



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**“MECANISMO DE ACCIÓN DE LA
DEHIDROEPIANDROSTERONA EN LA TRANSICIÓN MESÉNQUIMA-
EPITELIO EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA MDA-MB-231”**

**T E S I S
QUE PRESENTA:**

M. en B.R.A. Zaira Colín Val
MATRÍCULA: 2171801239

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

JURADO:

Presidenta: Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero (Codirectora interna)

Secretaria: Dra. Rebeca López Marure (Codirectora externa)

Vocal: Dra. Mina Königsberg Fainstein (Asesora)

Vocal: Dra. María Isabel Soto Cruz

Vocal: Dra. Criselda Mendoza Milla

Ciudad de México, junio 2021.



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, bajo la dirección de la Dra. Rebeca López Marure y de la Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero del Departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y del Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo de la Dra. Mina Konigsberg Fainstein del Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I.

La autora agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 570169, que comprendió del periodo de 1-01-2017 al 31-12-2020. El doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de excelencia del CONACyT y, además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

Zaira Colín Val
15 de junio de 2021

JURADO:

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero
Presidenta

Prof. Investigador Titular "C", Tiempo Completo
Laboratorio de Bioenergética y
Envejecimiento Celular,
Departamento de Ciencias de la Salud.
División CBS. Universidad Autónoma
Metropolitana Iztapalapa.

Dra. Rebeca López Marure
Secretaria

Jefe del Departamento de Fisiología
Investigador en Ciencias Médicas "D", Tiempo
Completo,
Laboratorio de Biología Celular,
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio
Chávez".

Dra. María Isabel Soto Cruz
Vocal

Laboratorio de Oncología
Molecular, Unidad de
Investigación en Diferenciación
Celular y Cáncer,
Laboratorio 9PB, UMIEZ,
FES Zaragoza, UNAM

Dra. Criselda Mendoza Milla
Vocal

Investigador en Ciencias Médicas "C"
Laboratorio de Biología
Celular, Departamento de Fibrosis Pulmonar,
Unidad de Investigación del
Instituto Nacional de Enfermedades
Respiratorias.

Dra. Mina Königsberg Fainstein
Vocal

Prof. Titular "C", Tiempo Completo
Responsable del Laboratorio de
Bioenergética y Envejecimiento Celular.
Departamento de Ciencias de la Salud.
División CBS. Universidad Autónoma
Metropolitana Iztapalapa.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer de forma general a todas las personas que han compartido sus conocimientos conmigo y me han ayudado a crecer de forma profesional.

A mi jurado en especial a la Dra. Isabel y la Dra. Criselda por aceptar ser parte de mi jurado, por tomarse el tiempo de leer y realizar comentarios a mi tesis.

A mi posgrado por el apoyo.

A la Dra. Mina por su apoyo y porque gracias a ella conocí a la Dra. Rebeca y llegue al laboratorio que se convertiría en mi segunda casa.

A la Dra. Norma por ayudarme con mis dudas, por estar pendiente en todo momento, apoyarme y creer en mí desde la maestría.

A la Dra. Viridiana que empezó conmigo este camino y ahora sé que me está apoyando desde el cielo.

A la Dra. Rebeca no solo por ser mi mamá académica y abrirme las puertas de su laboratorio, sino también por brindarme su amistad y por sus sabios consejos, siempre le estaré agradecida por todo el apoyo.

A todos mis compañeros de laboratorio, Eli, José Antonio, Manuel, Diana, Michel, Daniel y a todos los que han pasado, aunque sea por un momento por el laboratorio, gracias por brindarme su apoyo, su amistad, por las risas, las pláticas y por estar ahí en los momentos de celebración, de frustración y estrés por los que he pasado, de verdad siempre tendrán un lugar en mi corazón, y espero que esta amistad dure más allá del laboratorio.

A Carlos por las pláticas, pero sobre todo por las risas y aunque no convivimos tanto espero que esta amistad dure mucho tiempo, P.D. luego me agradece por el honor de estar en mi tesis.

A Gabriel por las largas pláticas, los cafés y por tu amistad.

A mi amiga Ana por ser mi apoyo y estar orgullosa de mi como yo de ella, gracias por las pláticas, los desayunos y tu amistad.

En general a mi familia, tíos, primos, pero sobre todo a mi abuelita y a mis padres, hermanos y sobrinas.

Y por supuesto a la personita más importante en mi vida, a mi hijo gracias por apoyarme y entenderme los días que llegue tarde, cansada y sin ganas de jugar, gracias por ser tan buen hijo. TE AMO.

DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico a mis padres, hermanos por su apoyo y su ayuda con Santi y a mis sobrinas espero ser un buen ejemplo para ustedes.

Pero principalmente se la dedico a dos personas la primera es a Santiago por ser el mejor hijo del mundo y por ser mi apoyo incondicional, esto va por ti, para que estés orgulloso de tú mamá, y la segunda persona a mí, por mi esfuerzo, dedicación, por demostrarme que, si puedo con todo, que soy inteligente, capaz y muy chingona.

INDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
ABREVIATURAS	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 LA DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)	12
1.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA DHEA	12
1.1.2 EL METABOLISMO DE LA DHEA.....	12
1.1.3 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y RECEPTORES UTILIZADOS POR LA DHEA.....	13
1.2 EL CÁNCER	14
1.2.1 EL CÁNCER DE MAMA Y LA ANGIOGÉNESIS.....	15
1.2.2 LA MIGRACIÓN Y LA METÁSTASIS.....	16
1.2.3 LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMA (TEM).....	17
1.2.4 LA TRANSICIÓN MESÉNQUIMA- EPITELIO (TME).....	17
1.2.5 LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA TEM	19
1.2.6 LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL CÁNCER	20
2. ANTECEDENTES	21
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	25
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS	26
6.1 OBJETIVO GENERAL	26
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	26
7.1 MATERIALES.....	26
7.2 CONDICIONES DEL CULTIVO CELULAR.....	27
7.3 ENSAYO MTT	29
7.4 CRISTAL VIOLETA (CV).....	29
7.5 ENSAYO DE MIGRACIÓN	30
7.6 ENSAYO DE MOTILIDAD (ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA)	30
7.7 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	31
7.8 WESTERN BLOT	31
7.9 TRANSFECCIÓN DEL siRNA.....	32
7.10 ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUMORES.....	32
7.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
8. RESULTADOS	35

8.1 LA COMBINACIÓN DE LA DHEA Y LOS INHIBIDORES DISMINUYÓ LA PROLIFERACIÓN	36
8.2 LA WORTMANINA REVIRTIÓ LA INHIBICIÓN DE LA MIGRACIÓN INDUCIDA POR LA DHEA	38
8.3 LA EXPRESIÓN DE LA E Y N-CADHERINA REGULADA POR LA DHEA	40
8.4 EL INHIBIDOR LY294002 NO AFECTO LA REDUCCIÓN DE MTT EN LAS CÉLULAS MDA-MB-231.....	44
8.5 LOS EFECTOS DE LA DHEA EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 SON ATRAVÉS DE LA VÍA PI3K/Akt.....	49
8.6 FORMACIÓN DE TUMORES <i>IN VIVO</i>.....	54
9. DISCUSIÓN.....	56
10. CONCLUSIÓN	63
11. PERSPECTIVAS.....	63
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
13. ANEXOS (ARTÍCULO).....	72

FIGURAS Y TABLAS

<i>Figura 1. Estructura de la DHEA.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 2. La angiogénesis.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 3. Procesos celulares durante el desarrollo de la metástasis.</i>	<i>18</i>
<i>Figura 4. Efecto de la DHEA y de los inhibidores en la citotoxicidad de las células MDA-MB-231.</i>	<i>35</i>
<i>Figura 5. Los inhibidores disminuyen la presencia de Akt-p y ERK-p en células MDA-MB-231.</i>	<i>36</i>
<i>Figura 6. La inhibición de la proliferación causada por la DHEA en células MDA-MB-231 no se vio afectada por los inhibidores.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 7. La DHEA disminuyó la migración mediante ensayos de cierre de herida a través de la vía PI3K/Akt.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 8. La DHEA disminuyó la migración mediante ensayos transwell a través de la vía PI3K/Akt.</i>	<i>40</i>
<i>Figura 9. La DHEA aumentó la expresión de la E-cadherina en células MDA-MB-231 a través de la vía PI3K/Akt.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 10. La DHEA disminuyó la expresión de la N-cadherina en las células MDA-MB-231 a través de la vía PI3K/Akt.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 11. El LY294002 no afectó la reducción de MTT.</i>	<i>44</i>
<i>Figura 12. Efecto del inhibidor LY294402 en la presencia de la proteína AKT y AKT-p en la línea celular MDA-MB-231.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 13. La inhibición de la proliferación causada por la DHEA en las células MDA-MB-231 no se vio afectada con el inhibidor LY294002.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 14. La DHEA disminuyó la migración mediante ensayos de cierre de herida a través de la vía PI3K/Akt.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 15. La DHEA disminuyó la migración mediante ensayos transwell a través de la vía PI3K/Akt.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 16. La DHEA aumentó la expresión de la E-cadherina en las células MDA-MB-231 a través de la vía PI3K/Akt utilizando el inhibidor LY294002.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 17. Efecto del siRNA en la expresión de la proteína PI3K en la línea celular MDA-MB-231.</i>	<i>50</i>
<i>Figura 18. La inhibición de la proliferación causada por la DHEA en células MDA-MB-231 es mediante la vía de la PI3K.</i>	<i>51</i>

Figura 19. La DHEA disminuyó la migración mediante ensayos de cierre de herida a través de la vía PI3K/Akt.....	52
Figura 20. La DHEA disminuyó la migración mediante ensayos transwell a través de la vía PI3K/Akt.	53
Figura 21. La DHEA aumenta la expresión de la E-cadherina en las células MDA-MB-231 a través de la vía PI3K/Akt utilizando el inhibidor LY294002.....	54
Figura 22. El siRNA contra el gen PIK3CA abolió el efecto de la DHEA en el crecimiento tumoral de xenotransplante de las células MDA-MB-231 en ratones desnudos.....	55
Figura 23. Papel de la vía de PI3K/Akt en el cáncer. Durante la tumorigénesis, la vía PI3K/Akt está hiperactivada.....	62
Tabla 1. Características de la línea celular MDA-MB-231.	28
Tabla 2. Inhibidores.....	29
Tabla 3. Grupos del ensayo in vivo.	34

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, siendo el cáncer de mama la primera causa en mujeres, por lo que esta tesis contribuirá a dar un mejor y eficaz tratamiento contra el cáncer de mama.

La dehidroepiandrosterona (DHEA) es una hormona esteroide adrenal y está presente en una concentración más alta que cualquier otra hormona en el plasma humano. Se ha observado que la DHEA inhibe la proliferación y la migración de las células de cáncer de mama, y modifica la expresión de proteínas implicadas en la transición epitelio-mesénquima (TEM). Sin embargo, los mecanismos implicados en estos efectos no se comprenden completamente. Por lo que es importante estudiar este mecanismo por el cual la DHEA tiene estos efectos sobre el cáncer de mama para poder utilizarla en el tratamiento de dicha enfermedad.

Los efectos de la DHEA sobre la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 podrían producirse por la unión de ésta a los RTK y la señalización a través de las vías MEK/ERK y/o PI3K/Akt. En el presente estudio, las células MDA-MB-231 se trataron con la DHEA en presencia de inhibidores farmacológicos de estos receptores y vías, así también se utilizó el siRNA contra el gen *PIK3CA*, que bloquea la vía PI3K. La proliferación celular se midió mediante la tinción con violeta cristal, la migración mediante los ensayos de cierre de herida y la migración usando placas transwell. Mientras que la expresión de las proteínas de la TEM por medio de Western blot. Así mismo se realizó un ensayo *in vivo* de xenotransplante en ratones desnudos (nu/nu) utilizando el siRNA contra *PIK3CA*.

Los resultados mostraron que ninguno de los inhibidores utilizados revirtió la actividad antiproliferativa de la DHEA. Sin embargo, la wortmanina y el LY294002, inhibidores de la vía PI3K/Akt, revirtieron la inhibición de la migración y los cambios en la expresión de las proteínas E- y N-cadherina, inducidos por la DHEA en células MDA-MB-231. El siRNA contra *PIK3CA* abolió los efectos de la DHEA sobre la proliferación, la migración, la expresión de proteínas TEM y el crecimiento de tumores en ratones desnudos. En conclusión, estos resultados sugieren que la vía PI3K/Akt participa en los efectos de la DHEA en la línea celular MDA-MB-231.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of worldwide deaths, and breast cancer is the leading cause of cancer death in women, so this thesis contributes to providing a better and effective treatment against breast cancer.

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an adrenal steroid hormone present in a higher concentration than any other hormone in human plasma. DHEA has been shown to inhibit the proliferation and migration of breast cancer cells and to modify the expression of proteins involved in the epithelial-mesenchymal transition (EMT). However, the mechanisms involved in these effects are not fully understood.

The effects of DHEA on the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 could be produced by its binding to the receptor of tyrosine kinase (RTK) and through the MEK/ERK and/or PI3K/Akt pathways. In this study, the MDA-MB-231 cells were treated with DHEA in the presence of pharmacological inhibitors of these receptors and pathways, as well as a siRNA against the PIK3CA gene. Cell proliferation was measured by crystal violet staining, migration by wound healing and transwell assays, and protein expression by Western blot. An *in vivo* xenograft assay was performed in nude mice (nu⁻/nu⁻) using siRNA against *PIK3CA*.

The results showed that none of the inhibitors used reversed the antiproliferative activity of DHEA. However, wortmannin and LY294002, PI3K/Akt pathway inhibitors, reversed the migration inhibition and the changes in the E- and N-cadherin proteins expression, induced by DHEA in MDA-MB-231 cells. The siRNA against PIK3CA abolished DHEA's effects on proliferation, migration, EMT protein expression, and tumor growth in nude mice. In conclusion, these results suggest that the PI3K/Akt pathway participates in the effects of DHEA in the MDA-MB-231 cell line.

ABREVIATURAS

DHEA: Dehidroepiandrosterona
RTK: Receptores de tirosina cinasa
TEM: Transición epitelio mesenquima
TME: Transición mesenquima epitelio
ACTH: Adrenocorticotrópica
SULT2A: Sulfotransferasa
SO₃⁻²: Sulfurilo
NR: nucleares
RXR: Receptor retinoide X
AR: Receptor de andrógenos
ER α y Er β : Receptor de estrógenos α y β
PXR: Receptor de pregnano
SXR: Receptor de xenobióticos esteroideos
PM: Receptores de membrana plasmática
T: Testosterona
DTH: Dihidrotestosterona
E2: Estradiol
S1R: Receptor sigma-1
NGF: Receptores de la familia de neurotrofina
NCI: Instituto Nacional del Cáncer
TNB: Triple negativo
RE: Receptor de estrógenos
RP: Receptor de progesterona
(TEM-TF): Factores de transcripción activadores de la TEM
miRNA: Pequeños RNA interferentes

ROS: Especies reactivas de oxígeno
MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógeno
PI3K: Fosfatidil inositol 3-kinasa
mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero
IGFR: Receptor de factor de crecimiento insulínico
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico
PIP2: Fosfatidil inositol 4,5 difosfato
PIP3: Fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato
PH: Pleckstrina
PDK: Enzima piruvato deshidrogenasa cinasa
ERK: Cinasa regulada por señal extracelular
AG-1478: 4-3-chloroanilino-6,7-dimethoxyquinazoline
RNAi: RNA de interferencia
piRNA: RNA asociado a piwi
siRNA: RNA interferente pequeño
AA: Ácido asiático
EGCG: Epigallocatequina-3-galato
CAS: Sustrato asociado a crk
CCR: Células de cáncer colorrectal
AM: Astragalus membranaceus (AM)
PKB: Proteína cinasa B

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)

1.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA DHEA

La DHEA (3 β -hidroxi-5-androsten-17-ona) es un esteroide adrenal que está presente en el plasma humano en una concentración más alta que cualquier otra hormona esteroide (Clark, 2018). La DHEA está formada por una molécula de ciclopentano-perhidrofenantreno, compuesta por 3 anillos (A, B y C) de 6 carbonos y uno de 5 (D), con ciertas modificaciones (Figura 1). Pertenece a los esteroides de 19 carbonos con un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 del anillo B, además contiene un grupo ceto o hidroxil en la posición 17 y una masa molar de 288.424 g/mol (Ganong, 1996; Prough *et al.*, 2016).

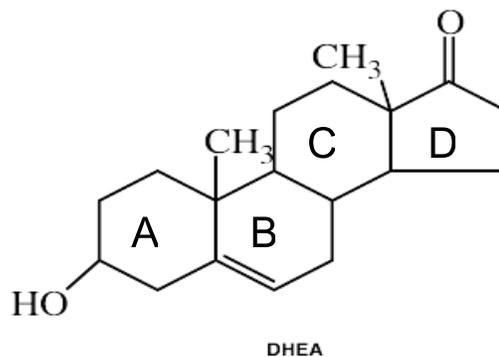


Figura 1. Estructura de la DHEA

(modificada de Goodarzi *et al.*, 2014).

