



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN
CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR
Y MOLECULAR DEL CÁNCER

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

LUIS ALBERTO CRUZ SILVA

DIRECTOR DE TESIS
M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F.

2006





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR
Y MOLECULAR DEL CÁNCER

“EFECTO DE LA DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) SOBRE EL
POTENCIAL PROLIFERATIVO DE LAS CÉLULAS DE LINFOMA
HUMANO EUHE”

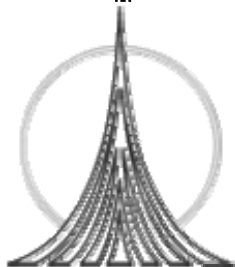
T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :

LUIS ALBERTO CRUZ SILVA

DIRECTOR DE TESIS
M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

MÉXICO, DF.

2006



Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Celular y Molecular del Cáncer de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la FES-Zaragoza. UNAM, bajo la dirección del M. en C. Luis Sánchez Sánchez.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, porque sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

A mi madre que con su apoyo incondicional que supo guiarme para lograr lo que he soñado.

Al M. en C. Luis Sánchez, por darme la oportunidad de conocer el mundo de la investigación y por los conocimientos compartidos, por el tiempo que se dedico a orientarme.

A la M. en C. Maria Luisa Escobar Sánchez por su apoyo técnico y compartir sus conocimientos.

A los miembros del jurado:

M. C. Raúl Zavala Chavero

M. en C. Luis Sánchez Sánchez

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

M. en B. E. Enrique Mendieta Márquez

M. en C. Jorge Hernández Montes

Por su tiempo, sus sugerencias que enriquecieron este trabajo

A Hugo y Vicente que compartieron sus conocimientos y por su apoyo en el laboratorio.

A todos los miembros del laboratorio que participaron en mi formación.

A Sergio, Ivan, Ipanema y a todos mis compañeros que estuvieron al principio de mi formación ya que con su amistad no hubiera disfrutado mi estancia en la universidad, por esos momentos inolvidables y principalmente por brindarme su amistad.

A Gerardo, Diana, Chucho y Reyna que con su apoyo, los momentos especiales que compartimos en campo, que fortalecieron nuestra amistad

A Cristina y Checa por compartir esos momentos inolvidables.

A Prof. Cristóbal, por sus consejos, los cuales han fortificado mi formación y principalmente por ser un buen amigo.

A Cristina por ser alguien especial.

A ti Elba por tus consejos y tu amistad incondicional que me has dado.

A todos mis compañeros y amigos.

A Carmina y Edmundo por sus donaciones y los efectos secundarios que les pude haber provocado, ser buenos compañeros de laboratorio y sobre todo amigos.

A Danahé por los momentos malos y buenos que vivimos.

DEDICATORIAS

A mis padres, ustedes que siempre me apoyaron, por su amor.

A mi Mamá por todos los consejos y desvelos, el apoyo que recibí de ti en los momentos buenos y malos y por que hasta la fecha pase lo que pase siempre estás presente. Este es tu trabajo.

A mis hermanos que compartimos muchos años felices y que enriquecen mi vida

A mis amigos Ivan, Sergio, Ipanema, Gerardo, Diana Chucho Reyna Itzel Evelin y Efrén, que formaron parte de mi vida Universitaria, en donde compartimos muchas cosas y sobre todo porque con ellos viví momentos gratos que nunca olvidaré.

A Elba por los momentos tan gratos que vivimos.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
El sistema endocrino y las hormonas	5
Hormonas esteroides	5
DHEA	8
Biosíntesis de la DHEA.	9
Efectos biológicos de la DHEA.	12
La DHEA y el cáncer	13
HEMATOPOYESIS	15
Cáncer	18
Linfomas	19
Tratamiento	22
JUSTIFICACIÓN	23
OBJETIVOS	24
HIPÓTESIS	24
MÉTODO	25
Obtención de las concentraciones de DHEA.	25
Obtención de linfocitos humanos.	25
Establecimiento de cultivos de células de linfoma EuHe.	26
Efecto de la DHEA en la proliferación del linfoma EuHe.	26
Determinación de la Proliferación Celular mediante la técnica de Incorporación del Colorante Cristal Violeta.	26

Citometría de Flujo.	27
Ensayo de Proliferación con Incorporación de Timidina Tritiada.	27
Efecto de la DHEA en la proliferación de linfocitos.	28
Ensayo para la localización específica de caspasa 3 en cultivos de linfoma EuHe.	28
Ensayo para la detección específica del extremo 3'-OH de fragmentos de cadenas de DNA (TUNEL), en cultivos celulares.	28
Análisis estadístico	29
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	42

RESUMEN

La Dehidroepiandrosterona DHEA y su sulfato DHEAS son los principales productos secretados por la corteza de la glándula suprarrenal, aunque también puede ser sintetizada por las gónadas, el cerebro y el tracto gastrointestinal. La DHEA es clasificada como un esteroide C-19 regulado por la acción de la hormona corticotropina (ACTH) al igual que los andrógenos adrenales androstendiona y testosterona. A pesar de la abundancia de la DHEA y la DHEAS su papel fisiológico no es muy claro. Sin embargo, se le ha adjudicado un papel antineoplásico, antidiabético, antiosteoporótica, entre otros. Pese a su papel antineoplásico, poco se sabe sobre su función antileucémica, y más específicamente sobre células de linfoma. En base a lo descrito anteriormente el presente trabajo tiene como propósito determinar el efecto de la DHEA sobre el potencial proliferativo de células de linfoma EuHe y de linfocitos provenientes de sangre periférica humana. Al respecto se obtuvo que la DHEA induce un decremento del 50% en la densidad celular de cultivos de células EuHe con una concentración de 0.15 μM , induciendo a estas células a salir de la fase S del ciclo celular para inducir las a una muerte apoptótica, como lo revelan los resultados de análisis de distribución del DNA en las diferentes fases del ciclo celular, evaluada por citometría de flujo, la marca positiva a la procaspasa-3 determinada por inmunocitoquímica y la fragmentación del ADN evaluada por la técnica de TUNEL. En contraste, tanto el potencial proliferativo de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana así como la distribución del DNA en las diferentes fases del ciclo celular no se ven alterados a la concentración de 0.15 μM de DHEA. Estos resultados indican que la diferencia de efecto de la DHEA en células EUHE en comparación con los linfocitos de sangre periférica hacen de la DHEA un agente con un fuerte potencial antileucémico y con un gran campo de estudio.

INTRODUCCIÓN

Los organismos multicelulares, para su funcionamiento como un todo integrado, dependen de la comunicación entre las células a fin de coordinar las funciones de los distintos tejidos y órganos. Esta comunicación intercelular se lleva a cabo a través de mensajeros químicos o moléculas señal. Una molécula señal es una sustancia química sintetizada por células con la finalidad de influir sobre la actividad de otras células del mismo organismo. Tales sustancias químicas pueden ser proteínas, péptidos pequeños, ciertos aminoácidos, esteroides, derivados de ácidos grasos, nucleótidos y determinados gases disueltos como el dióxido de carbono y monóxido de nitrógeno.

Las células en donde las moléculas señal actúan se denominan células blanco, que pueden ser de un solo tipo celular o de tipos celulares diferentes. Esta especificidad se debe a la presencia de receptores específicos que suelen estar localizados sobre la superficie de la célula blanco, pero que también pueden estar en el interior de la célula, en cuyo caso la molécula señal atraviesa la membrana celular e ingresa al citoplasma. Un receptor es un sitio de unión compuesto por una proteína, una glucoproteína o un polisacárido, en la superficie o dentro de una célula, a la cual se fija específicamente una sustancia con gran afinidad y desencadena así una respuesta específica. Una célula puede contener diferentes tipos de receptores para distintas moléculas señal, de manera que cada tipo celular está en condiciones de reaccionar individualmente frente a cientos de tipos distintos de moléculas señal, que llegan a la célula por el líquido extracelular y el torrente sanguíneo. La unión entre una molécula señal y el receptor desencadena variaciones alostéricas de la conformación del receptor, que inician los procesos moleculares que generan la respuesta (Alberts, 1996).

Según la distancia que migran las moléculas señal antes de actuar sobre las células blanco, se distinguen tres tipos de moléculas señal: 1) las que actúan como mediadores locales, dado que tienen función parácrina y sólo se difunden a una corta distancia para alcanzar los receptores de las células vecinas, sobre las cuales ejercen su acción, este proceso se denomina **señalización parácrina**, la difusión dura un período del orden de los segundos, y en ese lapso, el mediador local se fija al receptor de la célula blanco o es inmovilizado por componentes de la matriz extracelular, o es degradado por las enzimas extracelulares. 2) En algunos casos los mediadores locales actúan sobre receptores denominados auto-receptores, sobre la misma célula que secretó la molécula señal: este tipo de señalización se denomina **señalización autócrina** dado que tiene lugar una especie de autorregulación de las actividades celulares. 3) Por último, algunas moléculas señal llegan al torrente sanguíneo bajo la forma de hormonas, que alcanzan así a las células lejanas este proceso es conocido como **señalización endocrina** y depende de la difusión y del flujo sanguíneo, por lo que es relativamente lenta. Cuando la molécula señal es producto de una neurona y viajan

por el torrente sanguíneo para actuar sobre la célula blanco el proceso se denomina **señalización neuroendocrina** (Villem 1998).

El sistema endocrino y las Hormonas

El sistema endocrino está compuesto por células endocrinas aisladas, tejido endocrino y glándulas endocrinas. Las células que lo componen sintetizan hormonas. Una hormona es una sustancia química sintetizada por una célula y que es secretada al torrente sanguíneo para ser transportada a sitios alejados con la finalidad de influir sobre la actividad de otras células; de este modo, las hormonas alcanzan sus células blanco al cabo de segundos a minutos. Aunque las glándulas endocrinas son muy diferentes en sus características histológicas, tienen dos rasgos estructurales básicos comunes: la carencia de un sistema de conductos excretores y su basta vascularización. Sobre la base de la composición química del producto de secreción, las células endocrinas se dividen en dos tipos generales principales: las que secreta hormonas proteicas y las que secretan hormonas esteroides. (Geneser, 2000). En base de que en este trabajo la molécula en estudio es una hormona esteroide nos enfocaremos a la descripción de estas hormonas (Villego 1998).

Hormonas esteroides

Las hormonas esteroides, son pequeñas moléculas hidrofóbicas, todas ellas actúan a través de un mecanismo similar. Se difunden directamente atravesando la membrana plasmática de las células que las producen y se unen a proteínas receptoras intracelulares. La unión del ligando activa los receptores, los que regulan directamente la transcripción de determinados genes. Estos receptores tienen estructuras relacionadas entre sí y constituyen la superfamilia de receptores intracelulares (o superfamilia de receptores de hormonas esteroides) (Alberts, 1996).

Todas las hormonas esteroides son sintetizadas a partir del colesterol, a pesar de que todas estas moléculas son relativamente insolubles en agua, se hacen solubles para su transporte por el torrente sanguíneo y otros líquidos extracelulares mediante su unión a proteínas transportadoras específicas, de las que se separan antes de entrar en la célula blanco (Devlin 1997).

Además de la diferencia fundamental en la manera en que señalizan a sus células blanco, la mayoría de las moléculas insolubles en agua se diferencian de las solubles en cuanto al tiempo que se mantienen en el torrente sanguíneo y en los tejidos. La mayoría de las hormonas solubles en agua se eliminan y/o degradan en cuestión de minutos después de entrar al torrente sanguíneo y los mediadores locales y los neurotransmisores son eliminados del espacio extracelular incluso más rápidamente. Las hormonas esteroides, por el contrario, persisten en la sangre durante horas. En consecuencia, las moléculas señal solubles, habitualmente median las respuestas de duración corta, mientras que las insolubles tienden a mediar respuestas más duraderas (Alberts, 1996).

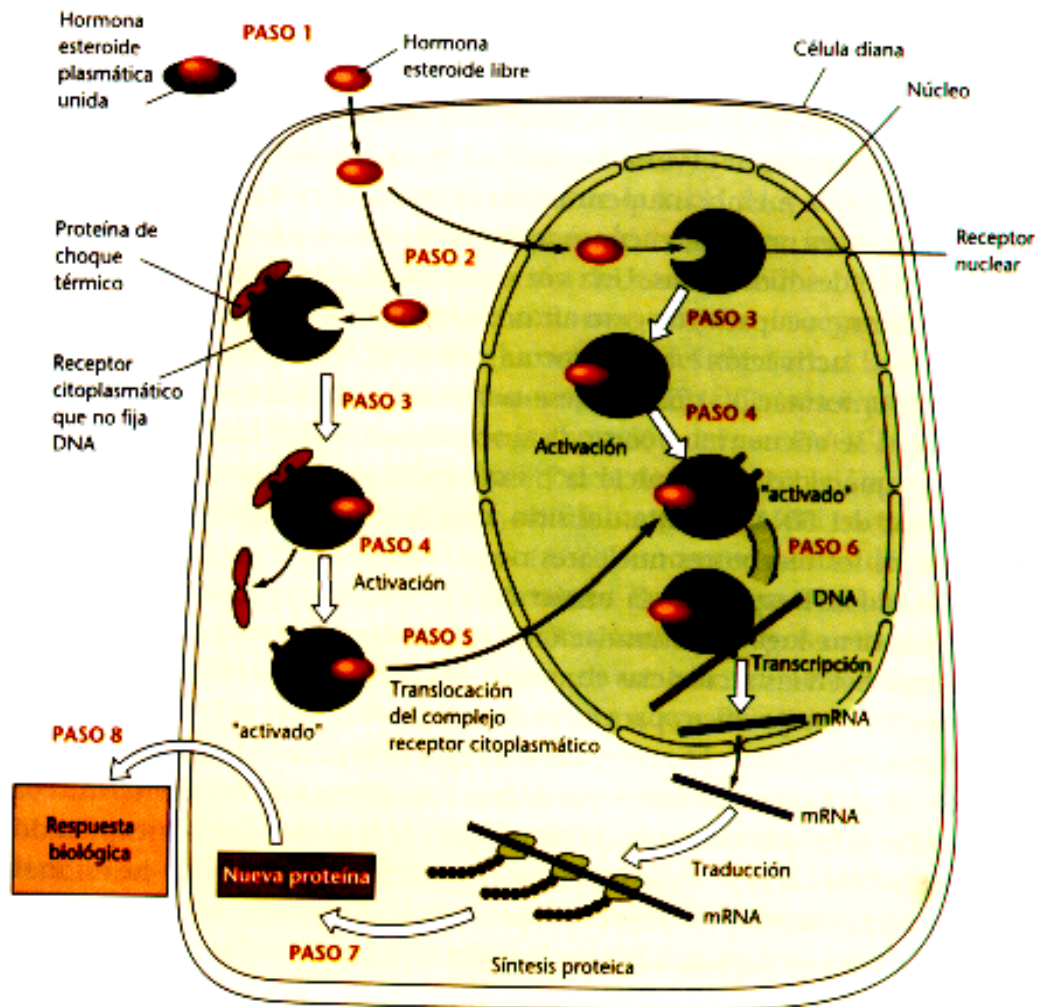


Fig.1 Modelo de la acción de las hormonas esteroides Paso 1. disociación de la hormona libre (biológicamente activa) de la proteína transportadora circulante: Paso 2: difusión del ligando libre al citosol o núcleo; Paso3: fijación del ligando al receptor citoplasmático o nuclear inactivado: Paso 4: activación del complejo hormona-receptor citoplasmático a la forma activa fijadora de ADN; Paso 5: translocación del complejo hormona-receptor activados al núcleo; Paso 6: fijación de complejos específicos de respuesta a elementos específicos de respuesta de ADN; Paso 7: síntesis de nuevas proteínas codificadas en genes sensibles a las hormonas; Paso 8: alteración en el fenotipo o en la actividad metabólica de la célula blanco debida a proteínas inducidas de manera específica. (Tomado de Devlin, 1997).

