



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

**“La Dehidroepiandrosterona (DHEA) inhibe la Transición
Epitelio Mesénquima en Células de Epitelio Alveolar
Humano A549”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA:
CHRISTIAN IVÁN SEVILLA RESÉNDIZ**

**ASESOR:
DRA. CRISELDA MENDOZA MILLA**

**COASESOR:
DR. VÍCTOR MANUEL ZENDEJAS BUITRÓN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

La Dehidroepiandrosterona (DHEA) inhibe la Transición Epitelio Mesénquima en Células de Epitelio Alveolar Humano A549

Que presenta el pasante: Christian Iván Sevilla Reséndiz
Con número de cuenta: 306319774 para obtener el Título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de agosto de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
1er. SUPLENTE	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
2do. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

Al INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSIO VILLEGAS” por apoyarme en la realización de mi TESIS así como a la C.C.I.N.S.H.A.E. POR APOYARME. GRACIAS!

A la DRA. CRISELDA MENDOZA MILLA que me brindó su apoyo, confianza, respeto, etc de cosas positivas y demás que me ayudaron a crecer y creer en mí y me ha cambiado el panorama mundial. MUCHAS GRACIAS! X10^{INFINITO}.

A la madre mía IRENE RESÉNDIZ REYES que sin más que decir, es mi madre y te escogería de nuevo GRACIAS!!!

A mis chulos y hermosísimos hermanos que sin su apoyo no hubiera logrado lo que tengo hasta ahora Ma. De Lourdes Sevilla Reséndiz, Marco Antonio Sevilla Reséndiz y Sergio Alejandro Sevilla Reséndiz (XOXO es nuestra primera TESIS va por todos). También a ti abue desde donde me miras Margarita Reséndiz Reyes†.

A Luis Molina Ávila que me acompañó en este camino tan canijo GRACIAS!!!

A los siguientes: Noemi Escalona Rodríguez, Arly Reynaud, Nestor Ortega Miron, Victor Hugo Sanchez Ruiz, Ana Mayela Valero, Alf jejeje, Elena Serrano Zaragoza.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN.....	7
Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI).....	7
Transición Epitelio Mesénquima (TEM)	9
Dehidroepiandrosterona (DHEA).....	11
Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β).....	13
Fibrosis Pulmonar Idiopática y DHEA.....	15
MARCO TEÓRICO.....	16
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVOS.....	17
METODOLOGÍA	18
Cultivo Celular.....	18
Ensayo de Viabilidad celular con WST-1	19
Proliferación celular por incorporación de Bromodesoxiuridina (BrdU).....	20
Detección de apoptosis por citometría de flujo (Anexina V e IP).....	22
Análisis de Western Blot (WB) para α -SMA y E-Caderina	24
PCR en Tiempo Real (RT-Q-PCR)	25
Inmunofluorescencia de α -SMA	26
Análisis Estadísticos	26
RESULTADOS.....	27
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES.....	43
REFERENCIAS.....	44
ANEXOS.....	45

ABREVIATURAS

α -SMA: Alfa actina del músculo liso
 α -cat: Alfa Catenina
 β -cat: Beta Catenina
BCE: Células de endotelio capilar bovino
BrdU: Bromodesoxiuridina
D.E: Desviación Estandar
DHEA: Dehidroepiandrosterona
DHEAS: Dehidroepiandrosterona sulfatada
EPLIN: Proteína epitelial de pérdida en neoplasma
ERK: Señal extracelular reguladora de cinasa
EtOH: Etanol
FPI: Fibrosis pulmonar idiopática
HEK293: Células de riñón de embrión humano
HUVEC: Células de endotelio de vena umbilical humana
IF: Inmunofluorescencia
JNK: Cinasa c - Jun N – terminal
LAPC-4: Células epiteliales de cáncer de próstata
LIMA I: Dominio LIM y unión a actina 1
MAPK: Proteína cinasa activadora de mitógeno
MDCK: Células epiteliales de riñón de perro
MEC: Matriz extracelular
MEK: Proteína activadora de mitógeno cinasa
MKK: Proteína activadora de mitógeno cinasa cinasa
MLK: Proteína cinasa de linaje múltiple
NII: Neumonías intersticiales idiopáticas
NMuMG: Células epiteliales de glándula mamaria de ratón
PC12: Células del Feocromocitoma de médula adrenal de rata
Ras: GTPasa monomérica
SPC: Proteína C surfactante
Sts: Estaurosporina
TAK1: Proteína cinasa de la familia MLK
T β R: Receptor de TGF β
TEM: Transición epitelio mesénquima
TGF β : Factor de crecimiento transformante beta
TMB: Tetrametilbencidina
WB: Western Blot
WST-1: 4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-3H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno)
ZO-I: Proteína de unión estrecha

RESUMEN

La Dehidroepiandrosterona (DHEA) es una hormona que se sintetiza principalmente en la corteza de la glándula suprarrenal y se encuentra en la circulación tanto en forma sulfatada (DHEAS) como no sulfatada (DHEA). Esta hormona alcanza su pico máximo de concentración tanto en hombres como en mujeres aproximadamente a los 25 años y disminuye con la edad. La disminución de la DHEA se ha asociado con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, entre las cuales se encuentran las neumopatías intersticiales difusas, como la Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI). Esta enfermedad se caracteriza por la formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos y la acumulación exagerada de matriz extracelular, lo cual conduce a la destrucción del pulmón; se presenta principalmente en personas de edad avanzada. Se ha sugerido que uno de los mecanismos involucrados en la patogénesis de la FPI es la Transición Epitelio Mesénquima (TEM) desencadenada por microdaños desconocidos en el epitelio alveolar que conducen a la destrucción de la arquitectura pulmonar. Las células epiteliales alveolares expresan normalmente altos niveles de E – Caderina y no expresan alfa actina del músculo liso (α -SMA), durante la TEM disminuye la E-Caderina y aumenta α -SMA.

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que la concentración de DHEA disminuye significativamente en pacientes con FPI respecto a los controles sanos en el mismo rango de edad. Además, experimentos realizados con fibroblastos pulmonares humanos provenientes de pulmones de pacientes con FPI, demostraron que la DHEA es capaz de inducir muerte celular e inhibir los efectos profibrosantes asociados al estímulo con TGF- β 1. Este trabajo pretende demostrar que la DHEA es capaz de inhibir la TEM inducida por TGF- β 1 en células de epitelio alveolar humano A549, evaluando los cambios en el contenido de E – Caderina y α -SMA.

Por medio de citometría de flujo se demostró que el TGF- β 1 provoca apoptosis en células epiteliales A549, mientras que la DHEA disminuye este efecto, incluso llegando a valores por debajo de los basales. Por medio del ensayo colorimétrico con WST-1, se demostró que el TGF- β 1 disminuye el número celular mientras que la DHEA en concentraciones bajas no tiene ningún efecto. El TGF- β 1 disminuye la proliferación medida por incorporación de Bromodesoxiuridina (BrdU) a las 48 horas, en tanto la DHEA produce un pequeño aumento. Mediante las técnicas de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en Tiempo Real, *Western Blot* e Inmunofluorescencia se demostró que TGF- β 1 induce un aumento en la expresión de α –SMA y disminución en la expresión de E-Caderina; la DHEA inhibe los efectos causados por TGF- β 1 en nuestro modelo.

Los antecedentes y nuestros resultados, sugieren que la DHEA puede ser considerada como estrategia terapéutica a futuro, sin embargo aun faltan estudios por realizar.

INTRODUCCIÓN

Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)

La Fibrosis Pulmonar Idiopática forma parte de un grupo de padecimientos respiratorios subagudos crónicos que comparten el hecho de responder ante un daño con un proceso inflamatorio intersticial severo e intralveolar difuso, que es seguido por fibrosis o destrucción de las unidades alveolo-capilares. La FPI es la forma más común de las neumonías intersticiales idiopáticas (NII) que se presenta de manera crónica, progresiva y letal. Dicha enfermedad se asocia con la edad ya que se presenta principalmente a partir de los 55 años y, como su nombre lo indica, se desconoce qué la ocasiona (Pardo & Selman, 2002a).

Se ha postulado que la FPI, a diferencia del resto de las NII, puede resultar de microdaños epiteliales que llevan a la alteración de la forma, el estado de diferenciación y la función de las células epiteliales, de este modo la FPI se caracteriza por la lesión y la activación anormal de las células del epitelio alveolar. (Figura 1). Así, se ha señalado que la inflamación no es un evento característico de la FPI, y como evidencia de ello se observa la presencia de alveolitis media/moderada en estados tempranos o avanzados de la enfermedad y la falta de respuesta a terapia anti-inflamatoria potente y de largo plazo (Pardo & Selman, 2002a).

El daño a las células epiteliales puede resultar de diversos estímulos como infecciones, reacciones autoinmunes, toxinas, radiación y daño mecánico lo que genera que sobreexpresen citocinas profibróticas. Estas citocinas, principalmente TGF- β 1, contribuyen a la fibrogénesis induciendo la formación de focos de fibroblastos y miofibroblastos a través de la proliferación de las células mesenquimatosas residentes, atrayendo fibroblastos y fibrocitos circulantes y estimulando la transición epitelio mesénquima (TEM).

Los focos de fibroblastos y miofibroblastos ocasionan la acumulación exagerada de matriz extracelular (Aldred & Mecocci, 2010), lo que conduce a la destrucción de la estructura y función pulmonar al exceder la tasa normal a la cual ésta matriz es degradada (Pardo & Selman, 2002a).

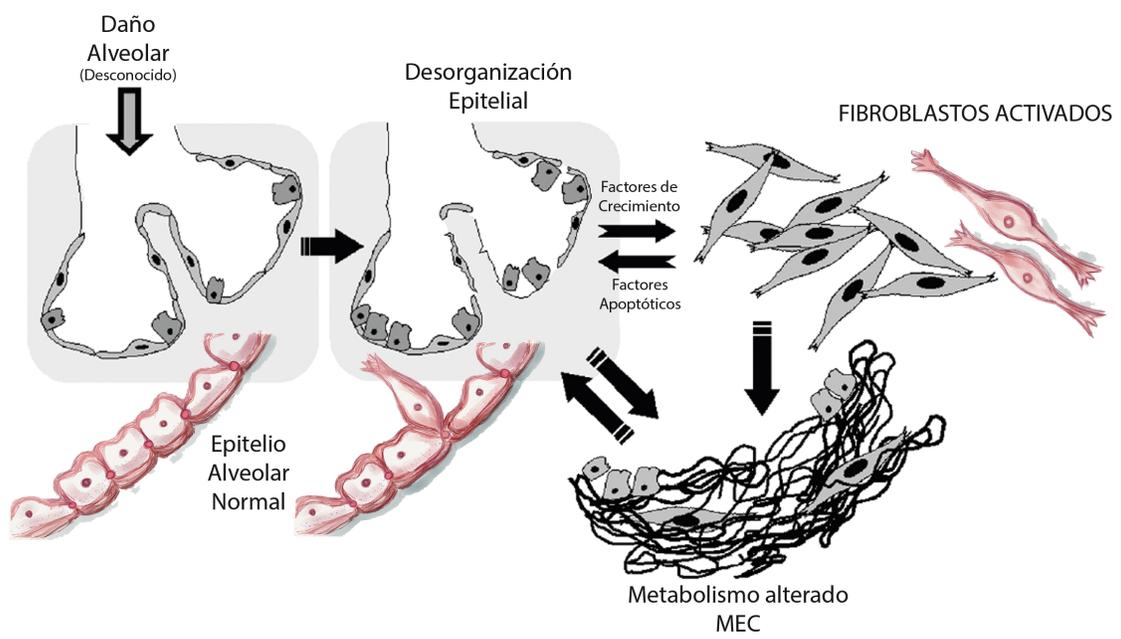


Figura 1. Representación de la FPI modificada de (Selman & Pardo, 2002).

Transición Epitelio Mesénquima (TEM)

La TEM es un proceso complejo y reversible que inicia con la ruptura de las uniones intercelulares y la pérdida de la polaridad ápico – basal típica de las células epiteliales, las cuales se transdiferencian a miofibroblastos (común en pulmón, hígado y riñón por reorganización del citoesqueleto) que se consideran como fibroblastos activados, capaces de proliferar y sintetizar matriz extracelular (MEC) (Bariety *et al.*, 2001).

Durante la TEM aparecen filopodios en la superficie basal de las células epiteliales que se extienden, luego la célula se elonga hacia la MEC intersticial y se desprende del epitelio. Las citoqueratinas desaparecen y se sintetizan α - actina de músculo liso (α -SMA) y vimentina (ambos usados como marcadores mesenquimatosos). La E-Caderina, marcador característico de las células epiteliales y las desmoplaquinas se pierde o se redistribuye. Las uniones celulares se rompen, aparecen nuevos receptores de MEC y así la laminina y la colágena IV de la lámina basal son reemplazadas por fibronectina y colágena I (Cowin & Burke, 1996).

La α -SMA es un componente importante del citoesqueleto y se encuentra involucrado en la motilidad celular y endocitosis (Kolesnichenko & Vogt, 2011) presentes en miofibroblastos y fibroblastos de pulmón en células alveolares humanas, por lo tanto, es usada como marcador de miofibroblastos en la FPI y algunos cánceres (Lofdahl *et al.*, 2011).

La E-Caderina es una proteína de adhesión célula-célula abundante en epitelio que pertenece a la superfamilia de las Caderinas. Son glucoproteínas de superficie celular dependientes de Ca^{2+} que participan en la adhesión homofílica célula – célula. La región citoplásmica de E-Caderina contiene uniones formadas por 2 Cateninas (p120 Catenina y β -Catenina), donde p120 Catenina está involucrada en la distribución y estabilización de los complejos de adhesión entre membranas plasmáticas y β -Catenina proporciona la conexión entre α -Cateninas cuyos complejos están involucrados en la formación de núcleos de filamentos de actina y uniones adherentes que participan en un mecanismo de unión complejo Caderina – Catenina de la membrana con la actina del citoesqueleto citosólico de cada célula en unión (Li *et al.*, 2012). (Figura 2). Esta proteína se pierde en la TEM y se ha visto que disminuye por acción de TGF- β 1 (5ng/ml) en células de epitelio alveolar A549 (Kim *et al.*, 2007).

