



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
UNAM- CAMPUS JURQUILLA

**“CAPTURA Y EFECTOS ANTITUMORALES DEL YODO EN LÍNEAS
CELULARES DE CÁNCER PROSTÁTICO HUMANO”**

Tesis

Que para optar por el grado de:
Dra. en Ciencias Biomédicas

Presenta:

M. en C. Nuri Aranda López

Tutor

Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano
[Instituto de Neurobiología, UNAM](#)

Dr. Horacio Merchant Larios
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM,](#)

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera,
[Instituto de Neurobiología, UNAM](#)

QUERÉTARO, QRO., AGOSTO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó en el Instituto de Neurobiología bajo la dirección de la Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano. Este trabajo fue apoyado por CONACYT (127368, 176911) y PAPIIT-DGAPA (IN202513, IN200813). Nuri Aranda recibió beca CONACYT 883201.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Brenda Serrano por aceptarme como su alumna y por siempre tener un momento para escucharme y enseñarme. Gracias también por tu paciencia.

A la Dra. Carmen Aceves por su apoyo constante.

A la Técnico Académico Guadalupe Delgado, al Auxiliar de Laboratorio Felipe Ortiz Cornejo, en la Coordinación del Posgrado a Leonor Casanova Rico, en la Videoconferencia a Lourdes Lara Ayala, en la unidad de Cómputo al Ingeniero Ramírez Olvera y en la biblioteca al Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela. Gracias también a las secretarias del posgrado por su ayuda y buena disposición durante los trámites.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, Dr. Andrés Quintanar Stephano, Dr. Horacio Merchant Larios. Gracias por su ayuda y valiosos comentarios cada semestre y durante la revisión de esta tesis.

Por sus valiosos comentarios para mejorar este trabajo, a los miembros del jurado, Dra. Brenda Anguiano, Dra. Marcela Lizano, Dra. Vilma Maldonado, Dra. Aurea Orozco y Dra. María Elena Hernández.

A todos mis compañeros del laboratorio, los pasados y los presentes. Omar, Eva, Yunuén, Paloma, Mario, Laura, Elvira, Susana, Felipe. Gracias por los buenos momentos.

A mi familia. Gracias a mis papás; Jorge y Nuri, a mis hermanos; Jorge, Cecilia y Andrés. Agradezco profundamente todo el amor y las enseñanzas con las que han llenado y formado mi vida.

Gracias también a mis amigas incondicionales Idania, Araceli, Yunuén, Claudia y Margarita. Gracias por ser un apoyo constante en mi vida.

DEDICATORIA

Este trabajo lo entrego a mi esposo Salvador y a mis hijos Sebastián y Andrea. Gracias Salvador por tu apoyo incondicional. Gracias niños por permitirme ser su mamá.

ÍNDICE

Resumen	7
Introducción.....	8
Antecedentes.....	10
Próstata	10
Anatomía	10
Características histológicas.....	11
Características funcionales	13
Desarrollo de la próstata.....	14
Hormonas sexuales y próstata	15
Patologías prostáticas	16
Yodo	20
Captura de yodo en la tiroides.....	20
Captura de yodo en sitios extra-tiroideos	21
Organificación del yodo	21
Efectos antineoplásicos del yodo.....	22
Planteamiento del problema	23
Hipótesis	24
Objetivos.....	24
General.....	24
Específicos.....	24
Material y métodos	24
Reactivos	24
Líneas y cultivos celulares.....	25
Diseño experimental	26
Curso temporal de la captura de yodo	26
Efecto de los inhibidores de NIS y pendrina sobre la captura de yodo	26
Expresión de NIS y PDS	26
Efectos del yodo en la proliferación celular	27
Efectos del yodo sobre la apoptosis.....	27
Métodos analíticos.....	27
Conversión química de yoduro radiactivo a yodo molecular	27
Extracción de RNA.....	28
RT-PCR	28
Análisis de la viabilidad celular con el método de exclusión con azul de tripano	29
Western Blot.....	29
Cuantificación de proteínas	30
Determinación de apoptosis.....	30
Actividad de caspasa 3	30
Análisis estadístico	31
Resultados.....	31
Captura de yodo.....	31
Curso temporal y respuesta a ácido retinoico (AR).....	31
Expresión y participación de NIS y pendrina en las células cancerosas.	32
Efectos del yodo en la proliferación celular	32
Efectos del yodo en la apoptosis.....	39

Discusión	41
Conclusiones.....	44
Bibliografía.....	46
Publicación	58

RESUMEN

Está bien establecido que el yoduro es un micronutriente esencial en la fisiología tiroidea de todos los vertebrados. Este elemento es captado tanto por la tiroides como por tejidos extra-tiroideos en diversas formas químicas. Estudios en células cancerosas (tiroides, glándula mamaria, neuroblastoma) han mostrado que el yodo ejerce efectos antitumorales induciendo apoptosis e inhibiendo la expresión de factores de invasión celular. Estudios de nuestro laboratorio en roedores han mostrado que la próstata capta yodo en forma de yoduro (I^-) y yodo molecular (I_2). El propósito de esta tesis fue analizar los mecanismos de captura del yodo y sus efectos en la proliferación celular y apoptosis en líneas representativas de epitelio prostático humano no canceroso (RWPE-1), canceroso diferenciado (LNCaP) y canceroso indiferenciado (DU-145). Los resultados mostraron que las tres líneas celulares captan ambas formas químicas de yodo. Los análisis farmacológicos y moleculares indican que en las células RWPE-1, la captura de I^- depende del cotransportador Na^+ / I^- (NIS), mientras que en las células LNCaP depende de pendrina. La captura de I^- en la línea DU-145, así como la captura de I_2 en las tres líneas celulares, no depende de NIS ni de pendrina. En las tres líneas celulares, ambas formas químicas de yodo ejercen efectos antiproliferativos de manera dosis-dependiente. Las células RWPE-1 y LNCaP exhiben un IC_{50} para I^- de 371 ± 1.8 y $876 \pm 100 \mu M$, respectivamente; mientras que las DU-145 fueron resistentes a estas concentraciones. El IC_{50} para I_2 fue de 237 ± 13.7 , 181 ± 12.0 y $310 \pm 13.7 \mu M$ en las células RWPE-1, LNCaP y DU-145, respectivamente. En las tres líneas celulares, los incrementos en el índice Bax/Bcl-2 y en la actividad de caspasa 3, indican que ambas formas químicas de yodo inducen apoptosis a través de la vía de las caspasas. En términos generales, este trabajo muestra que las células prostáticas tienen la capacidad de captar yodo y que sus efectos dependen tanto de la especie química (yodo o yoduro) como del estado de diferenciación celular. Comprender estos procesos podría contribuir a la prevención y/o desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos.

INTRODUCCIÓN

Este trabajo forma parte de una línea de investigación encaminada a comprender la participación de los compuestos yodados en la fisiología y patología de la próstata. El cáncer de próstata representa un importante problema de salud pública debido a su alta incidencia y a la capacidad de generar metástasis. A nivel mundial existen diferencias importantes en la distribución de esta enfermedad. En Japón la incidencia de cáncer prostático (estandarizada por edad) es de 10 por cada 100 000 habitantes, aproximadamente la décima parte de la observada en Estados Unidos. Aunque el origen de este fenómeno aún no está claramente establecido, estudios epidemiológicos han sugerido la existencia de una relación entre el alto consumo de yodo y la menor incidencia del cáncer de próstata. No todos los tejidos captan yodo, pero se sabe que además de la tiroides, algunos tejidos extra-tiroideos normales o tumorales tienen la capacidad de hacerlo. Estudios en células cancerosas (tiroides, glándula mamaria, neuroblastoma) han mostrado que el tratamiento con yodo detiene la proliferación celular, induce apoptosis y reduce la expresión de factores asociados con invasión celular. La hipótesis de nuestro laboratorio plantea que estos efectos podrían estar mediados a través de la yodación del ácido araquidónico (AA) y la formación de lípidos bioactivos (yodolactonas). Existen evidencias de que la 6-yodolactona (6-IL) actúa como ligando de los receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) y se ha propuesto que este podría ser uno de los mecanismos por medio de los cuales el yodo ejerce sus efectos antineoplásicos. En modelos de roedores se ha reportado que la próstata normal y tumoral capta yodo en forma de yoduro (I^-) y de yodo molecular (I_2), y que la administración de una u otra forma química, previene la hiperplasia prostática asociada a la administración de hormonas sexuales. En cáncer prostático humano se ha reportado la presencia de un cotransportador de yoduro Na^+/I^- , pero se desconoce su relevancia funcional.

Con base a lo anterior el propósito de esta tesis fue caracterizar los mecanismos de captura y potenciales efectos antitumorales del yodo en líneas celulares de próstata humana. A continuación se revisan aspectos generales sobre la fisiología y patología de la próstata,

así como algunos antecedentes sobre el metabolismo del yodo. Posteriormente se presentan y discuten los resultados, y al final se anexa la publicación derivada de este trabajo.

ANTECEDENTES

Próstata

La próstata es una glándula mixta que está presente en todos los mamíferos. Se localiza en la base de la vejiga, rodeando completamente a la uretra, y junto con las vesículas seminales, el ámpula y las glándulas bulbouretrales, forma parte de las glándulas accesorias del sistema reproductor masculino (Cunha, et al., 1987).

Anatomía

Durante muchos años se tuvo el concepto que la próstata humana estaba organizada en lóbulos y es hasta la década de 1980 que los estudios de McNeal establecen que esta glándula es una estructura monolobulada compuesta por cuatro zonas concéntricas, las cuales convergen a la uretra prostática (Figura 1). La *zona de transición o periuretral* representa el 5% del volumen prostático y es la región más sensible a desarrollar hiperplasia prostática benigna (HPB). La *zona central* representa el 25% del volumen total, contiene los conductos eyaculatorios y es la región en donde primordialmente ocurren los procesos infecciosos. La *zona periférica* representa el 70% del volumen de la glándula y es el sitio en donde se presentan el 70% de los cánceres. La *zona anterior* está formada por tejido conectivo y carece de elementos glandulares. Esta región cubre completamente la superficie anterior de la glándula y se fusiona con el esfínter interno y el músculo detrusor de la vejiga (Selman, 2011).

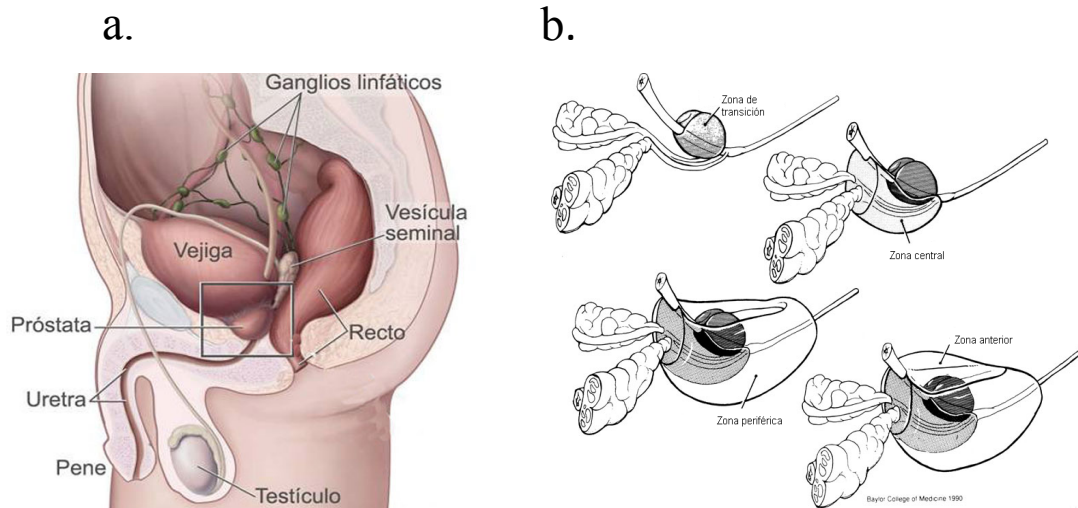


Figura 1. a) Localización anatómica de la próstata. Esta glándula se localiza debajo de la vejiga, rodeando a la uretra. **b) Zonas de la próstata.** Transición, central, periférica y anterior. Tomado de Oh, et al., 2003.

Características histológicas

El tejido prostático está compuesto por distintas poblaciones de células epiteliales (basales, neuroendócrinas y secretoras) y estromales (músculo liso, fibroblastos y endotelio) (Figura 2).

Componente Epitelial

Las células basales se localizan a lo largo de la membrana basal de cada conducto y se caracterizan por ser pequeñas, redondas, con poco citoplasma y núcleo grande de forma irregular. Estas células expresan citoqueratinas 5 y 14 y niveles bajos o indetectables de el receptor a andrógenos. Consecuentemente no expresan antígeno específico de próstata (PSA), ni fosfatasa ácida prostática (PAP). Estas células son poco diferenciadas y prácticamente no contienen productos de secreción. Se ha propuesto la existencia de una subpoblación de células troncales en este estrato y que el cáncer podría originarse a partir de estas células (Shen, et al., 2008).

Las células neuroendócrinas se localizan a lo largo de la membrana basal y se ha propuesto que a través de una interacción parácrina y/o autócrina, regulan la proliferación,

diferenciación y actividad de las células secretoras y neuroendocrinas adyacentes. Estas células expresan una gran variedad de péptidos, entre los que se encuentran la hormona estimulante de la tiroides, calcitonina, somatostatina, etc (Zapata, et al., 2004; Michel, 2010).

Las células secretoras o lumbinales constituyen el compartimiento exócrino de la glándula, son las más abundantes y se identifican fácilmente por su fenotipo secretor (núcleo en la base, complejo de Golgi altamente desarrollado y presencia de gránulos de secreción). Estas células están completamente diferenciadas y dependen de andrógenos para su proliferación y sobrevivencia.

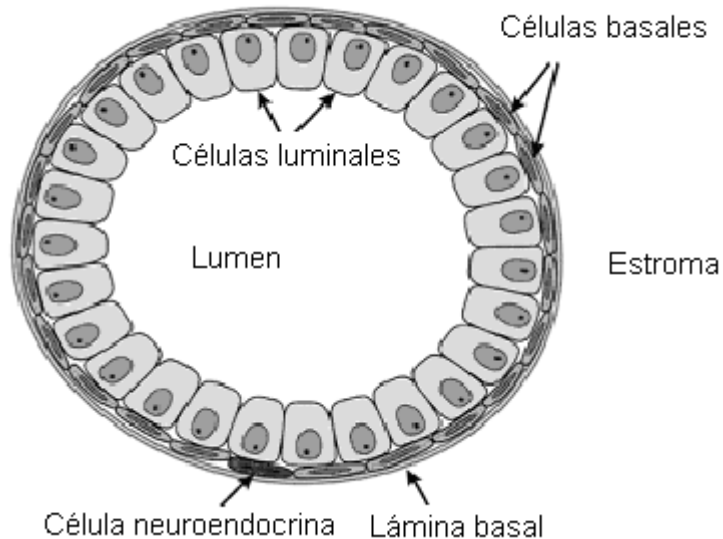


Figura 2. Representación de los tipos celulares presentes en la próstata. El componente epitelial está formado por las células lumbinales, basales y neuroendócrinas. El componente estromático carece de elementos glandulares y se conforma de músculo liso, fibroblastos, vasos sanguíneos y terminales nerviosas. Tomado de Abate-Shen C, 2000.

Componente Estromático

La próstata contiene varias poblaciones de células estromales, entre las que destacan fibroblastos, miofibroblastos, endotelio y fibras nerviosas (Lawson & Witte, 2007).

Características funcionales

La próstata produce y/o secreta al plasma seminal altas concentraciones de prostaglandinas, espermina, fructosa, ácido cítrico, zinc y diversos tipos de enzimas (PSA, fosfatasa ácida prostática, leucina amino-peptidasa, deshidrogenasa láctica, proteasas, esterasas y fosfatasas). Aunque la función de algunas de estas secreciones no está bien establecida, se ha sugerido que su acción conjunta promueve la movilidad y supervivencia de los espermatozoides. Algunos de estos factores, como los fosfatos y el bicarbonato actúan como buffers optimizando las condiciones de pH para la fertilización. El PSA participa en la lisis y coagulación del plasma seminal. Las altas concentraciones de azúcares (fructosa) proveen de energía a los espermatozoides y la presencia de lípidos disminuye el choque ambiental. Además, el epitelio secreta agentes bacteriológicos como el zinc y la espermina. En la Tabla 1 se resume algunos de los principales componentes que la próstata concentra, sintetiza y secreta.

Tabla 1. Principales productos de secreción del epitelio prostático.

Componente	Probable Función
Ácido cítrico	Agente antioxidante
Antígeno específico de próstata (PSA)	Disolución del coágulo seminal al degradar a la semenogelina.
IGFP-3	Sustrato para PSA. Al ser degradado, aumenta la biodisponibilidad de IGF.
Zinc	Inhibidor de la m-aconitasa. Actúa como agente antibacterial.
Poliaminas: espermina, espermidina y putrescina	Previenen la coagulación excesiva del líquido seminal. La espermina une iones fosfato, ácidos nucleicos y fosfolípidos.
Fosfatasa ácida	Hidrólisis de aldehídos, unión a poliaminas.

Desarrollo de la próstata

La próstata es un órgano de origen endodérmico cuyo desarrollo a partir del seno urogenital, comienza alrededor de la décima semana de la vida fetal en humanos (Meeks & Schaeffer, 2011). Su desarrollo, crecimiento y diferenciación dependen de andrógenos, y esta dependencia se basa en una interacción bidireccional epitelio-mesénquima.

En humanos, en la semana 10 de gestación surgen los primeros brotes epiteliales que dan lugar a la uretra y zona periférica prostática. Al final de la semana 15 las células basales se han desarrollado completamente, el epitelio secretor ha adquirido su fenotipo funcional y se pueden encontrar algunas células neuroendócrinas dispersas. En el tercer trimestre de la vida fetal, la próstata humana entra en un estado de quiescencia que se prolonga hasta la pubertad, cuando el epitelio prostático comienza nuevamente a proliferar. En la pubertad la próstata duplica su tamaño, las células epiteliales comienzan a expresar receptores a andrógenos y se establece completamente el fenotipo secretor. Entre los 45 y 50 años de edad, la próstata entra en un periodo de involución debido a que la producción de testosterona comienza a declinar (andropausia). Sin embargo es muy frecuente que en esta etapa la glándula entre en una segunda fase de crecimiento, dando lugar a patologías como la hiperplasia prostática benigna (HPB) o el cáncer (Figura 3).

