



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**“Efecto de los esteroides (DHEA, DHEA-S,  
testosterona y estradiol) en la proliferación de  
las células de cáncer de mama MCF-7”**

**T E S I S**  
**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**B I O L O G O**  
**P R E S E N T A :**  
**VICTORIA GAYOSSO TÉLLEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE**

**ASESOR INTERNO: M. en ISBH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ**



**Lo Humano Eje  
de Nuestra Reflexión**

**MÉXICO, D.F.**

**2004**



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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular del **Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"** bajo la dirección de

**Dra. Rebeca López Marure**



**Al Todo Poderoso ...**

## DEDICATORIA

- ♣ A mis padres que son lo más sagrado de mi existencia y a quienes amo profundamente.
- ♣ A todos y cada uno de mis hermanos, y especialmente a mi hermana Soco, ya que de no ser por su valiosa ayuda este trabajo simplemente no existiría, y a quien le estoy y estaré eternamente agradecida por todo.
- ♣ A Beto V. R. un ser humano extraordinario que siempre estuvo conmigo brindándome su apoyo de manera incondicional y a quien yo no podré pagar con nada lo que ha hecho por mi.
- ♣ A mis estimados compañeros Yadira, Lot, Gladys, Estela, Cesar, Ricardo, Alberto y de quienes omito sus nombres porque no puedo mencionarlos a todos pero con quienes viví momentos gratos durante la carrera.

## AGRADECIMIENTOS

- ♣ A la Dra. Rebeca López Marure por permitirme realizar el presente trabajo bajo su dirección, pero sobre todo por su valiosa amistad y porque es un gran ser humano.
- ♣ Al M. en C. Luis Sánchez por darme la oportunidad de entrar al fascinante y enigmático mundo de la Ciencia.
- ♣ A Gis y a Fer porque siempre tuvieron tiempo para mí, pero sobre todo mucha paciencia y porque saben ser excelentes amigos y a quienes estimo de verdad.
- ♣ Mi agradecimiento a los sinodales por sus valiosas sugerencias y observaciones para el mejoramiento de esta tesis.

**PRESIDENTE**  
**VOCAL**  
**SECRETARIO**  
**SUPLENTE**  
**SUPLENTE**

**DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRAN**  
**DRA. REBECA LÓPEZ MARURE**  
**M. en IBSh. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ**  
**M. en B.E. ENRIQUE MENDIETA MÁRQUEZ**  
**DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**

- ♣ Agradezco la valiosa colaboración del M. en C. José Luis Ventura del Instituto de Fisiología. UNAM, para la realización del ensayo de la PARP asimismo la del M. en C. Armando Cervantes de la FES-Zaragoza. UNAM, por el análisis estadístico realizado a los ensayos del presente trabajo.

# INDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>EL CÁNCER DE MAMA EN MÉXICO</b>	2
<b>TRATAMIENTOS PAR EL CÁNCER DE MAMA</b>	4
<b>LA DHEA Y EL CÁNCER</b>	5
<b>CARACTERISTICAS DE LA LINEA CELULAR MCF-7</b>	9
<b>HORMONAS</b>	10
- Tipos de hormonas	11
- Transporte de hormonas	14
- Mecanismo de acción hormonal	15
- Metabolismo hormonal	17
- Las glándulas suprarrenales	17
- Síntesis de hormonas esteroides suprarrenales	18
- Andrógenos adrenales	22
<b>EFFECTOS BIOLÓGICOS DE ANDRÓGENOS Y ESTRÓGENOS</b>	24
- Efectos biológicos de la DHEA y de la DHEA-S	24
- Efectos biológico de la Testosterona	24
- Efectos biológicos de los Estrógenos	25
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	27
<b>HIPÓTESIS</b>	28
<b>OBJETIVOS</b>	29
- Objetivo general	29
- Objetivos particulares	29
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	31
- Cultivo Celular	31
- Proliferación celular	31
- Incorporación de timidita tritiada	32

## **Viabilidad celular y actividad metabólica de las células por la reducción de MTT**

- Exclusión de azul de tripano	33
- Reducción de MTT	35
<b>Muerte celular o apoptosis</b>	36
- Fragmentación de PARP	36
- Fragmentación del ADN	38
<b>Análisis estadístico</b>	39
<b>RESULTADOS</b>	40
<b>DISCUSIÓN</b>	54
<b>CONCLUSIONES</b>	59
<b>REFERENCIAS</b>	60
<b>APÉNDICE</b>	67

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEA-S	Sulfato de Dehidroepiandrosterona
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
RPMI	Medio de cultivo
SFB	Suero Fetal Bovino
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
$\mu\text{Ci}$	micro-Curies
$\mu\text{l}$	micro-litros
$\mu\text{g}$	micro-gramos
$\mu\text{M}$	micro-molar
$\text{nM}$	nano-molar
ml	mililitro
nm	nanometros (medida longitud de onda)
rpm	revoluciones por minuto

## RESUMEN

La dehidroepiandrosterona (DHEA) es una hormona adrenal que se deriva del colesterol y puede ser metabolizada a estrógenos (estradiol) o andrógenos (testosterona). Estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que la DHEA, ejerce un efecto protector en contra de varias enfermedades, entre ellas el cáncer de mama humano. Se ha demostrado que la DHEA afecta la proliferación de las células de cáncer de mama MCF-7, ya sea inhibiéndola o estimulándola; sin embargo, existe mucha controversia en cuanto a estos resultados.

Por lo que en este trabajo se evaluó el efecto de la DHEA y dos de sus derivados (estradiol y testosterona), en la proliferación de las células MCF-7. Así mismo, se determinó si el efecto inhibitorio de la DHEA se asociaba a una disminución de la viabilidad y la muerte celular.

La proliferación celular fue medida por medio de la incorporación del colorante cristal violeta; la viabilidad celular, por medio de la reducción de [(bromuro de 3(4,5-dimetildiazoil-2-il)-2,5 difeniltriazolium] (MTT); y la muerte celular por medio de la fragmentación del ADN y por el rompimiento del enzima Poly-ADP-ribosa polimerasa (PARP) mediante la activación de la caspasa-3.

Nuestros resultados mostraron que la DHEA inhibió la proliferación celular a una concentración de 25  $\mu\text{M}$ , pero la estimuló a concentraciones nanomolares (nM). Esto sugiere que posiblemente se presente un fenómeno similar a lo ocurrido *in vivo*, en donde concentraciones altas en el plasma sanguíneo protegen contra el cáncer y bajas concentraciones lo favorecen. La DHEA-S no afectó la proliferación a ninguna de las concentraciones utilizadas, lo que sugiere que en estas células sólo sirve como un reservorio. La testosterona inhibió débilmente la proliferación a partir de 1  $\mu\text{M}$  y el estradiol la estimuló a concentraciones nanomolares (nM); sin embargo, el efecto de ambas no mimetizó el efecto antiproliferativo de la DHEA sugiriendo que ésta no se convierte a testosterona o a estradiol para producir su efecto. La DHEA disminuyó la viabilidad celular e indujo la degradación del ADN sin fragmentar a la PARP, lo que posiblemente sugiere inducción de muerte celular tardía independiente de la activación de la caspasa-3.

# INTRODUCCIÓN

## EL CÁNCER DE MAMA EN MÉXICO

El cáncer en general se presenta actualmente como la segunda causa de muerte en nuestro país y aproximadamente el 6% de las defunciones por cáncer corresponden al mamario, ocupando éste el sexto lugar dentro de las causas de muerte por cáncer, se considera hoy que en el año 2010 habrá una tasa de mortalidad de trece por cada 100,000 mujeres adultas y cerca de 4500 defunciones al año por esta causa en México (López-Ríos et al, 1997).

En el país, cada 2 horas y media muere una mujer por esta enfermedad, es decir, se registran 10 muertes diarias por cáncer de mama. En el mundo se presentan alrededor de 570,000 casos nuevos por año, y actualmente la American Cancer Society predice que una de cada 8 mujeres padecerá cáncer mamario durante su vida (López-Ríos et al 1997).

En las mujeres mexicanas se presenta a partir de los 25 años, siendo más frecuente entre los 40 a 55 años de edad, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS). Actualmente existe suficiente información epidemiológica que sustenta la asociación de varios factores de riesgo de cáncer de mama, en particular los relacionados con el comportamiento reproductivo tales como: la menarca (primera menstruación antes de los 12 años), primer embarazo después de los 30 años, la falta de lactancia materna, la nuliparidad y la menopausia después de los 52 años (Tovar, 1996). Generich en 1982 reportó que las tasas de mortalidad en las mujeres solteras, en

relación con las casadas, eran mucho más altas para la mortalidad por cáncer de mama que para otras causas de muerte.

Varios autores han descrito la evidencia de que la paridad y la lactancia tienen un efecto protector con respecto al cáncer de mama (Lazcano et al, 1982; Kelsey y Horn-Ross, 1993a; Kelsey et al, 1993b; Salve-Villedieu et al, 1995). Un factor de riesgo es el consumo de alcohol, que ha sido asociado con un incremento en la incidencia de cáncer de mama en mujeres que consumen por arriba de 2-5 bebidas alcohólicas por día (Smith-Warner et al, 1998). Yu en 1998, sugirió que el alcohol puede incrementar el riesgo de cáncer de mama, debido a que se elevan las concentraciones de estrógenos en el plasma, así como de factores de crecimiento relacionados con la proliferación celular. Por otra parte, la fuente primaria de estrógenos en mujeres postmenopáusicas, se derivan de la conversión de androstenediona a estrona en el tejido adiposo; por lo tanto, la obesidad postmenopáusica aumenta el riesgo de cáncer de mama por el incremento en la producción de estrógenos (Brian y Heather, 2000).

## Tratamientos para el cáncer de mama

La selección del tratamiento inicial para el cáncer de mama está basada en el alcance y agresividad de la enfermedad. Para los cánceres en etapas I, II y III, las principales consideraciones son tratar adecuadamente el cáncer y prevenir la recurrencia, ya sea en el lugar del tumor original (local) o en cualquier otra parte del cuerpo (metástasis).

Con frecuencia el tratamiento quirúrgico en el tumor, o mastectomía (parcial, total o radical con disección axilar) se hace necesario. También, se utiliza la terapia por radiación la cual va dirigida al tumor, en el seno, en la pared torácica o a otros tejidos que se conoce o se sospecha tengan células cancerosas malignas.

Mientras que el tratamiento sistémico consiste en quimioterapia y terapia hormonal (con tamoxifen), la cual al hacer circular drogas y hormonas por todo el cuerpo, se intenta eliminar las células del cáncer que puedan estar presentes en otras partes distantes del organismo.

La mayoría de las mujeres recibe una combinación de tratamientos. Para los tumores en etapa 0, el tratamiento estándar es la mastectomía o lumpectomía más radiación. Para los casos en etapas I y II, lo recomendado es lumpectomía más radiación o mastectomía con la disección de, por lo menos, un "ganglio centinela". Por lo común se agregan o quimioterapia o terapia hormonal. La presencia de tejido canceroso en los ganglios linfáticos axilares es muy

importante para la definición de la etapa del proceso, el tratamiento y seguimiento apropiados.

Medicamentos nuevos, llamados inhibidores de la aromatasas, han mostrado ser tan buenos o mejores que el tamoxifen en mujeres con cánceres en etapa IV. (<http://pcs.adam.com/ency/article/000913trt.htm>).

## LA DHEA Y EL CÁNCER

La aromatización de los andrógenos adrenales representa la mayor fuente de estrógenos en las mujeres después de la menopausia, los cuales pueden promover el desarrollo de tumores mamarios dependientes de hormonas (Maggiolini et al, 2001). La conversión de los esteroides C19 a estrógenos es catalizada por un complejo enzimático llamado aromatasa, el cual está presente en células de la granulosa del ovario (McNatty et al, 1979), en las células de Leydig del testículo (Brodie e Inkster, 1993), en la placenta (Gadsby et al, 1980), en el tejido adiposo (Ackerman et al, 1981), en el cerebro (Steckelson et al, 1999), en la piel (Simpson et al, 1997), en el tejido endometrial y en el tejido de cáncer mamario (Sasano y Harada, 1998).

Estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que la dehidroepiandrosterona (DHEA), hormona presente en mujeres pre-menopáusicas y postmenopáusicas, ejerce un efecto protector en contra del cáncer de mama (Di Monaco et al, 1997).

Otros estudios demuestran que la concentración de los andrógenos adrenales son bajos en un grupo de mujeres con un alto riesgo de cáncer de mama (Wang et al, 1975; Wang et al, 1979; Gomes et al, 1988). Zumoff et al (1981) confirman este descubrimiento para mujeres premenopáusicas y encuentran concentraciones supranormales de la dehidroepiandrosterona sulfatada (DHEA-S) plasmática en pacientes postmenopáusicas. Lo anterior puede ser explicado por la existencia de dos tipos de cánceres: uno asociado con las hormonas del ovario en el periodo

premenopáusico; y el otro, con el medio ambiente hormonal postmenopáusico (también llamado cáncer adrenal) (De Waard, et al 1977).

Najid y Habrioux (1990) revelaron que la concentración de la DHEA en mujeres que desarrollaron cáncer de mama son bajos, incluso nueve años antes del inicio o de la diagnosis de la enfermedad. También, estudios epidemiológicos en mujeres premenopáusicas muestran que las concentraciones de la DHEA y la DHEA-S en el plasma y orina están inversamente relacionados con el cáncer de mama (Di Monaco et al, 1997). Por otro lado, se ha sugerido que el efecto de la DHEA sobre el crecimiento de dicho padecimiento puede ser dependiente de la actividad hormonal; vía receptor de esteroides (SR), ya que la DHEA es metabolizada en el tejido mamario a 5-androstene-3  $\beta$ , 17  $\beta$ -diol (ADIOL), un compuesto con propiedades androgénicas y estrogénicas (Hackenberg et al, 1993). Por lo anterior, se ha sugerido que la actividad hormonal predominante de la DHEA es estimular el crecimiento celular vía receptor de estrógenos (ER) Najid y Habrioux, 1990; Pizzini et al, 1992), pero también se le ha atribuido un efecto antiproliferativo debido a los receptores de andrógenos (AR) (Hackenberg et al, 1993); este efecto antagonista puede ser explicado por la existencia de dos tipos de cáncer de mama humano (De Waard et al, 1977). Además, se ha demostrado que la DHEA ejerce numerosas actividades en condiciones fisiológicas y patológicas vía mecanismos no hormonales (Ebeling y Koivisto, 1994).