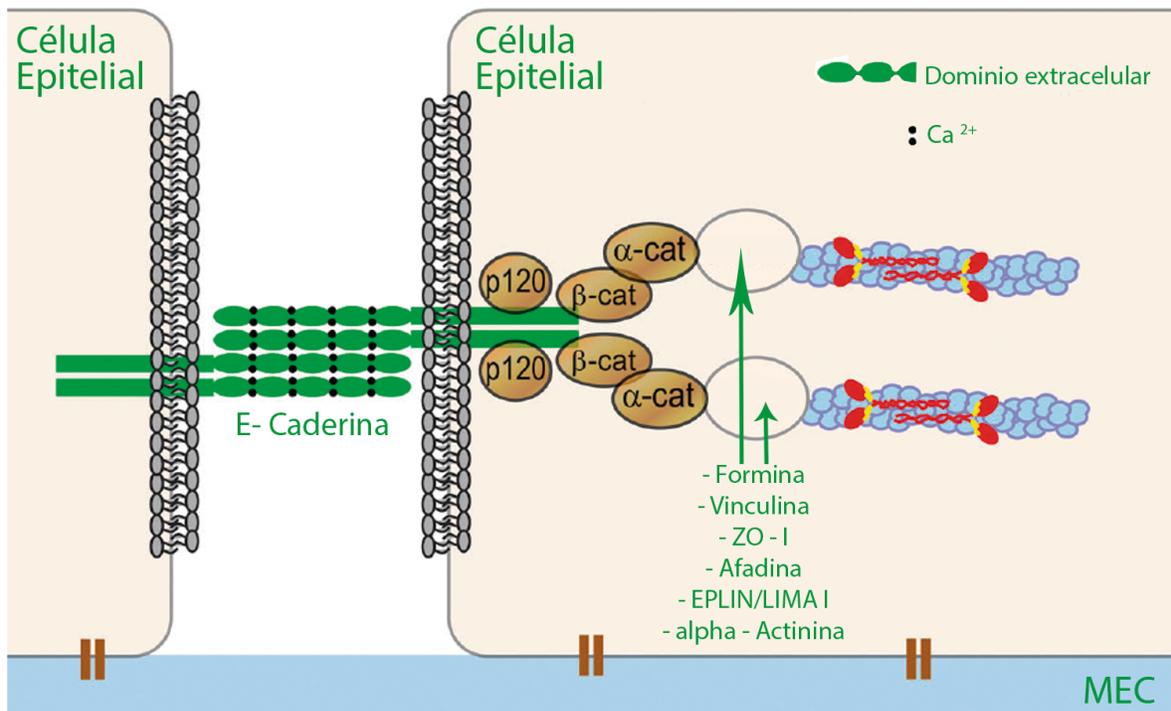


Figura 2. Unión homofílica de E-Caderina modificada de (Li *et al.*, 2012).

Dehidroepiandrosterona (DHEA)

Esta hormona se encuentra de manera fisiológica como DHEA y en forma sulfatada como DHEAS siendo los principales productos secretados por la corteza de la glándula suprarrenal, cerebro, gónadas y tracto intestinal (Yoshida *et al.*, 2003).

Se ha propuesto que la forma sulfatada de la DHEA unida a la albumina podría servir como un reservorio, mientras que la DHEA es a la que se le atribuye efecto biológico a nivel tejido y es considerada como un andrógeno débil; su concentración tiene gran variabilidad diurna al igual que la DHEAS, y es que, mientras que la concentración de la DHEAS no varía a lo largo del día, la secreción de la DHEA sigue un ritmo diurno similar al exhibido por el cortisol (Ebeling & Koivisto, 1994). Su secreción presenta un patrón característico asociado a la edad, de manera tal que, inmediatamente después del nacimiento, la concentración de DHEAS circulante es elevada debido a que es sintetizada por la glándula adrenal fetal. Sin embargo, dicha concentración baja rápidamente y no comienza a subir otra vez sino hasta los 6 – 10 años de edad (Artt, 2004).

Las hormonas esteroides proceden de tejidos corporales específicos y se dividen en dos tipos: las hormonas sexuales y progestacionales y las hormonas suprarrenales. Todas ellas se sintetizan a partir del colesterol y necesitan un intermediario, la α^5 -pregnenolona. Este precursor se convierte en dehidroepiandrosterona en las células suprarrenales de la zona reticular mediante la acción de la 17 α -hidroxilasa del retículo endoplásmico (RE) para formar 17 α -hidroxipregnenolona que, a continuación, actúa en un sistema de rotura de la cadena lateral carbonada y la convierte en dehidroepiandrosterona. Dicho compuesto se transforma en 17 α -estradiol a través del sistema de aromatasa y la acción de la 17-reductasa. Así mismo, el estradiol se genera a partir de la testosterona por acción del sistema de la aromatasa. Las hidroxilasas de RE son enzimas citocromo P450. (Figura 3).

Los niveles máximos de la hormona se alcanzan alrededor de los 25 años, luego comienzan a descender nuevamente de manera sostenida, de tal modo que alrededor de los 60 años las concentraciones séricas de la DHEA se encuentran sólo entre el 5–10% de lo observado en adultos jóvenes. Este descenso es conocido como “adrenopausia” y es independiente de la menopausia que ocurre tanto en hombres como en mujeres. La concentración de DHEA en el plasma de un humano adulto es de 0.01–0.02 μ M mientras que la de DHEAS es de 5-7 μ M, estos niveles disminuyen con la edad, pero cuando los niveles de DHEA están muy bajos se asocian a algunos cambios crónico-degenerativos asociados con el envejecimiento, entre los que se encuentran la aterosclerosis y la diabetes (Legrain & Girard, 2003).

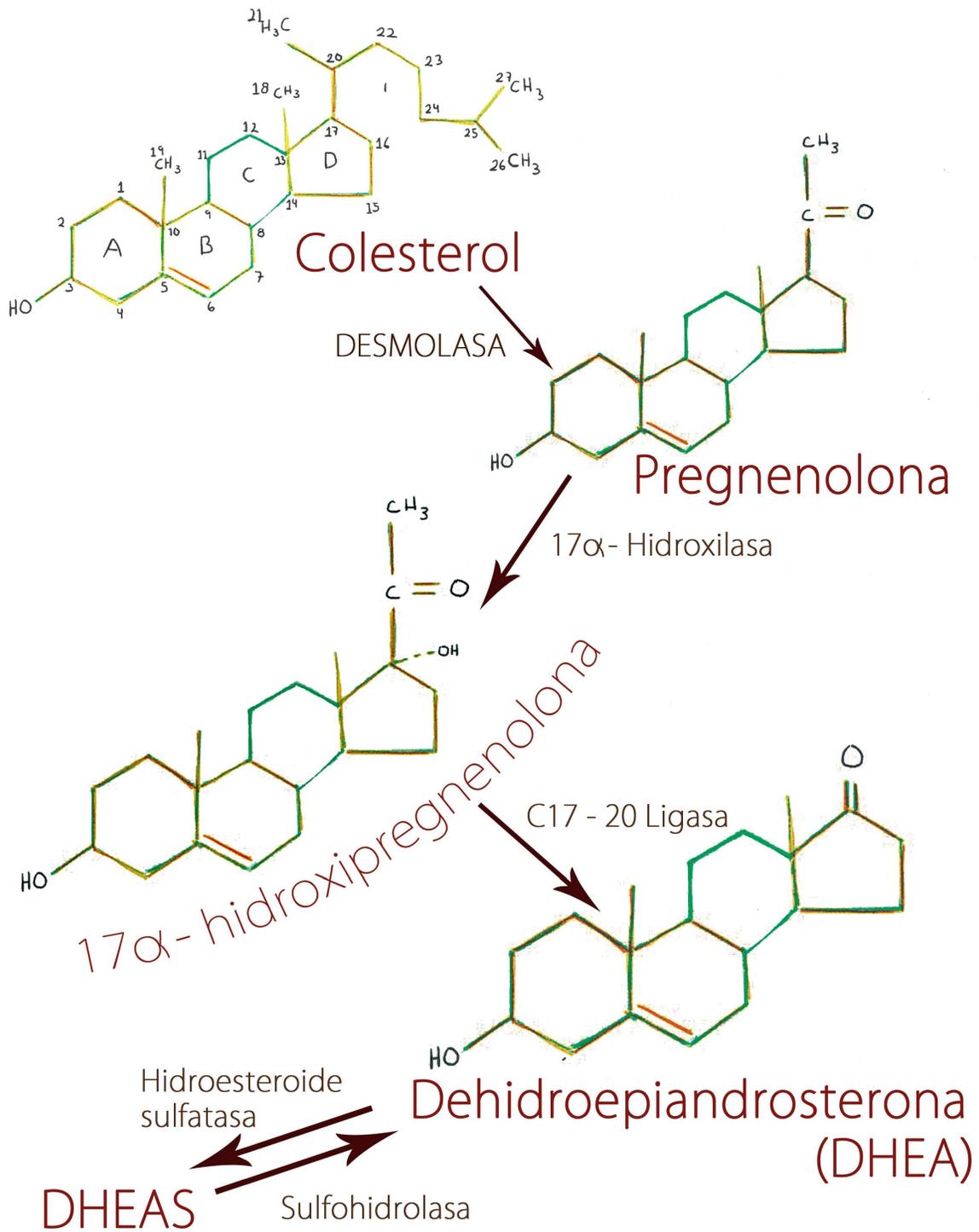


Figura 3. Síntesis de la DHEA y DHEAS (Regelson *et al.*, 1988).

Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β)

El TGF- β es parte de la superfamilia de factores de crecimiento, se encuentra en 3 isoformas: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, las cuales se han identificado en diferentes estirpes celulares como plaquetas, células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, células tumorales, linfocitos T en respuesta de diversos antígenos y en macrófagos cuando son expuestos a lipopolisacáridos bacterianos. Son proteínas multifuncionales que desempeñan un papel fundamental en el desarrollo embrionario como en la homeostasis tisular. Otra de sus funciones es la regulación de la respuesta inflamatoria durante la respuesta fibrosante (a bajas concentraciones es un factor proinflamatorio y a concentraciones altas es antiinflamatorio).

De las distintas isoformas, el TGF- β 1 se considera como el prototipo de factor profibrosante porque favorece la formación de miofibroblastos incrementando la síntesis de colágenas fibrilares como se menciona en el apartado de la TEM (ver página 7) (Regelson *et al.*, 1988).

Se ha comprobado que el TGF- β 1 puede mediar la transición epitelio mesenquima en células alveolares tipo II en ratón. En pacientes con FPI se realizaron estudios de las células alveolares tipo II aisladas de pulmón, las cuales expresaban niveles elevados de mRNA para colágena tipo I, y proteínas mesenquimales como α -SMA y calponina. Al utilizar un inhibidor del receptor de TGF- β cinasa (SB431542) en células cultivadas sobre fibronectina se observó que se conservaban los niveles normales de E - Caderina, α -SMA y proteína surfactante C (SPC), sin embargo se observó un aumento en la expresión de vimentina, demostrando que TGF- β 1 puede mediar la TEM en células alveolares tipo II (Aoki *et al.*, 2003).

El TGF- β 1 activa a las proteínas SMAD (Vía canónica), pero, tiene la capacidad de activar otras vías incluyendo la vía de la familia MAPK (ERK, C-JUN y p38) y la vía PI3K (Vías no canónicas). En la vía canónica TGF- β 1 se une a sus receptores transmembranales T β RII y T β RI promoviendo la fosforilación de Smad2/3, una vez fosforilados se unen a Smad4 que les ayuda a llegar al núcleo funcionando como factores de transcripción. Smad7 inhibe ésta vía evitando la fosforilación de Smad2/3.

En la vía no canónica el TGF- β 1 se une a su receptor transmembranal, lo cual conduce a la activación de TAK1 y Ras que a su vez activan a los factores de transcripción JNK, p38 (TAK1) y ERK1/2 (Ras). Estos factores también pueden interactuar con la vía canónica fosforilando Smad2/3. La vía TAK1 activa MKK3/4/6 y solo MKK4 activa JNK y MKK3/6 activa p38, inclusive MKK4 y JNK funcionan como reguladoras de las vías ya que activan Smad7 logrando inhibir el uso de la vía canónica. (Figura 4).

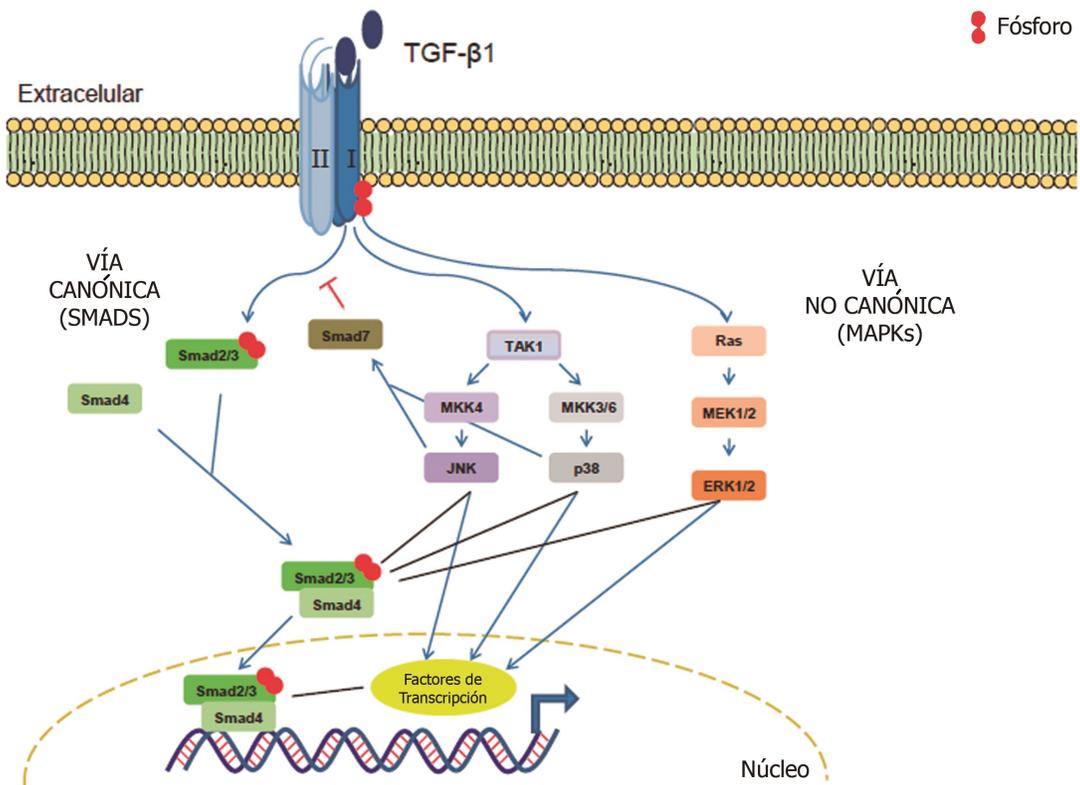


Figura 4. Vía Canónica y No Canónica de TGF-β1 modificada de (Burks & Cohn, 2011).

Fibrosis Pulmonar Idiopática y DHEA

El equipo del Dr. Selman y colaboradores indican que la FPI se presenta comúnmente en personas mayores de 50 años, por lo cual se asocia con el envejecimiento, sin embargo hasta el momento no se sabe realmente que la causa (Pardo & Selman, 2002b). Otros trabajos, mencionan que disminución de la concentración de DHEA se relaciona con la aparición de enfermedades crónico degenerativas en sujetos de edad avanzada (13).

Existen antecedentes que demuestran que el TGF- β 1 induce el incremento del metabolismo de DHEA en estroma del tejido de próstata y células epiteliales (LAPC-4). La DHEA y uno o más de sus metabolitos modulan varias vías celulares y moleculares de señalización implicadas en la patogénesis de la hipertensión pulmonar (Mendoza *et al.*, 2012).

Recientemente, se realizó un trabajo en el que se demuestra que los niveles plasmáticos de DHEA y su forma sulfatada (DHEAS) en 137 pacientes con FPI, se encuentran significativamente disminuidos con respecto a 58 sujetos control. En este mismo trabajo se demuestra que la DHEA a concentraciones farmacológicas de 100 μ M induce apoptosis de fibroblastos de pulmón provenientes de pacientes con FPI, además de otros efectos antifibrosantes tales como inhibición de la migración e inhibición de la síntesis de colágena (Mendoza *et al.*, 2012). Otros trabajos, han puesto de manifiesto su utilidad terapéutica en diabetes, inflamación, osteoporosis, daño hepático y cáncer de colon (Aoki *et al.*, 2003).

Considerando lo mencionado en el párrafo anterior, se abre la posibilidad de considerar a esta molécula como una estrategia terapéutica potencial, sin embargo, aun queda pendiente por determinar la acción de la DHEA en cuanto a inhibir la TEM en las células epiteliales de alveolo.

