



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

LA DEHIDROEPIANDROSTERONA  
(DHEA) INDUCE APOPTOSIS DE  
FIBROBLASTOS PULMONARES  
HUMANOS

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

ANA MAYELA VALERO JIMÉNEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CRISELDA MENDOZA MILLA

COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS LARRALDE RANGEL, DRA. ANNIE  
PARDO SEMO

TUTOR INVITADO: M. en C. MOISÉS SELMAN LAMA



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.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 03 de octubre de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **VALERO JIMÉNEZ ANA MAYELA** con número de cuenta **300024577**, con la tesis titulada **"LA DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) INDUCE APOPTOSIS DE FIBROBLASTOS PULMONARES HUMANOS"**, realizada bajo la dirección de la DRA. CRISELDA MENDOZA MILLA.

|             |      |                             |
|-------------|------|-----------------------------|
| Presidente: | DR.  | CARLOS LARRALDE RANGEL      |
| Vocal:      | DR.  | LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  |
| Secretario: | DRA. | ANNIE PARDO SEMO            |
| Suplente:   | DRA. | REBECA LÓPEZ MARURE         |
| Suplente:   | DR.  | JULIO EDUARDO MORÁN ANDRADE |

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 5 de enero de 2012

*M. del Coro Arizendi*  
**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA**

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A CONACYT por el apoyo recibido a través:

- de la beca de la convocatoria titulada “CONVOCATORIA DE BECAS CONACYT NACIONALES AGOSTO-OCTUBRE 2009”.
- del financiamiento aprobado para el proyecto de investigación “DEHIDROEPIANDROSTERONA: ESTUDIO DE SUS POSIBLES MECANISMOS MOLECULARES ANTIFIBROSANTES Y SU IMPORTANCIA COMO BIOMARCADOR” con la clave CONACYT SALUD-2009-C01-113590.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER) por facilitar las instalaciones necesarias para llevar a cabo este proyecto y por el apoyo recibido a través de la evaluación y aprobación del presente estudio por el Comité de Ciencia y Bioética en Investigación del INER con el código B3109.

Un agradecimiento especial a mi Tutora Principal la Dra. Criselda Mendoza Milla y a todos los miembros de mi Comité Tutor: Dr. Carlos Larralde Rangel, Dra. Annie Pardo Semo y M. en C. Moisés Selman Lama por enriquecer este proyecto y mi formación con su conocimiento.

## **Agradecimientos a título personal**

Toda mi gratitud y admiración para mi Tutora Principal, Dra. **Criselda Mendoza Milla**, quién recorrió conmigo y muy de cerca todo este proceso. Mil gracias por todas las enseñanzas, el apoyo y la paciencia, por tu disposición para escuchar y debatir, pero principalmente por la confianza que depositaste en mí y por brindarme tu valiosa amistad que sabes que es correspondida con un gran cariño.

Un agradecimiento especial a la **Dra. Blanca Ortiz** y a la **Dra. Lourdes Barrera** del INER por su apoyo con los experimentos de citometría de flujo referentes a apoptosis. Agradezco a la Dra. Lourdes Barrera también por su disposición y sus explicaciones que me ayudaron a comprender mejor lo referente a la citometría y el citómetro.

A **Violeta Morales** y **Joel** por el trabajo que realizaron en los experimentos de tinción con cristal violeta. A Vio además por la compañía, por las largas pláticas y las carcajadas. ¡Se te quiere vieja!

**Alfredo Lozano Bolaños**: por haberme ayudado en mis pininos de cultivo celular y en todo lo que estaba a tu alcance, así como por la amistad que me brindaste desde el primer día en que llegué al INER... ¡gracias bicho!

A **Iliana Herrera** y **José Cisneros**: mil gracias porque siempre tuvieron la mejor disposición de ayudarme y orientarme cuando me encontraba a la deriva con mis dudas. Gracias también por las risas y por su amistad que hizo bello el trabajar en el mismo espacio.

A **Patricia Zurita** por tu amable disposición y sincera preocupación por los estudiantes, por tu ardua labor en mantener limpio y en orden tanto el laboratorio como el material de trabajo. ¡Gracias Patito!

A todas la personas que conforman el **Laboratorio de Biología Celular** del INER, por su acogida cordial y por hacer amenas las largas estancias en el laboratorio.

**Anita Vega Miranda:** por el aliento y el apapacho caluroso que siempre nos hacen tanto bien, por escucharme y brindarme la confianza de escucharte también... y por tantas y tantas tardes divertidas de la “mancuerna cultural” jeje ¡y las que nos faltan! ¡Gracias amiguiux!

A mis **padres, hermanos y familia** en general porque a pesar de la distancia son el apoyo incondicional y la fuerza constante que me impulsa a seguir.

A todos mis amigos entrañables que, sin estar vinculados directamente con este proyecto, han sido una parte importante en su realización. Gracias porque el tiempo pasa pero ustedes siguen ahí apoyándome en cada paso que doy:

**Erandi:** por compartir mi cerebro y ser ese corazón que incansablemente alienta al mío a sentir.

A los Bernal Gómez por su cariño, por permitirme ser parte de su vida y su familia. A **Charly:** por tus incontables ocurrencias con las que siempre sabes hacer reír. A **Edna:** por tu inquebrantable cordura y franqueza. A **Alma:** porque seguimos creciendo juntas y porque a pesar de los repentinos olvidos sabemos que siempre contamos con ese hombro amigo.

**Sathya, Karla, Pancho y Chabe:** por ese peculiar modo de ser que hace que tan solo nosotros nos aguantemos jaja y que tanto disfruto, por compartir conmigo sobre las peripecias de la ciencia y de la vida. ¡Que nuestra amistad siga creciendo!

**Alicia Rodriguez:** por soportarme y ser una excelente roomie, porque en estos dos años de trabajo hemos pasado un poco de todo pero siempre con una sonrisa, ¡gracias mi reina!

A mis **prim@s:** por ser mis amigos de toda la vida, porque sin importar el tiempo y la distancia siempre estamos en los momentos importantes. Gracias por entender y soportar las largas ausencias que a pesar mío se dan, porque al regreso siempre encuentro brazos abiertos y buenos momentos. Y gracias también por conocerme y no dejarme olvidar quién soy ni de dónde vengo. ¡Los quiero, esta va por ustedes!

*A mis primos*

*Y si las gracias no pudiese daros  
porque profundamente ya me hubiese dormido,  
bien sabréis que lo intento  
con labios de granito.*

*Emily Dickinson*

# Índice general

|   |    |
|---|----|
| Abreviaturas .....  | 9  |
| Resumen .....   | 11 |
| Abstract .....  | 12 |
| Introducción .....  | 13 |
| Fibrosis Pulmonar Idiopática .....  | 13 |
| Dehidroepiandrosterona.....   | 15 |
| Apoptosis.....  | 19 |
| Fibrosis Pulmonar Idiopática y Dehidroepiandrosterona .....                         | 22 |
| Justificación .....   | 23 |
| Hipótesis.....  | 24 |
| Objetivo general .....  | 24 |
| Objetivos particulares.....   | 24 |
| Metodología.....  | 25 |
| Cultivo Celular .....   | 25 |
| Determinación del número celular .....  | 25 |
| Proliferación celular .....   | 26 |
| Detección de apoptosis por citometría de flujo (Anexina V) .....                    | 28 |
| Western Blot .....  | 30 |
| Actividad de la caspasa 8 por colorimetría. ....                                    | 31 |
| Actividad de la caspasa 9 por fluorometría. ....                                    | 32 |
| Análisis estadístico.....   | 33 |
| Resultados .....  | 34 |
| La DHEA disminuye el número de fibroblastos pulmonares humanos normales.....        | 34 |
| La DHEA disminuye la proliferación de fibroblastos pulmonares humanos normales..... | 36 |

|  |    |
|--|----|
| La DHEA induce apoptosis en fibroblastos pulmonares humanos normales de la línea CCD25Lu. .... | 38 |
| La DHEA disminuye los niveles de la procaspasa 8. ....   | 39 |
| La DHEA induce la activación de la caspasa 9. ....   | 40 |
| La DHEA modula moléculas anti- y pro- apoptóticas.....   | 43 |
| Moléculas antiapoptóticas.....   | 43 |
| Moléculas proapoptóticas.....  | 46 |
| Discusión.....   | 47 |
| Conclusiones.....  | 52 |
| Perspectivas.....  | 53 |
| Referencias.....   | 54 |
| ANEXO.....   | 59 |
| Tablas del Análisis Estadístico.....   | 59 |

## Abreviaturas

Akt = proteína cinasa C (PKC)

aro = aromatasas

ATP = adenosín trifosfato

BrdU = bromodesoxiuridina

DHEA = dehidroepiandrosterona

DHEAS = dehidroepiandrosterona sulfato

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium

DOC = desoxicorticosterona

ERK = cinasa regulada por señales extracelulares

FPI = fibrosis pulmonar idiopática

GSK3  $\beta$  = glucógeno sintasa cinasa 3  $\beta$

HK = hexocinasa

HRP = peroxidasa (POD)

HSD = deshidrogenasa de hidroesteroides

HSD = oxidoreductasa de hidroesteroides

HSD = sulfatasa de hidroesteroides

IGF-I = factor de crecimiento insulínico I

I $\kappa$ B = inhibidor de kappa B

JNK = cinasa c-Jun N-terminal

KSR = reductasa de cetoesteroides

MAPK = proteína cinasa activada por mitógeno

MEC = matriz extracelular

NF- $\kappa$ B = factor nuclear kappa-cadena ligera-potenciador de linfocitos B activados

NID = neumopatías intersticiales difusas

PBS = solución amortiguadora de fosfatos

PDGF = factor de crecimiento derivado de plaquetas

PI3K = cinasa de fosfoinosítido 3

P-S = pregnenolona sulfato

R = reductasa

RE = retículo endoplásmico

ROS = especies reactivas de oxígeno

scc= corte de la cadena lateral (side-chain cleavage)

SFBI = suero fetal bovino inactivado

SH = sulfhidrolasa

TGF  $\beta$  = factor de crecimiento transformante  $\beta$

THDOC = tetrahidrodexocorticosterona

THP = tetrahidroprogesterona

TMB = tetrametil-benzidina

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

## Resumen

La dehidroepiandrosterona (DHEA) es una hormona esteroide que se produce principalmente en la corteza de las glándulas suprarrenales. Junto con su forma sulfatada (DHEAS), en humanos, es el esteroide más abundante en la circulación cuya concentración plasmática disminuye fisiológicamente con la edad y es un precursor clave en la síntesis de andrógenos y estrógenos. Estudios previos en nuestro laboratorio demuestran que la concentración de la DHEA disminuye significativamente en pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) respecto a controles sanos. La FPI es una enfermedad progresiva, irreversible y letal asociada al envejecimiento que se caracteriza por un aumento en la migración/proliferación de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos. Se ha sugerido que dichas células presentan resistencia a la apoptosis y se ha observado que la dehidroepiandrosterona (DHEA) es capaz de inducir muerte celular por apoptosis en diversos tipos celulares. En este contexto, el presente estudio pretende evaluar la capacidad de la DHEA de inducir apoptosis de fibroblastos pulmonares humanos con miras hacia nuevas estrategias terapéuticas contra la FPI.

En esta investigación, la DHEA produjo una disminución estadísticamente significativa en el número de fibroblastos pulmonares humanos tratados con la hormona. De manera notable, dicha disminución se debió tanto a inhibición de la proliferación como a la inducción de apoptosis, siendo ésta última mediada por la activación de la caspasa 9. Tanto los efectos sobre la proliferación como de inducción de apoptosis pueden estar relacionados con la inhibición de la fosforilación de Akt.

De este modo, queda claro que la DHEA es una hormona con efectos antifibrosantes potenciales, ya que ataca dos de los principales procesos que caracterizan el fenotipo de los fibroblastos/miofibroblastos en FPI: resistencia a apoptosis y proliferación desregulada. Estudios como el presente son de vital importancia porque analizan el problema desde perspectivas distintas a las establecidas tradicionalmente, en las que la inflamación se consideraba un hecho fundamental en el desarrollo de esta patología.

## **Abstract**

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulphate ester, DHEAS, are the most abundant steroid hormones in human circulation produce by the adrenal cortex. Its secretion declines with ageing and is a key molecule in the synthesis of androgens and estrogens. Previous studies in our laboratory show that DHEA concentration significantly decreases in patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) compared to healthy controls. IPF is a chronic, progressive and usually lethal lung disorder characterized by increased proliferation/migration of fibroblasts and their differentiation into myofibroblasts, with a consequent accumulation of extracellular matrix. It has been suggested that these cells are apoptosis resistant and that DHEA is capable of inducing cell death by apoptosis in different cell types. In this context, this study aims to evaluate DHEA's ability to induce human lung fibroblasts apoptosis with a view to new therapeutic strategies against IPF.

Our results show a significantly decrease in number of fibroblasts stimulated with DHEA. This decrease was due to both apoptosis and proliferation inhibition. Apoptosis was mediated by caspase-9 activation and both effects appear to be related with inhibition of Akt phosphorylation.

Thus, DHEA could be a hormone with potential antifibrotic effects, since it attacks two major processes that characterized the fibroblasts/myofibroblasts phenotype in IPF: resistance to apoptosis and deregulated proliferation. Studies like this are very important because they address the problem from different perspectives with respect to the traditional approach in which inflammation was considered a fundamental process for development of IPF.

## Introducción

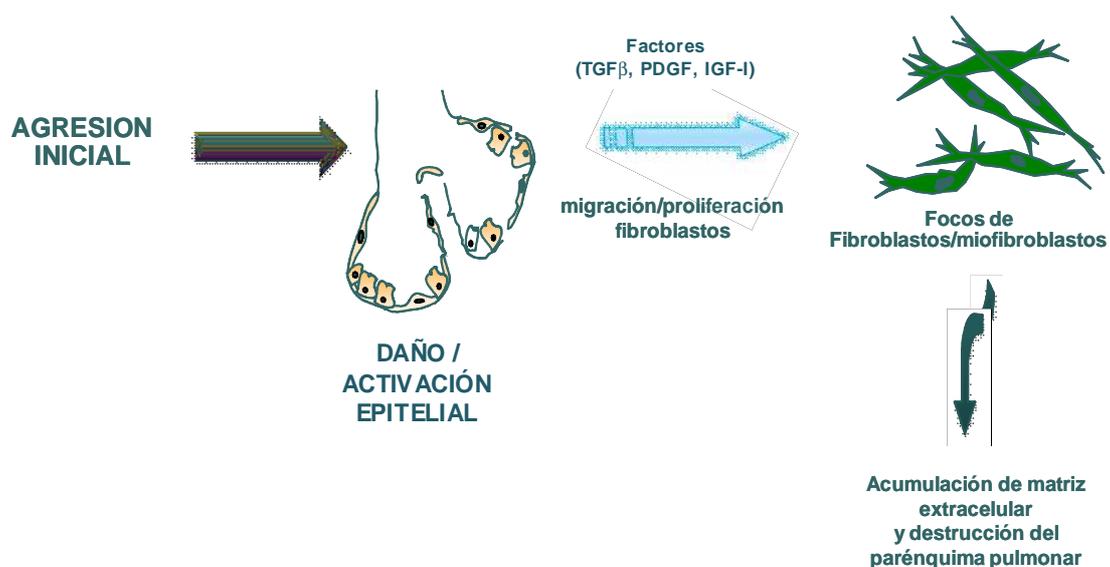
### *Fibrosis Pulmonar Idiopática*

Las neumopatías intersticiales difusas (NID), también conocidas como enfermedades fibrosantes de pulmón, son diferentes padecimientos respiratorios subagudos crónicos que comparten el hecho de responder ante un daño con un proceso inflamatorio intersticial e intralveolar difuso, que es seguido por fibrosis o destrucción de las unidades alveolo-capilares [1]. El daño a los tejidos puede resultar de diversos estímulos: infecciones, reacciones autoinmunes, toxinas, radiación y daño mecánico [2]. Y, aunque los cambios fibróticos típicamente son conceptualizados como el engrosamiento fibroso del intersticio (el espacio tisular que se encuentra entre las paredes alveolares), una parte importante de la remodelación del pulmón sucede en los espacios alveolares. Dichos cambios pueden tener efectos dramáticos e irreversibles en la arquitectura pulmonar, resultando en insuficiencia respiratoria progresiva y ocasionando la muerte en pocos años [3].