Por otro lado, Maggiolini et al (2001), sugieren que la DHEA puede ser un substrato para la biosíntesis del estradiol en las células de cáncer de mama MCF-7. Van Landeghem et al (1985), describieron que a bajas concentraciones (en el rango de aquellas establecidas en el tejido mamario), la DHEA solo modifica el crecimiento de las

células MCF-7 que responden a hormonas. Se ha demostrado que el crecimiento de las células MCF-7 es estimulado por la DHEA con un máximo efecto a  $10^{-4}$ M (Tanaka et al, 2000; Schmitt et al, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que la DHEA-S, estimula el crecimiento de las células MCF-7 (Billich et al, 2000; Andò et al, 2002); a pesar de que otros autores han sugerido que la DHEA-S no tiene efectos biológicos, posiblemente porque solo sirve como reservorio para la DHEA (Hayashi et al, 2000; Leowattana, 2001).

Por otro lado, varios autores han demostrado que la adición de la DHEA en la dieta de ratones, disminuye la incidencia de tumores mamarios espontáneos (Schwartz, 1979., Boccuzzi et al, 1992; Feo et al, 2000), y que tiene un efecto anticarcinogénico (Gordón et al, 1981). También se ha reportado que la DHEA tiene algunos efectos benéficos, además del cáncer de mama, en una amplia variedad de enfermedades tales como: la obesidad, la diabetes, los desórdenes inmunes y la aterosclerosis (Regelson et al, 1990; Schwartz et al, 1986; Watson et al, 1996; Bauleiu, 1996). Sin embargo, el papel de la DHEA en el cáncer de mama humano ha sido tema de debate por años, ya que los mecanismos por medio de los cuales ésta ejerce protección no se saben con exactitud.

Las células MCF-7 constituyen un excelente modelo experimental para evaluar el efecto de muchas moléculas sobre la proliferación celular, por lo que en este trabajo se determinó el efecto de la DHEA, la DHEA-S, la testosterona y el estradiol en la proliferación de la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

## CARACTERÍSTICAS DE LA LÍNEA CELULAR MCF-7

Las células MCF-7, son una línea celular derivada de un adenocarcinoma de mama humano, tienen receptores positivos a estrógenos (RE), los cuales pueden estimular el crecimiento de tumores mamarios dependientes de hormonas (Eisen y Weber, 1998), dichos tumores mantienen altas concentraciones de estrógenos en pacientes postmenopáusicas (Maggiolini et al 2001), debido a que algunos de estos tumores sintetizan estrógenos (Tanaka et al, 2000); estas células también expresan la actividad de la aromatasas (Najid y Habrioux 1990). Presentan ciertas características de un epitelio mamario diferenciado incluyendo la habilidad para procesar estradiol a través de receptores de estrógenos citoplasmáticos. El crecimiento de las células MCF-7 es inhibido por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Tomado de American Type Culture Collection (ATCC).

Estas células fueron obtenidas de una paciente con las siguientes características:

Edad de la paciente:	69 años
Propiedades de crecimiento:	Adherentes
Morfología:	Epitelial
Tejido:	Adenocarcinoma de glándula mamaria

## HORMONAS

En este trabajo, el tema que nos ocupa es el cáncer de mama y la relación que tiene con algunas hormonas esteroideas como son: DHEA, la DHEA-S, la testosterona y el estradiol; por lo que se hace necesario mencionar algunas características de las mismas.

La palabra hormona proviene del griego *hormon* que significa, agitar o excitar. Las hormonas son sustancias químicas producidas por una glándula endócrina que son liberadas al torrente sanguíneo y ejercen su acción en una célula blanco (Nelson et al, 2001).

Se sabe que las hormonas controlan el crecimiento de las células y los tejidos, los ritmos cardíacos, la presión sanguínea, la función renal, la movilidad del tubo gastrointestinal, la secreción de enzimas digestivas y de otras hormonas, la lactación y la actividad de los sistemas reproductores (Nelson et al, 2001).

## Tipos de hormonas

Existen varios tipos de hormonas que se diferencian por su estructura química.

Las hormonas **peptídicas** pueden tener entre tres y más de doscientos aminoácidos (aa). Incluyen las hormonas pancreáticas insulina, glucagón y somatostatina, además de las hormonas del hipotálamo y la hipófisis. Estas hormonas son sintetizadas en los ribosomas como proteínas precursoras más largas (prohormonas), que son empaquetadas en vesículas secretoras y escindidas por proteólisis para formar los péptidos activos.

Las hormonas del tipo **catecolaminas** derivan del aminoácido tirosina y son de baja masa molecular e incluyen las hormonas de la médula adrenal (adrenalina y noradrenalina) y las hormonas menos solubles del tiroides. Las catecolaminas sintetizadas en el cerebro y otros tejidos neurales actúan como neurotransmisores. Las catecolaminas están muy concentradas en el interior de vesículas de secreción, son liberadas por exocitosis y actúan a través de receptores de superficie para generar segundos mensajeros intracelulares. Están implicadas en una amplia variedad de respuestas fisiológicas frente al estrés agudo.

Las hormonas **eicosanoides** (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos) proceden del ácido araquidónico, un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos. Son sintetizadas cuando son necesarias a partir del araquidonato, que ha sido liberado enzimáticamente de los fosfolípidos de la membrana por la fosfolipasa A<sub>2</sub>. Las eicosanoides son secretadas en el fluido intersticial fuera de las células y actúan de

forma parácrina sobre las células vecinas. Las prostaglandinas estimulan la contracción del músculo liso, incluidos los del intestino y del útero. También están implicadas en el dolor y la inflamación en todos los tejidos. Los tromboxanos regulan la función de las plaquetas y, por lo tanto, la coagulación sanguínea. Los leucotrienos LTC<sub>4</sub> y LTD<sub>4</sub> estimulan la contracción del músculo liso en el intestino, las vías pulmonares y la tráquea, y son mediadores de la respuesta severa inmune llamada anafilaxia.

Las hormonas **esteroideas**, son liposolubles e incluyen las hormonas de la corteza adrenal (mineralocorticoides y glucocorticoides), las hormonas que se forman a partir de la vitamina D y las hormonas sexuales masculinas y femeninas (andrógenos y estrógenos). Las hormonas esteroideas son sintetizadas a partir del colesterol en varios tejidos endócrinos y son transportadas hasta sus células diana a través de la corriente sanguínea, unidas a proteínas transportadoras. Todas las hormonas esteroideas actúan por medio de receptores nucleares para cambiar el nivel de expresión de genes específicos. Los andrógenos (testosterona) y los estrógenos (estradiol) son sintetizados en los testículos, en los ovarios y en la corteza adrenal.

Los **retinoides** son potentes hormonas que regulan el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular por medio de receptores nucleares de los retinoides. La prohormona retinol es sintetizada principalmente en el hígado a partir de la vitamina A, y muchos tejidos convierten el retinol en la hormona ácido retinoico. Los retinoides actúan sobre todos los tejidos, pues todas las células tienen al menos un tipo de receptor de los retinoides.

Las hormonas **tiroideas** T<sub>4</sub> (tiroxina) y T<sub>3</sub> (triyodotironina) son sintetizadas en la glándula tiroidea a partir de la proteína precursora tiroglobulina. Dos residuos de tirosina de la tiroglobulina son yodados enzimáticamente y unidos covalentemente; T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub> son

liberadas a continuación por proteólisis. Estas hormonas estimulan el metabolismo energético, especialmente en el hígado y en el músculo.

El **óxido nítrico (NO)** es un radical libre relativamente estable sintetizado a partir de oxígeno molecular y del nitrógeno del grupo guanidino de la arginina en una reacción catalizada por la NO sintasa. Este enzima se encuentra en muchos tejidos y tipos celulares: neuronas, macrófagos y células del músculo liso entre otros. El NO actúa cerca de su lugar de liberación; penetra en la célula diana y activa el enzima citosólico guanilil ciclasa, que cataliza la formación del segundo mensajero guanina monofosfato cíclico (cGMP) (Nelson et al, 2001).

## Transporte de hormonas

Una vez que las hormonas son secretadas a la sangre, circulan por el plasma, ya sea como moléculas libres o unidas a proteínas transportadoras específicas; para las hormonas adrenales la proteína transportadora es fundamentalmente la transcortina, también llamada CBG (*Corticosteroide binding globulin*) y la albúmina. La transcortina es una  $\beta$ -globulina que tiene una gran afinidad por el cortisol y por los esteroides con grupos cetónicos en posición 21 y 3, y con doble enlace entre los carbonos 4 y 5, y transporta el 70 % del cortisol plasmático y aproximadamente el 10 % de la aldosterona. La albúmina tiene mucho menor afinidad por los esteroides, pero las concentraciones plasmáticas son muy superiores a la transcortina, por ello transporta el 20 % del cortisol y el 40 % de la aldosterona circundante. Estas sustancias transportadoras permiten la solubilización en el plasma de sustancias lipoides, ya que las hormonas unidas a una proteína transportadora no son biológicamente activas, pero tampoco son metabolizadas. Generalmente las hormonas peptídicas, proteicas y las catecolaminas circulan libres aunque hay excepciones (Tresguerres, 1999).

## Mecanismo de acción hormonal

Todas las hormonas actúan mediante receptores localizados en células diana sensibles a hormonas, a los que éstas se unen de forma específica y con alta afinidad, esto permite a las hormonas ejercer sus funciones biológicas a concentraciones muy bajas en la sangre, en un rango que va de micromolar ( $10^{-6}\text{M}$ ) a picomolar ( $10^{-12}\text{M}$ ) (Nelson et al, 2001).

Las hormonas peptídicas se sintetizan formando parte de un polipéptido más largo que es cortado por proteasas específicas inmediatamente después de ser transportado a vesículas secretoras para dar lugar a la molécula activa. La estimulación de una célula mensajera por un neurotransmisor u hormona causa la inmediata exocitosis de la hormona peptídica a la sangre. Las células mensajeras también son estimuladas para sintetizar la hormona y rellenar las reservas celulares. La hormona peptídica liberada tiene una vida media en la sangre de tan solo segundos o minutos, antes de ser degradadas por proteasas de la sangre y tejidos (Darnell et al, 1993).

En este trabajo, las hormonas utilizadas pertenecen al grupo de las hormonas esteroideas. Estas hormonas, son transportadas por proteínas específicas desde donde son liberadas hasta donde ejercerán su acción. La interacción hormona-receptor provoca un cambio del potencial de membrana resultante de la abertura o del cierre de un canal iónico regulado por hormonas; la activación de un enzima-receptor por una hormona extracelular; un segundo mensajero, tal como el Adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) o el trifosfato de inositol, es generado en el interior de la célula para actuar como regulador alostérico de algún enzima clave. En las células diana, estas

hormonas atraviesan la membrana plasmática por difusión simple y se unen a proteínas receptoras específicas presentes en el núcleo. Los complejos receptor-hormona se unen a secuencias del ADN altamente específicas (elementos de respuesta hormonal (HRE)) y modifican la expresión de los genes. El complejo hormona-receptor unido puede estimular o suprimir la expresión (transcripción a ARNm) de genes específicos adyacentes a los HRE y, por lo tanto, la síntesis de las proteínas codificadas por estos genes (Nelson et al, 2001).

## **Metabolismo hormonal**

La degradación metabólica ocurre por medio de enzimas que activan la proteólisis, proceso de oxido-reducción y/o introducción de grupos funcionales adicionales. El hígado es el lugar donde se lleva a cabo el metabolismo de prácticamente todas las hormonas. Allí se conjugan con el ácido glucorónico y el sulfúrico y los productos resultantes se eliminan por la bilis o la orina. Muchas hormonas peptídicas y parte de las hormonas esteroideas libres se filtran en el glomérulo renal y se eliminan directamente por la orina, después de reabsorberse en parte por los túbulos y sufrir una degradación local (Tresguerres, 1999).

## **Las glándulas suprarrenales**

En el humano, las glándulas suprarrenales son un par de estructuras piramidales, aplanadas, ubicadas en el retroperitoneo, sobre la pared posterior del polo superior de cada riñón. Miden alrededor de 1 x 3 x 5 cm y pesan en conjunto unos 10 g (Finn, 2001). Están constituidas por la corteza y la médula. La corteza representa del 80-90 % de su peso; procede de los tejidos mesodérmicos y es la fuente de las hormonas esteroideas (Berne y Levy, 1995). Ésta se encuentra dividida en tres zonas, denominadas desde afuera hacia adentro, la zona glomerular cuyo principal producto de secreción es la aldosterona, la zona fascicular que sintetiza cortisol y la zona reticular que segrega andrógenos (DHEA, DHEA-S y testosterona) y estrógenos (estradiol, estrona y estriol) (Finn, 2001). La médula suprarrenal forma del 10-20 % restante de la glándula y procede de las células neuroectodérmicas de los ganglios simpáticos y es la fuente de las hormonas catecolamínicas (adrenalina y noradrenalina) (Berne y Levy, 1995).

## Síntesis de hormonas esteroides suprarrenales

El precursor común de todas las hormonas esteroideas es la molécula de colesterol, en la que modificaciones en la cadena lateral como la hidroxilación en distintos puntos y la aromatización de los anillos, le confiere actividades biológicas individuales (Tresgueres, 1999) (Figura 1).

Aunque las células suprarrenales son capaces de sintetizar colesterol, la mayor parte de éste llega a la glándula unido a las lipoproteínas de baja densidad (LDL). La unión de las LDL a sus receptores específicos en las células de la suprarrenal hace que el colesterol penetre al interior de las células por endocitosis, donde se hidroliza, dando como resultado colesterol libre. Parte del colesterol se almacena en las gotas lipídicas en forma de ésteres, de donde posteriormente podrá ser liberado para ser usado como sustrato (Tresgueres, 1999).