MARCO TEÓRICO

Hasta la fecha se piensa que el desarrollo de la FPI se debe a la activación de las células del epitelio alveolar y no a un proceso inflamatorio como se ha indicado en la mayoría de las enfermedades fibrosantes del pulmón. Por lo tanto, el epitelio alveolar juega un papel crucial en el desarrollo de esta enfermedad. Uno de los mecanismos que parecen estar involucrados en la destrucción de la arquitectura pulmonar debido a la acumulación de MEC es la TEM, la cual podría contribuir a la formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos, mismos que parecen ser resistentes a la apoptosis.

En este contexto, estudios recientes han mostrado que la DHEA es capaz de inducir apoptosis en distintos tipos celulares, entre ellos los fibroblastos pulmonares humanos. Tales resultados sugieren que esta hormona podría tener efectos antifibrosantes. No obstante, los efectos de la DHEA sobre el epitelio pulmonar no han sido estudiados. Por lo tanto, en el presente estudio, se busca profundizar en dichos efectos.

HIPÓTESIS

La Dehidroepiandrosterona podría inhibir la Transición Epitelio Mesenquima inducida por TGF- β 1 en células de epitelio alveolar humano A549 midiéndola a través de α -actina del músculo liso y E-Caderina.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto que la DHEA causa sobre la TEM inducida por Factor de Crecimiento Transformante- β 1 en células de epitelio alveolar humano A549 por medio de los marcadores α -actina del músculo liso y E-Caderina.

Objetivos Particulares

- ❖ Determinar mediante citometría de flujo el efecto que la DHEA en concentraciones menores a 100 μ M y el TGF- β 1 causan sobre la apoptosis en células de epitelio alveolar humano A549.
- ❖ Estudiar el efecto que la DHEA en concentraciones menores a 100 μ M y TGF- β 1 causan en el número celular y proliferación de células de epitelio alveolar humano A549, medidos por reducción de WST-1 y por incorporación de BrdU.
- ❖ Determinar por medio de la técnica de *Western Blot* el efecto que la DHEA causa sobre las proteínas α -SMA y E-Caderina en células de epitelio alveolar humano A549 estimuladas con TGF- β 1.
- ❖ Demostrar cualitativamente que la expresión de α -SMA aumenta por acción de TGF- β 1 mientras que disminuye por la DHEA en células de epitelio alveolar humano A549 por medio de inmunofluorescencia (IF).
- ❖ Estimar por medio de la técnica de "PCR en tiempo real" el efecto que la DHEA causa sobre la expresión de α -SMA y E - Caderina en células de epitelio alveolar humano A549 estimuladas con TGF- β 1.

METODOLOGÍA

Cultivo Celular

La línea celular de epitelio alveolar humano A549 se cultivó en frascos para cultivo celular T-25 y T-75 (CORNING), todos los cultivos fueron realizados en medio F12 (GIBCO) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino inactivado (SFBI) (GIBCO) y una mezcla de antibiótico/antimicótico (SIGMA). Mantenidos en atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO₂ en incubadoras (NAPCO; Forma Scientific).

Todos los procedimientos se realizaron en ambiente estéril, en campanas de flujo laminar con filtros HEPA (VECO). Para realizar los subcultivos las células fueron sembradas en frascos para cultivo, se lavaron con PBS estéril una vez y se trataron con 0.05% Tripsina-EDTA 1X (GIBCO) durante 1 minuto a 37°C, monitoreando continuamente al microscopio para asegurar una adecuada disgregación de las células. La suspensión celular se recuperó en tubos estériles y se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm. El pellet se resuspendió en 2 ml de medio de cultivo y se procedió al conteo celular, mismo que se realizó utilizando cámara de Neubauer y el método de Azul de Tripano. Este método consiste en diluir 1:2 la suspensión celular con solución de Azul de Tripano al 4% en PBS, una alícuota de 10 µl se utiliza para cargar la cámara de Neubauer y contar. Las células que están muertas pierden su permeabilidad selectiva de membrana permitiendo el paso del colorante y mostrándose al microscopio de color azul, las células vivas se observan incoloras.

Para preservar los cultivos celulares, las suspensiones celulares se congelaron en crioviales de 1.8mL (Corning tipo HXBL) utilizando medio F12+10%SFBI con 10% de Dimetilsulfoxido (DMSO) (SIGMA-HYBRI-MAX); el procedimiento se llevó a cabo de manera gradual en caja de almacenamiento para criovial con isopropanol (lo cual permite una disminución lenta de 1°C por minuto) en ultracongelador (REVCO) a -70°C y posteriormente se transfirieron a tanque de nitrógeno líquido para preservarlas a -195°C. (Figura 5).

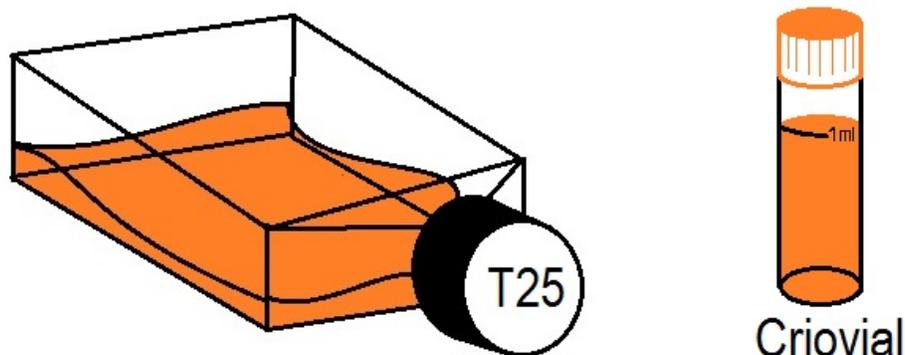


Figura 5. Representación de cultivo celular en caja T25 y tubo criovial de congelación.

Estimación de viabilidad celular con WST-1

Las células se sembraron a una densidad de 5,000 por pozo en placas de 48 pozos, cada uno de los cuales contenía 500uL de medio F12 suplementado con 2% de SFBi. Se estimularon con TGF- β 1 (R&D Systems) 5ng/mL y diferentes concentraciones de DHEA (SIGMA) (0.78uM – 100uM) durante 48 y 96 horas.

La DHEA se disuelve en etanol y las diluciones de trabajo se preparan a partir de un stock de 20mM. La dilución de DHEA conteniendo etanol se agregó a cada pozo, de modo que la concentración final de etanol en los experimentos fue de 0.5%, por lo que fué necesario incluir controles con este porcentaje de etanol con el fin de verificar cualquier efecto citotóxico en los cultivos.

Una vez concluido el tiempo de estímulo se aspiró el medio de cultivo y se lavaron los pozos con PBS estéril. Posteriormente se adicionaron 200 μ L de F12 sin SFBi conteniendo el reactivo WST-1 (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-3H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno) diluído de acuerdo a las indicaciones del fabricante (10 μ L para cada 200 μ L de medio de cultivo). Las placas se incubaron a 37°C en la incubadora durante 2 horas y media. Al finalizar se tomaron 150uL de cada pozo y se pasaron a una placa de 96 pozos que se leyó en el espectrofotómetro a 450nm y 620nm.

Este ensayo se basa en la reducción de la sal de tetrazolio WST-1 por acción del complejo sistema mitocondrial-succinato-tetrazolio-reductasa, que se encuentra activo sólo en células vivas. La sal de formazan producida, fué leída en el espectrofotómetro 450 – 620nm y la cantidad será proporcional al número de células viables. (Figura 6).

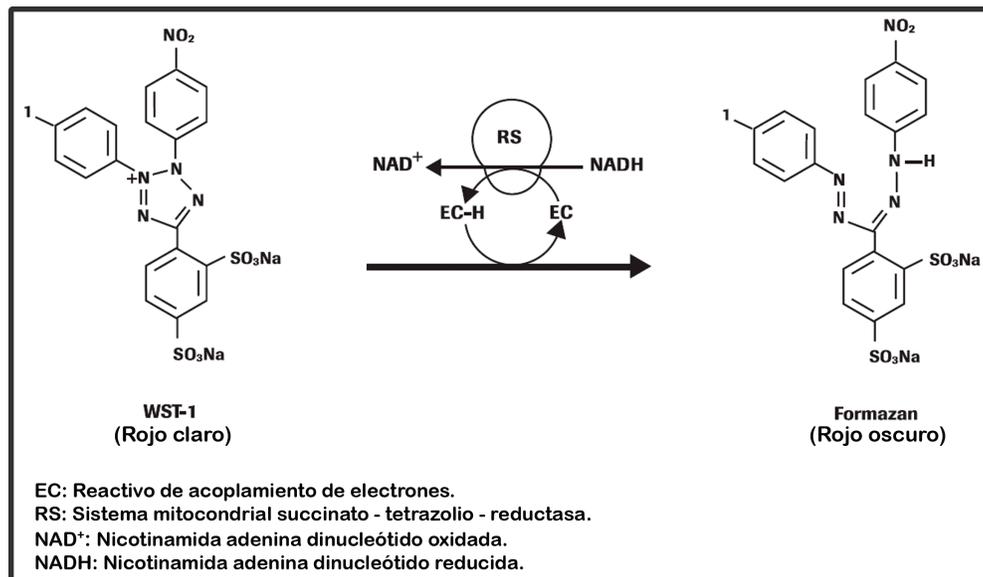


Figura 6. Representación de ensayo de proliferación con WST – 1 (Inserto de Cell Proliferation Reagent WST-1 de ROCHE).

Proliferación celular por incorporación de Bromodesoxiuridina (BrdU)

Las células A549 fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 6 000 células A549/pozo, cada uno de los cuales contenía 100µL de medio de cultivo. Los cultivos fueron estimulados durante 24 y 48 horas con TGF-β1 5ng/mL y diferentes concentraciones de DHEA (12.5uM – 50uM) de acuerdo a lo que se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamiento para las células de epitelio alveolar humano A549 en placas de 96 pozos.

Estímulos por pozo (triplicado)	TGF-β1 (5ng/mL)	DHEA	BrdU 10µM (4 Horas)	anti-BrdU (96 Minutos)
Blanco (1 pozo)			X	X
Control de Fondo (1 pozo)				X
Control			X	X
TGF-β1	X		X	X
DHEA 12.5µM		X	X	X
T/D 12.5µM	X	X	X	X
DHEA 25µM		X	X	X
T/D 25µM	X	X	X	X
DHEA 50µM		X	X	X
T/D 50µM	X	X	X	X

Una vez finalizado el experimento, se retiró el medio de cultivo mediante aspiración y se midió la proliferación mediante incorporación de BrdU utilizando un estuche comercial colorimétrico (ROCHE) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente: se adicionó BrdU a una concentración final de 10µM en un volumen final de 100µL/pozo, se incubó a 37°C por 4 horas. Una vez transcurrido el tiempo se retiró la BrdU y se agregaron 200µl/pozo de solución fijadora “FixDenat” y se incubó durante 30 minutos a 25°C. Posteriormente se retiró la solución fijadora y se agregaron 100µl de solución con anticuerpo anti-BrdU acoplado a peroxidasa (POD) diluido 1:100 con su propio diluyente, después de lo cual se incubó durante 90 minutos a 25°C. Al finalizar se retiró la solución y se lavaron los pozos 3 veces con 200µL de solución de lavado 1X. Por último, se agregaron 100µL del sustrato a cada pozo y se incubó protegiendo de la luz a 25°C durante 5 minutos. Una vez desarrollado el color se transfirieron 80µL del sobrenadante de cada pozo a una nueva placa de 96 pozos que se leyó en el lector de ELISAS (Biotek) a 370nm.

Este ensayo nos permitirá evaluar la proliferación “*in vitro*” de células de epitelio alveolar humano A549 a través de la incorporación de BrdU (un análogo de timidina) en el nuevo DNA sintetizado, que a su vez se marcará con anti - BrdU acoplado a POD (peroxidasa), ésta enzima actúa sobre el sustrato TMB (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine) y produce un compuesto colorido cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de BrdU incorporado. (Figura 7).

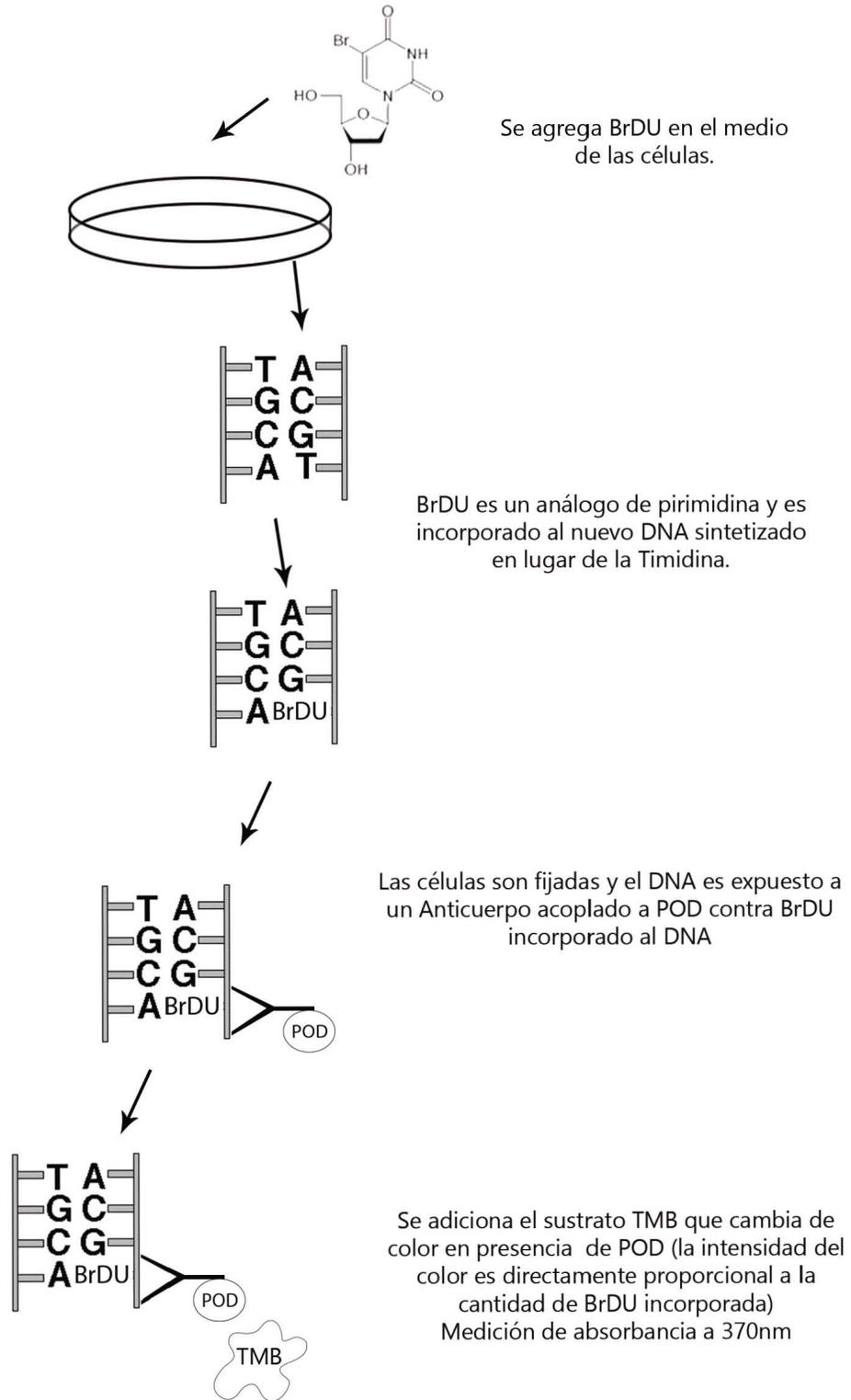


Figura 7. "Representación de ensayo de proliferación por incorporación con BrdU"

Detección de apoptosis por citometría de flujo (Anexina V e IP)

Se cultivaron placas de 12 pozos a una densidad de 30 000 células A549/pozo, cada uno de los cuales contenía 1ml de medio F12 suplementado con 2% de SFBi. Las células se estimularon con TGF- β 1 5ng/ml y DHEA a diferentes concentraciones (0.7812 - 100 μ M) de acuerdo a la Tabla 2.