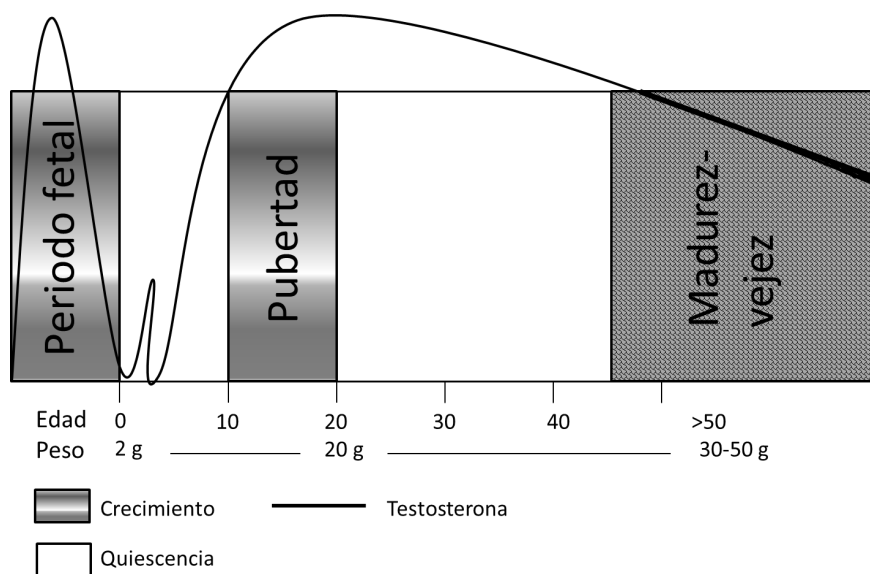


Figura 3. Desarrollo de la próstata en el humano. El crecimiento y diferenciación de la próstata ocurre en dos periodos críticos del desarrollo, el período fetal y puberal. Este proceso está asociado a un aumento en los niveles circulantes de testosterona. Es frecuente que entre la cuarta y quinta década de vida, la glándula presente un crecimiento patológico, el cual puede ser benigno o maligno.

Hormonas sexuales y próstata

La próstata es un órgano cuyo desarrollo, función y patología están íntimamente relacionados con el sistema neuroendócrino. Los andrógenos participan en el crecimiento, función y mantenimiento de la próstata. Estas hormonas actúan a través de la activación de los receptores de andrógenos (RA), que son receptores nucleares que regulan la expresión de genes cuyos productos están involucrados en procesos de proliferación, diferenciación y sobrevivencia celular (Brinkmann, 2011). Existen evidencias de que en ausencia de andrógenos el epitelio prostático involuciona como resultado de un mecanismo de apoptosis y el reemplazo con andrógenos estimula la proliferación celular, pero una vez que la glándula alcanza su tamaño “normal”, no aumenta más de tamaño, debido a que se alcanza un balance entre la proliferación y la apoptosis (Bruyninx, et al., 2000; Arnold & Isaacs, 2002).

En la próstata, la testosterona puede ser convertida a dihidrotestosterona o DHT (andrógeno más potente) por acción de la enzima 5α -reductasa, y también puede ser

transformada a estrógenos por la aromatasa P450 (Risbridger, et al., 2007). La próstata presenta dos subtipos de receptores a estrógenos, los ER α y ER β . La estimulación de los ER α , induce proliferación de la capa basal del epitelio prostático que resulta en metaplasia escamosa (Risbridger, et al., 2001; Taylor, et al., 2006). El ER β se encuentra principalmente en las células epiteliales y aunque aún no se definen bien sus efectos, se ha propuesto que son los responsables del efecto local antiproliferativo y apoptótico. En ratones con deficiencia de andrógenos la administración de estrógenos resulta en una respuesta proliferativa e inflamatoria tanto del estroma como del epitelio (Bianco, et al., 2002).

Patologías prostáticas

A diferencia de otros mamíferos, la próstata humana es altamente susceptible de desarrollar patologías crónicas como hiperplasia o cáncer. Hasta el momento no está bien clara la etiología de estas enfermedades, pero está bien establecido que su incidencia aumenta en los varones mayores de 50 años (SEER Cancer Statistics Review 1975-2009). A continuación se revisan aspectos generales asociados a estas patologías.

Hiperplasia prostática benigna (HPB)

El término HPB es utilizado por los clínicos para describir un síndrome que se acompaña de crecimiento prostático no maligno en la zona de transición, obstrucción de la uretra y sus consecuentes alteraciones del tracto urinario. En algunos casos la vejiga no logra vaciarse y esto se acompaña de infecciones, sedimentaciones y prostatitis. A todos estos síntomas se les llama *Síntomas del Tracto Urinario Inferior (LUTS)*. A diferencia del cáncer esta patología no es mortal, pero puede ser progresiva, impactando directamente en la calidad de vida de los pacientes. Entre los métodos de elección para el tratamiento de esta patología, se encuentran el uso de antiandrógenos, el uso de bloqueadores de los receptores α 1-adrenérgicos y procedimientos quirúrgicos (Michel, 2010).

Aunque no está claramente establecido el origen causal de la HPB, se ha propuesto que el componente endócrino podría contribuir a la protección o progresión de la enfermedad. No ha sido posible establecer una relación directa entre los niveles circulantes de hormonas sexuales y el desarrollo de la patología (Lee & Peehl, 2004) pero existen evidencias de que una disminución local en el cociente testosterona/estradiol podría contribuir en el desarrollo de la HPB (Banerjee, et al., 2001). En comparación con el tejido normal, la próstata hiperplásica presenta niveles elevados de aromatasa, sugiriendo un incremento local en los niveles de estrógenos (Hiramatsu, et al., 1997).

Diversos estudios sugieren fuertemente que los niveles elevados de PRL también provocan alteraciones del epitelio prostático como inflamación, displasia e hiperplasia, todas ellas análogas a las que presentan los pacientes con HPB (Ahonen, et al., 1999; Van Copponolle, et al., 2001). Estudios clínicos sugieren que la hiperprolactinemia podría estar asociada al desarrollo de HPB (Nevalainen, et al., 1997; Van Copponolle, et al., 2001). Estudios experimentales muestran que un aumento en los niveles circulantes de PRL promueve un incremento en el tamaño del alveolo y altura epitelial (Hernández, et al., 2006).

Neoplasia intraepitelial (NIP)

La neoplasia prostática intraepitelial (NIP) es un proceso característico del epitelio secretor que involucra tanto a los ductos como a los acinos. Se considera que la NIP representa una lesión precancerosa que se caracteriza por presentar “pseudo” estratificación epitelial así como núcleo y nucleolos grandes. En los acinos con NIP de alto grado se puede apreciar invasión temprana al estroma (Montironi, et al., 2007).

Cáncer

El 95 % del cáncer prostático está representado por el adenocarcinoma. De estos tumores, el 70 % se originan en la zona periférica, mientras que entre un 10 y un 20% proviene de las zonas de transición y central.

En 1941, un estudio realizado por Huggins y Hodges mostró que la ablación de andrógenos se acompaña de una regresión del cáncer, sugiriendo la existencia de una relación positiva entre los andrógenos y el crecimiento tumoral prostático. Sin embargo, está bien establecido que aunque los andrógenos promueven la proliferación del tumor, la administración de testosterona no aumenta la incidencia tumoral, los niveles bajos de testosterona no disminuyen el riesgo de cáncer, y no existe una correlación entre los niveles séricos de andrógenos y la enfermedad (Isbarn, et al., 2009; Morgentaler & Rhoden, 2006).

Dado que en las etapas iniciales del cáncer la proliferación y sobrevivencia de las células prostáticas depende de testosterona, una de las principales estrategias terapéuticas consiste en la remoción de andrógenos por métodos farmacológicos. Es bien conocido que los tumores prostáticos presentan niveles elevados de Bcl-2 (proteína antiapoptótica) y que la remoción de andrógenos induce apoptosis a través de la vía TGF- β -caspasas. Además existe evidencia que en las células privadas de andrógenos se detiene el ciclo celular en la fase G1, disminuyendo la expresión de ciclina D1 y de CDK4 (Knudsen, et al., 1998). Sin embargo en más del 40 % de los pacientes la enfermedad progresa en el lapso de uno o dos años a una segunda etapa, en la que la terapia anti-andrógenos ya no es efectiva y el tumor retoma una segunda fase de crecimiento y progresión metastásica. La opción de tratamiento para prolongar la sobrevivencia de estos pacientes es la quimio- o radioterapia. Se han identificado algunos mecanismos que podrían participar en la progresión tumoral.

1. Aumento en los niveles prostáticos de andrógenos. Existen evidencias de que en los pacientes con ablación sistémica de andrógenos, una disminución de casi 10 veces en los niveles circulantes de testosterona, no se refleja en falta de andrógenos a nivel tumoral, probablemente debido a una mayor expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de estas hormonas (Mostaghel, Montgomery, & Nelson, 2009).

2. Señalización aberrante del receptor a andrógenos. Se ha propuesto que la activación del receptor a andrógenos en presencia de poco ligando (aumento en la sensibilidad), podría ser producto de mutaciones en el dominio de unión al ligando,

permitiendo su activación no sólo por andrógenos, sino también por otros esteroides y factores de crecimiento (Brooke & Bevan, 2009).

3. Producción local de estrógenos. Otra vía de acción para los andrógenos es a través de su conversión a estrógenos. Las células cancerosas de próstata presentan un aumento en la expresión de la enzima P450-aromatasa, lo cual se acompaña de un aumento en la producción local de estrógenos (Ellem, et al., 2004). Estudios experimentales han mostrado que la administración combinada de testosterona y estrógenos promueve la aparición de neoplasia prostática intraepitelial adenocarcinoma prostático en una cepa de ratas susceptible a desarrollar lesiones prostáticas (Leav et al., 1989).

4. Otras vías de señalización. La fosforilación del receptor a andrógenos se ha asociado con el cáncer de próstata refractario a hormonas y se ha propuesto que las vías de señalización de las MAPK, asociadas a IGF, FGF y EGF podrían estar relacionadas con este proceso. Independientemente de que estos factores de crecimiento contribuyan *per se* a la proliferación y progresión del tumor (invasión y metástasis).

5. Células troncales cancerosas. Se ha propuesto que esta subpoblación de células indiferenciadas podrían ser las responsables de mantener el crecimiento del tumor, pues son capaces de sobrevivir en ausencia de andrógenos (Yu, et al., 2012; Brooke & Bevan, 2009)

Yodo

El yodo es un elemento no metálico, sólido, que pertenece a la familia de los halógenos; tiene número atómico 53 y peso atómico 126.91. Este elemento es poco abundante en la naturaleza, y su deficiencia representa un problema de salud mundial, por la implicación de este elemento en la fisiología tiroidea. A nivel poblacional la deficiencia de yodo se ha combatido a través de la yodación de la sal de mesa con yoduro $[I^-]$ o yodato $[IO_3^-]$ de sodio. Estudios recientes apoyan la noción que el yodo, además de ser un componente esencial en la síntesis de hormonas tiroideas, también regula algunos procesos celulares extra-tiroideos.

Captura de yodo en la tiroides

La tiroides es el órgano con mayor capacidad de captar yodo, siendo la concentración intracelular de I^- , de 20 a 40 veces mayor que en el plasma. En la tiroides como en otros tejidos, la captura de I^- depende del cotransportador Na^+/I^- (NIS). NIS es una glicoproteína de 13 dominios transmembranales que se localiza en la región basolateral de las células foliculares de la tiroides y cuya expresión depende de la hormona estimulante de la tiroides (TSH). Por medio de un mecanismo de transporte activo, el NIS cotransporta 2 iones Na^+ (a favor de su gradiente) y un ión I^- (en contra de su gradiente) hacia el interior de la célula (Carrasco, 1993). La fuerza electromotriz del NIS está dada por el gradiente de concentración de Na^+ generado por la ATPasa Na^+/K^+ (De la Vieja, et al., 2000). El transporte de I^- mediado por NIS es bloqueado por inhibidores competitivos de aniones como el perclorato (ClO_4^-) y el tiocianato (Chung, 2002). Además de NIS, se conoce la existencia de otro transportador de I^- sensible a ácido disulfónico-2,2'-etilbeno-4,4'-diisotiocianato (DIDS) denominado pendrina (Shennan & Boyd, 1986; Rillema & Hill, 2003). Aunque este transportador se localiza en la membrana apical del tirocito y transloca el I^- al coloide (Russo, et al., 2001), también se ha mostrado su presencia en la membrana basal de células cancerosas de tiroides y mama (Skubis-Zegadlo, et al., 2005, Rillema & Hill, 2003). En tiroides se ha descrito la existencia de un tercer transportador de yoduro denominado transportador de yoduro apical humano (*AIT*), codificado por otro gen que

muestra un 70% de homología con el NIS, se encuentra en la región apical del tirocito y se encarga de la transferencia de I^- de la membrana apical hacia el coloide, de manera similar a pendrina (Lacroix, et al., 2004).

Captura de yodo en sitios extra-tiroideos

Las glándulas salivales, el estómago, la glándula mamaria lactante y los plexos coroides son órganos que comparten con la tiroides la capacidad de captar I^- a través del transportador NIS (Carrasco, 1993). Además de estos tejidos, la expresión de NIS (mRNA y proteína) también se ha mostrado en timo, hipófisis, páncreas, testículo y en niveles más bajos en ovario, adrenal, pulmón y próstata, (Spitzweg, et al., 1998; Wapnir, et al., 2003). Es bien conocido que la regulación de NIS está bajo un control órgano-específico. En la tiroides, la expresión depende de TSH; mientras que en los tejidos extratiroides cancerosos, el NIS es inducido por ácido retinoico (Kogai, et al., 2000).

Hasta el momento se desconoce la identidad molecular del transportador de I_2 . Estudios en algas marinas cafés del género *Laminaria*, muestran que el I^- presente en el agua de mar es oxidado por la exoenzima haloperoxidasa convirtiéndolo a I_2 ó ácido hipoyodoso, y es en estas formas químicas que es internalizado por un mecanismo de difusión facilitada (Kupper, et al., 1998). Consistentemente, se ha mostrado que las células cancerosas mamarias captan I_2 por un mecanismo independiente de NIS y pendrina, y se ha propuesto la existencia de un mecanismo de difusión facilitada, dado que la captura es específica y saturable, pero independiente de ATP y Na^+ (Arroyo-Helguera, et al., 2006; Anguiano, et al., 2007).

Organificación del yodo

Existen evidencias de que el yodo puede organificarse en aminoácidos, proteínas y lípidos. En la tiroides el I^- se incorpora a los residuos tirosilo de la globulina tiroidea como parte de la vía de síntesis de hormonas tiroideas, mientras que en la glándula mamaria lactante se incorpora a la caseína de la leche (Strum, 1978; Shah, et al., 1986). En ambos

tejidos la organificación del I^- ocurre por mecanismos enzimáticos, requiriéndose la presencia de enzimas peroxidadas, como la tiro- y lactoperoxidasa, respectivamente. Además se sabe que en ambos tejidos, el I^- puede organificarse a lípidos (ácidos grasos poliinsaturados) y dar lugar a la formación de lactonas. Existe evidencia de que la administración de I^- reduce el crecimiento tiroideo en la glándula con bocio, a través de un mecanismo apoptótico (Hintze, et al., 1989; Stübner, et al., 1987) y se ha propuesto que la formación endógena de 6-yodolactona podría estar involucrada en este proceso (Vitale, et al., 2000; Mutaku, et al., 2002).

Efectos antineoplásicos del yodo

Existen datos que apoyan la noción que el yodo contribuye a mantener la integridad de los epitelios normales y cancerosos. La deficiencia de yodo por períodos prolongados se acompaña de lesiones benignas mamarias, las cuales pueden ser prevenidas mediante la suplementación con I_2 (Eskin et al., 1995; Ghent, et al., 1993; Kessler, 2004). En tumores mamarios de rata se ha mostrado que la administración de yodo en forma de lugol ($I_2 + I^-$), disminuye la proliferación del tumor (Funahashi, et al., 1999; Funahashi, et al., 2001; García-Solís, et al., 2005; Soriano, et al., 2011). Es importante destacar que en el cáncer mamario, el I^- no tiene el mismo efecto protector que el del I_2 . El único modelo en el que se ha observado un efecto antineoplásico del I^- es en los tumores mamarios inducidos con dimetilbenzantraceno (DMBA). Este efecto se ha explicado a través de la inducción de la lacto-peroxidasa, lo cual permitiría la oxidación del I^- a I_2 , siendo este último quien ejercería el efecto protector (Soriano, et al., 2011).

Existen evidencias de que los efectos apoptóticos y antiproliferativos del I_2 podrían estar mediados por la activación de diversas vías. En células MCF-7 (cáncer mamario) los efectos apoptóticos del I_2 involucran vías dependientes (aumenta p53, p21, Bax y caspasa 7) e independientes de caspasas (aumenta el potencial de membrana mitocondrial, PARP1, AIF) (Shrivastava, et al., 2006; Arroyo-Helguera, et al., 2008).

Estudios de nuestro grupo han mostrado que el I_2 tiene la capacidad de unirse al ácido araquidónico y generar un yodolípido llamado 6-yodolactona, el cual actúa como ligando de los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR) (Nuñez-Anita et al., 2009). Los efectos antiproliferativos y apoptóticos de la 6-IL y de los agonistas a PPAR-gamma están bien documentados en el bocio, así como el cáncer mamario y prostático (Dugrillon, et al., 1990; Dugrillon, et al., 2003; Jarrar & Barranova, 2007; Matsuyama & Yoshimura, 2008).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La incidencia de cáncer prostático es de 5 a 10 veces menor en sociedades asiáticas (Japón) en comparación con sociedades occidentales (EUA) (GLOBOCAN 2008). Estas diferencias se han atribuido a factores ambientales, pues en la descendencia de los japoneses que emigran a los Estados Unidos, la incidencia aumenta y se empata a la de occidente (Shimizu, et al., 1991, Moyad & Carroll, 2004). Es bien aceptado que el factor dietético puede participar en este fenómeno. La dieta Japonesa contiene por lo menos dos componentes que podrían participar en esta prevención; la soya y las algas marinas. La soya posee un alto contenido de fitoestrógenos (isoflavonas) a los cuales se les han adjudicado propiedades antineoplásicas (Kumar, et al., 2012). Por otro lado, las algas poseen un alto contenido de yodo, pues concentran 30,000 veces más yodo que cualquier otro ser vivo (Küpper, et al., 2008; Cann, et al., 2000). Se ha reportado que la población japonesa consume alrededor de 30 veces más yodo que la ingesta diaria recomendada (Cann, et al., 2000). Son escasos los estudios que relacionan la ingesta de yodo y la incidencia de cáncer prostático, pero un estudio retrospectivo mostró una asociación no significativa, entre la ingesta alta de yodo y una disminución del riesgo (Cann, et al., 2007). Estudios de nuestro laboratorio han mostrado que la próstata de rata y ratón capta yodo en forma de yoduro (I^-) y de yodo molecular (I_2) (Anguiano, et al., 2007; Aceves & Anguiano, 2009; Olvera-Caltzontzin, et al., 2012). Estos hallazgos correlacionan con la expresión de los transportadores de yoduro, NIS y pendrina en la próstata humana normal y cancerosa (Spitzweg, et al., 1998; Navarra, et al., 2010). En un modelo experimental de hiperplasia prostática se encontró que el suplemento con I^- o I_2 en el agua para beber (0.5

%) previene la hiperplasia asociada a la administración de hormonas sexuales (Aceves & Anguiano, 2009), y que el tratamiento con 6-IL induce apoptosis en células humanas de cáncer prostático (Aranda, et al., 2013). Con base en lo anterior, el propósito de este trabajo fue analizar la captura y propiedades antineoplásicas del yodo, en un modelo *in vitro* de cáncer prostático humano

HIPÓTESIS

Las células de cáncer de próstata humano captan yodo, y este ejerce efectos antiproliferativos y/o apoptóticos.