Las enzimas que intervienen en la síntesis de los esteroides pertenecen a la familia de las enzimas oxidativas del citocromo p450 (CYP), que reducen el oxígeno con electrones donados por el NADPH. La reacción limitante en la biosíntesis de los esteroides es el paso de colesterol a pregnenolona, que se realiza en la mitocondria. La conversión del colesterol a pregnenolona comprende tres etapas: dos hidroxilaciones en posición 20 y 22, y la escisión de la molécula entre los carbonos 20 y 22, formándose pregnenolona y ácido isocaproico. Estas reacciones se llevan a cabo por un enzima, la CYP11A1, localizada en la membrana interna de la mitocondria (Tresgueres, 1999).

La pregnenolona es extraída rápidamente de la mitocondria y sufre una modificación secuencial para dar lugar a los distintos esteroides. En el retículo

endoplásmico, la pregnenolona puede sufrir dos conversiones. Una es el paso a progesterona, reacción catalizada por el enzima 3-hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3  $\beta$ HSD), produciéndose la deshidrogenación del hidroxilo en posición 3 y la isomerización del doble enlace de posición 5-6 a 4-5. La progesterona, mediante la acción de la CYP21A2 (21 hidroxilasa) se transforma en 11-desoxicorticosterona. En la zona, glomerulosa, existe la enzima CYP11B2 (aldosterona sintetasa), con tres actividades, 11-hidroxilasa, 18-hidroxilasa y 18 oxidasa, por lo que, a partir de la 11-desoxicorticosterona, se forma la aldosterona. En las zonas fascicular y reticular existe una enzima, la CYP17, con actividad 17 hidroxilasa y 17-20 liasa. Por lo tanto, en ellas la pregnenolona se convierte en 17-OH- pregnenolona mediante la hidroxilación en el carbono 17. En la biosíntesis del cortisol las siguientes hidroxilaciones se realizan en los carbonos 21 y 11 por acción de las enzimas CYP21A2 y CYP11B1. La hidroxilación en el carbono 17 de la pregnenolona permite que la actividad 17-20 liasa de la CYP17 extraiga la cadena lateral del carbono 17, formándose la DHEA. Como la zona reticular tiene menor actividad 3- $\beta$ HSD y 11-hidroxilasa, los principales esteroides que se sintetizan en esta zona son la DHEA y la DHEA-S por acción de la enzima dehidroepiandrosterona-sulfotransferasa (Tresgueres, 1999). La DHEA (3 $\beta$ -hidroxi-5-androsten-17-ona) es una hormona que contiene una molécula de ciclopentanoperhidrofenantreno, compuesta por 3 anillos (A, B y C) de 6 carbonos y uno (D) de 5 carbonos (Figura 1). La DHEA pertenece a los esteroides de 19 carbonos con un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 del anillo B, además contiene un grupo ceto o hidroxil en la posición 17 (Ganong, 1996).

La androstenediona, mediante la enzima 17-cetorreductasa, se convierte en testosterona y ésta a su vez con la intervención de la aromatasa, se transforma en 17 $\beta$ -estradiol (Figura 1) (Tresgueres, 1999).

## Colesterol

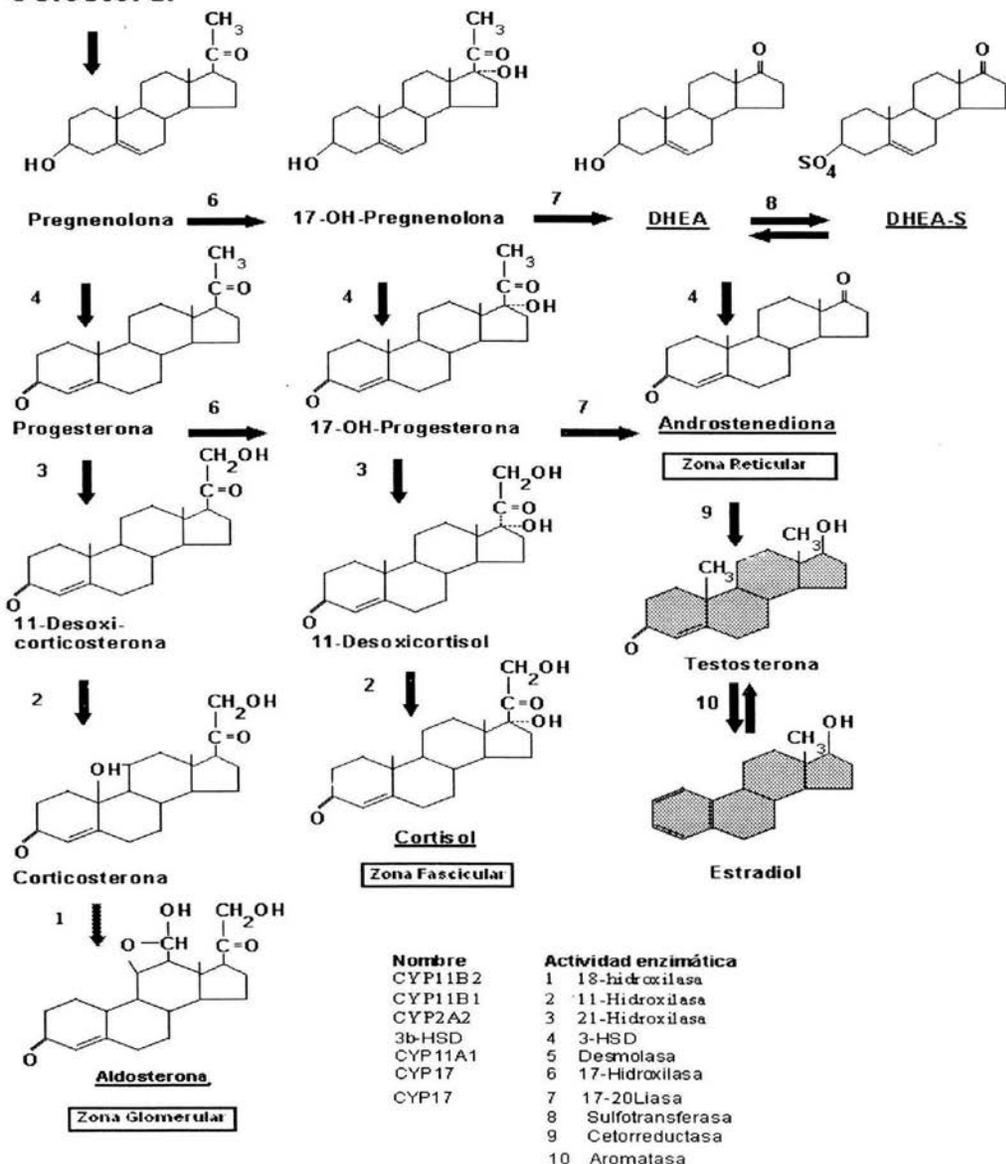


Figura 1. Biosíntesis de las hormonas en las zonas glomerular, fascicular y reticular de la corteza suprarrenal. Los principales productos secretados están subrayados. Las enzimas para las reacciones se muestran en la parte inferior del esquema. Los esteroides testosterona y estradiol (área sombreada) son sintetizados en gónadas. Tomado y modificado de Tresguerres,1995.

## Andrógenos adrenales

Los principales andrógenos secretados por la corteza suprarrenal son la DHEA, la DHEA-S y la androstenediona. Estos compuestos pueden convertirse en los andrógenos testosterona y  $5\alpha$ -dihidrotestosterona en los tejidos periféricos, éstos también son responsables de la interconversión de la DHEA y la DHEA-S mediante las acciones de la sulfotransferasa y la sulfatasa, respectivamente (Figura 1) (Yen et al, 1999).

La secreción de estas hormonas se incrementa por las adrenales de los 6-8 años de edad. En el plasma, la concentración de la DHEA-S en un hombre o mujer adultos son de 100 a 500 veces más altos que la testosterona y de 1000 a 10 000 veces más elevados que el estradiol, esto provee un gran reservorio para la conversión de andrógenos y estrógenos en los tejidos periféricos (Labrie et al, 2000).

La DHEA es también llamada "fuente de la juventud" (Williams, 2000), ya que las concentraciones más altas de la DHEA y la DHEA-S se dan aproximadamente a los 25 años de edad y posteriormente decrecen; disminuyendo progresivamente hasta en un 95 % a los 85 años (Hayashi, et al 2000). La DHEA sirve como precursor en la biosíntesis de compuestos estrogénicos y androgénicos tales como el  $17\beta$ -estradiol, 5-androstene- $3\beta$ , - $17\beta$  diol, testosterona y la 4-androstena-3,17-diona en tejidos periféricos (Labrie, 1991; Labrie et al, 2000; Miller, 2002). Cabe señalar que en mujeres postmenopáusicas el 100 % de los esteroides sexuales son sintetizados en tejidos periféricos a partir de precursores de origen adrenal como son la DHEA y la DHEA-S (Labrie et al, 2000).

Durante la fase folicular del ciclo menstrual, las glándulas suprarrenales de las mujeres secretan de 3 a 4 mg de DHEA, de 7 a 14 mg de DHEA-S, de 1 a 1.5 mg de androstenodiona y 50  $\mu$ g de testosterona por día. Estos valores representan alrededor del 50 %, más del 90 y cerca de un 50 % de las concentración circundante de la DHEA, la DHEA-S y la androstenodiona, respectivamente. Otro 30 % de la DHEA circundante deriva de la conversión periférica de la DHEA-S. En las mujeres, alrededor del 67 % y el 50 % de la concentración plasmática de la testosterona y la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, respectivamente, derivan de la androstenodiona. El resto de estas hormonas circulantes es producido por el ovario (Yen et al,1999). Por otra parte, la DHEA como su sulfato pueden metabolizarse por hidroxilaciones en los carbonos 7 y 16 o por la transformación del grupo cetónico a hidroxilo en el carbono 17. Los derivados pueden conjugarse con el ácido glucorónico, aunque existe una gran porción en forma de sulfatos. Los compuestos en forma de sulfatos tienen una vida media en el plasma más largo, debido a que se unen débilmente a las proteínas plasmáticas y no se filtran libremente por el glomérulo renal (Yen et al, 1999).

# **EFFECTOS BIOLÓGICOS DE ANDRÓGENOS Y ESTRÓGENOS**

## **Efectos biológicos de la DHEA y la DHEA-S**

Se considera que la DHEA y la DHEA-S contribuyen al proceso normal de maduración de las mujeres púberes (adrenarca), pero no estimulan ni apoyan otros cambios puberales dependientes de andrógenos en humanos. Algunos estudios recientes sugieren que pueden tener otros efectos metabólicos importantes, como el inhibir la aterosclerosis y prolongar la vida en los conejos, y quizás en humanos (Hayashi et al, 2000).

## **Efectos biológicos de la Testosterona**

Los andrógenos donde se incluye a la testosterona, son esenciales para la diferenciación adecuada del aparato genital externo masculino durante el desarrollo fetal. En la pubertad, median el crecimiento del escroto, los epidídimos, los conductos deferentes, las vesículas seminales, la próstata y el pene. Además, estimulan el crecimiento del músculo esquelético y de la laringe, y de las placas cartilagosas epifisarias, lo cual origina el brote de crecimiento puberal. También inducen el crecimiento de vello ambisexual (púbico y axilar) y sexual (barba, bigote, pecho, abdomen y espalda), así como la actividad de las glándulas sebáceas. Otro efecto es la estimulación de la eritropoyesis (Greenspan y Gordon, 1998).

## Efectos biológicos de los estrógenos

El estradiol, la estrona y el estriol forman en su conjunto los llamados estrógenos, los cuales se requieren para la maduración normal de la mujer. Estimulan la maduración de la vagina, el útero y las trompas uterinas en la pubertad, así como las características sexuales secundarias. Inducen el desarrollo estrófico y el crecimiento de los conductos en la mama, causan la fase de crecimiento acelerado y el cierre de la epífisis de los huesos largos que se presentan en la pubertad. Alteran la distribución de la grasa corporal para producir el contorno típico del cuerpo femenino, que incluye cierta acumulación de grasa alrededor de la cadera y las mamas. Las cantidades mayores también estimulan el desarrollo de pigmentación en la piel, de modo principal en las regiones de pezones, areolas y genitales. También tienen una función importante en el desarrollo del recubrimiento endometrial (Greenspan y Gordon, 1998).

Los estrógenos también tienen varios efectos metabólicos importantes. Parecen provocar en parte, el mantenimiento de la estructura normal de la piel y vasos sanguíneos en mujeres. Además, disminuyen el índice de resorción de hueso al antagonizar el efecto de la hormona paratiroidea (PTH). Estos pueden tener efectos importantes en la absorción intestinal porque reducen la movilidad de este órgano. Estimulan la síntesis de enzimas que causan crecimiento uterino y en el hígado aumentan la síntesis de proteínas de fijación y transporte (Greenspan y Gordon, 1998).

Los estrógenos pueden incrementar la coagulación de la sangre. Estos disminuyen la oxidación a cetonas de los lípidos del tejido adiposo e incrementan la síntesis de triglicéridos. Facilitan la pérdida del lípido intravascular hacia el espacio

extracelular, lo cual produce edema. También modulan el control de la función del músculo liso por el sistema nervioso simpático (Greenspan y Gordon, 1998).

## JUSTIFICACIÓN

El cáncer mamario es uno de los mayores problemas de salud en el mundo, en México ocupa el segundo lugar en frecuencia entre las neoplasias malignas, después del cervicouterino y cada día mueren por esta causa diez mujeres mexicanas.

Las terapias utilizadas para su tratamiento son muy agresivas y costosas. Se ha estimado que el costo del tratamiento de quimioterapia asciende a unos cuatro mil dólares; el combinado con quimio y radioterapia es de diez mil dólares y la suma de estos con la cirugía puede alcanzar los quince mil dólares; por lo que día a día se están buscando nuevas drogas que no presenten tantos efectos secundarios y los costos no sean tan elevados.