Se utilizó Estaurosporina (Sts) (SIGMA – ALDRICH) a una concentración final de 1 μ M durante 1 hora para los controles de compensación del citómetro. La staurosporina induce apoptosis a las células de epitelio alveolar humano A549, por lo tanto se utilizó también como control positivo. La solución stock de DHEA también se preparó en etanol, por lo cual se siguieron las mismas indicaciones especificadas para el ensayo de WST1 (pag 17).

Una vez finalizados los tiempos de estímulo las células se disgregaron con 100 μ l de tripsina, se transfirieron a tubos para citometría y se centrifugaron. Posteriormente se lavaron una vez con PBS y se centrifugaron nuevamente. Las tinciones se realizaron en 100 μ l de buffer de anexina de acuerdo a las indicaciones del fabricante y de acuerdo a la tabla 2. Después de 15 minutos de incubación con los fluorocromos las células se llevaron al Citómetro de Flujo (BD FACSCanto II) para detectar Anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP), se adquirieron 5000 eventos para cada condición y se analizaron con el Software FlowJo vX.0.6.

La apoptosis se detectó por medio de la Anexina V-FITC y la necrosis por medio del IP. La Anexina V se utilizó para detectar células en apoptosis ya que tiene alta afinidad a la fosfatidilserina que normalmente se encuentra en la cara citosólica de la membrana, pero, cuando la célula entra en apoptosis se expresa en la cara externa de la membrana citoplásmica. El IP se utilizó para detectar necrosis, ya que las células que mueren por necrosis pierden la permeabilidad selectiva de su membrana permitiendo el paso de IP que se une al DNA bicatenario, a diferencia de las células que sufren apoptosis, mismas que conservan la permeabilidad de su membrana y no permiten la entrada del IP.

Tabla 2. Orden y Tiempo de Estímulos para las células A549.

#Tubo	Estímulos	Tratamiento c/Estímulo	Tiempo	Tinción	Observación	Realización
1	Control	s/tx	-	s/Tinción	Compensación	1 vez
2	Estaurosporina	1 μ M	1 Hora	Anexina V	Compensación	1 vez
3	Estaurosporina	1 μ M	1 Hora	IP	Compensación	1 vez
4	Estaurosporina	1 μ M	1 Hora	Anexina V/IP	Control (+)	1 vez
5	Control	s/tx	-	Anexina V/IP	Control (-)	Duplicado
6	DHEA	0.7812 μ M	48 y 96 Horas	Anexina V/IP	Experimento	Duplicado
7	DHEA	1.56. μ M	48 y 96 Horas	Anexina V/IP	Experimento	Duplicado
8	DHEA	3.125 μ M	48 y 96 Horas	Anexina V/IP	Experimento	Duplicado
9	DHEA	6.25 μ M	48 y 96 Horas	Anexina V/IP	Experimento	Duplicado
10	DHEA	12.5 μ M	48 y 96 Horas	Anexina V/IP	Experimento	Duplicado
11	DHEA	25 μ M	48 y 96 Horas	Anexina V/IP	Experimento	Duplicado
12	DHEA	50 μ M	48 y 96 Horas	Anexina V/IP	Experimento	Duplicado
13	DHEA	100 μ M	48 y 96 Horas	Anexina V/IP	Experimento	Duplicado
14	TGF - β	5ng/ml	48 y 96 Horas	Anexina V/IP	Experimento	Duplicado

Análisis de Western Blot (WB) para α -SMA y E-Caderina

Las células para experimento se sembraron en cajas petri de 10cm de diámetro (P10) a una confluencia aproximada de 60% un día antes de iniciar los estímulos. Los cultivos se estimularon con TGF- β 1 5ng/mL y/o DHEA 25 y 50uM durante 5 días con re-estímulo al tercer día. Al finalizar el experimento los cultivos se lisaron con 100uL buffer de lisis RIPA conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (SIGMA). Los lisados se recuperaron en tubos eppendorf y se centrifugaron durante 15 minutos a 14 000 rpm. Los sobrenadantes que contuvieron la proteína total se recuperaron en tubos eppendorf nuevos. La concentración de proteína se determinó mediante el reactivo de BRADFORD (BIO-RAD-Assay protein) y se mantuvieron en congelación a -70°C hasta el momento de su uso. Las muestras mezcladas con amortiguador Laemmli y hervidas se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida/bis-acrilamida al 13% (SDS-PAGE) a 150 volts durante 90 minutos a -4°C, en cada pozo se cargaron 40 μ g de proteína y 9 μ L de marcador de peso molecular (BIO-RAD-Western C). Una vez finalizada la electroforesis se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa durante 60 minutos a 15 volts y a T°Amb en cámara semi-húmeda (BIO-RAD). Una vez realizada la transferencia, las membranas se trataron con leche libre de grasa al 5% por 1 hora para bloquear los sitios inespecíficos y posteriormente se incubaron durante toda la noche a -4°C con anticuerpo primario diluido (anti α -SMA, anti E-Caderina o anti β -tubulina) diluido con PBS+1% de BSA de acuerdo a lo indicado en la tabla 3. Al finalizar la incubación se lavó 4 veces con PBS + Tween 0.05% + TRIS-HCl + NaCl 5%. (Tabla 3). Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a HRP durante 60 minutos a T° Ambiente. (Tabla 3). Al finalizar se volvió a lavar 4 veces con PBS + Tween 0.05% + TRIS-HCl + NaCl 5% para después ser revelado por medio de Luminol – Peróxido en fotodocumentador (Chemi Doc, BioRad) y se obtuvo las imágenes de las bandas que fueron analizadas por densitometría con el programa Image Lab V 3.0 (BIO-RAD).

Tabla 3. Características de Anticuerpos para WB.

Anticuerpo	Hospedero	Marca	Dilución de trabajo	Tamaño (kDa)	Dilución secundario
β - Tubulina	Rabbit	Santa Cruz	1:200	55	1:5000
E - Caderina	Rabbit	Santa Cruz	1:200	120	1:5000
α - SMA	Mouse	SIGMA - ALDRICH	1:200	42	1:8000

PCR en Tiempo Real (RT-Q-PCR)

Las células fueron sembradas con medio de cultivo con Suero Fetal Bovino inactivado (SFBi) en cajas petri de 6cm de diámetro (P6) a 60% de confluencia 24 horas antes de iniciar el experimento. Se estimularon en medio de cultivo sin SFBi durante 5 días con re-estímulo al 3 día con el fin de evitar la disminución del efecto del TGF- β 1. Los estímulos evaluados fueron: Control, TGF- β 1, DHEA, TGF- β 1 / DHEA. El mRNA se obtuvo en esterilidad dentro de la campana de flujo laminar utilizando el método de Trizol (SIGMA). Se agregó 1mL del Trizol a cada caja y se homogenizó suavemente para lisar las células, el lisado se transfirió a tubos Eppendor de 1.5mL y se agitaron en vortex 15 segundos y se llevaron a T° ambiente. Una vez descongeladas se agregan 200 μ L de Cloroformo y se agitaron a mano 15 segundos de manera vigorosa (5 veces) al final se dejó reposar 5 minutos a T° ambiente y después se centrifugó durante 15 minutos entre 2–4°C a 12000 g, se recuperó la fase acuosa con micropipeta usando puntas estériles.

Se agregaron 500 μ L de Isopropanol a cada tubo y se dejó 1 hora a -20°C o a -70°C toda la noche, se centrifugó a 12000g por 10 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante lavando 2 veces con 1mL etanol al 75% diluido con agua tratada con Dietilpirocarbonato 0.01%, después de cada lavado se centrifugó a 7500g por 5 minutos a 4°C y se dejó secar al aire los minutos necesarios, hasta que quedó sólo el pellet, que se resuspendió con 20 μ L de H₂O grado PCR. Una vez resuspendido, se cuantificó la cantidad de RNA obtenido con espectrofotómetro NanoDROP 1000 V.3.3. La PCR se realizó en termociclador (Hybaid PCR Sprint Thermal Cycler HBSP 02110) y se utilizó 1 μ g de RNA por muestra, utilizando el estuche comercial de RT-PCR-oligo-DT (poli A) (THERMO - Verso cDNA Synthesis Kit) con el que se obtuvo todos los mRNA presentes. El programa se utilizó de la siguiente manera: 42°C por 45 minutos (amplificación) y 92°C (desactivó reacción al detener la retrotranscriptasa) por 2 minutos para finalizar a - 4°C con el fin de mantener el cDNA, al final la muestra se aforó a 30 μ L de H₂O grado PCR y se refrigeró a - 20°C. Para conocer la expresión de E - Caderina y α - SMA se utilizaron sondas Taqman específicas para dichos genes y se realizó PCR en tiempo real utilizando el termociclador (QIAGEN-Rotor-Gene Q). Las muestras se corrieron por triplicado y se incluyeron controles negativos de H₂O. El análisis de la expresión se calculó utilizando el delta CT como se muestra en la Tabla 10 y 11.

Inmunofluorescencia de α - SMA

Se cultivaron en portaobjetos especiales con 4 pozos (Chamber Slide System–NUNC) 10 000 células de epitelio alveolar humano A549 por pozo utilizando el siguiente orden de estímulos Control, TGF- β 1 (5ng/mL), DHEA 50 μ M y TGF- β 1 (5ng/mL)/DHEA 50 μ M durante 5 días con re-estímulo al 3 día.

Posteriormente se fijaron con Paraformaldehído 1% en PBS por 15 minutos, al finalizar se retiró el fijador y se colocaron en PBS frío. Se comenzó la IF premeabilizando las células con Tritón 0.01% diluido en PBS durante 30 segundos y rápidamente se pasan a una solución de PBS + Tween 0.05% para lavar en agitación suave por 10 minutos. Se continúa con la incubación con solución bloqueadora 1X diluida en agua desionizada (Universal Blocking Reagent (10X)-BioGenex) por 1 hora, al finalizar se retira la solución de bloqueo y se colocan en anti- α -SMA acoplado a FITC en dilución 1:30 con PBS + Tween 0.05% + BSA 1% y se deja incubando a -20°C durante toda la noche.

Al finalizar se lava 3 veces con PBS + tween 0,05% por 10 minutos y un cuarto lavado con PBS sin tween por 10 minutos.

Para poder observar al Microscopio de Fluorescencia cada laminilla se montó con 20uL de DAPI frío (Ultra Cruz Mounting Medium for fluorescens whit DAPI–Santa Cruz) y se colocó un cubreobjetos que se selló de las orillas con barniz para uñas transparente. Inmediatamente se observó al Microscopio de Fluorescencia.

Análisis Estadísticos

Todos los resultados se analizaron con el Software STATISTICA V.8 y se reportan promedios +/- Desviación Estandar (D. E.), ANOVA one-way ($p < 0.05$) y Prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

Los resultados que se muestran son el promedio de al menos dos experimentos por duplicado o triplicado.

Las pruebas ANOVA one-way y Dunnett se aplicaron a los datos derivados de experimentos realizados al menos por triplicado, y se consideraron diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.05$

RESULTADOS

A) Efecto del TGF- β 1 y la DHEA sobre la viabilidad celular en cultivos de células epiteliales humanas A549

Con la finalidad de determinar las concentraciones de DHEA que no alteraran el número celular para que sean utilizadas en ensayos posteriores para evaluar la TEM (inducida por TGF- β 1), se realizaron ensayos colorimétricos con WST-1. Con este ensayo se evaluó la viabilidad celular obteniendo los resultados que se muestran a continuación:

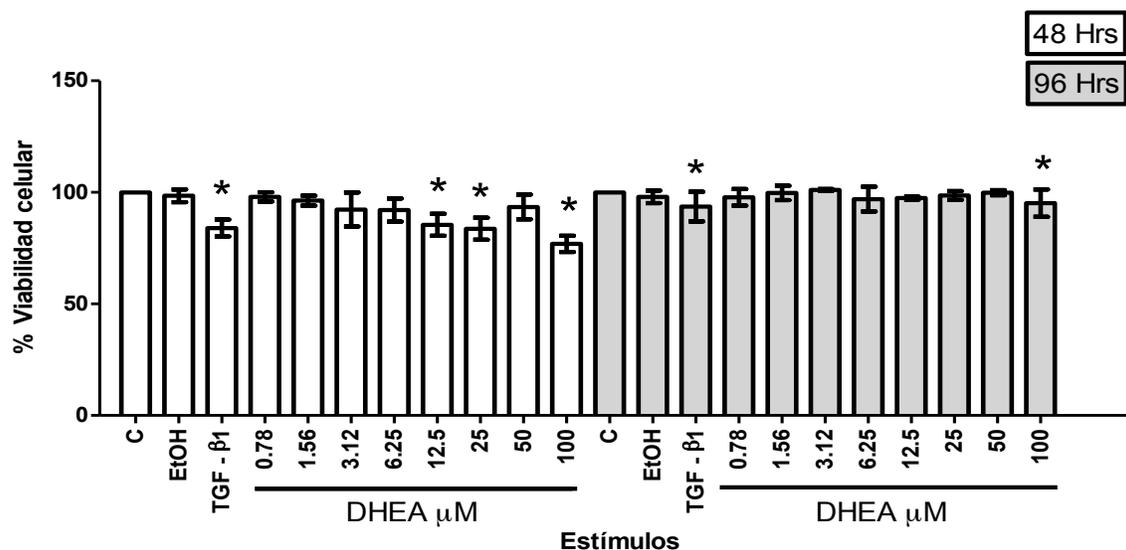


Figura 8. Viabilidad celular en células A549 estimuladas durante 48 y 96 horas con DHEA (0.78 - 100 μ M), TGF- β 1 (5ng/ml) y EtOH (0.5%). Los resultados que se muestran son el promedio de seis experimentos independientes realizados por cuadruplicado. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control sin tratamiento ($p < 0.05$), ver Tablas 6 y 7 del anexo.

- Las células A549 tratadas con EtOH por 48 y 96 horas no muestran cambios en el porcentaje de la viabilidad celular con respecto al control (100%) (Figura 8, barras EtOH).
- El TGF- β 1 produce una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad celular a las 48 horas (84 \pm 3.8 %) que se mantiene hasta las 96 horas (93.6 \pm 6.65 %) con respecto al control (100%). (Figura 8, barras TGF- β 1).
- La DHEA solamente es capaz de disminuir significativamente la viabilidad celular a concentraciones de 12.5 μ M (85.44 \pm 4.93 %), 25 μ M (83.67 \pm 4.92 %) y 100 μ M (76.91 \pm 3.64 %) a las 48 horas, mientras que a las 96 horas este efecto sólo se presenta a 100 μ M (95.18 \pm 6.1 %) con respecto al control (100%). (Figura 8, barras DHEA (0.78 - 100 μ M)).