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la más común de las neumopatías intersticiales de causa desconocida y, de hecho, la más agresiva de todas las enfermedades pulmonares intersticiales difusas [4,5]. Se trata de un padecimiento con una sobrevida promedio de 3 años después de realizado el diagnóstico, cuya prevalencia y mortalidad están aumentando [6,7]. En un estudio reciente que abarcó causas de muerte entre los años 1992-2003 en EUA se observó que la mortalidad por FPI se incrementó 28.4% en hombres y 41.3% en mujeres [7]. El síntoma principal de la FPI es la disnea de esfuerzo progresiva y de evolución insidiosa, además se presenta tos seca o con expectoración mucosa, hiponexia, astenia y baja de peso, siendo la taquipnea un signo constante. Como la causa más común de muerte asociada a FPI se encuentra la progresión de la fibrosis pulmonar y de la insuficiencia respiratoria con el consecuente desarrollo de hipertensión arterial pulmonar y cor pulmonale con sucesivas descompresiones. Otras causas son enfermedad cardiovascular, incluyendo isquemia miocárdica e insuficiencia ventricular izquierda; carcinoma broncogénico;

embolismo pulmonar (3-7%) e infección pulmonar favorecida por el uso de esteroides y agentes citotóxicos (2-4%) [1].

Hasta la fecha se han caracterizado dos rutas distintas para el desarrollo de fibrosis pulmonar difusa. La ruta común a la mayoría de las NID es la ruta inflamatoria. Esta consta primero de una fase de alveolitis y luego de fibrosis en fase terminal e involucra redes de citocinas comunes en los distintos padecimientos. Por esta vía, la interacción entre las células inmunes e inflamatorias y otros mediadores controla el inicio, la progresión y la eventual resolución de la inflamación o el paso a la fibrosis [2,3]. No obstante, se ha señalado que la inflamación no es un evento importante en la FPI [3]. Evidencia de ello es la presencia de alveolitis media/moderada en estados tempranos o avanzados de la enfermedad y la falta de respuesta a terapia anti-inflamatoria potente y de largo plazo [3]. Así, se ha postulado que la FPI, a diferencia del resto de las NID, puede resultar de microdaños epiteliales que llevan a la alteración de la forma, el estado de diferenciación y la función de las células epiteliales [3]. De este modo, la FPI se caracteriza por la lesión y la activación anormal de las células del epitelio alveolar, mismas que provocan la migración y proliferación de fibroblastos y su posterior diferenciación a miofibroblastos, los cuales son los responsables de la acumulación exagerada de matriz extracelular (MEC) con la consecuente destrucción de la arquitectura pulmonar [8,9], todo lo cual constituye la ruta epitelial a la fibrosis pulmonar (Fig. 1).



**Figura 1.** Esquema del daño epitelial y el desarrollo de fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

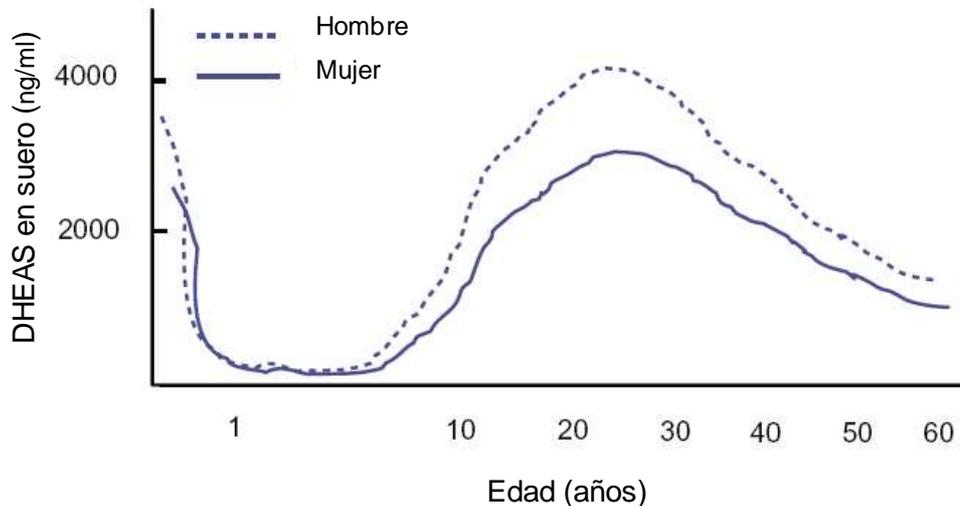
En la FPI, las células del epitelio alveolar contribuyen a la fibrogénesis no sólo por sobreexpresar citocinas profibróticas, sino porque quizás son incapaces de secretar algunos inhibidores de crecimiento de fibroblastos, mismos que adquieren un fenotipo migratorio, proliferativo y profibrótico (miofibroblasto) [3]. Considerar dicho proceso debe ser de primordial importancia al proponer nuevas terapias contra la FPI ya que gran parte de la terapéutica actual se enfoca en la resolución del proceso inflamatorio, situación que la torna inadecuada e ineficiente. Por ejemplo, se ha observado que la terapia inmunosupresiva y con corticosteroides, en la mayoría de los individuos afectados, no previene la acumulación de MEC [10]. La acumulación de MEC es el hecho final común de cualquier desorden fibrótico y la fibrosis ocurre cuando la síntesis de colágena nueva por miofibroblastos excede la tasa a la cual ésta es degradada, de modo que la cantidad total de colágena incrementa con el tiempo [2].

En los últimos años se han desarrollado múltiples investigaciones sobre este padecimiento, algunas enfocadas a conocer la causa del mismo y otras tantas enfocadas a su tratamiento. No obstante, hasta la fecha no ha sido posible desarrollar un tratamiento efectivo contra la FPI.

### ***Dehidroepiandrosterona***

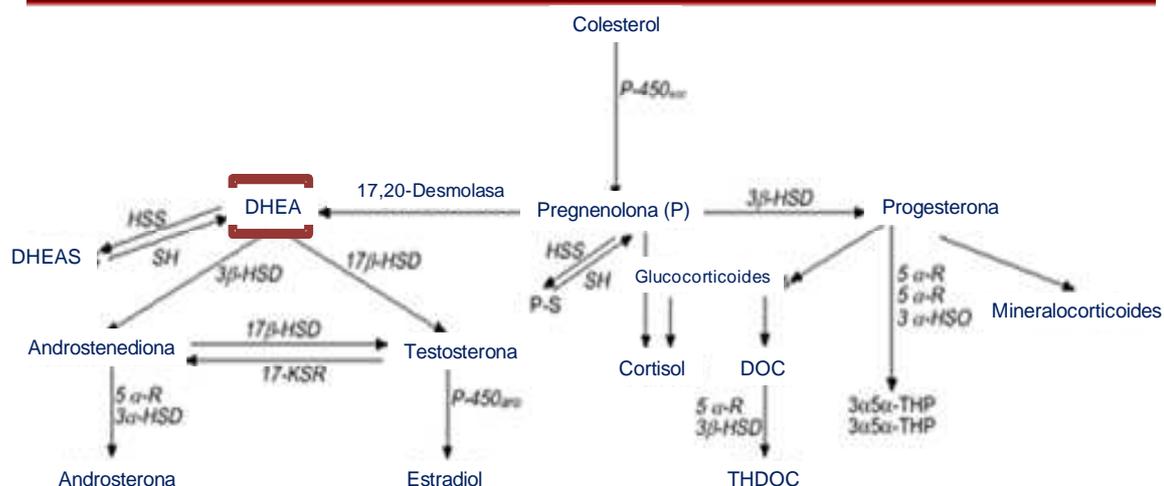
La dehidroepiandrosterona (DHEA), junto con su forma sulfatada (DHEAS), es la hormona esteroide más abundante en la circulación en humanos [11], y es producida principalmente en la corteza de las glándulas suprarrenales, además del cerebro, las gónadas y el tracto gastrointestinal [12,13]. Su secreción presenta un patrón característico asociado a la edad, de manera tal que, inmediatamente después del nacimiento, la concentración de la DHEAS circulante es elevada debido a que es sintetizada por la glándula adrenal fetal. Sin embargo, dicha concentración baja rápidamente y no comienza a subir otra vez sino hasta los 6-10 años de edad [11]. Los niveles máximos de la hormona se alcanzan alrededor de los 25 años (Fig. 2), luego comienzan a descender nuevamente y de manera sostenida, de tal modo que alrededor de los 60 años las concentraciones séricas de la DHEA se encuentran sólo entre el 5-10% de lo observado en adultos jóvenes [11,14]. Este descenso es conocido como “adrenopausia” y es un fenómeno independiente de la menopausia que ocurre tanto en hombres como en mujeres. Otro dato interesante sobre la regulación en los niveles de la dehidroepiandrosterona es que, mientras que la concentración de la

DHEAS no varía a lo largo del día, la secreción de la DHEA sigue un ritmo diurno similar al exhibido por el cortisol [11].



**Figura 2.** Representación gráfica del comportamiento de la concentración promedio de la DHEAS durante la vida humana.  
(Modificado de Arlt W. Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. (2004).18 (3):363-8).

Las hormonas esteroides proceden de tejidos corporales específicos y se dividen en dos tipos: las hormonas sexuales y progestacionales y las hormonas suprarrenales. Todas ellas se sintetizan a partir del colesterol y necesitan un intermediario, la  $\Delta^5$ -pregnenolona (Fig. 3). Este precursor se convierte en dehidroepiandrosterona en las células suprarrenales de la zona reticular mediante la acción de la  $17\alpha$ -hidroxilasa del retículo endoplásmico (RE) para formar  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona que, a continuación, actúa en un sistema de rotura de la cadena lateral carbonada y la convierte en dehidroepiandrosterona. Dicho compuesto se transforma en  $17\beta$ -estradiol a través del sistema de aromatasa y la acción de la  $17$ -reductasa. Así mismo, el estradiol se genera a partir de la testosterona por acción del sistema de la aromatasa. Las hidroxilasas del RE son enzimas citocromo P450 [15].



**Figura 3.** Síntesis de la dehidroepiandrosterona (DHEA), la DHEA sulfato (DHEAS) y otros esteroides. El señalamiento de más de una enzima indica un proceso de múltiples pasos. aro = aromatase, DOC = deoxycorticosterone, HSD = hydrosteroid dehydrogenase, HSO = hydrosteroid oxidoreductase, HSS = hydrosteroid sulfatase, KSR = ketosteroid reductase, R = reductase, scc= side-chain cleavage, SH = sulfohydrolase, P-S = pregnenolone sulfate, THDOC = tetrahydrodeoxycorticosterone, THP = tetrahydroprogesterone.

(Modificado de referencia [16])

Las hormonas ejercen sus efectos en el organismo mediante distintos mecanismos. El mecanismo clásico de acción de las hormonas sexuales es a través de la interacción con sus receptores intracelulares: receptores de estrógeno, andrógenos y progesterona, que son factores nucleares de transcripción. Además de estos receptores, en sistema nervioso se ha demostrado la existencia de receptores para esteroides en la membrana celular, por ejemplo para la progesterona [17], la vitamina D [18], la testosterona [19] y los estrógenos [20]. Los efectos que desencadenan se han llamado “no transcripcionales”. Otro mecanismo de acción de los esteroides, muy importante en el sistema nervioso, es la modulación alostérica de receptores iotrópicos y de transportadores de neurotransmisores [21].

En este contexto, algunos estudios han mostrado que la DHEA induce la apertura de canales de potasio dependientes de voltaje ( $K_v$ ) [22,23]. En células PASM (pulmonary artery smooth muscle cells), al estimular con la DHEA, se induce la

apertura de canales de potasio activados por corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que además de aumentar las corrientes de dichos canales también induce apoptosis y mejora aquella mediada por el óxido nítrico. Esto es explicado por una pérdida del  $\text{K}^+$  citosólico resultante del aumento en el eflujo de  $\text{K}^+$  [23]. Los autores de ese trabajo señalan que la apoptosis inducida por óxido nítrico también puede estar relacionada con una despolarización de la membrana mitocondrial. Adicionalmente, se ha observado que concentraciones elevadas de la DHEA inhiben el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y son neurotóxicas *in vitro* e *in vivo*. El tratamiento de cultivos intactos de neuronas con DHEA además es asociado con un aumento en la glucosa y lleva a muerte neuronal [24].

Por otra parte, en células vasculares de músculo liso se ha probado que la DHEA disminuye la proliferación e incrementa la apoptosis [22]. Bonnet y colaboradores demostraron que esos efectos son mediados por la inhibición de Akt y la subsecuente activación de GSK-3 $\beta$ , lo que ocasiona una despolarización mitocondrial, un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de canales de potasio dependientes de voltaje ( $\text{K}_v$ ) con un aumento en la concentración de calcio. Dichos efectos resultaron ser independientes de receptores tanto de andrógenos como de estrógenos y al parecer involucran un receptor de membrana acoplado a proteínas G, hecho que resulta interesante de considerar.

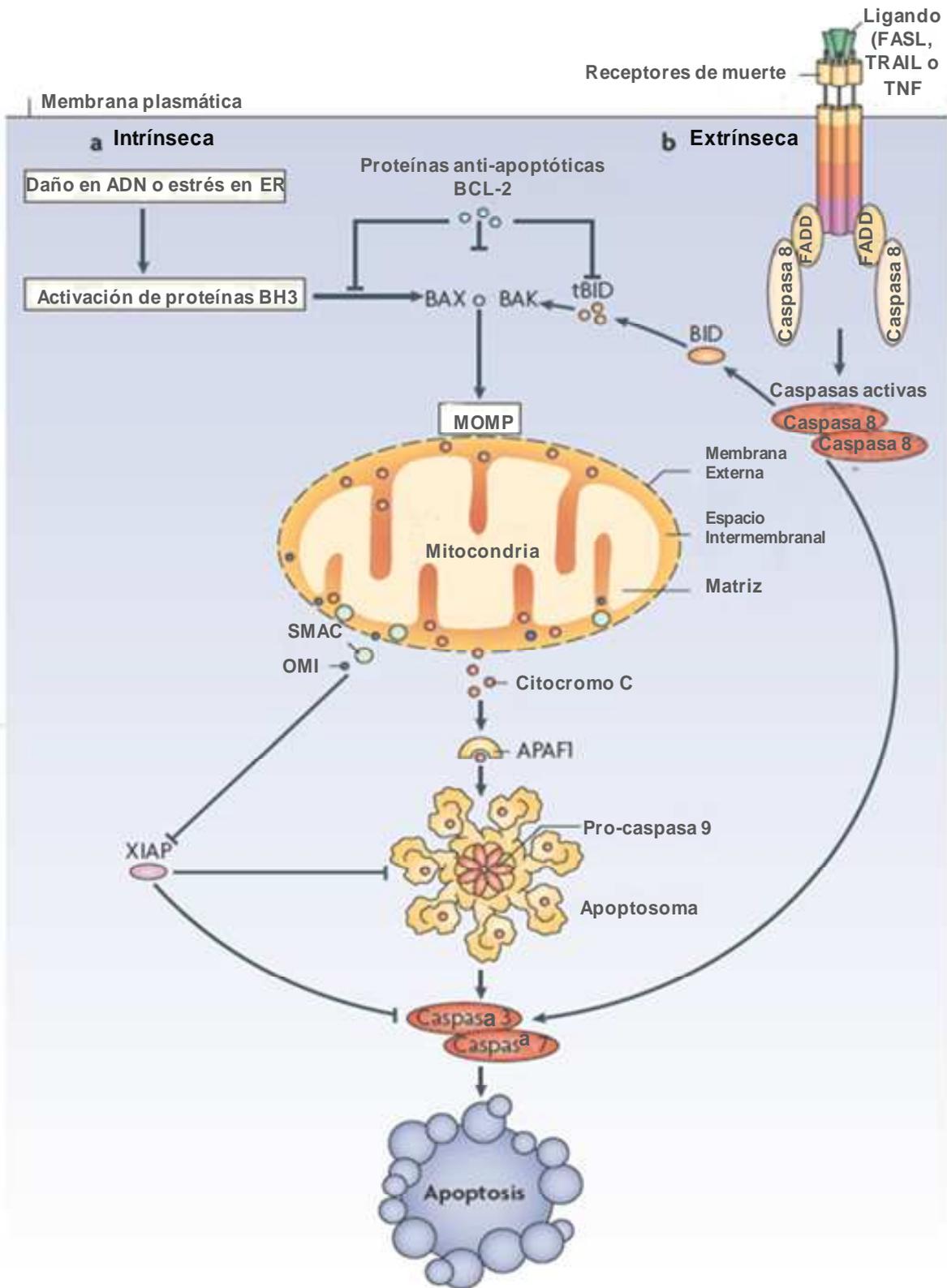
En otros trabajos, se observó que la DHEA inhibe la proliferación de células HepG2 (una línea celular de hepatoma) inhibiendo la actividad de PI3K/Akt. Igualmente, en este tipo celular es capaz de inducir apoptosis, que ha sido asociada a la inhibición de la fosforilación de Akt (Thr<sup>308</sup> y Ser<sup>473</sup>) [14]. En células HT-29 (una línea celular de adenocarcinoma de colon) se ha reportado la inducción de arresto celular por la DHEA, proceso que, por el contrario, puede ocurrir sin inducción de apoptosis [14]. Otra investigación realizada también con células de hepatoma, mostró que la inhibición del crecimiento inducida por la DHEA era acompañada por una disminución en la expresión de genes mitocondriales, alteraciones morfológicas y funcionales de la mitocondria y el agotamiento de ATP intracelular [25]. Dicha inhibición del crecimiento se veía contrarrestada al suplementar con piruvato.