OBJETIVOS

General

Caracterizar los mecanismos de captura y los efectos del yodo en la proliferación celular y apoptosis en líneas celulares humanas no cancerosas y cancerosas de próstata.

Específicos

1. Analizar el curso temporal, así como la expresión y participación de NIS y pendrina en la captura de I_2 y I^- .
2. Evaluar los efectos de ambas formas químicas de yodo en la proliferación celular y apoptosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

Los medios de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), KSFM (*Keratinocyte Serum Free*), la solución de sales balanceada (HBSS), la glutamina (GlutaMAX-I), el suero fetal bovino (SFB), la penicilina, la estreptomina, la solución de tripsina-EDTA y todos los reactivos para la extracción de

RNA y RT-PCR (grado biología molecular) fueron obtenidos de Invitrogen (Carlsbad, CA). El Na¹²⁵I fue de NEN Life Science Products (Boston, MA, USA). El perclorato de potasio (KClO₄), el 4,4'-diisotiocianatoestilbena-2,2'-ácido disulfónico (DIDS), el ácido retinoico todo-trans y el estuche comercial para determinar la actividad de caspasa-3 provinieron de Sigma (St Louis, MO). Los inhibidores de proteasas Mini Complete y el estuche para detectar apoptosis fueron obtenidos de Roche Applied Sciences (Indianapolis, USA). Los anticuerpos para Bax, Bcl-2 y β-actina provinieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Las membranas de nitrocelulosa y el reactivo de Bradford fueron de Bio-Rad (Richmond, CA). El sistema de detección por quimioluminiscencia (ECL) fue de Amersham Life Science (Buckinghamshire, U.K).

Líneas y cultivos celulares

Las líneas celulares de epitelio prostático humano se obtuvieron de la ATCC (Manassas, VA). La línea RWPE-1 proviene de la zona periférica de una próstata adulta no cancerosa, mientras que las líneas LNCaP y DU-145 provienen de una metástasis a ganglio linfático y cerebro, respectivamente. En algunos experimentos se utilizaron las células MCF-7 (epitelio mamario humano canceroso) y las FRTL-5 (epitelio tiroideo de rata) como control positivo de la captura y expresión de los transportadores de yodo.

La línea RWPE-1 se creció en medio KSFM suplementado con 0.05 mg/ml de extracto de hipófisis bovina y 5 ng/ml de factor de crecimiento epidermal. La línea LNCaP se creció en medio RPMI-1640 suplementado con 2mM de glutamina. Las líneas DU145, MCF-7 y FRTL-5 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% SFB. Todos los medios se suplementaron con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las tres líneas celulares fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Diseño experimental

Curso temporal de la captura de yodo

En las tres líneas celulares se analizó la captura de I₂ y I⁻ en células previamente tratadas con 10 μM de ácido retinoico todo-trans por 48 horas para inducir la expresión de NIS. Las células (1 x 10⁶) se sembraron en placas de seis pozos y se incubaron con yodo radiactivo (0.5 μCi ¹²⁵I₂ o Na¹²⁵I) durante 5, 10, 15, 30, 60 o 90 minutos a 37°C. La incubación se detuvo a los tiempos respectivos, colocando las placas en frío (4°C) y removiendo el medio de cultivo. Las placas se lavaron dos veces y las células se resuspendieron en PBS. La captura inespecífica se determinó adicionando yodo radiactivo y lavando inmediatamente después. La radiactividad retenida se cuantificó en un contador de emisiones gamma. La captura específica es la diferencia de la captura total menos la captura inespecífica. Los resultados se expresan como pmolas yodo captado /10⁶ células.

Efecto de los inhibidores de NIS y pendrina sobre la captura de yodo

Las células cancerosas fueron preincubadas por 48 horas en ausencia o presencia de 10 μM de ácido retinoico (inducción NIS) e incubadas por 15 min con 50 μM de ClO₄⁻ (inhibidor NIS) y/o 1 mM DIDS (inhibidor pendrina).

Expresión de NIS y PDS

La expresión de los RNAm para NIS y PDS se analizó mediante un análisis de RT-PCR, en células incubadas durante 48 horas, en ausencia o presencia de 10 μM de ácido retinoico. Las células MCF-7 tratadas con ácido retinoico y FRTL-5 fueron utilizadas como control positivo de la expresión de NIS y pendrina, respectivamente.

Efectos del yodo en la proliferación celular

Las células se sembraron en placas de seis pozos (5×10^4) y fueron tratadas con diferentes concentraciones de I_2 o I^- . El efecto del I_2 se analizó a las 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento y el del I^- a las 72 horas. Los grupos control recibieron medio de cultivo como vehículo. El número de células viables se analizó con el método de exclusión con azul tripano. A partir de una función sigmoide, se calculó el EC50 para una u otra forma química de yodo a las 72 horas de tratamiento.

Adicionalmente se realizó un experimento con el propósito de analizar la capacidad proliferativa de las células a las que se les retira el tratamiento. Las células LNCaP y RWPE-1 fueron tratadas con 200 μ M de I_2 y las DU-145 con 400 μ M. A las 96 horas se les retiró el yodo y la proliferación celular se evaluó en el transcurso de las siguientes 72 horas.

Efectos del yodo sobre la apoptosis

Las células fueron tratadas con 200 μ M (LNCaP y RWPE-1) o 400 μ M (DU-145) de I_2 o I^- por 72 horas. La apoptosis se evaluó mediante la determinación de mono y oligonucleosomas por medio de un ELISA. El índice de las proteínas Bax/Bcl2 se analizó mediante Western Blot y la actividad de caspasa 3 se cuantificó por medio de un ensayo enzimático colorimétrico.

Métodos analíticos

Conversión química de yoduro radiactivo a yodo molecular

La conversión de $^{125}I_2$ a partir de $^{125}I^-$ se realizó con el método de McAlpine (1945). Este método se basa en una reacción de oxidación, la cual consiste en incubar el $^{125}I^-$ en presencia de H_2O_2 y HCl. Por cada μ l de $^{125}I^-$ se adiciona 10 μ l de HCl (0.001 N) y 10 μ l de H_2O_2 (30%).

Extracción de RNA

La extracción de RNA total se llevó a cabo utilizando TRIzol® Reagent. Las células se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se añadió 200 µl de cloroformo y la mezcla se centrifugó (4°C) a 12.000 g durante 10 minutos. Se separó la fase acuosa y el RNA se precipitó con 500 µl de isopropanol. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos (4°C). El etanol se evaporó y el precipitado se resuspendió en agua estéril. La cantidad de RNA se cuantificó por medio de un espectrofotómetro a 260 nm (Beckman DU 650). La pureza del ácido nucleico se determinó por medio del cociente 260/280.

RT-PCR

La retrotranscripción se realizó a partir de 2 µg de RNA total y 10 pmoles de oligo d(T). Esta mezcla se incubó 5 minutos a 45°C y posteriormente se agregó el la mezcla de desoxinucleótidos (10 nM), y la enzima Superscript transcriptasa reversa (200 U). La reacción se incubó 1 hora a 37°C y 5 minutos a 95°C. El DNA complementario (cDNA) se conservó a -20°C. El PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl cuya mezcla contiene de 1-2 µl cDNA, 1 µl dNTP (Mix 10x), 5 µl Buffer (10x KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 mM, gelatina 10 µg/l), 2.5 µl MgCl₂ (30 mM), 1 µl oligos específicos (10 pmol), y 5 U Taq polimerasa. Las muestras se desnaturalizaron a 94°C por 45 s, seguido de 32 ciclos de 45 s, a 62°C para NIS, 65°C para pendrina y 55°C para actina. Posteriormente se llevó a cabo una incubación a 72°C por 1 min. El último ciclo se realizó con una extensión de 3 minutos a 72°C. La electroforesis de los amplicones se realizó en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo un transiluminador UV. El tamaño del producto generado se confirmó usando un marcador de DNA (1 Kb DNA ladder, GIBCO-BRL). En la tabla 2 se muestran los oligos utilizados en los ensayos de RT-PCR.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en la PCR

mRNA	GenBank Clave acceso	Sentido/Anti sentido
β -actina	NM-031144	GTC CCA GTA TGC CTC TGG TCG TAC / CCA CGC TCG GTC AGG ATC TTC ATG
Pendrina	AF167412	CAT TCT GGG GCT GGA CCT C / CCT TCG GGA CAT TCA CTT TCA
NIS	U60282	CCG GAT CAA CCT GAT GGA CT / CCT GAG GGT GCC ACT GTA AG

Análisis de la viabilidad celular con el método de exclusión con azul de tripano

Este método se basa en la capacidad de las células muertas de incorporar el colorante y teñirse de azul (Horvathova et al., 2006). El número de células viables se obtiene del número total menos el número de muertas. Las células se resuspenden en 1 ml de medio de cultivo y de esta suspensión se toman 10 μ l y se mezclan con 5 μ l de azul de tripano. Las células se cuentan en un hematocímetro. La proliferación celular se determinó en función del número de células vivas por unidad de tiempo. Los resultados se reportan en porcentaje (%) y representan el incremento del número de células en función del tiempo [número de células vivas \div número inicial (100)].

Western Blot

Las células se lisaron en 300 μ l de amortiguador de lisis que contiene SDS 10%, NaCl 5M, EDTA 0.5M, Tris (1M, pH 8). Por cada 30 ml de amortiguador se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas MiniComplete. La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Bradford. La fracción proteica (50-70 μ g) fue colocada en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% y posteriormente fue transferida a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Life Science). Los sitios de unión inespecífica se bloquearon durante 2h con leche libre de grasa al 5% en 25 ml de amortiguador TTBS (20

mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7.4, 0.05% Tween 20). Las membranas se incubaron con anticuerpos policlonales para Bax (1:800), Bcl-2 (1:200) y β -actina (1:100) durante 12 h a 4°C. Posteriormente las membranas se lavaron varias veces en TTBS y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1:500). La señal se detectó por quimioluminiscencia ECL (Amersham). El análisis densitométrico se determinó con el software ImageQuant TL v2005, (Amersham).

Cuantificación de proteínas

El método de Bradford se basa en el cambio de color que ocurre cuando el reactivo azul brillante de Coomassie reacciona con los residuos de arginina en un medio ácido (Bradford M, 1976). El reactivo presenta una tonalidad café, y cambia a diferentes tonalidades de azul dependiendo de la concentración de proteínas. La absorbancia se determina a una longitud de onda de 550 nm. Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar y la curva se construyó en un intervalo de 1 - 10 μ g de proteína.

Determinación de apoptosis

El índice de apoptosis se determinó mediante un ensayo cuantitativo de ELISA, el cual se basa en la determinación de mono- y oligonucleosomas en el citoplasma. Las células se preincubaron en un buffer de lisis y posteriormente se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-histonas (marcado con biotina) y un anticuerpo anti-DNA (conjugado con peroxidasa). Los resultados se expresan como porcentaje de apoptosis con respecto a las células no tratadas.

Actividad de caspasa 3

Las células se lisaron y homogeneizaron en un buffer de lisis (250 mM HEPES, pH 7.4, 25 mM CHAPS, 25 mM DTT). Los homogeneizados se centrifugaron a 12500 rpm x 15 min (4°C) y en el sobrenadante se determinó la actividad de la caspasa 3 mediante un ensayo colorimétrico. El ensayo consistió en incubar 50 μ g de proteína con 10 μ l de

sustrato (DEVD-pNA) durante 4 horas a 37°C. Las muestras se mantuvieron en oscuridad durante la incubación y el producto de la reacción se detectó a una absorbancia de 415 nm en un lector de ELISA. Las lecturas de cada muestra fueron interpoladas en una curva de calibración de p-nitroanilina (pNA).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M (error estándar de la media) de por lo menos 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Las diferencias entre grupos fueron analizadas utilizando el análisis de varianza (ANOVA) de 1 o 2 vías y la prueba de Tukey de comparación múltiple. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Captura de yodo

Curso temporal y respuesta a ácido retinoico (AR)

La captura de I^- , se presenta desde los primeros 10 minutos y alcanza sus valores mas altos en el transcurso de 30 (DU-145) o 60 minutos (RWPE-1 y LNCaP) (Figura 1). En el panel derecho se muestra que el tratamiento con 1 μ M ácido retinoico, aumentó la captura de I^- en las células RWPE-1, pero no tuvo ningún efecto en las LNCaP o DU-145. La figura 2 muestra que en las tres líneas celulares, la captura de I_2 se presenta desde los primeros 5 minutos y alcanza los valores más altos alrededor de los 10 minutos. El panel derecho muestra que el tratamiento con 1 μ M ácido retinoico, no aumenta la captura de I_2 en ninguna de las líneas celulares.

Expresión y participación de NIS y pendrina en las células cancerosas.

La captura de I^- se analizó en ausencia y/o presencia de inhibidores de NIS (ClO_4^-) y/o pendrina (DIDS). La figura 3 muestra que la administración de ClO_4^- no tuvo efecto sobre la captura del I^- en ninguna de las líneas celulares, mientras que el DIDS redujo la captura de I^- en las LNCaP, pero no tuvo efecto en las RWPE-1 o DU-145. Los análisis de RT-PCR (mRNA) mostraron que el NIS se expresa selectivamente en las células RWPE-1 y pendrina en las células LNCaP, mientras que las células DU-145, no expresan NIS, ni pendrina.

Efectos del yodo en la proliferación celular

Los resultados de la figura 4 muestran el curso temporal dosis-respuesta del I_2 en las tres líneas celulares. A partir de estos datos se calculó el IC50 para I_2 y se encontró que las células RWPE-1 requieren una concentración 237 μM para inhibir el 50 % de su proliferación, mientras que las células LNCaP y DU-145 requieren concentraciones 181 μM y 310 μM , respectivamente. Las células LNCaP resultaron ser más sensibles que las RWPE-1 y DU145 a los efectos del I_2 . La figura 5 muestra los efectos antiproliferativos del I^- en las tres líneas celulares. El IC50 para I^- en las células RWPE-1 y LNCaP fue de 371 y 876 μM , respectivamente. Las células DU-145 fueron resistentes al I^- a las concentraciones y tiempos analizados.

Adicionalmente se analizó la capacidad proliferativa de las células RWPE-1 y LNCaP a las que se les retira el yodo, tras previo tratamiento con I_2 o I^- por 96 horas. La concentración de yodo utilizada en este estudio equivale al IC50 respectivo para cada línea celular y la tasa de proliferación se evaluó a las 72 horas post-administración. Los resultados de la figura 5 y tabla 4 muestran que al retirar el yodo, las células retoman su velocidad de proliferación y al cabo de 72 horas la velocidad se equipara con la del grupo no tratado.

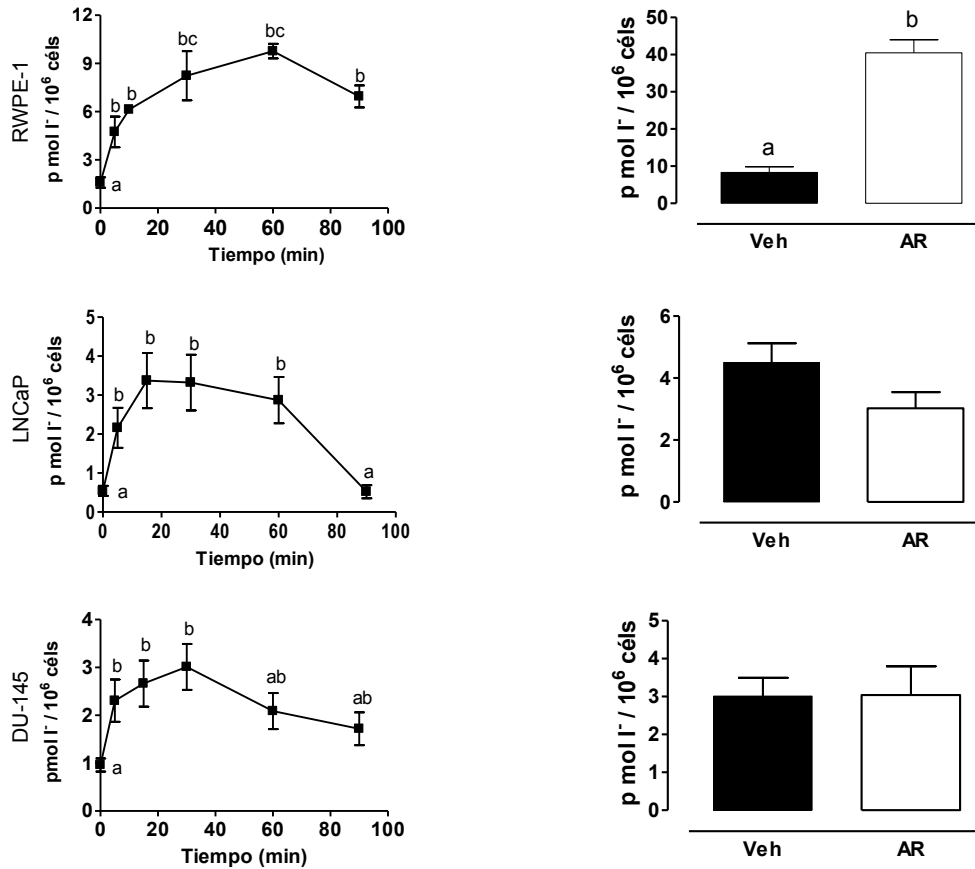


Figura 1. Captura de yoduro radiactivo (¹²⁵I). Curso temporal y respuesta a ácido retinoico. Los cultivos fueron tratados con 0.6 μCi ¹²⁵I y la captura radiactiva fue detectada en un contador gamma en un intervalo de 5 a 90 minutos. En células previamente tratadas con 10 μM ácido retinoico (AR, 48 horas), se evaluó la captura de yoduro radiactivo a los 30 minutos post-administración. Los datos se expresan como media ± EEM. Letras diferentes implican diferencias significativas, ANOVA y Tukey como prueba *post hoc*, p < 0.05. n = 3-6 experimentos independientes realizados por duplicado.