B) Efecto del TGF-β1 y la DHEA sobre la apoptosis de células epiteliales humanas A549

Con el propósito de establecer las concentraciones de DHEA que no induzcan muerte celular y que serán utilizadas en los ensayos posteriores para evaluar la TEM (inducida por TGF-β1), se realizaron ensayos de citometría de flujo para detectar apoptosis. Los resultados se presentan en la siguiente figura:

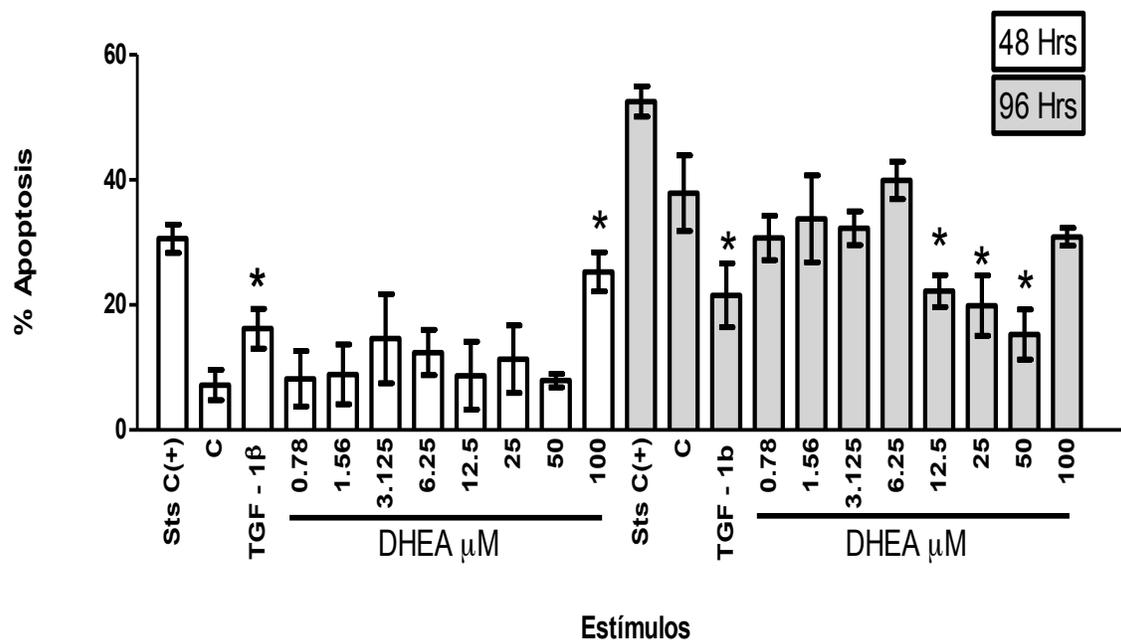


Figura 9. Apoptosis en células A549 estimuladas durante 48 y 96 horas con DHEA (0.78 - 100μM), TGF-β1 (5ng/ml) y estaurosporina como control positivo (1mM, 1 hora). Los resultados que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control sin tratamiento ($p < 0.05$), ver Tablas 4 y 5 del anexo.

- Las células A549 en condiciones basales muestran un porcentaje de apoptosis de 7.2 ± 2.4 % a las 48 horas que se incrementa a las 96 horas (37.87 ± 5.1) (Figura 9, barras Control).
- El TGF-β1 (5ng/ml) produce un aumento significativo de la apoptosis con respecto al control sin tratamiento a las 48 horas (7.2 ± 2.4 v.s. 16.2 ± 3.2 %), sin embargo a las 96 horas no se observa un aumento, por lo contrario, se observa una disminución estadísticamente significativa (37.9 ± 6.0 v.s. 21.5 ± 5.1 %).
- La DHEA solamente induce un aumento estadísticamente significativo en la apoptosis cuando se utiliza a una concentración de $100 \mu\text{M}$ a las 48 horas (7.2 ± 2.4 v.s. 25.3 ± 3.1 %), contrario a lo que se observa a las 96 horas (37.9 ± 6.0 v.s. 30.9 ± 1.4 %), ver Figura 9 barra DHEA $100 \mu\text{M}$.

- Concentraciones de DHEA \leq a $50\mu\text{M}$ no inducen aumento en la apoptosis con respecto a las condiciones basales en ninguno de los dos tiempos estudiados; más aun, se observa una tendencia a disminuir significativamente en algunas de las concentraciones estudiadas a las 96 horas (Figura 9 barras DHEA 12.5-50 μM).
- La Estaurosporina, que en este ensayo se utiliza como un control positivo de muerte celular, tal y como se esperaba produjo un aumento en la apoptosis en comparación con el control sin tratamiento (7.2 ± 2.4 v.s. 30.6 ± 2.3 a las 48 horas y 37.9 ± 6.0 v.s. 52.6 ± 8.3 % a las 96 horas), Figura 9, barra Sts C(+). Dicha tendencia se mantuvo aún a las 96 horas en donde la falta de cambio de medio incrementó incluso la apoptosis basal en los controles sin tratamiento. Cabe aclarar que el tratamiento con Estaurosporina en todos los casos fue solamente de 1 hora mientras que para los cultivos utilizados como controles sin tratamiento y estimulados con TGF- β 1 y DHEA se mantuvieron sin cambio de medio durante 48 y 96 horas.

C) Efecto del TGF-β1 y la DHEA sobre la proliferación celular en cultivos de células epiteliales humanas A549

Con la finalidad de determinar las concentraciones de DHEA que no alteren la proliferación y que serán utilizadas en ensayos posteriores para evaluar la TEM (inducida por TGF-β1), se realizaron ensayos de incorporación de BrdU y se obtuvieron los siguientes resultados:

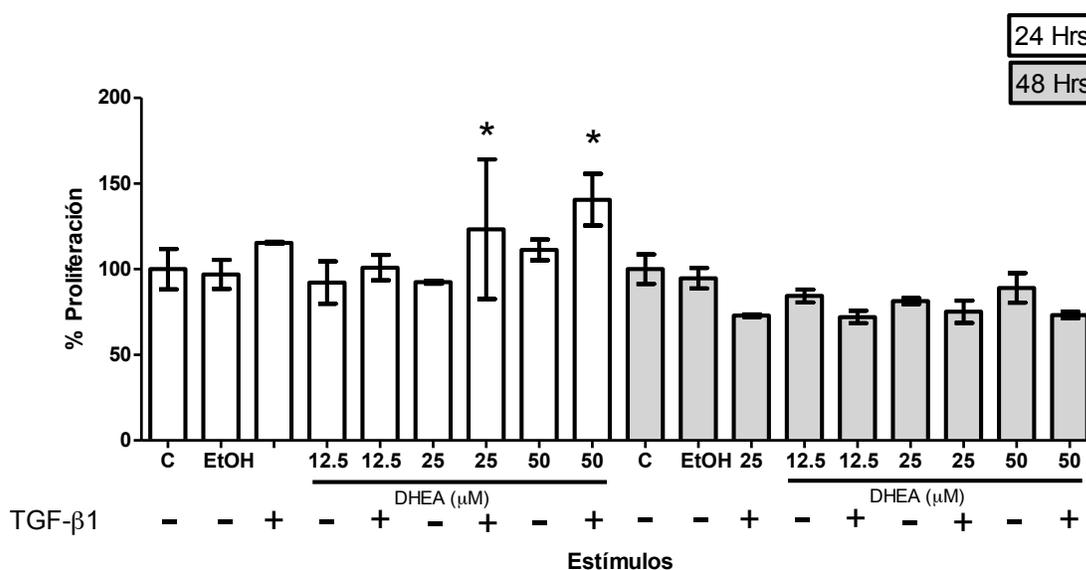


Figura 10. Efecto de la DHEA (12.5-50μM) y TGF-β1 (5ng/ml) sobre la proliferación celular medida por incorporación de BrdU en células A549 estimuladas durante 24 y 48 horas. Los resultados que se muestran son el promedio de un experimento realizado por triplicado. El asterisco indica diferencias significativas entre promedios con respecto al control sin tratamiento ($p < 0.05$), ver Tablas 8 y 9 del anexo.

- Los cultivos de células A549 tratadas con EtOH no presentaron cambios significativos en la proliferación celular en 24 (96.9±8.5 %) y 48 horas (94.7±6 %) en comparación con el control (100 %). (Figura 10, barras EtOH).
- El TGF-β1 no modificó significativamente la proliferación celular en los cultivos de células A549 originando un ligero aumento a las 24 horas (115.4±0.6 %) y una ligera disminución a las 48 horas (72.9±0.7 %) en comparación en el control (100%). (Figura 10, barras TGF-β1).
- Los cultivos celulares de A549 tratados con DHEA en concentraciones 12.5, 25μM no presentan cambios significativos en la proliferación celular resultando en una ligera disminución a las 24 y 48 horas. En el caso de usar DHEA 50μM se observa que a las 24 horas presentan un ligero aumento (111.3±6 %), pero, a las 48 horas una ligera disminución (89±8.62 %) en comparación con el control (100 %). (Figura 10, barras DHEA (12.5-50μM)).
- Los cultivos celulares de A549 tratados con TGF-

- β 1/DHEA (12.5-50 μ M) presentan aumentos significativos en la proliferación celular a las 24 horas a concentraciones de 25 μ M (123.3 \pm 40.8 %) y 50 μ M (140.6 \pm 15.1 %); en el caso de 12.5 μ M (100.9 \pm 7.5 %) se mantiene en valores cercanos al control (100%). A las 48 horas las concentraciones de DHEA 12.5, 25 y 50 μ M generan una ligera disminución en la proliferación celular (72 \pm 3.6, 75.1 \pm 6.5 y 73.2 \pm 1.9 % respectivamente) con respecto al control (100 %). (Figura 10, barras TGF- β 1/DHEA (12.5-50 μ M)).

D) Efecto del TGF- β 1 y la DHEA sobre la E-Caderina en cultivos de células epiteliales humanas A549

Utilizando las concentraciones de DHEA seleccionadas en los experimentos previos, se analizaron los cambios en la E-Caderina mediante un ensayo de *Western Blot* en extractos totales de células estimuladas con TGF - β 1 y DHEA, los resultados se muestran a continuación:

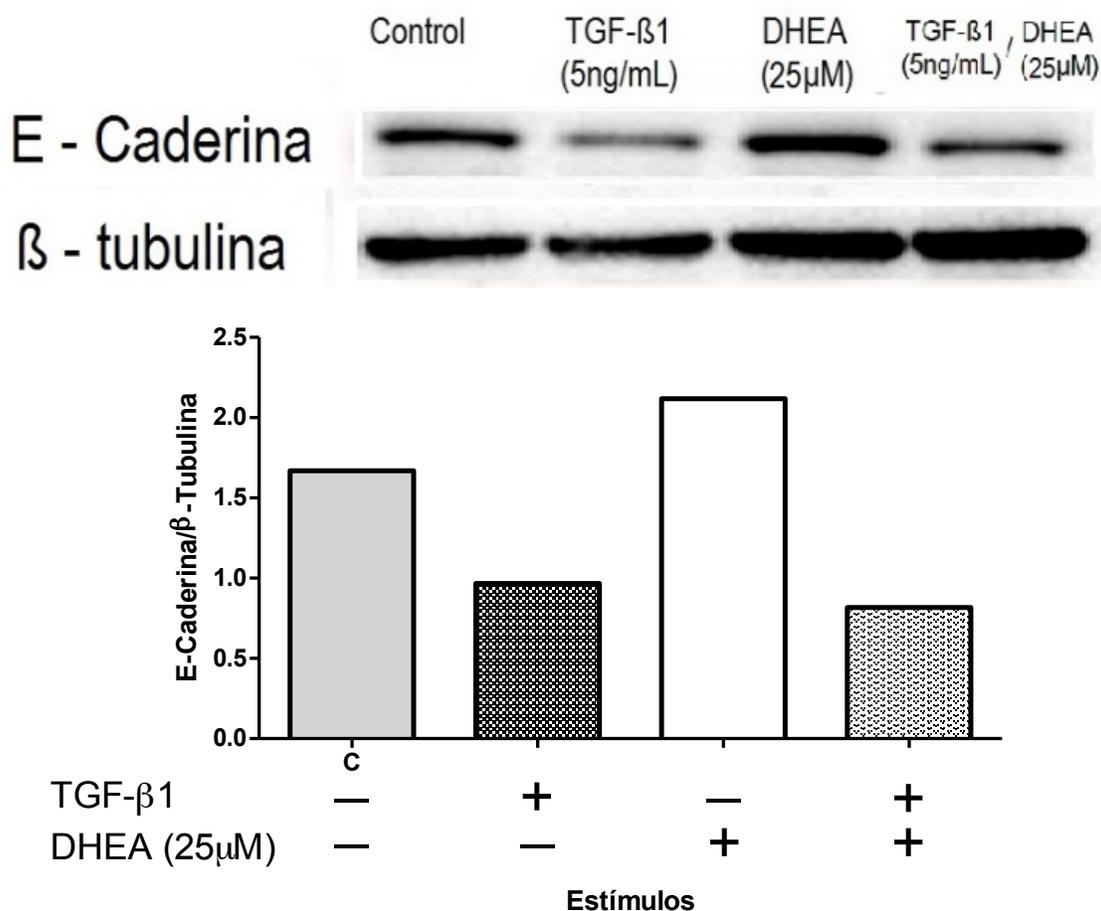
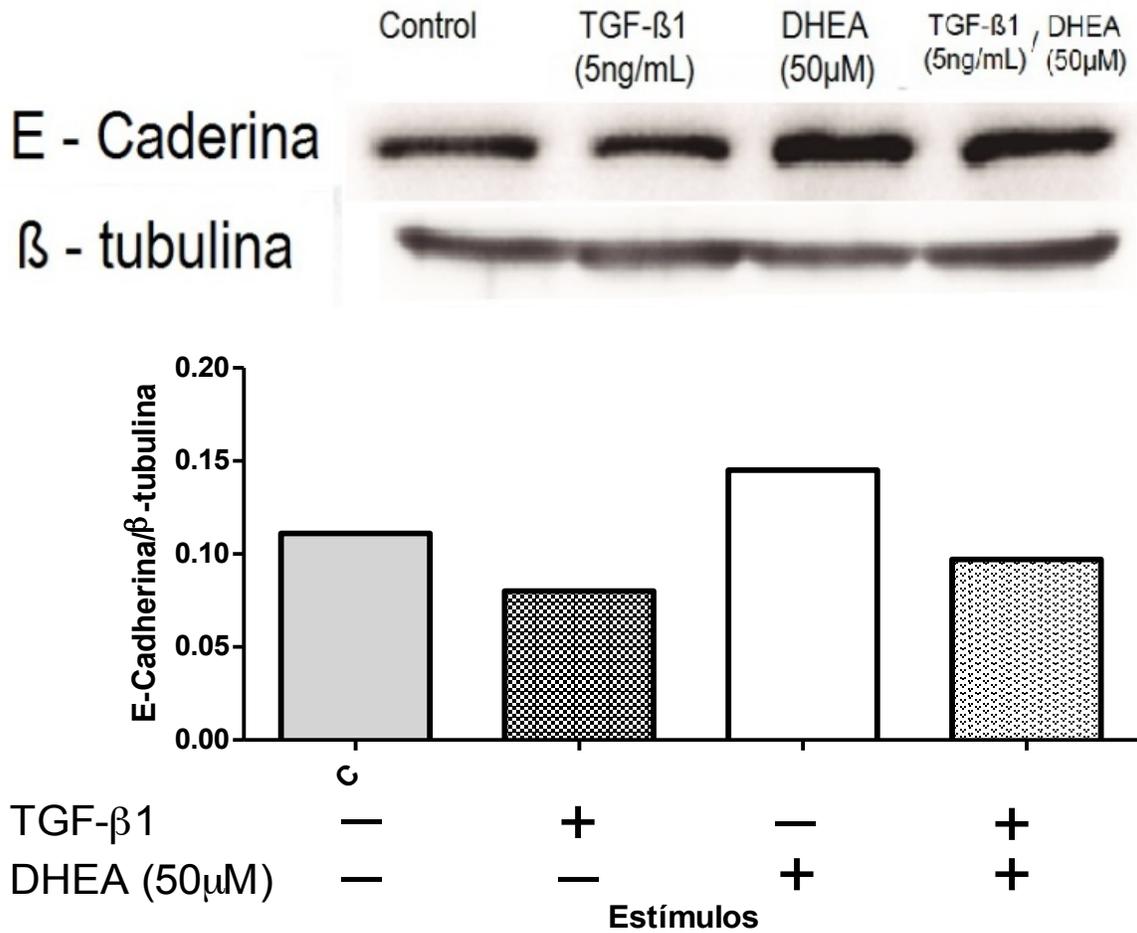


Figura 11. Efecto de la DHEA y TGF- β 1 sobre la E-Caderina analizada por *Western Blot* en extractos de proteína total de células A549 estimuladas durante cinco días con 5 ng/ml de TGF- β 1 y/o DHEA a la concentración indicada. Los resultados que se muestran fueron analizados por densitometría y se normalizaron contra β -Tubulina, de lo cual se deriva la gráfica mostrada en la parte inferior de la figura, en la parte superior se muestra el *Western Blot*.