1.1.2 EL METABOLISMO DE LA DHEA

La DHEA se origina a partir del colesterol bajo la regulación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) proveniente de la glándula hipófisis, se sintetiza principalmente en la zona reticular de la corteza suprarrenal, y en menor cantidad en las

células de la teca ovárica, en las células de Leydig en los testículos y en el cerebro. Se metaboliza en el hígado, en donde se convierte a androstendiona, la cual es el principal precursor de andrógenos y estrógenos (Klinge *et al.*, 2018). La principal forma circulante de la DHEA es la hormona unida a un azufre (DHEA-S). La sulfonación de la DHEA en la suprarrenal es catalizada por el miembro 1 de la familia 2A de la sulfotransferasa (SULT2A1) que conjuga sulfurilo (SO_3^{-2}) con el grupo C3- β -hidroxilo de la DHEA que produce la DHEA-S, a su vez la DHEA-S es metabólicamente interconvertible a la DHEA a través de la hidrólisis por una sulfatasa (Sahu *et al.*, 2020).

La DHEA tiene un patrón de secreción característico relacionado con la edad. La producción suprarrenal de la DHEA comienza durante la pubertad, alcanza su punto máximo a los 20 años y disminuye con la edad a partir de los 25 años. Los niveles de la hormona descienden progresivamente a una tasa del 2% por año (Sahu *et al.*, 2020). La disminución de los niveles plasmáticos de la DHEA se ha relacionado con la aparición de diversas patologías como cambios en el metabolismo, depresión, cáncer de mama, entre otros (Sahu *et al.*, 2020).

Durante casi 50 años se consideró que la DHEA era un compuesto inerte, y solo un precursor de las hormonas sexuales andrógenos y estrógenos (Rutkowski *et al.*, 2014). En la actualidad, la evidencia ha demostrado que tiene actividades biológicas en muchos tejidos y activa varias vías de señalización a través de su unión a receptores de membrana y nucleares (Vegliante y Ciriolo, 2018).

1.1.3 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y RECEPTORES UTILIZADOS POR LA DHEA

Los mecanismos de acción de la DHEA aún no se han comprendido completamente. Se ha propuesto que la DHEA se une a los receptores nucleares (NR) de clase I, es decir, a los receptores de hormonas esteroideas. También se une a algunos de los NR de clase II, que son aquellos que se dimerizan con el receptor retinoide X (RXR) (Prough *et al.*, 2016). Así mismo se ha observado que la DHEA se une a los receptores de andrógenos (AR), receptores de estrógenos α y β (ER α y ER β , ESR1 y ESR2), receptor de pregnano (PXR),

receptor de xenobióticos esteroideos (SXR), así como a los receptores de membrana plasmática (PM) (Webb *et al.*, 2006; Teng *et al.*, 2015). Las afinidades de unión de la DHEA con los NR son mucho más bajas que las de los ligandos afines a los receptores. Cuando la DHEA se metaboliza a andrógenos (testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT) y a estrógenos (estradiol (E2), tiene una alta afinidad de unión por los AR y ER; sin embargo, es mayor por el ER α y el ER β (Clark *et al.*, 2018). Otros receptores a los que la DHEA se puede unir activándolos o inhibiéndolos son los de membrana plasmática, entre los que se encuentran, el receptor sigma-1 (S1R), los RTK, receptores de la familia de neurotrofina (NGF), receptores acoplados a proteínas G, etc. (Clark *et al.*, 2018). Dependiendo del tipo celular, la DHEA puede unirse a estos receptores y tener efectos biológicos. Varios autores han reportado la probabilidad de que exista un receptor específico para la DHEA; sin embargo, éste aún no ha sido confirmado (Williams *et al.*, 2002; Liu y Dillon, 2002).

1.2 EL CÁNCER

El Instituto Nacional del Cáncer (NCI) define al cáncer como el conjunto de enfermedades donde las células anormales se multiplican sin control pudiendo invadir otros tejidos a través de los sistemas sanguíneo y linfático (NCI).

Existen diferentes tipos de cáncer, siendo el cáncer de mama uno de los más frecuentes en todo el mundo y la primera causa de muerte en mujeres por cáncer en México (OMS, 2020; INEGI, 2020). El cáncer es una enfermedad heterogénea, su rápida progresión y su tan elevada mortalidad se relacionan fuertemente con procesos de neo-angiogénesis y metástasis en órganos diferentes a su origen, los sitios de metástasis más frecuentes del cáncer de mama son los pulmones, el hueso y el hígado (Jin *et al.*, 2018).

El cáncer de mama, a su vez, se divide en diferentes subtipos en función de la presencia o ausencia del receptor de estrógenos (RE), el receptor de progesterona (RP) y el receptor HER2. Así, podemos distinguir entre un subtipo luminal con alta expresión del RE, RP, y HER2, y un subtipo basal o triple negativo (TNBC), caracterizado por tener menos del 1% de los RE y RP, y la ausencia del HER2, lo que con lleva a un mal pronóstico (Bergin y Loi, 2019).

Para que la metástasis suceda debe ocurrir una serie de pasos previos como son, el rearreglo del citoesqueleto, la invasión celular, la migración y la entrada de las células a la circulación (Massagué y Obenauf, 2016).

1.2.1 EL CÁNCER DE MAMA Y LA ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis es un proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Sajib *et al.*, 2018) (Figura 2). Es un proceso fundamental asociado con el desarrollo normal pero también con el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis (Raica *et al.*, 2009). Incluye varios pasos donde el microambiente juega un papel muy importante. Las células inmunes infiltrantes, el tejido normal adyacente y/o las células tumorales secretan factores de crecimiento angiogénicos los cuales se enlazan a receptores específicos sobre las células endoteliales (Eldridge y Wagner, 2019). La interacción de estos receptores con sus ligandos produce la diferenciación y la proliferación de las células endoteliales y eventualmente la formación de tubos capilares (Khosravi *et al.*, 2009).

A través de estudios clínicos-patológicos y experimentales se ha mostrado que la angiogénesis tiene un papel esencial en el desarrollo, así como para la invasión y la metástasis del cáncer de mama, ya que los nuevos vasos sanguíneos proveen los nutrientes y el oxígeno necesario para la formación del nuevo tumor (Lu *et al.*, 2003).

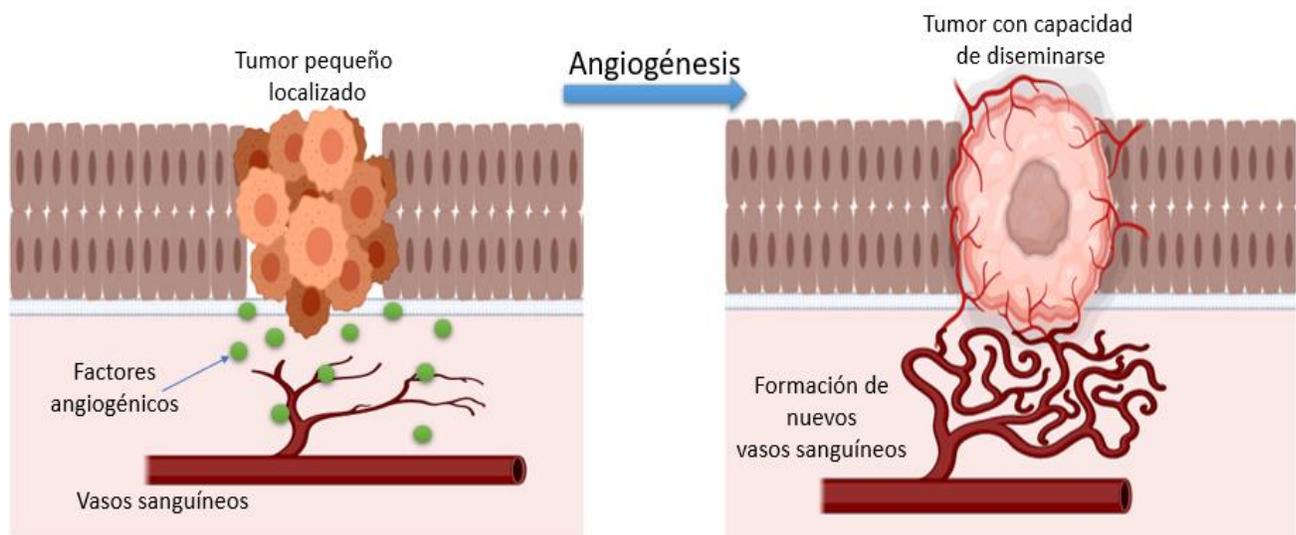


Figura 2. La angiogénesis.

Es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de una red preexistente. Se realiza con la ayuda de factores de crecimiento angiogénicos que interactúan con los receptores de las células endoteliales, provocando la diferenciación y la proliferación de estas y eventualmente la formación de tubos capilares que proveen los nutrientes necesarios para el crecimiento del tumor.

1.2.2 LA MIGRACIÓN Y LA METÁSTASIS

La elevada mortalidad del cáncer se debe a su frecuente capacidad de generar metástasis, principalmente en los huesos, los pulmones y el cerebro, y es la causa del 90% de las muertes relacionadas con el cáncer (Kelly *et al.*, 2007; Boareto *et al.*, 2016). Un momento clave en el desarrollo de la metástasis es la migración, un proceso de múltiples etapas que involucra cambios en el citoesqueleto, en las adhesiones substrato-célula y en los componentes de la matriz extracelular de las células tumorales. Dichas células viajan a través de las monocapas de células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos, para su posterior invasión a tejidos y órganos distantes formando un tumor secundario. Las células cancerosas pueden migrar como células individuales o migrar colectivamente (Massagué y Obenauf, 2016).

Estos eventos se inician con células tumorales primarias que pierden características epiteliales y adquieren las características de tipo mesenquimatoso, proceso conocido como Transición Eppitelio-Mesénquima (TEM) (Knaul *et al.*, 2008; Neophytou *et al.*, 2019).

1.2.3 LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMA (TEM)

La TEM es un proceso que se presenta durante la embriogénesis, pero también se ha asociado con varias funciones tumorales como la iniciación tumoral, la progresión maligna, la migración de la célula tumoral, la intravasación a la sangre, la metástasis y la resistencia a la terapia (Pastushenko y Blanpain, 2019). Durante la TEM, las células epiteliales pierden sus propiedades y adquieren un fenotipo y características mesenquimales, entre las que se encuentran la pérdida de la polaridad y de la adhesión celular, el aumento en la movilidad e invasividad, la resistencia a la apoptosis y varios cambios morfológicos. Durante este proceso tan complejo participan diversos factores de transcripción, así como ciertas proteínas epiteliales y mesenquimales, entre las que destacan la E-cadherina, la β -catenina y la N-cadherina (Kalluri y Weinberg, 2009).

1.2.4 LA TRANSICIÓN MESÉNQUIMA- EPITELIO (TME)

Por otro lado, también existe el proceso contrario de la TEM, conocido como transición mesénquima-epitelio (TME), en el cual la célula con fenotipo mesenquimal lo pierde adquiriendo nuevamente su fenotipo epitelial, perdiendo su capacidad de migrar gracias al aumento de proteínas de unión como la E-cadherina y a la disminución de las proteínas mesenquimales como la N-cadherina, entre otras (Boareto *et al.*, 2016; Jolly *et al.*, 2017).

Las células epiteliales y mesenquimales difieren en varias características funcionales y fenotípicas. En condiciones normales, las células epiteliales no se desprenden del epitelio y no migran, aunque si tienen cierta capacidad motriz dentro de la capa epitelial (Thiery y Sleeman, 2006). En cultivo, las células epiteliales crecen en grupos de células que mantienen las adhesiones con las células vecinas y presentan marcadores epiteliales como la E-cadherina, la desmoplaquina y la citoqueratina celular (Zavala-Zendejas *et al.*, 2011; Brabletz *et al.*, 2018). En contraste, las células mesenquimales no forman capas organizadas, las adhesiones con las células mesenquimales vecinas son menos fuertes y no están asociadas a una lámina basal, lo que les permite una mayor capacidad migratoria. En cultivo, las células mesenquimales tienen forma de huso, con una morfología similar a

los fibroblastos y tienden a ser motrices, presentan expresión de marcadores mesenquimales como la proteína N-cadherina y filamentos intermedios (vimentina) (La Gamba *et al.*, 2005; Thiery y Sleeman, 2006) (Figura 3).

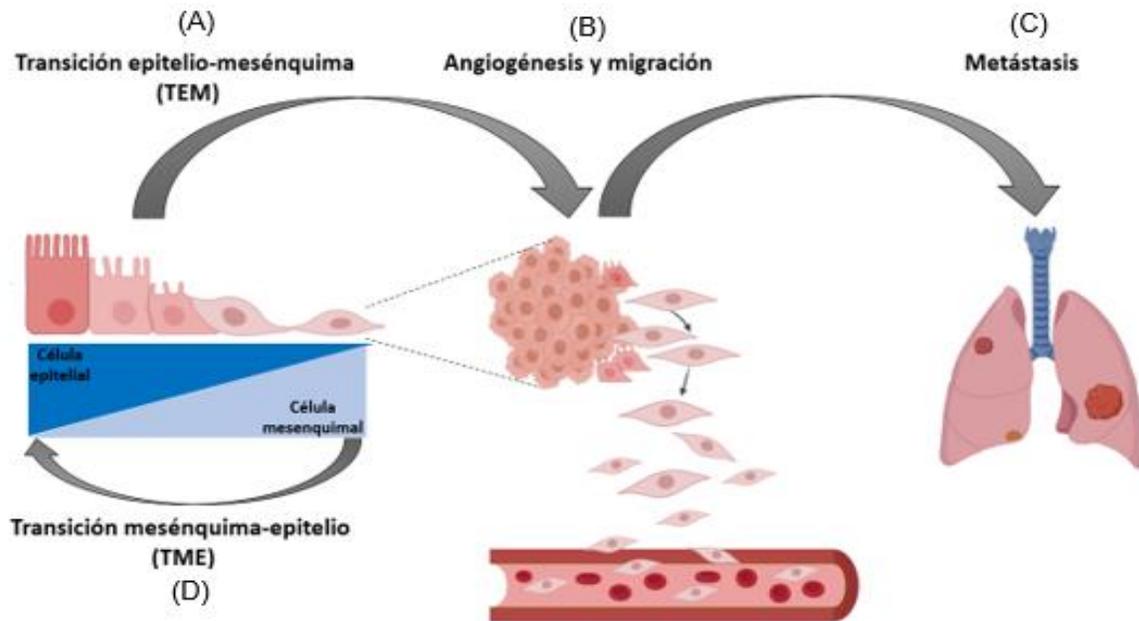


Figura 3. Procesos celulares durante el desarrollo de la metástasis.

Para que la metástasis ocurra existen pasos previos como la TEM, la cual consiste en la pérdida progresiva de los marcadores epiteliales y el aumento de los mesenquimales, provocando la transición funcional de las células epiteliales polarizadas a células mesenquimales móviles (A). Formación de nuevos vasos sanguíneos y migración de las células mesenquimales (B). Formación de tumor secundario (metástasis) (C). Transición funcional de las células mesenquimales a las células epiteliales (D).

1.2.5 LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA TEM

Durante la iniciación y la finalización de la TEM se ven involucrados varios procesos moleculares, entre ellos se encuentran los factores de transcripción activadores de la TEM (TEM-TF), principalmente de las familias SNAIL, TWIST, Slug y ZEB. Además, ocurren cambios y reorganización en la expresión de proteínas específicas de superficie y del citoesqueleto, y cambios en la producción de enzimas y en la expresión de micro RNAs (miRNAs) (Brabletz *et al.*, 2018). Los TEM-TF desempeñan papeles importantes en todas las etapas de la progresión del cáncer desde el inicio, el crecimiento primario del tumor, la invasión y la metástasis, así como en la resistencia a la terapia (Brabletz *et al.*, 2018). El TEM-TF SNAIL juega un papel importante en la regulación de la TEM, ya que al ser un factor de transcripción media la disminución en la expresión de moléculas de adhesión como E-cadherina, claudina y ocludina, así como el incremento de marcadores mesenquimales como vimentina, fibronectina y la expresión de metaloproteinasas (Qiao *et al.*, 2012). Por otro lado, la expresión de Slug es activada por la translocación de la proteína β -catenina al núcleo promoviendo la TEM (Kalluri y Weinberg, 2009).

Numerosas señales extracelulares como factores de crecimiento, señales estromales, y factores estresantes como la hipoxia y las especies reactivas de oxígeno (ROS) han sido implicados en la inducción de la TEM. Durante la TEM ocurre una reducción de la adhesión célula-célula mediante la represión transcripcional de las cadherinas componentes de las uniones adherentes, la ocludina y la claudina componentes de las uniones estrechas y la desmoplaquina, componente de los desmosomas (De Wever *et al.*, 2008). La expresión de los filamentos intermedios también cambia durante la TEM con la sustitución de la citoqueratina de las células epiteliales por la vimentina típica de las células mesenquimales (Omary *et al.*, 2004).