La DHEA es una hormona a la que se le ha atribuido un papel protector contra el cáncer, por lo que en este trabajo, se determinó el efecto que tiene la DHEA y algunos de sus derivados sobre la proliferación, la viabilidad y la muerte de las células de cáncer de mama MCF-7, con la finalidad de determinar su posible mecanismo en la protección contra el cáncer de mama y como una posible alternativa en el tratamiento del mismo. Las células MCF-7, una línea derivada de cáncer de mama humano dependiente de estrógenos y que expresa actividad de aromataasa, es un excelente modelo *in vitro* para estudiar el papel que tiene la DHEA en el cáncer de mama (Schmitt et al, 2001),

## HIPÓTESIS

Se sabe que la DHEA tiene un papel protector contra el cáncer de mama y se postula que esta protección se debe a su efecto antiproliferativo, por lo tanto, si la DHEA protege contra el cáncer, se espera que inhiba la proliferación de las células MCF-7.

Se ha sugerido que la DHEA ejerce su efecto de manera indirecta a través de su conversión a sus derivados, testosterona y estradiol, si el efecto inducido por la DHEA en las células MCF-7 se debe a su conversión a dichos esteroides, entonces éstos mimetizarán el efecto de la DHEA.

# OBJETIVOS

**OBJETIVO GENERAL:** Determinar el efecto de los esteroides DHEA, DHEA-S, testosterona y estradiol en la proliferación, la viabilidad y muerte de las células de cáncer de mama MCF-7.

## OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar el efecto de diferentes concentraciones de los esteroides DHEA, DHEA-S, testosterona y estradiol en la proliferación de las células MCF-7, por medio de la tinción con cristal violeta.
- Si algunas de las hormonas presentan un efecto inhibitor o inductor de la proliferación, determinar la concentración óptima para inhibir o incrementar en un 50% la proliferación de las células MCF-7, por medio de la tinción con cristal violeta.
- Si existe efecto antiproliferativo, evaluar si éste se asocia a la disminución en la síntesis del ADN por medio de la incorporación de timidina tritiada.

- Evaluar si la DHEA, DHEA-S, testosterona y estradiol afectan la viabilidad de las células, mediante la exclusión de azul tripano y la reducción del MTT [(bromuro de 3(4,5-dimetildiazoil-2-il)-2,5 difeniltratrazolium] .
- Si existe efecto antiproliferativo, evaluar si este efecto se asocia a un proceso de muerte celular por medio de la activación de la caspasa 3 (rompimiento de PARP) y la fragmentación del ADN.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Cultivo celular

Las células de cáncer de mama MCF-7 fueron mantenidas en RPMI 1640 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) (HyClone), 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina, 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de anfotericina B (SQUIBB) y 10  $\mu\text{g/ml}$  de ciproxina (Bayer). Estas células crecieron en una atmósfera humidificada al 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C.

## Proliferación celular

La proliferación celular fue evaluada por medio de la incorporación del colorante cristal violeta a los núcleos (Kueng et al, 1989). Para ello, 3000 células por pozo fueron sembradas en un volumen de 0.1 ml de medio de cultivo en placas de 96 pozos; se estimularon con la DHEA, la DHEA-S, la testosterona y el estradiol (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) a las siguientes concentraciones: 0.1, 1, 10, y 100  $\mu\text{M}$ ; 12.5, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ; 0.1, 1, 10, y 100 nM. Todas las concentraciones fueron previamente probadas por Najid y Habrioux, (1990) y Schmitt et al, (2001). Como disolvente se usó el etanol a una concentración no mayor al 1% (Di Monaco et al, 1997), mientras que el estradiol se disolvió en una solución amortiguadora de HEPES (NaCl 0.14M, KCl 0.004M, Heps

0.01M y 0.01 M de glucosa). Se incubaron por 48 h, concluido este tiempo se retiró el medio y se adicionó glutaraldehído (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO ) al 1.1% por 10 min. Se lavaron con agua corriente y se adicionaron 100  $\mu$ l/pozo del colorante cristal violeta al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) pH 6, manteniéndose en agitación por un lapso de 20 min. Las placas se lavaron nuevamente hasta eliminar el colorante que no fue asimilado por las células, se agregó una solución de ácido acético (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO ) al 10 % en agua destilada, se agitó suavemente para desteñir a las células y que el colorante quedara en suspensión de manera homogénea. Posteriormente se tomó la lectura de los pozos en un lector de placas para ELISA (Microplate Bio-Tek Instruments EL 311) a 595 nm. La proliferación celular fue graficada como el porcentaje de proliferación con respecto al control negativo (cultivos sin tratamiento). Se realizaron cinco repeticiones por quintuplicado para cada condición.

## **Incorporación de timidina tritiada**

Otra técnica que se empleó para medir la proliferación celular fue por medio de la cuantificación de la síntesis del ADN, para lo cual se utilizó uno de los elementos que lo conforman (la timidina, análogo de la timina), que lleva una marca radiactiva (tritio) (Wright et al, 1992). Esta timidina se incorpora cuando ocurre la síntesis de ADN y esto permite estimar la cantidad de ADN que se está sintetizando.

Para ello, 50 000 células fueron sembradas en placas de 24 pozos con 1 ml de medio de cultivo, se estimularon con la DHEA a una concentración de 25, 50 y 100  $\mu$ M. Para acelerar la muerte celular se utilizó la actinomicina D (que detiene a las células MCF-7 en la fase G1 del ciclo celular) a 5 nM (control positivo) (Gómez et al, 1996) y se marcaron con 1  $\mu$ Ci/ml de timidina tritiada (NEN). Se incubaron por 48 h, después de la cual, se retiró el medio de cultivo, se lavaron dos veces con una solución amortiguadora de HEPES y posteriormente fueron lisadas con una solución de NaOH 200 mM durante 6 h. Después de la lisis, la solución de NaOH de cada pozo se colocó de manera individual en viales con 3 ml de líquido de centelleo (BECKMAN, USA). La emisión de luz fue cuantificada como cuentas por minuto (cpm) durante 1 min en un contador de centelleo (Beckman). Finalmente las cpm obtenidas fueron graficadas como el porcentaje de proliferación con respecto al control. Se realizaron tres repeticiones.

# Viabilidad celular y actividad metabólica de las células por la reducción de MTT

## Exclusión de azul de tripano

La viabilidad celular fue evaluada por medio de la exclusión del colorante azul de tripano, el cual, es asimilado por las células solamente cuando éstas se encuentran deterioradas de la membrana citoplasmática; las células que no incorporan dicho colorante se consideran como células viables.

En placas de 6 pozos, 68 000 células fueron sembradas en dos ml de medio de cultivo al 10 % de SFB. Fueron estimuladas con DHEA al 0.1, 1, 10, 12.5, 25, 50 y 100  $\mu$ M. Con testosterona se estimularon a una concentración de 100  $\mu$ M y se incubaron por 48 h. Concluido este tiempo, se retiró el medio y fueron lavadas dos veces con una solución amortiguadora de HEPES, tripsinizadas para desprender a las células y diluirlas 1 a 1 con azul tripano. Las células se contaron en una cámara de Neubauer (Boeckel CO) y el porcentaje de viabilidad fue obtenido mediante la siguiente relación:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Células no teñidas}}{\text{Células teñidas} + \text{Células no teñidas}} \times 100$$

## Reducción del MTT

La técnica del (bromuro de 3(4,5-dimetildiazoil-2-il)-2,5 difeniltrazolum (MTT) fue usada para determinar la viabilidad celular. Este ensayo mide la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial. El MTT es una sal de tetrazolium soluble (amarilla) que es reducida solo por las células metabólicamente activas a una sal de formazán insoluble (azul). La cantidad de este producto es directamente proporcional a la viabilidad celular (Green et al, 1984).

Para ello, 15 000 células fueron cultivadas en placas de 24 pozos en un ml de medio de cultivo y estimuladas con 10 ng/ml del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) más actinomicina D (5 nM), 25  $\mu$ M y 100 nM de la DHEA y 100  $\mu$ M de la testosterona. Después de 48 h de incubación, se adicionaron 20  $\mu$ l de MTT (5 mg/ml) a cada pozo y se incubaron durante 4 h. Concluido este tiempo se agregaron 200  $\mu$ l de alcohol isopropílico al 0.04 N acidificado con HCl para solubilizar el formazán, y la absorbancia fue medida en un lector de placas para ELISA (Microplate Bio-Tek Instruments EL 311) a una longitud de onda de 570 nm. La reducción del MTT/célula se obtuvo dividiendo la absorbancia obtenida con el MTT a 570 nm entre la absorbancia del cristal violeta a 595 nm. Se realizaron tres repeticiones.

# Muerte celular o apoptosis

## Fragmentación de la PARP por inmunoanálisis

La apoptosis es una forma morfológica y bioquímicamente clara de muerte celular, caracterizada por la condensación nuclear y citoplasmática, fragmentación del ADN, dilatación del retículo endoplásmico y alteraciones en la composición de la membrana celular (exposición de la fosfatidil serina) (Bratton et al, 2000).

La señalización de la apoptosis está regulada por dos vías distintas: una involucra a los receptores de muerte de la membrana celular ( Fas, TNF-R1, DR-3, DR-4, DR-5, DR-6 ) y la otra a la mitocondria (Reed, 2001; Ashkenazi y Dixit, 1998; Kaufmann y Earnshaw, 2000). Las proteínas liberadas de la mitocondria durante la apoptosis incluyen a las caspasas (mayormente a la 2, 3 y 9), así como el citocromo C (Loeffler y Kroemer, 2000), siendo éste una proteína importante en la cadena respiratoria que al ser liberado al citosol es un distintivo de la apoptosis después del tratamiento de ciertos inductores de la misma (Martinou et al, 2000; Green y Reed, 1998).

La apoptosis fue medida por medio del rompimiento de la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), la cual es un sustrato de la caspasa-3 que se activa durante el proceso apoptótico. Para ello, 150 000 células fueron sembradas en placas de 6 pozos y estimuladas con el TNF- $\alpha$  (control positivo) a una concentración de 10 ng/ml y con la DHEA a 25  $\mu$ M y 100 nM. Concluido el tiempo de incubación el medio fue retirado y se lavó con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS), se adicionaron 2 ml de fenilmetil-sulfonil fluoruro, inhibidor de Seril-proteasas (PMSF) (10 ng/ml), se colectó y fue centrifugado por 5 minutos a 15 000 rpm. Las células fueron lisadas con una solución amortiguadora que contiene 62.5 mM de tris pH 6.8, 6 M de Urea, 10 % de

glicerol, 2 % de dodecil sulfato de sodio (SDS), 0.003 % de azul de bromofenol y 5 % de 2- $\beta$ -mercaptoetanol, además fueron sonicadas (agitación mediante vibraciones ultrasónicas) por 45 segundos a una intensidad suave y constante del 40 %. Las muestras se corrieron en un gel de acrilamida al 10 % de SDS-PAGE por 14 h. Las proteínas fueron transferidas en una membrana de nitrocelulosa que fue bloqueada en PBS conteniendo 0.1 % de Tween 20 más 5 % de leche descremada por 1 h. El exceso de leche fue lavado y se incubó con un anticuerpo monoclonal contra PARP (ENZYME Systems products CA, USA) diluido 1:10 000, preparado en PBS conteniendo 1 % de Tween 20 más 1 % de albúmina sérica bovina (BSA), incubado a temperatura ambiente por 14 h. Posteriormente se lavó la membrana con PBS Tween 0.1 %, se adicionó el anticuerpo secundario contra IgGs de ratón acoplado a peroxidasa (DAKO)(1: 10 000) por 1 h. Las proteínas se observaron por revelado con quimioluminiscencia (Super Signal<sup>®</sup>, Pierce. IL, USA) el cual contiene el sustrato peróxido y luminol. Estas fueron evidenciadas por exposición con película de auto radiografía (Kodak). Las exposiciones fueron a 1,3 y 5 min.

## Fragmentación de ADN

Uno de los cambios observados en las células apoptóticas es la degradación internucleosomal del ADN (Earnshaw et al, 1999). Esta degradación es el resultado del rompimiento de un inhibidor de nucleasas mediado por proteasas llamado Inhibidor de DNAsa activado por caspasas (ICAD) el cual libera una singular endonucleasa llamada DNAsa activadora de caspasas (CAD) (Enari et al, 1998). La condensación de la cromatina apoptótica, uno de los cambios morfológicos tempranos, es el resultado de la acción de diversos polipéptidos, incluyendo el factor inductor de la apoptosis (una flavoproteína liberada de la mitocondria y la topoisomerasa II) (Susin et al, 1999). Subsecuentemente se presenta la fragmentación de los núcleos, que se refleja en el rompimiento de polipéptidos que normalmente contribuyen a la integridad estructural de los núcleos, específicamente a la proteína de los aparatos nuclear y mitótico (NuMA) (Earnshaw, et al 1999).

Para corroborar la muerte celular en las células MCF-7, se observó la fragmentación del ADN, el cual se rompe por la activación de enzimas que lo fragmentan produciendo un patrón de bandedo o escalera cuando se observa en un gel de agarosa.

Obtención del ADN. 500 000 células fueron sembradas en cajas petri de 10 ml y tratadas con 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  más actinomicina D (5nM) (control positivo), DHEA a 25  $\mu$ M y 100 nM por 72 h. Las células fueron lisadas con 500  $\mu$ l de una solución de lisis (0.5% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20  $\mu$ g RNasa A

por ml, 100 µg de proteínasa K por ml). La solución de lisis se colectó y fue colocada en tubos de ensayo, que se incubaron por 12 h a 37°C en agitación constante. La suspensión del lisado fue después extraída con un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (2.5:2.4:0.1), se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min. La fase acuosa se colectó y se le adicionó 1/10 de volumen de acetato de sodio pH 5.5, para precipitar el ADN se adicionaron de 2-2.5 volúmenes de etanol al 100 %; ésta solución se dejó a -20°C por 12 h. Concluido este tiempo, se centrifugó a 10000 rpm por 15 min, se decantó el sobrenadante y el ADN se resuspendió en agua estéril. Finalmente el ADN se separó en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y fue fotografiado bajo iluminación ultravioleta (UV).