- Los resultados del experimento muestran que en las células A549 el TGF - β 1 disminuye los niveles de E - Caderina mientras que DHEA muestra un ligero aumento, sin embargo, ésta concentración de DHEA no es capaz de revertir los efectos de TGF- β 1 tal y como se observa en el cuarto carril de la figura y en la barra correspondiente. (Figura 11, barras TGF - β 1, DHEA 25 μ M y TGF - β 1/DHEA 25 μ M).

Debido a que no se presentó el efecto esperado sobre la E-Caderina, se decidió evaluar una concentración más elevada de DHEA (50 μ M). Los resultados se muestran a continuación:

A)



B)

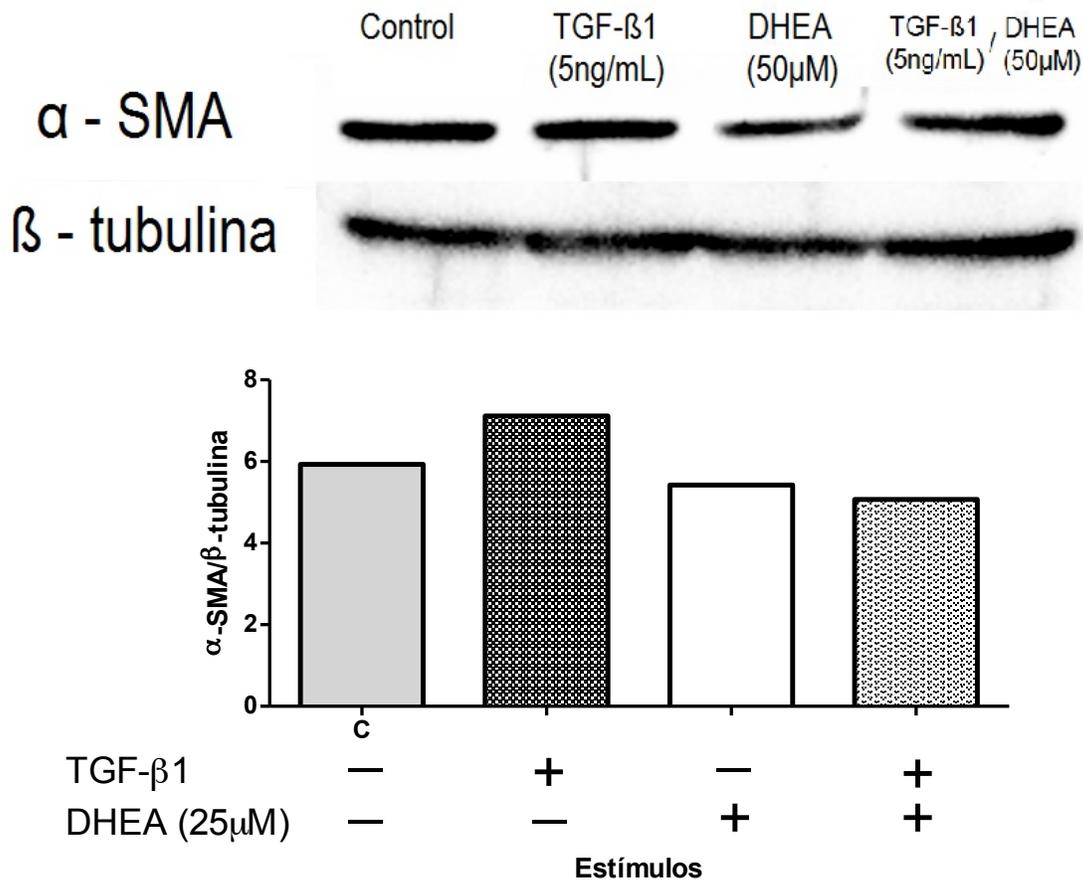


Figura 12. Efecto de la DHEA y 5 ng/ml de TGF- β 1 sobre E-Caderina (A) y α -SMA (B) en células epiteliales A549 estimuladas durante cinco días. En la parte superior de cada panel se muestra el *Western Blot* y en la parte inferior se muestra la gráfica derivada del análisis densitométrico normalizado con β -Tubulina.

- Los resultados muestran que el TGF- β 1 en células A549 produce una disminución en los niveles de E-Caderina y un aumento en los de α -SMA en comparación con el control sin tratamiento. Cabe señalar que E-Caderina se encuentra en niveles elevados y que α -SMA debería estar en niveles muy bajos en células epiteliales normales, contrario a lo que se observa en el panel B de la figura (Figura 12, gráfica A y B barras TGF- β 1).
- Las células A549 tratadas con la DHEA muestran un aumento en los niveles de E-Caderina y una disminución ligera en los de α -SMA en comparación con el control sin tratamiento. (Figura 12, gráfica A y B barras DHEA 50 μ M).
- Esta concentración de DHEA es capaz de revertir los efectos de TGF- β 1 observándose valores de E-Caderina muy similares a los del control. Cuando analizamos el efecto de la DHEA sobre la α -SMA, observamos que incluso hay una pequeña disminución con respecto al control sin tratamiento. (Figura 12, gráfica A y B barras TGF - β 1/DHEA 25 μ M).

E) Efecto del TGF- β 1 y la DHEA sobre α -SMA en cultivos de células epiteliales humanas A549

Con el propósito de corroborar las observaciones realizadas por Western Blot, se decidió realizar inmunofluorescencia de células A549 estimuladas durante 5 días (y re-estimulando a los 3) con TGF - β 1 y/o DHEA 50 μ M. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura:

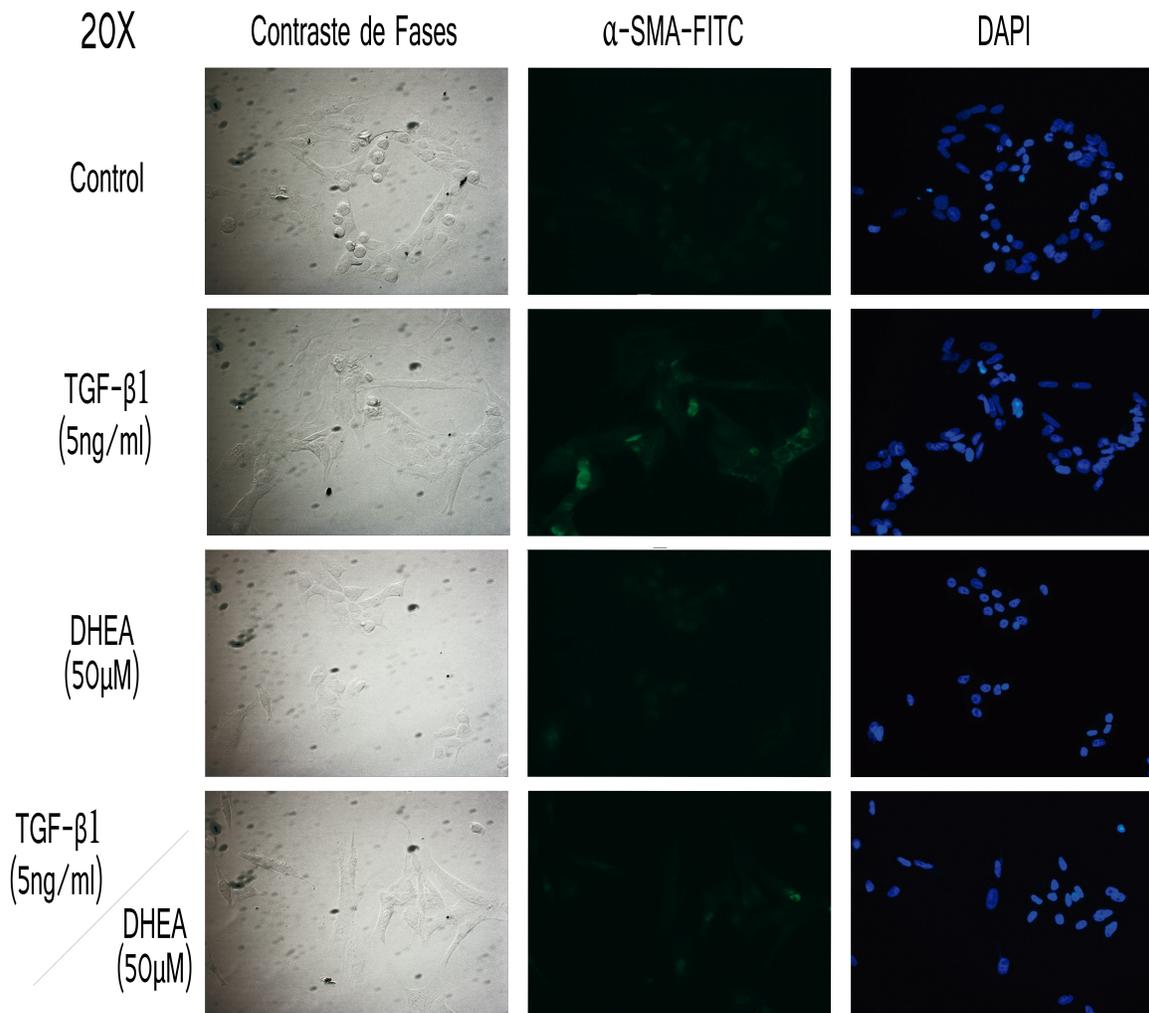


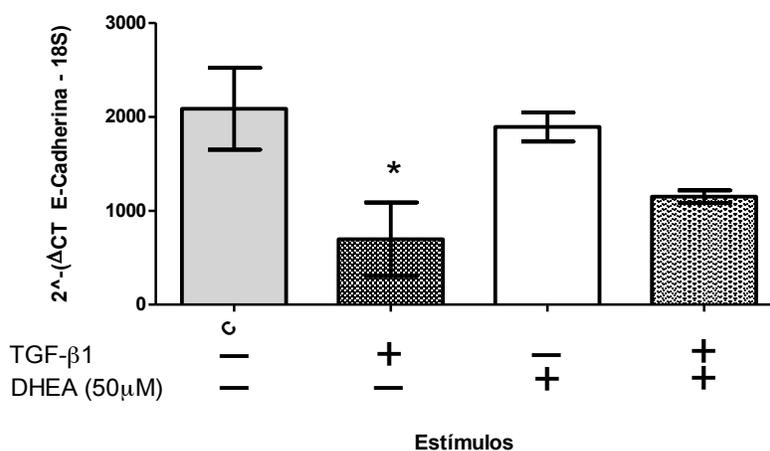
Figura 13. Efecto de la DHEA y TGF- β 1 sobre α -SMA analizada por Inmunofluorescencia en células A549. En la primera columna se muestra la imagen de contraste de fases, en la segunda se muestra la tinción con anticuerpo anti- α -SMA acoplado a FITC y la tercera muestra la tinción de núcleos con DAPI.

- En las células A549 estimuladas con TGF - β 1 se observa un aumento en el contenido de α -SMA con respecto al control sin tratamiento, mientras DHEA no induce ningún cambio (Figura 13).
- En la tinción de α -SMA en células A549 estimuladas con TGF - β 1/DHEA se observa que la DHEA inhibe el efecto generado por TGF - β 1 (5ng/ml), y el contenido es muy similar al observado en el control sin tratamiento (Figura 13).

F) Efecto del TGF-β1 y la DHEA sobre la expresión de E-Caderina y α-SMA medida por RT-Q-PCR en cultivos de células epiteliales humanas A549

Finalmente se realizó análisis de la expresión de E-Caderina y α-SMA mediante PCR en tiempo real. Los resultados derivados del análisis se muestran a continuación:

A)



B)

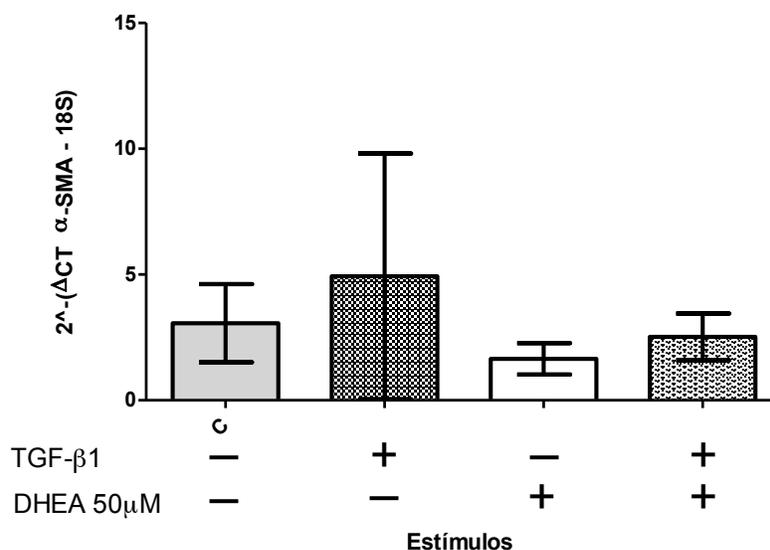


Figura 14. Efecto de la DHEA y TGF-β1 sobre la expresión de E-Caderina (A) y α-SMA (B) analizadas por PCR en Tiempo Real en células A549 estimuladas durante cinco días. Los ΔCTs fueron normalizados contra 18S, que es un gen constitutivo. Los resultados que se muestran son el promedio de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control sin tratamiento ($p < 0.05$), ver Tablas 10 y 11 del anexo.

- Las células A549 tratadas con TGF β 1 presentaron una disminución significativa en la expresión de E-Caderina, y un aumento de α -SMA en comparación con el control sin tratamiento. (Figura 14, gráfica A y B barras TGF β 1 (5ng/ml)).
- Las células A549 tratadas con DHEA aumentaron ligeramente los valores de E-Caderina y disminuyeron los de α -SMA en comparación con el control sin tratamiento. (Figura 14, gráfica A y B barras DHEA 50 μ M).
- Las células A549 estimuladas con TGF β 1/DHEA mostraron que se revierte el efecto causado por TGF β 1 al no haber diferencia significativa en E-Caderina y obtener menor expresión de α -SMA en comparación al control sin tratamiento. (Figura 14, gráfica A y B barras TGF- β 1/DHEA 50 μ M).