Una característica muy marcada de la TEM es la pérdida de la expresión de la E-cadherina (Thiery y Sleeman, 2006), lo que permite que las células tumorales se desenganchen de la masa primaria y pasen a los conductos de diseminación. Las adherencias de célula a célula mediadas por la E-cadherina limitan la motilidad celular y establecen la polaridad apical-basal. Esta característica de mantener la adhesión entre las células es lo que le otorga la capacidad de actuar como gen supresor de tumores (Chao *et al.*, 2010). La sola alteración de la expresión de la E-cadherina es suficiente para desencadenar una TEM (Onder, 2008).

1.2.6 LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL CÁNCER

Se han descrito muchas alteraciones en las células de cáncer de mama. Sin embargo, las alteraciones más estudiadas y más directamente involucradas en la iniciación, la progresión y el desarrollo del cáncer de mama son las que involucran vías de señalización como las de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y la vía de señalización, fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K), Akt y la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) (Asati *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2018). Estas vías son estimuladas como consecuencia de la activación de receptores de membrana tirosina cinasa, como el receptor de factor de crecimiento insulínico (IGFR) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), así como por receptores acoplados a proteínas G (Vivek *et al.*, 2016).

La PI3K se divide en tres clases (I, II, III) en función de su estructura y especificidad de sustrato (Pinzón *et al.*, 2009). La clase I se clasifica además en clase IA y IB, en donde la clase IA es la clase más estrechamente implicada en cáncer. La PI3K está constituida por un dominio catalítico p110 y un dominio regulador p85. La PI3K fosforila al fosfatidil inositol 4,5 difosfato (PIP2), para dar como producto al fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP3) que es el segundo mensajero de esta ruta, el cual activará a la AKT mediante su unión al dominio de homología con pleckstrina (PH) (Mukohara, 2015).

La vía de PI3K/Akt es necesaria en numerosos aspectos del crecimiento y la supervivencia celular (Fruman y Rommel, 2014). La activación anormal de esta vía provoca la alteración de los mecanismos de control del crecimiento, la motilidad y la supervivencia celular, lo que favorece el crecimiento, la capacidad metastásica y una mayor resistencia a los tratamientos para eliminar a células cancerígenas (Fruman *et al.*, 2017; Ortega *et al.*, 2020).

Las MAPKs son activadas por estímulos de muy diversa naturaleza y son un paso crítico en la traducción de estímulos extracelulares en respuestas intracelulares mediante la fosforilación y consiguiente activación de múltiples sustratos (Vivek *et al.*, 2016). La regulación aberrante de la vía de las MAPKs está relacionada con la progresión del cáncer, el ciclo celular, la apoptosis y la diferenciación celular (Mc Cubrey *et al.*, 2007). La cinasa regulada por señal extracelular (ERK) es un componente aguas abajo activado por la serina/treonina cinasa Raf. La Raf activa a las cinasas de doble especificidad (MEK) 1/2,

que luego activan a la ERK1/2. La activación de la ERK promueve la expresión regulada al alza del EGFR, promoviendo el crecimiento tumoral (Yu *et al.*, 2015).

Estas vías, junto con otras más, forman una red bioquímica entrecruzada que, en las células tumorales, se halla frecuentemente hiperactivada, lo que induce al crecimiento celular descontrolado (Vivek *et al.*, 2016).

2. ANTECEDENTES

Las líneas celulares constituyen una de las principales herramientas en la investigación médica y biológica. Comparadas con los modelos animales multicelulares, la utilización del cultivo celular supone un sistema más sencillo para estudiar procesos bioquímicos o moleculares, lo que ha permitido mejorar el conocimiento de numerosas enfermedades, analizar la respuesta a fármacos o determinar el efecto de mutaciones concretas en el genoma. En el campo de la oncología, la investigación con líneas celulares derivadas de células tumorales de pacientes ha contribuido a caracterizar algunos de los rasgos típicos del cáncer, así como a desarrollar algunos de los fármacos usados en la actualidad.

La mayoría de los cánceres de mama son dependientes de hormonas como los estrógenos y la progesterona, lo que ha llevado a desarrollar fármacos para inhibir a sus receptores y a algunos otros como el HER2 (relacionado con la proliferación) y así combatir dicha enfermedad. Sin embargo, existen otros tipos de cáncer que no poseen estos receptores y por esta razón son llamados triples negativos, en los cuales los tratamientos convencionales no funcionan, por lo que se busca desarrollar nuevos fármacos y tratamientos. Tal es el caso de la línea celular MDA-MB-231, la cual es triple negativo, por lo que es altamente metastásica y tiene la capacidad de generar tumores en modelos *in vivo*. Esta línea se generó a partir una muestra de derrame pleural de una paciente con cáncer de mama que falleció de esta enfermedad en 1973 y es una de las más utilizadas debido a que presenta un crecimiento rápido en medios de cultivo. Muchos de los cánceres de mama que se presentan en México tienen características similares a las células MDA-MB-231, como lo son la ausencia de receptores y su alta migración e invasividad, lo que los hace de difícil tratamiento; por lo tanto, estas células constituyen un excelente modelo de estudio para

este proyecto de investigación.

Se ha descrito que la DHEA tiene un efecto protector contra una amplia variedad de enfermedades, entre ellas el cáncer (Vegliante y Ciriolo, 2018). Donde ha mostrado tener un efecto inhibitor en la proliferación de células tumorales, entre las que se encuentran líneas celulares derivadas de cáncer de mama como son, MCF-7, Hs578T y MDA- MB-231 (Rais *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 1992; López-Marure *et al.*, 2011).

Existen evidencias que indican que los efectos de la DHEA en las líneas celulares de cáncer se deben a su conversión a andrógenos y estrógenos, los cuales activan a los receptores intracelulares de estrógenos (ERs) y andrógenos (ARs) (Hayashi *et al.*, 2000; Schmitt *et al.*, 2001); sin embargo, otros grupos de investigación y nuestro grupo de trabajo hemos demostrado que los efectos de la DHEA en dichas líneas son directos e independientes de su conversión a estos derivados (Williams *et al.*, 2002; Zapata *et al.*, 2005; Gayosso *et al.*, 2006). Así mismo, nuestro grupo de trabajo demostró que la DHEA inhibe la proliferación y la migración de las líneas celulares derivadas de cáncer de mama MCF-7, MDA- MB-231 y Hs578T (López-Marure *et al.*, 2011); además, inhibe la formación de esferoides de células MCF-7, MDA-MB-231 y ZR-75-30 y la formación de colonias en agar en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 (López-Marure *et al.*, 2016).

En otro trabajo demostramos que la DHEA disminuye la expresión de la N-cadherina y aumenta la expresión de la E-cadherina (proteínas involucradas en la TME) en la línea celular MDA-MB-231 además, la DHEA inhibió el crecimiento de tumores en ratones nu^{+/+} (Colín-Val *et al.*, 2017). Sin embargo, los mecanismos por los cuáles ejerce estos efectos aún no han sido del todo aclarados.

Varios autores mencionan que las vías de transducción que están relacionadas con el efecto de la DHEA en procesos como la proliferación, la migración y la TME en diferentes tipos celulares, son las rutas de PI3K/Akt y MEK/ERK (Jiang *et al.*, 2005). En estudios en líneas celulares derivadas de diferentes tipos de cáncer se ha observado que la DHEA actúa a través de estas vías y su unión a receptores de tirosina cinasa, como el receptor del IGF (Liang *et al.*, 2016). La DHEA inhibe la TEM en células bronquiales epiteliales 6HBE-14 (Xu *et al.*, 2014).

En este trabajo se evaluó el mecanismo por el cual la DHEA indujo estos efectos en la línea celular MDA-MB-231. Para llevar a cabo esto se utilizaron fármacos inhibidores de las vías de PI3K/Akt, MEK/ERK, así como de los receptores IGF y EGF.

La mayoría de los inhibidores de PI3K desarrollados hasta la fecha son competitivos con el ATP, los inhibidores más utilizados son la wortmanina un metabolito natural de *Penicillium funiculosum*, y el LY294002 que se derivó del flavonoide quercetina (Mahos *et al.*, 1994; Davies *et al.*, 2000; Gharbi *et al.*, 2007).

En el caso de la vía de MEK/ERK uno de los primeros inhibidores desarrollados ha sido el U-0126, al contrario de la mayoría de los inhibidores de cinasas, los inhibidores de MEK no son competidores del ATP (Davies *et al.*, 2000). Su mecanismo de acción reside en su capacidad de unirse a MEK y bloquearla en estado catalíticamente inactivo, por lo que son altamente específicos, ya que las secuencias a las que se unen son únicas para esta familia de cinasas (Sebolt-Leopold y Herrera, 2004).

Uno de los inhibidores que existen actualmente para inhibir la actividad del EGFR es el AG-1478 (4-(3-chloroanilino-6,7-dimethoxyquinazoline), que es competitivo con el ATP (Gan *et al.*, 2007). En el caso del receptor del IGF uno de los inhibidores es el AG-538, el cual Blum y colaboradores (2000) encontraron que no es un inhibidor competitivo con el ATP, sino que es un inhibidor que se superpone con las tirosinas del IGFR en el sitio de autofosforilación, evitando dicha autofosforilación y así inhibiendo al receptor.

Algunas de las desventajas de estos inhibidores son su inespecificidad y su uso exclusivo a modelos *in vitro*, por lo que se han buscado nuevas opciones, técnicas más específicas y que se puedan utilizar tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* tal es el caso del uso de RNA de interferencia (RNAi), entre los que se encuentran el ARN asociado a piwi (piRNA), pequeños ARN interferentes (miRNA) y el ARN interferente pequeño (siRNA). El siRNA es actualmente utilizado en aplicaciones terapéuticas debido a su gran capacidad de silenciar genes específicos tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.

En la actualidad el uso de modelos experimentales *in vivo* proporciona un mejor entendimiento del cáncer ya que el microambiente donde se desarrolla el tumor es más parecido al microambiente en el que crecería un tumor en el cuerpo humano. El modelo

más utilizado en cáncer es el xenotransplante en ratones desnudos (nu⁻/nu⁻), Los ratones desnudos fueron descubiertos por Flanagan en 1962. Flanagan describió sus características tanto genotípicas como fenotípicas, entre ellas la ausencia de pelo, esto ocasionado por un alelo mutante homocigota recesivo que pertenece al grupo linkage VII del cromosoma 11; sin embargo, su rasgo más característico y la razón por la cual es utilizado en modelos de estudio para el cáncer es la ausencia de timo o un timo rudimentario el cual produce un número reducido de células T maduras por lo cual no rechazan tejidos alo- ni xenotransplantes convirtiéndolo en el primer modelo inmunodeprimido para el estudio del cáncer entre otras enfermedades (Pantelouris 1973; Cadili y Kneteman 2008; Ruiz *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial el cáncer de mama es el más frecuente en las mujeres constituyendo el 25.2 % de todos los casos de cáncer (OMS, 2020). En México el número anual de pacientes diagnosticados con cáncer de mama se vio incrementado entre los años 2010 a 2019. Siendo el 2019, el año que presentó la tasa de incidencia más alta para las mujeres (35.24 casos por cada 100 mil mujeres de 20 años o más) (INEGI, 2020). El cáncer de mama constituye la principal causa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos entre la población de 20 años y más, por lo que esta problemática requiere la implementación de estrategias y nuevos fármacos que ayuden al tratamiento de manera eficaz y con los menos efectos secundarios posibles.

El TNBC representa entre el 10 % y el 15 % de todos los cánceres de mama y son más comunes en mujeres menores de 40 años o con alguna mutación de gen *BRCA1*, este tipo de cáncer es el que se propaga más rápido, al no poseer receptores de estrógenos, de progesterona ni de la proteína HER2; la terapia hormonal y los medicamentos para HER2 no son una opción por lo que su tratamiento es limitado y posee el peor pronóstico. Algunas de las opciones para el tratamiento es la cirugía cuando el cáncer aún está localizado, así como la quimioterapia y la radioterapia, las cuales generan efectos secundarios que afectan el estilo de vida de las mujeres, con los tratamientos adecuados y dependiendo del grado de la enfermedad este tipo de cáncer tiene una tasa de supervivencia de 5 años.

Se ha demostrado que la DHEA tiene un papel protector contra el cáncer; sin embargo, los mecanismos mediante los cuales ejerce estos efectos, particularmente en la línea celular MDA-MB-231, aún se desconocen. Por lo que es importante evaluar los mecanismos involucrados en los efectos de protección de la DHEA en la línea celular MDA-MB-231. Lo que proporcionará información valiosa para el desarrollo y el uso de fármacos para el tratamiento del cáncer triple negativo.

En síntesis, el cáncer es un gran problema de salud pública tanto en México como en el mundo, y la DHEA ha demostrado tener efectos positivos en el cáncer de mama, por lo que encontrar el mecanismo de acción de dichos efectos es prioritario.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el receptor y la vía de señalización utilizados por la DHEA para inhibir la migración, la proliferación y modificar la expresión de proteínas involucradas en la TME en las células MDA-MB-231, así como disminuir el crecimiento de tumores en ratones nu^{-}/nu^{-} ?

5. HIPÓTESIS

La DHEA inhibirá la proliferación, la migración y modificará la expresión de proteínas involucradas en la TME en las células MDA-MB-231, y en ratones nu^{-}/nu^{-} disminuirá el crecimiento de tumores mediante la vía de PI3K/Akt y/o MEK/ERK, y por medio de los receptores IGFR y EGFR.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo de acción por el cual la DHEA inhibe la migración, la proliferación y modifica la expresión de algunas de las proteínas involucradas en la TME en células MDA-MB-231 e inhibe el crecimiento de tumores en ratones nu⁻/nu⁻.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la participación de los receptores IGFR o EGFR en la vía de transducción que utiliza la DHEA en la línea celular MDA-MB-231.
- Determinar la participación de las vías PI3K/Akt y MEK/ERK en los efectos de la DHEA en la línea celular MDA-MB- 231.
- Evaluar si la vía de transducción identificada *in vitro* participa en la inhibición causada por la DHEA en el crecimiento de tumores en ratones nu⁻/nu⁻.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MATERIALES

El anticuerpo monoclonal contra la N-cadherina (CD325) se adquirió de eBioscience (San Diego, CA, USA). El anti-β-actina (AC-15) se adquirió de Abcam (Cambridge, MA, USA). Los anticuerpos monoclonales contra Akt 1/2/3 (5C10), Akt-p 1/2/3 (C-11), ERK 1/2 (C-9), ERK-p (pT202/pY204.22A), el anticuerpo policlonal contra la E-cadherina (H-108), los anticuerpos secundarios m-IgGk BP-HRP (sc-526102) gG-HRP (sc-516087) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA). Los inhibidores AG-538 (CAS 133550-18-2), AG-1478 (CAS 175178-82-2), U-0126 (CAS 109511-58-2) y Wortmanina (CAS

19545-26-7) también fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology. Los reactivos de para el Western blot se obtuvieron de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). El medio DMEM con alto contenido de glucosa (4.5 g/mL) y otros reactivos del cultivo celular se adquirieron de GIBCO/BRL (GrandIsland, NY, USA). El hidroclohidrato LY294002 (I9908) se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Espectrofotómetro de microplacas (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). La detección quimio luminiscente de bandas se realizó con el sistema SuperSignal® y el sistema de imágenes MP ChemiDoc™ (Bio-Rad).

7.2 CONDICIONES DEL CULTIVO CELULAR

Las células MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC) con las siguientes características.

Tabla 1. Características de la línea celular MDA-MB-231.

MDA-MB-231	
Organismo	<i>Homo sapiens</i>
Tejido	Glándula mamaria
Tipo celular	Epitelial con características mesenquimales
Morfología	Epitelial
Enfermedad	Adenocarcinoma
Receptores	
Estrógenos	Negativo
Progesterona	Negativo
HER2	Negativo

Las células MDA-MB-231 se cultivaron en medio DMEM con alta concentración de glucosa (4500.0 mg/L) suplementado con suero de ternera recién nacida al 10% (NBCS) y con antibiótico-antimicótico al 1%. Las células se mantuvieron a 37°C con una humedad relativa del 100% y una atmósfera al 5% de CO₂ y 95% de aire. Para evaluar la concentración de los inhibidores se realizaron curvas usando las concentraciones de 2.5, 5, 10, 20 y 40 µM. Sin embargo, dado los resultados obtenidos en el Western blot, en los que se muestra que a estas concentraciones los fármacos inhiben a sus respectivos blancos, se decidió utilizar la concentración de 40 µM para el resto de los experimentos.

Las células se expusieron a los inhibidores (40 µM) 1 h antes de la adición de la DHEA (10 µM) durante 48 h, los cuales mostraron en experimentos previos, ser los que tenían mejores efectos. Los inhibidores utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Inhibidores

Inhibidor	Blanco
AG-538	IGFR
AG-1478	EGFR
U-0126	MEK
Wortmanina	PI3K
LY294002	PI3K

Se utilizaron los inhibidores AG-538, AG-1478, U-0126, wortmanina y LY294002 con las concentraciones de 2.5, 5, 10, 20 y 40 μM , posteriormente para todos los siguientes experimentos solo se utilizó la concentración de 40 μM , antes de la adición de la DHEA (10 μM).