Todos los receptores intracelulares para las hormonas esteroides, se unen a secuencias específicas del DNA adyacentes a los genes que están regulados por el ligando correspondiente. Algunos de ellos, se localizan principalmente en el citoplasma y sólo se unen al DNA después de

unirse al ligando, otros se localizan principalmente en el núcleo y se unen al DNA incluso en ausencia de ligando. En cualquier caso, la unión de ligando altera la conformación de la proteína receptora, que entonces activa (u ocasionalmente inhibe) la transcripción génica. En muchos casos la respuesta tiene lugar en dos etapas: en primer lugar la inducción directa de la transcripción de un pequeño número de genes específicos, en cuestión de 30 minutos, y que se conoce como la respuesta primaria; los productos de estos genes, a su vez, activan otros genes, produciendo una respuesta retardada, denominada respuesta secundaria. Así, un simple incremento hormonal puede generar un complejo cambio del patrón de expresión génica (Alberts, 1996; Devlin 1997). (Fig. 1)

La respuesta a las hormonas esteroides, como en el caso de las respuestas a señales extracelulares en general, está determinada tanto por la naturaleza de la célula blanco así como por la naturaleza de la molécula señal. A pesar de que diferentes tipos celulares tengan receptores idénticos, el conjunto de genes que regula el receptor es diferente en cada caso. Ello es debido a que generalmente a cada gen eucariota se le ha de unir más de un tipo de proteína reguladora de genes, para activar su transcripción. Por ello, un receptor intracelular puede activar un gen sólo si existe la combinación adecuada de otras proteínas reguladoras del gene, y algunas de ellas son específicas del tipo celular. Así, las hormonas esteroides inducen un conjunto característico de respuestas en los animales, debido a que: 1) únicamente ciertos tipos celulares tienen receptores para ello; 2) cada uno de estos tipos celulares contiene una combinación diferente de otras proteínas reguladoras de genes que colaboran con el receptor activado influyendo en la transcripción de conjuntos específicos de genes (Alberts, 1996)

Estructura de las hormonas esteroides

Las hormonas esteroides se derivan de tejidos específicos del cuerpo y se pueden dividir en dos clases: las hormonas sexuales y las hormonas suprarrenales. Ambos tipos son sintetizados a partir del colesterol y todas estas hormonas requieren pasar por un intermediario, pregnenolona. La estructura de las hormonas esteroides está relacionada con el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno (Fig.2). El sistema de anillos de las hormonas esteroides es estable y no pueden ser catabolizadas por las células de los mamíferos. La conversión de las hormonas a formas activas, de baja actividad o inactivas implica la alteración del anillo (Devlin, 1997; Stryer, 2003).

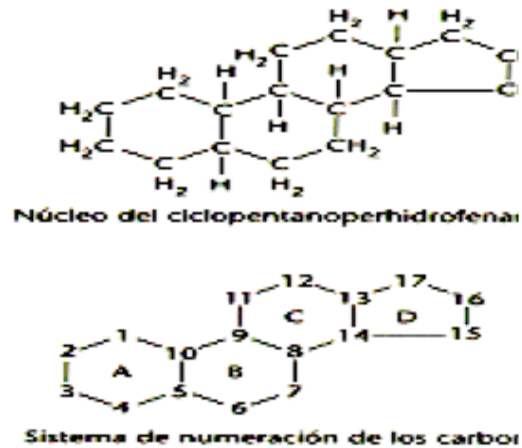


Fig.2 El núcleo de los esteroides Tomado de Devlin, 1997.

Algunas de las hormonas esteroides humanas son el cortisol, que es la hormona antiestrés más destacada, la aldosterona que regula la absorción de Na^+ , las hormonas sexuales entre las que se pueden mencionar al 17β -estradiol y la testosterona, y progestacionales donde la progesterona es la más importante. Sin embargo existen otras hormonas que son muy importantes para el funcionamiento del organismo tales como la 1,25-Dihidroxitamina D_3 y la Dehidroepiandrosterona (DHEA) que tiene diversos efectos protectores, puede convertirse en estrógeno, inhibe la G6-PDH, regula la coenzima NAD^+ , además algunos autores han mostrado que la DHEA tiene acción antiosteoporótica y acción trópica en piel y pelo así mismo, muchos investigadores han comenzado a evaluar el papel de la DHEA en la prevención de la carcinogénesis y en la inhibición del crecimiento de tumores. (Devlin1997)

DHEA

La Dehidroepiandrosterona (DHEA) y su sulfato (DHEAS) son los principales productos secretados por la glándula suprarrenal específicamente de la corteza, también puede ser secretadas por el cerebro gónadas y el tracto intestinal (Yoshida, 2003). Cuando la DHEAS se une a la albúmina y se convierte en un reservorio, la DHEA probablemente es más activa a nivel del tejido. La DHEA es considerada como un andrógeno débil, y su concentración tiene una gran variación diurna al igual que la DHEAS (Pertti y Veikko, 1994).

La pregnenolona, es el principal precursor de los tres principales grupos de esteroides suprarrenales (Parker, 1989 y Roberts y Fitten, 1990). Estos productos son liberados a la vena adrenal y al sistema circulatorio, influyendo en la respuesta de tejidos específicos. La DHEA (Fig.3) es clasificada como un esteroide C-19 regulado por la acción de la hormona corticotropina (ACTH) al igual que los andrógenos adrenales androstendiona y testosterona (Parker, 1989). La DHEA es producida por las células reticulares de las glándulas suprarrenales, que después de ser secretada por la glándula, se pone en circulación en el torrente sanguíneo como DHEA sulfato (DHEAS) y es convertida, de ser necesario, en otras hormonas incluyendo estrógenos, andrógenos y corticosteroides (Vande Wiele 1960). Ambas hormonas son las hormonas esteroides más abundantes en circulación. La concentración de DHEA en el plasma de un humano adulto es de 0.01 a 0.02 μM mientras que de la DHEAS es de 5 a 7 μM (Roberts, 1990 y Zumoff 1981). Sin embargo en síndromes hiperandrogenitales, los niveles de DHEA pueden elevarse hasta 28 μM . Los niveles de DHEA son elevados en pacientes con ovarios poliquísticos e hipertricosis (Regelson et al. 1990). Los niveles de DHEA son muy bajos en los primeros 7 años de vida, después de los cuales tienden a elevarse con un pico entre los 20 y los 24 años (De Peretti y Forest, 1978), Después de la segunda década hay una disminución sobre el 20% cada diez años. Investigaciones recientes sugieren que esta disminución de los niveles de DHEA están asociados con algunos cambios degenerativos asociados con la edad (Legrain, 2003)

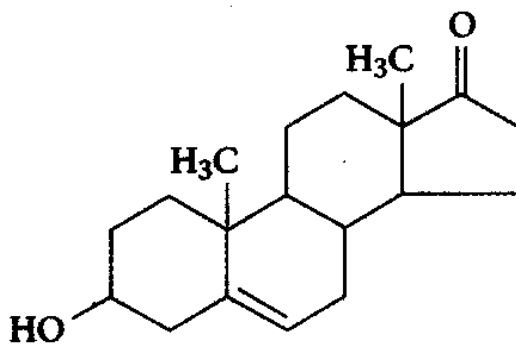


Fig.3. Estructura de la Dehidroepiandrosterona (Tomado de Devlin, 1997)

Biosíntesis de la DHEA

El colesterol es el principal precursor de las hormonas esteroideas incluyendo a la DHEA, el colesterol cambia a Δ^5 -pregnenolona liberando un C_6 aldehído. La Δ^5 -pregnenolona es indispensable en la síntesis de todas las hormonas esteroideas. La pregnenolona puede ser convertida directamente en progesterona, para lo cual requiere de dos enzimas citoplasmáticas, 3β -oldeshidrogenasa y $\Delta^{4,5}$ isomerasa. La deshidrogenasa convierte el grupo 3-OH de la pregnenolona a grupo 3-keto y la isomerasa mueve el doble enlace del anillo B al anillo A para producir progesterona. La progesterona es convertida posteriormente en aldosterona y cortisol. La conversión de progesterona en aldosterona, que ocurre en las células de la zona glomerular de la glándula suprarrenal, requiere de la 21-hidroxilasa del retículo endoplásmico, la 11β -hidroxilasa y 18- hidroxilasa mitocondrial. Para convertirse en cortisol requiere primeramente en las células de la zona reticulada de la glándula suprarrenal de la 17-hidroxilasa y la 21-hidroxilasa del retículo endoplásmico junto con la 11β -hidroxilasa mitocondrial. La pregnenolona es convertida en dehidroepiandrosterona en las células de la zona reticular por acción de 17α -hidroxilasa del retículo endoplásmico para formar 17α -hidroxipregnenolona y por la eliminación de un carbono cambia el sistema de unión para formar dehidroepiandrosterona. La DHEA es convertida en DHEAS por acción de la hidroesteroide sulfatasa. (Fig. 4 y 5).

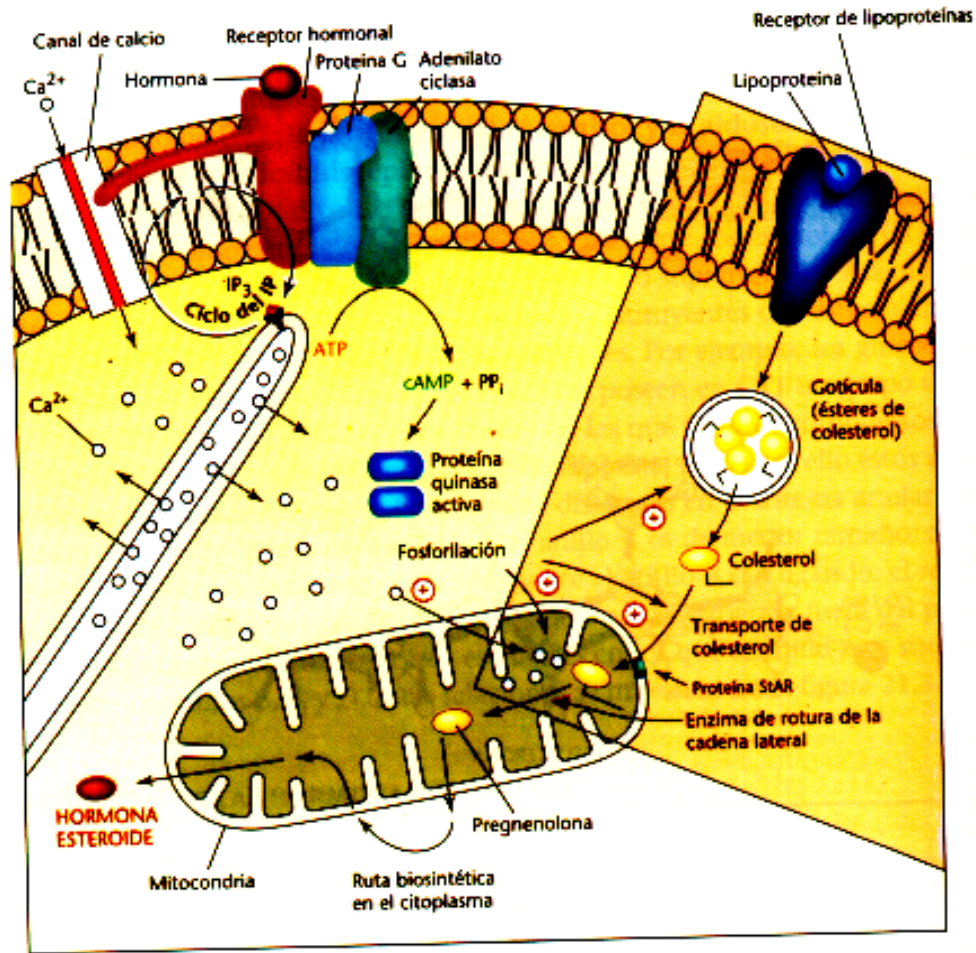


Fig. 4. Visión general de la estimulación mediante hormonas de la síntesis de hormonas esteroideas. La naturaleza de la hormona (parte superior de la figura) depende del tipo celular y del receptor. Dicha hormona se une al receptor de la membrana celular y activa la adenilato ciclasa mediante una proteína G estimulante. El receptor, activado por la hormona, puede estimular directamente, a través de la activación del ciclo del fosfatidilinositol (IP). Si el ciclo del IP se estimula al mismo tiempo el IP_3 puede elevar los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} a partir de la reserva de calcio intracelular. El aumento de AMPc activa la proteína cinasa A, que al fosforilar diversas proteínas multiplica la hidrólisis de los ésteres de colesterol de las gotículas que pasan a la forma libre e incrementa el transporte de colesterol a las mitocondrias. La combinación de niveles elevados de Ca^{2+} y de la fosforilación proteica, a sí como la inducción de la proteína StAR produce un aumento de los niveles de la cadena lateral y la biosíntesis de esteroides. El conjunto de estas reacciones consigue superar los pasos que limitan la velocidad de la biosíntesis de esteroides, con lo que la producción de estos aumenta. Los esteroides se secretan en el espacio extracelular y circulan por el torrente sanguíneo para alcanzar a los tejidos blanco. (Tomado de Devlin, 1997)

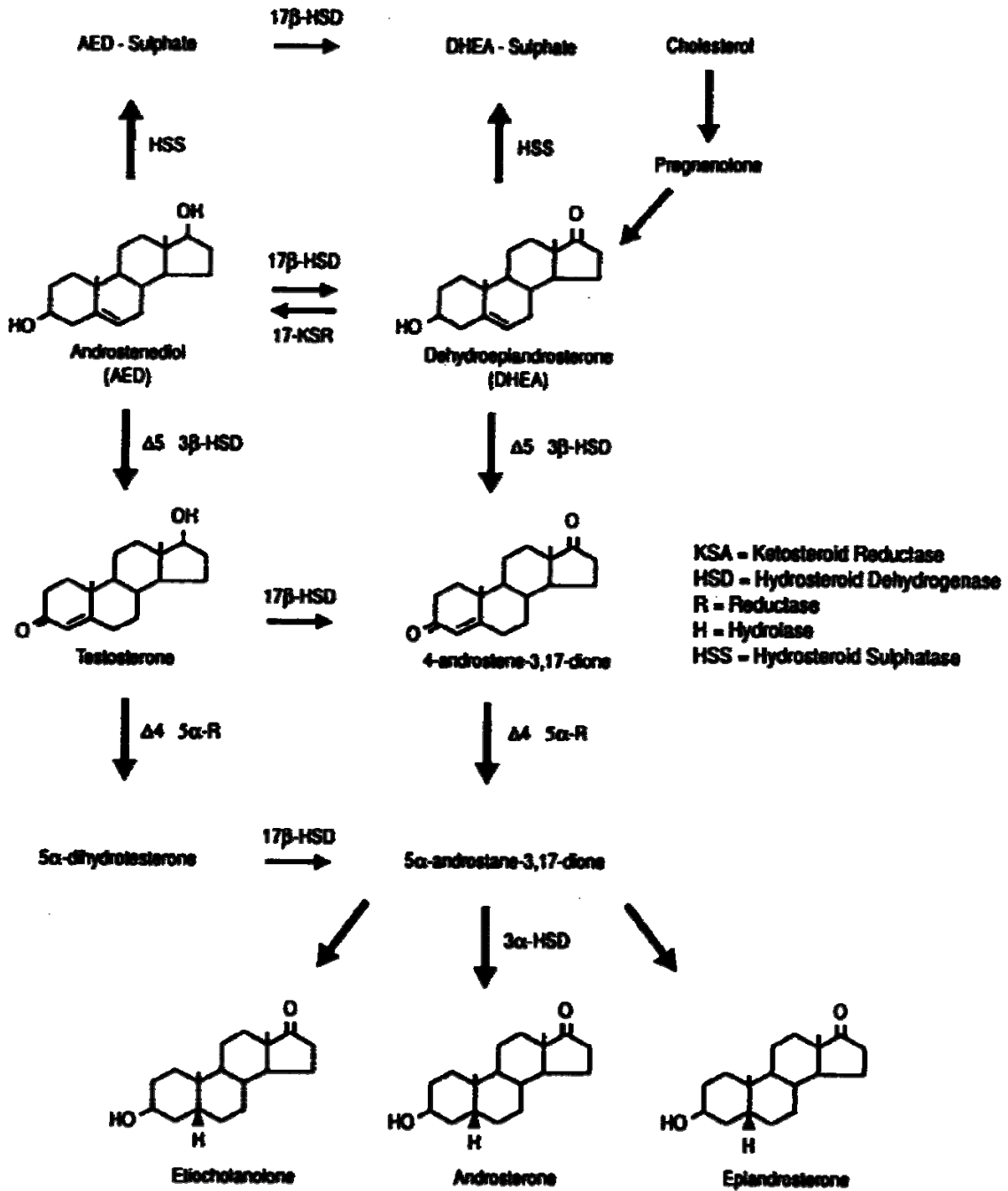


Fig. 5. Síntesis de la Dehidroepiandrosterona. (Tomado de Regelson et al 1995)

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LA DHEA

Importancia Fisiológica

A pesar de la abundancia de la DHEA y la DHEAS su papel fisiológico no es muy claro. In vitro e in vivo, algunos datos sugieren que al parecer tiene efectos parecidos a los estrógenos y andrógenos, dependiendo de la homeostasis de las hormonas sexuales (Drucker et al, 1972). En la mujer premenopáusica la DHEA es un antagonista de los estrógenos, quizá a través de la unión competitiva de su metabolito 5-androste 3β 17 β diol (ADIOL) y el estradiol al receptor de estrógenos, o a un andrógeno a través de su metabolismo hasta androstendiona o testosterona. Gordon y sus colaboradores (1987) mencionan que algunas evidencias epidemiológicas y experimentales sugieren que existe una relación inversa entre la alteración en los niveles sanguíneos o la excreción de este esteroide o sus metabolitos y el número de enfermedades o síndromes incluyendo el cáncer. Reportes recientes muestran que la DHEA tiene efectos benéficos en la prevención de la diabetes, inflamación, osteoporosis, daño hepático y cáncer de colon. (Aoki, 2003)

Efectos en la Proliferación Celular

Regelson, et al (1990) y Spector et al (1991) han mostrado que la DHEA tiene acción anti-osteoporosis y acción trópica en piel y pelo. El papel de la DHEA en la prevención de la carcinogénesis y en la inhibición del crecimiento de tumores ha sido evaluado por diversos investigadores. Sin embargo, hay observaciones paradójicas ya que la DHEA en dosis farmacológicas a largo plazo pueden producir hepatocarcinogénesis en ratones (Rao et al, 1992). También se ha mostrado que un gene de la susceptibilidad tumoral de la granulosa del ovario se estimula por la DHEA en los ratones SWX5 (Beamer et al, 1989), esto sugiere que la DHEA puede ser trópica dependiendo del locus cromosomal del tejido.