DISCUSIÓN

Con base en las publicaciones relacionadas con el efecto antifibrosante de la DHEA en fibroblastos de pulmón (Mendoza *et al.*, 2012) y con el propósito de clarificar su potencial terapéutico en la FPI, se decidió estudiar los efectos de ésta hormona sobre células epiteliales alveolares humanas, mismas que son afectadas durante el desarrollo de la FPI cuando sufren TEM (Selman & Pardo, 2002).

Como objeto de estudio se utilizó la línea celular A549 proveniente de epitelio alveolar humano en las cuales se indujo TEM con TGF- β 1 a concentración de 5ng/ml. Ya se ha demostrado por otros autores que bajo las condiciones mencionadas TGF- β 1 induce TEM en células A549, la cual se demuestra principalmente a través de la disminución de E-Caderina y aumento de α -SMA (Kim *et al.*, 2007).

Estudios realizados por la autora Julia Arnold con DHEA (10nM) en células de nódulo linfático (LAPC - 4) demuestran que esta hormona induce proliferación celular (Arnold *et al.*, 2008). Con el propósito de determinar el efecto de la DHEA en nuestro modelo, se evaluaron varias concentraciones de DHEA sobre el número celular en cultivos de epitelio alveolar humano A549 por medio del ensayo de WST-1. Los resultados demuestran que el número celular de A549 disminuye significativamente por acción de TGF- β 1 (5ng/ml) y DHEA a concentraciones de 12.5, 25 y 100 μ M (15.99%, 14.56%, 16.33% y 23.09% respectivamente) a las 48 horas en comparación con el control (100%). Por éste mismo ensayo realizado a las 96 horas se demostró que el número celular de epitelio alveolar humano A549 disminuye significativamente por el TGF- β 1 (5ng/ml) y DHEA 100 μ M un 6.4% y 4.82% respectivamente en comparación con el control (100%). Sin embargo, en concentraciones de DHEA menores a 50 μ M observamos que a las 96 horas no hay disminución en el número celular, razón por la cual serían elegibles para realizar pruebas posteriores. Los controles de etanol 0.5% no presentaron algún efecto citotóxico en A549, por lo cual concluimos que no afectan nuestros resultados (Tablas 6,7 y Figura 8).

Experimentos previos en el laboratorio demostraron que la DHEA 100 μ M es capaz de inducir apoptosis en cultivos de fibroblastos pulmonares humanos, por lo cual se decidió partir de este rango de concentraciones para evaluar el efecto de la hormona en cultivos de células epiteliales humanas A549 (Mendoza *et al.*, 2012). Lo primero que se hizo fue la curva de DHEA por medio de diluciones seriadas utilizando como diluyente Etanol al 96%; se evaluó el efecto de DHEA en concentraciones de 0.7812, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 μ M, y se utilizó TGF- β 1 (5ng/ml) como inductor de la TEM. Por medio citometría de flujo y Anexina V/ Ioduro de propidio para evaluar apoptosis, se demostró que el TGF- β 1 (5ng/ml) y la DHEA (100 μ M) inducen apoptosis de manera significativa a cultivos de epitelio alveolar humano A549 a las 48 horas, concentraciones de DHEA 0.7812, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 μ M inducen una tasa de apoptosis baja, es decir, similar a la apoptosis basal, siendo éstas concentraciones las candidatas a ser utilizadas para las pruebas posteriores. Analizando el ensayo a las 96 horas se observó que el TGF- β 1 (5ng/ml) no produce apoptosis de

manera similar a lo observado a las 48 horas cuando se compara con respecto al control sin tratamiento (48 horas: 7.2 ± 2.4 v.s. 16.2 ± 3.2 % y 96 horas: 37.9 ± 6.0 v.s. 21.5 ± 5.1 %). La ausencia del efecto observada en este modelo puede deberse a que no se renovaron los estímulos con TGF- β 1, como lo demuestran los estudios realizados por el autor Ferrari Giovanni en células de endotelio capilar bovino (BCE) y endotelio de vena umbilical (HUVEC) estimuladas con TGF- β 1 (1ng/ml), en dichos estudios. Los autores encuentran que esta citocina induce apoptosis "in vitro" a partir de las 6 horas, sin embargo, observaron que el efecto de la citocina se pierde a lo largo del tiempo, por lo cual renovaron el estímulo con TGF- β 1 cada 24 horas (Ferrari *et al.*, 2009). Otros estudios realizados por Jennifer Leight con TGF- β 1 (2ng/ml) en células epiteliales de glándula mamaria de ratón (NMuMG) y células epiteliales de riñón de perro (MDCK) demuestran que ésta citocina induce apoptosis "in vitro", TEM (medida a través del aumento de E-Caderina y disminución de α -SMA) y disminución en el número celular (Leight *et al.*, 2012), siendo éste un efecto que también se encontró en este modelo, tal y como ya se mencionó.

La DHEA a concentraciones de 12.5, 25 y 50 μ M induce una disminución significativa de la apoptosis (15.64%, 17.97% y 22.6% respectivamente) cuando se compara con el control sin tratamiento, por lo cual se decidió utilizar éstas concentraciones para los experimentos posteriores encaminados a determinar el efecto sobre la TEM inducida por TGF- β 1 (Tablas 4,5 y Figura 9). Estudios realizados por Lazaridis Lakovos utilizando DHEA (10 μ M) demuestran que esta hormona induce un efecto antiapoptótico en células del Feocromocitoma de médula adrenal de rata (PC12) y células de riñón de embrión humano (HEK293) (Lazaridis *et al.*, 2011). Por lo tanto, los efectos de DHEA en cuanto a la apoptosis de A549 a partir de las 48 y hasta las 96 horas se explicarían como un efecto antiapoptótico que se presenta sólo en concentraciones $\leq 50 \mu$ M.

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por los autores mencionados, en el sentido de que el TGF- β 1 (5ng/ml) induce la disminución del número celular, en nuestro caso, en células provenientes del epitelio alveolar humano A549 a las 48 y 96 horas. En cuanto a la DHEA, concentraciones $\leq 50 \mu$ M son óptimas para ser usadas en A549 debido a que presentan baja tasa de apoptosis y no alteran el número celular.

Con el propósito de evaluar si las concentraciones DHEA $\leq 50 \mu$ M tienen efecto sobre la proliferación celular medida por incorporación de BrdU, se eligieron 12.5, 25 y 50 μ M de DHEA y se evaluaron bajo las siguientes condiciones: control sin tratamiento, TGF - β 1 (5ng/ml), DHEA (12.5, 25 y 50 μ M) y TGF- β 1 (5ng/ml) simultáneamente con DHEA (12.5, 25 y 50 μ M). Nuestros resultados demuestran un aumento significativo de la proliferación medido a las 24 horas al utilizar concentraciones de DHEA 25 y 50 μ M y TGF- β 1 (5ng/ml) dando un promedio de 7.72% mayor al control (100%), todos los demás estímulos mantienen valores similares al control (100%) a las 24 horas. Con éste mismo ensayo de proliferación realizado a las 48 horas se demostró que todas las condiciones mantienen la proliferación en niveles similares al control (100%). (Tablas 8, 9 y Figura 10).

El aumento de la proliferación celular de A549 es directamente proporcional al aumento de la concentración de DHEA a las 24 horas, pero, a las 48 horas la proliferación celular se mantiene constante a cualquier concentración de DHEA. En cuanto al TGF- β 1 (5ng/ml), observamos un aumento en la proliferación medida por incorporación de BrdU, pero disminución en el número celular medida por WST1. Las células A549 tratadas con Etanol al 0.5% no muestran cambios en la proliferación con respecto al control.

Con base a los resultados obtenidos sobre la proliferación de A549 y tomando en cuenta que la cantidad de BrdU unida al DNA se relaciona a su duplicación celular (Figura 7), se puede afirmar que la DHEA 12.5, 25 μ M no afectan la proliferación de A549 y que TGF- β 1 (5ng/ml) aumenta esta proliferación, pero, lo más notable es que la concentración de DHEA que más aumenta la proliferación es la de 50 μ M. El TGF- β 1 a pesar de provocar la disminución del número celular y aumentar la apoptosis, paradójicamente también aumenta la proliferación. Aparentemente, la primera respuesta de las células epiteliales normales a la citocina, es la muerte, después de lo cual comienza el proceso de TEM que genera células mesenquimatosas, mismas que probablemente tengan una mayor tasa de proliferación, lo cual explicaría los datos obtenidos.

Los ensayos para evaluar la TEM se realizaron a los 5 días (re-estimulando a los 3 días) y a concentraciones de 25 y 50 μ M de DHEA. Estas concentraciones se eligieron debido a que no modifican el número celular, la proliferación ni la apoptosis a los tiempos más largos a los que se evaluaron (96 y 48 horas)

Con el propósito de evaluar la TEM, se realizaron ensayos de *Western Blot* para E-Caderina y α -SMA utilizando extractos totales de proteína de células A549 estimuladas bajo las siguientes condiciones: Control sin tratamiento, TGF- β 1 (5ng/ml), DHEA 25 μ M y TGF- β 1 (5ng/ml) con DHEA 25 μ M estimulados por 5 días con re - estímulo al tercer día. Nuestros resultados indican que el TGF- β 1 (5ng/ml) induce la disminución de E-Caderina, mientras que la DHEA 25 μ M los aumenta con respecto al control, sin embargo, esta concentración no revierte el efecto de TGF- β 1 (Figura 11), es decir no es capaz de inhibir la TEM. Considerando que la DHEA 25 μ M no tuvo ningún efecto sobre la TEM, se tomó la decisión de evaluar 50 μ M de DHEA. Nuestros datos indican que la DHEA sí revierte la TEM (evaluada por aumento de E-Caderina) inducida por TGF- β 1 (Figura No. 15). Simultáneamente a la disminución de E-Caderina, durante la TEM se observa aumento de α - SMA., la DHEA 50 μ M es capaz de revertir este fenómeno (Figura 12). Por lo tanto, la concentración 50 μ M de DHEA es adecuada para inhibir la TEM. Los resultados obtenidos en cuanto al efecto de TGF- β 1 sobre la TEM en células epiteliales, concuerda con lo observado por Jennifer Leight y Kim J. H. (Kim *et al.*, 2007; Leight *et al.*, 2012)

Los efectos de la DHEA sobre la TEM, también fueron medidos por expresión génica de E-Caderina y α - SMA. Los resultados obtenidos por PCR en Tiempo Real concuerdan con lo observado por Western Blot: la expresión de E-Caderina disminuye por acción de TGF- β 1 y aumenta por acción de DHEA 50 μ M con respecto al control sin tratamiento; cuando ambos estímulos se colocan al

mismo tiempo la expresión de E-Caderina se restaura casi hasta el nivel del control sin tratamiento. Por otra parte, la expresión de α -SMA aumenta por acción de TGF- β 1 pero disminuye por acción de DHEA 50 μ M con respecto al control sin tratamiento; cuando ambos estímulos se colocan al mismo tiempo se ve contrarrestado el efecto de TGF- β 1, disminuyendo a niveles cercanos al control sin tratamiento (Tablas 10, 11 y Figura 14). Con base a estos resultados se confirma que la DHEA 50 μ M muestra un efecto antifibrosante en A549 medido por la expresión de E-Caderina y α -SMA. Aunque, desconocemos la ruta a través de la cual la DHEA inhibe el efecto de TGF- β 1, podríamos suponer, éste probablemente sea directamente sobre la señalización del TGF- β 1, ya sea la vía canónica o la no canónica relacionadas con la TEM (Figura 4).

Finalmente, con el propósito de corroborar nuestras observaciones, se realizó IF para α -SMA en células A549. El TGF- β 1 aumenta la cantidad de α -SMA mientras que DHEA 50 μ M la disminuye; la DHEA en conjunto con TGF - β 1 revierte la acción de la citocina, inhibiendo el aumento de α -SMA que se observa normalmente en respuesta a TGF- β 1.

El efecto que TGF- β 1 (5ng/ml) genera en A549 sobre E-Caderina podría estar involucrado según el autor Quingsong Xu con la vía Wnt-Frizzled debido a que TGF- β 1 vía canónica se une a sus receptores T β RII y T β RI promoviendo la fosforilación de Smad2/3, aquí Smad4 funcionaría como ayudante de Smad2/3 fosforiladas para viajar al núcleo y fungir como factor de transcripción promoviendo la TEM, pero, si el complejo receptor ligando Wnt/Frizzled/LRP (no activado ubiquitina - proteosoma la β -catenina) se activa Smad2/3 toma la β -catenina que está unida a P120 (proteína de anclaje de E - Caderina) llevándola al núcleo para servir como factor de transcripción y a su vez logra que se pierda la adhesión homofilica célula - célula entre E-Caderinas llevando a un desarreglo en los tejidos que contienen estas células promoviendo la TEM (Xu *et al.*, 2012). (Figura 15).

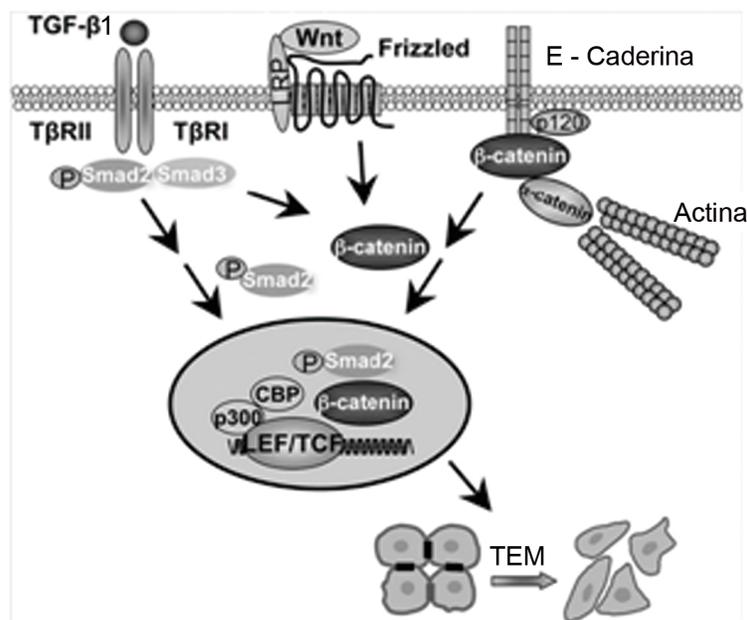


Figura 15. Modificado de (23) vía Wnt - Frizzled de TGF - β 1 para E - Caderina

El efecto que TGF- β 1 (5ng/ml) genera en A549 sobre α -SMA podría estar involucrado según el autor Nathan Sandbo con la propuesta de un modelo trifásico del mecanismo de la expresión de α -SMA por acción de TGF- β 1 en la cual TGF- β 1 vía canónica estimula la expresión de moléculas señalizadoras (no se sabe cuáles) Smad dependientes que activaran a Rho induciendo la formación de fibras de estrés que promueven la acumulación nuclear de MKL₁ y SRF de transcripción dependiente de α -SMA cuya acción será la formación de α -SMA que a su vez promoverá la formación de más α -SMA (Sandbo *et al.*, 2011). (Figura 16)

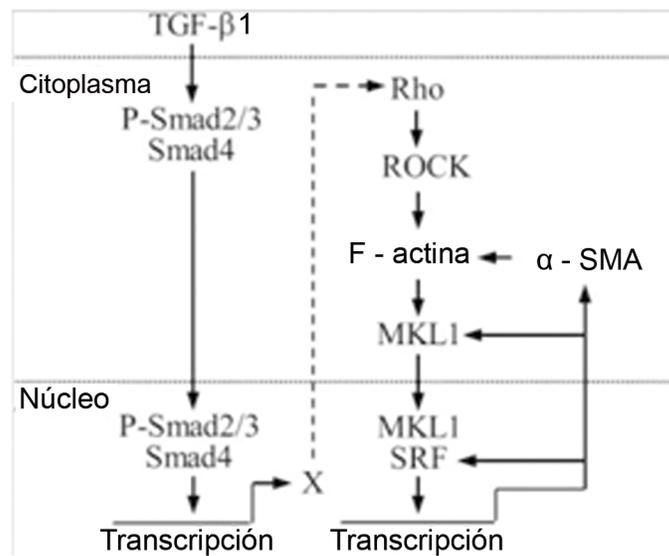


Figura 16. Modificado de (24) vía de TGF - β 1 para α - SMA.