7.3 ENSAYO MTT

Para obtener la concentración adecuada de los inhibidores para bloquear a su blanco (Tabla 1) se midió su efecto citotóxico mediante el ensayo del MTT. Se sembraron células MDA-MB-231 (3×10^3 células/pozo) en placas de 96 pozos y se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 durante 24 horas para permitir su adherencia, posteriormente se expusieron a diferentes concentraciones de los inhibidores (2.5, 5, 10, 20 y 40 μM) y 10 μM de la DHEA (concentración utilizada en experimentos previos) durante 48 h. Las células no tratadas se usaron como controles. Se añadieron 20 μL de la solución del MTT (5 mg/ml) a cada pozo y las placas se incubaron en la oscuridad a 37°C durante 4 h, para permitir la formación de cristales de formazán. Después se eliminó el medio de cultivo, los cristales de formazán se disolvieron con 100 μL de isopropanol ácido (HCl 0.04 N) y se midió la densidad óptica a 570 nm en un espectrofotómetro de microplacas.

7.4 CRISTAL VIOLETA (CV)

Para medir la proliferación celular se realizó la prueba del CV. Las células MDA-MB-231 (3×10^3 /pozo) se sembraron en placas de 96 pozos y se expusieron a cada inhibidor (40 μM) durante 1 h, posteriormente las células se cultivaron con la DHEA (10 μM) durante 48 h.

Las células se fijaron con 100 μ L de glutaraldehído al 1.1% en solución amortiguadora de fosfatos HEPES (NaCl 150 mM, KCl 4.4 mM, HEPES 10.9 mM, glucosa 12.2 mM, pH 7.4) durante 15 min, las placas se lavaron tres veces con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente, enseguida la placa se tiñó con 100 μ L de una solución de cristal violeta al 0.1% (tampón de ácido fosfórico 200 mM, pH 6) durante 20 min. Las placas se lavaron minuciosamente con agua destilada para eliminar el exceso de la solución de CV y se secaron al aire. El colorante unido a las proteínas celulares se solubilizó con 100 μ L de una solución de ácido acético al 10% durante 10 min. La densidad óptica se midió a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas.

7.5 ENSAYO DE MIGRACIÓN

Se sembraron las células MDA-MB-231 (2.5×10^5 /pozo) en filtros transwell de tamaño de poro de 8 μ m en 250 μ L de medio libre de NBCS y se les agregaron los inhibidores con o sin la DHEA. Al pozo inferior de la placa, se le añadió 1 mL de medio con 10% de NBCS. Después de 48 h de tratamiento, las células en el lado superior del filtro se eliminaron frotando dos veces con un hisopo. La migración de las células en el lado inferior del filtro y las células adheridas a la placa (células que migraron) se tiñeron con cristal violeta.

7.6 ENSAYO DE MOTILIDAD (ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA)

Se sembraron las células (2×10^5 /pozo) en placas de 12 pozos y se dejaron en cultivo por 2 días hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente, a las monocapas celulares se les realizó una herida con la ayuda de una punta de pipeta de 200 μ L. Para eliminar las células flotantes, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con una solución tampón de fosfatos con Ca^{2+} y Mg^{2+} (0.1 g de MgCl_2 , 0.1 g de CaCl_2 , 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 2.16 g de NaH_2PO_4 , 0.2 g de K_2HPO_4 , pH 7.2). Se añadió medio fresco con NBCS al 2% con los tratamientos: control (células no tratadas), DHEA, inhibidores solos e inhibidores más DHEA durante 48 h. Las heridas se fotografiaron a las 0 y 48 h. El porcentaje de área abierta de la herida (espacio libre de células) se calculó utilizando el software ImageJ - NIH.

7.7 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las células MDA-MB-231 se sembraron en placas Petri de 35 mm y se cultivaron hasta una confluencia del 70%, se trataron con los inhibidores y la DHEA durante 48 h. El medio de cultivo se retiró y las células se lavaron con HEPES. Después se incubaron con 100 μ L de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 120 mM, NP₄ al 0.5%, NaF 100 mM, NaVO₃ 0.2 mM, aprotinina 1 μ g/mL, PMSF 1 mM, 1 μ g/mL de leupeptina) a 4°C durante 15 min. Las células se separaron con un raspador y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 14,000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -80°C. La concentración de proteína se midió con el ensayo de Bradford (Bio-Rad). La absorbancia se leyó a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas. La concentración de proteína se calculó a partir de una curva estándar de albúmina de suero de bovino (BSA).

7.8 WESTERN BLOT

La determinación de la presencia de las proteínas se realizó por electroforesis utilizando geles de SDS-poliacrilamida al 8% de la siguiente manera, 2.5 mL de solución 1 (Tris-HCl 0.75 M, SDS al 0.2%, pH 8.8), 2 mL de solución de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 1 mL de agua, 7 μ L de TEMED y 25 μ L de persulfato de amonio al 13%. Las muestras se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min. Luego, se cargaron 30 μ g de proteína del lisado total por carril con 1:1 de t buffer de muestra Laemmli (2X). Las muestras se procesaron a 120 voltios durante 90 min con buffer Tris/Glycine/SDS (1X). Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF a 120 voltios durante 120 min a 4°C, con 800 mL de solución de transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%, pH 8.3). Las membranas se bloquearon con leche sin grasa al 8% en TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7.6 y Tween-20 al 0.01%) durante 1 h con agitación constante, posteriormente las membranas se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios contra N-cadherina (1:1000), β -actina (1:5000), Akt 1/2/3 (1:1000), Akt-p 1/2/3 (1:1000), ERK 1/2 (1:1000), ERK-p (1:1000), E-cadherina (1:200) y PI3K (1:1000). Después de la incubación, las membranas se lavaron tres veces durante 5 min con TBS-T y se incubaron con leche sin grasa al 8%

en TBS-T durante 15 min. Los anticuerpos secundarios contra m-IgGk BP-HRP (1:10000) y elGg-HRP (1:10000) se añadieron durante 1 h en agitación constante a temperatura ambiente y después se realizaron tres lavados con TBS-T durante 5 min. La detección quimioluminiscente de bandas se realizó con el reactivo Clarity™ Western ECL subtrate y el sistema de imágenes MP ChemiDoc™. El análisis densitométrico de proteínas se realizó con el software Image Lab™ V 4.0.

7.9 TRANSFECCIÓN DEL siRNA

Las células se sembraron en cajas Petri de 35 mm, una vez que llegaron a una confluencia del 70%, se sembraron en medio DMEM sin suero y se incubaron con 600 pM del siRNA prediseñado contra PI3KCA, y con 9 µL del control negativo del siRNA previamente diluidos con 450 µL de medio DMEM sin suero durante 72 h. La transfección se realizó utilizando Lipofectamina 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Transcurridas las 72 h la transfección se confirmó con Western blot analizando la expresión de la PI3K, y se realizaron los experimentos correspondientes (CV, ensayo de cierre de herida, ensayo transwell, expresión de las proteínas E y N-cadherinas) con y sin DHEA.

7.10 ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUMORES

El uso de animales para este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales local. Los estudios se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

El ensayo de formación de tumores se realizó en un modelo de xenotransplante en ratones desnudos atímicos (nu/nu), se utilizaron un total de 21 hembras de 10 semanas de edad de 20-25 g de peso, Para implantación de las células tumorales, se suspendieron 1×10^6 células de la línea MDA-MB-231 (solo células, células previamente inoculadas con el control

del siRNA o con el siRNA para PI3K) en 100 μ L de tampón HEPES 1X y se implantaron por vía subcutánea en la parte dorsal derecha de los ratones. Los ratones se monitorearon cada tercer día hasta la formación de tumores.

La DHEA se diluyó en aceite de oliva estéril al 80% y etanol (vehículo) al 20%. La DHEA se inyectó por vía subcutánea en el plano dorsal de los ratones cada tres días a una dosis de 60 μ g de la DHEA/g de peso corporal en un volumen total de 100 μ L.

Los animales se dividieron aleatoriamente en 7 grupos (3 ratones por grupo): Grupo 1 = Control negativo (-), solo se inyectó vehículo durante 5 semanas; Grupo 2 = Control positivo (+), se inocularon células tumorales y solo se administró el vehículo; Grupo 3 = Control siRNA, se inocularon las células tumorales previamente transfectadas con el control del siRNA durante 48 h y se administró el vehículo por 5 semanas; Grupo 4= siRNA, se inocularon las células tumorales previamente transfectadas con el siRNA durante 48 h y se les administró el vehículo durante 5 semanas; Grupo 5 = DHEA, se administró la DHEA durante 5 semanas comenzando con la primera dosis 1 semana antes de la inoculación con las células tumorales; Grupo 6 = DHEA + Control siRNA, se administró la DHEA durante 5 semanas comenzando con la primera dosis 1 semana antes de la inoculación con las células tumorales previamente transfectadas con el control del siRNA durante 48 h; Grupo 7 = DHEA + siRNA, se administró la DHEA durante 5 semanas comenzando con la primera dosis 1 semana antes de la inoculación con las células tumorales previamente transfectadas con el siRNA durante 48 h (Tabla 2).

Cuatro semanas después de la implantación de las células tumorales, los ratones se anestesiaron con una inyección peritoneal de 0.4 ml/ratón de pentobarbital (6.3 g/100 mL) diluida 1:10 y se realizó la eutanasia mediante dislocación cervical. Posteriormente los tumores se aislaron, se pesaron y se fotografiaron.

Tabla 3. Grupos del ensayo in vivo.

Grupos	Vehículo	DHEA	Células solas	Células control siRNA	Células siRNA
1 Control (-)	X				
2 Control (+)	X		X		
3 Control siRNA	X			X	
4 siRNA	X				X
5 DHEA		X	X		
6 DHEA + Control siRNA		X			X
7 DHEA + siRNA		X			X

Los animales se dividieron aleatoriamente en 7 grupos (3 ratones por grupo): Grupo 1 = Control (-), Grupo 2 = Control (+), Grupo 3 = Control siRNA, Grupo 4= siRNA, Grupo 5 = DHEA, Grupo 6 = DHEA + Control siRNA, y Grupo 7 = DHEA + siRNA.

7.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y por lo menos tres veces de manera independiente. Se realizó un análisis descriptivo de todos los grupos y se verificó la distribución de los datos bajo la curva de normalidad. Se realizó la prueba ANOVA para comparar más de dos grupos de datos, seguida de Tukey-Kramer para la comparación entre grupos. Las diferencias se consideraron como estadísticamente significativas con una $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

Para evaluar la posible toxicidad de los inhibidores utilizados, las células se expusieron a diferentes concentraciones de éstos (2.5, 5, 10, 20 y 40 μM) y se determinó la viabilidad mediante la reducción del MTT. Los resultados mostraron que ninguno de los inhibidores con ninguna de las concentraciones utilizadas afectó la reducción del MTT (Figura 4), por lo que en los experimentos siguientes solo se usó la concentración de 40 μM . Para comprobar la efectividad de los inhibidores para bloquear a sus moléculas blanco, se realizó un Western blot. Los resultados indicaron que todos los fármacos lograron inhibir a sus respectivos blancos (Figura 5).

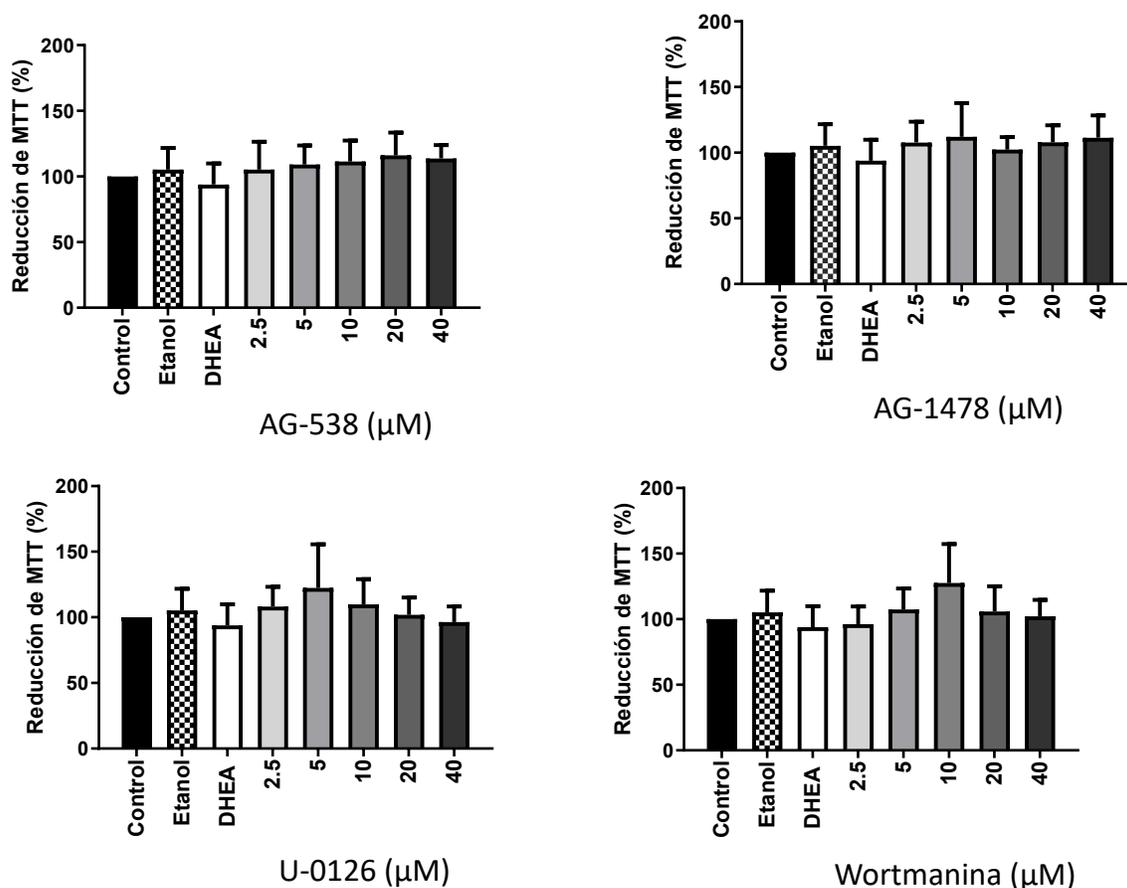


Figura 4. Efecto de la DHEA y de los inhibidores en la citotoxicidad de las células MDA-MB-231.

Las células se sembraron (3×10^3 /pozo) en placas de 96 pozos y se incubaron con 2.5, 5, 10, 20 y 40 μM de AG-538, AG-1478, U-0126 y wortmanina y con la DHEA 10 μM durante 48 h. Se usó etanol como vehículo. Los datos se muestran como el porcentaje de reducción del MTT donde el grupo

control representa el 100%. Los resultados se expresan como la media \pm la DE, de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

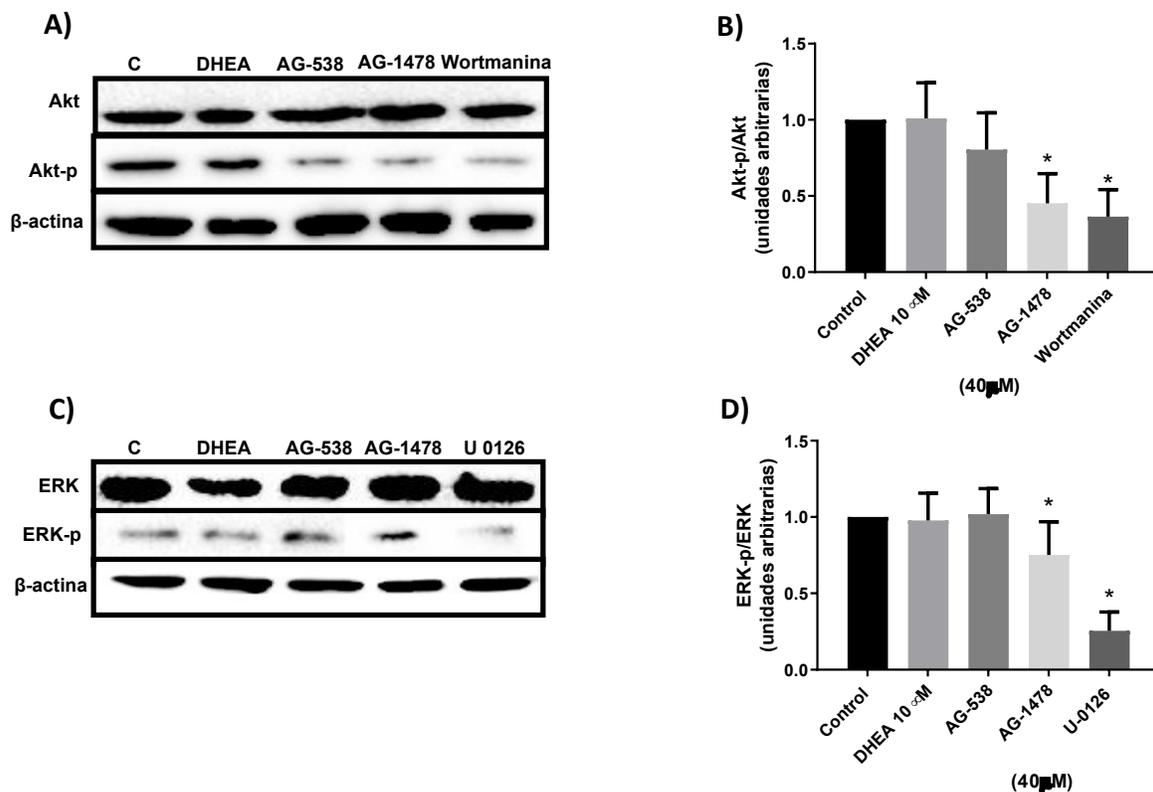


Figura 5. Los inhibidores disminuyen la presencia de Akt-p y ERK-p en células MDA-MB-231.