Paradójicamente, la DHEAS se ha encontrado en cantidades excedentes en los fluidos de las glándulas mamarias de mujeres premenopáusicas y posmenopáusicas de 50 a 1000 veces mayores que en el plasma, y existe una relación entre la elevación del fluido cístico, los valores de la DHEA y el factor de crecimiento epidermal (EGF) (Regelson et al, 1990).

Un análogo de la DHEA (16 α -fluoro-5androsteno-17-diona) (DHEA 8354), está siendo probado clínicamente en la prevención del cáncer en la poliposis de intestino. La DHEA 8354 es

efectiva contra la producción de tumores en una gran variedad de modelos de cáncer de intestino (Shibata et al, 1993; Hastings et al, 1988)

La DHEA inhibe la replicación celular y la incorporación de uridina en células proliferativas de hepatomas y hepatocitos, la DHEA a una dosis de 10 mg/kg/día induce la regresión en mastosarcomas espontáneos de perros y gatos (Regelson et al, 1988).

En células T de ratones db/db a las que se les indujo hepatitis con Concanavalina A (ConA); la DHEA redujo el daño hepático mediante la inhibición de algunos mediadores que promueven la inflamación y apoptosis (Aoki, 2003).

Otros estudios Clínicos

Se ha reportado que la DHEA ha sido utilizada en el tratamiento de gota, profiria, cirrosis, psoriasis, dilatación cervical, edema angioneurótico hereditario y cáncer (Regelson et al, 1990). La DHEAS ya está disponible en Europa, donde la han utilizado como un estrógeno en el tratamiento de los síntomas de la menopausia y depresión.

LA DHEA Y EL CÁNCER

La DHEA es un esteroide secretado por la corteza adrenal que al parecer posee propiedades quimioprotectoras en diferentes tumorigénesis de modelos animales (Schwartz, 1988; Zumoff, 1980). La administración de DHEA en animales se ha encontrado que puede proteger de una gran variedad de carcinogénesis experimentales; por ejemplo en el colon (Nyce, 1984 y Aoki, 2003), de pulmón (Schwartz, 1981; Moore et al. 1986), de hígado (Moore et al. 1986; Garcea et al. 1987; Garcea et al. 1988), de páncreas (Thornton et al. 1989) y de seno (Schwartz, 1979). Todos estos reportes sugieren que la DHEA tiene una eficacia quimiopreventiva; aunque se desconoce su mecanismo de acción.

En 1975 en el laboratorio del Instituto para la Investigación del Cáncer de la Escuela de Medicina de Filadelfia se demostró que la DHEA protege cultivos de células epiteliales de hígado de ratón y fibroblastos de embriones de ratón contra el efecto de aflatoxina B₁ y 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) que inducen citotoxicidad y transformación maligna.

Schwartz y colaboradores encontraron que un largo tratamiento con DHEA inhibe el desarrollo de cáncer de seno espontáneo en: ratones C3H-A^{vy}//A (obesos) (1979) y C3H-A/A, también inhibe tumores de pulmón inducidos con DMBA y uretano en ratones A/J (Schwartz, 1981).

Yang y sus colaboradores (2002) demostró que la DHEA presenta una actividad antimutagénica en el desarrollo de cáncer de seno inducido con DMBA en ratas Sprague-Dawley.

Ratko et al. (1991), reportan que la administración de DHEA 0.1 o 0.2 % en la dieta a ratas Sprague-Dawley tratadas con MNU inhibió significativamente la carcinogénesis mamaria inducida por MNU sin ningún efecto aparente en el aumento del peso.

Schwartz sus colaboradores en 1984 encontraron que la aplicación tópica de DHEA o el derivado 3 β -metilandroster-5-en-17-ona en ratones CD-1 (a los que se les indujo el desarrollo de papilomas con DMBA y 12-0-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)), reduce significativamente el número, la incidencia y el desarrollo de papilomas y carcinomas de la piel, sin tener ningún efecto en el crecimiento del cuerpo. Pashko y colaboradores encontraron que la aplicación tópica de DHEA inhibe el desarrollo de papilomas y carcinomas inducidos por aplicaciones de DMBA semanalmente (1985). Estos resultados sugieren que la inhibición del desarrollo de papilomas y carcinomas de piel por la DHEA es el resultado de la acción directa del esteroide sobre las células de la piel. La administración de la DHEA en la dieta también ha dado como resultado reducciones significativas en el índice de aparición y frecuencia en todos los estadios de las lesiones de colon

(hiperplasia atípica, carcinoma in situ, carcinoma invasivo) inducidas en hembras de ratón BALB/c con 1,2-dimetilhidrazina (Nyce, 1984). También la administración de DHEA en la dieta inhibe significativamente el desarrollo de tumores de tiroides y la frecuencia de lesiones neoplásicas en el hígado de ratas F344 que fueron tratadas con dihidroxidi-n-propilnitrosamina (Moore, 1986).

Cuando el TPA es aplicado a la piel del ratón induce hiperplasia epidermal. Pashko observaron (1981) que una simple inyección intraperitoneal de DHEA (10mg/kg) a ratones ICR una hora antes de la aplicación de TPA en la piel, impide la estimulación del TPA en la incorporación de [³H]T epidermal. La DHEA también suprime la estimulación del TPA en la incorporación de [³H]T epidermal cuando es administrada oralmente o se aplica tópicamente en dosis que inhiban la promoción del TPA de los papilomas de piel. La inhibición por DHEA de la hiperplasia epidermal inducida por TPA se confirmó por la examinación histológica de piel de ratón, así como determinando el contenido de DNA de una sección de 2x2 cm² de piel 48h después de la aplicación del TPA.

Hematopoyesis

Las células sanguíneas maduras presentes en la circulación, desempeñan una gran variedad de funciones fundamentales para el organismo, los eritrocitos transportan el oxígeno, las plaquetas participan en el control de la coagulación sanguínea, mientras que los granulocitos, monocitos y linfocitos intervienen en la defensa inmunitaria contra los agentes extraños (Zambrano et al., 1999). Estas células tienen periodos de vida relativamente cortos muriendo por senescencia o durante el desarrollo de sus funciones normales (Hughes-Jones & Wickramasingh, 1991). La pérdida de las células sanguíneas es rápidamente equilibrada por la formación de nuevas células sanguíneas, mediante el proceso conocido como hematopoyesis (haima-sangre; poyesis-producción) (Orkin, 1995).

La producción de células sanguíneas en el humano inicia en el saco vitelino durante los primeros 14 a 19 días de vida embrionaria, el hígado y bazo fetal se convierten en los principales órganos hematopoyéticos en el segundo trimestre de embarazo y la médula ósea fetal hacia el tercer trimestre. Después del nacimiento, es la médula ósea el principal sitio hematopoyético en individuos sanos. Durante los primeros cuatro años de vida, la médula de todos los huesos contribuye a la hematopoyesis (Munker et al, 1998).

Posteriormente, con el incremento de células adiposas en ciertas regiones de la médula, la hematopoyesis queda restringida, de manera que a la edad de 25 años, los únicos sitios hematopoyéticos activos son los huesos pélvicos, la columna vertebral, las regiones proximales de fémur y húmero, el cráneo y el esternón (Hughes-Jones & Wickramasingh 1991). La producción diaria de eritrocitos, plaquetas y granulocitos en el adulto normal es de aproximadamente 3×10^9 , 2.5×10^9 y 1×10^9 por kilogramo de peso corporal, respectivamente. Este nivel de producción se ajusta a las necesidades del individuo y puede variar desde casi cero hasta muchas veces lo normal.

El peso aproximado de la médula ósea en el adulto, calculado en estudios de necropsia, es de 3.4 a 5.9% del peso corporal total. Con el empleo de coloides radiactivos se ha estimado que el peso aproximado de la médula ósea hematopoyéticamente activa es de 1000 g y que ésta se distribuye en pelvis (34%), vértebras (28%), cráneo y mandíbula (13%), esternón y costillas (10%), húmeros, escápulas y clavículas (8%) y fémures (4%) (Guillermo J. 2004)

Las células sanguíneas se desarrollan dentro de un ambiente particular llamado microambiente hematopoyético (Prosper et al., 2001). El microambiente hematopoyético está integrado por un componente celular y un componente proteico, el cual está constituido por distintos tipos celulares y proteínas extracelulares. Las células que constituyen de manera

permanente el microambiente hematopoyético conocidas como células del estroma medular o estromales, son principalmente fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, osteoblastos, adipocitos y células accesorias (monocitos, linfocitos y células NK) denominadas así por estar de manera transitoria en el microambiente.

La principal función de las células estromales es promover el microambiente propicio para favorecer la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas de los diferentes linajes hematopoyéticos (Linaje mielóide: eosinófilos basófilos, neutrófilos, granulocitos, monocito-macrófagos, megacariocitos y eritrocitos; Linaje linfóide: Linfocitos T y B). Estas células principalmente secretan proteínas (componente proteico) como la colágena, fibronectina, laminina y proteoglicanos que constituyen la matriz extracelular, o proteínas conocidas como citocinas o factores de crecimiento (HGF por sus siglas en inglés Hematopoietic Growth Factor) que regulan la fisiología de las células hematopoyéticas y sus precursores (Munker et al., 1998; Prosper et al., 2001).

La hematopoyesis es sustentada a partir de la proliferación y diferenciación de un grupo de células conocidas como células tallo hematopoyéticas (CTH) (Orkin, 1995). Estas células son pequeñas y con poco citoplasma, se concentran principalmente en el estroma de la médula ósea, se caracterizan por su alta capacidad proliferativa y de auto-renovación (Ogawa & Matsunaga, 1999; Orlic & Bodine, 1994),

Así como por la ausencia de características morfológicas o histoquímicas, propias de las células maduras o comprometidas hacia algún linaje celular. En condiciones normales la mayoría de estas células se encuentran quiescentes (Fase G₀ del ciclo celular). Estas células son consideradas totipotenciales, dado que son susceptibles de comprometerse hacia cualquiera de los linajes celulares sanguíneos mieloides y linfoides, cuando son estimuladas con la combinación de diferentes citocinas (Morrison et al., 1995; Ogawa, 1993), además tienen la capacidad para reconstruir la hematopoyesis a corto y largo plazo, en individuos mielosuprimidos después de una quimioterapia (Morrison et al., 1995), y solo constituyen menos del 0.005% de las células mononucleadas en médula ósea (Fig. 6).

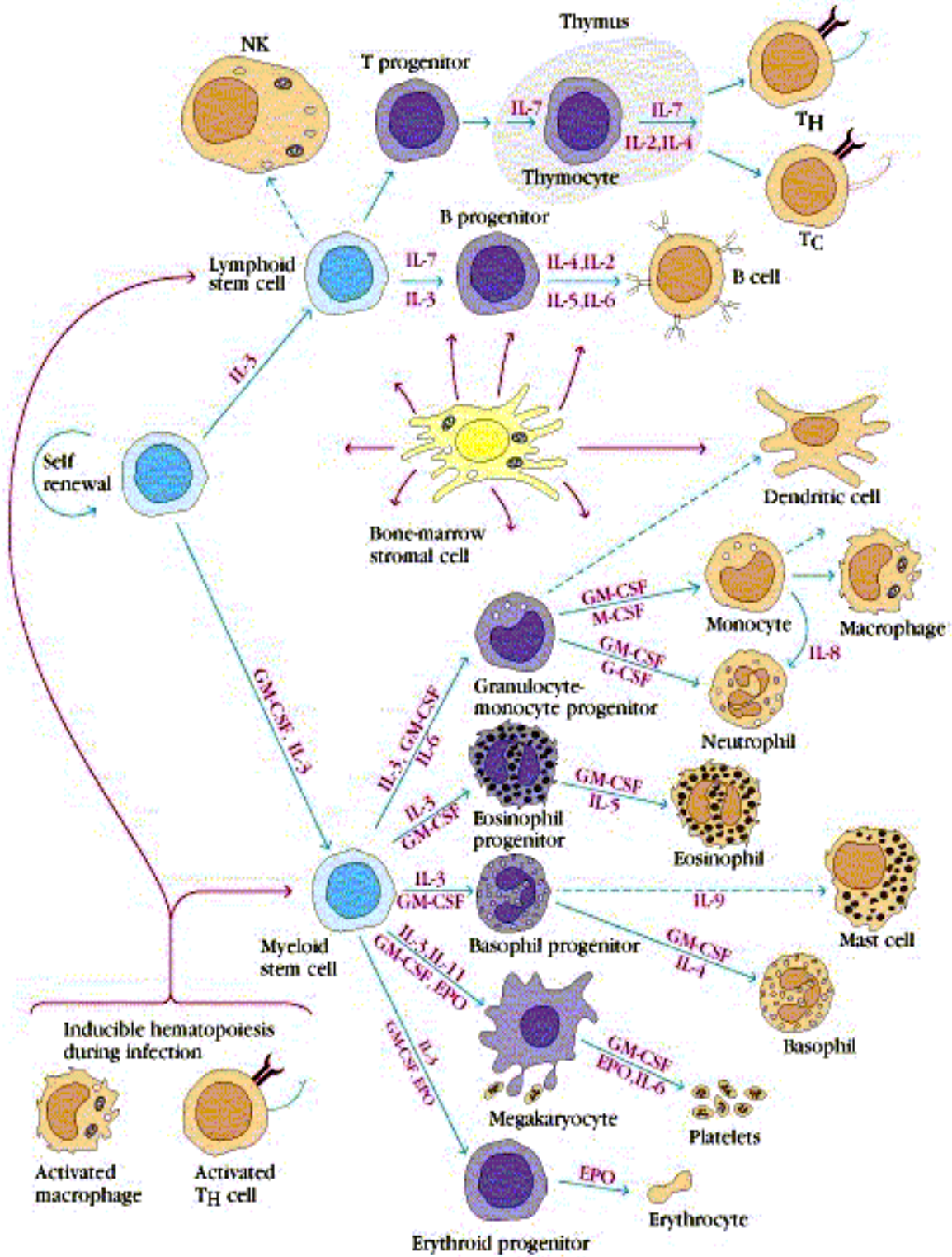


Figura 6. Representación esquemática de la Cascada de maduración Hematopoyética.

CÁNCER

El término cáncer comprende un grupo de enfermedades neoplásicas en las que existe transformación de las células corporales normales en malignas. Esto implica cambios en el material genético de las células, es decir, en el DNA. Las células cancerosas están definidas por dos propiedades hereditarias 1) se reproducen a pesar de las restricciones normales y 2) invaden y colonizan lugares normalmente reservados para otras células, estas características son las que hacen especialmente peligrosos a los cánceres. Cuando la proliferación de una célula anormal está fuera de control se produce un tumor o neoplasma; si estas células neoplásicas permanecen agrupadas en una masa única el tumor es benigno. Un tumor se considera canceroso sólo si es maligno, es decir, si sus células tienen la capacidad de invadir el tejido circundante, son capaces de liberarse del tumor, entrar en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos y formar tumores secundarios en otros lugares del cuerpo, proceso conocido como metástasis. Los cánceres se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular en el que se originan. Los cánceres procedentes de células epiteliales se denominan carcinomas; los que proceden de tejido conjuntivo o de células musculares se denominan sarcomas y por último los derivados de células hematopoyéticas o de células del sistema nervioso se denominan leucemias (Doll, 1987).

Las líneas celulares normales pueden transformarse en células cancerígenas a causa de virus, carcinógenos químicos e irradiación. Las líneas celulares transformadas tienen la capacidad de desarrollarse en neoplasias malignas, estas células transformadas se reconocen por ciertas características que incluyen antigenicidad alterada, inhibición por contacto disminuida, requerimientos reducidos de determinados nutrientes y la capacidad de crecer en suspensión. Las células alteradas transmiten información genética inapropiada a su descendencia y comienzan a proliferar de un modo anormal y destructivo. Normalmente, las células se reproducen con regularidad para reemplazar tejido agotado, para reparar lesiones y para permitir el crecimiento durante los años de desarrollo. Cuando los tejidos han sido reemplazados, las heridas reparadas o el crecimiento completado, la reproducción celular se detiene (Ruiz 2004)

El cuerpo regula, en su proceso normal, el crecimiento celular de un modo ordenado; en cambio en el cáncer, no existe regulación y la reproducción celular y el crecimiento son desordenados. Los peligros del cáncer están relacionados con la reproducción caótica de las células malignas. Otra forma en que la malignidad puede producirse es por el ingreso en una cavidad corporal y entrar en contacto con un órgano sano; sin embargo, éste no es el modo común en que se produce la metástasis.