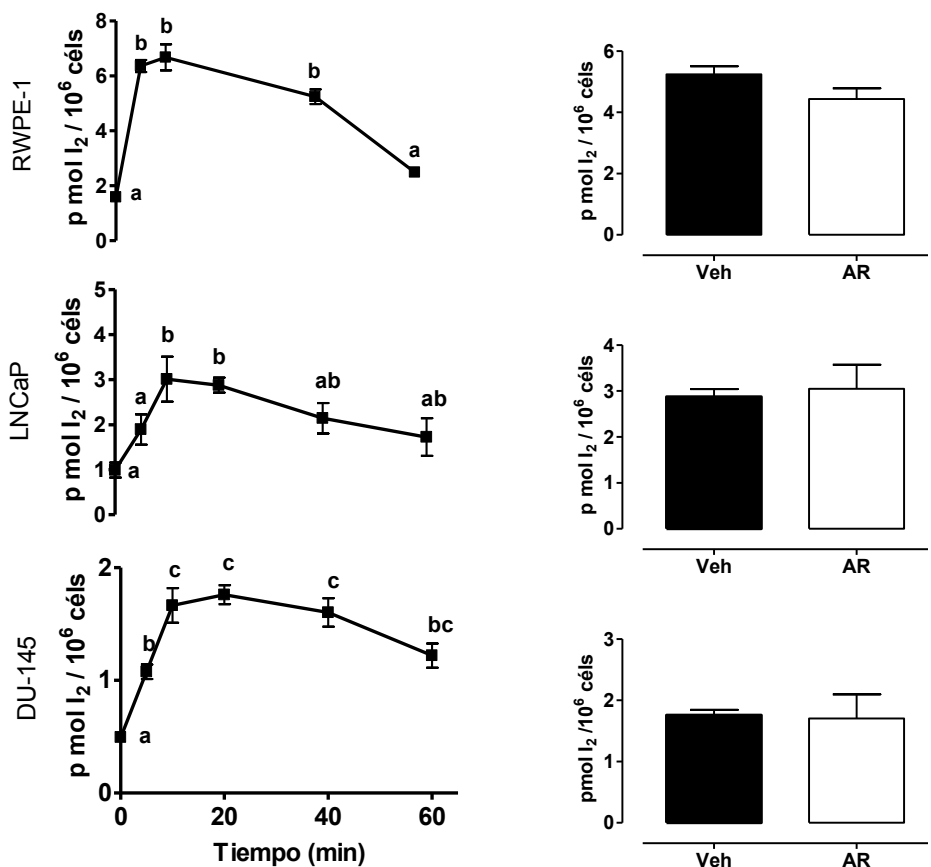


Figura 2. Captura de yodo radiactivo ($^{125}\text{I}_2$). Curso temporal y respuesta a ácido retinoico. Los cultivos fueron tratados con $0.6 \mu\text{Ci } ^{125}\text{I}_2$ y la captura radiactiva fue detectada en un contador gamma en un intervalo de 5 a 60 minutos. En células previamente tratadas con $10 \mu\text{M}$ ácido retinoico (AR, 48 horas), se evaluó la captura de yodo radiactivo a los 30 minutos post-administración. Los datos se expresan como media \pm EEM. Letras diferentes implican diferencias significativas, ANOVA y Tukey como prueba *post hoc*, $p < 0.05$. $n = 3-6$ experimentos independientes realizados por duplicado.

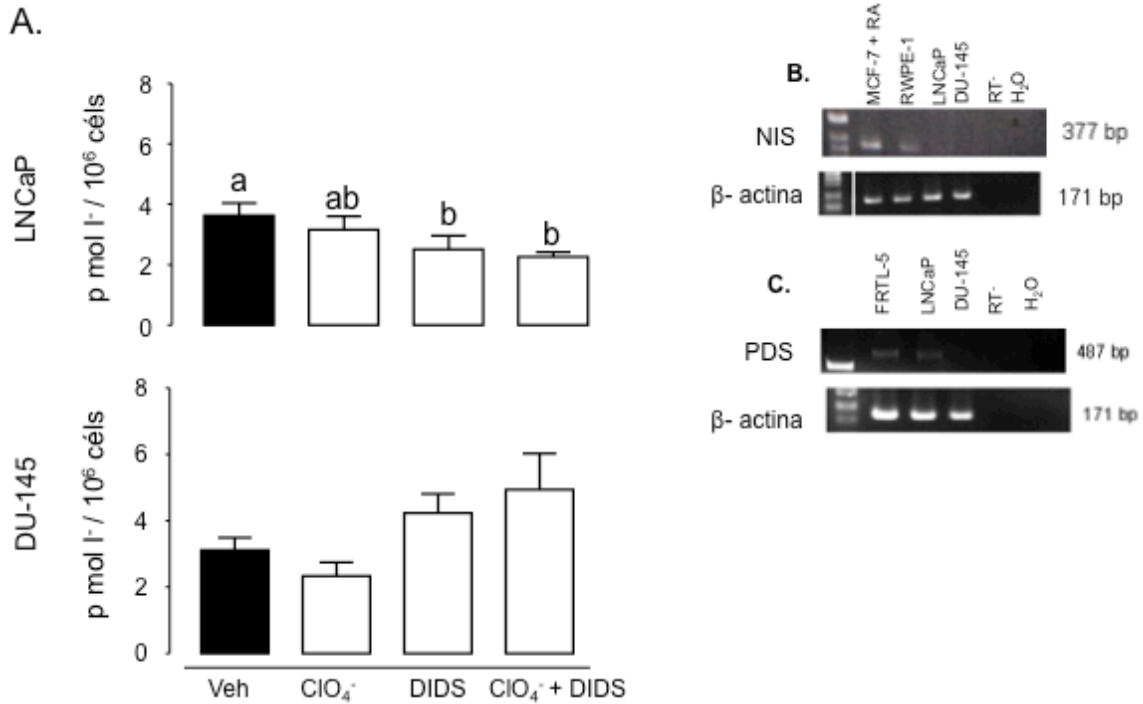
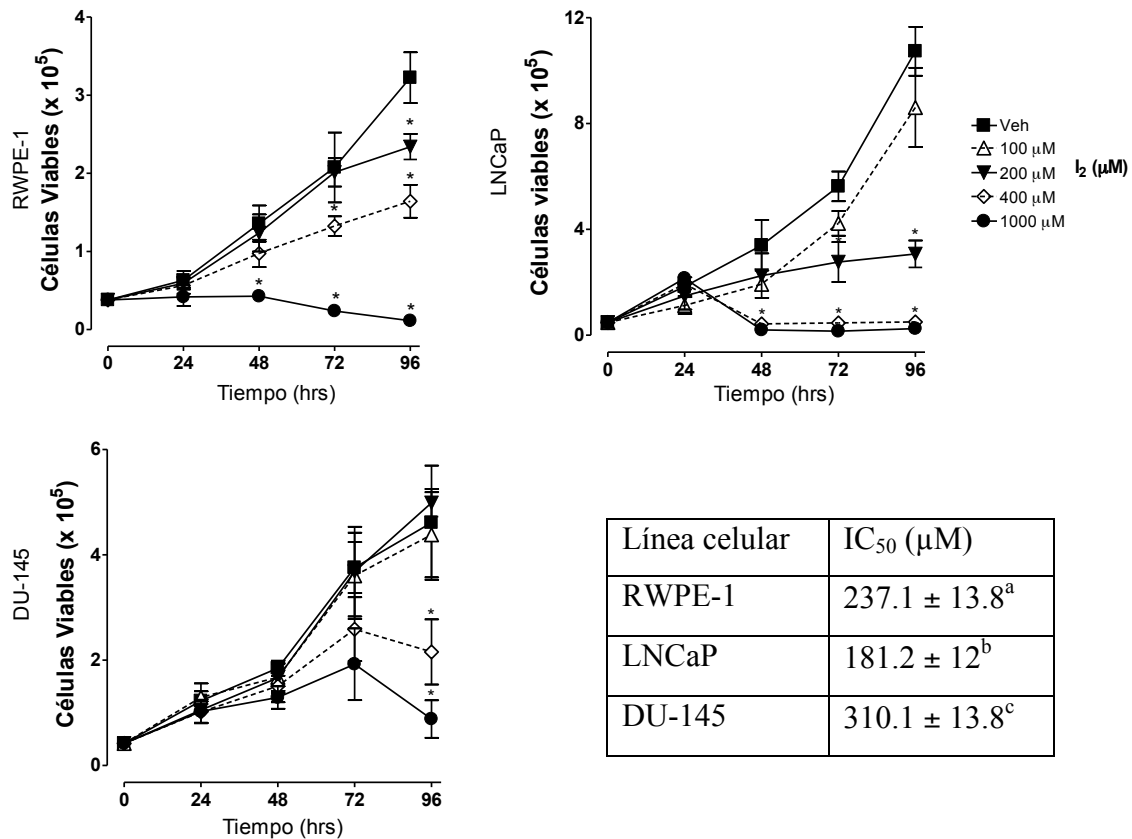


Figura 3. A. Efecto de los inhibidores de yoduro en la captura de $^{125}\text{I}^-$ en las células de cáncer prostático. Las células fueron pre-incubadas durante 15 min con $50 \mu\text{M ClO}_4^-$ y / o 1 mM DIDS . Posteriormente las células fueron tratadas con $0.6 \mu\text{Ci } ^{125}\text{I}^-$ y la captura se determinó 30 minutos post-administración. La radiactividad se determinó en un contador gamma. $n = 3-4$. Los valores se expresan como la media \pm EEM. Letras diferentes representan diferencias significativas, $p < 0.05$. ANOVA, Tukey. **B-C. Expresión (mRNA) de NIS y pendrina.** Electroforesis en geles de agarosa (2%) de los productos de RT-PCR. Como control de la cantidad e integridad del mRNA se analizó la expresión de un gen constitutivo como β -actina. Las células MCF7 tratadas con AR (MCF+AR) fueron utilizadas como control positivo de la expresión de NIS y las células FRTL-5 fueron utilizadas como control positivo de pendrina. Imagen representativa de 3 ensayos independientes.

Tabla 4. Efectos del yodo en la tasa de proliferación celular

Línea Celular	Basal	I ₂		I ⁻	
		Tratamiento	Suspensión	Tratamiento	Suspensión
RWPE-1	37 ± 3	59 ± 5*	32 ± 9	48 ± 1*	43 ± 5
LNCaP	28 ± 2	47 ± 13*	27 ± 4	49 ± 9*	30 ± 9

Las células fueron tratadas con 200 µM de I₂ o 400 µM I⁻ durante 96 horas. A este tiempo se les retiró del medio de incubación el tratamiento con yodo y se evaluó la proliferación celular durante las siguientes 72 horas. Los resultados representan el tiempo (horas) que tardan las células en duplicarse. El tratamiento con I₂ o I⁻ aumentó la latencia de duplicación celular, lo cual se refleja en una disminución en la proliferación celular. Este efecto se revirtió cuando el I₂ o I⁻ fue removido. n = 3 experimentos independientes realizados por duplicado. *P<0.05, con la prueba t de Student.



Línea celular	IC ₅₀ (μM)
RWPE-1	237.1 ± 13.8 ^a
LNCaP	181.2 ± 12 ^b
DU-145	310.1 ± 13.8 ^c

Figura 4. Efecto del I₂ en la proliferación celular. El número de células viables se determinó mediante un ensayo de exclusión con azul de Tripano. El IC₅₀ para I₂ se calculó a las 72 horas de tratamiento, mediante una regresión no lineal. Letras distintas representan diferencias significativas, p < 0.05 con la prueba post hoc de Tukey. Los datos se expresan como la media ± EEM, n = 5 ensayos independientes.

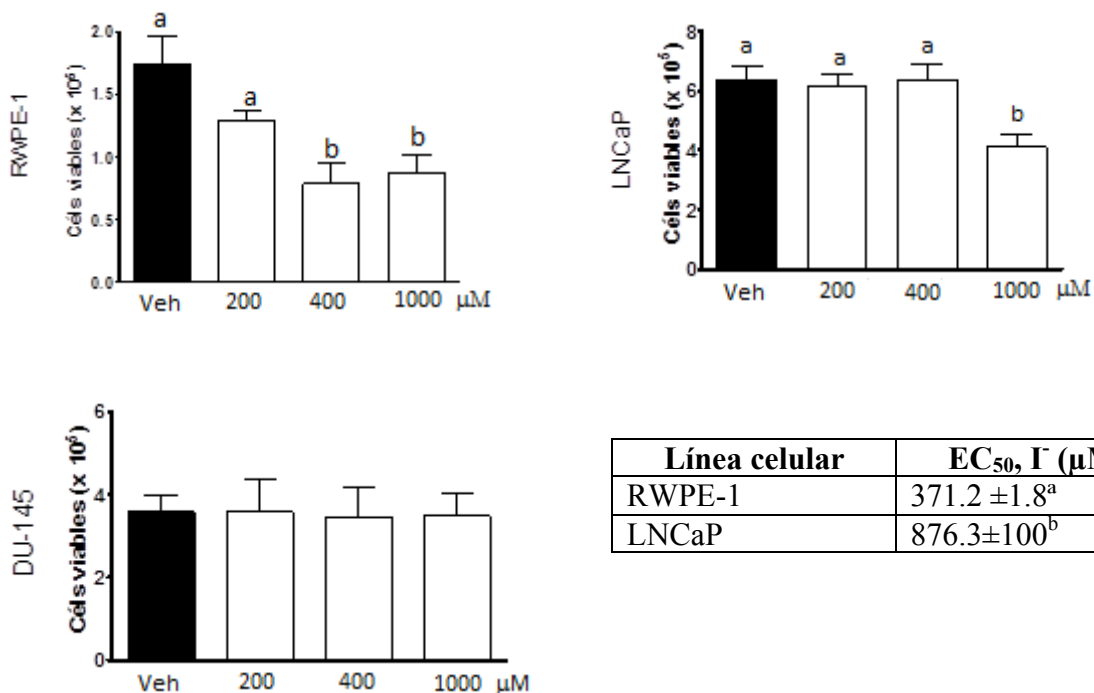


Figura 5. Efecto del I⁻ sobre la proliferación celular. El número de células viables se determinó mediante un ensayo de exclusión con azul de Tripano. El IC₅₀ para I⁻ se calculó a las 72 horas de tratamiento, mediante una regresión no lineal. Letras distintas representan diferencias significativas, $p < 0.05$ con la prueba post hoc de Tukey. Los datos se expresan como la media \pm EEM, $n = 5$ ensayos independientes.

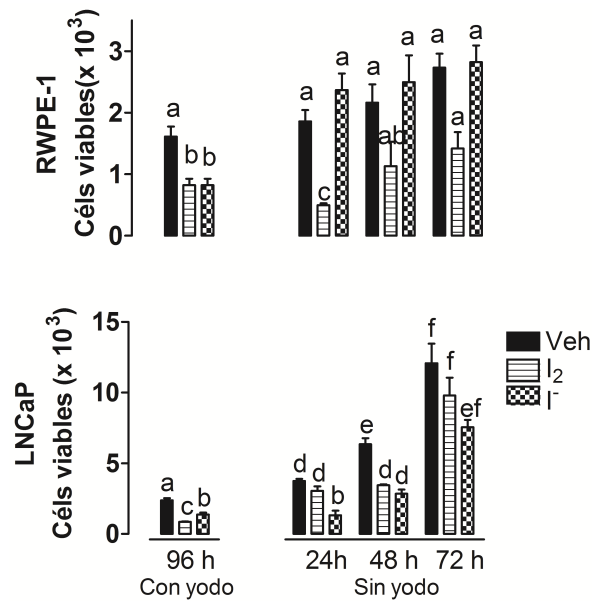
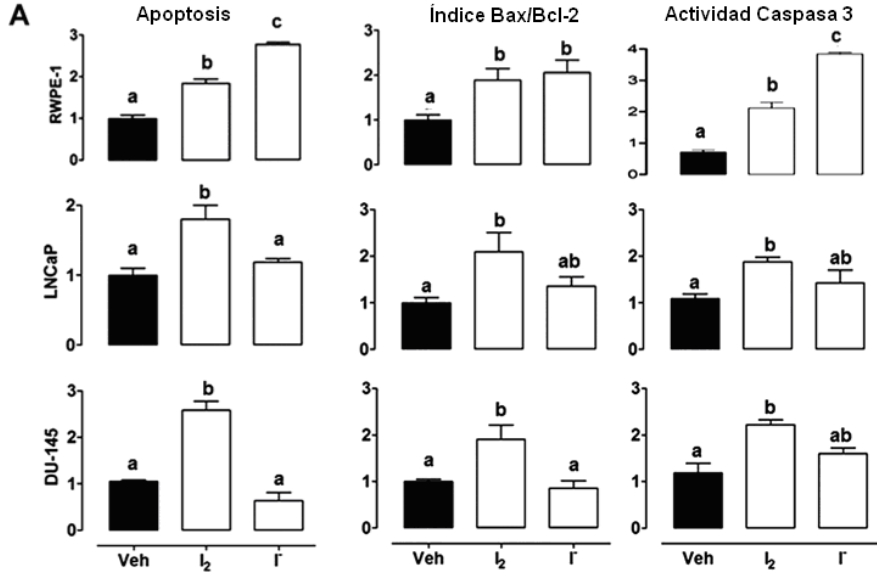


Figura 6. Efectos de la remoción del yodo sobre la proliferación celular. Las células fueron tratadas con 200 μM I_2 o 400 μM I^- durante 96 horas. Se retiró el yodo y se evaluó la proliferación celular en el transcurso de las siguientes 72 horas. El número de células viables se determinó mediante conteo directo utilizando el ensayo de exclusión con azul de Tripano. Los datos se reportan como la media \pm EEM, $n = 5$. Letras distintas implican diferencias significativas. ANOVA de dos vías, $p < 0.05$ con la prueba *post hoc* de Tukey.

Efectos del yodo en la apoptosis

En la figura 7 se muestran los efectos del yodo sobre la apoptosis. El tratamiento con I_2 induce apoptosis, aumenta el cociente Bax/Bcl₂ y la actividad de caspasa 3 en las tres líneas celulares. En contraste, el tratamiento con I^- sólo tiene estos efectos en las células RWPE-1. En las células cancerosas no se observaron diferencias significativas secundarias al tratamiento con I^- .



B Western Blots

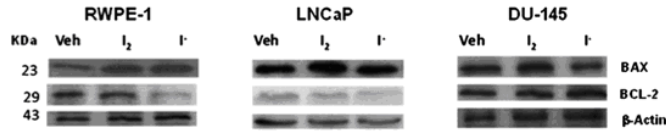


Figura 7. Efectos del yodo sobre la apoptosis. **A.** Las células fueron tratadas con I₂ o I₁ durante 72 horas con 400 μM de I₂ o I₁. Se muestra el % de apoptosis, el cociente Bax / Bcl-2 y la actividad de caspasa 3. Los resultados representan el % de cambio con respecto al grupo no tratado (vehículo). n = 3 experimentos independientes. Letras distintas implican diferencias significativas. ANOVA, p < 0.05 con la prueba *post hoc* de Tukey. **B.** Imágenes representativas de los inmunoblots. Los resultados fueron normalizados con respecto a la cantidad de β-actina.

DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis mostraron que las células humanas de epitelio prostático no canceroso y canceroso captan yoduro (I^-) y yodo molecular (I_2), y que el tratamiento con estas formas químicas induce efectos antiproliferativos y apoptóticos a través de la vía de las caspasas.

La expresión de NIS (mRNA) en las células RWPE-1, así como el aumento en la captura de I^- secundario al tratamiento con ácido retinoico, sustentan la participación de este transportador en la captura de yoduro en las células no-cancerosas. Este dato concuerda con la expresión de NIS en el tejido prostático normal (Spitzweg, et al., 1998; Perron, et al., 2001). En contraste en las líneas cancerosas la captura de I^- no fue estimulada por ácido retinoico y no fue inhibida por el perclorato. Estos hallazgos, aunados a la nula expresión de NIS, corroboran que en las células cancerosas, el mecanismo de internalización del I^- es independiente de NIS. Estudios previos han mostrado que efectivamente las células LNCaP no expresan NIS, y que a diferencia de otras células tumorales (tiroides y glándula mamaria), este no es inducido con ácido retinoico (Schmutzler, et al., 1997; Simon, et al., 1998; Kogai, et al., 2000; Spitzweg, et al., 2003). Sin embargo, en adenocarcinomas de próstata humana se ha mostrado que la expresión de NIS es heterogénea, presentándose en alrededor del 50 % de las muestras analizadas (Navarra, et al., 2010). En otros tipos de cáncer se ha mostrado una disminución en la expresión de NIS y en la captura de I^- , apoyando la noción de una regulación órgano-específica de NIS (Maxon & Smith, 1990; Ward, et al., 2003). Se requieren estudios específicos que permitan conocer la regulación de NIS en la próstata normal y tumoral. En la tiroides, la TSH es el principal regulador de la expresión de NIS y de la captura de I^- (Dohán & Carrasco, 2003; Nunez-Anita, et al., 2011) mientras que en la glándula mamaria es la prolactina (Rillema, et al., 2000).