Se sembraron células MDA-MB-231 (1×10^6) en cajas de Petri de 100 mm y se expusieron a los inhibidores (40 μ M) durante 1 h. La presencia de Akt-p y ERK-p se determinó mediante Western blot. El nivel de expresión de las proteínas se normalizó contra el nivel de Akt y ERK, respectivamente. Se muestra un experimento representativo de Akt y Akt-p (A) y de ERK y ERK-p (C). El nivel de fosforilación de proteínas se normalizó frente al nivel de la proteína sin fosforilar (B) y (D). Los resultados se expresan como la media \pm la DE de tres experimentos independientes con resultados similares. * $p < 0.05$ en comparación con las células control.

8.1 LA COMBINACIÓN DE LA DHEA Y LOS INHIBIDORES DISMINUYÓ LA PROLIFERACIÓN

Para determinar si la DHEA afecta la proliferación celular mediante las vías PI3K/Akt y MEK/ERK, o IGF1R y EGFR, las células fueron expuestas a 40 μ M de los inhibidores solos

o en combinación con 10 μ M de la DHEA y el vehículo (etanol) durante 48 h, y la proliferación fue evaluada por tinción con CV. La DHEA inhibió en un 50% la proliferación de las células MDA-MB-231. Todos los inhibidores aumentaron la proliferación en un 20-40% en comparación con las células de control. La combinación de la DHEA con AG-1478, U-0126 y wortmanina indujo una mayor disminución de la proliferación en comparación con la DHEA sola (Figura 6), lo que sugiere que ninguna de estas vías participa en el efecto antiproliferativo de la DHEA.

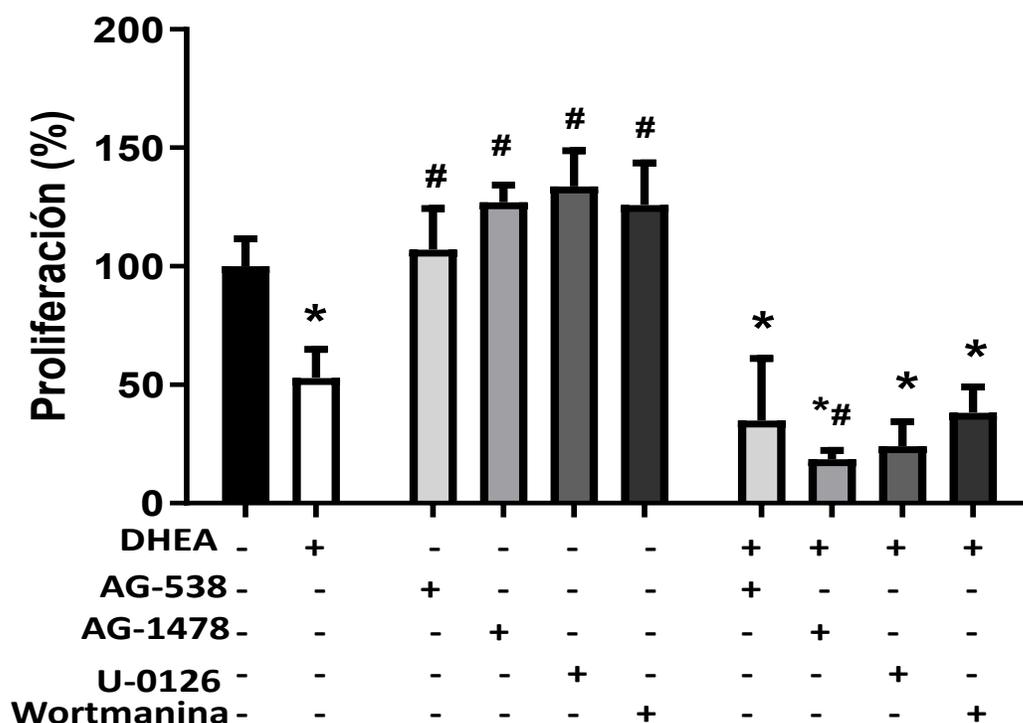


Figura 6. La inhibición de la proliferación causada por la DHEA en células MDA-MB-231 no se vio afectada por los inhibidores.

Las células se sembraron (3×10^3) en cada pozo y se incubaron con 40 μ M de los inhibidores (AG-538, AG-1478, U-0126 y wortmanina), solos o en combinación con la DHEA (10 μ M) durante 48 h. Las células se incubaron con los inhibidores durante 1 h antes de agregar la DHEA. La proliferación celular se midió por la técnica de CV. Los datos se muestran como el porcentaje de la proliferación donde el grupo control representa el 100%. Los resultados se expresan como la media \pm la DE, de tres experimentos independientes por triplicado. * # $p < 0.05$ en comparación con el control y la DHEA, respectivamente.

8.2 LA WORTMANINA REVIRTIÓ LA INHIBICIÓN DE LA MIGRACIÓN INDUCIDA POR LA DHEA

Las células se expusieron a 40 μ M de los inhibidores sin o con 10 μ M de la DHEA durante 48 h y la migración se evaluó mediante un ensayo de cierre de herida (Figura 7) así como con ensayo transwell (Figura 8). La DHEA disminuyó la migración de las células en un 70%, similar a nuestros resultados anteriores (López-Marure et al., 2011; Colín-Val et al., 2017). Todos los inhibidores disminuyeron la migración cuando se usaron solos en comparación con el control; sin embargo, cuando se combinaron con la DHEA, solo la wortmanina pudo revertir en un 40% la inhibición de la migración inducida por la DHEA sola (Figura 7). Los resultados de los ensayos transwell mostraron que la DHEA disminuyó en un 25% la migración en comparación con el control. Se observaron resultados similares con el inhibidor U-0126 con una disminución de la migración de un 30%. La combinación del inhibidor U-0126 más la DHEA disminuyó la migración en un 45%. La combinación de la DHEA con el inhibidor wortmanina disminuyó la migración en un 12% en comparación con el tratamiento de la DHEA sola (Figura 8), lo que indica que la vía de la PI3K/Akt podría participar en la inhibición de la migración inducida por la DHEA.

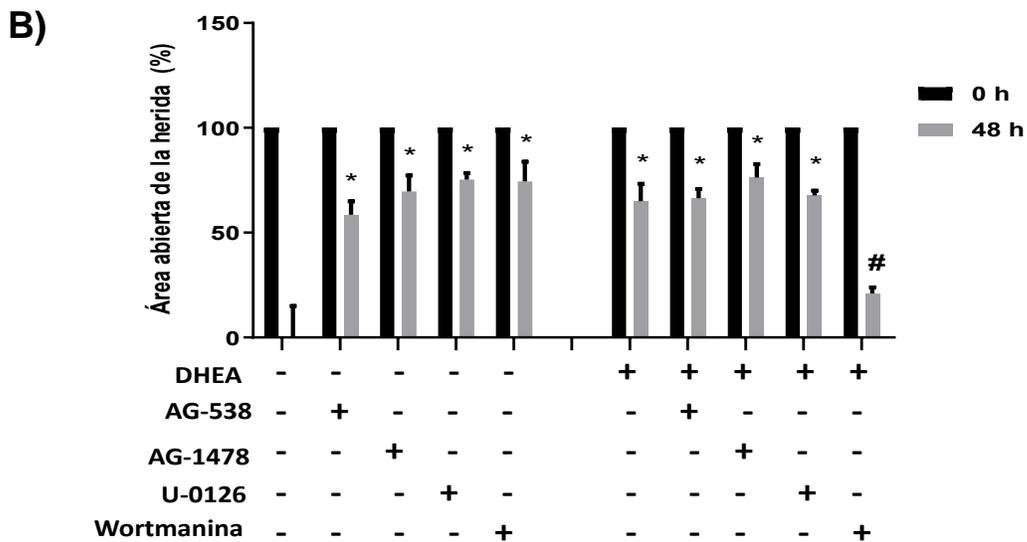
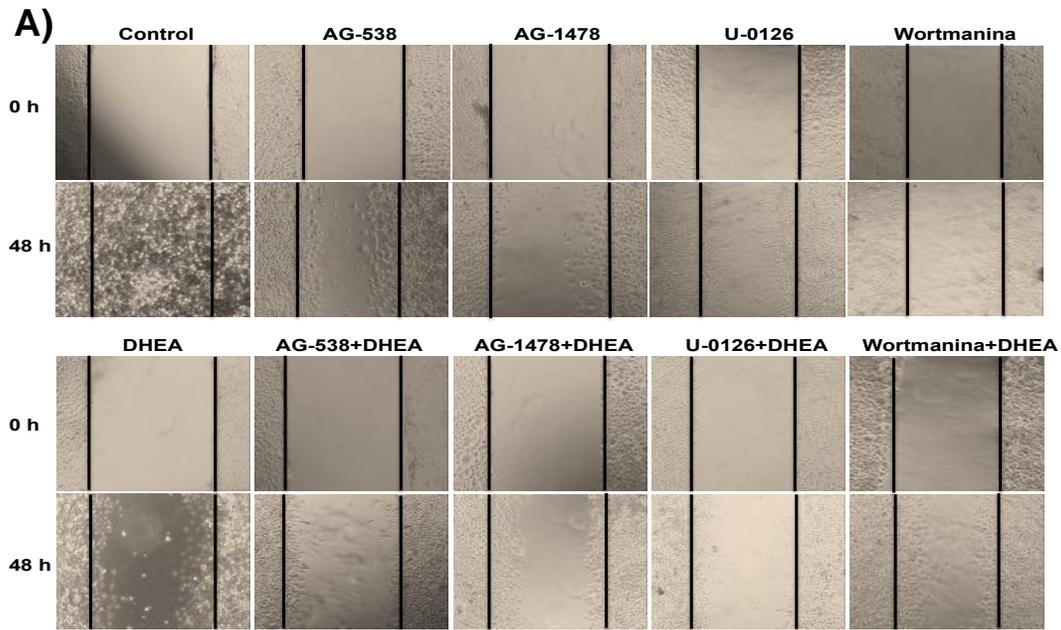


Figura 7. La DHEA disminuyó la migración mediante ensayos de cierre de herida a través de la vía PI3K/Akt.

Se cultivaron monocapas confluentes de las células MDA-MB-231 sin (control), con la DHEA 10 μ M y con los inhibidores 40 μ M, y se evaluó la migración celular mediante ensayo de cierre de herida a las 48 h. A) Las células se fotografiaron a las 0 y 48 h después de los tratamientos. B) Se realizó un análisis del porcentaje del área abierta de la herida con el software Image J. Los datos se muestran como el porcentaje de área abierta de la herida y se expresan como la media \pm la DE, de tres experimentos independientes. *, # $p < 0.05$ comparado con el control y la DHEA respectivamente, en el tiempo 0.

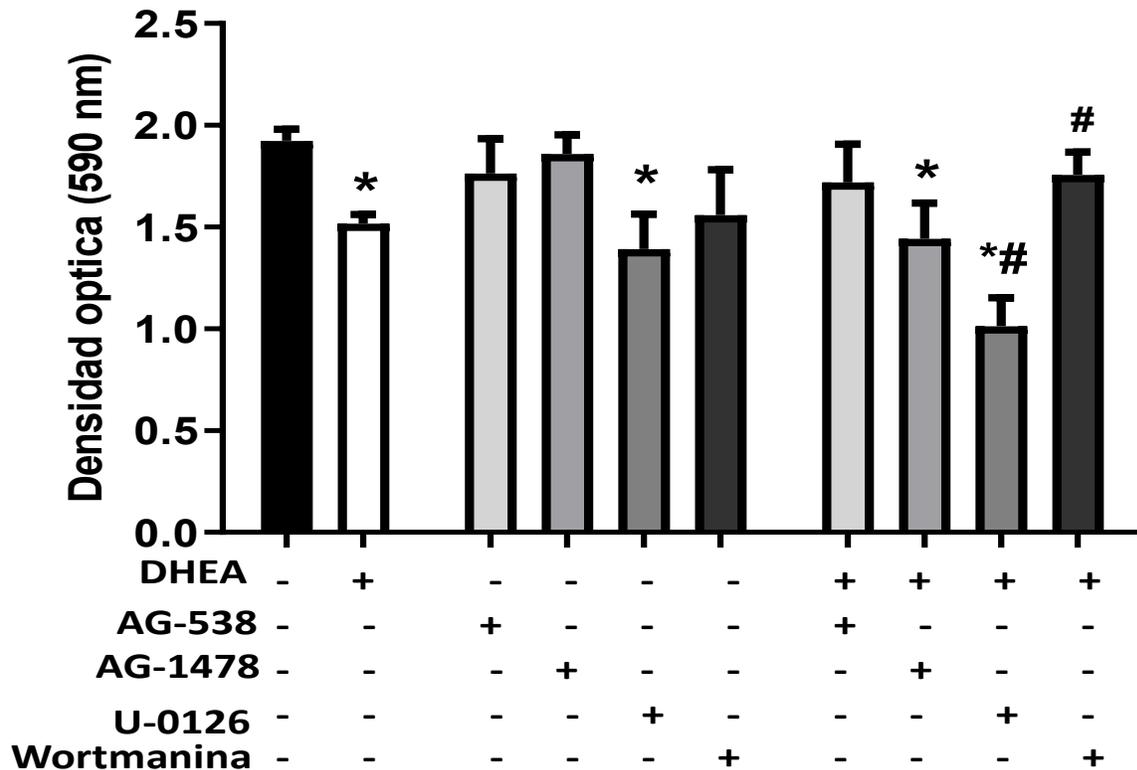


Figura 8. La DHEA disminuyó la migración mediante ensayos transwell a través de la vía PI3K/Akt.

Las células se cultivaron sin (control) o con la DHEA (10 μ M), los inhibidores solos (40 μ M) e inhibidores más la DHEA durante 48 h. La migración celular se evaluó mediante el ensayo transwell y las células migratorias se tiñeron con CV. Los datos se muestran como densidad óptica y se expresan como la media \pm la DE, de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *, # $p < 0.05$ comparado con el control y la DHEA, respectivamente.

8.3 LA EXPRESIÓN DE LA E Y N-CADHERINA REGULADA POR LA DHEA

Las proteínas E y N-cadherina son marcadores específicos del fenotipo epitelial y mesenquimatoso, respectivamente. Anteriormente demostramos que la DHEA aumentaba la expresión de la E-cadherina y disminuía la expresión de la N-cadherina en las células MDA-MB-231 (Colín-Val *et al.*, 2017). Por lo tanto, para probar si el efecto de la DHEA está mediado por la vía PI3K/Akt o MEK/ERK, o mediante los receptores IGF y EGF, se observó

la expresión de la E y N-cadherina en las células tratadas con la DHEA sola o en combinación con los diferentes inhibidores de estas vías y de los receptores. Los resultados del Western blot mostraron que los inhibidores solos disminuyeron la expresión de la E-cadherina (28%) en comparación con las células del control (Figura 9). El tratamiento con la DHEA más U-0126 aumentó la expresión de la E-cadherina de una manera similar a la DHEA sola (Figura 9), lo que sugiere que la vía MEK/ERK no participa en el efecto inducido por la DHEA en la expresión de la E-cadherina. Por otro lado, la combinación de DHEA más los inhibidores AG-538, AG-1478 y wortmanina abatió el aumento de la expresión de la E-cadherina provocado por la DHEA sola, lo que indica que el EGFR e IGFR, así como la vía PI3K/Akt participan en el efecto inducido por la DHEA sobre la expresión de la proteína E-cadherina (Figura 9).

Los resultados de la expresión de la N-cadherina mostraron que todos los inhibidores disminuyeron alrededor del 30% su expresión (Figura 10). Cuando las células se incubaron con la DHEA más los inhibidores AG-538, AG-1478 y U-0126, la expresión de la N-cadherina fue similar a la de la DHEA sola; sin embargo, wortmanina abolió el 40% de la disminución de la N-cadherina inducida por la DHEA, lo que sugiere que la vía PI3K/Akt participa en el efecto de la DHEA en la expresión de la N-cadherina (Figura 10).