Existen dudas respecto de que un solo proceso esté involucrado en la etiología de todos los tipos de cáncer. La causa exacta de la conversión de células normales en cancerígenas aún no se

comprende por completo. Un factor importante es la alteración constante del DNA que pasa de una generación a otra, pero no existe la certeza sobre la causa que desencadena el cambio en la estructura del DNA y porqué algunas personas sucumben al cáncer y otras no. La inmunidad celular sin duda desempeña algún papel en la capacidad para detener el crecimiento de células cancerígenas; algunos investigadores creen que la mayoría de las personas desarrolla pequeños cánceres en el curso de sus vidas pero no presentan signos clínicos porque sus mecanismos de defensa destruyen las células malignas y evitan su replicación. Los oncólogos reconocen que los factores ambientales, hereditarios y biológicos desempeñan un papel importante en el desarrollo del cáncer. La incidencia de cáncer en determinadas poblaciones sugiere que coexisten otros factores importantes en su desarrollo como son el patrón hereditario, la administración de drogas inmunosupresoras y la edad.

Linfomas

Tradicionalmente los linfomas han sido considerados tumores del sistema linfático pero posteriormente han sido reconocidos como neoplasias del sistema inmune. La evolución de una clona maligna se puede gestar en cualquiera de las áreas que conforman a los folículos linfoides ya sea a nivel cervical, esplénico o en médula ósea, a diferencia de la leucemia las células de los linfomas muestran cohesión y consistencia por lo que llegan a constituir tumores sólidos (Hillman 1975).

La clasificación de linfomas ha sufrido varios cambios y controversias, los primeros antecedentes fueron establecidos por Hodgkin que describe siete casos tumorales en los glándulas absorbentes, un poco mas adelante Virchow define los criterios diferenciales entre las leucemias y los linfomas, en 1865 se aplica por primera vez el término de enfermedad de Hodgkin, en 1898 y en 1902 Sterberg y Reed respectivamente describen las alteraciones histopatológicas de la enfermedad y además resaltan la importancia del hallazgo de células anormales y gigantes a las que hasta la fecha se les reconoce como el marcador de la enfermedad de Hodgkin, se trata de las células de Reed-Stenberg. Los intentos por clasificar a los linfomas han sido múltiples pero las iniciales propuestas sobresale la de Jackson y Parker (1947) quienes identifican tres grupos: EL paragranuloma, leal granuloma y el sarcoma. Mas tarde Lukes –Butler (1966) introduce criterios histopatologicos que de alguna manera lo relaciona con la clasificación de Jackson y Parker (Ruiz 2004).

En estas clasificaciones se fue partiendo del aspecto macroscópico de los linfomas y posteriormente al detalle histológico, luego se incorporo la descripción morfológica del tipo celular predominante y entonces aparecieron los nombres como linfoma linfoblástico, linfoma linfocítico pobremente diferenciado o linfoma linfocítico bien diferenciado entre otros, esta clasificación

corresponde a Rappaport y es aplicable a los linfomas no Hodgkin. Con el advenimiento de los anticuerpos monoclonales fue entonces posible conocer la expresión antigénica de las células linfomatosas, mediante el panel adecuado de anticuerpos monoclonales para la línea T, B activados o no activados, para las células de Reed-Stenbergo para inmunoblastos.

El término de linfoma no-Hodgkin es una definición negativa poco afortunada, que se refiere a las neoplasias del sistema reticuloendotelial, diferentes de la enfermedad de Hodgkin. El término de linfoma no-Hodgkin comprende entidades con un amplio espectro en cuanto a agresividad clínica, desde neoplasias con un curso largo e indolente (linfomas foliculares), hasta las que presentan una extraordinaria velocidad de crecimiento e invalidad (linfoma linfoblástico y linfoma de células pequeñas no hendidas (Millar et al. 1998).

De acuerdo con el registro Histopatológico de Neoplasias en México, en 1999 se diagnosticaron 2 911 casos nuevos de linfoma no-Hodgkin, lo que representa 0.98% de todas las neoplasias malignas; por otro lado, según este mismo registro, los linfomas no-Hodgkin ocupan el eudécimo lugar en hombres y el decimotercero en mujeres como causa de muerte lo que representa 0.3% del total de defunciones (Graus-Weisman 1980).

El extenso uso de marcadores facilitó mucho el diagnóstico de linfomas no Hodgkin. En primer lugar, la difícil distinción entre el trastorno linfoproliferativo y el carcinoma a veces se facilita mediante la aplicación de anticuerpos monoclonales contra el antígeno común leucocitario (CD45), los cuales reaccionan con todas las células linfáticas de los cortes en parafina o sometidas a proceso criostático, y anticuerpos contra citoqueratina que reconoce la mayoría de los carcinomas. En segundo lugar, mediante paneles de anticuerpos monoclonales que diferencian los elementos celulares que conforman el tejido linfoide normal se puede conocer con certeza la célula de origen del linfoma.

La mayor parte de los linfomas no Hodgkin se origina en células B y la característica reveladora del diagnóstico para los inmunólogos es la síntesis de inmunoglobulina monotípica, o sea de sólo una cadena ligera, en contraste, la población de células en un sitio de hiperplasia de células B reactivas se tiñe para las cadenas **k** y **a**.

Los linfomas de células del centro folicular que limitan el centro germinativo reactivo representan más del 50% de los linfomas B. exhiben inmunoglobulina de superficie monotípica y los centrocitos y centroblastos de mayor tamaño, que componen los dos tercios de los casos, contiene inmunoglobulina citoplasmática. Se tiñen para complejo mayor de histocompatibilidad Clase II y débilmente para el antígeno común de leucemia linfoblástica aguda. Algunas células con morfología similar conforman tumores denominados en conjunto "linfomas de la zona del manto" o "linfomas de células pequeñas escindidas". Pero difieren de las células del centro folicular en que

presentan tinción de superficie positiva para inmunoglobulina G y CD5 y negativa para el antígeno común de leucemia linfoblástica aguda. Las células linfoblastoides del linfoma de Burkitt exhiben el antígeno común para la leucemia linfoblástica aguda e inmunoglobulina M de superficie (Ruiz 2004).

La enfermedad de Hodgkin es una entidad neoplásica de las células que normalmente existen en el tejido linfóide y que afectan órganos del llamado sistema inmunológico. Aún no se precisa su origen celular, pero existen informes cada vez más numerosos de que se genera en los linfocitos "B" activados de los folículos linfoides ganglionares. Con el uso de anticuerpos monoclonales específicos, las células características de la enfermedad tienen el fenotipo CD15+, CD30+, CD74+ Y CD45+; son células "B" de expresión frustrada. El tejido linfóide que rodea a estas células es del tipo T CD4+. No se conoce el agente causal. Algunos estudios epidemiológicos de brotes en comunidades, áreas escolares y familias, sugieren una respuesta excesiva a un agente infeccioso, que puede ser viral. El agente viral más estudiado ha sido el de Epstein-Barr, un herpesvirus que suele causar linfopenia, depresión de linfocitos cooperadores CD4 y reducción de la inmunidad celular. Sin embargo, hasta la fecha se ha demostrado el genoma viral sólo en un poco más de la mitad de los tejidos afectados por linfoma de Hodgkin, con mayor frecuencia en los pacientes mestizos latinos que en los caucásicos (Ruiz 2004).

Anatomía patológica. El diagnóstico de la enfermedad depende del estudio histológico de un ganglio linfático. Las biopsias por medio de aguja a los aspirados ganglionares no son útiles para el diagnóstico. Desde 1945, Lukes y Parker elaboraron las primeras clasificaciones diagnósticas; dicha clasificación fue denominada después por Lukes y Butler en 1960 se definió en la convención de Rye en Nueva Cork donde se incluyeron cuatro variedades, que aún persisten en las nuevas clasificaciones de la Revised European-American Lymphoma (REAL) de 1994 y la de la OMS en 1999.

La evolución histológica descrita muestra clara progresión de la abundancia de linfocitos a la escasez, y de la deficiencia de células de Reed-Sternberg a gran cantidad de las mismas. En ese mismo orden sucede la respuesta al tratamiento quimioterapéutico solo, o combinado con radioterapia o inmunoterapia.

El antígeno Ki-1 específico de la célula de Reed-Sternberg se designa con el CD30 y también se observa en linfomas unicelulares de carácter anaplásico y en linfomas de células grandes.

Cuadro clínico: Los enfermos generalmente cursan con crecimientos ganglionares de consistencia aumentada, móviles, indoloros, que tienen más de seis semanas de evolución y miden

más de 3 cm, debido a que un ganglio o varios han confluído. El sitio más frecuente en 70 % de los casos es el cuello y en 90 % de los pacientes las lesiones son superficiales. Inicialmente no hay otras manifestaciones clínicas concomitantes, pero, conforme avanza la enfermedad, hasta 50 % de los sujetos empieza a tener síntomas constitucionales, fiebre de escasa magnitud, casi vespertina o nocturna, seguida de sudación nocturna, ambas intermitentes, producidas por liberación de interleucina 1 y 2.

Tratamientos o terapias de leucemias

El tratamiento cito-ablativo radical de los pacientes leucémicos, mediante radioquimioterapia, destruye las células madre de la médula ósea, que se pueden extraer antes del tratamiento, purgar con anticuerpos citotóxicos para eliminar las células leucémicas y reubicar más tarde para recuperar al paciente. Sin embargo, este tratamiento no elimina todas las células leucémicas; una estrategia más efectiva es el trasplante de médula ósea alogénica de donantes con un complejo mayor de histocompatibilidad razonablemente compatible, que ejercen un efecto injerto versus huésped importante aunque no muy bien entendido. El proceso de purgar la médula ósea para eliminar las células T y así impedir la enfermedad injerto versus huésped, que representa una seria complicación de estos trasplantes, extrae al mismo tiempo la ponderada actividad antileucémica, por lo que se plantea un dilema.

El pronóstico global de los pacientes con linfoma no Hodgkin es malo, aunque mejora con la quimioterapia combinada. En los receptores de trasplante se observa una probabilidad 35 veces mayor de desarrollo del linfoma que los individuos normales, y hay indicios de que esto no necesariamente se debe atribuir a la inmunosupresión de largo plazo (Avilés et al. 1992).

La terapia depende del estadio de la patología, los pacientes con enfermedad localizada en el tejido linfoide por encima del diafragma responde bien a la radioterapia, mientras que los portadores de enfermedad diseminada requieren un tratamiento más agresivo.

Linfoma EuHe

Histopatológicamente. La línea celular EuHe resultó Enfermedad de Hodgkin var. Celularidad mixta que persiste hasta la fecha, morfológicamente se encontraron células de Hodgkin de Reed-Sternberg y otras. Citoquímica PAS+, SN-, Esterasa-, Inmunofenotipo CD20+, CD19+, CD30 dudoso, CD10-, CD3-, CD8-, CD13-, CD33-, Ia-, Pendiente CD15. El tiempo de duplicación de las células es de 16h, su eficiencia de clonación en agar suave 60%.

JUSTIFICACIÓN

En nuestro país, actualmente, en la población de 1 a 4 años, la leucemia representa 54 de cada 100 defunciones, en el caso de 5 a 14 años, la leucemia provoca 57.6 por ciento de éstos fallecimientos. Es la primera causa de mortalidad de menores de 15 años, de manera que ha surgido la necesidad de desarrollar nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad, principalmente para las personas que presentan leucemias severas. Los tratamientos que se conocen hasta ahora son muy agresivos con el organismo, en especial la radioterapia y la quimioterapia, ya que no actúan específicamente sobre las células tumorales, ocasionando efectos negativos en el resto del cuerpo, disminuyendo significativamente la calidad de vida del paciente. Es bien sabido que el organismo produce un gran número de sustancias que regulan la proliferación celular de forma natural, de manera que se ha considerado la posibilidad de poder encontrar alguna o algunas sustancias que sean capaces de inhibir la proliferación de las células tumorales. En los últimos años se han estudiado un gran número de sustancias que al parecer inhiben la proliferación celular, entre estas se ha considerado a la dehidroepiandroesterona (DHEA) y se ha encontrado que puede inhibir el crecimiento de tumores, así como el desarrollo de papilomas y carcinomas en diversos órganos de ratas y ratones. A pesar de los estudios que se han realizado con esta hormona, no se han realizado estudios sobre el efecto de ésta sobre linfomas, por lo que se considera de gran importancia realizar trabajos de investigación que permitan evaluar el efecto que produce ésta hormona sobre dichas células. Por lo que en el presente trabajo se pretende emprender dicho estudio específicamente para el linfoma EuHe, orientado en la generación de información que en el futuro pudiera ser útil en el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de linfomas.

Objetivos Generales:

Evaluar sí la DHEA afecta el potencial proliferativo y el ciclo celular de las células de linfoma humano EUHE, así como si induce muerte por apoptosis.

Objetivos particulares:

- a) Estandarizar las condiciones de cultivo de células de linfoma humano EUHE y linfocitos de sangre periférica humana.
- b) Determinar la concentración de DHEA en la cual se observe un 50% de decremento en el número celular (IC_{50}), tanto para las células EUHE, así como para las células linfocíticas.
- c) Evaluar sí el decremento en el número celular es causado por la detención en alguna de las fases del ciclo celular, para ambos cultivos celulares.
- d) Establecer sí la DHEA induce a las células EUHE y a las células linfocíticas a entrar en apoptosis, a través de la detección de la caspasa 3 y la fragmentación del DNA, evaluadas a través de inmunocitoquímica y la técnica de TUNEL respectivamente..

Hipótesis

Es conocido que la DHEA es capaz de inhibir la proliferación celular de células normales así como de tumorales, a través de la detención en la fase G1 del ciclo celular, por lo que existe la posibilidad de que la DHEA induzca el mismo efecto sobre las células de linfoma humano EUHE.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las concentraciones de DHEA

Para obtener el primer Stock, se pesa 0.00288 g. y diluye en 100 μL de etanol para obtener la concentración de 0.1 μM , de este se toma 10 μL y se le adiciona 90 μL de etanol para obtener el segundo Stock y este tiene una concentración de 0.01 μM .

Para obtener las concentraciones deseadas se toma un microlitro del segundo Stock y se diluye en 1 μL de medio de cultivo al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) para tener una concentración de 0.01 μM , del mismo Stock se toma 5 μL y de de igual forma que la primera concentración de lleva a 1 mL para obtener 0.05 μM .

Del primer Stock se toma 1 μL y se lleva a 1 mL de medio al 10 % de SFB y reobtiene una concentración de 0.1 μM para obtener las siguientes concentra se tomaron del mismo Stock 1.1, 1.3, 1.5, 1.7 y 1.9 μL y se llevaron a 1 mL de medio de cultivo al 10 % de SFB para obtener las siguientes concentraciones finales de 0.11, 0.13, 0.17 y 0.19 mM respectivamente.

Para los controles con etanol (OH), los cultivos fueron estimulados con RPMI al 10% de SFB y 0,5 % de etanol, para el control positivo (C) solo se pone RPMI al 10 % de SFB en ensayos del linfoma humano EuHe.

Para los ensayos de linfocitos el control positivo (C+) este se estimulo con fitoemaglutinina (0.025mL por cada mililitro de medio de cultivo utilizado) y el control negativo (C-) solo se puso el medio de cultivo.

Obtención de linfocitos humanos

Los cultivos primarios de linfocitos se obtendrán de sangre periférica humana. Una jeringa nueva y estéril de 20 mL se remoja internamente con heparina (5000 UI/mL, (PiSA, México). En breve, se extrae de la vena del brazo de un voluntario sano 20 mL de sangre periférica. Por otro lado, en un tubo de fondo cónico de vidrio, se depositan 3 mL de Ficoll-Hypaque (densidad de 1.077, +/- 0.001) (Sigma, E.U.). Inmediatamente se agrega lentamente por la pared del tubo 6-7 mL de sangre, de tal forma que la proporción ficoll-sangre sea de 1:2. Se centrifuga el tubo a 70 g/30-40 min. De esta manera, las células mononucleares de sangre periférica se separan al centrifugarlas por gradiente de densidad con el Ficoll-Hypaque.

De esta forma, se pueden apreciar a través de la columna del tubo cuatro fases: hasta el fondo, una de un líquido de color rojo (eritrocitos), luego una transparente (Ficoll-Hypaque), le siguió un fino anillo blanco (linfocitos y monocitos) y hasta la superficie, un líquido amarillo (plasma). Se colecta el anillo de linfocitos con una pipeta de 1 mL, evitando extraer la fase Ficol la cual se deposita en un tubo cónico de vidrio y se lava (resuspendiendo) con 10 mL de RPMI-1640. Se centrifuga a 70 g/5 min., se retira el líquido por decantación y se vuelve a lavar con RPMI-1640 y centrifugar a 70 g/5 min.