La expresión de pendrina en las células LNCaP, así como la inhibición de la captura de I^- por DIDS, sugiere la participación de la pendrina en éstas células (Lacroix, et al., 2001). En el tirocito la pendrina se expresa en la membrana apical y participa en el eflujo

de I^- hacia el lumen, requiriéndose altas concentraciones de I^- (> 1 mM) para funcionar como transportador (Yoshida, et al., 2004; Yoshida, et al., 2002). Aparentemente en tejidos extra tiroideos como el epitelio mamario normal y tumoral, la función de pendrina está asociada con la entrada de I^- a las células (Rillema & Hill, 2003; Anguiano, et al., 2007). Nuestros resultados farmacológicos y moleculares en las células DU-145, descartan la participación de NIS y pendrina en la captura de I^- y sugieren la participación del algún otro transportador de aniones. Por ejemplo, existen evidencias que el I^- puede ser internalizado por los transportadores de Cl^- , cuyos valores de K_m oscilan en el intervalo mM (Bourke & Nelson, 1971).

Nuestros resultados en las células de cáncer prostático mostraron que la captura de I_2 es un proceso independiente de NIS y pendrina. Estudios previos de nuestro grupo mostraron que en las células de cáncer mamario (MCF-7), el transporte de I_2 está mediado por un mecanismo de difusión facilitada independiente de Na^+ y ATP (Arroyo-Helguera, et al., 2006). Consistentemente a través de un mecanismo de este tipo, las algas marinas del género *Laminaria* poseen la propiedad de internalizar diferentes especies oxidadas de yodo hacia el interior de la célula (Kupper, et al., 1998).

Nuestros datos mostraron que ambas formas químicas de yodo ejercen efectos antiproliferativos y apoptóticos, siendo las células LNCaP dos veces más sensibles a los efectos del I_2 que las DU-145. La mayor sensibilidad de las células LNCaP al I_2 no está asociada con los niveles de captura, pues estas células captan lo mismo que las DU-145, pero la mitad de lo que captan las RWPE-1. En diferentes líneas celulares se ha mostrado una amplia gama de sensibilidades a los efectos del I_2 . Las células de cáncer mamario dependientes de estrógenos (MCF-7) y las de neuroblastoma (SH-SY5Y) son más sensibles que las células de cáncer mamario independientes de estrógenos (MDA-MB231, MDA-MB134, MDA-MB157) o colon (CCL-221), mientras que las células de epitelio mamario no canceroso (MCF-10, MCF-12F) y los fibroblastos (NIH3T3) son las menos sensibles al arresto celular y a la apoptosis inducida por I_2 (Arroyo-Helguera, et al., 2006; Shrivastava, et al., 2006; Rosner, et al., 2010). En las células prostáticas se observó un aumento en el índice Bax/Bcl-2 y en la actividad de caspasa 3 en respuesta al I_2 . Estos resultados

corroboran la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. En células humanas de cáncer de tiroideo y mamario han mostrado que el yodo induce apoptosis a través de la vía intrínseca o mitocondrial (Gärtner, et al., 2010). Se ha observado la activación de elementos de la vía de las MAPKs, entre ellos p21, Bcl-XL y p53 (Liu, et al., 2010). Además en células de cáncer mamario el tratamiento con I₂ puede inducir la traslocación nuclear de AIF y la activación proteolítica de PARP1, activando una vía apoptótica independiente de caspasas (Shrivastava, et al., 2006; Arroyo-Helguera, et al., 2008).

Es probable que la mayor sensibilidad de las células LNCaP al I₂ esté relacionada con el aumento en la concentración de ácido araquidónico. Se ha reportado que estas células poseen niveles significativamente mayores de ácido araquidónico en comparación con células prostáticas no cancerosas ó de carcinoma prostático invasivo (Dahiya, et al., 1992). Diversos estudios han mostrado que el ácido araquidónico es el precursor de un lípido yodado llamado 6-yodolactona, el cual podría actuar como intermediario de los efectos del I₂ (Arroyo-Helguera, et al., 2008; Gärtner, et al., 2010). Existen evidencias que los tumores mamaros presentan niveles cuatro veces más altos de ácido araquidónico en comparación con el tejido normal y que la suplementación con I₂ induce la formación de este yodolípido en los tumores mamaros (Rillema & Mulder, 1978; Aceves & Anguiano, 2009). Estudios de nuestro grupo han mostrado que la 6-yodolactona podría actuar como ligando de los receptores PPAR y de esta manera regular la expresión de genes asociados a ciclo celular, apoptosis y diferenciación celular (Nuñez-Anita, et al., 2009; Nunez-Anita, et al., 2011). En apoyo a lo anterior, estudios recientes de nuestro grupo muestran que la administración exógena de 6-IL induce apoptosis en las células de cáncer prostático (Aranda, et al., 2013).

Aunque en el cáncer de próstata no se ha explorado, otro posible mecanismo de acción del I₂ es regular el balance redox (Arroyo-Helguera, et al., 2008; Shrivastava, et al., 2006). La administración de I₂ a células MCF-7 se acompaña de una disminución en los niveles de especies reactivas de oxígeno y del contenido de tioles (Shrivastava, et al., 2006).

En concordancia con el I_2 , el tratamiento con I^- también tuvo efectos antiproliferativos y apoptóticos, siendo las células prostáticas no cancerosas las más sensibles. Estudios en cáncer mamario o bocio han mostrado que para que el I^- se organifique en lípidos y ejerza sus efectos antineoplásicos, se requiere que éste sea transformado a una forma oxidada como el I_2 y existen evidencias de que las enzimas pro-oxidantes lacto- y tiroperoxidasas están involucradas en este proceso (Tramontano, Veneziani, Lombardi, Villone, & Ingbar, 1989; (Arroyo-Helguera, et al.??, 2008; Soriano, et al., 2011). Un estudio reciente mostró la presencia de una mieloperoxidasa en el tejido prostático y es probable que esto explique los efectos antiproliferativos y apoptóticos del I^- al ser oxidado a I_2 (Roumégère, et al., 2012).

En términos generales este estudio muestra que el yodo induce efectos apoptóticos en células humanas de cáncer prostático y concuerda con el hecho de que la administración conjunta de ambas formas químicas de yodo (Lugol, $I_2 + I^-$) reduce el crecimiento tumoral en un modelo de cáncer en ratones inmunosuprimidos (Aranda et al., 2013). Estudios experimentales y clínicos han mostrado que el tratamiento suplementario con I_2 reduce el crecimiento asociado a la hiperplasia prostática (Aceves & Anguiano, 2009). La mayor sensibilidad de las células prostáticas al I_2 sugiere el uso de esta forma química como un potencial agente terapéutico.

CONCLUSIONES

1. Las células humanas de próstata no cancerosa y cancerosa captan yodo en forma de yoduro (I^-) y yodo molecular (I_2).

El NIS participa en el transporte de I^- de las células RWPE-1 y LNCaP, pero no en las DU-145.

El NIS no participa en el transporte de I_2 en ninguna línea celular.

2. El yodo induce efectos antiproliferativos de manera diferencial, dependiendo del estado de diferenciación celular.

Las células RWPE-1 son más sensibles a los efectos del I^- , mientras que las LNCaP son más sensibles al I_2 .

Las células DU-145 fueron resistentes a los efectos de una u otra forma química.

3. Los efectos apoptóticos del I^- o I_2 son mediados por la vía Bax/caspasas

Este estudio sustenta las bases para explorar los potenciales efectos terapéuticos del yodo en modelos in vivo.

BIBLIOGRAFÍA

Abate-Shen C, S. M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes and Development, 14*, 2410-2434.

Aceves, C., & Anguiano, B. (2009). Is iodine an antioxidant and antiproliferative agent for the mammary and prostate glands? En: Comprehensive Handbook of iodine. Nutritional, Endocrine and Pathological aspects. En B. G. Preedy VR (Ed.). Academic Press.

Aceves, C., García Solís, P., Arroyo-Helguera, O., Vega-Riveroll, L., Delgado, G., & Anguiano, B. (2009). Antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. Participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferators-activated receptors (PPAR). *Molecular Cancer, 8*, 33-36.

Ahonen, T., Härkönen, P., Laine, J., Rui, H., Martikainen, P., & Nevalainen, M. (1999). Prolactin is a survival factor for androgen deprived rat dorsal and lateral prostate epithelium in organ culture. *Endocrinology, 140*, 5412-5421.

Anguiano, B., García Solís, P., Delgado, G., & Aceves, C. (2007). Uptake and gene expression with antitumoral doses of iodine in thyroid and mammary gland: Evidence that chronic administration has not harmful effects. *Thyroid, 17*, 851-859.

Aranda, N., Sosa, S., G, D., Aceves, C., & Anguiano, B. (2013). Uptake and antitumoral effects of iodine and 6-iodolactone in differentiated and undifferentiated human prostate cancer cell lines. *Prostate, 73*, 31-41.

Arnold, J., & Isaacs, J. (2002). Mechanisms involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault. *Endocrine Related Cancer, 9*, 61-73.

Arroyo-Helguera, O., Delgado, G., & Aceves, C. (2006). Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocrine Related Cancer, 13*, 1147-1158.

Arroyo-Helguera, O., Rojas, E., Delgado, G., & Aceves, C. (2008). Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. *Endocrine Related Cancer*, *15*, 1003-1011.

Banerjee, P., Banerjee, S., & Brown, T. (2001). Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe specific spontaneous hyperplasia of the Brown Norway rat prostate. *Endocrinology*, *142*, 4066-4075.

Bianco, J., Handelsman, D., Pedersen, J., & Risbridger, G. (2002). Direct response of murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinology*, *143*, 4922-4933.

Bourke, R., & Nelson, K. (1971). Further studies on the K⁺ dependent swelling of the primate cerebral cortex in vivo: the enzymatic basis of the K⁺ dependent transport of chloride. *Journal of Neurochemistry*, *19*, 663-685.

Brinkmann AO, F. P. (1996). Structural and functional aspects of androgen receptors in normal and pathological situations. En K. Pasqualini JR (Ed.), *Hormone-dependent cancer* (págs. 323-342).

Brinkmann. (2011). Molecular mechanisms of androgen action: a historical perspective. *Methods in Molecular Biology*, *776*, 3-24.

Brooke, G., & Bevan, C. (2009). The Role of Androgen Receptor Mutations in Prostate Cancer Progression. *Current Genomics*, *10*, 18-25.

Bruyninx, M., Ammar, H., Reiter, E., Cornet, A., & Closset, J. (2000). Genes upregulated during castration induced rat prostatic apoptosis: cloning and characterization of new cDNAs. *British Journal of Urology International*, *85*, 1134-1142.

Cann, S., van Netten, J., & van Netten, C. (2000). Hypothesis: iodine, selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes Control*, *11*, 121-127.

Cann, S., Van Netten, J., & Van Netten, C. (2007). Hypothesis: iodine, selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes Control*, *11*, 121-127.

Carrasco, N. (1993). Iodide transport in the thyroid gland. *Biochemica et Biophysica Acta*, *1154*, 65-82.

Chung, J. (2002). Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *Journal of Nuclear Medicine*, *43*, 1188-2000.

Cunha, G., Donjacour, A., Cooke, P., Mee, S., Bigsby, R., Higgins, S., y otros. (1987). The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrine Reviews*, *70*, 388-362.

Dahiya, R., Boyle, B., Goldberg, B., Yoon, W., Konety, B., Chen, K., y otros. (1992). Metastasis-associated alterations in phospholipids and fatty acids of human prostatic adenocarcinoma cell lines. *Biochemistry and Cell Biology*, *70*, 548-554.

De la Vieja, A., Dohan, O., Levy, O., & Carrasco, N. (2000). Molecular analysis of sodium / iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiological Reviews*, *80*, 1083-1105.

Dohán, O., & Carrasco, N. (2003). Advances in Na(+)/I(-) symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *213*, 59-70.

Dugrillon, A., Bechtner, G., Uedelhoven, W., Weber, P., & Gärtner, R. (1990). Evidence that iodolactone mediates the inhibitory effect of iodide on thyroid cell proliferation but not adenosine 3'-5'-monophosphate formation. *Endocrinology*, *127*, 337-343.

Dugrillon, A., Uedelhoven, W., Pisarev, M., Bechtner, G., & Gärtner, R. (1994). Identification of delta-iodolactone in iodide treated human goiter and its inhibitory effect on proliferation of human thyroid follicles. *Hormone and Metabolic Research*, *26*, 465-469.

Ellem, S., Schmitt, J., Pedersen, J., Frydenberg, M., & Risbridger, G. (2004). Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *89*, 2434-2441.

ER, B. (1996). Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 63, 403-412.

Eskin, B., Grotkowski, C., Connolly, C., & Ghent, W. (1995). Different tissue responses for iodine and iodide in rat thyroid and mammary glands. *Biological Trace Element Research*, 49, 9-19.

Funahashi, H., Imai, T., Mase, T., Sekiya, M., Yokoi, K. H., Nshikawa, M., y otros. (2001). Seaweed prevents breast cancer? *Japanese Journal of Cancer Research*, 92, 483-487.

Funahashi, H., Imai, T., Tanaka, Y., Tsukamura, K., Hayakawa, Y., Kikumori, T., y otros. (1999). Wakame seaweed supresses the proliferation of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene-induced mammary tumors in rats. *Japanese Journal of Cancer Research*, 90, 922-927.

García-Solís, P., Alfaro, Y., Anguiano, B., Delgado, G., Guzmán, R., Nandi, S., y otros. (2005). Inhibition od N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I₂) but not by iodide (I⁻) treatment. Evidence that I₂ prevents cancer promotion. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 236, 49-57.

Gärtner, R., Rank, P., & Ander, B. (2010). The role of iodine and delta-iodolactone in growth and apoptosis of malignant thyroid epithelial cells and breast cancer cells. *Hormones*, 9, 60-66.

Ghent, W., Eskin, B., Low, D., & Hill, L. (1993). Iodine replacement in fibrocystic disease of the breast. *Cancer Journal of Surgery*, 36, 453-460.

Hernández, M., Soto-Cid, A., Rojas, F., Pascuali, A.-A. G., Toledo, R., García, L., y otros. (2006). Prostate response to prolactin in sexually active male rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17, 4-28.

Hintze, G., Emrich, D., & Köbberling, J. (1989). Treatment of endemic goiter due to iodine deficiency with iodine, levothyroxine or both: results of a multicentre trial. *European Journal of Clinical Investigation*, 19, 527-534.

Hiramatsu, M., Maehara, I., Ozaki, M., Harada, N., Orikasa, S., & Sasano, H. (1997). Aromatase in hyperplasia and carcinoma of the human prostate. *Prostate*, *31*, 118-124.

Isbarn, H., Wanner, M., Salomon, G., Steuber, T., Schlomm, T., Köllermann, J., y otros. (2009). Long-term data on the survival of patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy in the prostate-specific antigen era. *Journal of the British Association of Urological Surgeons*, *106*, 37-43.

Jarrar, M., & Barranova, A. (2007). PPARgamma activation by thiazolidinediones (TZDs) may modulate breast carcinoma outcome: the importance of interplay with TGFbeta signaling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *11*, 71-87.

Kessler, J. (2004). The effect of supraphysiologic levels of iodine on patients with cyclic mastalgia. *The Breast Journal*, *10*, 328-336.

Knudsen, K., Arden, K., & Cavenee, W. (1998). Multiple G1 regulatory elements control the androgen-dependent proliferation of prostatic carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, *273*, 20213-20222.

Kogai, T., Schultz, J., Johnson, L., Huang, M., & Brent, G. (2000). Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*, 8519-8524.

Kumar, N., Crocker, T., Smith, T., Pow-Sang, J., Spiess, P., Connors, S., y otros. (2012). Prostate cancer chemoprevention targeting high risk populations: model for trial design and outcome meadures. *Journal of Cancer Science and Therapy*, *2011*, S3.

Küpper, F., Carpenter, L., McFiggans, G., Palmer, C., Waite, T., Boneberg, E., y otros. (2008). Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*, 6954-6958.

Kupper, F., Schweigert, N., Gall, E., Legendre, J., Vilter, H., & Kloareg, B. (1998). Iodine uptake in laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta*, *207*, 163-171.

Lacroix, L., Mian, C., Caillou, B., Talbot, M., Filetti, S., Schlumberger, M., y otros. (2001). Na⁺/I⁻ symporter and Pendred syndrome gene and protein expression in prostate cancer. *Cancer Research*, *15*, 5331-5335.

Lacroix, L., Pourcher, T., Magnon, C., Bellon, N., Talbot, M., Intaraphairot, T., y otros. (2004). Expression of the apical iodide transporter in human thyroid tissues: a comparison study with other iodide transporters. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *89*, 1423-1428.

Langer, R., Burzler, C., Bechtner, G., & Gärtner, R. (2003). Influence of iodide and iodolactones on thyroid apoptosis. Evidence that apoptosis induced by iodide is mediated by iodolactones in intact porcine thyroid follicles. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, *111*, 325-329.

Lawson, D., & Witte, O. (2007). Stem cells in prostate cancer initiation and progression. *Journal of Clinical Investigation*, *117*, 2044-2050.

Leav, I., Merk, F., Kwan, P., & Ho, S. (1989). Androgen-supported estrogen enhanced epithelial proliferation in prostates of intact Noble rats. *Prostate*, *15*, 23-40.

Lee, K., & Peehl, D. (2004). Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Journal of Urology*, *172*, 1784-1791.

Liu, X., Chen, G., Vlantis, A., Tse, G., & Van Hasselt, C. (2010). Iodine induces apoptosis via regulatins MAPKs-related p53, p21, and Bcl-xL in thyroid cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *14*, 128-135.

Matsuyama, R., & Yoshimura, R. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a potent target for prevention and treatment in human prostate and testicular cancer. *PPAR Research*, *2008*, 249849.

Maxon, H., & Smith, H. (1990). Radioiodine-131 in the diagnosis and treatment of metastatic well differentiated thyroid cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *19*, 658-718.

Meeks, J., & Schaeffer, E. (2011). Genetic regulation of prostate development. *Journal of Andrology*, 32, 210-217.

Michel, M. (2010). The forefront for novel therapeutic agents based on the pathophysiology of lower urinary tract dysfunction: alpha-blockers in the treatment of male voiding dysfunction - how do they work and why do they differ in tolerability? *Journal of Pharmacological Sciences*, 112, 151-157.

Montironi, R., Mazzucchelli, R., Lopez-Beltran, A., Cheng, L., & Scarpelli, M. (2007). Mechanisms of disease: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and other proposed preneoplastic lesions in the prostate. *Nature Clinical Practice Urology*, 4, 321-332.