## **Análisis estadístico**

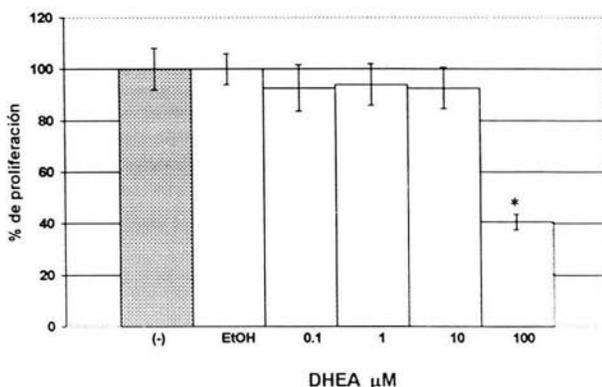
Todos los experimentos se realizaron por quintuplicado y por lo menos tres veces de manera independiente. Las figuras de los resultados muestran un ensayo representativo con su media y su desviación estándar.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar las diferencias estadísticas entre las células tratadas con las diferentes concentraciones de la DHEA y sus esteroides metabólicos DHEA-S, testosterona y estradiol, con las células no tratadas (control), posteriormente se efectuó un análisis de comparación múltiple de medias mediante la prueba de Dunnett. Las diferencias entre los grupos fueron consideradas significativas cuando  $P < 0.05$  (P- Value).

## RESULTADOS

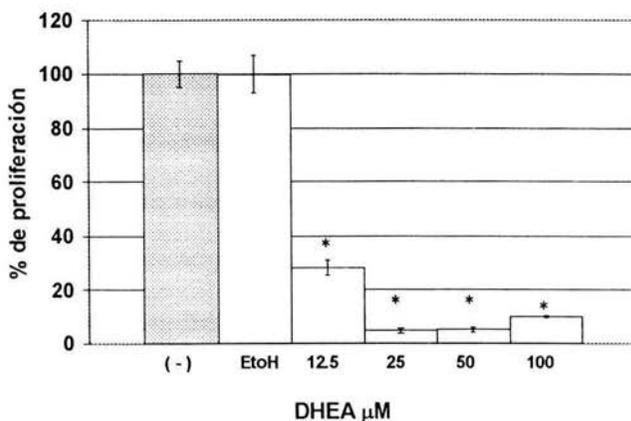
### Efecto de la DHEA, la DHEA-S, la testosterona y el estradiol sobre la proliferación en las células MCF-7

Para determinar el efecto de la DHEA en la proliferación de las células de cáncer de mama MCF-7, se realizó una curva dosis-respuesta a las siguientes concentraciones: 0.1, 1, 10, y 100  $\mu\text{M}$ . La DHEA inhibió la proliferación celular a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  (Figura 2). Como se muestra en el gráfico, la inhibición en la proliferación a dicha concentración fue drásticamente inhibida en un 60%, lo que hizo pensar que probablemente a concentraciones entre 10 y 100  $\mu\text{M}$  se observaría un efecto antiproliferativo. Por ello, se decidió realizar otra curva dosis-respuesta a concentraciones entre 10 y 100  $\mu\text{M}$ , por lo que las células se cultivaron a 12.5, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de la DHEA.



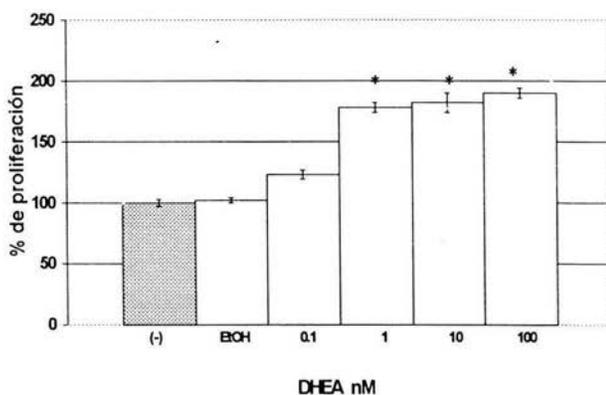
**Figura 2.** Efecto de la DHEA sobre la proliferación de las células MCF-7 a concentraciones entre 0.1 y 100  $\mu\text{M}$ . Aproximadamente  $3 \times 10^3$  células en 100  $\mu\text{l}$  de medio fueron sembradas en placas de 96 pozos y se estimularon con la DHEA por 48 h a las diferentes concentraciones. La proliferación fue medida por medio del colorante cristal violeta y se graficó como el porcentaje de proliferación con respecto al control (cultivos sin tratamiento) (-). Como vehículo de la DHEA se utilizó el etanol (EtOH). \* Datos estadísticamente significativos con una  $p < 0.05$  vs el control.

La DHEA inhibió la proliferación de manera dosis-dependiente a partir de 12.5  $\mu\text{M}$ , observándose el máximo efecto a partir de 25  $\mu\text{M}$  (Figura 3). Por lo anterior, para posteriores ensayos se utilizó la DHEA a 25  $\mu\text{M}$ .



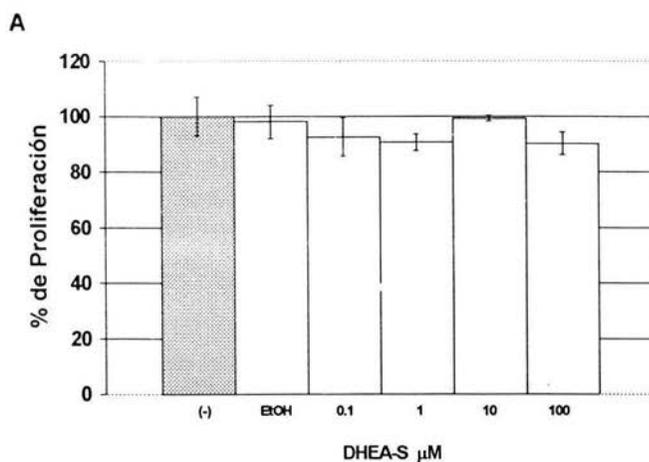
**Figura 3.** Efecto de la DHEA sobre la proliferaci3n de las c3lulas MCF-7 a concentraciones entre 12.5 y 100  $\mu\text{M}$ . Aproximadamente  $3 \times 10^3$  c3lulas en 100  $\mu\text{l}$  de medio fueron sembradas en placas de 96 pozos, se cultivaron con la DHEA a 12.5, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ . La proliferaci3n celular fue cuantificada despu3s de 48 h de incubaci3n por medio de la t3cnica del cristal violeta. 3sta fue graficada como el porcentaje de proliferaci3n con respecto al cultivo sin DHEA (-). Como veh3culo de la DHEA se utiliz3 el etanol (EtOH). \* Datos estadisticamente significativos con una  $p < 0.05$  vs el control.

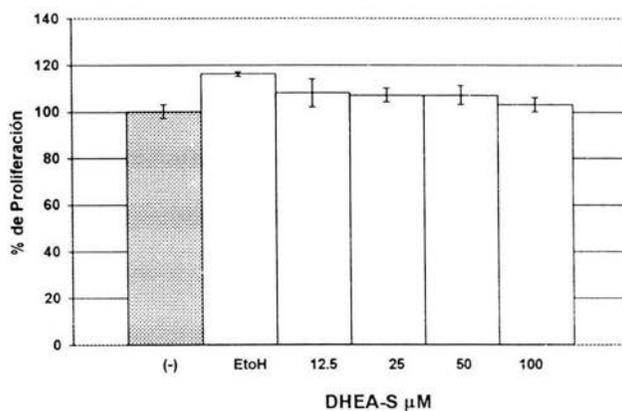
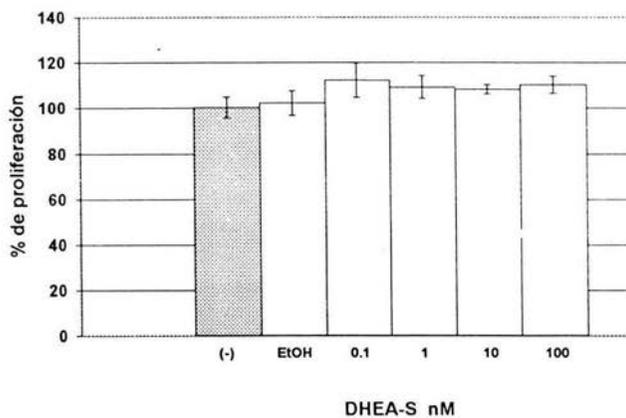
Se ha demostrado que la DHEA induce la proliferación celular a concentraciones menores en el rango de nanomoles (nM) en las células MCF-7. Para determinar si este fenómeno se repite en nuestras condiciones experimentales, se realizó una curva dosis-respuesta con 0.1, 1, 10 y 100 nM. Como se observa en la Figura 4, la DHEA estimuló la proliferación de manera dosis-dependiente entre 1 y 100 nM, obteniéndose una máxima estimulación a 100 nM con respecto al control.



**Figura 4.** Efecto de la DHEA sobre la proliferación de las células MCF-7 a concentraciones entre 0.1 y 100 nM. Aproximadamente  $3 \times 10^3$  células en 100  $\mu$ l de medio (RPMI conteniendo 10% de SFB), fueron sembradas en placas de 96 pozos h. Las células fueron estimuladas a 0.1, 1, 10 y 100 nM de la DHEA por 48 h. La proliferación celular fue graficada como el porcentaje de proliferación con respecto al cultivo sin DHEA (-). Como vehículo de la DHEA se utilizó el etanol (EtOH).\* Datos estadísticamente significativos con una  $p < 0.05$  vs el control.

Para determinar si en las células MCF-7 la DHEA-S pudiera tener algún efecto sobre la proliferación, las células se cultivaron con esta hormona a diferentes concentraciones y se evaluó la proliferación. Los resultados mostraron que la DHEA-S no tuvo efecto alguno en la proliferación celular a ninguna de las concentraciones usadas (Figura 5 A,B,C). Por lo que, en ensayos posteriores esta hormona no fue utilizada.

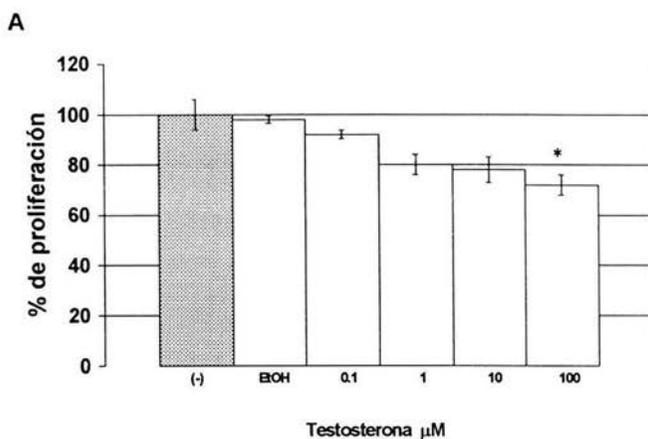


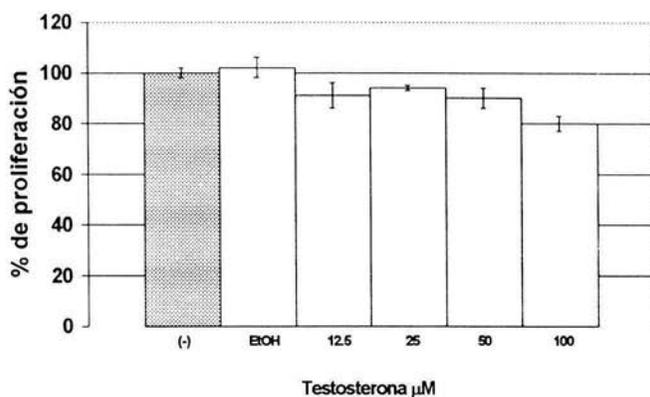
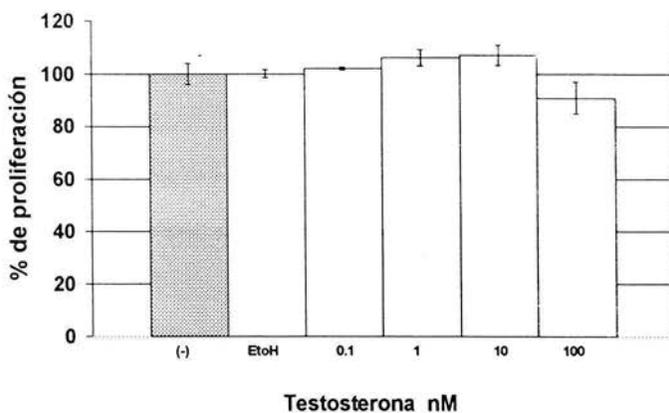
**B****C**

**Figura 5.** Efecto de la DHEA-S sobre la proliferación de las células MCF-7 a concentraciones nM y  $\mu\text{M}$ . Las células fueron cultivadas a diferentes concentraciones 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  (A), 12.5, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  (B) y 0.1, 1, 10 y 100 nM (C). La proliferación celular se evaluó a las 48 h de incubación, se utilizó como vehículo etanol para disolver la DHEA-S. La proliferación fue graficada como el porcentaje de proliferación con respecto al control (cultivo sin DHEA-S) (-).

Se ha demostrado que el efecto inducido por la DHEA puede ser a través de su conversión a el estradiol. Con la finalidad de determinar si la testosterona (otro derivado de la DHEA) pudiera tener un efecto similar al de la DHEA en la proliferación celular, se cultivaron las células MCF-7 a diferentes concentraciones con la testosterona y se evaluó la proliferación.

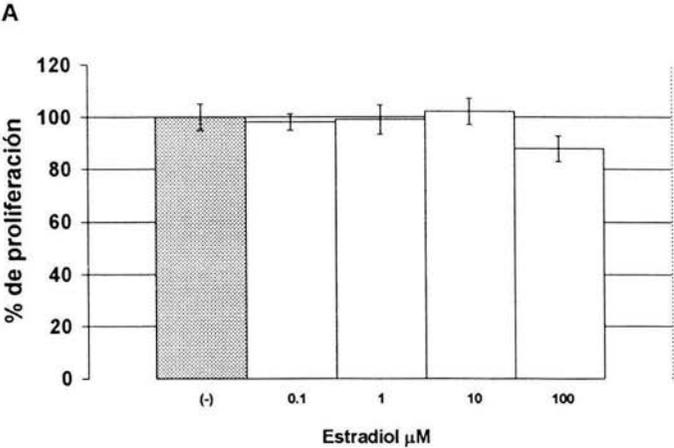
La testosterona tuvo un efecto inhibitor de manera dosis-dependiente en la proliferación celular; sin embargo, su efecto fue débil, y solo se observó inhibición a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  (Figura 6 A y B). A concentraciones menores (nanomolar), la testosterona no estimuló la proliferación celular (Figura 6 C).