El botón celular se resuspende con RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de SFB, se vierte a una caja petri y las células se mantienen en condiciones de cultivo por 1 h (con esto se adhieren al fondo de la caja los monocitos, permaneciendo en suspensión los linfocitos). Al término de este tiempo se colecta el medio, el cual contiene los linfocitos, se transfiere a otro plato de cultivo y se ocupan para los ensayos biológicos.

Establecimiento de cultivos de células de linfoma EUHE.

Inicialmente las células EUHE fueron cultivadas en RPMI al 10% de SFB por 48 h y posteriormente fueron resembradas en cajas petri de 5 ml (NUNCLON) para su uso en los ensayos biológicos.

Efecto de la DHEA en la proliferación del linfoma EuHe

Para los ensayos experimentales, las células se sembraron en placas de 96 pozos (Nunc, Dinamarca) a una densidad inicial de 5,000 células por pozo en 100 μ L de medio como ya se indicó. Los tratamientos se realizaron agregando diferentes concentraciones de DHEA de 0.01, 0.05, 0.1, 0.11, 0.13, 0.15, 0.17 y 0.19 μ M solubilizada en etanol absoluto (SIGMA). Los controles utilizados fueron cultivos que no se estimularon con DHEA y a los que se les agregó 5 μ L de etanol (como un vehículo). Las células fueron incubadas durante 48 horas y posteriormente se evaluó la proliferación por los métodos que se describen a continuación.

Determinación de la Proliferación Celular mediante la técnica de Incorporación del Colorante Cristal Violeta.

Uno de los métodos utilizados para evaluar la proliferación celular fue la técnica de incorporación del colorante cristal violeta a los núcleos celulares. (Kueng et al, 1989) Esta técnica consistió en sembrar y estimular a las células en las mismas condiciones de cultivo que se mencionaron. Transcurrido el tiempo de estímulo, las células fueron fijadas durante 10 minutos con

glutaraldehído al 1.1% (SIGMA); las placas fueron lavadas y secadas al aire. Se añadieron 50 μ l/pozo del colorante cristal violeta al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico (SIGMA) pH 6.0 y se mantuvo durante 10 minutos en agitación constante. Después de la tinción, se lavaron tres veces las cajas de cultivo con agua desionizada o bidestilada, de tal manera que el colorante no asimilado fue retirado de los pozos. Posteriormente se añadieron 50 μ l de ácido acético al 10%, dejando en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente para desteñir a las células y que el colorante quedara en suspensión de forma homogénea. Posterior a eso, se tomaron las lecturas de cada pozo en un lector de placas de ELISA (EI_x800; Bio-Tek) a 570 nm, y las densidades ópticas se graficaron como % de proliferación celular con respecto al control.

Citometría de Flujo

La cantidad de DNA presente en las células se determina usando citometría de flujo de acuerdo al método descrito por Vindelov et al, 1985. Las células se siembran en una concentración de 18000 células x cm^2 y son tratadas con y sin DHEA en cultivos asincrónicos o sincrónicos, de tal manera que se pueda apreciar y comparar el patrón de distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular. Brevemente la técnica consiste en desprender las células con tripsina. Enseguida se centrifugan a 1000-1500 rpm durante 3 minutos y se desecha el sobrenadante. El botón se lava con 1 ml de PBS y se centrifuga nuevamente. Se desecha el sobrenadante y se añade 1 ml de paraformaldeído al 1.1% en PBS por 20 minutos. Se centrifugan nuevamente a la misma velocidad y se desecha el sobrenadante. Se lavan con PBS y se centrifuga nuevamente para después desechar el sobrenadante. El botón celular se resuspende en 1ml de RNAsa en PBS y se deja por 30 minutos a 37°C. Nuevamente se centrifuga y se desecha el sobrenadante para finalmente añadir 500 μ l de yoduro de propidio de una solución stock (200 mg/lit) durante 2 minutos a temperatura ambiente. El exceso de yoduro es retirado por centrifugación con un par de lavados con PBS, dejando el botón celular resuspendido en 1 ml de PBS. Finalmente se realiza la evaluación en el citómetro FACS (Coulter, USA).

Ensayo de Proliferación con Incorporación de Timidina Tritiada

Esta evaluación consiste en la asimilación del nucleótido timidina (un análogo de la timina) marcada con tritio al ADN de las células en cultivo, cuando las células se encuentran en fase de síntesis del ciclo celular (Conn & Stumpf, 1984; Bulbulian, 1987; Karp, 1996).

La población celular se pone con 1 μ Ci de [^3H]dTTP/mL (Amersham, actividad específica de 125 Bq/mmol). Al tiempo indicado para la condición planeada, las células se lavan con PBS (X3) y se fijan con metanol al 95% (v/v) en PBS durante 20 min. Nuevamente las células se lavan

con PBS (X3) y posteriormente se añaden 100 μ L/pozo de NaOH 200mM (en el caso para una placa de 96 pozos) con el propósito de lisar las células y liberar el ADN marcado. A las 6-24 h éste lisado se deposita en viales con 2 mL de líquido de centelleo (Beckman, E.U.) Los destellos producto de la radiación, se amplifica con el líquido de centelleo y la reacción se evalúa en un contador de centelleo programado para registrar emisiones β (Beckman E.U., modelo LS-6500). Las lecturas cpm (cuentas por minuto) se convierten a porcentaje de proliferación; los cultivos sin tratamiento (basal) representaron el 100%.

Efecto de la DHEA en la proliferación de linfocitos

Se cultivan 4×10^4 linfocitos/pozo-100 μ L de RPMI-1640 suplementado con 20 % (v/v) de SFB y adicionado con 15 μ g/mL de Concanavalina A (ConA, un activador policlonal) en una placa de 96 pozos de fondo cónico. Los linfocitos se tratan agregando diferentes concentraciones de DHEA (especificaciones) solubilizada en etanol absoluto (SIGMA). Los controles utilizados fueron cultivos que no se estimularon con DHEA y a los que se les agregó etanol (como un vehículo). Las células fueron incubadas durante 48 horas y posteriormente se evaluó la proliferación por los métodos que se describen a continuación. A las 48 h de cultivo, los linfocitos se marcan con 1 μ g/mL [T^{H3}]dTTP y a las 16 h adicionales de cultivo, se cosechan las células para evaluar su proliferación con la técnica de timidina tritiada.

Ensayo para la localización específica de caspasa 3 en cultivos de linfoma EuHe

Cultivar células en cajas de plástico con cubreobjetos. Con una densidad celular de 500 000 células por caja y se estimulan al terminar el ensayo se, fijar con paraformaldehído al 2% en PBS (Preparar al momento) de 15 a 30 min. a temperatura ambiente. Lavar 3 veces con PBS, por 5 min. cada lavado. Permeabilizar con Tritón X-100 0.5% en PBS, durante 5 min. a 4 °C. posteriormente lavar 3 veces con PBS, 10 min. cada lavado. Incubar con el anticuerpo primario 2 ½ horas, (anti-caspasa 3 CPP32 Ab4, Rabbit polyclonal antibody Lab Vision 1:100 en PBS) a temperatura ambiente o 12 horas a 4 °C en una cámara húmeda, lavar 3 veces con PBS, por 5 min cada lavado. Incubar con el anticuerpo secundario con fluorocromo en oscuridad durante 1 ½ horas (gota anti-rabbit con FITC 1:200 en PBS) en cámara húmeda a temperatura ambiente, lavar 3 veces con PBS durante 5 min. Incubar con Dapi durante 30 seg. Finalmente montar en medio de montaje "antifolding", etiquetar y guardar en congelación.

Ensayo para la detección específica del extremo 3'-OH de fragmentos de cadenas de DNA (TUNEL), en cultivos celulares.

Cultivar células en cajas de plástico con cubreobjetos. con una densidad celular de 500 000 células por caja y se estimulan al terminar el ensayo se, lavan 3 veces con PBS, por 3 min cada lavado. Fijar con paraformaldehído al 2% en PBS (Preparar al momento) de 15 a 20 min. a temperatura ambiente. Lavar 3 veces con PBS, por 5 min. cada lavado. Permeabilizar con Tritón X-100 0.5% en PBS, durante 5 min. a 4 °C. posteriormente lavar 3 veces con PBS, 5 min. cada lavado. Se añade inmediatamente buffer de equilibrio (20-30 μ l en cámara húmeda durante 15 min. a temperatura ambiente. Se escurren las preparaciones en un papel absorbente sin dejar secar inmediatamente incubar 1 h con enzima Tdt (33 μ l de enzima + 77 μ l de buffer de reacción), en cámara húmeda. Detener la reacción con buffer de paro (1ml de buffer de paro en 34 ml de agua Milli Q). 10 min en agitación suave, en cámara húmeda lavar 3 veces con PBS, por 1 min cada lavado. Incubar con anti-dig-FITC, 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. (68 μ l de solución de bloqueo mas 62 μ l de anti-dig). Lavar 3 veces con PBS en cámara húmeda, 2 min. cada lavado. E incubar con Dapi 30 segundos. (Añadir rápidamente) Lavar 3 veces con PBS en cámara húmeda, 1 min. cada lavado. Finalmente montar en medio de montaje "antifolding", etiquetar y guardar en congelación.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados fueron sometidos a análisis estadístico de prueba t de student suponiendo varianzas iguales o a análisis de varianza de un solo factor, utilizando los paquetes estadísticos del programa Excel. Se aplicó la prueba de Tukey para determinar entre que pares de medias existía diferencia, en el caso que se compararon las medias, el análisis se realizó mediante la prueba de "t" de Studen. En todos los casos sólo se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue igual o menor al 0.05.

RESULTADOS

Es conocido que la hormona dehidroepiandrosterona (DHEA) presenta una actividad antitumoral en diferentes tipos de tumores sólidos, sin embargo, su papel en leucemias y específicamente en linfomas es desconocido. Para determinar si la DHEA afecta de manera negativa el potencial proliferativo de células de linfoma, cultivos de células de linfoma EuHe (linfoma Hodchking) fueron inducidos con diferentes concentraciones de DHEA. Y el número celular fue determinado por la técnica de tinción con cristal violeta, y la viabilidad fue evaluada por exclusión molecular del compuesto azul tripano (Fig. 7).

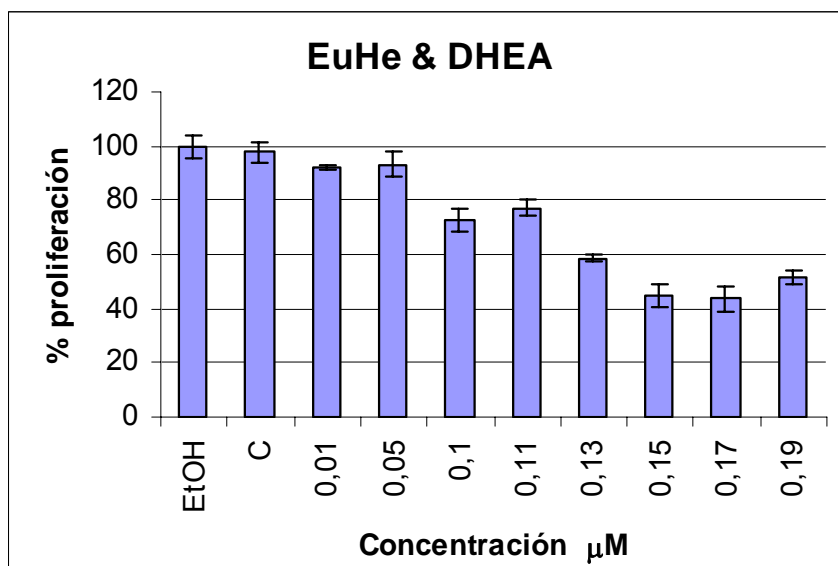
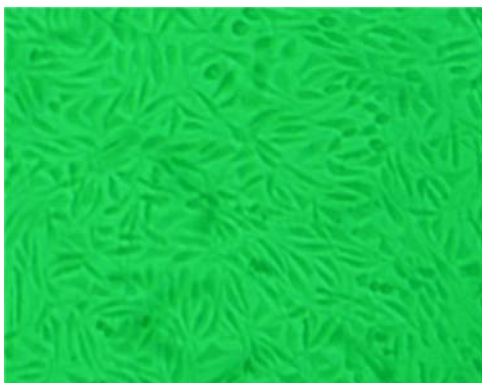


Fig. 7. Efecto de la hormona DHEA sobre el potencial proliferativo de células de linfoma EuHe. 5000 células por pozo fueron cultivadas en un volumen total de 100 μl en placas de cultivo de 96 pozos, mantenidas a 37°C y 5% de CO₂, durante 24 hrs. Posteriormente fueron inducidas con la hormona DHEA a diferentes concentraciones, mantenidas en las condiciones antes mencionadas por 48 hrs. mas y al término del tiempo de inducción, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1% y teñidas con cristal violeta para determinar el número celular. La gráfica representa un experimento de cuatro, con cinco repeticiones por condición. Las barras representa el promedio con su desviación estándar. Se compararon las medias de todas las concentraciones con ETOH desde la concentración de 0.1 μM hasta 0.19 μM tienen una diferencia significativa

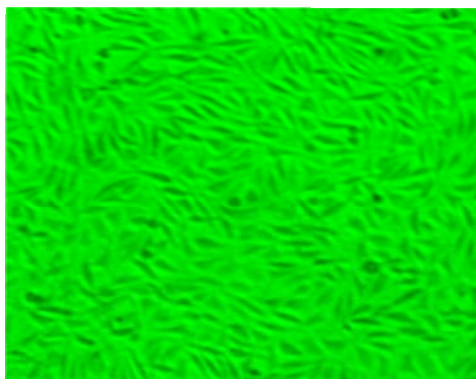
Como se observa en la figura 7, la DHEA induce un decremento en el número celular en cultivos de células del linfoma EuHe, disminuyendo en un 50% la densidad celular con una concentración de 0.15 μM (Ver material y métodos). Pese al decremento observado en el número celular, la viabilidad se mantuvo arriba del 90 %, indicando que el decremento en el número celular no es debido a un efecto citotóxico de la DEHA. Los cultivos fueron observados en un microscopio invertido y fotografiados con una cámara digital (OLYMPUS), con el propósito de observar cambios

morfológicos (Fig. 8). Al respecto se encontró que las células tratadas con DHEA presentan una menor densidad celular, donde la mayoría conservan una morfología similar de las células no tratadas, aunque también se puede observar algunas células circulares que indican una posible inducción a desadherirse de la caja de cultivo (Fig. 8C).

(A) EuHe CONTROL



(B) EuHe CON ETANOL



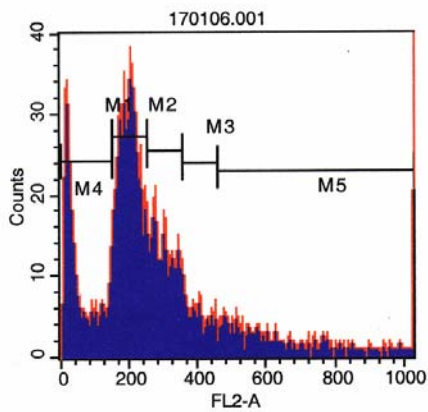
(C) EuHe CON DHEA



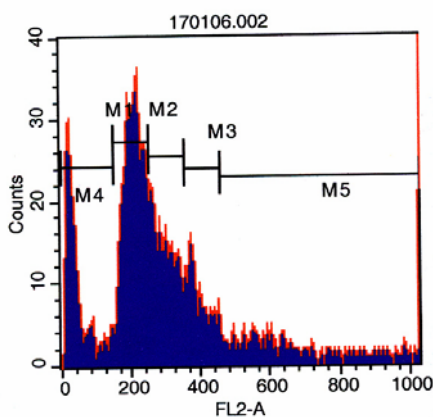
Fig. 8. Fotografías de cultivos de células EuHe. 500 000 células fueron sembradas en cajas petri de 2.5 mL. mantenidas a 37°C y 5% de CO₂, durante 24 hrs. Posteriormente fueron inducidas con la hormona DHEA a diferentes concentraciones, mantenidas en las condiciones antes mencionadas por 48 hrs A) en este ensayo solo se encuentran las células con RPMI al 5% de SFB. B) este ensayo se estimulo con el vehículo (3.5mL de OH). C) en este ensayo se estimularon a las células con DHEA (0.15 μ M)

El hecho de observar un decremento en el número celular inducido por la DHEA en los cultivos de células EuHe, genera la pregunta de sí este decremento es debido a una inhibición de la proliferación celular, provocando un paro en alguna fase del ciclo celular o a una inducción de muerte por apoptosis. Para dar respuesta al primer punto, cultivos de células EuHe fueron tratadas

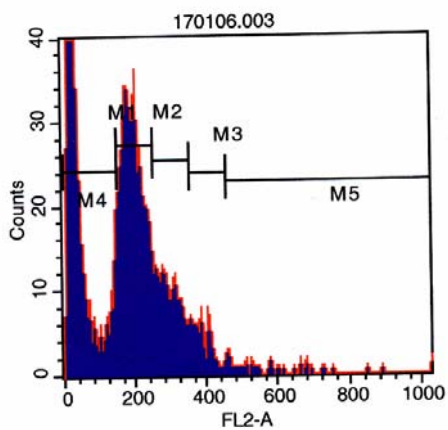
con DHEA y la distribución del ADN fue analizada por citometría de flujo, con la intención de observar el efecto de la DHEA sobre las fases del ciclo celular de las células EuHe (Fig. 9)



EUHE-CONTROL	
EVENTOS	%
TOTALES	5000=100%
M1	40.94
M2	20.52
M3	6.94
M4	21.34
M5	11.08



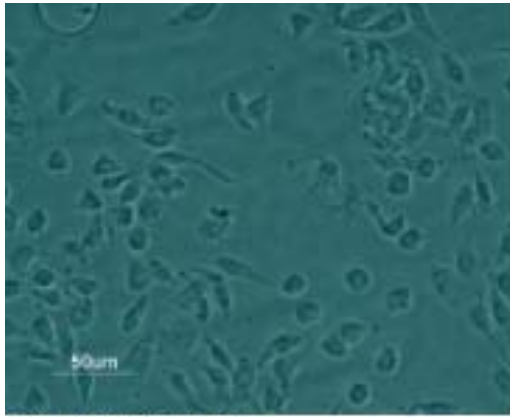
EUHE-ETANOL	
EVENTOS	%
TOTALES	5000=100%
M1	39.08
M2	24.10
M3	10.00
M4	16.92
M5	10.48



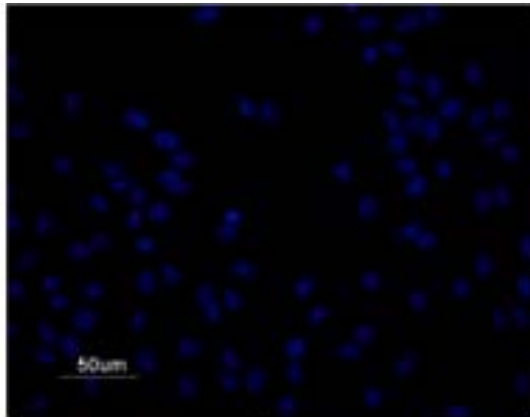
EUHE-DHEA	
EVENTOS	%
TOTALES	5000=100%
M1	40.68
M2	13.82
M3	3.70
M4	41.16
M5	1.18

Fig. 9. y tabla 1. Efecto de la DHEA en la distribución del ADN de la línea de linfoma humano EuHe en las diferentes fases del ciclo celular, determinada por citometría de flujo.