Morgentaler, A., & Rhoden, E. (2006). Prevalence of prostate cancer among hypogonadal men with prostate-specific antigen levels of 4.0 ng/mL or less. *Urology*, 68, 1263-1267.

Mostaghel, E., Montgomery, R., & Nelson, P. (2009). Castration-Adapted Prostate Cancer: Targeting Androgen Metabolic Pathways in Recurrent Disease. *Urologic Oncology*, 27, 251-257.

Moyad, M., & Carroll, P. (2004). Lifestyle recommendations to prevent prostate cancer, part II: time to redirect our attention? *Urological Clinics of North America*, 31, 301-311.

Mutaku, J., Poma, J., Many, M., Deneff, J., & Van Den Hove, M. (2002). Cell necrosis and apoptosis are differentially regulated during goiter development and iodine-induced involution. *Journal of Endocrinology*, 172, 375-386.

N. M., Micali, S., Lepore, S., Cesinaro, A., Celano, M., & Sighinolfi, M. D. (2010). Expression of the sodium / iodide symporter in human prostate carcinoma. *Urology*, 75, 773-778.

Nevalainen, M., Valve, E., Ingleton, P., & Härkönen, P. (1997). Expression and hormone regulation of prolactin receptors in rat dorsal and lateral prostate. *Endocrinology*, 137, 3078-3088.

Núñez-Anita, R., Arroyo-Helguera, O., Cajero-Juarez, M., López-Bojorquez, L., & Aceves, C. (2009). A complex between 6-iodolactone and peroxisome proliferator-activated type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 89 (34-42).

Núñez-Anita, R., Cajero-Juarez, M., & Aceves, C. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptors: role of isoform gamma in the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 11, 775-786.

Oh, W., Hurwitz, M., D'Amico, A., Richie, J., & Kantoff, P. (2003). *Neoplasms of the Prostate*. En: *Holland-Frei Cancer Medicine*. (6a edición ed.). (P. R. Kufe DW, Ed.)

Olvera-Caltzontzin, P., Delgado, G., Aceves, C., & Anguiano, B. (2012). Uptake and potential antineoplastic effects of iodine on prostate cancer in the TRAMP model. *American Association for Cancer Research*.

Perron, B., Rodriguez, A., Leblanc, G., & Pourcher, T. (2001). Cloning of the mouse sodium iodide symporter and its expression in the mammary gland and other tissues. *Journal of Endocrinology*, 170, 185-196.

Rillema, J., & Hill, M. (2003). Pendrin transporter carries out iodide uptake into MCF-7 human mammary cancer cells. *Experimental Biology and Medicine*, 228, 1078-1082.

Rillema, J., & Mulder, J. (1978). Arachidonic acid distribution in lipids of mammary glands and DMBA-induced tumors of rats. *Prostaglandins and Medicine*, 1, 31-38.

Rillema, J., Yu, T., & Jhiang, S. (2000). Effect of prolactin on sodium iodide symporter expression in mouse mammary gland explants. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 279, E769:772.

Risbridger, G., Ellem, S., & McPherson, S. (2007). Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. *Molecular Endocrinology*, 39, 183-188.

Risbridger, G., Wang, H., Young, P., Kurita, T., Wang, Y., Lubahn, D., y otros. (2001). Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor-alpha mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Developmental Biology*, 39, 183-188.

Rosner, H., Torremante, P., Moller, W., & Gartner, R. (2010). Antiproliferative / cytotoxic activity of molecular iodine and iodolactones in various human carcinoma cell lines. No intergering with EGF-singaling, but evidence for apoptosis. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 118, 410-419.

Roumeguère, T., Delree, P., Van Antwerpen, P., Rorive, S., Vanhamme, L., de Ryhove Lde, L., y otros. (2012). Intriguing location of myeloperoxidase in the prostate: a preliminary immunohistochemical study. *Prostate*, 72, 507-513.

Russo, J., Hu, Y., Silva, I., & Russo, I. (2001). Cancer risk related to mammary gland structure and development. *Microscopy Research and Technique*, 15, 204-223.

Sadar MD, H. M. (1999). Prostate cancer: molecular biology or early progression to androgen independence. *Endocrine Related Cancer*, 6, 487-502.

Schmutzler, C., Winzer, R., Meissner-Weigl, J., & Kohrle, J. (1997). Retinoic acid increases sodium / iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240, 832-838.

Selman, S. (2011). The McNeal prostate: a review. *Urology*, 78, 1224-1228.

Shah, N., Eskin, B., Krouse, T., & Sparks, C. (1986). Iodoprotein formation by rat mammary glands during pregnancy and early postpartum period. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 181, 443-449.

Shen, M., Wang, X., Economides, K., Walker, D., & Abate-Shen, C. (2008). Progenitor cells for the prostate epithelium: roles in development, regeneration, and cancer. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 73, 529-538.

Shennan, D., & Boyd, C. (1986). External anions relieve DIDS inhibition of SO₄ efflux from placental vesicles. *Bioscience Reports*, 6, 889-894.

Shimizu, H., Ross, R., Bernstein, L., Yatani, R., Henderson, B., & Mack, T. (1991). Cancer of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *British Journal of Cancer*, 63, 963-966.

Shrivastava, A., Tiwari, M., Sinha, R., Kumar, A., Balapure, A., Bajpai, V., y otros. (2006). Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 19762-19771.

Simon, D., Kohrle, J., Reiners, C., Boerner, A., Schmutzler, C., Maninz, K., y otros. (1998). Redifferentiation therapy with retinoids: therapeutic option for advanced follicular and papillary thyroid carcinoma. *World Journal of Surgery*, 22, 569-574.

Skubis-Zegadlo, J., Nikodemaska, A., Przyutla, E., Mikula, M., Bardadin, K., Ostrowski, J., y otros. (2005). Expression of pendrin in benign and malignant human thyroid tissues. *British Journal of Cancer*, 93, 144-151.

Soriano, O., Delgado, G., Anguiano, B., Petrosyan, P., Molina-Servín, E., Gosenbatt, M., y otros. (2011). Antineoplastic effect of iodine and iodide in dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors: association between lactoperoxidase and estrogen-adduct production. *Endocrine Related Cancer*, 18, 529-539.

Spitzweg, C., Joba, W., Eisenmenger, W., & Heufelder, A. (1998). Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids form salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83, 1746-1751.

Spitzweg, C., Scholz, I., Bergert, E., Tindall, D., Young, C., Goke, B., y otros. (2003). Retinoic acid-induced stimulation of sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of radioiodine in prostate cancer. *Endocrinology*, 144, 3423-3432.

Strum, J. (1978). Site of iodination in lactating mammary gland. *Anatomical Record*, 192, 235-244.

Stübner, D., Gärtner, R., Greil, W. G., Brabant, G., Permanetter, W., Horn, K., y otros. (1987). Hypertrophy and hyperplasia during goitre growth and involution in rats--separate bioeffects of TSH and iodine. *Acta Endocrinologica*, 116, 537-548.

Taplin ME, B. G. (1995). Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 332, 1393-1398.

Taylor, R., Cowin, P., Couse, J., Korach, K., & Risbridger, G. (2006). 17 beta-estradiol induces apoptosis in the developing rodent prostate independently of ER alpha or ER beta. *Endocrinology*, 147, 191-200.

Tramontano, D., Veneziani, B., Lombardi, A., Villone, G., & Ingbar, S. (1989). Iodine inhibits the proliferation of rat thyroid cells in culture. *Endocrinology*, 125, 984-992.

Van Copponolle, F., Slomianny, C., Carpentier, F., Le Bourhis, X., Ahidouch, A., Croix, D., y otros. (2001). Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgen dependence. *Endocrinology and Metabolism*, 280, E120-129.

Vitale, M., Matola, D., D'Ascoli, F., Salzano, S., Bogazzi, F., Fenzi, G., y otros. (2000). Iodine excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology*, 141, 598-605.

Wapnir, I., Van de Rijn, M., Nowels, K., Amenta, P., Walton, K., Montgomery, K., y otros. (2003). Immunohistochemical profile of the sodium / iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88, 1880-1888.

Ward, L., Santarosa, P., Granja, F., da Assumpcao, L., Savoldi, M., & Goldman, G. (2003). Low expression of sodium iodide symporter identifies aggressive thyroid tumors. *Cancer Letters*, 200, 85-91.

Yoshida, A., Hisatome, I., Taniguchi, S., Sasaki, N., Yamamoto, Y., Miake, J., y otros. (2004). Mechanism of iodide / chloride exchange by pendrin. *Endocrinology*, *145*, 4301-4308.

Yoshida, A., Taniguchi, S., Hisatome, I., Royaux, I., Green, E., Kohn, L., y otros. (2002). Pendrin is an iodide-specific apical porter responsible for iodide efflux from thyroid cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *87*, 3356-3361.

Yu, C., Yao, Z., Jiang, Y., & E, K. (2012). Prostate cancer stem cell biology. *Minerva Urologica e Nefrologica*, *64*, 19-34.

Zapata, P., Colas, B., López Ruiz, P., Ropero, R., Martín, R., Rodríguez, F., y otros. (2004). Phosphotyrosinephosphatase SHP-1, somatostatine and prostate cancer. *Actas Urológicas Españolas*, *28*, 269-285.

Uptake and Antitumoral Effects of Iodine and 6-Iodolactone in Differentiated and Undifferentiated Human Prostate Cancer Cell Lines

Nuri Aranda, Susana Sosa, Guadalupe Delgado, Carmen Aceves, and Brenda Anguiano*

Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro., Mexico

BACKGROUND. Evidence indicates that iodine per se could be implicated in the physiology of several organs that can internalize it. In thyroid and breast cancer, iodine treatments inhibit cell proliferation and induce apoptosis through a direct (mitochondria) and/or indirect effect (iodolipid generation). Here, we determined the uptake of iodide (I^-) and iodine (I_2), as well as the antiproliferative and apoptotic effects of 6-iodolactone (6-IL) and both forms of iodine in human prostate cells lines.

METHODS. Non-cancerous (RWPE-1) and cancerous (LNCaP, DU-145) cells, as well as nude mice xenotransplanted with DU-145 cells were used as cancer models. Iodine uptake was analyzed with radioactive tracers, transporter expression by qRT-PCR, cell proliferation by blue trypan, apoptosis by enzyme immunoassay or fluorescence, BAX and BCL-2 by western-blot, and caspase 3 by enzymatic assay.

RESULTS. All three cell lines take up both forms of iodine. In RWPE-1 cells, I^- uptake depends on the Na^+/I^- symporter (NIS), whereas it was independent of NIS in LNCaP and DU-145 cells. Antiproliferative effects of iodine and 6-IL were dose and time dependent; RWPE-1 was most sensitive to I^- and 6-IL, whereas LNCaP was more sensitive to I_2 . In the three cell lines both forms of iodine activated the intrinsic apoptotic pathway (increasing the BAX/BCL-2 index and caspases). Iodine supplementation impaired growth of the DU-145 tumor in nude mice.

CONCLUSION. Normal and cancerous prostate cells can take up iodine, and depending on the chemical form, it exerts antiproliferative and apoptotic effects both in vitro and in vivo.

Prostate 73: 31–41, 2013. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: proliferation; apoptosis; RWPE-1; LNCaP; DU-145

INTRODUCTION

Prostate cancer is the most frequently diagnosed malignancy in men over 50 years old, and it is the second leading cause of cancer deaths in Western countries [1]. In spite of recent advances in the diagnosis, the current therapies are limited by their side effects and their inability to eliminate the androgen-independent prostate cancer cells [2]. The development of chemopreventive agents is a major goal of research in cancer, and the potential therapeutic use of iodine has gained attention in recent years [3–5].

Iodine is crucial for synthesizing thyronine and maintaining the epithelial integrity of thyroid follicles [6]. Different chemical forms of iodine can be

differentially taken up and metabolized in the tissues [7]. The thyroid gland preferentially internalizes iodide (I^-), whereas nubile mammary gland takes up I_2 and I^- to the same extent [8]. I^- is actively

Grant sponsor: PAPIIT-UNAM; Grant number: IN201210; Grant sponsor: CONACYT; Grant numbers: 78955. 87196. 127368.

Conflicts of interest: None.

*Correspondence to: Dr. Brenda Anguiano, Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla, Boulevard Juriquilla, # 3001 Querétaro 76230, Mexico. E-mail: anguiano@unam.mx

Received 15 December 2011; Accepted 18 April 2012

DOI 10.1002/pros.22536

Published online 10 May 2012 in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com).

transported by the Na^+/I^- symporter (NIS), which is powered by Na^+/K^+ ATPase and competitively inhibited by perchlorate; ClO_4^- [9,10]. The molecular identity of the putative I_2 -transporter is unknown, but studies in breast cancer cells show that I_2 transport is a saturable process dependent on protein synthesis, but independent of NIS [8,11]. A similar mechanism has been described in seaweeds, suggesting its presence in several organisms [12].

A protective effect against cancer progression has been attributed to iodine. The selectivity of this effect depends on the capacity of cells to take up and metabolize different chemical forms of iodine. In normal thyroid cells high concentrations of I^- induce cell-cycle arrest (G₀/G₁ and G₂ phases) and apoptosis [13,14], whereas moderated I^- supplement prevents the transformation from differentiated thyroid tumor into a less differentiated [15,16]. Apoptosis induction by I^- can be prevented by propyl-thiouracil, an inhibitor of the thyroperoxidase (TPO), indicating that this effect requires oxidation of I^- to I_2 [14]. Indeed recent studies show apoptotic I_2 effects in follicular, papillary, and anaplastic thyroid cancer cell lines [17]. Similarly data have been documented in several cancers that included in vivo and in vitro models where I_2 delays tumor progression, inhibits cell proliferation, and induces apoptosis [18,19]. These antineoplastic I_2 effects could be mediated by a direct antioxidant/oxidant mitochondrial action, by the formation of iodolipid intermediates like 6-iodolactone or iodoheptadecanal, or even by the inhibition of the estrogen effect [11,18–23]. Moreover, the activation of BAX- caspases, and apoptosis-inducing factor (AIF)-poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) pathways has been documented in several cancer cells [17,20,24].

In relation to prostate pathologies, an epidemiological study has shown a possible but non-significant association between dietary iodine intake and prostate cancer risk [25]. Compared to thyroid gland, expression of mRNAs for NIS is low in normal human and mouse prostatic tissues [26–28]. In human prostate cancer, NIS protein is present in 50–70% of the tumors; however, there are controversies about whether it is functional [29,30]. A study from our group showed that prostate gland takes up both I^- and I_2 , and that both chemical forms are effective in preventing the prostate hyperplasia induced by high concentrations of testosterone and estrogens in rats [4]; however, there is no evidence of iodine effects on prostate cancer. Therefore, the goals of this work were: (1) To characterize, in non-cancerous and cancerous human prostate cell lines, the time course of iodine uptake; (2) to identify whether NIS participates in these processes; (3) to analyze the effects of

iodine, iodide, and 6-IL on proliferation and apoptosis; and (4) to explore in vivo the potential antitumoral effects of iodine. RWPE-1, LNCaP and DU-145 cells were used as human models of normal epithelium or differentiated or undifferentiated prostate cancer, respectively. Athymic mice inoculated with DU-145 cells were also used for the in vivo model. Both chemical forms of iodine, as well as 6-IL, inhibited cell proliferation and induced apoptosis in a dose- and time-dependent manner. Iodine treatment reduced tumor progression in vivo.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

DMEM, RPMI 1640 and KSF medium, fetal bovine serum (FBS), GlutaMAX-I, antibiotics, and trypsin-EDTA solutions were supplied by Invitrogen (Carlsbad, CA). Na^{125}I was purchased from NEN Life Science Products (Boston, MA). Potassium perchlorate (ClO_4^-), all-trans-retinoic acid (AR) and arachidonic acid were supplied by Sigma (St. Louis, MO). The proteinase inhibitor cocktail was supplied by Roche Applied Sciences (Indianapolis, IN). Polyclonal antibodies for BAX, BCL-2, and β -actin were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Nitrocellulose membranes and the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system were from Amersham Life Science (Buckinghamshire, UK). All chemicals for RNA extraction and RT-PCR were from Invitrogen. Cell fluorescence kit to assay for apoptosis was supplied by Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA). The cell death detection ELISA kit was purchased from Roche Applied Science (Mannheim, Germany) and Bradfords reagent was from Bio-Rad (Richmond, CA).

Cell Lines

Cell lines were purchased from the ATCC (Manassas, VA). RWPE-1 cells are derived from the peripheral zone of a non-cancerous adult human prostate. LNCaP and DU-145 cancerous human prostate cells are derived from a metastasis to lymph node and brain respectively. RWPE-1 cells were grown in KSF medium with 0.05 mg/ml bovine pituitary extract and 5 ng/ml epidermal growth factor. LNCaP cells were grown in RPMI-1640 medium with 2 mM glutamine and 10% (v/v) FBS. DU-145 and MCF-7 cells were grown in DMEM with 10% (v/v) FBS. All culture media were supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and cultured at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. In all experiments, culture medium was renewed daily.

Radioiodine Uptake

RWPE-1, LNCaP, and DU-145 cells were pretreated with 10 μM AR for 48 hr to induce NIS expression. Then were incubated (5×10^4 cells/well) in fresh culture medium containing 1% FBS and 0.5 μCi of carrier-free either $^{125}\text{I}_2$ or Na^{125}I for 5, 10, 15, 30, 60, and 90 min. $^{125}\text{I}_2$ was generated by the oxidation of $^{125}\text{I}^-$ with H_2O_2 and HCl , as previously described [31]. At the end of the incubation, the medium was removed, the cells were washed with cold PBS, and radioactivity was measured in a gamma counter. Specific uptake was expressed as pmol I_2 or $\text{I}^-/10^6$ cells/hr. Non-specific uptake was determined by adding radioactive tracers to the cells and immediately washing with PBS.

Identification of NIS Transporter

To confirm or exclude NIS participation, the cells were preincubated for 15 min with 50 μM ClO_4^- . NIS mRNA expression was evaluated by RT-PCR. Breast cancer cells (MCF-7) treated with 10 μM retinoic acid (RA) were used as a positive control for NIS.

Effects of Iodine and 6-IL on Cell Proliferation and Apoptosis

Non-cancerous and cancerous prostate cell lines (5×10^4 cells/well) were treated with I_2 or I^- (100–1,000 μM). Cell proliferation was evaluated using the trypan blue exclusion method [32]. The number of viable cells was calculated by subtracting the number of dead cells from the total. The rate of proliferation was measured as the difference between the number of viable cells at the initial time (T_0) and 24, 48, 72, and 96 hr. The IC_{50} value was calculated at 72 hr of treatment using the equation $y = \frac{B+(T-B)}{1+10^{(\text{LogEC}_{50}-x)(\text{Hillslope})}}$, where y represents the percentage of cell inhibition, B is the initial cell number, T is the cell number at 72 hr, x represents $\log [\text{I}_2 \text{ or } \text{I}^-]$, and the Hill slope represents the steepness of the fitted curve.