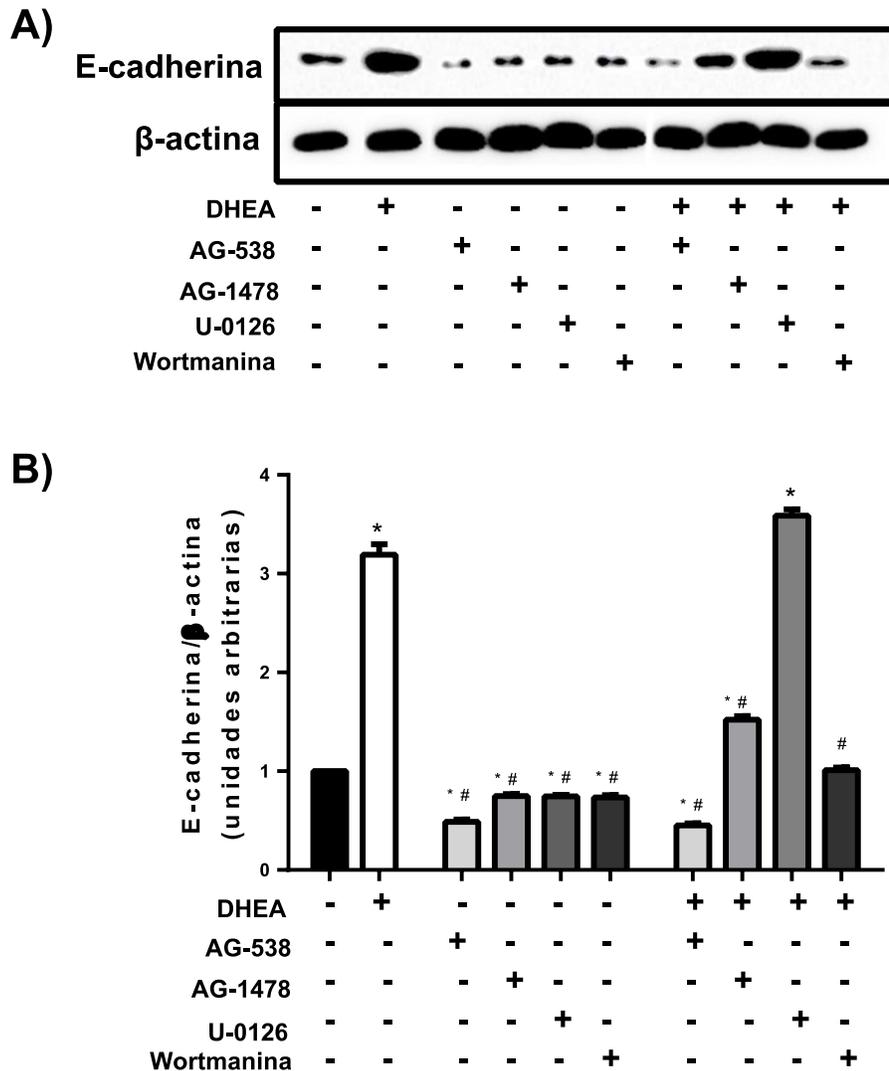


Figura 9. La DHEA aumentó la expresión de la E-cadherina en células MDA-MB-231 a través de la vía PI3K/Akt.

Se cultivaron monocapas confluentes de células MDA-MB-231 sin (control), con DHEA (10 μ M) y con los inhibidores (40 μ M), y se evaluó la expresión de la E-cadherina a las 48 h usando la técnica de Western blot. El nivel de expresión de la proteína se normalizó frente al nivel de la β -actina. A) Muestra un experimento representativo. B) La expresión de la proteína se normalizó con el control de carga (β -actina) y los resultados se expresaron como la media \pm la DE, de tres experimentos independientes con resultados similares. *, # $p < 0.05$ comparado con el control y la DHEA, respectivamente.

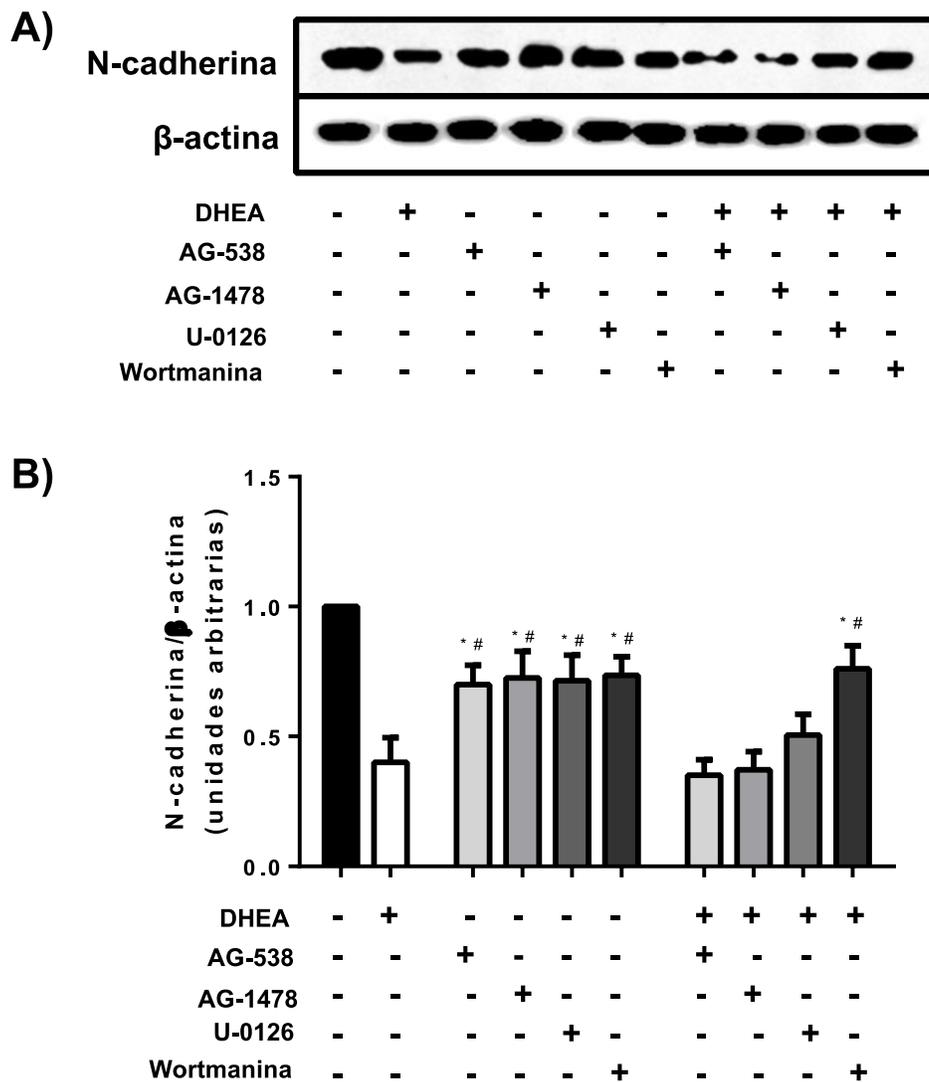


Figura 10. La DHEA disminuyó la expresión de la N-cadherina en las células MDA-MB-231 a través de la vía PI3K/Akt.

Se cultivaron monocapas confluentes de células MDA-MB-231 sin (control), con la DHEA (10 μ M) y con los inhibidores (40 μ M), y se evaluó la expresión de la N-cadherina a las 48 h mediante Western blot. El nivel de expresión de la proteína se normalizó frente al nivel de la β -actina. A) Experimento representativo B) La expresión de la proteína se normalizó con el control de carga (β -actina) y los resultados se expresaron como la media \pm la DE, de tres experimentos independientes con resultados similares. *, # $p < 0.05$ comparado con el control y la DHEA, respectivamente.

8.4 EL INHIBIDOR LY294002 NO AFECTO LA REDUCCIÓN DE MTT EN LAS CÉLULAS MDA-MB-231

Para confirmar que los efectos de la DHEA están mediados por la vía PI3K/Akt, utilizamos otro inhibidor de esta vía, el LY294002. Para determinar la posible toxicidad del LY294002, se cultivaron las células con diferentes concentraciones (2.5, 5, 10, 20 y 40 μM) y se realizó el ensayo del MTT. El LY294002 no tuvo efecto en la reducción del MTT con ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura 11). Para confirmar la inhibición de la PI3K, se realizó un ensayo de Western blot contra Akt y Akt-p utilizando 40 μM del inhibidor (Figura 12).

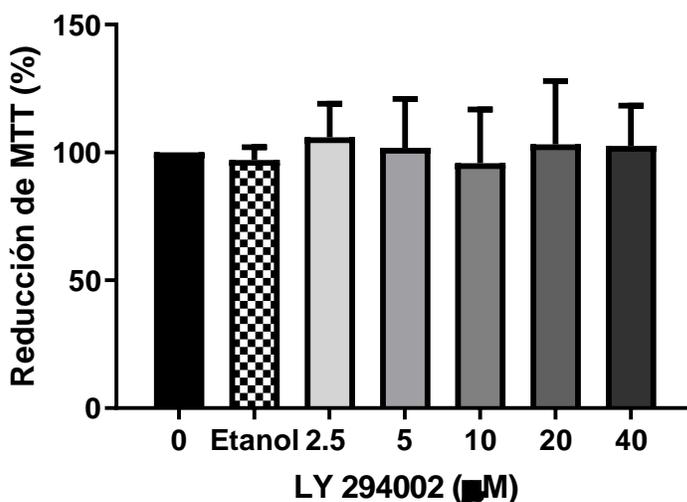


Figura 11. El LY294002 no afectó la reducción de MTT.

Células control, vehículo (etanol) y tratamientos con el inhibidor LY294002 (2.5, 5, 10, 20 y 40 μM). Se muestran 3 experimentos por triplicado. Los resultados se expresan como la media \pm la DE, de tres experimentos realizados por triplicado. *, # $p < 0.05$ comparado con el control y la DHEA, respectivamente.

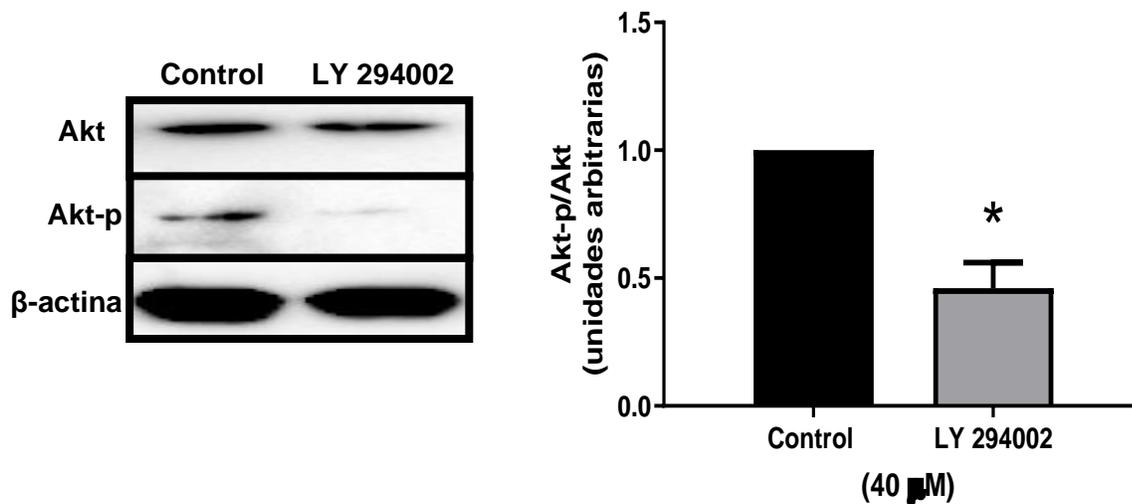


Figura 12. Efecto del inhibidor LY294402 en la presencia de la proteína AKT y AKT-p en la línea celular MDA-MB-231.

Las células se cultivaron con el inhibidor a 40 μM. A) Se muestra un ensayo representativo de la presencia de las proteínas por Western blot de tres experimentos independientes realizados por triplicado. B) El efecto sobre la actividad se expresa como el cociente de normalización AKT-p/AKT en unidades arbitrarias y se comparó contra el control (células sin tratamiento) que corresponde a 1. Los resultados se expresan como la media ± la DE, de tres experimentos realizados por triplicado. * p<0.05 vs control.

Las células fueron expuestas a la DHEA más el inhibidor LY294002 y se evaluó la proliferación y la migración. Las concentraciones solas no afectaron la proliferación (Figura 13). La combinación del LY294002 con la DHEA tampoco afectó la proliferación en comparación con el tratamiento con la DHEA sola; por lo tanto, estos resultados indican que la vía PI3K no participa en el efecto antiproliferativo inducido por la DHEA, confirmando los resultados anteriores al usar wortmanina. Para evaluar si esta vía puede participar en otros efectos inducidos por la DHEA, también se evaluaron la migración y la expresión de la E y N-cadherina. Los resultados del ensayo de cierre de herida mostraron que la DHEA evitó el cierre de la herida en un 80% (Figura 14). El LY294002 solo evitó el cierre de la herida en un 50%, y cuando se combinó con la DHEA revirtió un 30% el efecto de la DHEA sola. Resultados similares se obtuvieron en el ensayo transwell, donde el LY294002 abolió el efecto inducido por la DHEA en la migración (Figura 15). Estos resultados, juntos con los resultados previos al usar wortmanina, sugieren que la vía PI3K está relacionada con el efecto de la DHEA en la migración.

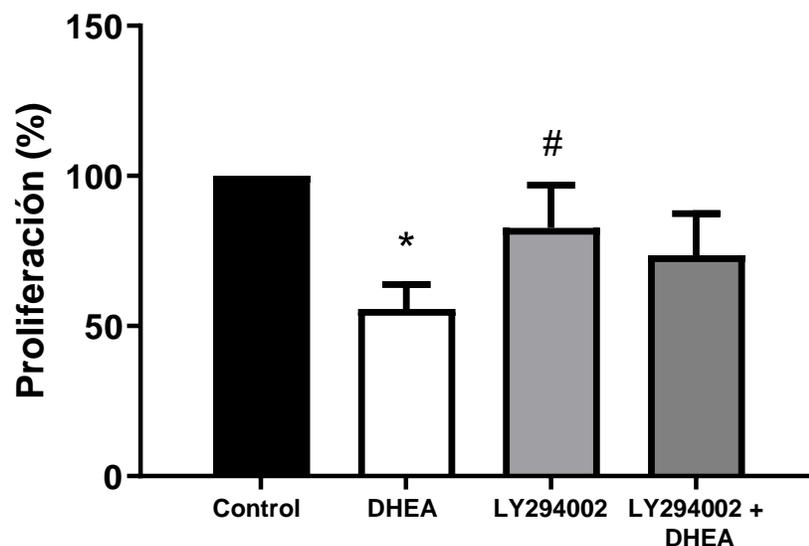


Figura 13. La inhibición de la proliferación causada por la DHEA en las células MDA-MB-231 no se vio afectada con el inhibidor LY294002.

Las células (3×10^3) se sembraron en cada pozo y se incubaron con $40 \mu\text{M}$ del LY294002 solo o combinado con la DHEA ($10 \mu\text{M}$) durante 48 h. Las células se incubaron con el inhibidor durante 1 h antes de la adición de la DHEA. La proliferación celular se realizó con CV. Los datos se muestran como el porcentaje de proliferación donde el grupo de control representa el 100%. Los resultados se expresan como la media \pm la DE, de tres experimentos independientes por triplicado. *, # $p < 0.05$ comparado con el control y la DHEA, respectivamente.

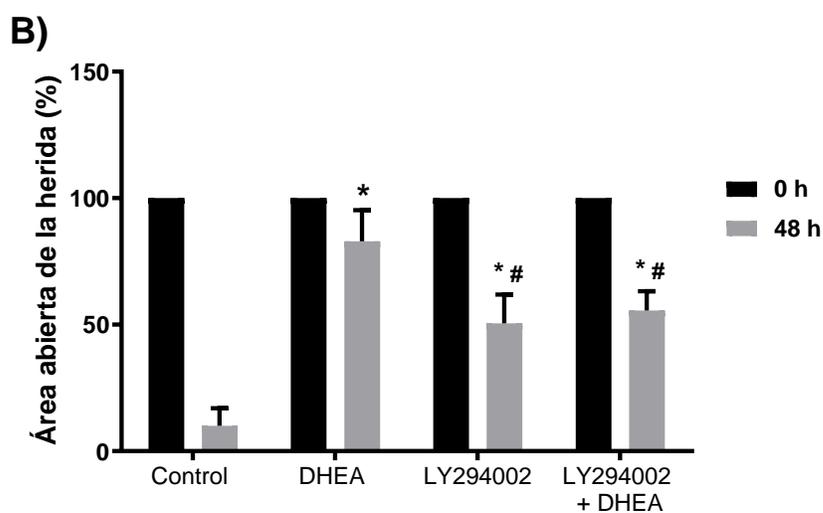
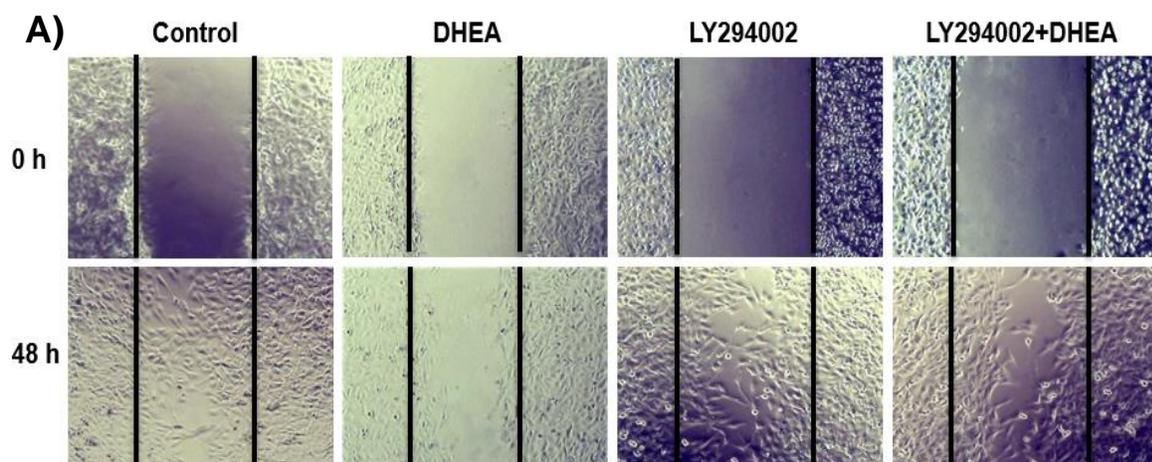


Figura 14. La DHEA disminuyó la migración mediante ensayos de cierre de herida a través de la vía PI3K/Akt.