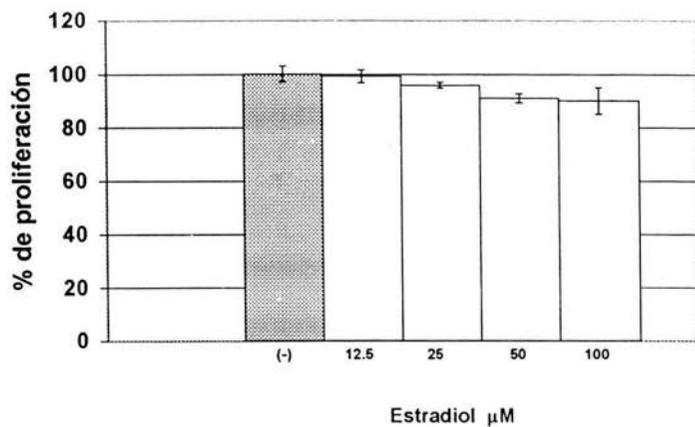
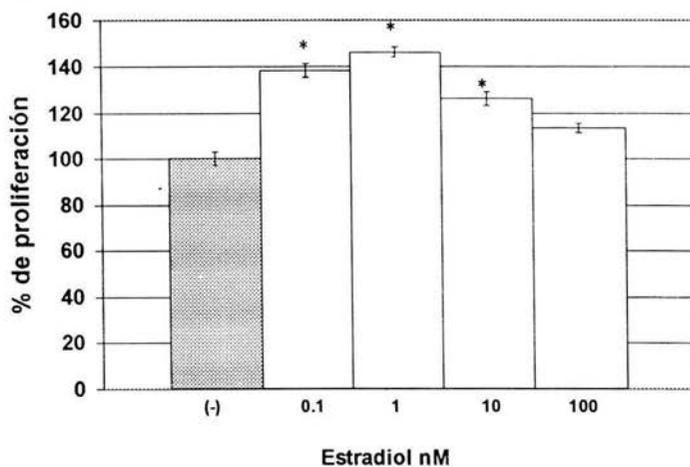


**B****C**

**Figura 6.** Efecto de la testosterona sobre la proliferaci3n de las c3lulas MCF-7 a concentraciones nM y  $\mu\text{M}$ . Las c3lulas fueron cultivadas a diferentes concentraciones de testosterona: 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  (A); 12.5, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  (B) y 0.1, 1, 10 y 100 nM (C). La proliferaci3n celular se evalu3 a las 48 h. de incubaci3n y se grafic3 como el porcentaje de proliferaci3n con respecto al control (cultivos sin tratamiento) (-). Como veh3culo de la testosterona se utiliz3 el etanol (EtOH). \*Datos estad3sticamente significativos con una  $p < 0.05$  vs el control.

También se utilizó el estradiol, y se evaluó la proliferación a las mismas concentraciones utilizadas que con la testosterona. El estradiol a concentraciones micromolares, no inhibió la proliferación de las células MCF-7 (Figura 7 A y B). Algunos autores han demostrado que el estradiol ejerce sus principales efectos a bajas concentraciones (rango de nanomoles), por lo que se probaron dichas concentraciones en la proliferación. Los resultados mostraron que a bajas concentraciones de la hormona se incrementa la proliferación de manera dosis-dependiente entre 0.1 y 10 nM obteniéndose una estimulación máxima a 1 nM de estradiol (Figura 7 C).



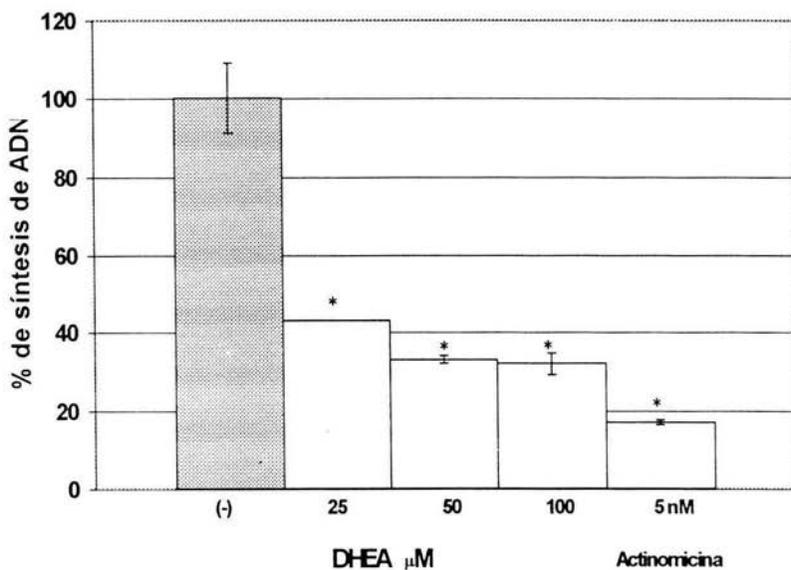
**B****C**

**Figura 7.** Efecto del estradiol sobre la proliferaci3n de las c3lulas MCF-7. Las c3lulas se cultivaron a las siguientes concentraciones 0.1, 1, 10 y 100 μM (A); 12.5, 25, 50 y 100 μM (B) y 0.1, 1, 10 y 100 nM (C) donde se observa un incremento en la proliferaci3n celular. Todas las concentraciones fueron evaluadas a las 48 h de incubaci3n y se grafic3 como el porcentaje de proliferaci3n con respecto al control (cultivos sin tratamiento) (-). Como veh3culo del estradiol se utiliz3 soluci3n amortiguadora de HEPES.\* Datos estadisticamente significativos con una  $p < 0.05$  vs el control.

## **Incorporación de la timidina tritiada**

Con la finalidad de determinar si la inhibición en la proliferación celular inducida por la DHEA (a 25  $\mu\text{M}$ ) se veía asociada a una disminución en la síntesis del ADN, se midió el contenido de éste por medio de la técnica de la incorporación de timidina tritiada. Como control positivo se utilizó la actinomicina D, la cual inhibe la síntesis de proteínas y por lo tanto, la del ADN.

Después de 48 h con la actinomicina D, las células fueron escasas y se despegaron de los pozos presentando cambios morfológicos (evidentes al observarlas al microscopio óptico) y los signos típicos de la apoptosis. Además, se observó una disminución de la incorporación de la timidina tritiada en un 83%. Por otra parte, la DHEA a concentraciones de 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ , disminuyó en un 57%, 67% y 68%, respectivamente la incorporación de timidina tritiada, comparados con el control negativo (células no tratadas) (Figura 8).



**Figura 8.** Efecto de la DHEA sobre la síntesis del ADN en las células MCF-7. Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos y estimuladas con la DHEA a 25, 50 y 100  $\mu$ M y con la actinomicina D (5 nM). Fueron pulsadas con 1  $\mu$ Ci/ml de timidina tritiada al inicio del cultivo y se evaluaron a las 48 h de incubación. La incorporación de la timidina tritiada fue graficada como el porcentaje de la síntesis del ADN (cuentas por minuto (cpm)) con respecto al control (-). \* Datos estadísticamente significativos con una  $p < 0.05$  vs el control.

## Actividad metabólica de las células por la reducción del MTT.

Para determinar si el efecto inhibitor de la DHEA y de la testosterona sobre la proliferación de las células MCF-7 se asociaba a un posible efecto citotóxico, se midió la viabilidad celular por medio del ensayo del MTT. Cuando la DHEA fue adicionada a una concentración de 25  $\mu\text{M}$ , se observó un aumento en la reducción del MTT/célula del 63 % lo que indicó un efecto tóxico; sin embargo, a una concentración de 100 nM se observó un incremento en el MTT de sólo el 18 %, con respecto al control negativo, lo que sugiere que a esta última concentración no resulta tóxica para las células. Cuando las células fueron tratadas con el TNF- $\alpha$  + Actinomicina D, los cuales producen toxicidad y muerte celular (control positivo), el aumento en la reducción fue del 186 %. Por otro lado, la testosterona no afectó la reducción del MTT, indicando que el efecto antiproliferativo inducido por ésta no causa toxicidad en las células (Tabla 1). Así mismo la viabilidad celular fue evaluada por medio de la técnica de exclusión de azul de tripano, donde la viabilidad fue del 100% (datos no mostrados).

**Tabla 1**

Reducción de MTT/célula  
(% con respecto al control)

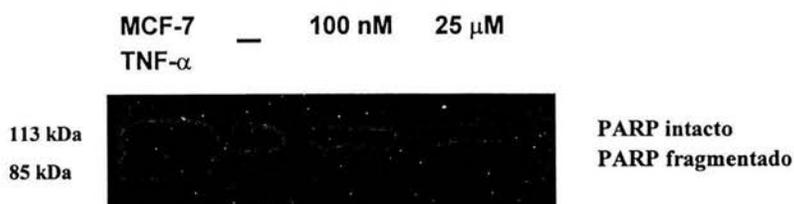
Control	TNF- $\alpha$ + Act-D	DHEA 25 $\mu\text{M}$	DHEA 100 nM	Testosterona 100 $\mu\text{M}$
100	286	163	118	99

**Tabla 1.** Porcentajes de reducción del MTT. Las células fueron estimuladas a las diferentes concentraciones de la DHEA, la testosterona y con el Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF) más Actinomicina D (Act-D) y fueron evaluadas a las 48 h del estímulo. La reducción del MTT/célula se obtuvo dividiendo la absorbancia obtenida con el MTT a 570 nm entre la absorbancia del cristal violeta a 595 nm.

## Muerte celular

### Rompimiento de PARP

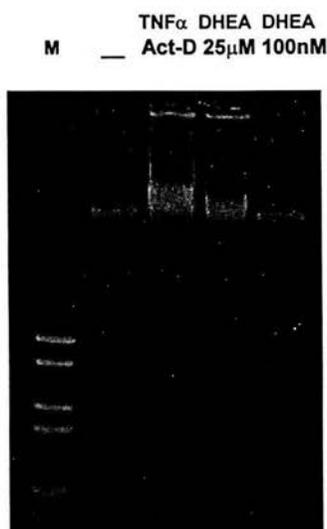
Para determinar si el efecto tóxico inducido por la DHEA a 25  $\mu\text{M}$  se asociaba a un proceso de muerte, se evaluó si la DHEA induce apoptosis mediante el rompimiento de la proteína poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) la cual se fragmenta por la activación de la caspasa-3. Un fragmento de 85 kDa de PARP (producto característico de células apoptóticas) fue detectado por inmunoanálisis en las células MCF-7 tratadas con el  $\text{TNF-}\alpha$  (control positivo) (Figura 9), pero no se observó rompimiento de dicha enzima en las células tratadas con la DHEA a 25  $\mu\text{M}$  y 100 nM (proteína intacta de 113 kDa). Estos resultados sugieren que la DHEA no induce apoptosis dependiente de la activación de la caspasa-3 en las células de cáncer de mama MCF-7.



**Figura 9.** Efecto de la DHEA sobre el rompimiento de la proteína PARP. Las células MCF-7 fueron tratadas con el  $\text{TNF-}\alpha$  (10 ng/ml) (control positivo) y con la DHEA a 100 nM y 25  $\mu\text{M}$ . La proteína fue extraída a las 48 h de incubación y analizada por medio de inmunoanálisis.

## Fragmentación del ADN

Teniendo en cuenta que el proceso apoptótico puede ser independiente de la activación de la caspasa-3, se determinó la degradación internucleosomal del ADN (o escalera de la muerte), la cual es conocida como un indicador bioquímico de la muerte celular programada. En las células MCF-7 tratadas con 25  $\mu\text{M}$  y 100 nM de la DHEA no hubo fragmentación nucleosomal del ADN después de 72 h de tratamiento (Figura 10); sin embargo, si se observó una degradación del ADN con la DHEA a la concentración que inhibe fuertemente la proliferación celular (25  $\mu\text{M}$ ). Cuando se usó el  $\text{TNF-}\alpha$  en combinación con la actinomicina D (control positivo), se pudo observar una degradación del ADN similar a la observada con la DHEA, por lo que se concluye que la DHEA induce la degradación del ADN probablemente sin inducir muerte celular dependiente de la caspasa-3.



**Figura 11.** Fragmentación del ADN. Las células MCF-7 fueron tratadas con 25  $\mu\text{M}$  y 100 nM de la DHEA por 72 h. Ambas células, flotantes y adherentes fueron colectadas y el ADN de cada fracción celular fue extraído y separado sobre un gel de agarosa al 1%. El gel fue teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz ultravioleta. La DHEA a las diferentes concentraciones no causó fragmentación en el ADN de las células MCF-7.

M= marcador de peso molecular

— = control

TNF $\alpha$  = Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

Act-D= Actinomicina D

## DISCUSIÓN

La DHEA, una hormona adrenal, ha mostrado tener un efecto protector en una amplia variedad de enfermedades, entre ellas el cáncer, por lo que en este trabajo se analizó su efecto en la proliferación de las células tumorales de mama MCF-7.

Se demostró que la DHEA tiene un efecto antiproliferativo en las células MCF-7, observándose una inhibición por debajo del 50 % a una concentración de 25  $\mu$ M. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Di Monaco y col. (1997), quienes observan una inhibición de la proliferación a altas concentraciones (20-50  $\mu$ M). Por otro lado se observó que la DHEA a una concentración entre 1 y 100 nM, indujo un aumento en la proliferación. Este efecto proliferativo ha sido previamente descrito por Maggiolini y col. (1999) y Schmitt y col. (2001), quienes encontraron estimulación de la proliferación de las células MCF-7 con la DHEA a una concentración de 100 nM.