An additional experiment was performed to analyze the proliferation rate of cancerous cells that survived the iodine treatment. RWPE-1 and LNCaP cells were seeded at low density (2×10^4 cells/well) and were treated with 200 μM I_2 or 400 μM I^- for 96 hr. Iodine was removed, and cell proliferation was evaluated for the next 72 hr. The doubling time (Dt) was calculated from the log phase of growth using the formula $\text{Dt} = 0.693t/\ln(\text{Nt}/\text{N0})$, where t represents time, Nt is the final number of cells, and N0 is the initial number of cells. To determinate if iodine induces apoptosis through a caspase-dependent mechanism; cells were treated for 72 hr with 400 μM I_2 or I^- . Apoptosis was assessed with an ELISA cell

death detection kit, which quantifies histone-complex DNA fragments. The BAX/BCL-2 ratio was used as an apoptotic index and was analyzed by western blot. Caspase-3 activity was measured by an enzymatic assay.

The 6-IL was synthesized and purified by a modification of the method described by Aceves et al. [19] and their identity was corroborated with gas chromatography mass spectrometry. The 6-IL stock solution was diluted in ethanol and stored at -80°C . RWPE-1 and LNCaP (10×10^3 cells/well) lines were treated with 6-IL (0.5 to 50 μM) for 96 hr. The control group was treated with ethanol $<0.01\%$. Cell proliferation was evaluated as described before, and apoptosis was measured using a cell fluorescence kit.

Effect of Iodine Supplementation on Tumor Progression

DU-145 cells (5×10^6 in 100 μl of matrigel) were inoculated into the back of athymic nude mice (Balb-c nu/nu, 10 weeks old). Iodine supplementation (mix, 0.5 mg I^- + 0.25 mg I_2) was administrated in the drinking water. Treatment started 3 days before inoculation and continued for 21 days. At end of the experiment the tumor was measured, and the volume (cm^3) was calculated using the ellipsoid formula ($\text{width} \times 2/\text{length})/2$. Handling and euthanasia of animals was reviewed and approved by an ad hoc ethics committee from the UNAM.

RT-PCR

Total RNA was extracted using TRIzol reagent and was reverse-transcribed using oligo-deoxythymidine. PCR was carried out with 1.0 μl cDNA in a final volume of 50 μl containing: 10X dNTP Mix, 10X Buffer (500 mM KCl, 100 mM, Tris-HCl pH 8.3), 30 mM MgCl_2 , 10 pmol specific primers, and 5 U Taq DNA polymerase. The primers used are shown in Table I. Samples were first denatured at 94°C for 45 sec, followed by 40 cycles at 62.1 or 55°C (NIS and β -actin, respectively). The last cycle, 72°C for 1 min, was followed by an extension of 3 min at 72°C . β -actin expression was analyzed as a control of RNA quantity and integrity. A mixture without reverse transcriptase (RT-) and a sample with all the reactants except cDNA, were used as internal control. The amplicons were resolved in a 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide. The sizes of the bands were confirmed by comparison with a commercial DNA ladder.

Apoptosis and Caspase-3 Activity Assays

The cell death detection kit is based on the quantitative sandwich enzyme immunoassay principle

TABLE I. Primers Used in RT-PCR Assays

mRNA	GenBank access	Sense/Anti sense
β -Actin	NM-031144	GTC CCA GTA TGC CTC TGG TCG TAC/CCA CGC TCG GTC AGG ATC TTC ATG
NIS	U60282	CCG GAT CAA CCT GAT GGA CT/CCT GAG GGT GCC ACT GTA AG

(anti-histone and anti-DNA-peroxidase) and allows the detection of mono- and oligonucleosomes in the cytoplasm. The amount of nucleosomes in the iodine-treated cells was normalized to the amount of nucleosomes in untreated cells. The cell fluorescence kit is based on detection of phosphatidylserine on the outer membrane (via annexin V) as an apoptosis indicator, and on the detection of calcein as a marker of living cells. Caspase-3 activity was determined with a colorimetric kit. Samples were lysed in 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.5% Triton X-100, 2 mM EDTA, and 200 μ g/ml proteinase K, and centrifuged at 16,000g for 15 min at 4°C. The supernatant (50 μ g of protein) was incubated with substrate (Ac-DEVD-pNA) for 4 hr at 37°C. The concentration of product (p-nitroaniline, pNA) was calculated from the absorbance based on a calibration curve. Caspase activity is expressed as μ mol pNA/mg protein/hr.

Western-Blot Analysis

Cells were lysed in ice-cold buffer (5 mM Tris-HCl, pH 8.0) containing 0.5% Triton X-100, 2 mM EDTA, 200 μ g/ml proteinase K, and one tablet of a protease inhibitor cocktail. Fifty micrograms of protein from each sample was separated by standard 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked using 5% nonfat milk in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 140 mM NaCl and 0.05% Tween 20. Membranes were probed overnight at 4°C using the polyclonal antibodies for BAX, BCL-2, and β -actin (at 1:800, 1:200, 1:100 dilutions, respectively). The antigen-antibody complex was detected using the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody (1:100). Immunoblots were visualized using the ECL reagent and exposed to Biomax X-ray film. Images were analyzed densitometrically using the Image Quant V2005 software (Piscataway, NJ). The BAX/BCL-2 index was calculated after they had been normalized to β -actin for equal loading. Protein concentration was measured by the Bradford method.

Statistical Analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM. Data were analyzed by a Student's *t*-test or one- or two-way analysis of variance (ANOVA) and multiple

comparisons (Tuckey's HSD test). Asterisks or different letters indicate significant differences between means ($P < 0.05$). At least three independent experiments were done, each in duplicate. Results were analyzed with the help of the statistical package Graph Pad Prism 4 (San Diego, CA).

RESULTS

Radioiodine Uptake in Non-Cancerous and Cancerous Prostate Cells

Our data showed a basal uptake of both chemical forms of iodine; cell-associated iodine significantly increased for the first 10 min and remained elevated for at least 30 min. The I_2 and I^- content returned to basal levels at 60 and 90 min, respectively. RWPE-1 cells took up twice as much I_2 and I^- as cancerous cells. Figure 1 inserts show that pre-treatment with RA had no effect on I_2 uptake in any cell line. In contrast, RA pre-treatment selectively increased the uptake of I^- by RWPE1 cells, but it had no effect on cancerous cells. All subsequent experiments in cancerous prostate cells were performed without RA pre-treatment.

Participation of NIS in I^- uptake

As shown in Figure 2A, ClO_4^- had no effect on I^- uptake in either cancerous cell line. Data showed that NIS was expressed only in RWPE-1 cells, but not in LNCaP or DU-145 cells. MCF-7 cells pre-treated with RA were used as positive controls for NIS expression (Fig. 2B).

Iodine and 6-IL Treatments Reduce Cell Proliferation and Induce Apoptosis

I_2 treatment significantly reduced cell proliferation in a dose-dependent manner in the three cell lines (Fig. 3). At 72 hr of treatment, LNCaP cells were significantly most sensitive (IC_{50} 181 \pm 12), followed by RWPE-1 (237 \pm 13) and DU-145 (310 \pm 10 μ M). I^- treatment significantly reduced the proliferation of RWPE-1 and LNCaP cells at 72 hr (Fig. 4). RWPE-1 was the cell line most sensitive to I^- effects, exhibiting an IC_{50} value of 371 \pm 17 μ M. In contrast, LNCaP cells were less vulnerable, with an IC_{50} value of 876 \pm 100 μ M. DU-145 cells were resistant to I^- effects at all doses and times analyzed. To determine

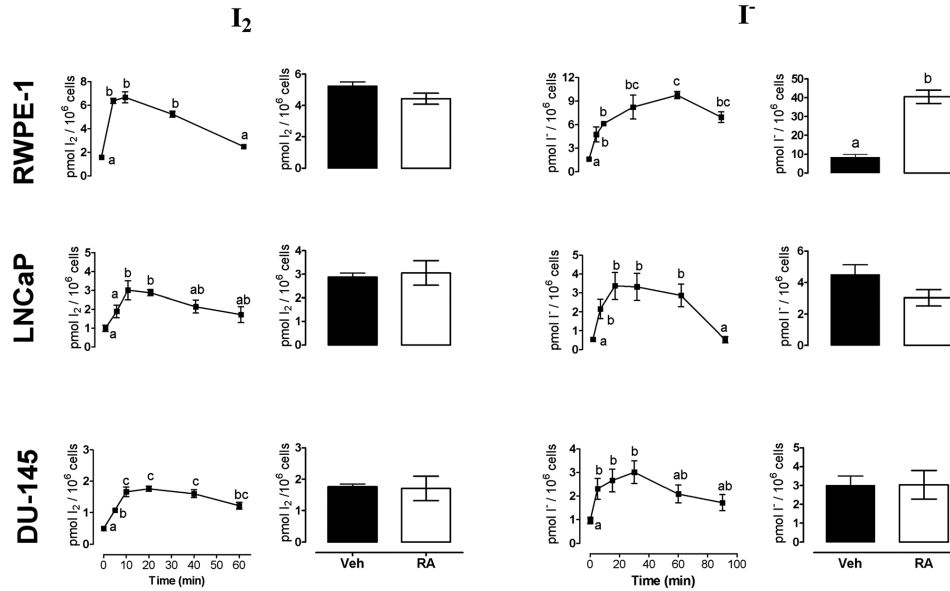


Fig. 1. Time course of iodine uptake in non-cancerous (RWPE-1) and cancerous (LNCaP and DU-145) cells. Cells were incubated with $0.6 \mu\text{Ci } ^{125}\text{I}_2$ or $^{125}\text{I}^-$ for the indicated times. One group of each cell line was pre-incubated for 48 hr with $10 \mu\text{M RA}$ (open bars) or with vehicle (filled bars), and then incubated with $^{125}\text{I}_2$ or $^{125}\text{I}^-$ for 10 or 30 min, respectively (inserts). Data were analyzed by a one-way ANOVA, and differences between means were evaluated by Tuckey's HSD test. Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$, $n = 3-6$ experiments.

if the iodine effects were reversible, RWPE-1 and LNCaP cells were pre-treated with $200 \mu\text{M I}_2$ or $400 \mu\text{M I}^-$ for 96 hr, treatments was removed, and cell proliferation was analyzed for the next 72 hr. Although both chemical form of iodine reduced cell proliferation during the 96 hr treatment, the proliferation rate of both cell lines returned to normal when the iodine or iodide was withdrawn (Fig. 5). To test if the cell arrest caused by the iodine treatments was innocuous or generated alterations, we determined the cell doubling time (CDT), which indicates the time required for the cell population to double. In the presence of I_2 or I^- , the CDTs increased by 30–40% compared to the control group (vehicle), whereas after withdrawal of the treatments, the CDTs reverted to the normal values (Table II). Figure 6 shows that, $400 \mu\text{M I}_2$ induced apoptosis mediated by BAX-Caspases (i.e., increases in apoptotic nucleosomes, BAX/BCL-2 index, and caspase-3 activity), in the three cell lines. In RWPE-1 cells apoptosis was induced with $400 \mu\text{M I}^-$. In contrast, LNCaP and DU-145 cells were resistant to this dose.

Figure 7 shows that 6-IL treatment inhibited cell proliferation and induced apoptosis in a dose-

dependent manner. RWPE-1 was the cell line significantly most sensitive to these effects, exhibiting an IC_{50} value of $1.25 \pm 0.09 \mu\text{M}$ (72 hr). In contrast, LNCaP cells were less sensitive, with an IC_{50} value of $20 \pm 1.0 \mu\text{M}$.

Figure 8 shows that iodine supplementation ($0.5 \text{ mg I}^- + 0.25 \text{ mg I}_2$) for 21 days significantly reduced tumor growth in the xenotransplanted model.

DISCUSSION

Iodine Uptake

This study presents the first evidence that non-cancerous (RWPE-1) and cancerous human prostate cells (LNCaP and DU-145) take up iodine, either as I_2 or I^- , and both forms are captured in minutes. It is well documented that many normal tissues such as thyroid, breast, gastric, and colon take up I^- and that RA strongly stimulates this uptake by increasing the expression of NIS. Carcinogenesis has been reported to reduce or eliminate uptake of I^- , suggesting that neoplastic transformation involves the disruption of NIS function and/or regulation [33,34]. Similar data

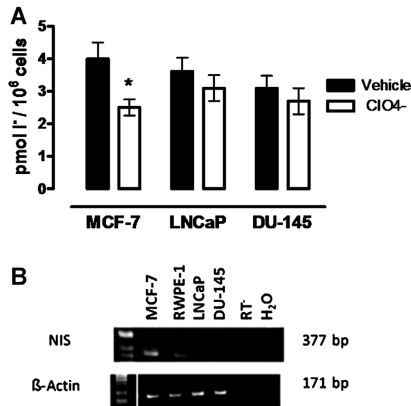
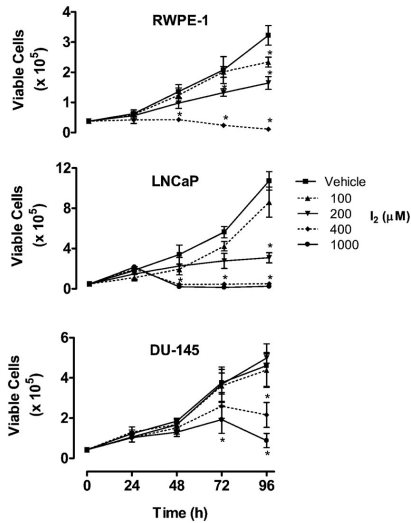


Fig. 2. NIS participation in iodide uptake in cancerous prostate cells. **A:** Cells were pre-incubated for 15 min with 15 μM ClO_4^- . Groups were treated with 0.6 μCi $^{125}\text{I}^-$, and uptake was analyzed at 30 min. Data were analyzed by a one-way ANOVA, and differences between means were evaluated by the Tukey's HSD test. Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$, $n = 4$ experiments. **B:** RT-PCR analysis for NIS expression. MCF-7 cells treated with 10 μM RA for 48 hr were used as positive control. A representative RT- is shown. H₂O, water with all the PCR reagents but without cDNA. The assays were repeated three times with independent RNA samples.



The Prostate

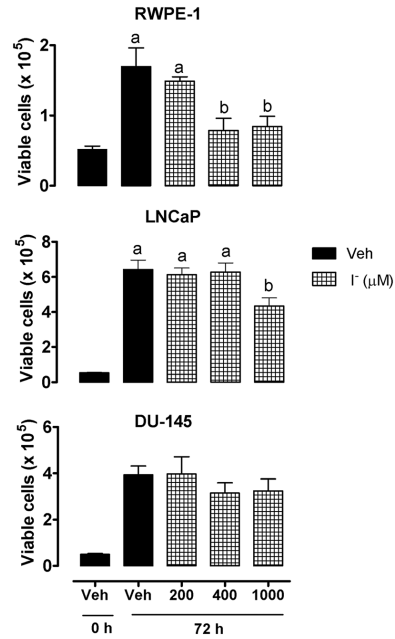


Fig. 4. Effect of I^- on proliferation of non-cancerous and cancerous prostate cells. Cells were incubated with different concentrations of I^- for 72 hr. Data were analyzed by a one-way ANOVA, and differences between means were evaluated by the Tukey's HSD test. Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$, $n = 4$ experiments.

were obtained in our study showing that only in normal cells (RWPE-1) the uptake of I^- was enhanced by 10 μM RA (NIS induction). In contrast, these treatments had no effect in cancer cells, and mRNA for NIS was absent, indicating that iodine uptake in LNCaP and DU-145 cells is NIS-independent. These data agree with NIS expression reported in normal human and mouse prostate tissue [26,28] and corroborate previous studies, which showed that LNCaP cells do not express NIS mRNA and that this transporter is not induced by RA treatments [35]. It is probable that I^- transport is mediated by some other anion transporter, such as pendrin (PDS). PDS is widely expressed in both normal and tumoral extra-thyroidal tissues [10]. This glycoprotein is expressed in the apical membrane of thyrocytes, whose function is related to iodide efflux into the follicular lumen [10]. In contrast, in extra-thyroidal tissues such as normal and tumoral mammary gland, PDS seems to be associated with I^- capture by epithelial cells [8,11,36].

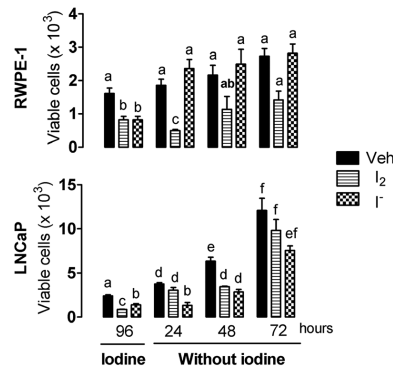


Fig. 5. Effect of iodine withdrawal on proliferation rate of RWPE-1 and LNCaP cells. Cells were treated for 96 hr with 200 μM I₂ or 400 μM I⁻. Iodine was removed and cell proliferation was analyzed for the next 72 hr. Data were analyzed by a two-way ANOVA, and differences between means were evaluated by the Tukey's HSD test. Different letters indicate significant differences, *P* < 0.05, *n* = 5 experiments.

The participation of PDS in cancerous prostate cells remains to be explored.

Our data showed that I₂ uptake is independent of NIS. This is consistent with studies in MCF-7 cells, which showed that I₂ uptake is independent of the anion transporter but dependent on protein synthesis [11]. In seaweed has been reported that I₂ uptake could be mediated by a facilitated diffusion mechanism [12]. More experiments are required in order to identify and characterize molecular iodine transport.

Antitumor Effects of Iodine and 6-IL

In non-cancerous and cancerous prostate cell lines, both chemical forms of iodine inhibit cell proliferation and induce apoptosis in a dose-dependent manner. LNCaP cells were twofold more sensitive than DU-

145 cells to antiproliferative I₂ effects, suggesting that I₂ might act primarily on differentiated rather than on undifferentiated cancer cells. Although RWPE-1 cells take up twofold more I₂ than LNCaP cells, they were less sensitive to the antiproliferative effects. These dose-dependent responses have been widely reported in other cell lines. Estrogen-dependent breast cancer and neuroblastoma cells are at least twice as sensitive to apoptotic I₂ effects than estrogen-independent breast cancer cell lines or glioblastoma [11,20,37]. Similarly, differentiated thyroid cancers are more sensitive to I₂-induced apoptosis than undifferentiated (anaplastic) [17]. In relation to normal cells, mammary epithelium and fibroblasts are fourfold less sensitive to I₂-induced cell arrest and apoptosis than cancer cells [11,20,37,38]. Together, these data suggest that aspects of iodine metabolism are modified during the processes of transformation and cancer progression. Our data demonstrate that RWPE-1 cells are more sensitive than LNCaP or DU-145 cells to antiproliferative I⁻ effects. Studies in thyroid gland and breast cancer indicate that I⁻ must be enzymatically oxidized to I₂ by TPO or LPO in order to induce apoptosis [16,23]. Human prostate epithelial cells express myeloperoxidase [39], which, through its pro-oxidant properties, could be involved in the transformation from I⁻ to I₂.