No obstante, es importante señalar que, hasta la fecha, se desconocen los mecanismos exactos involucrados en los diversos efectos de la DHEA, y tampoco ha sido bien caracterizado un receptor para esta hormona.

### ***Apoptosis***

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso controlado genéticamente en el que las células mueren en respuesta a señales ambientales o de desarrollo [26]. Su principal característica morfológica es la contracción de la célula y su núcleo. A lo largo de este proceso se mantiene la integridad de la membrana plasmática, hay condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos, mismos que son fagocitados rápidamente para evitar daños en las células vecinas. La distinción entre apoptosis y necrosis se debe en parte a diferencias sobre cómo la membrana plasmática participa en el proceso. En la necrosis, la pérdida temprana de la integridad de la membrana plasmática permite un influjo de fluido e iones extracelulares que resulta en hinchazón de la célula y sus organelos [27].

Una célula puede ser llevada a apoptosis por una de las dos rutas distintas pero convergentes: por receptores de muerte (ruta extrínseca) o por la vía mitocondrial (ruta intrínseca) (Fig. 4). En ambos casos, las enzimas encargadas de regular dicho proceso son las caspasas. Las caspasas apoptóticas se dividen en iniciadoras y efectoras, y sus cascadas de señalización desempeñan un papel central en la inducción, la transducción y la amplificación de las señales apoptóticas intracelulares para determinar el destino de la célula [28], que dependerá del balance entre factores que promueven la sobrevivencia celular y aquellos responsables de iniciar y ejecutar el “suicidio” celular. Dichos factores incluyen mediadores transcripcionales (NF- $\kappa$ B), receptores de membrana (TNF $\alpha$ , FAS), miembros de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bax, Bad, Bid), cinasas/fosfatasa (PI3K, Akt, JNK, MAPK, ERK) y proteasas de cisteína (caspasas) [26].



**Figura 4.** Rutas moleculares para la inducción de apoptosis.

(Modificado de referencia [29])

Aunado a lo anterior, resulta interesante la evidencia acerca de cambios en el metabolismo de la glucosa inducidos por la DHEA. El metabolismo de la glucosa es una fuente primaria de energía y biomateriales para el mantenimiento de la vida. Como primer paso del metabolismo, la glucosa es transportada a través de la membrana plasmática por el transportador de glucosa (Glut) bajando su gradiente de concentración. La hexocinasa (HK) en la mitocondria entonces fosforila la glucosa dando como resultado glucosa-6-fosfato (G6P). El producto generalmente entra en la ruta glucolítica generando NADH, ATP y piruvato, o la ruta de las pentosas-fosfato (PPP). En presencia de suficiente oxígeno, el piruvato de la glucólisis puede introducirse en la mitocondria y oxidarse por completo para producir más ATP. Cuando el oxígeno es limitado, el piruvato es dispuesto en forma de lactato y la glucólisis se convierte en la principal fuente de producción de ATP [30].

La conexión entre el metabolismo de la glucosa y la apoptosis es clara debido a que ésta última es un proceso dependiente de energía. Sin importar la ruta por la cual se inicie la apoptosis, en todo caso se lleva a cabo la activación de las caspasas. Tanto la activación como el funcionamiento de estas enzimas son dependientes de ATP, entonces se requiere de energía para continuar con la apoptosis [31]. El efecto del metabolismo de la glucosa en la ruta intrínseca de la apoptosis ha sido bien estudiado. Las proteínas de la familia Bcl-2 son reguladores clave de esta ruta e incluyen proteínas antiapoptóticas, proapoptóticas y BH3-only. Cuando las células son expuestas a algún factor de estrés las proteínas BH3-only son activadas y translocan hacia la mitocondria en donde antagonizan la función de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1. Proteínas proapoptóticas, como Bax y Bak, sufren entonces un cambio conformacional y se oligomerizan en la mitocondria para permitir la liberación del citocromo *c* [30], señal para la activación de la caspasa 9.

La apoptosis funciona como un mecanismo para mantener la homeostasis. Cuando la homeostasis se ve comprometida, ya sea por el exceso o la disminución de la apoptosis, resulta un proceso patológico. Así, numerosos estudios le han otorgado un papel importante en la remodelación pulmonar asociada con enfermedades fibrosantes de pulmón.

## ***Fibrosis Pulmonar Idiopática y Dehidroepiandrosterona***

Selman y colaboradores han notado que la FPI ocurre generalmente después de los 50 años de edad, y que dos tercios de los pacientes son mayores de 60 años. Estos hallazgos sugieren que la FPI es una enfermedad asociada al envejecimiento, aunque las razones se desconocen.

Es sabido que el envejecimiento es un proceso complejo que involucra múltiples reacciones bioquímicas con cambios moleculares que se manifiestan tanto a nivel celular como en el organismo completo. En suma, representa la serie de cambios (fisiológicos, genéticos y moleculares) que se dan en un organismo vivo a lo largo del tiempo y que conducen a una afectación funcional y a un incremento en la ocurrencia de patologías[32,33]. De manera notable, el incremento en la edad se asocia con un decaimiento de la función inmune conocido como inmunosenescencia. Esta situación implica un aumento en la susceptibilidad a desórdenes autoinmunes y crónicos así como a enfermedades infecciosas y cáncer, debido a la baja capacidad del sistema inmune de responder al estímulo de antígenos [34]. El resultado es un microambiente con un desbalance de citocinas que afecta la respuesta inmune tanto innata como adaptativa [35]. Es bien conocido que múltiples hormonas participan en el mantenimiento de la función inmune y, muchas de ellas, también observan un descenso en sus niveles conforme incrementa la edad; ejemplos claros de esto son la hormona de crecimiento (GH), el estrógeno, la dehidroepiandrosterona (DHEA) y la melatonina. Se ha propuesto que la disminución en la concentración circulante de estas hormonas desempeña un papel crucial en la inmunosenescencia [36]. De este modo, se establece una relación muy importante entre el sistema endócrino y el sistema inmune para el mantenimiento de la homeostasis y la regulación de enfermedades degenerativas asociadas con la edad, como es el caso de la FPI.

En este contexto, una hormona cuyos niveles se ven fuertemente asociados a la edad y que se ha visto que presenta efectos muy diversos en su acción contra distintos padecimientos es la dehidroepiandrosterona. En modelos animales, se ha observado que la DHEA muestra una actividad protectora contra una amplia variedad de enfermedades crónico degenerativas como la diabetes [37], enfermedades autoinmunes [38], enfermedad de Alzheimer [39], aterosclerosis [40] y cáncer [41].

Sin embargo, el papel fisiológico de la DHEA aún se desconoce. Los efectos biológicos de esta hormona dependen del tipo celular, órgano o tejido; se ha demostrado que induce un efecto antiproliferativo en diversos tipos celulares, tanto *in vitro* como *in vivo* [42,43], y que promueve apoptosis de timocitos y células tumorales [14,44-46], pero, tal y como ya se mencionó en el apartado previo, se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en dicho proceso.

En este sentido, cabe destacar que se ha sugerido que los fibroblastos/miofibroblastos de la FPI muestran una señalización apoptótica desregulada que los hace más resistentes a dicho proceso, razón por la cual permanecen tiempos prolongados en el parénquima lesionado [47].

A la fecha no existen trabajos publicados que aborden la relación entre enfermedades fibrosantes de pulmón y la DHEA; sin embargo, estudios preliminares en nuestro laboratorio demuestran que tanto la DHEA como la DHEAS se encuentran significativamente disminuidas en pacientes con FPI en comparación con sujetos normales pareados por sexo y edad. Lo anterior permite pensar que la DHEA pudiera tener efectos antifibrosantes y que su disminución podría favorecer el desarrollo de la FPI.

## **Justificación**

Las terapias existentes hasta la fecha para el tratamiento de la FPI resultan insuficientes e ineficientes dado que en este padecimiento, a diferencia del resto de las enfermedades fibrosantes de pulmón, parece que el proceso crucial para su desarrollo no es la inflamación sino la activación anormal de las células del epitelio alveolar.

La apoptosis juega un papel fundamental tanto en el mantenimiento de la homeostasis del pulmón normal como en la patogénesis de diversas enfermedades pulmonares. Se ha señalado que los fibroblastos/miofibroblastos de la FPI son resistentes a apoptosis y, dado que los fibroblastos son los responsables de la acumulación exagerada de matriz extracelular, su prevalencia en el parénquima lesionado contribuye a la progresión de la enfermedad. En este sentido, se ha observado que la DHEA es capaz de inducir apoptosis en distintos tipos celulares, esto aunado a la correspondencia

observada entre la disminución de los niveles de la hormona en personas de edad avanzada y la prevalencia de FPI en individuos de 60 años, permiten ver a la DHEA como una molécula con posibles efectos antifibrosantes. Así, el estudio de nuevas moléculas que estimulen la apoptosis de los fibroblastos/miofibroblastos en FPI resulta prometedor para el desarrollo de terapias más efectivas contra esta enfermedad.

## **Hipótesis**

La dehidroepiandrosterona (DHEA) tiene un efecto antifibrosante a través de la inducción de apoptosis en fibroblastos pulmonares humanos.

## **Objetivo general**

Determinar si la DHEA promueve la muerte celular en fibroblastos pulmonares humanos de la línea CCD25Lu e identificar algunos de los mecanismos involucrados en este fenómeno.

## **Objetivos particulares**

- Cuantificar la apoptosis mediada por la DHEA en fibroblastos pulmonares humanos.
- Determinar el efecto de la DHEA en la activación de moléculas proapoptóticas (caspasas, Bax) y antiapoptóticas (Akt, NF- $\kappa$ B) en fibroblastos pulmonares humanos.

## **Metodología**

### ***Cultivo Celular***

Fibroblastos pulmonares normales de la línea comercial CCD25Lu (ATCC) y primarios (NOVA) fueron cultivados en medio DMEM (GIBCO) y F12 (GIBCO) respectivamente, suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino inactivado (SFBi) (GIBCO) y una mezcla de antibiótico/antimicótico (SIGMA). Todos se mantuvieron a 37°C en incubadoras (NAPCO; Forma Scientific) con atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> hasta y durante los experimentos.

### ***Determinación del número celular***

Tinción con cristal violeta: Los fibroblastos pulmonares normales se sembraron en placas de 48 pozos a una confluencia de 10 000 células por pozo. Cada pozo contenía 500 µl de DMEM 10% SFBi. Las células se estimularon con diferentes concentraciones de la DHEA (SIGMA) (50-400 µM) durante 24, 48, 72 y 96 h para las CCD25Lu. En el caso de los cultivos primarios se estimuló con la DHEA durante 2, 4, 6 y 8 días.

En todos los casos se preparó un stock 100 mM de DHEA que se diluyó directamente en el medio de cultivo para obtener la concentración final deseada. La DHEA fue disuelta en etanol, mismo que previamente se corroboró que no tuviera efectos citotóxicos, concentraciones menores al 1% final en el medio no tienen efecto tóxico en las células en cultivo.

Una vez concluido el tiempo de estímulo se aspiró el medio, se lavó una vez con PBS y se adicionó glutaraldehído al 1.1% en medio o PBS. Se incubó de 15-20 min a temperatura ambiente y se aspiró el glutaraldehído. Posteriormente se adicionaron 200 µl de cristal violeta (solución de cristal violeta 0.1 % en solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6.0) y se dejó incubando en agitación durante 15 min. Luego se recuperó el cristal violeta y se lavó exhaustivamente la placa. Se dejó secar el tiempo necesario y se redisolvió el cristal violeta en 200 µl de ácido acético al 10% por pozo. De esta solución se tomaron 100 µl que se transfirieron a una placa de 96 pozos en la que se leyó la absorbancia a 590 nm.

Además de la tinción con cristal violeta, se sembraron células CCD25Lu en cubreobjetos a una densidad del 60-70% y se estimularon con la DHEA 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M durante 48 h. Al finalizar las 48 h se removió el medio y se lavó una vez con PBS. Las células fueron fijadas usando suficiente paraformaldehído al 4% en PBS para cubrir completamente los cubreobjetos durante 15 min a temperatura ambiente. Se removió el paraformaldehído y se permeabilizaron los fibroblastos con 0.25% Triton X-100 en PBS incubando por 20 min a temperatura ambiente. Después las células se lavaron dos veces con agua desionizada y se montaron en portaobjetos utilizando medio de montaje con DAPI (Santa Cruz). Estas muestras fueron observadas y fotografiadas en un microscopio de Fluorescencia (OLYMPUS) utilizando el filtro para DAPI (excitación: 358 nm; emisión: 461 nm).

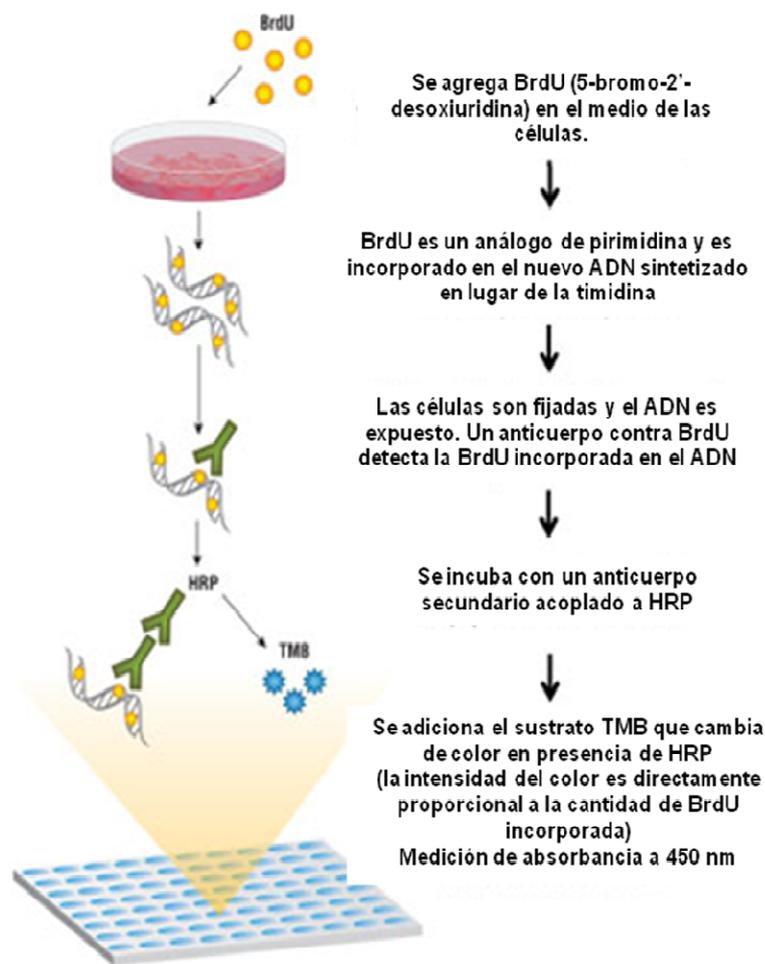
DAPI es un colorante fluorescente que se une fuertemente a regiones ricas en A-T en el ADN y que puede pasar a través de una membrana celular intacta, por lo que es usado ampliamente en microscopía de fluorescencia. En el presente trabajo permitió visualizar la cantidad de células vivas restantes después del tratamiento con la DHEA.

### ***Proliferación celular***

El efecto de la DHEA sobre la proliferación de las células CCD25Lu fue medido con un inmunoensayo colorimétrico basado en la incorporación de BrdU, un análogo sintético de la timidina, durante la duplicación del ADN (Roche) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Las células se sembraron en placas de 96 pozos a confluencia de 3000 células por pozo y en un volumen final de 100  $\mu$ l de DMEM 10% de SFBi. Se estimularon con DHEA 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M por un periodo de 24 h y 48 h. Concluido el experimento se retiró el medio con la DHEA y se agregó medio con BrdU (concentración final: 10  $\mu$ M BrdU) con el que se incubaron las muestras durante 4 h (Fig. 5). Transcurrido dicho tiempo se removió el medio con BrdU y se agregaron 200  $\mu$ l de solución fijadora (FixDenat) por pozo y se incubó por 30 min a una temperatura de 15-25°C. Se retiró la solución FixDenat y se adicionaron 100  $\mu$ l de solución con anticuerpo anti-BrdU (anti-BrdU-POD 1:100) incubando por 90 minutos. Después se retiró la solución con el anticuerpo y se lavó cada pozo con 200  $\mu$ l de solución de

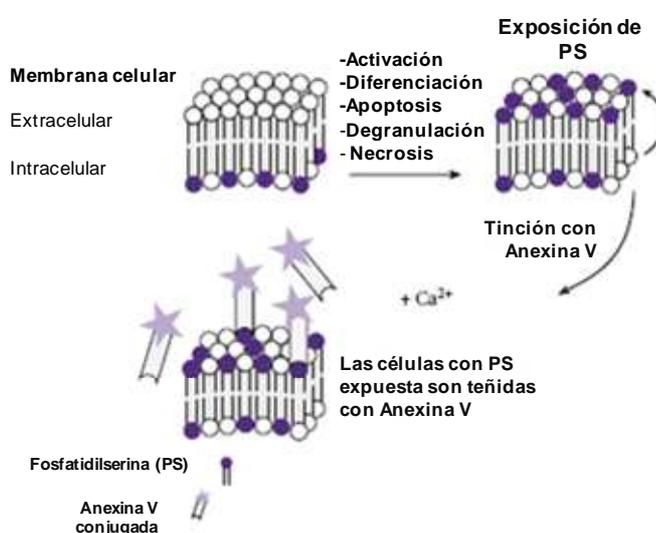
lavado (Washing Solution 1X) tres veces. Concluidos los lavados se agregaron 100  $\mu$ l de sustrato (Substrate Solution) a cada pozo cubriendo de la luz, y se incubó por 5 minutos (o hasta que el color emitido fuera suficiente para su detección fotométrica) en oscuridad a 15-25  $^{\circ}$ C. Los 100  $\mu$ l de solución fueron trasladados con una pipeta multicanal a una placa nueva de 96 pozos para detener la reacción de la enzima (POD) con el sustrato. La medición de la absorbancia de las muestras se llevó a cabo en un lector de ELISA (Synergy HT, BioTeK) a 370 nm.