Como se aprecia en la figura.9, la distribución del ADN esta dividida en cinco regiones: la región M1 o Fase G1 del ciclo celular, que representa a las células que tienen una carga genética de $2n$, característica de células que no se encuentran en división; la región M2 o Fase S del ciclo celular, representa a las células que contienen una carga genética que esta entre $2n$ y $4n$ y corresponden a células que se encuentran replicando su ADN ; la región M3 o Fase G2/M del ciclo celular, que comprenden a las células que presentan una carga genética de $4n$ y que es característico de células que están a punto de formar dos células hijas; la región M4, representa a las células cuya carga genética es menor de $2n$ y en ella se registran los fragmentos de núcleos, razón por la cual se le interpreta como un indicio de una posible muerte apoptótica. O necrótica y la región M5, que se caracteriza por presentar una carga genética mayor a $4n$ y representa a células que están agregadas, o polinucleadas. En base a lo anterior, la DHEA aparentemente induce a la apoptosis a las células EuHe que están ciclando, ya que la viabilidad evaluada por la exclusión del azul tripano revela que las células mantienen su membrana íntegra, descartando una muerte por necrosis. Para esclarecer este punto, cultivos de células EuHe fueron tratadas con la hormona y al cabo de 48 hrs se les determinó la presencia de fragmentos de ADN por la técnica de TUNEL como un indicador de muerte por apoptosis. (Figura 10)



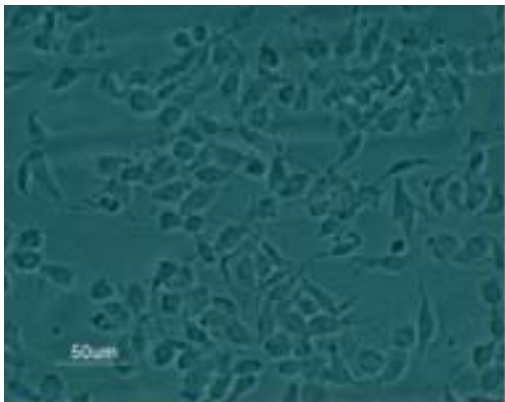
CONTROL-CONTRASTE
DE FASES



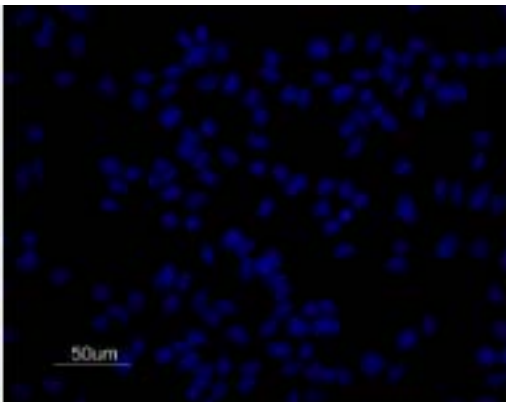
CONTROL-DAPI



CONTROL-TUNEL



ETANOL-CONTRASTE
DE FASES



ETANOL-DAPI



ETANOL-TUNEL

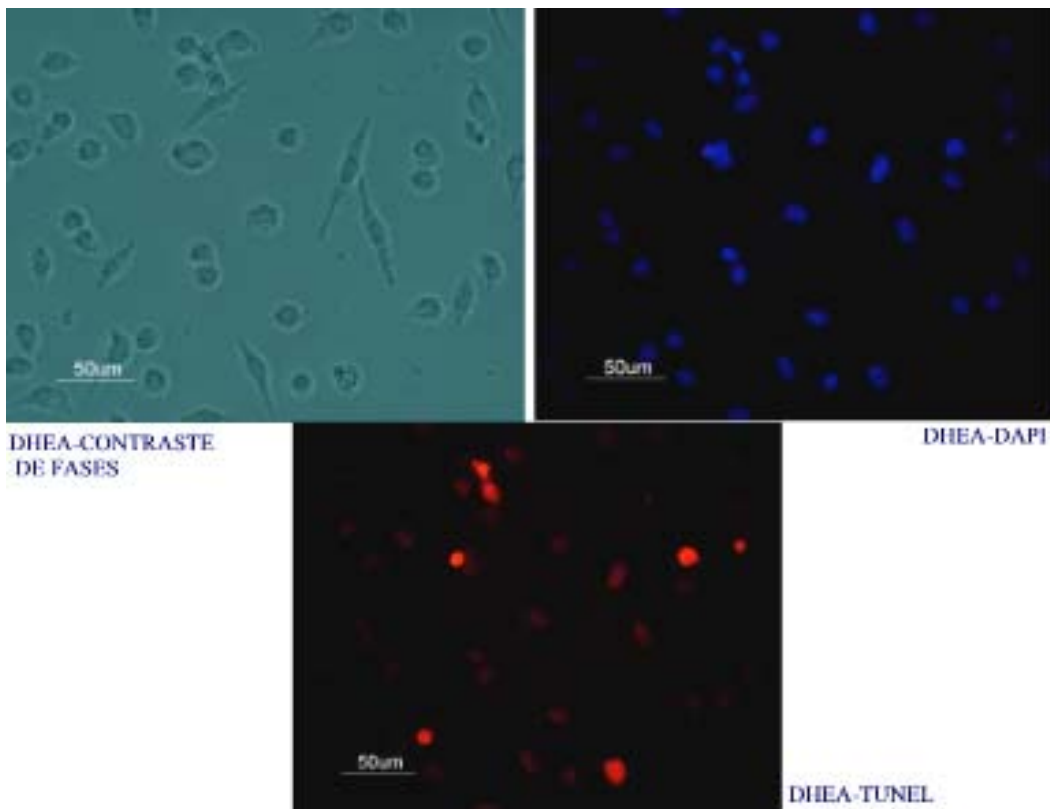


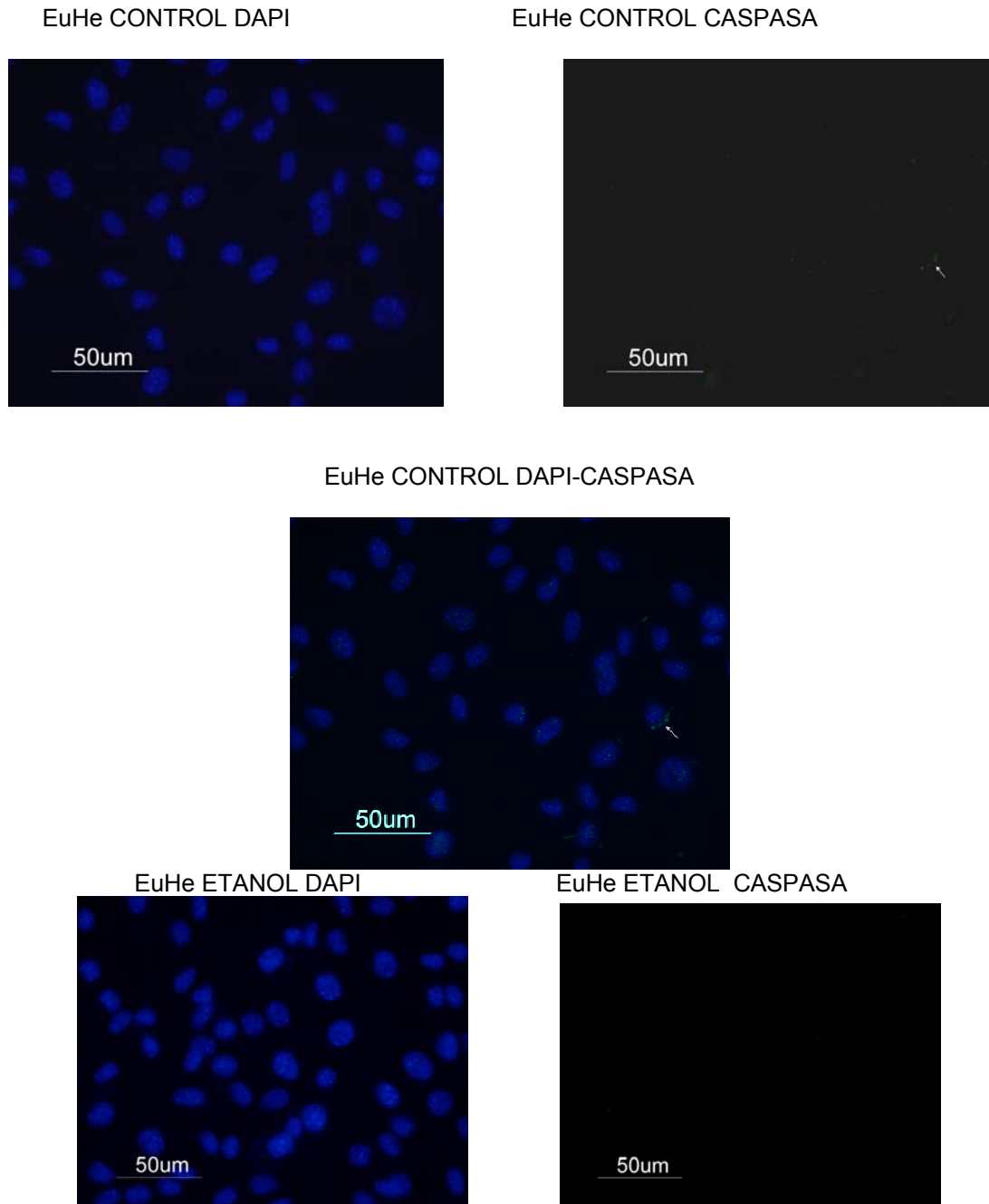
Figura 10. Inducción de apoptosis por DHEA. 500 000 células de EuHe fueron sembradas en cajas de cultivo de 2.5 cm. de diámetro, conteniendo un cristal de 1.5 cm² donde las células se adhirieron y crecieron. Las células que crecieron en los cristales de cada condición de cultivo fueron analizadas a través de la técnica de TUNEL, con el propósito de evaluar la fragmentación del ADN.

Como se muestra en la figura 10, tanto las células control, así como las tratadas con etanol, presentaron muy poca positividad a la rodamina, que genera un color rojo en el núcleo de las células que presentan el DNA fragmentado, como un indicador de apoptosis. Sin embargo, las células tratadas con la DHEA, mostraron una mayor positividad a la rodamina, indicando que hay una fuerte inducción de fragmentación del ADN en las células EuHe, confirmando la inducción de apoptosis causada por la DHEA en estas células.

Dado que dependiendo del tipo celular o de las circunstancias metabólicas los diferentes eventos apoptóticos pueden expresarse parcial o totalmente, se requieren de más de un parámetro para concluir que en efecto hay una inducción apoptótica, por lo que es necesario determinar la actividad de la caspasa 3. Las caspasas son una familia de proteasas de cysteina, que juegan un papel clave en la apoptosis (Thornberry 1998). Las caspasas son sintetizadas en una pro-forma inactiva y que requieren de ser cortadas de manera específica para activar su actividad proteolítica. Las caspasas son clasificadas como Iniciadoras de y como Efectoras de la apoptosis. Las

caspasas iniciadoras comunes son las caspasas 8 y 9, las cuales sirven para activar a las principales caspasas efectoras, tales como la caspasa 3, seguido por un rompimiento del DNA, generando fragmentos internucleosomales y ruptura de la poli (ADP-ribosa) polimerasa.

Para confirmar que las células EuHe son inducidas a morir por apoptosis cuando son tratadas con la DHEA, cultivos de células EuHe fueron tratadas con la DHEA y la determinación de caspasa 3 fue detectada por inmunocitoquímica (Fig. 11).



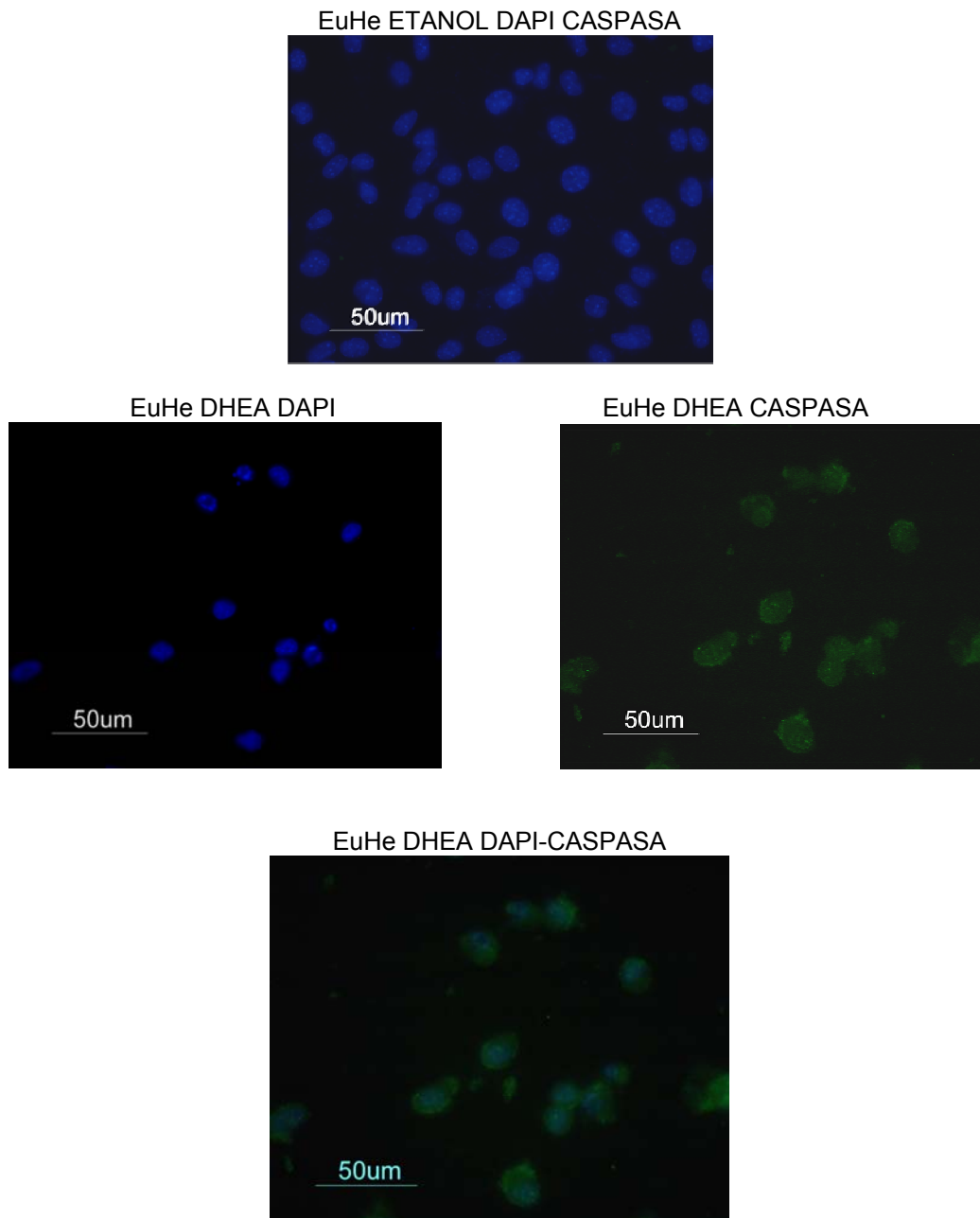


Figura 11. Detección de caspasa 3 en cultivos de células EuHe tratadas con DHEA. 500 000 células de EuHe fueron cultivadas en cajas de cultivo de 2.5 cm de diámetro, conteniendo un cristal de 1.5 cm² donde las células se adhirieron y crecieron. Las células que crecieron en los cristales de cada condición de cultivo, fueron tratados para detección de Caspasa-3 por inmunocitoquímica.