Se cultivaron monocapas confluentes de células MDA-MB-231 sin (control), con DHEA (10 μ M), el LY294002 solo (40 μ M) y el LY294002 más la DHEA durante 48 h. La migración celular se evaluó mediante ensayo de cierre de herida. A) Las células fueron fotografiadas a las 0 y 48 h después de los tratamientos. B) Se realizó un análisis del porcentaje de área abierta de la herida con el software Image J. Los datos se muestran como la media del área abierta de la herida \pm DE, de tres experimentos independientes realizados por triplicado, donde las células control fueron el 100%. *, # $p < 0.05$ comparado con el control y la DHEA, respectivamente.

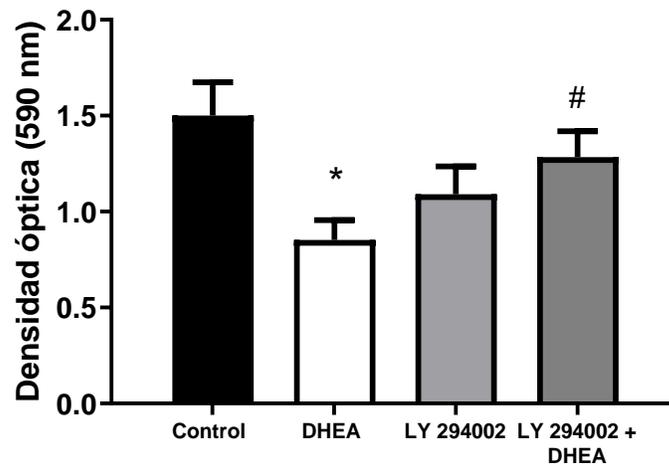


Figura 15. La DHEA disminuyó la migración mediante ensayos transwell a través de la vía PI3K/Akt.

Las células se cultivaron sin (control), con la DHEA (10 μ M), con el LY294002 (40 μ M) y el LY294002 más la DHEA durante 48 h. La migración celular se evaluó mediante ensayo transwell y las células migratorias se tiñeron con CV. Los datos se muestran como densidad óptica y se expresaron como la media \pm la DE, de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *, # $p < 0.05$ comparado con el control y la DHEA, respectivamente.

Además, el ensayo de Western blot reveló que el LY294002 solo aumentó en un 33% la expresión de la E-cadherina en comparación con el control (Figura 16 A y B); sin embargo, cuando las células se expusieron al LY294002 más la DHEA, la expresión de la E-cadherina disminuyó en un 45% en comparación con la DHEA sola. Finalmente, la expresión de la N-cadherina disminuyó en las células tratadas con el LY294002 solo en un 18% en comparación con el control, pero combinado con la DHEA, aumentó la expresión de la N-cadherina en niveles muy similares a los de las células control (Figura 16 C y D), lo que confirma que la vía de PI3K está involucrada en el efecto de la DHEA en la expresión de la E y N-cadherina.

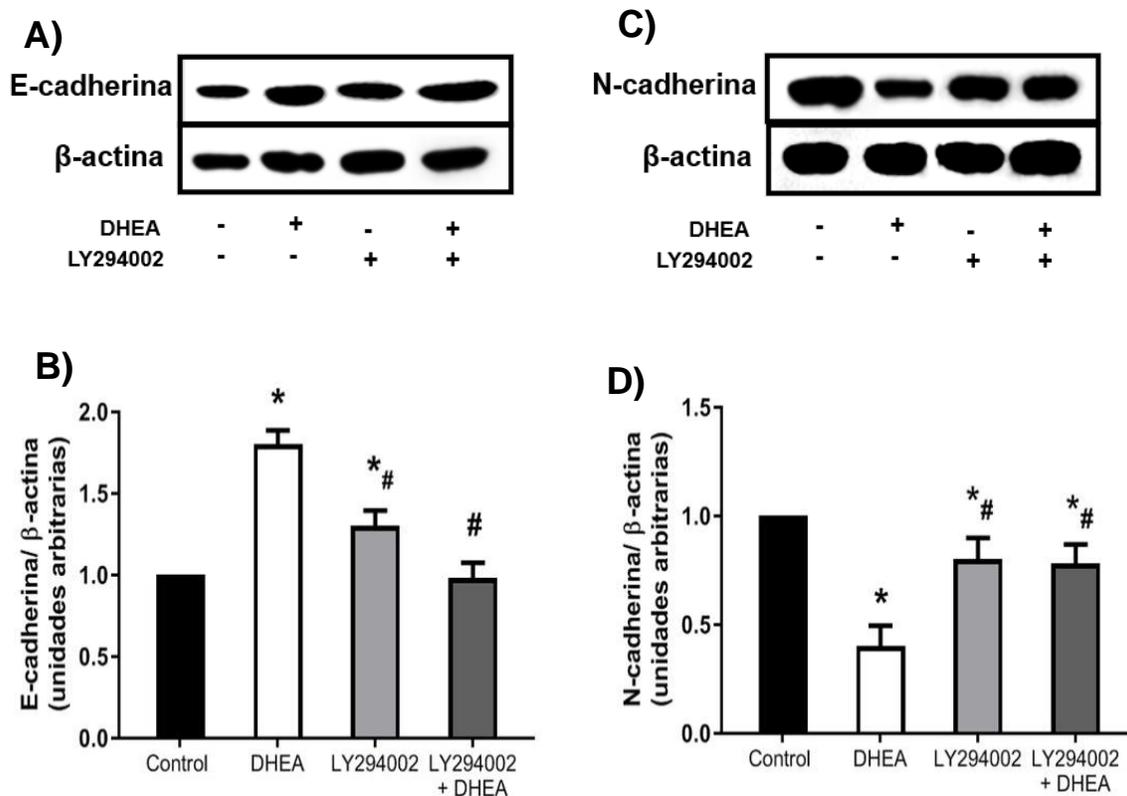


Figura 16. La DHEA aumentó la expresión de la E-cadherina en las células MDA-MB-231 a través de la vía PI3K/Akt utilizando el inhibidor LY294002.

Las células se expusieron al LY294002 solo y en combinación con la DHEA (10 μ M) durante 48 h. La expresión de la E y N-cadherina se determinó mediante western blot. El nivel de expresión de la proteína se normalizó frente al nivel de la β -actina. A) y C) muestran un experimento representativo de la E y N-cadherina, respectivamente. En B) y D), el nivel de expresión de las proteínas se normalizó frente al nivel de β -actina y los resultados se expresaron como la media \pm la DE, de tres experimentos independientes con resultados similares. * p <0.05 comparado contra la DHEA.

8.5 LOS EFECTOS DE LA DHEA EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 SON ATRAVÉS DE LA VÍA PI3K/Akt

Para confirmar que los efectos de la DHEA están mediados por la vía PI3K/Akt, utilizamos un siRNA contra el mensajero de la PI3K. Para confirmar el silenciamiento de la proteína PI3K, se realizó un ensayo de Western blot utilizando anticuerpos contra la PI3K (Figura 17).

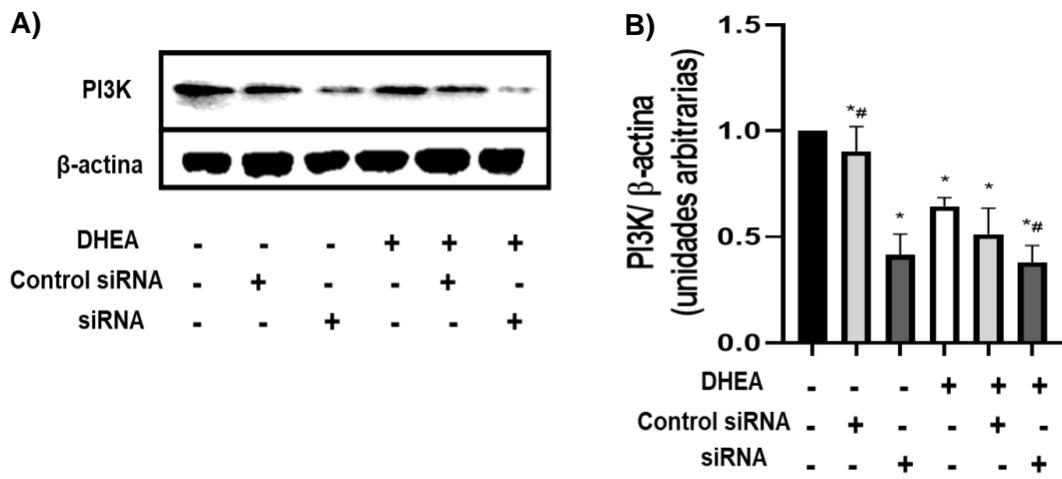


Figura 17. Efecto del siRNA en la expresión de la proteína PI3K en la línea celular MDA-MB-231.

Las células se cultivaron con el siRNA por 72 h. A) Se muestra un ensayo representativo de la expresión de las proteínas por Western blot de tres experimentos independientes. B) El nivel de expresión de la proteína se expresa como el cociente de normalización PI3K/ β -actina en unidades arbitrarias y se comparó contra el control (células sin tratamiento) que corresponde a 1. Los resultados se expresan como la media \pm la DE, de tres experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.05$ vs el control.

Las células se trataron por 72 h con el siRNA para silenciar PI3K, así como con su control y posteriormente se les agregó la DHEA durante 48 h y se evaluó la proliferación, la migración y la expresión de las proteínas E- y N-cadherina. El siRNA disminuyó la proliferación en un 25%, mientras que la DHEA lo hizo en un 50% (Figura 18). Los resultados anteriores mostraron que la combinación de la DHEA con los inhibidores no abatía los efectos de ésta, mientras que aquí se observa un aumento en la proliferación en un 30% con la combinación del siRNA más la DHEA comparada con la DHEA sola, esto podrá deberse a que los inhibidores no son tan específicos como el siRNA y podrían estar inhibiendo además de su blanco algún otro elemento. Esto demuestra la importancia de esta vía en los efectos antiproliferativos de la DHEA.

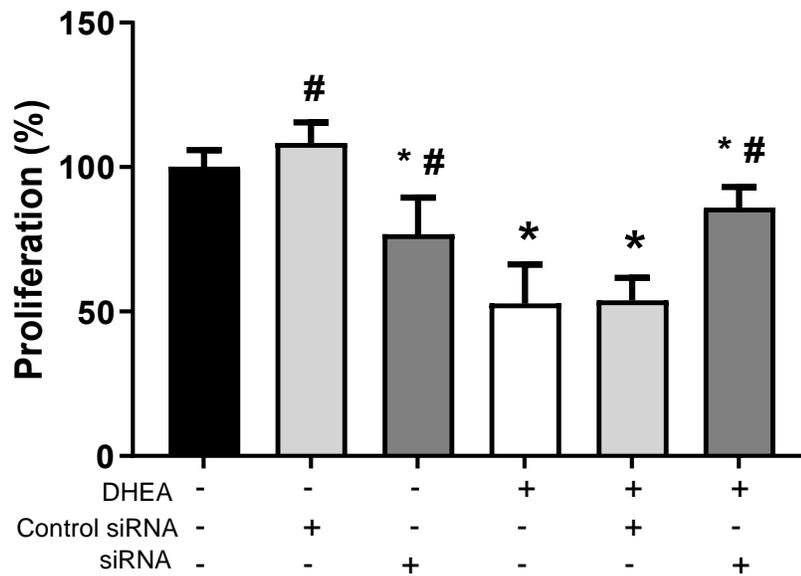
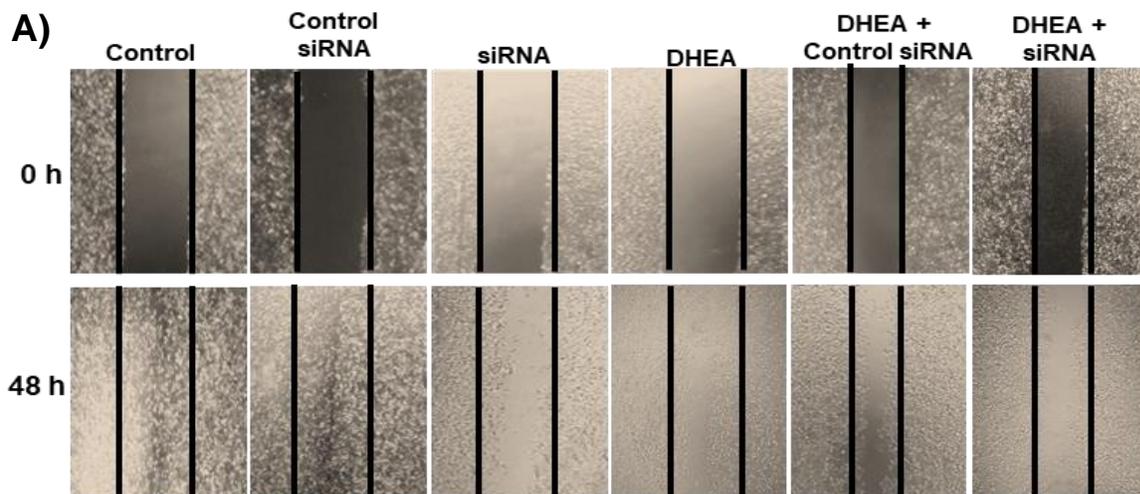


Figura 18. La inhibición de la proliferación causada por la DHEA en células MDA-MB-231 es mediante la vía de la PI3K.

Las células (3×10^3) se sembraron en cada pozo y se incubaron con el siRNA y su control solo o combinado con la DHEA $10 \mu\text{M}$ durante 48 h. Las células se incubaron con el siRNA 72 h antes de la adición de la DHEA. La proliferación celular se realizó con CV. Los datos se muestran como el porcentaje de proliferación donde el grupo de control representa el 100%. Los resultados se expresan como la media \pm la DE, de tres experimentos independientes por triplicado. *, # $p < 0.05$ comparado con el control y la DHEA, respectivamente.

Las células se trataron por 72 h con el siRNA para silenciar a PI3K, así como con su control y posteriormente se les agregó la DHEA durante 48 h y la migración se evaluó mediante un ensayo de cierre de herida (Figura 19) así como con ensayo de cámara de Boyden (transwell) (Figura 20). La DHEA disminuyó un 30% la migración en los ensayos transwell y ésta fue revertida en un 10% por el tratamiento del siRNA con la DHEA. Estos resultados confirman que la vía de PI3K está implicada en los efectos de la DHEA en la línea celular MDA-MB-231.



B)

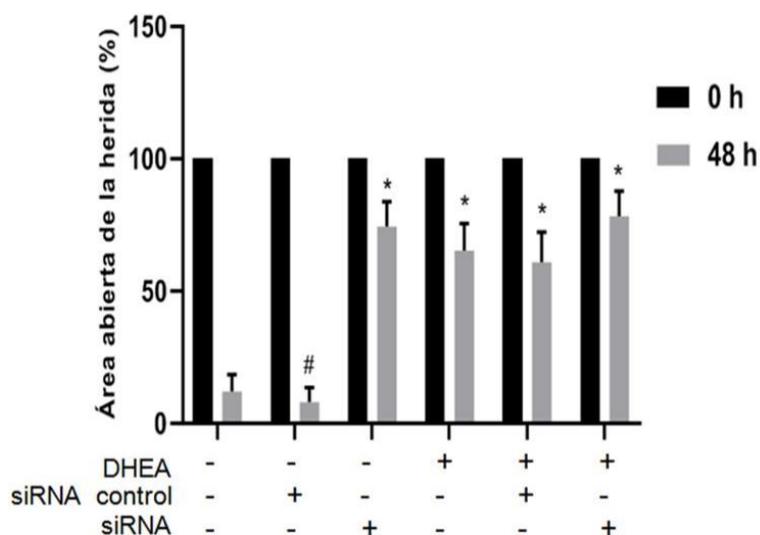


Figura 19. La DHEA disminuyó la migración mediante ensayos de cierre de herida a través de la vía PI3K/Akt.

Se cultivaron monocapas confluentes de células MDA-MB-231 sin (control), con el siRNA, DHEA y el siRNA más la DHEA durante 48 h. La migración celular se evaluó mediante el ensayo de cierre de herida. A) Las células fueron fotografiadas a las 0 y 48 h después de los tratamientos. B) Se realizó un análisis del porcentaje de área abierta de la herida con el software Image J. Los datos se muestran como la media del área abierta de la herida \pm DE, de tres experimentos independientes realizados por triplicado, donde las células de control fueron del 100%. *, # $p < 0.05$ comparado con control y DHEA, respectivamente.