**Figura 5.** Representación del ensayo de proliferación con BrdU.

### ***Detección de apoptosis por citometría de flujo (Anexina V)***

Para cuantificar el porcentaje de apoptosis inducido por la DHEA se utilizó citometría de flujo con anexina V. La anexina V es una glucoproteína que presenta una alta afinidad por la fosfatidilserina. Dicho fosfolípido se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesto en la cara externa cuando comienza el proceso de apoptosis. La anexina puede ser conjugada con distintos fluorocromos de manera tal que la tinción con estos compuestos permite identificar estados tempranos de la apoptosis (Fig. 6).



**Figura 6.** Representación de la detección de la apoptosis mediante citometría de flujo por Anexina V.

Fibroblastos pulmonares de la línea CCD25Lu se sembraron a un 70-80% de confluencia en cajas de 6 pozos y se estimularon con la DHEA. Al concluir el experimento se recuperó el medio de cada pozo en tubos de 5 ml para citometría utilizando pipeta automática y se lavaron las células con 4 ml de PBS. Para desprender las células de los pozos de cultivo se agregaron 500  $\mu$ l de tripsina 0.5X (Tripsina diluida con PBS). Se monitorearon las células hasta que éstas se desprendieron y sin exceder 3 min. Sin retirar la tripsina, se adicionó 1 ml de DMEM 30% SFBi y se resuspendieron las células suavemente con micropipeta. Hecho esto, se colocó el medio con células en el tubo correspondiente en el que previamente se

había recuperado el sobrenadante. Los tubos así preparados se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó decantando cuidadosamente y el pellet se resuspendió suavemente. Las células se lavaron con 4 ml de PBS y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min y a temperatura ambiente. Como en la ocasión anterior el sobrenadante se eliminó decantando cuidadosamente. Se agregaron 150  $\mu$ l de buffer de anexina 1X y se resuspendieron las células. A cada muestra se le agregaron 2.5  $\mu$ l de anexina (Kit BD Pharmingen) y/o 2.5  $\mu$ l de yoduro de propidio (IP), un colorante de ADN impermeable a la membrana celular que se usa para discriminar entre células muertas y células apoptóticas (células positivas para el IP indican un estado necrótico). Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente protegiendo de la luz y transcurrido ese tiempo se agregaron 350  $\mu$ l más de buffer de anexina 1X. Se agitó cuidadosamente cada muestra y se leyeron en un citómetro de flujo FACS Aria (BD, Palo Alto CA), equipado con un láser de 488 nm. Las muestras se adquirieron y analizaron con el programa FACSDiva.

En todos los experimentos, los controles de compensación se realizaron tratando a los fibroblastos con estaurosporina (Sts) (SIGMA) (1  $\mu$ M por 12 h o 2  $\mu$ M por 6 h). La estaurosporina es una toxina que se sabe que induce apoptosis de manera dosis y tiempo dependiente, por lo que es empleada como control positivo.

Controles de compensación para citometría de flujo:

| <b>Tratamiento</b>      | <b>Tinción</b> |
|-------------------------|----------------|
| Control sin tratamiento | Sin teñir      |
| Positivo (Sts)          | Anexina        |
| Positivo (Sts)          | IP             |
| Positivo (Sts)          | Anexina / IP   |

## ***Western Blot***

Los fibroblastos pulmonares CCD25Lu fueron sembrados al 70-80% de confluencia y estimulados con DHEA 100  $\mu$ M durante 4 h, 12 h y 24 h. Concluido el experimento se realizaron extractos celulares de proteína total. Las células se lavaron 2 veces con PBS a 4°C y se les agregaron 70  $\mu$ l de buffer de lisis (Tris 50  $\mu$ M pH 8, NaCl 120  $\mu$ M, 0.5% Igepal CA-630, 100 mM NaF y 200  $\mu$ M de ortovanadato de Na) al que justo antes de usarse se le adicionó PMSF (concentración final 1 mM) y cocktail inhibidor de proteasas (500  $\mu$ M AEBSF, HCl; 150 nM Aprotinina; 1  $\mu$ M E-64; 1  $\mu$ M Leupeptina hemisulfato) (Calbiochem). Las muestras con buffer de lisis se dejaron en hielo (4°C) durante 3-5 min y después se rasparon las células con gendarmes. Los lisados totales se centrifugaron a 14 000 rpm en frío (2-4°C) durante 15 min. Se recuperaron los sobrenadantes y se les midió el contenido de proteína por el método de Bradford (reactivo de Bradford, BIO-RAD). 50  $\mu$ g de las muestras diluidas con buffer Laemmli (4% SDS, 20% glicerol, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol, 0.125 M Tris-HCl) se corrieron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10% a 100 volts durante 60-90 min. Los geles se transfirieron a membranas de Nitrocelulosa (Osmonics, Westboroug, MA) utilizando buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 20% de metanol y 0.05% de SDS) en cámara semi-húmeda (Biorad) a 15 volts durante 40 min. Las membranas fueron bloqueadas en TBS-Tween (SIGMA) 0.05% (TBS-T) con leche libre de grasa (Svelty) al 5% durante 1 hora, cambiando la solución cada 30 min. Terminado el bloqueo las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y se incubaron con anticuerpo primario en diluyente comercial (Invitrogen) por 1 hora, en agitación y a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con TBS-T de 5-10 min cada uno y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en TBS-T con 1% de albúmina durante 1 hora, en agitación y a temperatura ambiente. Concluido el tiempo de incubación se realizaron de 3-5 lavados de 10 min con TBS-T. Las proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia con un Kit comercial (Termo Scientific) exponiendo las membranas en placas de autoradiografía (Kodak). Todas las señales se normalizaron contra  $\beta$ -tubulina.

Las concentraciones de anticuerpo primario y secundario variaron de acuerdo a la proteína buscada como se presenta a continuación:

| Anticuerpo             | Hospedero  | Marca      | Dilución de trabajo | Tamaño prot. (KDa) | Dilución secundario |
|------------------------|------------|------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| <b>b-tubulina HRP</b>  | Mouse IgG  | Santa Cruz | 1:200               | 55                 | —                   |
| <b>IkB</b>             | Rabbit IgG | Santa Cruz | 1:500               | 37                 | 1:3000              |
| <b>Bax</b>             | Mouse IgG  | Biolegend  | 1:500               | 21                 | 1:3000              |
| <b>Akt-P</b>           | Rabbit IgG | Santa Cruz | 1:500               | 60                 | 1:5000              |
| <b>Akt 1/2/3 Total</b> | Rabbit IgG | Santa Cruz | 1:500               | 60/56/60           | 1:5000              |
| <b>Caspasa 8</b>       | Rabbit IgG | Abcam      | 1:500               | 55                 | 1:6000              |
| <b>Caspasa 9</b>       | Rabbit IgG | Abcam      | 1:500               | 46                 | 1:5000              |

### ***Actividad de la caspasa 8 por colorimetría.***

Los fibroblastos se sembraron en cajas circulares de 6 cm de diámetro a una densidad del 70-80% y se estimularon con DHEA 100  $\mu$ M durante 6, 18 y 24 horas. Una vez concluido el experimento se aspiró el medio con la DHEA y se lavaron las células 1-2 veces con PBS. Se agregaron 70  $\mu$ l del buffer de lisis (buffer salino de Tris y detergente) del kit (Kit Apo Target, Invitrogen) y se incubaron las muestras en hielo (4°C) por 10 min. Posteriormente se rasparon las células y el extracto recuperado fue centrifugado a 10 000 x g durante 1 min en frío. Se recuperó el sobrenadante y se mantuvo en hielo hasta su uso. Cada extracto fue usado considerando 50-200  $\mu$ g de proteína en un volumen de 50  $\mu$ l, para lo cual se midió la concentración de la proteína con el método de Bradford. En una caja opaca de 96 pozos se colocaron 50  $\mu$ l del extracto de proteínas y se adicionaron 50  $\mu$ l del buffer de reacción (buffer salino, glicerol y detergente) del kit, al que previamente se le añadió 10 mM de DTT. Finalmente se agregó el sustrato (IETD-pNA) de la caspasa 8 a una concentración final de 200  $\mu$ M y se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA (Sinergy HT, BioTek). La lectura se llevó a cabo haciendo una cinética de 3 h con medición cada minuto y a temperatura constante de 37°C.

La medición corresponde a la absorción de luz por el cromóforo pNA libre, que inicialmente está acoplado a un tetrapéptido sintético (IETD) específico, y que después del corte del sustrato por la caspasa 8 puede ser cuantificado.

### ***Actividad de la caspasa 9 por fluorimetría.***

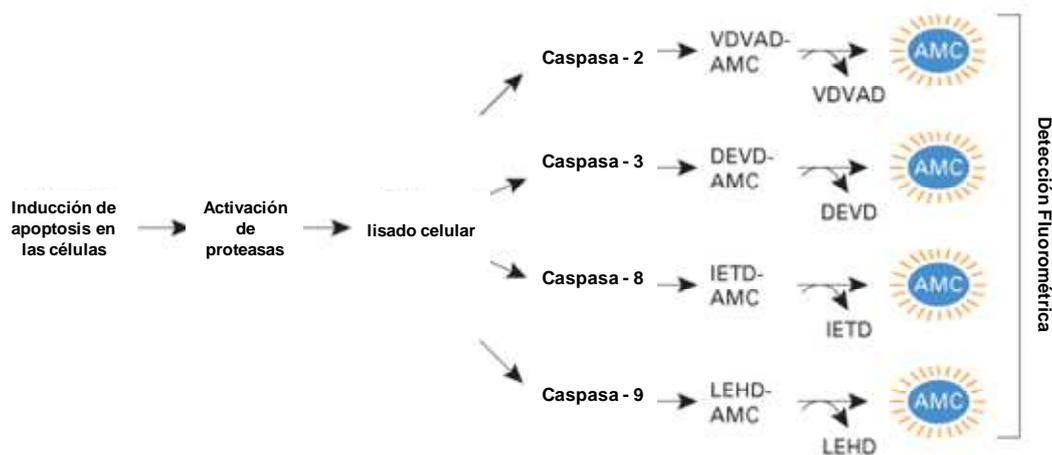
Los fibroblastos pulmonares (CCD25Lu) sembrados al 70% de confluencia fueron estimulados con la DHEA (100  $\mu$ M) por 12 y 24 horas. Transcurrido el tiempo de estímulo se aspiró el medio, se lavó una vez con PBS y se agregaron 70  $\mu$ l de buffer de lisis que contenía Tris-HCl 10 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM, NaCl 130 mM y 1% de Tritón 100X. Las células con buffer de lisis se mantuvieron en hielo (4°C) durante 3-5 min, posteriormente se rasparon y se recolectaron los lisados. Estos se centrifugaron a 14000 rpm por 15 min en frío (2-4°C) y se recuperaron los sobrenadantes, mismos que se mantuvieron en hielo o en congelación (-80°C) hasta su uso.

En una placa de 96 pozos (fondo claro y paredes oscuras) se colocaron 100  $\mu$ l del lisado celular más 100  $\mu$ l de buffer de ensayo (HEPES 40 mM, 20% glicerol y DTT 2 mM) al que previamente se le agregó el sustrato (Ac- LEHD-AMC) (Peptide) para la caspasa 9 a una concentración final de 20  $\mu$ M por pozo. Luego se incubó durante 5 min a temperatura ambiente en oscuridad y posteriormente se leyó la fluorescencia a 360/40 - 460/40 nm (Lector ELISA Synergy HT, Biotek) realizando una cinética de media hora con mediciones cada minuto, a temperatura constante (37°C).

En cada ensayo se incluyó un blanco (100  $\mu$ l de buffer de lisis + 100  $\mu$ l de buffer de ensayo) y con el resto de los lisados celulares se cuantificó la cantidad de proteína mediante el método de Bradford. Para el ensayo se consideró cuando menos 40  $\mu$ g de proteína en 50  $\mu$ l de buffer de lisis. Los resultados se presentan normalizados con respecto a la cantidad de proteína por muestra.

La medición representa la cantidad del residuo fluorogénico AMC, inicialmente acoplado a un tetrapéptido específico para la caspasa 9 y que es liberado por la actividad de la caspasa (Fig. 7).

## **Fluorimetría** (7-amino-4-metilcumarina)



**Figura 7.** Representación de la detección de la actividad de las caspasas por fluorimetría.

El cálculo de la actividad enzimática en cada muestra se realizó con la siguiente fórmula, en la que UF se refiere a las Unidades de Fluorescencia detectadas en el pozo:

$$\text{Actividad enzimática} = (\text{pendiente de las UF} / \text{tiempo} / \text{mg de proteína})$$

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Statistica. Se realizó un ANOVA de una vía (con alfa de 0.05) para la concentración de la DHEA seguido de una prueba de Dunnett para evaluar la significancia de los grupos experimentales con respecto del control.

En todos los casos la significancia de los resultados fue evaluada sobre el promedio de los datos obtenidos en 2-3 experimentos distintos, y se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar (D.E.).

El análisis densitométrico de los western blots se realizó con el programa Quantity One (BioRad).

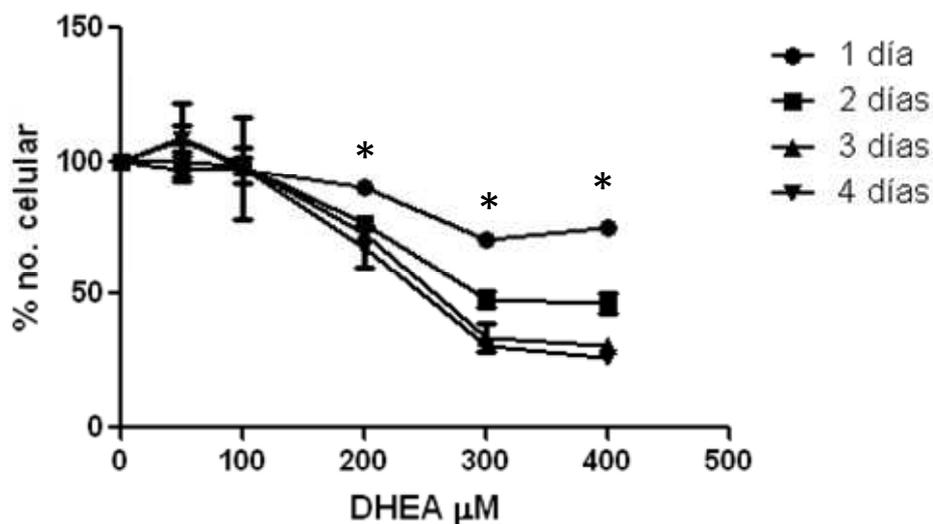
## Resultados

### *La DHEA disminuye el número de fibroblastos pulmonares humanos normales.*

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que, tanto en cultivos primarios como en fibroblastos de la línea comercial CCD25Lu, la DHEA disminuye el número celular. La respuesta observada fue concentración y tiempo dependiente.