CONCLUSIONES

La DHEA presenta efectos antiapoptóticos a concentraciones \leq de $50\mu\text{M}$ y aumenta la proliferación y el número celular en células de epitelio alveolar humano A549.

El TGF- β 1 disminuye la viabilidad celular e induce apoptosis, proliferación y TEM evaluada por la disminución en la expresión de E-Caderina y aumento en la expresión de α -SMA en células de epitelio alveolar humano A549 a los 5 días con un re estímulo al tercer día.

La DHEA a concentración $50\mu\text{M}$ inhibe la TEM inducida por TGF- β 1 en células de epitelio alveolar humano A549, provocando la disminución en la expresión de α -SMA y propiciando el aumento en la expresión de E-Caderina.

REFERENCIAS

1. Aldred, S. and Mecocci, P. 2010. Decreased dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) concentrations in plasma of Alzheimer's disease (AD) patients. *Arch.Gerontol.Geriatr.*, 51: e16-e18.
2. Aoki, K., Nakajima, A., Mukasa, K., Osawa, E., Mori, Y. and Sekihara, H. 2003. Prevention of diabetes, hepatic injury, and colon cancer with dehydroepiandrosterone. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 85: 469-472.
3. Arlt, W. 2004. Dehydroepiandrosterone and ageing. *Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab*, 18: 363-380.
4. Arnold, J.T., Gray, N.E., Jacobowitz, K., Viswanathan, L., Cheung, P.W., McFann, K.K., Le, H. and Blackman, M.R. 2008. Human prostate stromal cells stimulate increased PSA production in DHEA-treated prostate cancer epithelial cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 111: 240-246.
5. Bariety, J., Bruneval, P., Hill, G., Irinopoulou, T., Mandet, C. and Meyrier, A. 2001. Posttransplantation relapse of FSGS is characterized by glomerular epithelial cell transdifferentiation. *J.Am.Soc.Nephrol.*, 12: 261-274.
6. Burks, T.N. and Cohn, R.D. 2011. Role of TGF-beta signaling in inherited and acquired myopathies. *Skelet.Muscle*, 1: 19.
7. Cowin, P. and Burke, B. 1996. Cytoskeleton-membrane interactions. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 8: 56-65.
8. Ebeling, P. and Koivisto, V.A. 1994. Physiological importance of dehydroepiandrosterone. *Lancet*, 343: 1479-1481.
9. Ferrari, G., Cook, B.D., Terushkin, V., Pintucci, G. and Mignatti, P. 2009. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *J.Cell Physiol*, 219: 449-458.
10. Kim, J.H., Jang, Y.S., Eom, K.S., Hwang, Y.I., Kang, H.R., Jang, S.H., Kim, C.H., Park, Y.B., Lee, M.G., Hyun, I.G., Jung, K.S. and Kim, D.G. 2007. Transforming growth factor beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition of A549 cells. *J.Korean Med.Sci.*, 22: 898-904.
11. Kolesnichenko, M. and Vogt, P.K. 2011. Understanding PLZF: two transcriptional targets, REDD1 and smooth muscle alpha-actin, define new questions in growth control, senescence, self-renewal and tumor suppression. *Cell Cycle*, 10: 771-775.
12. Lazaridis, I., Charalampopoulos, I., Alexaki, V.I., Avlonitis, N., Pediaditakis, I., Efstathopoulos, P., Calogeropoulou, T., Castanas, E. and Gravanis, A. 2011. Neurosteroid dehydroepiandrosterone interacts with nerve growth factor (NGF) receptors, preventing neuronal apoptosis. *PLoS.Biol.*, 9: e1001051.
13. Legrain, S. and Girard, L. 2003. Pharmacology and therapeutic effects of dehydroepiandrosterone in older subjects. *Drugs Aging*, 20: 949-967.
14. Leight, J.L., Wozniak, M.A., Chen, S., Lynch, M.L. and Chen, C.S. 2012. Matrix rigidity regulates a switch between TGF-beta1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Mol.Biol.Cell*, 23: 781-791.

15. Li, L., Bennett, S.A. and Wang, L. 2012. Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adh.Migr.*, 6: 59-70.
16. Lofdahl, M., Kaarteenaho, R., Lappi-Blanco, E., Tornling, G. and Skold, M.C. 2011. Tenascin-C and alpha-smooth muscle actin positive cells are increased in the large airways in patients with COPD. *Respir.Res.*, 12: 48.
17. Mendoza, C., Jimenez, A.V., Rangel, C., Lozano, A., Morales, V., Becerril, C., Chavira, R., Ruiz, V., Barrera, L., Montano, M., Pardo, A. and Selman, M. 2012. DHEA has strong antifibrotic effects and is decreased in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur.Respir.J.*
18. Pardo, A. and Selman, M. 2002a. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 34: 1534-1538.
19. Pardo, A. and Selman, M. 2002b. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Biosci.*, 7: d1743-d1761.
20. Regelson, W., Loria, R. and Kalimi, M. 1988. 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.
21. Sandbo, N., Lau, A., Kach, J., Ngam, C., Yau, D. and Dulin, N.O. 2011. Delayed stress fiber formation mediates pulmonary myofibroblast differentiation in response to TGF-beta. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, 301: L656-L666.
22. Selman, M. and Pardo, A. 2002. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir.Res.*, 3: 3.
23. Xu, Q., Isaji, T., Lu, Y., Gu, W., Kondo, M., Fukuda, T., Du, Y. and Gu, J. 2012. Roles of N-acetylglucosaminyltransferase III in epithelial-to-mesenchymal transition induced by transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) in epithelial cell lines. *J.Biol.Chem.*, 287: 16563-16574.
24. Yoshida, S., Honda, A., Matsuzaki, Y., Fukushima, S., Tanaka, N., Takagiwa, A., Fujimoto, Y., Miyazaki, H. and Salen, G. 2003. Anti-proliferative action of endogenous dehydroepiandrosterone metabolites on human cancer cell lines. *Steroids*, 68: 73-83.

ANEXO

A) Apoptosis

Tabla 4. Análisis estadístico de la apoptosis en células A549 estimuladas durante 48 horas con TGF- β 1 o DHEA. Se muestran la D.E, ANOVA One-way y Prueba de Dunnett. Software STATISTICA V.8.

Estímulos	% Apoptosis	D. E.	Prueba de Dunnett (M<>Control) p < 0.05
Sts (1 μ M)	30.6	2.26	-
Control	7.2	2.43	-
TGF- β 1 (5ng/ml)	16.2	3.18	0.045
DHEA 0.78 μ M	8.2	4.41	1.000
DHEA 1.56 μ M	8.9	4.79	0.998
DHEA 3.12 μ M	14.6	7.14	0.573
DHEA 6.25 μ M	12.4	3.61	0.406
DHEA 12.5 μ M	8.7	5.44	0.999
DHEA 25 μ M	11.3	5.4	0.756
DHEA 50 μ M	7.9	1.09	1.000
DHEA 100 μ M	25.3	3.13	0.000
ANOVA p < 0.05			
Datos	SS	Grados de Libertad	P
Intercepción	6028.083	1	0.000000
Variable Independiente	1136.244	9	0.000071
Error	770.332	35	

Tabla 5. Análisis estadístico de la apoptosis en células A549 estimuladas durante 96 horas con TGF- β 1 o DHEA. Se muestran la D.E, ANOVA One-way y Prueba de Dunnett. Software STATISTICA V.8.

Estímulos	% Apoptosis	D. E.	Prueba de Dunnett (M<>Control) p < 0.05
Sts (1μM)	52.55	8.27	-
Control	37.87	6.04	-
TGF-β1 (5ng/ml)	21.53	5.13	0.0007
DHEA 0.78μM	30.73	3.54	0.2484
DHEA 1.56μM	33.77	6.95	0.7864
DHEA 3.12μM	32.28	2.69	0.4205
DHEA 6.25μM	39.93	2.99	0.9941
DHEA 12.5μM	22.23	2.53	0.0006
DHEA 25μM	19.90	4.81	0.0002
DHEA 50μM	15.27	4.02	0.0000
DHEA 100μM	30.9	1.44	0.2694
ANOVA p < 0.05			
Datos	SS	Grados de Libertad	P
Intercepción	25542.11	1	0.000000
Variable Independiente	1877.6	9	0.000002
Error	388.88	22	

B) Número celular

Tabla 6. Análisis estadístico del número celular en células A549 estimuladas durante 48 horas con TGF- β 1 o DHEA. Se muestran la D.E, ANOVA One-way y Prueba de Dunnett. Software STATISTICA V.8.

Estímulos	% Número celular	D. E.	Prueba de Dunnett (M<>Control) p < 0.05
Control	100	1X10 ⁻¹⁴	-
EtOH (0.5%)	98.46	2.83	1.000
TGF- β 1 (5ng/ml)	84.01	3.78	0.002
DHEA 0.78 μ M	97.97	2.06	0.998
DHEA 1.56 μ M	96.3	2.24	0.917
DHEA 3.12 μ M	92.3	7.62	0.212
DHEA 6.25 μ M	92.04	5.2	0.184
DHEA 12.5 μ M	85.44	4.93	0.005
DHEA 25 μ M	83.67	4.92	0.002
DHEA 50 μ M	93.42	5.55	0.430
DHEA 100 μ M	76.91	3.64	0.000
ANOVA p < 0.05			
Datos	SS	Grados de Libertad	P
Intercepción	286007.7	1	0.000000
Variable Independiente	1665.4	10	0.000017
Error	503.6	35	

Tabla 7. Análisis estadístico del número celular en células A549 estimuladas durante 96 horas con TGF- β 1 o DHEA. Se muestran la D.E, ANOVA One-way y Prueba de Dunnett. Software STATISTICA V.8.

Estímulos	% Número celular	D. E.	Prueba de Dunnett (M<>Control) p < 0.05
Control	100	8.9X10 ⁻¹⁵	-
EtOH (0.5%)	97.96	2.8	0.954
TGF- β 1 (5ng/ml)	93.6	6.65	0.003
DHEA 0.78 μ M	97.75	3.72	0.922
DHEA 1.56 μ M	99.74	3.18	1.000
DHEA 3.12 μ M	101.07	0.44	1.000
DHEA 6.25 μ M	96.99	5.59	0.722
DHEA 12.5 μ M	97.43	0.67	0.852
DHEA 25 μ M	98.56	1.96	0.995
DHEA 50 μ M	99.81	1.13	1.000
DHEA 100 μ M	95.18	6.1	0.039
ANOVA p < 0.05			
Datos	SS	Grados de Libertad	P
Intercepción	326404.8	1	0.000000
Variable Independiente	272.3	10	0.008751
Error	201.2	24	

C) Proliferación celular

Tabla 8. Análisis estadístico de la proliferación celular en células A549 estimuladas durante 24 horas con TGF- β 1 o DHEA. Se muestran la D.E, ANOVA One-way y Prueba de Dunnett. Software STATISTICA V.8.

Estímulos	% Proliferación	D. E.	Prueba de Dunnett (M>Control) p < 0.05
Control	100	11.82	-
EtOH (0.5%)	96.92	8.49	0.959
TGF- β 1 (5ng/ml)	115.39	0.62	0.713
DHEA 12.5 μ M	92.19	12.41	0.949
TGF- β 1 (5ng/mL)/DHEA 12.5 μ M	100.88	7.46	0.907
DHEA 25 μ M	92.38	0.83	0.983
TGF- β 1 (5ng/mL)/DHEA 25 μ M	123.30	40.81	0.043
DHEA 50 μ M	111.28	6.01	0.638
TGF- β 1 (5ng/mL)/DHEA 50 μ M	140.58	15.12	0.049
ANOVA p < 0.05			
Datos	SS	Grados de Libertad	P
Intercepción	340467.5	1	0.000000
Variable Independiente	19764.5	8	0.019208
Error	13893.1	18	

Tabla 9. Análisis estadístico de la proliferación celular en células A549 estimuladas durante 48 horas con TGF- β 1 o DHEA. Se muestran la D.E, ANOVA One-way y Prueba de Dunnett. Software STATISTICA V.8.

Estímulos	% Proliferación	D. E.	Prueba de Dunnett (M>Control) p < 0.05
Control	100	8.62	-
EtOH (0.5%)	94.72	6.04	0.988
TGF- β 1 (5ng/ml)	72.87	0.72	0.996
DHEA 12.5 μ M	84.35	3.74	0.996
TGF- β 1 (5ng/mL)/DHEA 12.5 μ M	72.05	3.59	1.000
DHEA 25 μ M	81.3	1.72	0.998
TGF- β 1 (5ng/mL)/DHEA 25 μ M	75.1	6.47	1.000
DHEA 50 μ M	89.02	8.62	0.959
TGF- β 1 (5ng/mL)/DHEA 50 μ M	73.24	1.95	0.999
ANOVA p < 0.05			
Datos	SS	Grados de Libertad	P
Intercepción	163112.1	1	0.0000000
Variable Independiente	1100.8	8	0.565063
Error	2876.9	18	

D) PCR en Tiempo Real

Tabla 10. Análisis estadístico de la expresión de E-Caderina en células A549 estimuladas durante 5 días con TGF- β 1 o DHEA. Se muestran la D.E, ANOVA One-way y Prueba de Dunnett. Software STATISTICA V.8.

Estímulos	PROMEDIO $2^{\Delta\Delta CT}$	D. E.	Prueba de Dunnett (M<Control) p < 0.05
Control	2085.80	436.37	-
TGF- β 1 (5ng/mL)	696.38	390.37	0.042
DHEA 50 μ M	1891.69	154.27	0.466
TGF- β 1 (5ng/mL)/DHEA 50 μ M	1149.41	67.56	0.206
ANOVA p < 0.05			
Datos	SS	Grados de Libertad	P
Intercepción	36703392	1	0.000008
Variable Independiente	2557518	3	0.149686
Error	2915177	8	

Tabla 11. Análisis estadístico de la expresión de α -SMA en células A549 estimuladas durante 5 días con TGF- β 1 o DHEA. Se muestran la D.E, ANOVA One-way y Prueba de Dunnett. Software STATISTICA V.8.

Estímulos	PROMEDIO $2^{\Delta\Delta CT}$	D. E.	Prueba de Dunnett (M<Control) p < 0.05
Control	3.07	1.55	-
TGF- β 1 (5ng/mL)	4.93	4.89	0.908
DHEA 50 μ M	1.65	0.62	0.666
TGF- β 1 (5ng/mL)/DHEA 50 μ M	2.52	0.93	0.905
ANOVA p < 0.05			
Datos	SS	Grados de Libertad	P
Intercepción	98.73354	1	0.003681
Variable Independiente	6.29005	3	0.791528
Error	48.14022	8	