Los resultados de la figura 11, muestran una clara actividad de la caspasa 3 en los cultivos tratados con DHEA, confirmando que la DHEA induce a las células de linfoma EuHe a fragmentar su ADN, formando cuerpos apoptóticos y activar a la caspasa 3, que de manera conjunta establecen que las células EuHe son inducidas a una muerte apoptótica cuando son tratadas con DHEA a una concentración de 0.15 µM.

Los resultados anteriores no dejan duda del efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis que la DHEA ejerce sobre las células EuHe, sin embargo, la gran pregunta es que efecto ejerce la DHEA en células normales, que en este caso es en células linfocíticas. Con el propósito de aclarar este punto, linfocitos de sangre periférica humana fueron aislados y cultivados, para determinar el efecto de la DHEA en su potencial proliferativo (Figura 12).

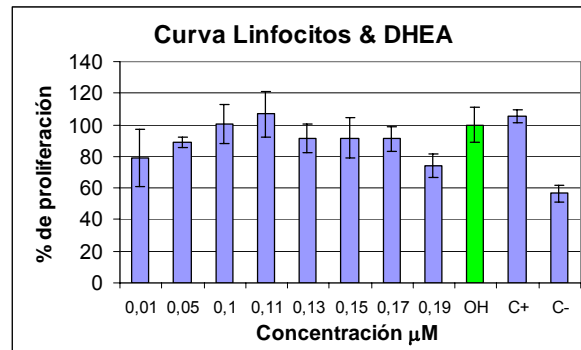
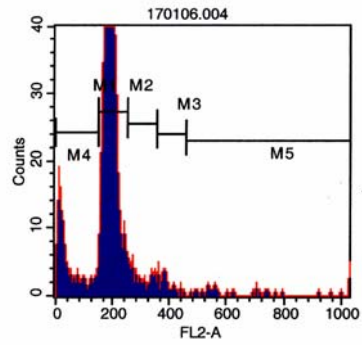


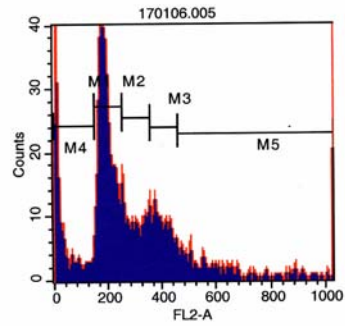
Figura 12. Efecto de la hormona DHEA sobre el potencial proliferativo de células de linfocíticas. 5000 células por pozo fueron cultivadas en un volumen total de 100 μl en placas de cultivo de 96 pozos, mantenidas a 37°C y 5% de CO₂, durante 24 hrs. Posteriormente fueron inducidas con la hormona DHEA a diferentes concentraciones, mantenidas en las condiciones antes mencionadas por 48 hrs. mas y al término del tiempo de inducción, fueron contadas con la ayuda de un hemocitómetro. La gráfica representa un experimento de cuatro, con cinco repeticiones por condición. Las barras representa el promedio con su desviación estándar. En todas las concentraciones el estudio estadístico que se hizo las medias no tienen una diferencia significativa con el control (OH) con excepción de la concentración de 0.19 μM .

Los resultados de la figura 12 establecen que la DHEA no altera el potencial proliferativo de las células linfocíticas en el rango de concentración de 0.01 a 0.17 μM , rango en el cual la concentración de 0.15 μM ejerce una acción antiproliferativa e inductora de apoptosis en las células de linfoma EuHe, como se demostró anteriormente. Para confirmar que la DHEA no afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas, se analizó el efecto de la DHEA en el ciclo celular de estas células a través de la distribución del DNA en las diferentes fases del ciclo celular por citometría de flujo de diferentes donadores sanos (Fig. 13 Tabla 2).

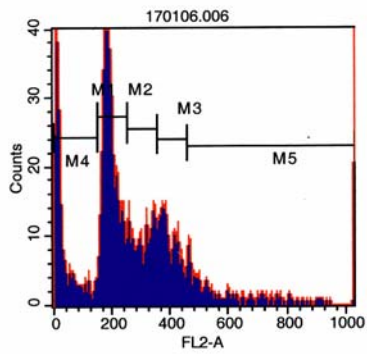
IA



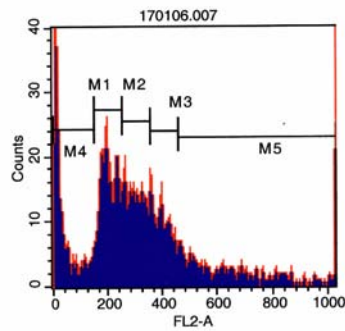
IB



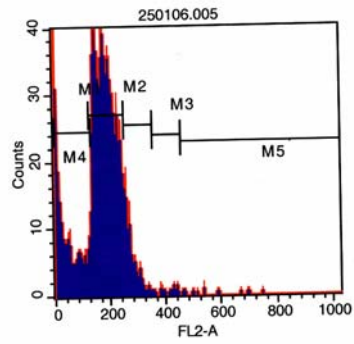
IC



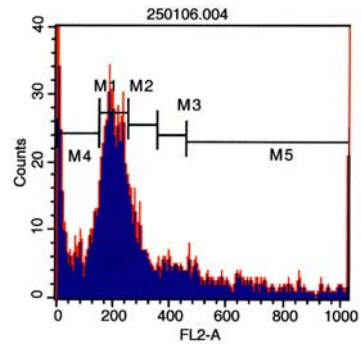
ID



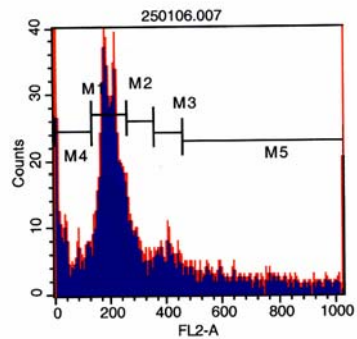
IIA



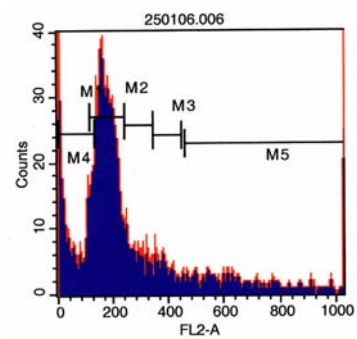
IIB



IIC



IID



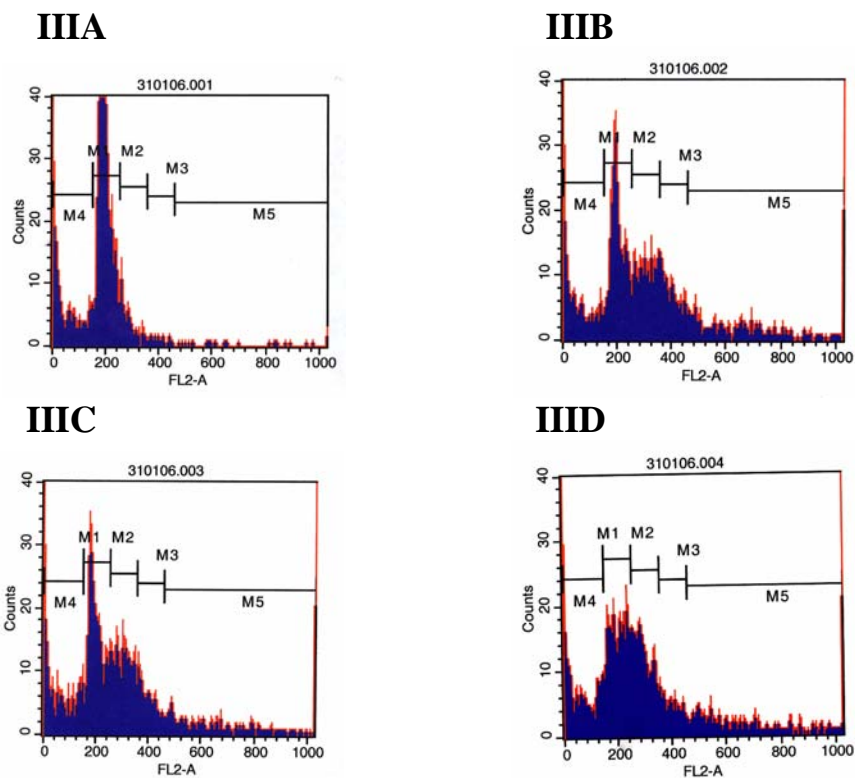


Figura 13. Efecto de la DHEA, en el ciclo celular de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana de tres individuos sanos. IA, IIA y IIIA cultivos de linfocitos sin Fitohemaglutinina; IB, IIB y IIIB cultivos de linfocitos con Fitohemaglutinina; IC, IIC y IIIC cultivos de linfocitos con Fitohemaglutinina y etanol; ID, IID, y IIID cultivos de linfocitos con Fitohemaglutinina, etanol y DHEA;

FASE / INDIVIDUO 1	Sin Fito	Con Fito	Fito/etanol	Fito/etanol/DHEA
M1-G1	86.56	39.50	39.78	24.36
M2-S	3.38	14.60	14.82	22.18
M3-G2/M	1.56	12.70	13.0	14.18
M4-APOPTOSIS	7.72	22.04	25.10	28.0
M5-AGREGADOS	0.98	11.66	7.74	11.82

FASE / INDIVIDUO 2	Sin Fito	Con Fito	Fito/etanol	Fito/etanol/DHEA
M1-G1	65.48	36.94	51.46	44.52
M2-S	6.94	12.18	8.92	9.38
M3-G2/M	0.56	6.14	5.42	6.76
M4-APOPTOSIS	28.5	29.68	26.60	19.04
M5-AGREGADOS	0.026	15.72	12.96	20.12

FASE / INDIVIDUO 3	Sin Fito	Con Fito	Fito/etanol	Fito/etanol/DHEA
M1-G1	56.08	23.86	26.02	24.54
M2-S	4.28	17.72	18.44	19.58
M3-G2/M	0.98	10.20	8.10	6.14
M4-APOPTOSIS	38.18	40.96	38.88	38.36
M5-AGREGADOS	0.62	7.78	8.94	11.74

Tabla 2. Efecto de la DHEA en la distribución del DNA en las diferentes fases del ciclo celular de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana, de tres individuos sanos.

Los resultados de la distribución del ADN en las diferentes fases del ciclo celular obtenidos por citometría de flujo en células linfocíticas estimuladas con 0.15 μM de DHEA revela que la respuesta de las células es de sacar a las células de la fase G1 para meterlas a la fase S o no afectar las fases del ciclo celular, resultados que contrastan con los obtenidos en las células EuHe, donde la DHEA las induce claramente a entrar en apoptosis, confirmando que la DHEA no afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas en estas condiciones.

Los resultados obtenidos hasta el momento, permiten establecer que las células del linfoma EuHe son sensibles a la DHEA, causándoles un decremento en su potencial proliferativo e induciéndolas a entrar en apoptosis. El hecho de encontrar que las células linfocíticas humanas no son sensibles a la DHEA a la concentración de 0.15 μM , ya que no afecta su potencial proliferativo ni afecta el ciclo celular de estas células, hace de esta hormona un agente con fuerte potencial para ser evaluado con fines terapéuticos.

DISCUSIÓN

La hormona dehidroepiandrosterona (DHEA) es un esteroide adrenocortical abundante, cuyo rango de funciones fisiológicas es muy ambiguo. Por muchos años el papel de la DHEA y su forma sulfatada DHEAS, fueron enfocadas como intermediarios en la biosíntesis de hormonas sexuales esteroideas. Éstas fueron implicadas como precursores para otras hormonas esteroideas que se les ha atribuido un papel en la carcinogénesis (Feo y Paslale, 1990, Scchwartz, 1990), diabetogénesis (Coleman, 1990) y arteroesclerosis e hipertensión (Nestler, 1990). También se le ha adjudicado una acción en la respuesta inmune que logra hacer que infecciones virales o bacterianas sean controladas por el huésped de manera más eficiente (Dulos 2001, Shames 2002). En relación al sistema inmune, existen trabajos que indican que la DHEA inhibe la limfopoyesis murina pero no la mielopoyesis, así como su capacidad para inhibir la diferenciación de células asesinas naturales murinas (Risdon et al, 1991).| De igual manera se ha reportado que los linfocitos inducen la secreción de DHEA a través de un contacto celular directo con células de la zona Reticular Adrenal (Gernot et al, 2006). Recientemente, mucho interés se ha centrado alrededor de la DHEA y de su capacidad para mejorar la habilidad del hospedero para combatir infecciones, a través de su actividad inmunomoduladora y anti-inflamatoria. Sin embargo, el efecto de la DHEA en linfomas humanos o en linfocitos normales es poco claro, por lo que es necesario generar información que nos permita entender de mejor manera el efecto de la DHEA sobre los linfocitos humanos. Al respecto nuestro trabajo revela que la DHEA decrece en un 50 % el potencial proliferativo de las células del linfoma EuHe en 72 hrs. de cultivo in Vitro, con una viabilidad arriba del 90 %, a una concentración de 0.15 μM indicando que no se trata de un efecto citotóxico, sino que el efecto está dado a través de inducir a las células que están en la fase S y G2M a una muerte por apoptosis, como se observa en las células tratadas con DHEA, que presentan un incremento en la expresión de la caspasa 3 y la fragmentación del ADN, que como se sabe son dos eventos importantes del proceso apoptótico. Sin embargo, la concentración de 0.15 μM de DHEA no afectó el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana y el efecto observado en el ciclo celular de estas células fue el de inducir a las células a entrar a la fase S, ó, de no afectar significativamente ninguna de las fases del ciclo celular, sugiriendo por un lado que los linfocitos de sangre periférica humana son menos sensibles a la DHEA en esas condiciones que las células EuHe y por el otro, que la diferencia en la sensibilidad a la DHEA hace que la DHEA sea considerada como un compuesto con potencial terapéutico. No obstante los resultados obtenidos, es necesario evaluar el efecto de la DHEA en otras líneas celulares provenientes de linfomas humanos y en particular en linfomas de Hodking, donde las terapias existentes para estas patologías solo son la quimio y radioterapia. El hecho de que la línea EUHE sea un linfoma de Hodking abre la expectativa de que la DHEA pueda ser utilizada como un agente terapéutico en esta enfermedad, además de probar su efecto sobre otro tipo de células leucémicas.

No obstante nuestros resultados, sería conveniente a futuro, determinar si el efecto inhibidor de la proliferación celular, así como el efecto apoptótico ejercido por la DHEA es realizado de manera directa o es llevado a cabo a través de la participación de otras hormonas precursoras. También sería deseable, determinar el mecanismo de acción tanto del efecto antiproliferativo como el efecto apoptótico, comparando la expresión de genes que regulan ambos eventos tanto en los estados patológicos, así como en células normales, con el propósito de generar un modelo que explique la o las rutas que siguen estas hormonas para regular la proliferación, no sólo de células de linfoma, sino de células hematopoyéticas en general, con el objeto de crear un modelo que permita ver con claridad el papel de las hormonas en la hematopoyesis así como en la respuesta inmune.

CONCLUSIONES

1. La DHEA induce un decremento del 50% en la densidad celular de cultivos de células EuHe a una concentración de 0.15 μM .
2. La DHEA induce un decremento en la fase S del ciclo celular.
3. La marca positiva a la procaspasa-3 y la fragmentación del ADN confirman que la DHEA induce a las células EuHe a una muerte por apoptosis.
4. La DHEA a la concentración de 0.15 μM no afecta el potencial proliferativo de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana.
5. La DHEA a la concentración de 0.15 μM no afecta la distribución del DNA en las diferentes fases del ciclo células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana.