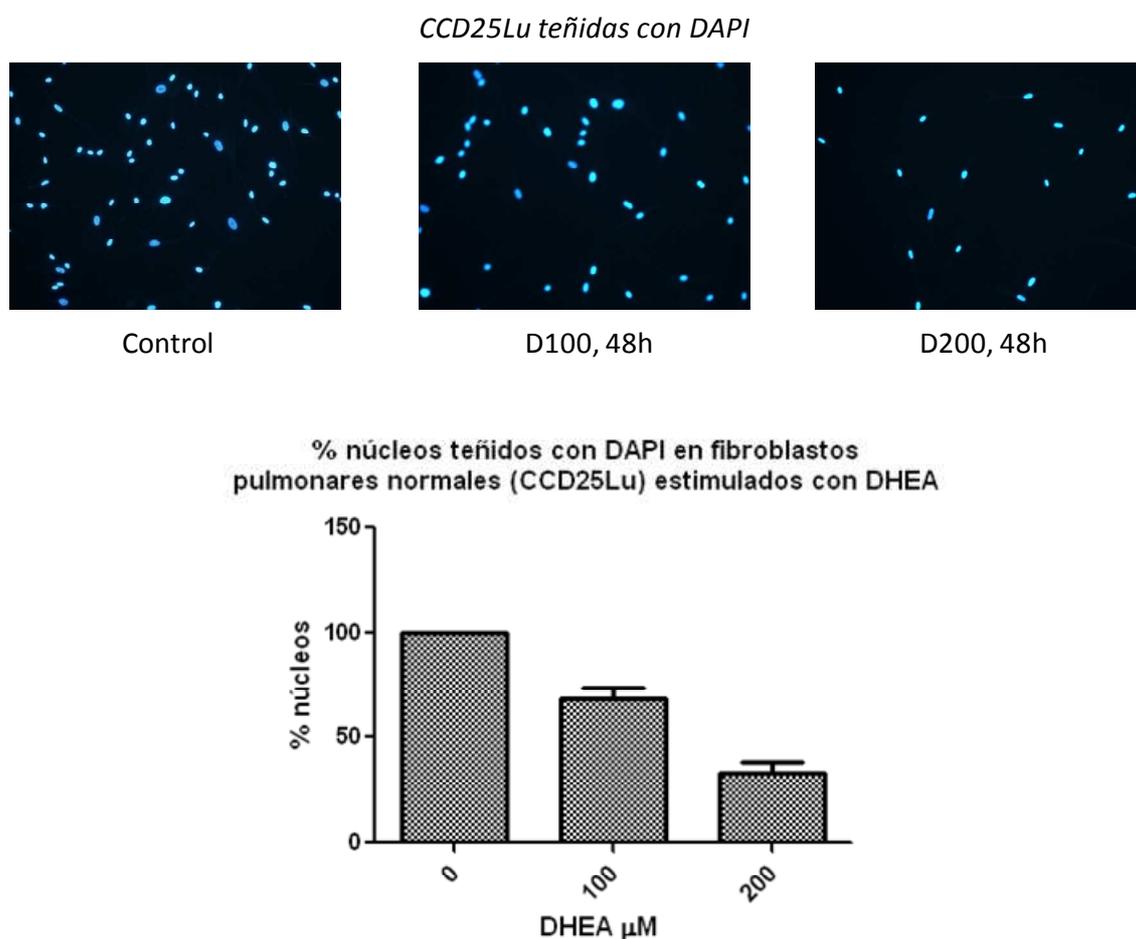
En el caso de los fibroblastos pulmonares de la línea CCD25Lu, se observaron valores que resultaron ser estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ; Tabla 1 del Anexo) en todos los tiempos evaluados (24 h, 48 h, 72 h y 96 h) a partir de 200  $\mu\text{M}$  de DHEA (Fig. 8). Se observan valores que bajan a 90.3% y hasta un 26.6% de células con respecto al control (100%).

### La DHEA disminuye el número de fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu)



**Figura 8.** Efecto de la DHEA sobre el número de fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu). Valores promedio  $\pm$  D.E. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control.

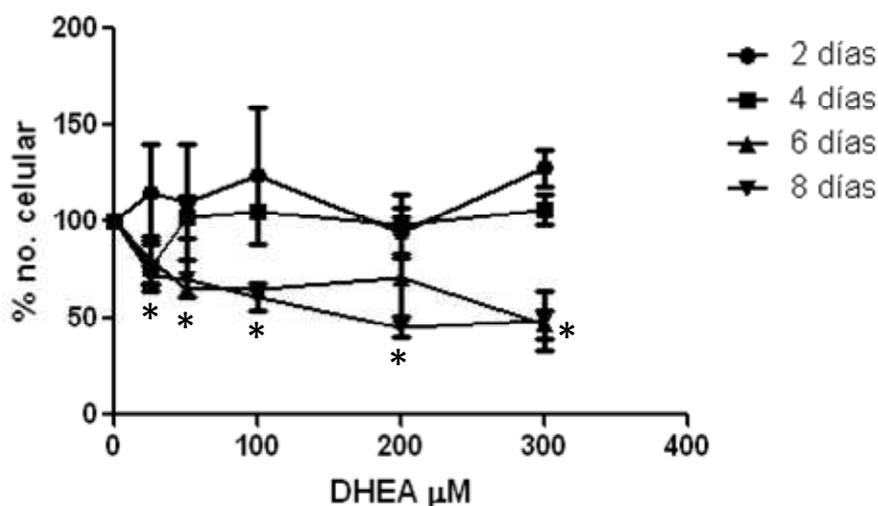
Adicionalmente, al tratar fibroblastos CCD25Lu con la DHEA durante 48 h, fijarlos y teñirlos con DAPI, se observa una disminución marcada en el número de células que responde de manera dosis dependiente (Fig. 9). El porcentaje de núcleos observados respecto al control sin tratamiento es de 68% y 32.8% con DHEA 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M, respectivamente.



**Figura 9.** Efecto de la DHEA sobre el número de fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu). % de núcleos teñidos/área.

Para corroborar los efectos de la DHEA sobre fibroblastos de pulmón observados en la línea comercial CCD25Lu, se realizó el mismo experimento con fibroblastos primarios (NOVA). En los cultivos primarios también se registró una disminución significativa ( $p < 0.05$ ; Tabla 2 del Anexo) en el número de células a los 6 días de estímulo con DHEA 300  $\mu$ M y a los 8 días con todas las concentraciones empleadas (Fig. 10). El porcentaje de células disminuye hasta un 45.2% con respecto al 100% del control.

### La DHEA disminuye el número de fibroblastos pulmonares normales primarios (NOVA)



**Figura 10.** Efecto de la DHEA sobre el número de fibroblastos pulmonares normales primarios (NOVA). Valores promedio  $\pm$  D.E. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control.

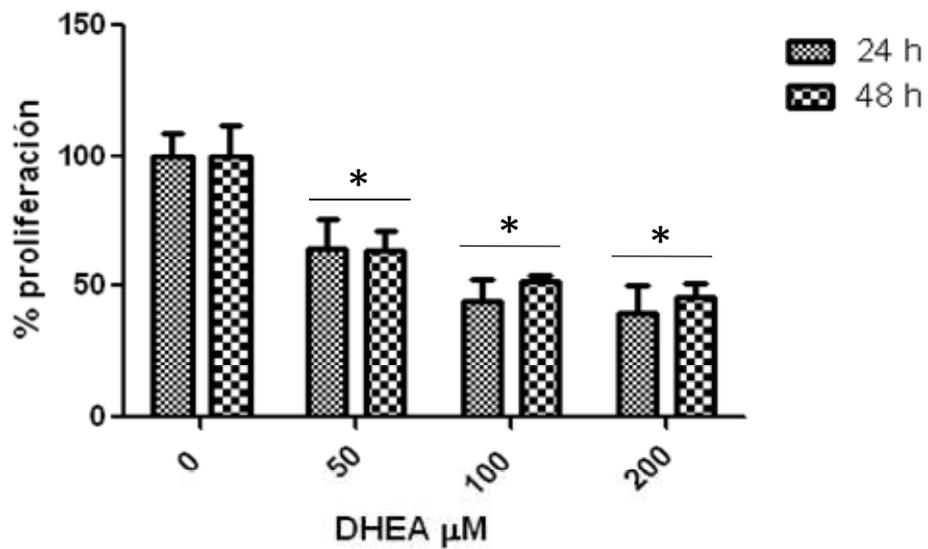
### ***La DHEA disminuye la proliferación de fibroblastos pulmonares humanos normales.***

Como se observó que la DHEA disminuye de manera significativa el número de fibroblastos, era importante conocer si esta disminución se debía a muerte celular, a inhibición de la proliferación o a ambos procesos. Dado que la disminución en el número de fibroblastos se veía tanto en la línea comercial como en fibroblastos primarios, de aquí en adelante se emplearon sólo células de la línea comercial CCD25Lu.

Para ello, se llevó a cabo un ensayo de proliferación en el que se observaron valores de proliferación significativamente menores ( $p < 0.05$ ; Tabla 3 del Anexo) en las células tratadas con la DHEA que los obtenidos para el control sin tratamiento (Fig. 11). Dichos valores oscilaron entre 64.9% y 40.1%.

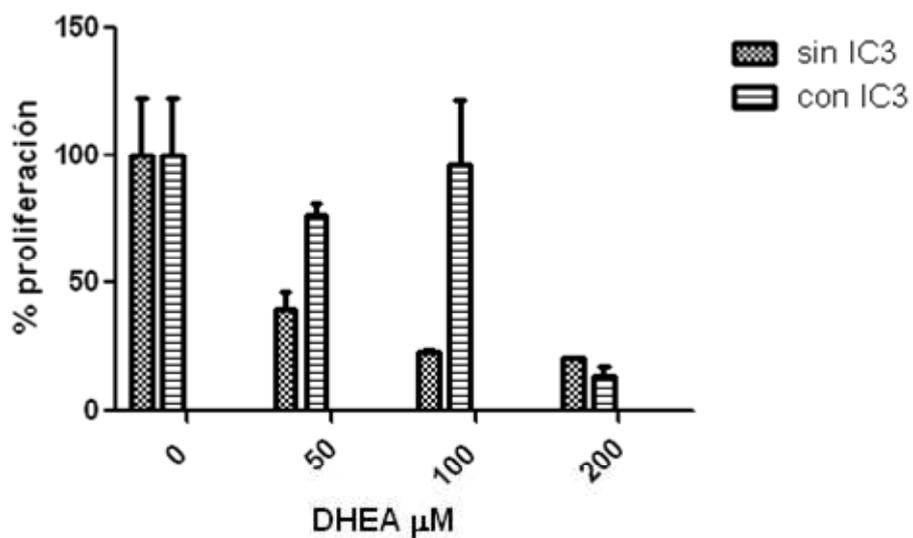
No obstante, al usar un inhibidor contra caspasa 3 (para eliminar el componente de muerte celular), la disminución en la proliferación es menos marcada (Fig. 12). Esto podría indicar que parte del descenso observado previamente en la proliferación se ve afectado por la pérdida de células a causa de la apoptosis.

La DHEA disminuye la proliferación de fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu)



**Figura 11.** Efecto de la DHEA sobre la proliferación de fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu). Valores promedio  $\pm$  D.E. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control.

Efecto de la DHEA + un inhibidor de la caspasa 3 en la proliferación de fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu)

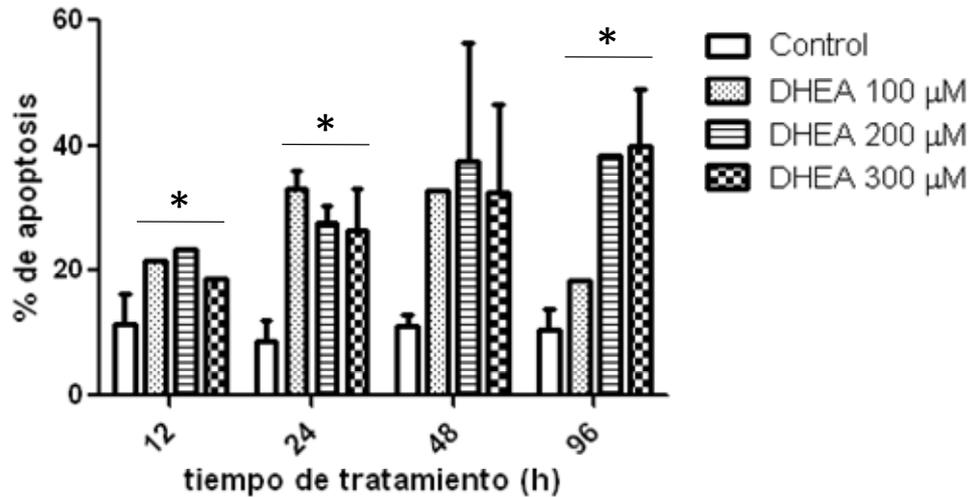


**Figura 12.** Efecto del uso de un inhibidor de la caspasa 3 sobre la proliferación de fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu) tratados con la DHEA. Valores promedio  $\pm$  D.E.

**La DHEA induce apoptosis en fibroblastos pulmonares humanos normales de la línea CCD25Lu.**

El ensayo de Anexina V mostró que la DHEA induce muerte de fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu) y que la muerte se debe principalmente a apoptosis y no a necrosis. Como en los casos anteriores, se observa una tendencia concentración y tiempo dependiente; mientras que en los controles, se observan valores de apoptosis basal entre 8.8-11.5%, con DHEA 100  $\mu$ M los valores van de 18.4-33%, con 200  $\mu$ M de 23.5-38.5% y con 300  $\mu$ M de 18.7-40% incrementando conforme aumentaba el tiempo de estímulo (Fig.13). Dicho aumento en el porcentaje de apoptosis resultó ser estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ; Tabla 4 del Anexo).

**La DHEA induce apoptosis en fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu).**

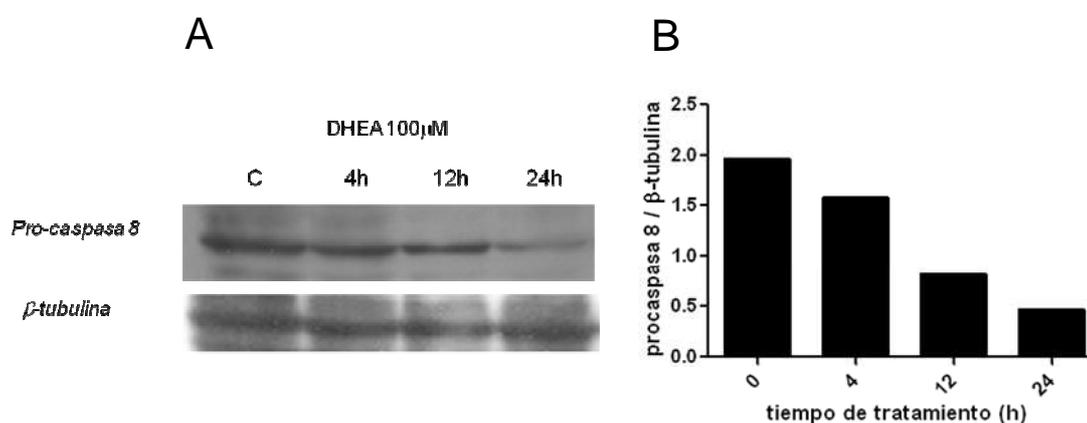


**Figura 13.** Efecto de la DHEA sobre el porcentaje de apoptosis en los fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu). Valores promedio  $\pm$  D.E. Asterisco indica diferencias significativas con respecto al control.

## ***La DHEA disminuye los niveles de la procaspasa 8.***

### **CASPASA 8**

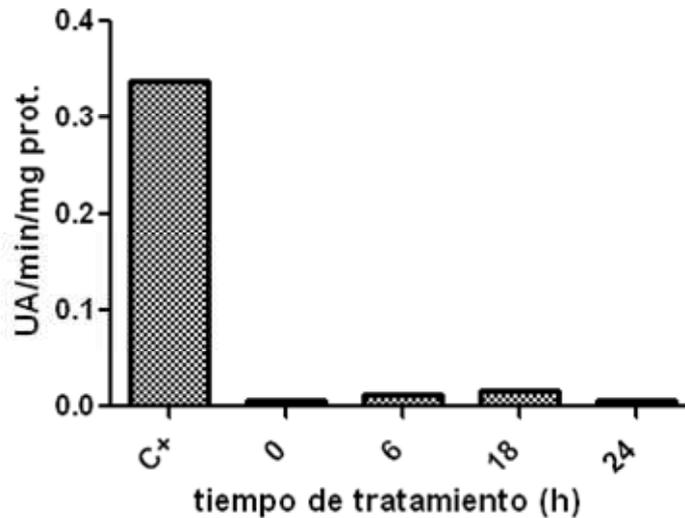
El western blot para la caspasa 8, con extractos de proteína total provenientes de células CCD25Lu, mostró una disminución en la procaspasa 8 a las 24 h de estímulo con DHEA 100  $\mu$ M. Sin embargo, no fue posible observar la caspasa activa (Fig. 14, se muestra una imagen representativa de al menos tres experimentos independientes).



**Figura 14.** A) Western blot para la caspasa 8 en las células CCD25Lu estimuladas con DHEA 100  $\mu$ M durante 4, 12 y 24 h. B) Densitometría para el western blot de la caspasa 8 normalizado contra  $\beta$ -tubulina.

Como método alternativo se empleó colorimetría para ver la actividad de la caspasa 8. En este caso tampoco se detectó un aumento considerable en la actividad de dicha caspasa al estimular con DHEA 100  $\mu$ M en tiempos de 6, 18 y 24 h (Fig. 15). Para mostrar la funcionalidad del ensayo y descartar problemas metodológicos en la detección de la actividad de la caspasa 8, se incluyó un control positivo que corresponde a células Hela estimuladas con estaurosporina 2  $\mu$ M durante 6 h.