También, contrario a lo que nosotros observamos, Tanaka y col. (2000), encontraron estimulación de la proliferación en las mismas células a una concentración de 1000  $\mu$ M. Por su parte, Di Monaco y col. (1997) sugieren que el efecto proliferativo de la DHEA sobre las células MCF-7 se debe posiblemente a la unión al receptor de estrógenos que dichas células poseen. Es interesante observar que mientras altas concentraciones de la DHEA inhiben la proliferación celular, bajas concentraciones la estimulan. Nosotros pensamos que esto es importante, ya que posiblemente el efecto inhibitor que tiene la DHEA a altas concentraciones, sea el mecanismo mediante el cual ejerza su protección en contra del cáncer *in vivo*.

En personas menores de 25 años (cuando la concentración de la DHEA en sangre es alta), el riesgo de padecer cáncer disminuye y la probabilidad de padecerlo aumenta con la edad, lo que se relaciona con una disminución de la concentración de la DHEA en la sangre. Esto podría explicar que bajas concentraciones de la DHEA inducen un aumento en la proliferación de las MCF-7, ya que cuando la concentración de la DHEA baja, existe una mayor probabilidad de desarrollar cáncer al estimularse la proliferación de las células tumorales. Así que, sería de gran utilidad usar la DHEA en un modelo *in vivo* (ratón) para determinar si ésta inhibe o no el crecimiento celular del tumor al igual que lo hace *in vitro*. También, sería relevante evaluar el efecto que la DHEA pudiera tener en otros tipos de cánceres a diferentes concentraciones.

Cuando se evaluó la forma sulfatada de la DHEA, no se observó efecto alguno en la proliferación de las células MCF-7, a pesar de que algunos autores mencionan haber encontrado inducción en el crecimiento de estas células con la DHEA-S (Billich et al, 2000). Yen y Laughlin (1998) mencionan que la DHEA-S puede servir como un modulador fisiológico para el metabolismo de los ácidos grasos en el hígado y en la expresión del enzima peroxisomal y de ese modo puede contribuir con los efectos anticarcinogénicos y quimioprotectores de esteroides endógenos. Los resultados obtenido con la DHEA-S coinciden con los de Leowattana (2001), en los que menciona que la DHEA-S actúa solamente como un reservorio de la DHEA y que carece de actividad biológica. Por lo que al parecer en las MCF-7, la DHEA-S no tiene actividad biológica cuando menos al inducir la proliferación celular.

Ha sido ampliamente descrito, que *in vitro* la DHEA puede convertirse enzimáticamente a otros derivados mediante la actividad dependiente de la aromatasas p450 (Miller, 2002). Muchos de los efectos biológicos de la DHEA se le atribuyen a su

transformación a estradiol como describieron Schmitt et al (2001), en donde la DHEA estimula la proliferación y la expresión de genes en las células de cáncer de mama después de que se convierte a estradiol. Por otro lado, Tanaka y col. (2000) demuestran que la DHEA se convierte a estradiol en las mismas células y que este proceso se acelera por las gonadotropinas. La conversión de la DHEA a estradiol ha sido demostrada en otras células como los macrófagos (Schmidt et al, 2000). Este proceso han sido atribuido a que la DHEA activa a los receptores de estrógenos (Najid y Habrioux, 1990).

Diversos autores demuestran un efecto proliferador al estradiol en las células MCF-7 a concentraciones nanomolares (Maggiolini et al, 1999; Schmitt et al, 2001) similar al observado con la DHEA a bajas concentraciones; sin embargo, nosotros observamos que el estradiol no mimetizó el efecto de la DHEA en la inhibición de la proliferación a ninguna de las concentraciones evaluadas, por lo que se sugiere que la DHEA no se convierte a estradiol, al menos al inducir su efecto antiproliferativo. Sería interesante evaluar el efecto que pudieran tener algunos de los inhibidores de la aromatasas como el anastrozole, el letrozole y el exemestane (Leowatthana, 2001), los cuales bloquean la conversión de la DHEA a estrona y estradiol, sobre la proliferación de las células tratadas con la DHEA.

Aunque se ha demostrado afinidad de la DHEA por el receptor de estrógenos, recientemente se demostró la presencia de un receptor activado por proteínas G para la DHEA (Liu y Dillon, 2002), por lo que es probable que las células MCF-7 presenten dicho receptor y la DHEA ejerza su efecto antiproliferativo activándolo directamente sin activar al receptor de estrógenos. A pesar de que la testosterona inhibió la proliferación de las células MCF-7, el efecto fue muy débil y no mimetizó al fuerte efecto antiproliferativo

observado con la DHEA, por lo que se cree que la DHEA no se convierte a la testosterona para inducir inhibición de la proliferación.

Por otra parte, se observó que el efecto antiproliferativo de la DHEA, se asoció a una disminución en la incorporación de la timidina tritiada, lo que sugiere una inhibición de la síntesis del ADN.

También se observó que la DHEA estimuló la actividad mitocondrial de las células MCF-7 al incrementar su capacidad para reducir la sal de tetrazolium. El incremento en la reducción del MTT y la disminución en el número celular refleja un aumento en la capacidad de reducción en las células remanentes viables. Lo anterior fue claramente visible en las células que fueron tratadas con TNF- $\alpha$  + Actinomicina-D y con la DHEA (25  $\mu$ M). Similar a este resultado, Gómez y col. (1996), observaron un incremento en la reducción del MTT y una disminución en el número celular y sugieren que posiblemente los superóxidos se incrementan brevemente antes o durante la muerte celular, por lo que algo similar pudiera estar ocurriendo en las células MCF-7 tratadas con la DHEA.

Como se observó un efecto tóxico de la DHEA al incrementar la reducción del MTT, se evaluó su efecto en la muerte celular. La DHEA no indujo la activación de la caspasa 3 y por lo tanto, no se observó un rompimiento de la PARP; sin embargo, a pesar de que no se observó fragmentación en escalera del ADN, éste se degradó, lo que indica un daño al mismo. Posiblemente la DHEA induzca un proceso de muerte tardía que no pudo ser observada a los tiempos evaluados ó es probable que las MCF-7 en presencia de la DHEA sufran algún daño a nivel mitocondrial y del ADN que pueda ser reparado posteriormente, evitando que la célula muera, como lo han sugerido Zhang y col. (2002) en donde demuestran que el daño al ADN inducido por la DHEA puede ser

reparado. Existen trabajos que demuestran que la DHEA es capaz de inducir apoptosis en las células BV-2 (Yang et al, 2002); sin embargo, también se ha descrito un efecto protector de la DHEA contra la apoptosis en células neuronales (Zhang et al, 2002). Es posible que asimismo la DHEA inhiba la liberación del citocromo C de la mitocondria, el cual activa a las caspasas 3 para un subsecuente rompimiento de la PARP (Lui et al, 1996).

En este trabajo se demostró que la DHEA inhibió la proliferación de las células MCF-7 a concentraciones micromolares y la estimuló a concentraciones nanomolares, sin posible transformación a testosterona y estradiol. Esta inhibición se asoció a una disminución en la síntesis del ADN. A pesar de que se observó un aumento en la capacidad de reducción del MTT por las células, no se encontró muerte celular dependiente de la activación de la caspasa 3 a los tiempos analizados, aunque si se observó la degradación del ADN. Es probable que algunos de los mecanismos de acción de la DHEA en su protección contra el cáncer sean: 1) inhibir la proliferación de las células tumorales, 2) inducir un daño a nivel mitocondrial e 3) inducir un proceso de muerte a tiempos tardíos (más de 4 días de tratamiento).

## CONCLUSIONES

- La DHEA inhibió el crecimiento de las células MCF-7 a concentraciones micromolares y la estimuló a concentraciones nanomolares de manera dosis dependiente.
- La DHEA-S no tuvo efecto alguno sobre la proliferación de las células MCF-7.
- La testosterona inhibió débilmente la proliferación de las MCF-7 a 100  $\mu\text{M}$ .
- El estradiol estimuló la proliferación de las células MCF-7 a concentraciones nanomolares.
- El efecto antiproliferaivo de la DHEA se asoció a una disminución en la incorporación de la timidina tritiada, por lo tanto, a una disminución en la síntesis del ADN.
- La DHEA incrementó la reducción del MTT a 25  $\mu\text{M}$  induciendo toxicidad.
- Mientras que la exclusión por azul de tripano mostró que este efecto tóxico producido por la DHEA a 25  $\mu\text{M}$  no afectó la viabilidad celular.
- La DHEA no indujo muerte celular dependiente de la activación de la caspasa 3, pero sí degradación del ADN.

## REFERENCIAS

- Ackerman G.E., Smith M.E., Mendelson C.R., MacDonald P.C., Simpson E.R. (1981). Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cell in monolayer culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53:412-417.
- American Type Culture Collection (ATCC). (2002). HTB-22.
- Andò S., F. De Amicis., V. Rago., A. Carpino., M. Maggiolini., M.L. Panno., M. Lanzino. (2002). Breast cancer: from estrogen to androgen receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 193 :121-128.
- Ashkenazi A., Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308.
- Baulieu E. E. (1996). Dehydroepiandrosterone (DHEA): a fountain of youth? *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 81:3147-3151.
- Berne M. R., Levy N.H. (1995). *Fisiología*. Editorial Mosby/Doyna libros, España. pp 550-559.
- Billich A., Nussbaumer P., Lehr P. (2000). Stimulation of MCF-7 breast cancer cell proliferation by estrone sulfate and dehydroepiandrosterone sulfate: inhibition by novel nonsteroidal steroid sulfatase inhibitors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 73:225-235.
- Bocuzzi G., Brignardello E., Di Monaco M., Forte C., Leonardi L., Pizzini A. (1992). Influence of dehydroepiandrosterone and 5-en-androsten-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol on the growth of MCF-7 human breast cancer induced by 17 $\beta$ - estradiol. *Anticancer Res.*12: 799-804.
- Bratton S. B., MacFarlane M., Cain K., Cohen M. G. (2000). Protein Complexes Activate Distinct Caspase Cascade in Death Receptor and Stress-Induced Apoptosis. *Exp. Cell. Res.* 256:27-33.
- Brian E. H., Heather S. F. (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21:427-433.
- Brodie A., Inkster S. (1993). Aromatase in the human testis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44:549-555.
- Darnell J., Lodish H., Baltimore D. (1993). *Biología celular y molecular*. 2ª. Edición, Ediciones Omega. Barcelona, España. pp. 769.

De Waard F., Cornelius J.P., Aoki K., Yoshida M. (1977). Breast incidence according to weight and height in two cities of the Netherlands and in Aichi Prefecture, Japan. *Cancer* 40:1269-1275.

Di Monaco M., Pizzini A., Gatto V., Leonardi L., Gallo M., Brignardello E., Bocuzzi G. (1997). Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition in the antiproliferative effects of dehydroepiandrosterone on human breast cancer cells. *British J. Canc.* 75: 589-592.

Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H. (1999). Mammalian caspases: Structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 383-424.

Ebeling P., Koivisto V. (1994). Physiological importance of dehydroepiandrosterone. *Lancet* 343:1479-1481.

Eisen A., Weber BL. (1998). Recent advance in breast cancer biology. *Curr. Opin. Oncol.* 10:486-491.

Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwa A., Nagata S. (1998). A caspase-activated DNase to grades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. 391:43-50.

Feo F., Pascale R M., Simile M.M., De Miglio M.R. (2000). Role of dehydroepiandrosterone in experimental and human carcinogenesis. In: Kalimi, M., Regelson W. (Eds.), *Dehydroepiandrosterone (DHEA). Biochemical, Physiological and Clinical Aspects.* Gruyter, Berlin, pp. 215-236.

Finn G. (2001). *Histología sobre bases biomoleculares.* 3ª edición . Editorial Médica panamericana, España. pp.13,602-604.

Gadsby J.E., Heap R.B., Burton R.D. (1980). Oestrogen production by blastocyst and early embryonic tissue of various species. *J. Reprod. Fertil* 60:409-417.

Ganong F.W. (1996). *Fisiología Médica.* 15ª edición. Editorial El Manual Moderno. México, D.F. pp.402-410.

Generich D., Hoff M. (1982). Evidence for a crossover in breast cancer risk factors. *Am. J. Epidemiol* 116:737-742.

Gomes P., Cassanas G., Halberg F., Hermida R., Robel P., Baulieu EE., Lakatua d., Haus e. (1988). Blood concentration of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) classifies for the risk of developing breast cancer. *CR Acad Sci Paris* 306:361-264.

Gómez E., Mendoza C., Ibarra Ma. De Jesús., Ventura JL., Zentella A. (1996). Ceramide Reproduces Late of Oxidative Stress during TNF-Mediated Cell Death in L929 Cells. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 228: 505-509.

- Gordon G.B., Newitt J.A., Shant L.M., Weng D.E. Talayay P. (1981). Inhibition of the conversion of 3T3 fibroblast clones to adipocytes by dehydroepiandrosterone and related anticarcinogenic steroids. *Canc. Res.* 46:3389-3395.
- Green D.R., Reed J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
- Green LM., Reade JL., Ware CF.(1984). Rapid colorimetric assay for cell viability: Aplication to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods* 70: 257-268.
- Greenspan S., Gordon J. (1998). *Endocrinología básica y clínica*. Edit. El manual moderno, México, D.F. pp. 461-466; 502-504.
- Hackenberg R., Turgetto., Filmer A., Schulz K. (1993). Estrogen and androgen receptor mediated stimulation and inhibition of proliferation by androst-5-ene-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol in human mammary cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46: 597-603.
- Hayashi T., Esaki T., Muto E., Kano H., Asai Y., Kumar N., Sumi D., Jayachandran M., Iguchi A. (2000). Dehydroepiandrosterone Retards Atherosclerosis formation Through Its Conversion to Estrogen. The possible Role of Nitric Oxide. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 782-792.
- Kaufmann S. H., Earnshaw W.C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell Research* 256: 42-49.
- Kelsey J., Horn-Ross P. (1993 a). Breast cancer: Magnitude of the problem and descriptive epidemiology. *Epidemiol. Rev.* 5:7-16.
- Kelsey J., Gammon M., John E., (1993 b). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol. Rev.* 15:36-47.
- Kueng W., Silber E., Eppenberg V. (1989). Quantification of Cells Cultured on 96-well Plates. *Anal. Biochem.* 186:643-665.
- Labrie, F. (1991). Intracrinology. *Mol. Cell. Endocrinol.* 78: C113-C118.
- Labrie F., Luu-The V., Lin SX., Simard J., Labrie C., El-Alfy M., Pelletier G., Bélanger A. (2000). Intracrinology: role of the family of 17 $\beta$ -hidroxisteriod dehydrogenases in human physiology and disease. *J. Mol. Endocrinol.* 25: 1-16.
- Lazcano E, Tovar V, Alonso-de Ruiz P, Romieu I, López L. (1982) Cáncer de mama: Un hilo conductor histórico, presente y futuro. *Salud Publica Mex.* 38:139-152.