Another interesting finding was the ability of prostate cells, both non-cancerous and cancerous, to reactivate proliferation when the iodine treatments were withdrawn. This pattern is consistent with epidemiologic reports showing that when an Asian population changed its diet from iodine rich to iodine poor, their protection against cancer disappeared [25,40]. Moreover, data from our laboratory using a tumor-induction model showed that if I₂ supplements are removed from the diet at 4 or 18 weeks, latent mammary cancers progress to overt cancers; however, if the treatment is maintained for more than 40 weeks, the antineoplastic iodine effect is permanent [18] [unpublished data]. The cellular mechanisms that may trigger the transition of the iodine effect from arrest to

TABLE II. Iodine Effect on Cell Doubling Time

Cell Line	Vehicle	I ₂		I ⁻	
		Treatment	Withdrawal	Treatment	Withdrawal
RWPE-1	37 ± 3	59 ± 5*	32 ± 9	48 ± 1*	43 ± 5
LNCaP	28 ± 2	47 ± 13*	27 ± 4	49 ± 9*	30 ± 9

The cell doubling time (CDT) is expressed in hours and was calculated (during log phase of growth) for groups treated with vehicle, I₂, and I⁻ for 96 hr. In both cell lines, I₂ and I⁻ increased the CDT in comparison with the untreated group (vehicle). **P* < 0.05, Student's *t*-test. The CDT values returned to normal when the iodine treatments were withdrawn (72 hr).

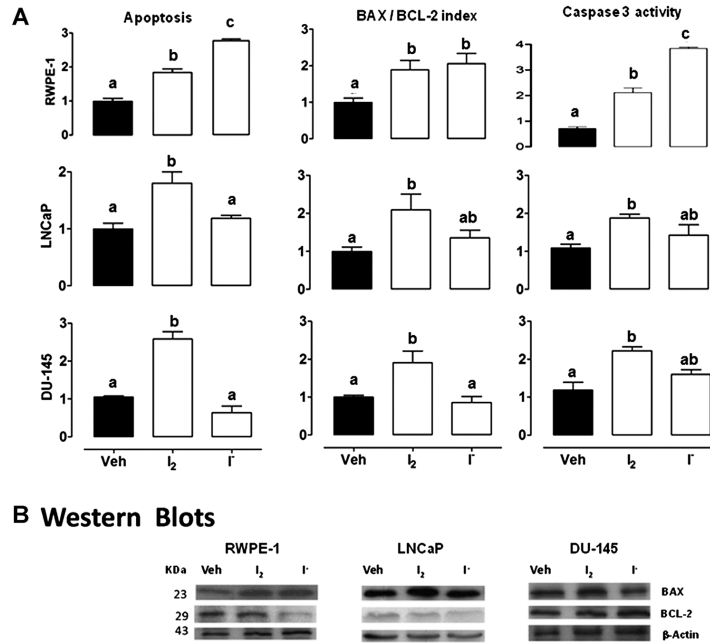


Fig. 6. Effects of iodine on apoptosis induction, BAX/BCL-2 index, and caspase-3 activity. **A:** Cell lines were treated for 72 hr with 400 μ M I₂ or I⁻. Apoptotic nucleosomes were estimated photometrically, BAX/BCL-2 index by western-blot, and caspase-3 activity with an enzymatic assay. Densitometric values for BAX and BCL-2 were normalized to β -actin and then used to calculate the BAX/BCL-2 index. All results were normalized to the untreated group (vehicle). Data were analyzed by a one-way ANOVA, and differences between means were evaluated by Tukey's HSD test. Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$, $n = 3$ experiments. **B:** Representative images of immunoblots of BAX, BCL-2, and β -actin are shown.

apoptosis are not known, but factors like dose or time could be involved. In accordance with the above, the present study showed that iodine mix supplementation maintains its antiproliferative effect in vivo (xenotransplants). Current studies in our laboratory are analyzing iodine effects on tumor initiation and/or progression in a transgenic model (TRAMP mouse).

The increases of the BAX/BCL-2 index and caspase-3 activity in prostate by iodine indicate an intrinsic activation pathway. These data are consistent with I₂ induction of apoptosis in thyroid and breast cancer cells by promoting the nuclear translocation of AIF, PARP1 cleavage, reducing the mitochondrial membrane potential, increasing pro-apoptotic factors such as BAX and BAK, and decreasing anti-apoptotic factors like BCL-2 [19,24,41]. The mechanism by which iodine inhibits cell proliferation was not analyzed here, but in breast cancer, p21 and cyclin D1 to decrease in response to iodine treatment [11,24]. Studies in thyroid follicular cells showed that high

iodide concentrations attenuate RET/PTC3 oncogene induction and reduce Ret and Erk phosphorylation (inhibiting the MAPK pathway) [41]. Antiproliferative and apoptotic effects of 6-IL on prostate cells, are consistent with those reported in other tumoral cells, such as thyroid, breast, neuroblastoma, pancreas, etc. [19,22,24,42,43].

Studies in thyroid and breast cancer support the notion that antineoplastic iodine effects are mediated by one or more of the following pathways: (1) By regulating apoptotic gene expression by iodolipids. Iodination of arachidonic acid (AA) leads to generation of 6-IL, which acts as a ligand of peroxisome proliferator activator receptors (PPAR) [4,19,44]. In this context, it is possible that the high content and turnover of AA observed in both differentiated prostate tumors and LNCaP cells [45,46] would encourage 6-IL generation and explain, for example, the triggering of the caspase apoptosis pathways and the inhibition of the estrogen response, two well-established effects of

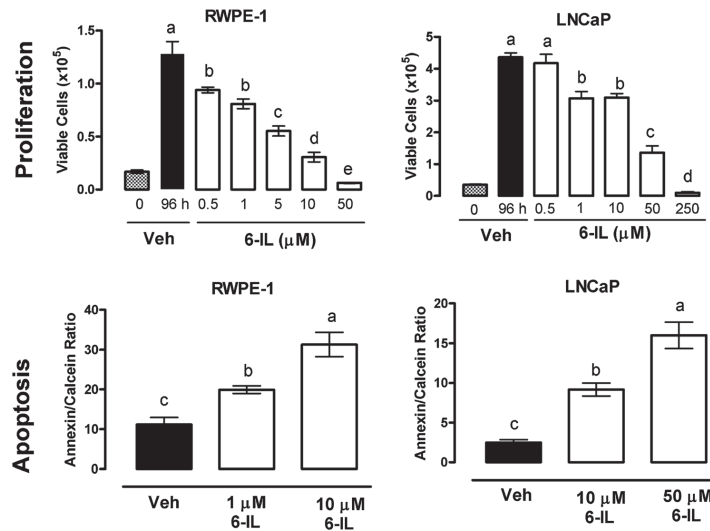


Fig. 7. Effects of 6-IL on cell proliferation and apoptosis induction. RWPE-1 and LNCaP cells were treated with different concentrations of 6-IL for 96 hr. Apoptosis induction was estimated by means of the annexin/calcein ratio. The data were analyzed by a one-way ANOVA, and differences between means were evaluated by Tukey's HSD test. Different letters indicate significant differences between groups, $P < 0.05$, $n = 4$ experiments.

PPAR gamma activation [47]. (2) By acting as a free radical. Iodine is known to act as an antioxidant at low or moderate levels, or as a free radical at high concentrations, activating PARP-1 and AIF [4,16,18,24,48]. In a model of skin injury induced by free radicals, it has been shown that iodine reduces the expression of inducible nitric oxide synthase

(iNOS) [49]. It will be interesting to analyze the effects of iodine on iNOS activity, given its well-known actions on oxidative stress. (3) By inhibiting the eicosanoid pathway. Although this mechanism is the least studied, an in vitro cell-free model has shown that iodination of linoleic acid might irreversibly inactivate lipoygenase activity [50]. Current studies in our laboratory analyze if antineoplastic effects of I₂ or 6-IL could be associated with lipoygenase inhibition and the consequent decrease in proliferative and/or anti-apoptotic lipid signaling.

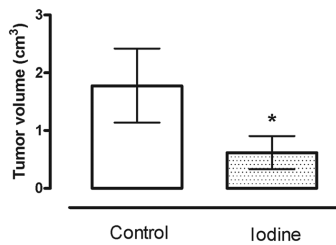


Fig. 8. Effects of iodide supplementation on tumor progression. DU-145 cells were inoculated into the back of athymic mice. One group received drinking water supplemented with an iodide/iodine mix (0.5 mg I⁻ + 0.25 mg I₂) for 21 days. The control group received drinking water without iodine. Tumor volume was measured at the end of the treatment, and the data were analyzed by Student's *t*-tests. * $P < 0.05$. $n = 5$ /group.

CONCLUSIONS

Non-cancerous and cancerous human prostate cell lines take up both forms of iodine. The antiproliferative and apoptotic effects of iodine are dose dependent, and they seem to depend on a complex interaction of factors: Transporters expression and amount of iodine taken up, transformation of I⁻ to a more highly oxidized chemical species, AA metabolism and iodolipid formation, cell differentiation stage, and sex hormone response. Further studies are required to analyze the molecular mechanisms of iodine on prostate cancer, and its potential clinical use in prevention and/or therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

N.A. was a student in the program Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM and S.S. in the program Maestría en Ciencias (Neurobiología)-UNAM. They received a fellowship from CONACYT (883201, 221009, respectively). We thank to Martín García and Felipe Ortiz for technical support, Ramón Martínez, Lorena Ortiz, Omar Gonzalez, and Alberto Lara for computer assistance, Francisco Valles and Rafael Silva for bibliographic assistance, Leonor Casanova for academic support, and Dorothy Pless for proofreading the manuscript.

REFERENCES

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60:277–300.
- Andreou M, Cheng L. Multifocal prostate cancer: Biologic, prognostic, and therapeutic implications. *Hum Pathol* 2010;41:781–793.
- Smyth PP. The thyroid, iodine and breast cancer. *Breast Cancer Res* 2003;5:235–238.
- Aceves C, Anguiano B. Is iodine an antioxidant and anti-proliferative agent for the mammary and prostate glands? In: Preedy VR, Burrow GN, Watson RR, editors. *Handbook of iodine*. San Diego, California: Elsevier; 2009. pp. 249–257.
- Liu XH, Chen GG, Vlantis AC, van Hasselt CA. Iodine mediated mechanisms and thyroid carcinoma. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009;46:302–318.
- Taurog AM. Hormone synthesis: Thyroid iodine metabolism. In: Braverman LE, Utiger R, editors. *The thyroid. A fundamental and clinical text*. Philadelphia, Lippincott: Williams and Wilkins; 2000. pp. 61–84.
- Thrall KD, Bull RJ. Differences in the distribution of iodine and iodide in the Sprague-Dawley rat. *Fundam Appl Toxicol* 1990;15:75–81.
- Anguiano B, Garcia-Solis P, Delgado G, Aceves VC. Uptake and gene expression with antitumoral doses of iodine in thyroid and mammary gland: Evidence that chronic administration has no harmful effects. *Thyroid* 2007;17:851–859.
- Dohan O, De la Vieja, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N. The sodium/iodide Symporter (NIS): Characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev* 2003;24:48–77.
- Bizhanova A, Kopp P. The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology* 2009;150:1084–1090.
- Arroyo-Helguera O, Anguiano B, Delgado G, Aceves C. Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:1147–1158.
- Küpper FC, Schweigert N, Ar Gall E, Legendre JM, Vilter H, Kloareg B. Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta* 1998;207:163–171.
- Smerdely P, Pitsiavas V, Boyages SC. Evidence that the inhibitory effects of iodide on thyroid cell proliferation are due to arrest of the cell cycle at G0G1 and G2M phases. *Endocrinology* 1993;133:2881–2888.
- Vitale M, Di Matola, D'Ascoli F, Salzano S, Bogazzi F, Fenzi G, Martino E, Rossi G. Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology* 2000;141:598–605.
- Dijkstra B, Prichard RS, Lee A, Kelly LM, Smyth PP, Crotty T, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins N. Changing patterns of thyroid carcinoma. *Ir J Med Sci* 2007;176:87–90.
- Maier J, van SH, van OC, Paschke R, Weiss RE, Krohn K. Iodine deficiency activates antioxidant genes and causes DNA damage in the thyroid gland of rats and mice. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:990–999.
- Liu XH, Chen GG, Vlantis AC, Tse GM, van Hasselt CA. Iodine induces apoptosis via regulating MAPKs-related p53, p21, and Bcl-xL in thyroid cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2010;320:128–135.
- García-Solis P, Alfaro Y, Anguiano B, Delgado G, Guzman RC, Nandi S, Diaz-Munoz M, Vazquez-Martinez O, Aceves C. Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I₂) but not by iodide (I⁻) treatment Evidence that I₂ prevents cancer promotion. *Mol Cell Endocrinol* 2005;236:49–57.
- Aceves C, Garcia-Solis P, Arroyo-Helguera O, Vega-Riveroll L, Delgado G, Anguiano B. Antineoplastic effect of iodine in mammary cancer: Participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Mol Cancer* 2009;8:33.
- Shrivastava A, Tiwari M, Sinha RA, Kumar A, Balapure AK, Bajpai VK, Sharma R, Mitra K, Tandon A, Godbole MM. Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway. *J Biol Chem* 2006;281:19762–19771.
- Stoddard FR, Brooks AD, Eskin BA, Johannes GJ. Iodine alters gene expression in the MCF7 breast cancer cell line: Evidence for an anti-estrogen effect of iodine. *Int J Med Sci* 2008;5:189–196.
- Thomazs L, Oglio R, Dagrosa MA, Krawiec L, Pisarev MA, Juvenal GJ. 6 Iodo-delta-lactone reproduces many but not all the effects of iodide. *Mol Cell Endocrinol* 2010;323:161–166.
- Soriano O, Delgado G, Anguiano B, Petrosyan P, Molina-Servín ED, Gonsebatt ME, Aceves C. Antineoplastic effect of iodine and iodide in dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors: Association between lactoperoxidase and estrogen-adduct production. *Endocr Relat Cancer* 2011;18:529–539.
- Arroyo-Helguera O, Rojas E, Delgado G, Aceves C. Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: Evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. *Endocr Relat Cancer* 2008;15:1003–1011.
- Hopton Cann SA, Qiu Z, van NC. A prospective study of iodine status, thyroid function, and prostate cancer risk: Follow-up of the First National Health and Nutrition Examination Survey. *Nutr Cancer* 2007;58:28–34.
- Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE. Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extra-thyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1746–1751.
- Lacroix L, Mian C, Caillou B, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, Bidart JM. Na⁽⁺⁾/I⁽⁻⁾ symporter and Pendred syndrome gene and protein expressions in human extra-thyroidal tissues. *Eur J Endocrinol* 2001;144:297–302.
- Perron B, Rodriguez AM, Leblanc G, Pourcher T. Cloning of the mouse sodium iodide symporter and its expression in the

- mammary gland and other tissues. *J Endocrinol* 2001;170:185–196.
29. Wapnir IL, van de Rijn M, Nowels K, Amenta PS, Walton K, Montgomery K, Greco RS, Dohan O, Carrasco N. Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1880–1888.
 30. Navarra M, Micali S, Lepore SM, Cesinaro AM, Celano M, Sighinolfi MC, De GC, Filetti S, Bianchi G, Russo D. Expression of the sodium/iodide symporter in human prostate adenocarcinoma. *Urology* 2010;75:773–778.
 31. McAlpine RK. The rate of oxidation of iodide ion by hydrogen peroxide. *J Chem Educ* 1945;22:387–390.
 32. Tennant JR. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* 1964;2:685–694.
 33. Kogai T, Taki K, Brent GA. Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:797–826.
 34. Altorjay A, Dohan O, Szilagyi A, Paroder M, Wapnir IL, Carrasco N. Expression of the Na⁺/I⁻ symporter (NIS) is markedly decreased or absent in gastric cancer and intestinal metaplastic mucosa of Barrett esophagus. *BMC Cancer* 2007;7:5.
 35. Spitzweg C, Scholz IV, Bergert ER, Tindall DJ, Young CY, Goke B, Morris JC. Retinoic acid-induced stimulation of sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of radioiodine in prostate cancer cells. *Endocrinology* 2003;144:3423–3432.
 36. Rillema JA, Hill MA. Pendrin transporter carries out iodide uptake into MCF-7 human mammary cancer cells. *Exp Biol Med* 2003;228:1078–1082.
 37. Rosner H, Torremante P, Moller W, Gartner R. Antiproliferative/cytotoxic activity of molecular iodine and iodolactones in various human carcinoma cell lines. No interfering with EGF-signaling, but evidence for apoptosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010;118:410–419.
 38. Nomura Y, Bhawal UK, Nishikiori R, Sawajiri M, Maeda T, Okazaki M. Effects of high-dose major components in oral disinfectants on the cell cycle and apoptosis in primary human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater J* 2010;29:75–83.
 39. Roumeguère T, Delree P, Van Antwerpen P, Rorive S, Vanhamme L, de Ryhove LD, Serteyn D, Wespes E, Vanhaerberbeek M, Boudjeltia KZ. Intriguing location of myeloperoxidase in the prostate: A preliminary immunohistochemical study. *Prostate* 2011;72:507–513. DOI: 10.1002/pros.21452.
 40. Marks LS, Kojima M, Demarzo A, Heber D, Bostwick DG, Qian J, Dorey FJ, Veltri RW, Mohler JL, Partin AW. Prostate cancer in native Japanese and Japanese-American men: Effects of dietary differences on prostatic tissue. *Urology* 2004;64:765–771.
 41. Fiore AP, Fuziwara CS, Kimura ET. High iodine concentration attenuates RET/PTC3 oncogene activation in thyroid follicular cells. *Thyroid* 2009;19:1249–1256.
 42. Dugrillon A, Uedelhoven WM, Pisarev MA, Bechtner G, Gartner R. Identification of delta-iodolactone in iodide treated human goiter and its inhibitory effect on proliferation of human thyroid follicles. *Horm Metab Res* 1994;26:465–469.
 43. Gartner R, Rank P, Ander B. The role of iodine and delta-iodolactone in growth and apoptosis of malignant thyroid epithelial cells and breast cancer cells. *Hormones* 2010;9:60–66.
 44. Nuñez-Anita RE, Arroyo-Helguera O, Cajero-Juarez M, Lopez-Bojorquez L, Aceves C. A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009;89:34–42.
 45. Dahiya R, Boyle B, Goldberg BC, Yoon WH, Konety B, Chen K, Yen TS, Blumenfeld W, Narayan P. Metastasis-associated alterations in phospholipids and fatty acids of human prostatic adenocarcinoma cell lines. *Biochem Cell Biol* 1992;70:548–554.
 46. Faas FH, Dang AQ, Pollard M, Hong XM, Fan K, Luckert PH, Schutz M. Increased phospholipid fatty acid remodeling in human and rat prostatic adenocarcinoma tissues. *J Urol* 1996;156:243–248.
 47. Nuñez-Anita RE, Cajero-Juárez M, Aceves C. Peroxisome proliferator-activated receptors. role of isoform gamma in the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2011;11:775–786.
 48. Joanta AE, Filip A, Clichici S, Andrei S, Daicovicu D. Iodide excess exerts oxidative stress in some target tissues of the thyroid hormones. *Acta Physiol Hung* 2006;93:347–359.
 49. Nyska A, Lomnitski L, Maronpot R, Moomaw C, Brodsky B, Sintov A, Wormser U. Effects of iodine on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in sulfur mustard-induced skin. *Arch Toxicol* 2001;74:768–774.
 50. Clapp CH, McKown J, Xu H, Grandizio AM, Yang G, Fayer J. The action of soybean lipoxygenase-1 on 12-iodo-cis-9-octadecenoic acid: The importance of C11-H bond breaking. *Biochemistry* 2000;39:2603–2611.