**Actividad de la caspasa 8 en fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu) estimulados con DHEA 100  $\mu$ M**



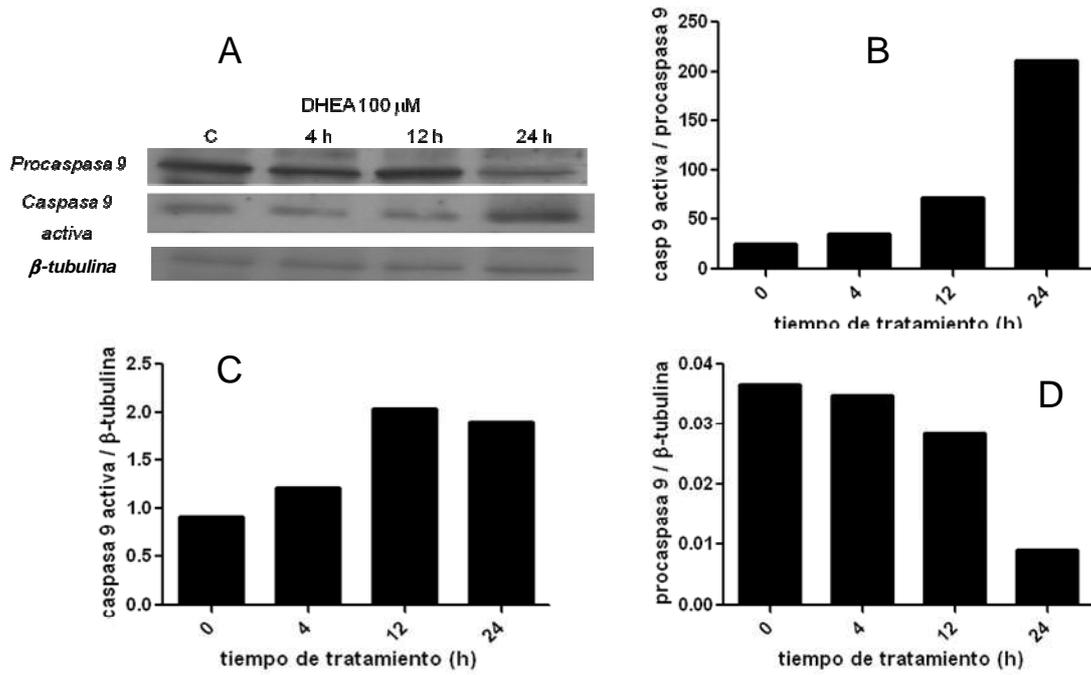
**Figura 15.** Actividad de la caspasa 8 medida por colorimetría en células CCD25Lu estimuladas con DHEA 100  $\mu$ M durante 6, 18 y 24 h.

***La DHEA induce la activación de la caspasa 9.***

**CASPASA 9**

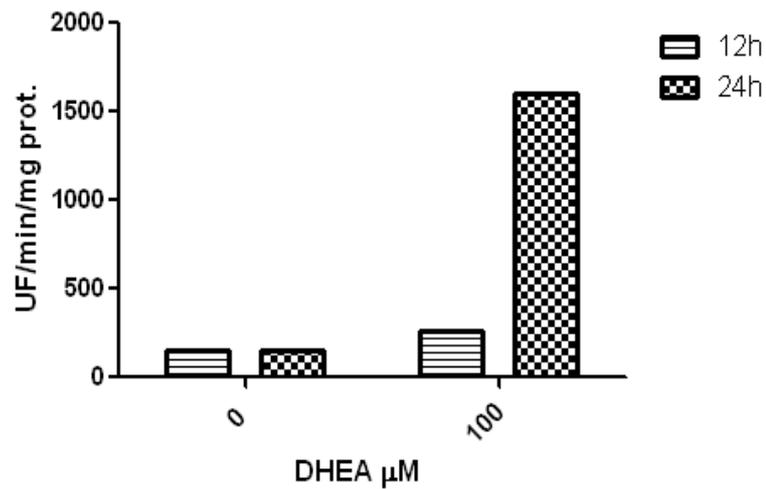
El western blot contra caspasa 9 mostró una marcada disminución de la procaspasa 9 a las 24 h de estímulo con DHEA 100  $\mu$ M con el respectivo aumento de la caspasa 9 activa en el mismo tiempo (Fig. 16, se muestra una imagen representativa de al menos tres experimentos independientes).

Tales datos pudieron ser corroborados al medir la actividad de la caspasa 9 por fluorometría, en donde, al igual que en el western blot, se observa un aumento en la actividad de la caspasa 9 a las 24 h de estímulo con DHEA 100  $\mu$ M (Fig. 17).



**Figura 16.** A) Western blot para la caspasa 9 en las células CCD25Lu estimuladas con DHEA 100  $\mu$ M durante 4, 12 y 24 h. Se presenta la densitometría de B) la caspasa 9 activa normalizada con la procaspasa 9; C) caspasa 9 activa normalizada contra  $\beta$ -tubulina; D) procaspasa 9 normalizada contra  $\beta$ -tubulina.

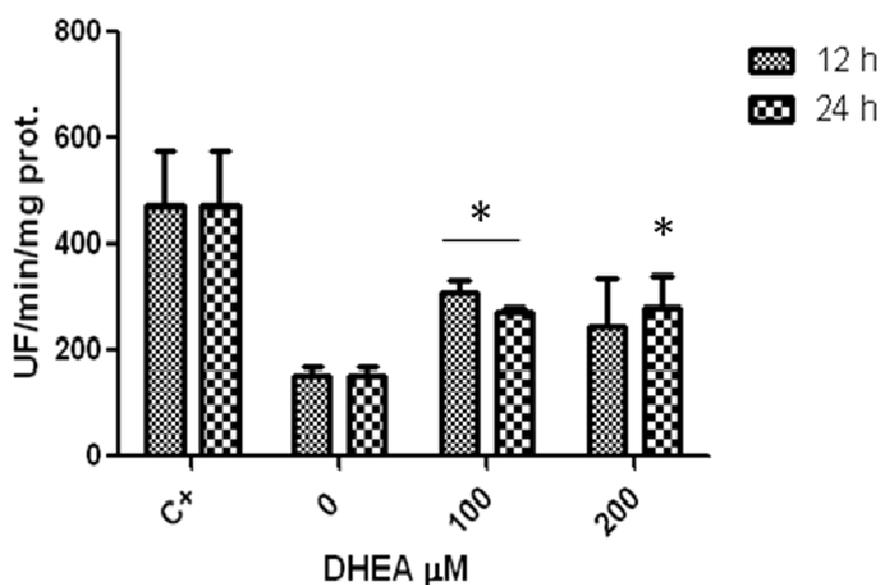
**La DHEA induce activación de la caspasa 9 en fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu)**



**Figura 17.** Actividad de la caspasa 9 medida por fluorometría en las c elulas CCD25Lu estimuladas con DHEA 100  $\mu$ M durante 12 y 24 h.

El ensayo fluorométrico para medir la actividad de la caspasa 9 se realizó en repetidas ocasiones tratando fibroblastos pulmonares CCD25Lu con 100 y 200  $\mu\text{M}$  de DHEA. Los resultados obtenidos refieren un aumento significativo ( $p < 0.05$ ; Tabla 5 del Anexo), con respecto al control sin tratamiento, en la actividad de la caspasa 9 en los fibroblastos pulmonares estimulados con la DHEA. Los valores oscilan entre 243- 309 UF/min/mg prot. en las células tratadas con la DHEA contra 153 UF/min/mg proteína del control (Fig. 18).

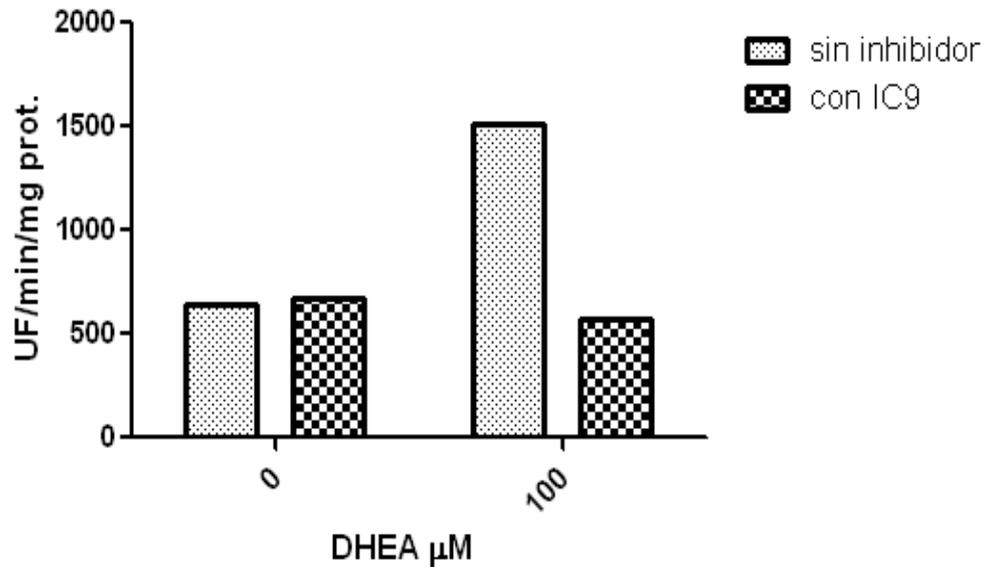
### La DHEA induce la activación de la caspasa 9 en fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu)



**Figura 18.** Efecto de la DHEA sobre la actividad de la caspasa 9, medida por fluorimetría, en fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu). Valores promedio  $\pm$  D.E. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control.

Al utilizar un inhibidor específico de la caspasa 9 en células CCD25Lu tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de DHEA se observa que la actividad de dicha caspasa es abatida hasta los valores basales. Estos datos corroboran que la DHEA induce apoptosis de fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu) vía la activación de la caspasa 9, que corresponde a la llamada ruta intrínseca de la apoptosis (Fig. 19).

### Efecto del inhibidor de la caspasa 9 sobre la activación de la caspasa 9 inducida por la DHEA

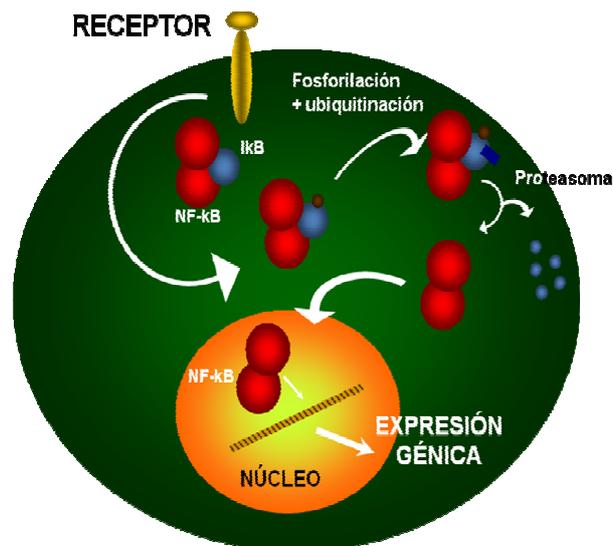


**Figura 19.** Efecto del inhibidor de la caspasa 9 en la actividad de la caspasa 9 medida por fluorimetría en células CCD25Lu tratadas con DHEA 100  $\mu\text{M}$  por 24 h.

### *La DHEA modula moléculas anti- y pro- apoptóticas*

#### Moléculas antiapoptóticas

Se realizó un western blot para determinar la expresión de I $\kappa$ B, el inhibidor de NF $\kappa$ B, un factor nuclear que participa en rutas de supervivencia celular. Cuando NF $\kappa$ B se encuentra inactivo se halla en el citoplasma formando un complejo con I $\kappa$ B. Por el contrario, cuando NF $\kappa$ B se activa se transloca al núcleo e I $\kappa$ B es degradado. Por tanto, es posible conocer, de manera indirecta, a través de la cantidad de I $\kappa$ B en lisados celulares totales, si NF $\kappa$ B está siendo activado al estimular con la DHEA.

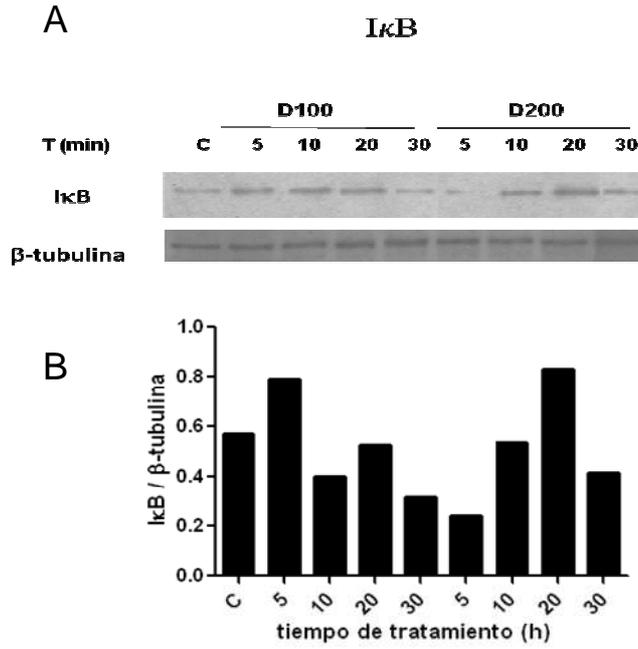


**Figura 20.** Esquema representativo de la regulación de NF-κB por su inhibidor IκB.

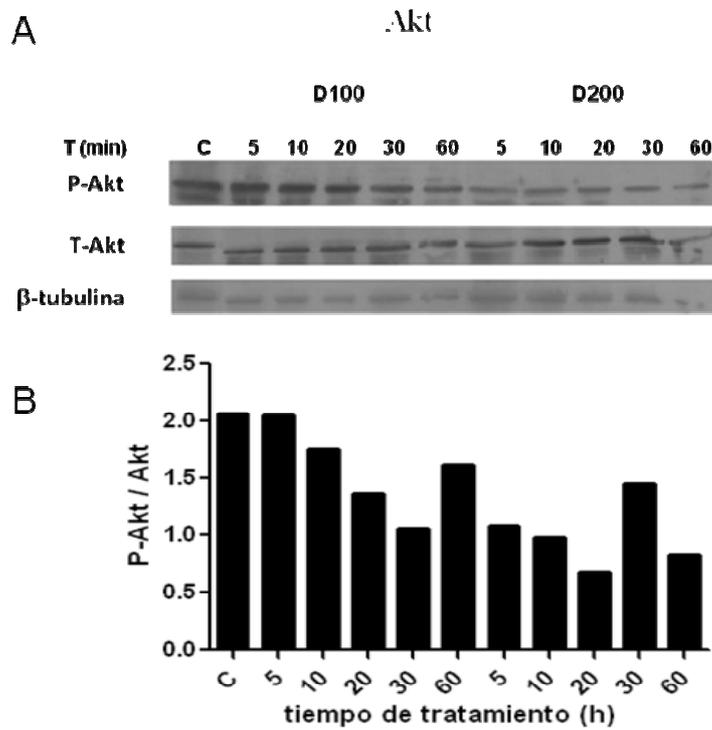
Los resultados obtenidos muestran un ligero aumento en la cantidad de IκB a los 5, 10 y 20 min luego del estímulo con DHEA 100  $\mu$ M y a los 10, 20 y 30 min después del estímulo con DHEA 200  $\mu$ M, ambos casos respecto del control sin tratamiento (Fig. 21, se muestra una imagen representativa de al menos tres experimentos independientes).

Por otra parte, se evaluó el efecto de la DHEA sobre la fosforilación de Akt, una molécula bien conocida por su participación en diversas rutas de señalización a través de la inducción de la fosforilación de múltiples moléculas, entre las que destacan rutas para el control de la proliferación y la sobrevivencia celular.

Previamente ha sido reportado que la DHEA es capaz de inhibir la fosforilación de Akt induciendo así sus efectos antiproliferativos en distintos tipos celulares. Los resultados obtenidos en este estudio corroboran los reportes previos, permitiendo observar que en fibroblastos de pulmón también existe una marcada disminución en la cantidad de Akt fosforilado (activo) al tratar con DHEA 100 y 200  $\mu$ M (Fig. 22, se muestra una imagen representativa de al menos tres experimentos independientes).



**Figura 21.** A) Western blot para I $\kappa$ B en células CCD25Lu estimuladas con DHEA 100 y 200  $\mu$ M durante 0, 5, 10, 20 y 30 min. B) Densitometría del western blot de I $\kappa$ B normalizada contra  $\beta$ -tubulina.