Estos resultados indican que la diferencia de efecto de la DHEA en células EUHE en comparación con los linfocitos de sangre periférica hacen de la DHEA un fuerte candidato para ser evaluado como una agente con un fuerte potencial antileucémico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Robertes K Watson JD. 1996. Molecular Biology of the Cell. Fourth Edition. Garland Publishing; Inc. New York & London.
2. Aoki, K; Nakajima, A; Mukasa, K; Osawa, E; Mori, Y; Sekihara, H. 2003. Prevention of diabetes, hepatic injury and colon cancer with dehydroepiandrosterone. J Steroid Biochem. Mol. Biol. 85(2-5): 469-72
3. Avilés A. De la Torre A, Díaz-Maqueo J. C. *et al.* 1992. Is surgery necessary in the treatment of primary gastric non-Hodgkin's lymphoma? Leuk Lymph 7: 151-158.
4. Barret-Connor E, Khaw KT. 1987. Absence of an inverse relation of dehydroepiandrosterone sulfate with cardiovascular mortality on postmenopausal women. N Engl J Med 317:711.
5. Barret-Connor E, Khaw K-T, Yen SSC. 1986 A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate, mortality and cardiovascular disease. N Engl J Med.315:1519-24.
6. Baulieu EE and Robel P. 1990. Neurosteroids: a new brain function?. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 37:305-403.
7. Beamer W G, Tenner B J, Schultz K L. 1989. Gene for ovarian granulosa cell tumor susceptibility, *Get*, in SWXJ recombinant inbred strains of mice revealed by dehydroepiandrosterone. Cancer Res. 48: 5092-5095.
8. Boone C W, Kelloff G J and Malone W C. 1991. Identification of candidate cancer preventative agents and their evaluation in animal models and human clinical trials. A Review. Cancer Res. 51:4528-4534.
9. Bulbrook RD, Hayward JL, Spicer CC, Thomas BS. 1962. Abnormal excretion of urinary steroids by women with early breast cancer. Lancet. 2:1238-1240.
10. Bulbrook RD, Hayward JL, Spicer CC 1971. Relation between urinary androgen and corticoid excretion and subsequent breast cancer. Lancet. 2:395-398.

11. Bush TL, Barrest-Connor E, Cowwan LD, Criqui MH, Wallace RB, Suchindran CM, Tyroler HA, Rifkind BM. 1987. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics program Follow-up Study. *Circulation* 75:1102-09.
12. Carlstrom K, Brody S, Lunell N-O, Langrelius A, Mollerstrom G, Pousette A, Rannevik G, Stege R, von Schoultz B. 1988. Dehydroepiandrosterone sulphate and dehydroepiandrosterone in serum: differences related to age and sex. *Maturitas*, 10:297-306.
13. Coleman, D. C. 1990. dehydroepiandrosterone and diabetic syndromes in mice. In *The Biological Role of Dehydroepiandrosterone*. M. Kalimi and W. Regelson, eds Walter de Gruyter, New York, p. 179
14. De la Torre B, Hedman M, Nilsson E, Olesen O, Thorner A. 1993 Relationship between blood and joint tissue DHEAS levels in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 11:597– 601.
15. De Peretti E and Forest M G.1978. Pattern of plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in human from birth to adulthood: evidence for testicular production. *J. Clin. Endocrinol. Metab* .47:572-577.
16. Devlin TM. 1997. Textbook of Biochemistry with clinical correlations. Fourth Edition. Wiley-Liss USA.
17. De Waard F, DeLaive JW, Baanders-Van Halewijn EA. 1960. On de bimodal age distribution of mammary carcinoma. *Br. J. Cancer*. 14:437-448.
18. D.L. Coleman, R.W. Schwizer, E.H. Leiter, Effect of genetic background on the therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetes — obesity mutants and in aged normal mice, *Diabetes* 33 (1) (1984) 26–32.
19. Doll R, Peto R. 1987. Epidemiology of cancer. In *Oxford Textbook of Medicine* (DJ Weatherall, JGG Ledingham, DA Warell, eds.) 2nd. Oxford University Press.
20. Dulos G. J., Bagchus W. M. 2001, Androgenus indirectly acelérate thymocyte apoptosis. *Int Immunopharmacol* 1:322-328.

21. Druker WD, Blumberg JM, Gandy HM, David RR, Verde AL. 1972. Biologic activity of dehydroepiandrosterone sulphate in man. *Clin. Endocrinol. Metab.* 35: 48-54.
22. Escandón RC, Benítez MM, Espinoza NJ, Vázquez MJ. 1993. Epidemiología del cáncer Cervicouterino en el IMSS. 34(6): 607-614.
23. Farewell VT, Bulbrook RD, Hayward JL. 1978. Risk factors in breast cancer: a prospective study on the island of Guernsey. In E. P. Grundmann and L. Beck (eds), *Cancer Campaign. Early Diagnosis of Breast Cancer. Methods and Results*, Vol. 1, pp 43-51. Stuttgart, Germany: Gustaf Fischer Verlag.
24. Feo. F., and R. Paslale. 1990. glucose-6-phosphate dehydrogenase and the relation of dehydroepiandrosterone to carcinogenesis. In *The Biological Role of Dehydroepiandrosterone*. M. Kalimi and W. Regelson, eds Walter de Gruyter, New York, p. 331.
25. Garcea R, Diano L, Pascale R, Frassetto S, Cozolino P, Ruggiu, ME, Feo F. 1987. Inhibition by dehydroepiandrosterone of liver putative preneoplastic foci formation in rats subjected to the initiation-selection process of experimental carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.*, 15: 164-169.
26. Garcea R, Diano L, Frassetto S, Cozolino P, Ruggiu, ME, Vannini MG, Pascale R, Lenzerini L, Simile MM, Puddu M. 1988. Reversal by ribo- and deoxyribonucleosides of dehydroepiandrosterone-induced inhibition of enzyme altered foci in the liver of rats subjected to the initiation-selection process of experimental carcinogenesis. *Carcinogenesis (Lond)*. 9:931-938.
27. García CA, Gariglio PV. 1993. Molecular Aspect of Human Papillomaviruses and their Relation to Uterine Cervix Cancer. *Rev. Invest. Clin.* 450: 85-92.
28. Geneser F. 2000. *Histología*. 3ª. Medica Panamericana S. A. Madrid, España.
29. Gutiérrez RM, López ME, Martínez TA, Montesinos MJ, Pérez P, García-Carrancá A, Zentella DA, Miranda PE. 2001. Caracterización de la línea celular EuHe en enfermedad de hodgkin. Posibilidades de terapia génica. XLII Congreso Anual de la Agrupación Mexicana de la Hematología, A.C. V Congreso Iberoamericano de Medicina Transfusional. Reunión

del Grupo Colaborativo Ibero Americano de Medicina Transfusional. 11-15 de Mayo de, Mérida, Yucatán, México.

30. Gernot W. W., Tobias L. 2006 Lymphocytes Stimulate Dehydroepiandrosterone Production through Direct Cellular Contact with Adrenal Zona Reticularis Cells: A Novel Mechanism of Immune-Endocrine Interaction. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Vol. 84, No. 11 pp. 4220- 4227.
31. Green Lora M, Reade LJ, Ware FC. 1984. Rapid Colorimetric Assay for Cell Viability: Application to the Quantitation of Cytotoxic and Growth Inhibitory Lymphokines.
32. Gordon GB, Shantz LM, Talaly P. 1987. Modulation of growth, differentiation and carcinogenesis by dehydroepiandrosterone. *Adv. Enzyme Regul.* 26: 355-382.
33. Hastings L A, Pashko L L, Lewbart M L and Schwartz A G. 1988. Dehydroepiandrosterone and two structural analogs inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate stimulation of prostaglandin G2 content in mouse skin. *Carcinogenesis*. 9: 1099-1102.
34. Hughes-Jones NC. And Wickramasinghe E. 1991. Lecture notes on haematology. Blackwell Scientific Publications, London. 225pp
35. Kraus-Weisman A, Ruiz-Argüelles G. J. De-León-Vega O. Pérez-Tamayo R. 1980. Estudio sobre linfomas. I. Frecuencia relativa de los linfomas en México. *Rev Invest Clin (Méx)*; 32: 179.
36. Kueng W, Silber E, Eppenberg V . Quantification of Cell Cultured on 96-well Plates. *Anal . Biochem*. 186:16-19.
37. Landis S, Murria T, Bolden S, Wingo PA. 1999. Cancer Statics. *CA Cancer J Clin*. 49:8-31.
38. Lazcano PE, Rojas MR, López AM, López CL, Hernandez AM. 1993. Instituto Nacional de Salud Pública de México. 35:65-73.
39. Legrain, S; Girard, L. 2003 Pharmacology and therapeutic effects of dehydroepiandrosterone in older subjects. *Drugs & aging*. 20(13): 949-967.

40. Loria RM, Inge TH, Cook S, Szakal A, Regelson W. 1988. Protection against acute lethal viral infections with the native steroid dehydroepiandrosterone (DHEA). *J. Med. Virol.* 26:301-314.
41. Miller T.P. Dahlberg S. Cassady J. R. *et al.* 1998. Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate and high grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 336: 21- 26.
42. Mortola JF, Yen SS. 1990. The effects of oral dehydroepiandrosterone on endocrine-metabolic parameters in postmenopausal woman. *J Clin Endocrinol Metab* 71:696-704.
43. Morrison S. Uchida N. Weissman I. 1995. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 35.
44. Moore MA, Thamavit W, Tsuda H, Sato K, Ichihara A, Ito N. 1986. Modifying influence of dehydroepiandrosterone on the development of dihydroxy-di-n-propilnitrosamine-initiated lesions in the thyroid, lung and liver of F344 rats. *Carcinogenesis (Lond.)*. 5:57-62.
45. M.P. Cleary, The antiobesity effects of dehydroepiandrosterone in rats, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 196 (1) (1991) 8–16.
46. Munker R. Hiller E. Paquette R. 1998. Modern hematology. Biology and clinical management. Human Pressia, New Jersey. 369pp.x
47. Nestler, J. E., J. N. Clore, and S. G. Blackard 1990. Regulation of dehydroepiandrosterone metabolism by insulin and metabolic effects of dehydroepiandrosterone in man. In *The Biological Role of Dehydroepiandrosterone*. M. Kalimi and W. Regelson, eds Walter de Gruyter, New York, p. 189.
48. Nyce JW, Magee PN, Hard GC, Schwartz AG. 1984. Inhibition of 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon tumorigenesis in BALB/c mice by dehydroepiandrosterone. *Carcinogenesis (Lond.)*. 45: 164-166.
49. Ogawa M. 1993. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81: 2844
50. Ogawa M. and Matsunaga T. 1999. Humoral regulation of hematopoietic stem cells. *Annu Acad Sci* 872: 17.

51. Orlic D. and Bodine D. 1994. What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up!. *Blood* 84: 2991.
52. Osawa, E; Nakajima, A; Yoshida, S; Omura, M; Nagase, H; Ueno, N; Wada, K; Matsuhashi, N; Ochiai, M; Nakagama, H; Sekihara, H. 2002. Chemoprevention of precursors to colon cancer by dehydroepiandrosterone (DHEA). *Life sciences* 70(22):2623-30
53. Parker L N. 1989. Adrenal Androgens in Clinical Medicine. 118-134. Academic Press. San Diego.
54. Pashko LL, Rovito RJ, Williams JR, Sobel EL, Schwartz AG. 1984. *Carcinogenesis* 5:463-466.
55. Pashko LL, Hard GC, Rovito RJ, Williams JR, Sobel EL, Schwartz AG. 1985. Inhibition of 7,12 dimethylbenz(a)anthracene-induced skin papillomas and carcinomas by dehydroepiandrosterone and 3 β -methyl-androst-5-en-17-one in mice. *Cancer Res.* 45:164-166.
56. Pertti E, Veikko AK. 1994. Physiological importance of dehydroepiandrosterone. *Lancet* 343:1479-81.
57. Rangel R, Ramírez J, Rocha L, Monroy A, Martínez R y B Weiss S. 1993. Establecimiento y caracterización de la línea celular CaLo y del Clon KaLo Obtenidos a partir de un carcinoma de cérvix y efecto de IL-2, IL-3, GM-CSF, M-CSF, TNF α e IFN γ sobre su proliferación- *Rev. Ins Nal Cancerol (Mex)* 39: 1861-1866.
58. Ramírez Gaytán. 1991-1992. Boletín de Información Estadística de México. No.11. Sistema Nacional de Salud.
59. Rao M S, Subbarao V, Yeldani V and Reddy J K. 1992. Hepatocarcinogenesis of Dehydroepiandrosterone in the rat. *Cancer Res.* 48:5092-5095.
60. Ratko TA, Detrisac CJ, Mehta RG, Kelloff GJ, Moon RC. 1991. *Cancer Res.* 51:481-486.

61. Regelson W, Kalimi M and Loria R.1990. Hormonal intervention: "buffer hormones" or "state dependency". The role of dehydroepiandrosterone (DHEA), thyroid hormone,estrogen and hypophysectomy in aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 521:260-273.
62. Risdon G. Thomas A. M. 1991. inhibition of Murine Natural Killer Cell Differentiation by Dehydroepiandrosterone. *Blood*, Vol. 78, No 9: pp. 2387- 2391.
63. Robel P, Baulieu EE, Corpechot C. 1990. Neurosteroids : 3β -hydroxy- $\Delta 5$ derivates in rat and monkey brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 277:649-655.
64. Roberts E and Fitten J. 1990 Serum steroid levels in two old men Alzheimer's disease (AD) before, during and after oral administration of dehydroepiandrosterone(DHEA). In *The Biologic Role of Dehydroepiandrosterone (DHEA)*. Kalimi M and Regelson W, Eds. 43-63. Walter de Gruyter. New York.
65. Roitt M Ivan 2003 *Inmunología Fundamentos décima edición* Ed. Panamericana Buenos Aires Argentina.
66. Ruiz Argüelles G. J. 2004 *Fundamentos de Hematología* Ed. Panamericana México D. F.
67. Schwartz, A. G., K. K. Fairman, and L. L. Pashko. 1990. The biologic significance of dehydroepiandrosterone. In *The Biological Role of Dehydroepiandrosterone*. M. Kalimi and W. Regelson, eds Walter de Gruyter, New York, p. 7.
68. Schwartz AG, 1979. Inhibition of spontaneous breast cancer formation in female C3H (A^{vy}/a) mice by long- term treatment with dehydroepiandrosterone. *Cancer Res.* 39: 1129-1132.
69. Shames R. S. 2002, Gender differences in the development and function of the immune system. *J. Adolescent Health* 30s:59-70.
70. Shibata M A, Shirai T, Asakawa E. 1993.Inhibition by dehydroepiandrosterone of butylated hydroxyanisole (BHA) promotion of rat bladder carcinogenesis and enhancement of BHA induced forestomach hyperplasia. *Int. J. Cancer.* 53: 819-823.

71. Spector T D, Thompson P W, Perry A and Grunnos A C. 1991. The relationship between sex steroids and bone mineral content in women soon after menopause. *Clin. Endocrinol.* 34: 37-41.
72. Stanley M and Parkinson K. 1979. Growth Requirements of Human Cervical Epthelial Cells in Culture. 24:407-414.
73. Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL. 2003. *Bioquímica*. 5a. Editorial Reverté, S. A. Barcelona, España. Pp. 974.
74. Schwartz AG, Tannen RH. 1981. Inhibition of 7,12 dimethylbenz(a)anthracece- and urethan-induced lung tumor formation in A/J mice by long-term treatment with dehydroepiandrosterone. *Carcinogenesis (Lond.)*. 2:1335-1337.
75. Thornton M, Moore MA, Ito N. 1989. Modifying influence of dehydroepiandrosterone or butylated hydroxytoluene treatment on initiation and development stages of azarine-induced acinar pancreatic preneoplast lesions in rat. *Carcinogenesis (lond)*, 10:407-410.
76. Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. 1985. A Detergent- Trypsin Meted for the preparation of Nuclei for Flow Cytometric DNA Analysis. *Cytom.* 6:348-356.
77. W.F. Ganong, Review of medical physiology, 15th ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1991, pp. 395–396
78. Wilder RL. 1996 Adrenal and gonadal steroid hormone deficiency in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 44(Suppl):10 –12
79. Yang, S; Fu, Z; Wang, F; Cao, Y; Han, R .2002. Anti-mutagenicity activity of dehydroepiandrosterone. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]*. 24(2):137-140.
80. Yoshida S, Honda A, Matsuzaki Y, Fukushima S, Tanaka N, Takagiwa A, Fujimoto Y, Miyasaki H, Salen G. 2003. Anti-proliferative action of endogenous dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolites on human cancer cells lines. *Steroids* 68 (1): 73-83.
81. Zumorff B, Levin J, Rosenfeld R S, Markham m Strain G W, Fukushima D K. 1981. Abnormal 24-hr mean plasma concentrations of dehydroepiandrosterone and

dehydroepiandrosterone sulfate in women with primary operable breast cancer. *Cancer Res.* 41: 3360-3363.

82. Zumorff B. 1988. Hormonal abnormalities in obesity. *Acta Med Scand.* 723(suppl):153-60.