Leowattana W. (2001). DHEA(S): The fountain of youth. *J. Med. Assoc. Thai.* 84 Suppl.2:5.

Li M., Wu X., Xiao-Chun X. (2001). Induction of apoptosis by cyclo-oxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome C-dependent pathway in esophageal cancer cells. *Int. J. Canc* 93:218-223.

Lui X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X. (1996). Inducción of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C. *Cell* 86:147-57.

Liu D., Dillon S. J. (2002). Dehydroepiandrosterone activates Endothelial Cell Nitric-Oxide Synthase by a Specific Plasma Membrane Receptor Coupled to G  $\alpha_{12,3}$ . *J. Biol. Chem.* 24:277-81.

Loeffer M., Kroemer G. (2000). The Mitochondrion in Cell Death Control: Certainties and incognita. *Exp. Cell Res.* 256: 19-26.

López-Rios O., Lazcano-Ponce E.C., Tovar Guzmán V., Hernández-Avila A. (1997). La epidemia de cáncer de mama en México. ¿Consecuencia de la transición demográfica?. *Salud Pública Mex.* 39:259-265.

Maggiolini M., Donzé O., Jeannin E., Ando S., Picard D. (1999). Adrenal Androgens Stimulate the Proliferation of Breast Cancer Cells as Direct Activators of Estrogen receptor  $\alpha$ . *Can. Res.* 59: 4864-4869.

Maggiolini M., Carpio A. Bonofiglio D., Pezzini V., Rago V., Marisco S., Picard D., Andò S. (2001). The direct proliferative stimulus of dehydroepiandrosterone on MCF-7 breast cancer cells is potentiated by overexpression of aromatasa. *Mol. Cell Endocrinol.* 184:163-171.

Martinou J. C., Desagher S., Antonsson B. (2000). Cytochrome C release from mitochondria: all or nothing. *Nat. Cell Biol.* 2:E41-3.S

Miller WL. (2002). Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Mol. Cell Endocrinol.* 198: 7-14.

McNatty K.P., Makris A., DeGrazia C., Osathanondh R., Ryan, K.J. (1979). The production of progesterona, androgens, and estrogens by granulosa cell, thecal tissue, and stromal tissue from human ovarios in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49:687-699.

Najid A., Habrioux G. (1990). Biological Effects of Adrenal Androgens on MCF-7 and BT-20 Human Breast Cancer Cells. *Oncology* 47:269-274.

Nelson L.D; Cox M.M., Lehninger L.A (2001). Principios de bioquímica. Ediciones. Omega. Barcelona. pp.379,468,469,884-894.

Pizzini A., Brignardello E., Leonardi L., Di Monaco M., Boccuzzi G. (1992). Aromatase fails to mediate the proliferative effects of adrenal androgens on cultured MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* 1: 709-712.

Reed J.C. (2001). Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol. Med.* 7:314-319.

Regelson W., Kalimi M., Loria R. (1990) DHEA: Some thoughts as to its biologic and clinical action. In: Kalimi, M. And Regelson, W. (eds) *The biologic role of Dehydroepiandrosterone (DHEA)*. Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York, pp. 405-445.

Salve-Villedieu FR., Lavertu J., Sasco A. (1995). L'influence de l'âge au premier accouchement sur la mortalité par cancer du sein: Une méthode d'estimation. *Population* 3:844-856.

Sasano H., Haranda N. (1998). Intratumoral aromatase in human breast, endometrial, and ovarian malignancies. *Endocr. Rev.* 19:593-607.

Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers, G. M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446

Schwartz A. G. (1979). Inhibition of spontaneous breast cancer formation in female C3H (Avy/a) mice by long-term treatment with dehydroepiandrosterone. *Cancer Res.* 39:1129-1132.

Schwartz A. G., Pashko L., Whitcomb J.M. (1986). Inhibition of tumor development by dehydroepiandrosterone and related steroids. *Toxicol. Pathol.* 14: 357-362.

Schmidt M., Kreutz M., Loffler G., Scholmerich J., Straub RH. (2000). Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. *J. Endocrinol* 164:161-169.

Schmitt M., Klinga K., Schnarr B., Morfin R., Mayer D. (2001). Dehydroepiandrosterone stimulates proliferation and gene expression in MCF-7 cells after conversion to estradiol. *Mol. Cell Endocrinol* 173:1-2.

Simpson E.R., Khao Y., Agarwal V.R., Micahel M.D., Bulun S.E., Hinshelwood M.M., Graham-Lorence S., Sun T., Fisher C.R., Qin k., Mendelson C.R. (1997). Aromatase expression in health and disease. *Rec. Prog. Horm. Res.* 52:185-213.

- Smith-Warner S., Spiegelman D., Yaun S.S. (1998). Alcohol and breast cancer in women. A pooled analysis of cohort studies. *J. Am. Med. Assoc.* 279:535-540.
- Steckerlbroeck S., Heidrich D.D., Stoffel-Wagner B., Hans V.H.J., Schramm J., Bidlingmaier F., Klingmüller D. (1999). Characterization of aromatase cytochrome p450 activity in the human temporal lobe. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:2795-2801.
- Tanaka Y., Kuwabara K., Okazaki T., Fujita T., Oizimil I., Kaiho S., Ogata E. (2000). Gonadotropins stimulate growth of MCF-7 human breast cancer cells by promoting intracellular conversion of adrenal androgens to estrogens. *Oncology* 59 Suppl 1.
- Tovar Guzmán V. (1996). Factores de riesgo por cáncer de mama en mujeres mexicanas. Un estudio de casos y controles hospitalarios. Tesis de maestría. México, D.F.: UNAM.
- Tresguerres J.A.F. (1999). Fisiología humana. 2ª Edición, editorial Mc Graw Hill. España. pp 932-934.
- Van Landeghem A.A., Poortman J., Nabuurs M., Thijssen J.H. (1985). Endogenous concentration and subcellular distribution of androgens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res.* 4:2907-2912.
- Wang D.Y., Bulbrook R.D., Hayward J.L. (1975). Urinary and plasma androgens and their relation to familial risk of breast cancer. *Eur J. Cancer.* 11: 873-877.
- Wang D.Y., Moore J. W., Thomas B.S., Bulbrook R.D., Hoare S.A., Tong D., Hayward J.L. (1979). Plasma and urinary androgens in women with varying degrees of risk of breast cancer. *Eur. J. Cancer.* 15: 1269-1274.
- Watson R. Huls A., Araghinam M., Chung S. (1996). Dehydroepiandrosterone and diseases of aging. *Drugs Aging* 9:274-291.
- Williams JR. 2000. The effects of dehydroepiandrosterone on carcinogenesis, obesity, the immune system, and aging. *Lipids* 35:325-31.
- Wright S.C., Kumar P., Tam A.W., Shen N., Varma M., Larrick J.W. (1992). Apoptosis and DNA fragmentation precede TNF induced cytolysis in U937 cell. *J. Cell Biochem.* 48: 344-355
- Yang NC., Jeng KC., Ho WM., Hu ML. (2002). ATP depletion is an important factor in DHEA-induced growth inhibition and apoptosis in BV-2 cells. *Life Sci.* 70:1979-88.
- Yen S.C.S., Jaffe B.R., Barbieri L. R. (1999). Endocrinología de la reproducción, fisiología, fisiopatología y manejo clínico., editorial Médica Panamericana. 4ª edición. Montevideo, Uruguay.

- Yen S.S., Laughlin G.A. (1998). Aging and the adrenal cortex. *Exp. Gerontol.* 33:897-910.
- Yu H., (1998). Alcohol consumption and breast cancer risk. *J. Am. Med. Assoc.* 280: 1138-1139.
- Zumoff B., Levin J., Rosenfield R.S., Markham M., Srain G.W., Fukushima D. K. (1981). Abnormal 24 h mean plasma concentrations of dehydroepiandrosterone sulphate in women with primary operable breast cancer. *Cancer Res.* 41:3360-3363.
- Zhang L., Li B., Ma W., Barker JL., Chang YH., Zhao W., Rubinow D.R. (2002). Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated derivative (DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the Akt signaling pathway in opposing ways. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 98:58-66.

## SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.

### APENDICE 1

#### Medio nutritivo para cultivo de células animales RPMI-1640

Este medio fue utilizado para mantener a la línea celular MCF-7 en condiciones fisiológicas estables. Dicho medio contiene los siguientes componentes:

Aminoácidos	mg/l
L-Arginina (libre de base)	200
L-Asparagina (anhidra)	50
L-Aspártico	20
L-Cistina 2 HCl	65.20
L-Ácido Glutámico	20
L-Glutamina	300
Glicina	10
L-Histidina (libre de base)	15
L-Hidroxiprolina	20
L-Isoleucina	50
L-Leucina	50
L-Lisina HCl	40
L-Metionina	15
L-Fenilalanina	15

L-Prolina	20
L-serina	30
L-Treonina	20
L-Triptofano	05
L-Tirosina 2 Na	28.83
L-Valina	20

<b>Vitaminas</b>	<b>mg/l</b>
Biotina	0.20
D-Pantotenato	0.25
Ácido Fólico	0.3
Cloruro de Colina	01
Mio-Inositol	35
Niacienamida	01
PABA	01
Piridoxina HCl	01
Riboflavina	0.20
Tiamina HCl	0.1
Vitamina B12	0.005

<b>Sales Inorgánicas</b>	<b>mg/l</b>
Nitrato de Calcio 4H <sub>2</sub> O	100
Cloruro de Potasio	400
Cloruro de Sodio	6000
Sulfato de Magnesio	48.84
Fosfato de Sodio dibásico (anhidro)	80

<b>Otros compuestos</b>	<b>mg/l</b>
D-Glucosa	2000
Glutación reducido	01
Rojo fenol, Na	05
HEPES	5958

**Modo de prepararse:** en 950 ml de agua bidestilada se diluyen 10.39 g de RPMI-1640 (Sigma Chemical company. ST. LOUIS, MO. USA), se adicionan 2.2 g de bicarbonato de Sodio (NaHCO<sub>3</sub>) y 0.30 g de L-Glutamina. Se afora a un volumen de 1000 ml, agitándose hasta disolver. Se ajusta el pH del medio de 7.2 – 7.4, se esteriliza con un filtro de membrana de 0.22 µm. Finalmente se almacena a 4°C para su posterior uso.

## APÉNDICE 2

### Solución Amortiguadora de HEPES 20 X

Esta solución se utilizó para los lavados frecuentes de las células MCF-7.

Componentes	g/l
NaCl	166
KCl	6.6
HEPES	52.36
Glucosa	44

**Modo de preparación:** en 500 ml de agua destilada se diluyen 166 g de NaCl, 6.6 g de KCl y 44 g de Glucosa, se ajusta el pH a 7.5 y se afora a 1000 ml de agua, y finalmente se esteriliza a vapor. Al momento de usar se prepara una solución 1 X.

## Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

Esta solución se usó para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos de tiempo. La capacidad amortiguadora es proporcionadas por las sales de fosfatos. Los componentes químicos se diluyen en un volumen final de 1000 ml de agua pentadestilada.

Componentes	g
Cloruro de Magnesio	0.1
Cloruro de Calcio	0.1
Cloruro de Sodio	8
Cloruro de Potasio	0.2
Fosfato ácido de Sodio	2.16
Fosfato diácido de Potasio	0.2

En la mayoría de las ocasiones se prescindió del Calcio y Magnesio, estas sales no fueron indispensables para la finalidad en este trabajo. Las restantes sales se diluyen en 800 ml de agua bidestilada por agitación. Posteriormente se afora a un volumen final de 1000 ml y esta solución se ajusta a un pH de 7.2 – 7.4, la solución amortiguadora se esteriliza utilizando filtros de membrana (Milipore, USA), con un poro de 0.22  $\mu\text{m}$  o por medio de vapor. Finalmente la solución se almacena a una temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

## **APENDICE 3**

### **Preparación del colorante cristal violeta para medir proliferación**

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6; la cual consiste en agregar 3.96 g de NaOH y 4.28 ml de ácido fórmico aforados a 500 ml con agua bidestilada. Una vez preparada la solución de cristal violeta es filtrada y posteriormente usada (Kueng et al, 1989).

## **APENDICE 4**

### **Tripsina al 0.05 %**

La enzima tripsina se utilizó para desprender a las células de los platos de cultivo. Esta se preparó disolviendo 0.025 g de tripsina (Sigma,USA) en 500 ml de Verseno, todo en condiciones de esterilidad. La solución se conserva en refrigeración hasta el momento de su uso.

## **Solución fisiológica de Verseno**

El Verseno se preparó de la siguiente manera: En 800 mililitros de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias:

<b>Componentes</b>	<b>g</b>
Tris base	3.04
Cloruro de Sodio	8.00
Cloruro de potasio	0.04
Etilen-diamino-tetra-acético (EDTA)	0.20

El pH se ajusta a 7.7 con ácido clorhídrico 10 N, se lleva el volumen a 1 litro y se esteriliza en autoclave a 20 libras de presión durante 20 min.

## **Desactivación del Suero Fetal Bovino (SFB)**

Se tomó una botella de suero fetal bovino (Hyclone,USA) y se colocó en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasó a un baño maría a 57°C durante 30 min. Posteriormente es transvasado en alícuotas de 100 ml para su mejor uso.

## **APENDICE 5**

### **Colorante azul tripano**

Para medir viabilidad, se empleó una dilución del colorante Azul de tripano (Sigma, USA), al 0.3% en PBS, antes de utilizarlo, el colorante fue filtrado con papel filtro del número 2 (Whatman, England).