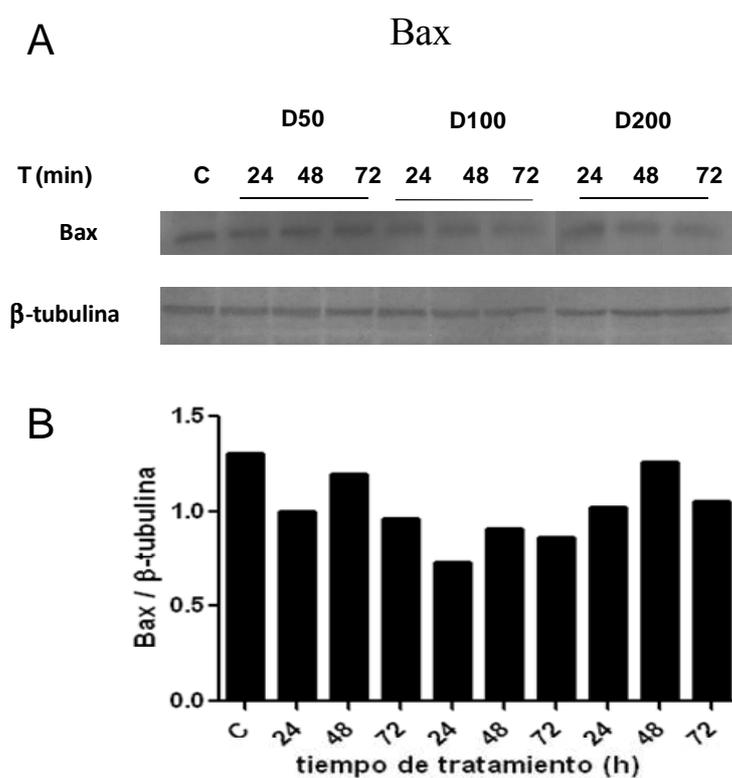


**Figura 22.** A) Western blot para Akt en células CCD25Lu estimuladas con DHEA 100 y 200  $\mu$ M durante 0, 5, 10, 20, 30 y 60 min. La forma activa está representada por P-Akt. B) Densitometría del western blot de Akt normalizada contra  $\beta$ -tubulina.

## Moléculas proapoptóticas

Entre las moléculas que participan en la inducción de apoptosis por la ruta mitocondrial se encuentra Bax, una proteína de la familia Bcl-2 que participa en la formación del poro mitocondrial para la liberación del citocromo c.

El western blot realizado no muestra cambios en la expresión de la proteína Bax al estimular con DHEA 50  $\mu$ M, mientras que se observa una ligera disminución de Bax conforme se incrementa el tiempo de tratamiento con DHEA 100 y 200  $\mu$ M (Fig. 23, se muestra una imagen representativa de al menos tres experimentos independientes).



**Figura 23.** A) Western blot para Bax en células CCD25Lu estimuladas con DHEA 50, 100 y 200  $\mu$ M durante 0, 24, 48 y 72 h. B) Densitometría del western blot de Bax normalizada contra  $\beta$ -tubulina.

## Discusión

En este trabajo, en un esfuerzo por encontrar nuevas moléculas que permitan el correcto tratamiento de la FPI, se evaluó el efecto de la DHEA sobre fibroblastos pulmonares humanos. En un primer acercamiento fue posible demostrar que la DHEA disminuye significativamente el número de fibroblastos pulmonares normales, tanto de la línea comercial CCD25Lu (Fig. 8) como de cultivos primarios NOVA provenientes de sujetos sanos (Fig. 10). Este fenómeno ocurre de manera dosis y tiempo dependiente. En el caso de las células CCD25Lu, la disminución en el número celular comienza a observarse entre 100 y 200  $\mu\text{M}$  en todos los tiempos probados (1, 2, 3 y 4 días), la disminución más acentuada se encontró en las concentraciones y tiempos máximos (300-400  $\mu\text{M}$ , 3 y 4 días) que se analizaron. Un experimento adicional que confirma estos resultados es el que se muestra en la figura 9, donde se presenta una notable disminución en el número de núcleos de células tratadas durante 48 h con 100 y 200  $\mu\text{M}$  de la DHEA. Por otro lado, en los fibroblastos NOVA (al contrario de lo observado en las CCD25Lu) entre 2 y 4 días de tratamiento no se observó efecto alguno en ninguna de las concentraciones estudiadas (25, 50, 100, 200 y 300  $\mu\text{M}$ ); la disminución en el número celular se observa a partir de los 6 días, e incluso a concentraciones bajas (25  $\mu\text{M}$ ). Nosotros observamos que las células NOVA proliferan a menor velocidad que las CCD25Lu, lo cual podría explicar las diferencias en sensibilidad respecto al tiempo y las concentraciones en los que se observan cambios para la línea comercial y los cultivos primarios. La disminución en el número celular podría ser causada por dos mecanismos: inhibición de la proliferación y/o inducción de apoptosis; ambos efectos antes descritos en diversos tipos celulares estimulados con la DHEA (hepatocitos, fibroblastos cardiacos, adenocarcinoma de colon, etc) [14,22,25,48].

Con el propósito de determinar si la disminución en el número celular ocasionado por la DHEA se debe a inhibición de la proliferación, a la inducción de apoptosis o al efecto combinado de ambos fenómenos, se diseñaron experimentos de proliferación y apoptosis. En los ensayos de proliferación, nuestros resultados mostraron que la DHEA es capaz de inhibir la proliferación de fibroblastos pulmonares humanos normales de la línea CCD25Lu a partir de 50  $\mu\text{M}$  a 24 y 48 horas (Fig.11). Se observa el valor máximo de inhibición a 100  $\mu\text{M}$ , no encontrándose diferencias entre 100 y 200  $\mu\text{M}$  (alrededor del 55% de proliferación con respecto al control). Considerando que las

células no fueron sincronizadas para estos experimentos, es de notar que dentro de la población existen células que se encuentran en etapas distintas del ciclo celular, lo que podría marcar las diferencias en cuanto a la sensibilidad a la DHEA. No obstante, nuestros resultados concuerdan con los hallazgos sobre las propiedades antiproliferativas de la DHEA que otros autores han reportado en fibroblastos cardiacos de rata [48].

Para determinar si el efecto observado durante los ensayos de proliferación podía estar influenciado no sólo por la inhibición de la proliferación sino quizás también por la muerte celular, se realizó el mismo ensayo poniendo un inhibidor de la caspasa 3. Nuestros resultados muestran que al agregar el inhibidor de la caspasa 3 el efecto de la DHEA es considerablemente menor que el observado en las muestras sin inhibidor a 100  $\mu$ M de DHEA (Fig. 12). Dichos datos sugieren que la DHEA promueve una reducción en el número celular (Fig. 8) a través de un mecanismo diferente a inhibición de la proliferación que involucra la activación de caspasas. Respuestas similares a las que nosotros observamos, han sido reportadas por otros autores en diferentes tipos celulares en los que la DHEA es capaz de inducir tanto inhibición de la proliferación como apoptosis [14,22,25].

Por tanto, para conocer si la DHEA efectivamente induce apoptosis en fibroblastos de pulmón y, en su caso, cuantificar el porcentaje de la misma, se realizaron diversos experimentos por citometría de flujo. Con ellos fue posible determinar que la DHEA induce apoptosis (mas no necrosis) en fibroblastos de pulmón normales y que esta inducción presenta un patrón concentración y tiempo dependiente (Fig. 13). Es posible observar un aumento en el porcentaje de apoptosis a partir de 24 horas de tratamiento y en todas las concentraciones de la DHEA probadas. Sin embargo, resulta interesante notar que, aunque se ensayaron tiempos tan largos como 96 horas, no fue posible superar el 45% de apoptosis en la población total. Este fenómeno podría explicarse por el hecho de que las células no fueron sincronizadas y por lo tanto la susceptibilidad al efecto proapoptótico de la hormona podría ser diferente.

Los resultados que muestran que la DHEA es capaz de inducir apoptosis en fibroblastos de pulmón son de gran relevancia en el contexto de la FPI, patología en la cual, como ya se mencionó antes, la señalización apoptótica parece estar desregulada, motivo por el cual los fibroblastos permanecen tiempos prolongados en

el parénquima lesionado. Por el contrario, en un proceso de reparación normal, cuando el epitelio es restablecido, la MEC es reabsorbida y los fibroblastos que la delimitan son eliminados por apoptosis [47].

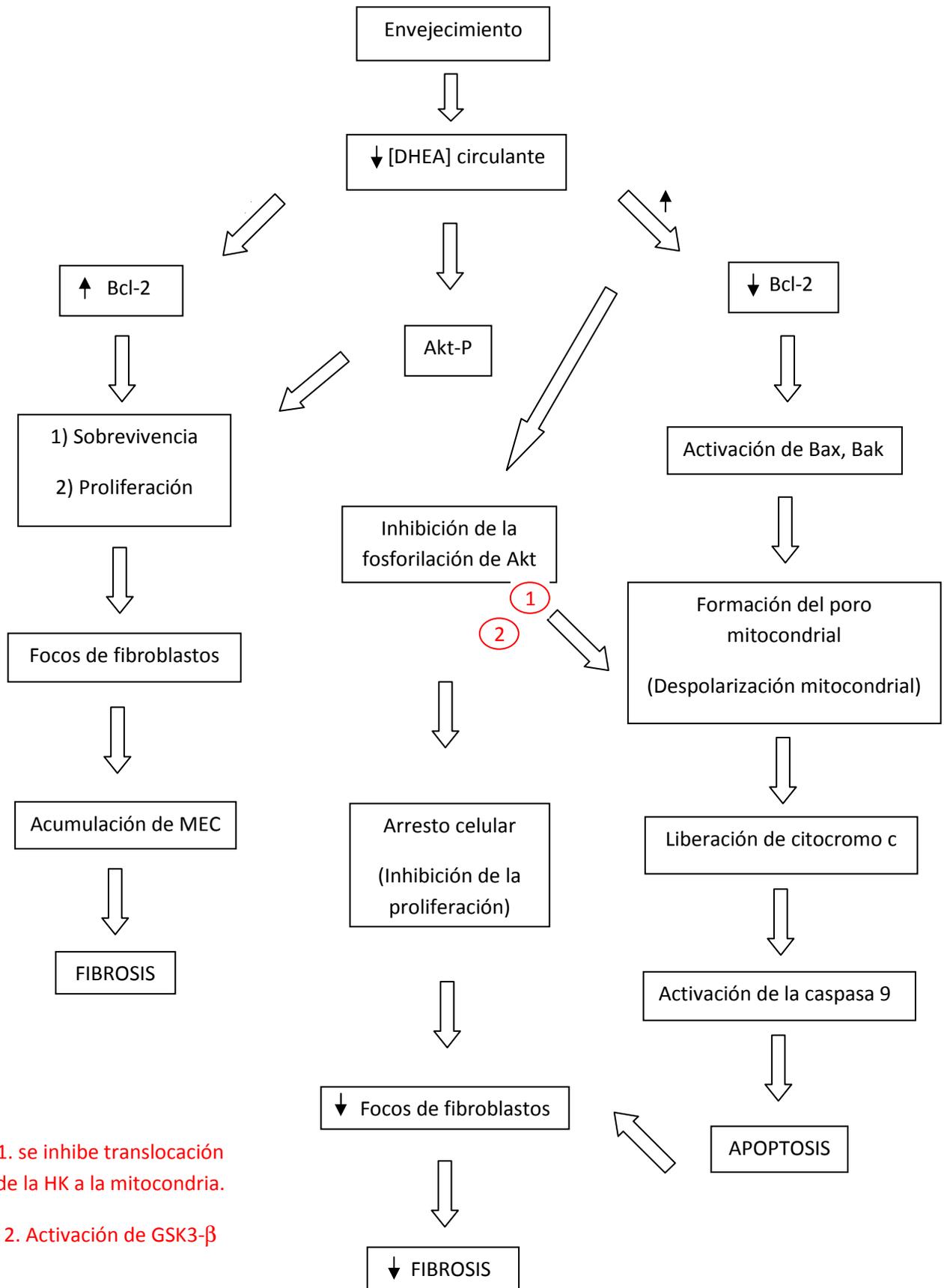
Un hecho bien conocido es que la apoptosis se da a través de dos rutas distintas y ya descritas, que implican la activación diferencial de caspasas. La ruta extrínseca de la apoptosis, se caracteriza por la activación de la caspasa 8, mientras que la ruta intrínseca requiere de la activación de la caspasa 9. De este modo, nuestros resultados muestran que la apoptosis inducida por la DHEA en fibroblastos de pulmón humano CCD25Lu, involucra la ruta intrínseca o mitocondrial. Este evento fue constatado primero por la disminución de la procaspasa 9 y el correspondiente aumento de la forma activa de la proteína detectada por western blot (Fig. 16) así como por el aumento en la actividad de la caspasa 9 medida a través del ensayo fluorométrico en células estimuladas con DHEA con respecto a controles sin tratamiento (Fig. 17, 18). De manera notable, el uso de un inhibidor específico de la caspasa 9 disminuye la actividad detectada a los niveles basales (Fig. 19). Por el contrario, aunque fue posible detectar por western blot una disminución en la procaspasa 8 en extractos de células tratadas con DHEA 100  $\mu$ M a distintos tiempos (4, 12 y 24 h) (Fig. 14), no se observó el aumento esperado en la forma activa de esta caspasa. Este dato concuerda con los resultados derivados del ensayo colorimétrico en el que tampoco se detecta un incremento significativo en la actividad de la caspasa 8 (Fig. 15). Aunque los efectos asociados a la activación de la ruta intrínseca de apoptosis (despolarización de la mitocondria, inhibición del complejo I de la cadena respiratoria y liberación de citocromo c) no se exploraron en este estudio, los resultados obtenidos indican que la DHEA activa la ruta mitocondrial en nuestro sistema.

Así, es posible que los efectos de la DHEA se lleven a cabo por múltiples mecanismos relacionados con la función mitocondrial. Wang y colaboradores, en ratones deficientes de la proteína p53 (un gen supresor de tumores que regula la expresión de Bcl-2 y Bax) tratados con la DHEA, pudieron observar una disminución en los niveles de mRNA de Bcl-2, mostrando que la DHEA es capaz de inducir apoptosis en el timo y de modular la tumorigénesis a través de alteraciones en las rutas apoptóticas que involucran a Bcl-2 y Bax. Sin embargo, en el presente estudio no se detectaron cambios en la cantidad de Bax al estimular con la DHEA (Fig.23).

Como se mencionó con anterioridad, en algunos tipos celulares, no sólo la inhibición de la proliferación sino también la inducción de la apoptosis por la DHEA ha sido asociada a la inhibición de la fosforilación de Akt [14,22,44]. Akt es una cinasa conocida por inducir cascadas de fosforilación relacionadas tanto con proliferación como con supervivencia celular. Nuestros hallazgos concuerdan con los de investigaciones previas, mostrando un claro descenso en la cantidad de Akt fosforilado (activo) al estimular con la DHEA (Fig. 22). Aunque otros autores observaron la inhibición de la fosforilación de Akt con 100  $\mu$ M de DHEA en células de carcinoma hepatocelular a las 24 h de estímulo [14], en nuestro sistema dicha inhibición ocurre a un tiempo considerablemente menor (1 hora), lo cual podría deberse a que se trata de tipos celulares distintos. Nuestros resultados sugieren que los efectos proapoptóticos y antiproliferativos de la DHEA podrían estar dados por su acción inhibitoria sobre la fosforilación de Akt.

Por otro lado, carecemos de evidencia concluyente que nos permita asegurar que la ruta de activación de NF- $\kappa$ B, medida indirectamente a través de la degradación de I $\kappa$ B (Fig. 21), no esté siendo afectada por la DHEA. No obstante, en la presente investigación no se profundizó más sobre los mecanismos moleculares involucrados en el efecto antiproliferativo de la DHEA, por lo que es necesario evaluar más ampliamente los mecanismos por los cuales la DHEA podría estar frenando el crecimiento en fibroblastos de pulmón.

Todo lo anterior nos habla de una estrecha relación entre diversos mecanismos moleculares que bien podrían estarse combinando para producir los efectos observados al tratar fibroblastos de pulmón con la DHEA. De tal modo que, conjuntando la evidencia obtenida en el presente estudio sobre los efectos antiproliferativos y proapoptóticos de la DHEA con la de investigaciones previas, es posible sugerir un mecanismo de acción probable para explicar la relación de esta hormona con la FPI y sus potenciales efectos antifibrosantes. El modelo que nosotros proponemos se muestra a continuación:



El envejecimiento conlleva una serie de cambios fisiológicos entre los que se encuentra la disminución de la concentración circulante de la DHEA/DHEAS. Este descenso podría estar asociado a la fosforilación de Akt y al aumento de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, que favorecen la sobrevivencia y proliferación celular. En el contexto de la FPI, este mecanismo conduciría a la formación y persistencia de focos de fibroblastos en el parénquima pulmonar con la consecuente acumulación de MEC que deriva en el deterioro de la arquitectura pulmonar y fibrosis. Por otra parte (in vitro) la presencia de la DHEA permitiría la inhibición de la fosforilación de Akt y probablemente la disminución de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2. Estos mecanismos derivarían por una parte en los daños a nivel mitocondrial ya descritos y en apoptosis, y por otro lado en inhibición de la proliferación de fibroblastos de pulmón. Ambos efectos, podrían contribuir a la disminución de los focos de fibroblastos y retardar el proceso fibrótico.

Resulta claro que la DHEA es una hormona con efectos antifibrosantes potenciales desde que influye en dos de los principales procesos que caracterizan el fenotipo de los fibroblastos/miofibroblastos en FPI: resistencia a apoptosis y proliferación desregulada. Estudios como este son de vital importancia ya que analizan el problema desde perspectivas distintas a las establecidas tradicionalmente cuando la inflamación se consideraba un hecho fundamental en el desarrollo de esta patología.

## **Conclusiones**

- La DHEA tiene efectos antifibrosantes potenciales gracias a que es capaz de inducir apoptosis e inhibición de la proliferación en fibroblastos pulmonares humanos normales.
- Los efectos antiproliferativos y apoptóticos de la DHEA pueden estar asociados a la inhibición de la fosforilación de Akt.
- La DHEA puede ejercer sus efectos antifibrosantes mediando la activación/inactivación de múltiples moléculas, como otras proteínas de la familia Bcl-2 y factores de transcripción, sobre los cuales es necesario realizar mayores investigaciones.

## Perspectivas

Resulta importante notar que el presente estudio se llevó a cabo con fibroblastos de pulmón normales, por lo que los resultados obtenidos nos hablan únicamente de efectos potenciales de la DHEA. Es de gran relevancia, una vez que se han corroborado los efectos de la DHEA sobre fibroblastos de pulmón normales, evaluar si los mismos efectos se mantienen en fibroblastos provenientes de biopsias de pacientes con FPI (*in vitro*) así como sus efectos en un modelo animal. No obstante, la importancia de esta investigación radica en que sienta un precedente para nuevas terapias contra FPI.

Es necesario realizar mayores investigaciones para poder esclarecer los mecanismos de acción de la DHEA, una hormona controversial por la diversidad de efectos que puede inducir. Existen diversas consideraciones para estudios futuros:

- Los efectos tan diversos observados al estimular con la DHEA podrían deberse a la presencia de distintos receptores en diferentes tipos celulares, lo cual nos hablaría de multiplicidad de receptores para la hormona dependiendo del órgano de procedencia de las células.
- La DHEA es metabolizada, por lo que es necesario asegurarse de que todos los efectos atribuidos a la hormona son realmente ocasionados por ella y no por alguno de sus metabolitos.
- Es necesario evaluar los efectos que se podrían presentar con una posible terapia a largo plazo. Algunos reportes señalan que puede promover cáncer dependiente de hormonas (seno y próstata) mientras que otros hacen énfasis en sus potentes efectos contra el cáncer.
- Para poder desarrollar un medicamento adecuado con la DHEA o alguno de sus metabolitos primero es necesario identificar detalladamente los mecanismos moleculares de acción de la DHEA.

## Referencias

1. Selman M: *Neumopatías Intersticiales Difusas*. México: Editorial Médica Panamericana; 1997.
2. TA Wynn: Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *Journal of Pathology* 2008, 199-210.
3. Pardo A, Selman M: Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Biosci* 2002, 7: d1743-d1761.
4. King TE Jr: Clinical advances in the diagnosis and therapy of the interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 172: 268-279.
5. Selman M, Carrillo G, Estrada A, Mejia M, Becerril C, Cisneros J *et al.*: Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern. *PLoS ONE* 2007, 2: e482.
6. Kim DS, Collard HR, King TE Jr: Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc* 2006, 3: 285-292.
7. Olson AL, Swigris JJ, Lezotte DC, Norris JM, Wilson CG, Brown KK: Mortality from pulmonary fibrosis increased in the United States from 1992 to 2003. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 176: 284.
8. Pardo A, Selman M: Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2002, 34: 1534-1538.
9. Selman M, King TE, Pardo A: Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001, 134: 136-151.
10. King T, Costabel U, Cordier J: Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and management: international consensus statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161: 646-664.
11. Wiebke A: Dehydroepiandrosterone and ageing. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004, 18: 363-380.

12. Charalampopoulos I, Tsatsanis C, Dermitzaki E, Vasilias-Ismini A, Castanas E, Margioris A *et al.*: Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins. *PNAS* 2004, 101: 8209-8214.
13. Valle D, Couet J, Labrie Y, Simard J, Belvedere P, Simontacchi C *et al.*: Occurrence of cytochrome p450 mRNA and dehydroepiandrosterone biosynthesis in the rat gastrointestinal tract. *Mol Cell Endocrinol* 1995, 111: 83-92.
14. Jiang Y, Miyazaki T, Honda A, Hirayama T, Yoshida S, Tanaka N *et al.*: Apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in the anti-proliferative actions of dehydroepiandrosterone. *J Gastroenterol* 2005, 40: 490-497.
15. Litwack G, Schmidt TJ: Bioquímica de las hormonas II: hormonas esteroides. In *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. Edited by Devlin TM, et al. Barcelona-México: Reverte; 2004:959-988.
16. Pepping J, Pharm D: DHEA: Dehydroepiandrosterone. *Am J Health-Syst Pharm* 2000, 57: 2048-2056.
17. Rossato M, Nogara A, Merico M, Ferlin A, Foresta C: Identification of functional binding sites for progesterone in rat Leydig cell plasma membrane. *Steroids* 1999, 64: 168-175.
18. Nemere I, Farach-Carson M: Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 248: 443-449.
19. Benten W, Lieberherr M, Giese G, Wrehlke C, Stamm O, Sekeris C *et al.*: Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB J* 1999, 13: 123-133.
20. Fiorelli G, Gori F, Frediani U, Franceschelli F, Tanini A, Tosti-Guerra C *et al.*: Membrane binding sites and non-genomic effects of estrogen in cultured human pre-osteoclastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996, 59: 233-240.
21. Veiga S, García-Segura LM, Azcoitia I: Propiedades neuroprotectoras de los esteroides sexuales y los neuroesteroides. *Rev Neurol* 2004, 39: 1043-1051.
22. Bonnet S, Paulin R, Sutendra G, Dromparis P, Roy M, Watson K *et al.*: Dehydroepiandrosterone reverses systemic vascular remodeling through the inhibition of the Akt/GSK3- $\beta$ /NFAT axis. *Circulation* 2009, 120: 1240.

23. Krick S, Platoshyn O, Seewney M, McDaniel S, Zhang S, Rubin L *et al.*: Nitric oxide induces apoptosis by activating K<sup>+</sup> channels in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, 282: H184-H193.
24. Safiulina D, Peet D, Seppet E, Zharkovsky A, Kaasik A: Dehydroepiandrosterone inhibits complex I of the mitochondrial respiratory chain and is neurotoxic in vitro and in vivo at high concentrations. *Toxicological Sciences* 2006, 93: 348-356.
25. hung-Yao Ho, Mei-Ling Cheng, Hsin-Yu Chiu, Shiue-Fen Weng, Daniel Tsun-Yee Chiu: Dehydroepiandrosterone induces growth arrest of hepatoma cells via alteration of mitochondrial gene expression and function. *International Journal of Oncology* 2008, 33: 969-977.
26. Kasof G, Degenhardt K, Perez D, Thomas A, White E: Overview: a matter of life and death. In *Singnalling pathways in apoptosis*. Edited by Lavin M, Watters D. Amsterdam: Harwood academic publishers; 1999:1-16.
27. Hotchkiss R, Strasser A, McDunn J, Swanson E: Mechanisms of Disease. Cell Death. *N Engl J Med* 2009, 361: 1570-1583.
28. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat G: Caspases - An update. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2011, 151: 10-27.
29. Tait SW, Green DR: Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Mol Cell Biol* 2010, 11: 621-632.
30. Zhao Y, Wieman H, Jacobs S, Rathmell J: Mechanisms and methods in glucose metabolism and cell death. *Methods Enzymol* 2008, 442: 439-457.
31. Budiherdjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X: Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999, 15: 290.
32. Srinivasan V, Maestroni G, Cardinali D, Esquifino A, Perumal S, Miller S: Melatonin, immune function and aging. *Immunity & Ageing* 2005, 2: 17.
33. Weinert B, Timiras P: Physiology of aging. Invited Review: Theories of aging. *J Appl Physiol* 2003, 95: 1706-1716.
34. Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Effrus R, Grubeck-Loebenstien B, Wikby A: Is immunosenescence infectious? *Trends Immunol* 2004, 25: 406-410.

35. Hakim F, Flomerfelt F, Boyiadzis M, Gress R: Aging, immunity and cancer. *Curr Opin Immunol* 2004, 16: 151-156.
36. Arlt W, Hewison M: Hormones and immune function: implications of aging. *Aging Cell* 2004, 3: 209-216.
37. Coleman DL, Leiter EH, Schwizer RW: Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetic mice. *Diabetes* 1982, 31: 830-833.
38. Binello E, Gordon CM: Clinical uses and misuses of dehydroepiandrosterone. *Curr Opin Pharmacol* 2003, 3: 635-641.
39. Wolkowitz OM, Kramer JH, Reus VI, Costa MM, Yaffe K, Walton p *et al.*: DHEA treatment of Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Neurology* 2003, 60: 1071-1076.
40. Eich DM, Nestler JE, Johnson DE, Dworkin GH, Ko D, Wechsler AS *et al.*: Inhibition of accelerated coronary atherosclerosis with dehydroepiandrosterone in the heterotopic rabbit model of cardiac transplantation. *Circulation* 1993, 87: 261-269.
41. Schwartz AG, Pashko L, Whitcomb JM: Inhibition of tumor development by dehydroepiandrosterone and related steroids. *Toxicol Pathol* 1986, 14: 357-362.
42. Melvin WS, Boros LG, Muscarella P, Brandes JL, Johnson JA, Fisher WE *et al.*: Dehydroepiandrosterone-sulfate inhibits pancreatic carcinoma cell proliferation in vitro and in vivo. *Surgery* 1997, 121: 392-397.
43. Rao MS, Subbarao V: Dehydroepiandrosterone inhibits DNA synthesis of rat hepatocytes induced by partial hepatectomy or mitogen (ciprofibrate). *Cell Prolif* 1997, 30: 1-5.
44. Jiang YF, Zhao PW, Tan Y, Liu LH, Li MH, Matsuzaki Y *et al.*: Molecular mechanisms of DHEA and DHEAS on apoptosis and cell cycle arrest via Akt pathway in hepatoma cell lines. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2007, 15: 441-444.
45. Kim HH, Shaipanich M, Hasselblatt K, Yeh J: Induction of apoptosis and ovarian cyst formation in the mouse ovary by dehydroepiandrosterone (DHEA). *J Med* 2003, 34: 101-112.
46. Liang J, Yao G, Yang L, Hou Y: Dehydroepiandrosterone induces apoptosis of thymocyte through Fas/Fas-L pathway. *Int Immunopharmacol* 2004, 4: 1467-1475.

47. Fattman C: Apoptosis in pulmonary fibrosis: too much or not enough? *Antioxidants & Redox Signaling* 2008, 10: 379-389.
48. Iwasaki T, Mukasa K, Yoneda M, Ito S, Yamada Y, Mori Y *et al.*: Marked attenuation of production of collagen type I from cardiac fibroblasts by dehydroepiandrosterone. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 288: E1222-E1228.

## ANEXO

### *Tablas del Análisis Estadístico*

**Tabla 1.** Resultados del análisis de varianza y diferenciación de promedios de Dunnett aplicado al efecto de la concentración de DHEA sobre el número de fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu).

|                | SC       | GL    | MC      | F       | p             |
|----------------|----------|-------|---------|---------|---------------|
| <b>ANOVA</b>   |          |       |         |         |               |
| 24 h           | 1551.33  | 5     | 310.27  | 46.03   | <b>0.000*</b> |
| 48 h           | 6522.46  | 5     | 1304.49 | 176.688 | <b>0.000*</b> |
| 72 h           | 11945.36 | 5     | 2389.07 | 139.373 | <b>0.000*</b> |
| 96 h           | 12930.40 | 5     | 2586.08 | 24.8356 | <b>0.001*</b> |
| <b>Dunnett</b> |          |       |         |         |               |
|                | 24 h     | 48 h  | 72 h    | 96 h    |               |
| 0              |          |       |         |         |               |
| 50             | 0.410    | 0.812 | 0.998   | 0.964   |               |
| 100            | 0.390    | 0.599 | 0.712   | 0.746   |               |
| 200            | 0.017    | 0.000 | 0.001   | 0.033   |               |
| 300            | 0.000    | 0.000 | 0.000   | 0.001   |               |
| 400            | 0.000    | 0.000 | 0.000   | 0.001   |               |

**Tabla 2.** Resultados del análisis de varianza y diferenciación de promedios de Dunnett aplicado al efecto de la concentración de DHEA sobre el número de fibroblastos pulmonares normales primarios (NOVA).

|                | SC      | GL     | MC     | F      | p             |
|----------------|---------|--------|--------|--------|---------------|
| <b>ANOVA</b>   |         |        |        |        |               |
| 2 días         | 1737.8  | 5      | 347.6  | 0.690  | <b>0.650</b>  |
| 4 días         | 1183.8  | 5      | 236.8  | 2.428  | <b>0.155</b>  |
| 6 días         | 3146.11 | 5      | 629.22 | 3.273  | <b>0.091</b>  |
| 8 días         | 3906.83 | 5      | 781.37 | 10.426 | <b>0.006*</b> |
| <b>Dunnett</b> |         |        |        |        |               |
|                | 2 días  | 4 días | 6 días | 8 días |               |
| 0              |         |        |        |        |               |
| 25             | 0.956   | 0.089  | 0.272  | 0.031  |               |
| 50             | 0.930   | 0.887  | 0.075  | 0.025  |               |
| 100            | 0.981   | 0.935  | 0.071  | 0.007  |               |
| 200            | 0.745   | 0.785  | 0.127  | 0.001  |               |
| 300            | 0.987   | 0.950  | 0.015  | 0.002  |               |

**Tabla 3.** Resultados del análisis de varianza y diferenciación de promedios de Dunnett aplicado al efecto de la concentración de DHEA sobre el porcentaje de proliferación de fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu).

|                | SC       | GL    | MC      | F      | p             |
|----------------|----------|-------|---------|--------|---------------|
| <b>ANOVA</b>   |          |       |         |        |               |
| 24 h           | 13156.72 | 3     | 4385.57 | 47.840 | <b>0.000*</b> |
| 48 h           | 10038.29 | 3     | 3346.10 | 54.145 | <b>0.000*</b> |
| <b>Dunnett</b> |          |       |         |        |               |
|                | 24 h     | 48 h  |         |        |               |
| 0              |          |       |         |        |               |
| 50             | 0.000    | 0.000 |         |        |               |
| 100            | 0.000    | 0.000 |         |        |               |
| 200            | 0.000    | 0.000 |         |        |               |

**Tabla 4.** Resultados del análisis de varianza y diferenciación de promedios de Dunnett aplicado al efecto de la concentración de DHEA sobre el porcentaje de apoptosis en fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu).

|                | SC       | GL    | MC      | F      | p             |
|----------------|----------|-------|---------|--------|---------------|
| <b>ANOVA</b>   |          |       |         |        |               |
| 12 h           | 331.009  | 3     | 110.336 | 21.310 | <b>0.000*</b> |
| 24 h           | 1328.085 | 3     | 442.695 | 21.952 | <b>0.000*</b> |
| 48 h           | 1710.77  | 3     | 570.26  | 3.294  | <b>0.058</b>  |
| 96 h           | 2255.81  | 3     | 751.94  | 28.162 | <b>0.000*</b> |
| <b>Dunnett</b> |          |       |         |        |               |
|                | 12 h     | 24 h  | 48 h    | 96 h   |               |
| 0              |          |       |         |        |               |
| 100            | 0.000    | 0.000 | 0.044   | 0.001  |               |
| 200            | 0.000    | 0.000 | 0.018   | 0.000  |               |
| 300            | 0.001    | 0.000 | 0.046   | 0.000  |               |

**Tabla 5.** Resultados del análisis de varianza y diferenciación de promedios de Dunnett aplicado al efecto de la concentración de DHEA sobre la activación de la caspasa 9, medida por fluorometría, en fibroblastos pulmonares normales (CCD25Lu).

|                | SC      | GL    | MC     | F     | p             |
|----------------|---------|-------|--------|-------|---------------|
| <b>ANOVA</b>   |         |       |        |       |               |
| 12 h           | 21653.9 | 3     | 7218.0 | 5.353 | <b>0.039*</b> |
| 24 h           | 15419.9 | 3     | 5140.0 | 7.597 | <b>0.018*</b> |
| <b>Dunnett</b> |         |       |        |       |               |
|                | 12 h    | 24 h  |        |       |               |
| C              |         |       |        |       |               |
| 50             | 0.943   | 0.679 |        |       |               |
| 100            | 0.029   | 0.020 |        |       |               |
| 200            | 0.113   | 0.011 |        |       |               |