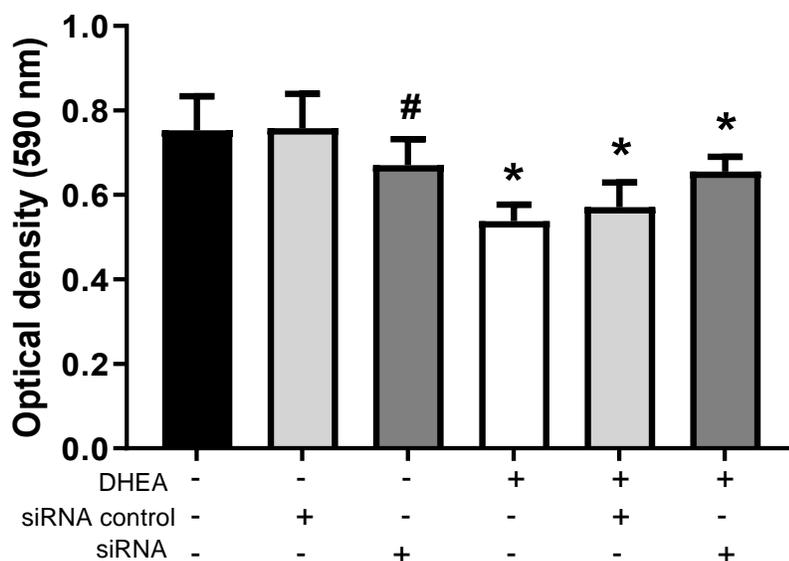


Figura 20. La DHEA disminuyó la migración mediante ensayos transwell a través de la vía PI3K/Akt.

Las células se cultivaron sin (control), con la DHEA (10 μ M), con LY294002 (40 μ M) y LY294002 más la DHEA durante 48 h. La migración celular se evaluó mediante ensayo transwell y las células migratorias se tiñeron con CV. Los datos se muestran como densidad óptica y se expresaron como la media \pm la DE, de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *, # $p < 0.05$ comparado con el control y la DHEA, respectivamente.

Los resultados del Western blot mostraron que el siRNA disminuyó la expresión de N-cadherina en un 50%, mientras que la DHEA la disminuyó en un 55%, en comparación con el control, y la combinación de siRNA con DHEA revirtió el efecto de la DHEA sola en un 30%. En cuanto a la expresión de E-cadherina, el siRNA aumentó un 225% su expresión en comparación con el control, mientras que la DHEA aumentó la expresión en un 275%; sin embargo, cuando las células se expusieron a al siRNA más DHEA, la expresión de E-cadherina disminuyó en un 30% en comparación con la DHEA sola (Figura 21). Estos resultados, junto con los anteriores, confirman que la vía PI3K/Akt está implicada en el efecto de la DHEA sobre la expresión de E- y N-cadherina.

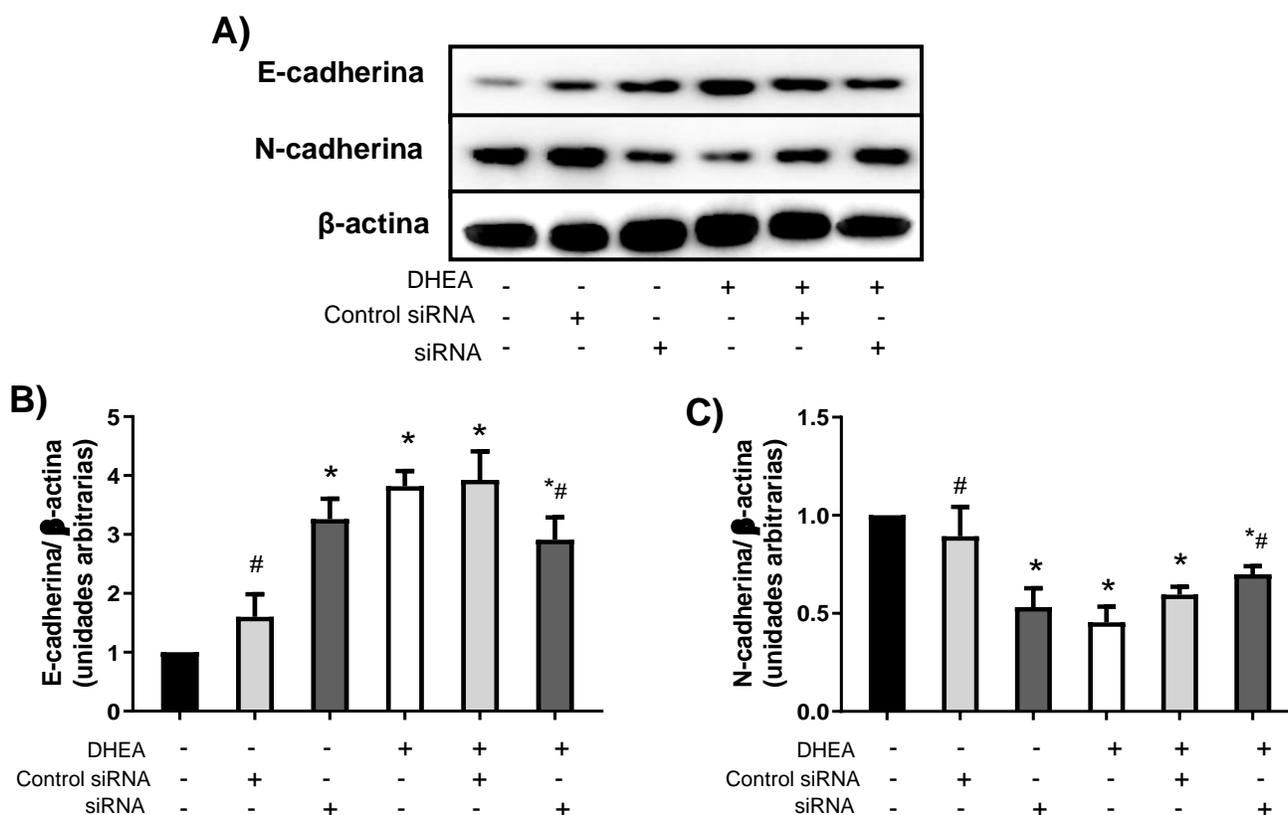


Figura 21. La DHEA aumenta la expresión de la E-cadherina en las células MDA-MB-231 a través de la vía PI3K/Akt utilizando el inhibidor LY294002.

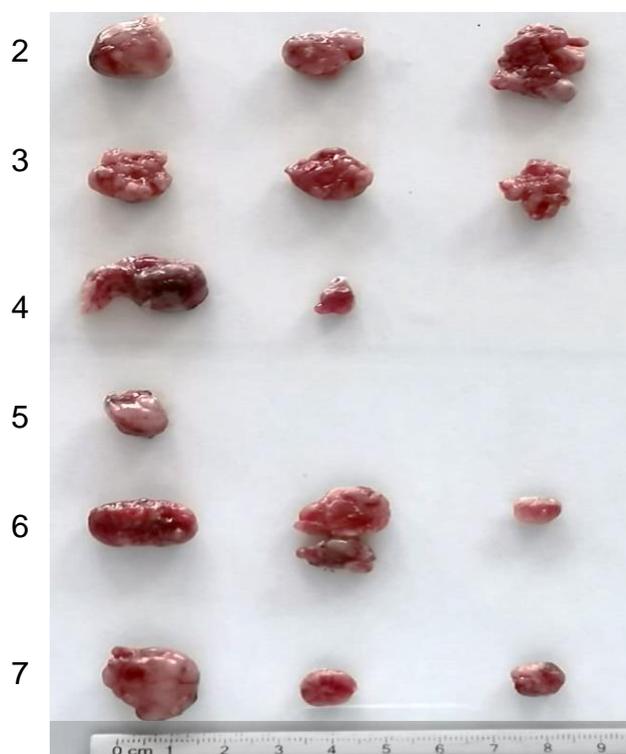
Las células se expusieron al LY294002 solo y en combinación con la DHEA 10 μ M durante 48 h. La expresión de E y N-cadherina se determinó mediante western blot. El nivel de expresión de la proteína se normalizó frente al nivel de la β -actina. A) muestra un experimento representativo de la E y N-cadherina. B y C) muestran el nivel de expresión de las proteínas de la E y N-cadherina respectivamente, el cual se normalizó frente al nivel de la β -actina y los resultados se expresaron como la media \pm la DE, de tres experimentos independientes con resultados similares. * $p < 0.05$ contra la DHEA.

8.6 FORMACIÓN DE TUMORES *IN VIVO*

Para observar si la vía de PI3K estaba relacionada con el efecto *in vivo* de la DHEA en la formación de tumores, se realizó un xenotransplante de la línea celular MDA-MB-231 (previamente transfectadas con el control del siRNA o con el siRNA para silenciar *PI3K* en un modelo con ratones nu^{-}/nu^{-} , a los cuales se les administró la DHEA en una concentración de 30

µg/g de peso/día, disuelta en 80% de aceite de oliva estéril y 20% de etanol (vehículo). En el Grupo 1 el vehículo no ocasionó ningún efecto secundario. En el Grupo control positivo (2) se observaron los tumores de mayor tamaño con un promedio de peso de 1.6 g con respecto a los demás grupos, los grupos 3 y 4 mostraron una disminución en el peso de los tumores con respecto al control con un promedio de peso de 1.2 y 0.73 g, respectivamente. En el grupo con el tratamiento de la DHEA (5) solo uno de los 3 ratones utilizados desarrollo tumor. En los grupos con el control del siRNA y el siRNA más el tratamiento con la DHEA (6 y 7) se observó un promedio en el peso de los tumores del 1.16 y 0.93 g respectivamente, mostrando un aumento en el tamaño y la aparición de los tumores con respecto al grupo de la DHEA (5), evitando que la DHEA tuviera un efecto en los ratones y en el crecimiento de los tumores, sugiriendo que la vía de PI3K/Akt también está involucrada en el efecto *in vivo* de la DHEA sobre la formación y el crecimiento de tumores (Figura 22).

A)



B)

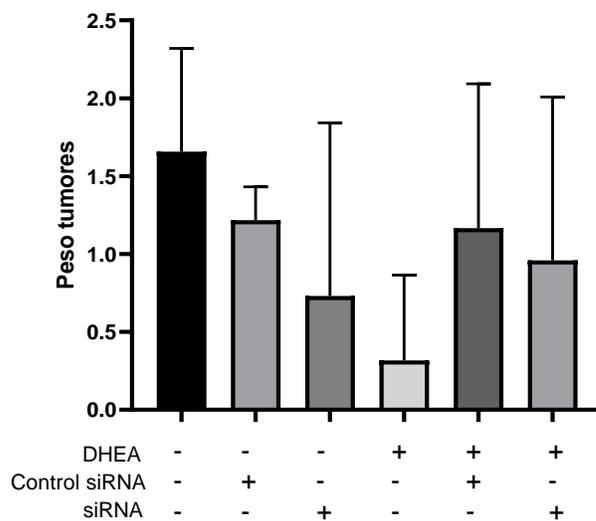


Figura 22. El siRNA contra el gen PIK3CA abolió el efecto de la DHEA en el crecimiento tumoral de xenotransplante de las células MDA-MB-231 en ratones desnudos.

Los ratones desnudos se dividieron en 7 grupos: 1) grupo de control (-) (20% de etanol, 80% de aceite de oliva), 2) grupo de control (+) (células MDA-MB-231 + vehículo), 3) grupo control siRNA (células MDA-MB-231 transfectadas con el control del siRNA + vehículo), 4) grupo siRNA (células MDA-MB-231 transfectadas con el siRNA + vehículo), 5) grupo DHEA (células MDA-MB-231+ DHEA), 6) grupo control del siRNA + DHEA (células MDA-MB-231 transfectadas con el control del siRNA + la DHEA), 7) grupo siRNA + DHEA (células MDA-MB-231 transfectadas con el siRNA + la DHEA). Las células MDA-MB-231 (1×10^6) se inyectaron a los ratones por vía subcutánea en los flancos derechos. Se inyectaron el vehículo y la DHEA (60 $\mu\text{g/g}$) por vía subcutánea en el plano dorsal cada tercer día. Cinco semanas después del xenotransplante los ratones se anestesiaron con el pentobarbital y se sacrificaron. Los tumores se extrajeron y se pesaron. Se muestra una fotografía de los tumores extraídos (A) y la gráfica de peso de los tumores (g) (B). Los resultados se expresan como la media \pm la DE de un experimento con una $n = 3$ por grupo.

9. DISCUSIÓN

En los últimos años, cada vez hay más pruebas que respaldan los beneficios de la DHEA para mejorar la salud, incluidas sus propiedades anticancerígenas (Klinge *et al.*, 2018). Anteriormente, nuestro grupo demostró que la DHEA inhibe la proliferación, la migración y modifica la expresión de la E- y N-cadherina, proteínas epitelial y mesenquimal respectivamente, en varias líneas celulares de cáncer de mama como MCF-7, ZR-75-30, Hs578T y MDA-MB-231 (López-Marure *et al.*, 2011; Colín-Val *et al.*, 2017). Sin embargo, los mecanismos por los cuales la DHEA provoca estos efectos son desconocidos. Por lo tanto, en este estudio investigamos los posibles mecanismos implicados en los efectos de la DHEA en la línea celular MDA-MB-231, la cual se caracteriza por presentar un fenotipo mesenquimal y ser altamente invasiva y metastásica. Para evaluar los posibles mecanismos, utilizamos inhibidores farmacológicos de las vías PI3K/Akt y MEK/ERK, así como de los receptores IGF y EGF. Además, se evaluó la proliferación, la migración y la expresión de proteínas de la TME en células cultivadas con la DHEA sola o en combinación con los inhibidores farmacológicos. También se utilizó un siRNA para silenciar la proteína *PI3K* para inhibir la vía PI3K.

Las vías de vías PI3K/Akt y MEK/ERK, así como los receptores IGF y EGF regulan procesos como la sobrevivencia, el crecimiento, la proliferación y la diferenciación los cuales están ampliamente relacionados con la progresión del cáncer (Gharbi *et al.*, 2007). Además, algunos estudios han demostrado que los efectos de la DHEA son a través de estas vías, tal es el caso de las células endoteliales de aorta (BAECs) en donde la DHEA

mostro un efecto de protección contra la apoptosis activando la vía PI3K (Liu *et al.*, 2007), por otro lado, en células epiteliales de prostata la DHEA indujo la proliferación mediante la vía de NF κ B vía PI3K/AKT (Sun *et al.*, 2010). En las líneas celulares HepG2 y HT-29 la DHEA inhibió la proliferación y provocó apoptosis a través de la vía PI3K/Akt (Jiang *et al.*, 2005). Estos antecedentes sugirieron que estas vías podrían ser las implicadas en los efectos observados de la DHEA en la línea celular MDA-MB-231. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que ninguna de las vías inhibidas participa en el efecto antiproliferativo de la DHEA, ya que no se revirtió con ninguno de los inhibidores (Figura 6). Por lo que la proliferación celular podría estar siendo inhibida por diferentes vías no evaluadas en este trabajo (Valdespino-Gómez *et al.*, 2015), entre las que se encuentran la vía de JAK-STAT y la de la Wnt/ β -catenina (Ruzhen *et al.*, 2017). La vía de transducción Wnt/ β -catenina es una de las vías involucradas en el inicio, la progresión y el pronóstico de los cánceres humanos (Ruzhen *et al.*, 2017). Por ejemplo, en células osteoblásticas y en células de carcinoma hepatocelular (HCC), compuestos como el tricloruro de aluminio (AlCl₃) y la pirfenidona respectivamente, inhibieron la proliferación a través de un mecanismo que involucra a la vía de Wnt/ β -catenina (Wanyue *et al.*, 2016; Wei-Jie *et al.*, 2017). Otra vía relacionada fuertemente con la proliferación celular y que se ha visto que se modifica en enfermedades como el cáncer es la vía de JAK/STAT. En un estudio se observó que el agente terapéutico ECPIRM, inhibió la proliferación celular promoviendo la apoptosis en las células de linfocitos T cutáneos (HUT78) a través de la vía JAK/STAT al reducir los niveles de fosforilación de JAK1, STAT3 y STAT5 (Hua *et al.*, 2018). En las células de retinoblastoma (SO-Rb50 e Y79), la curcumina redujo la viabilidad, migración, proliferación e invasión disminuyendo la fosforilación de JAK1, STAT1 y STAT3. Dado que estas vías son muy importantes en la regulación de la proliferación, sería interesante determinar si estas vías juegan un papel en la actividad antiproliferativa de la DHEA en las células MDA-MB-231.

La inhibición de la migración inducida por la DHEA se evaluó mediante ensayos de migración (cierre de herida y transwell), los resultados mostraron que el inhibidor wortmanina revirtió los efectos de la DHEA sobre la migración, mientras que con los demás inhibidores no se observó efecto (Figura 7 y 8), estos resultados indican la participación de la vía PI3K/Akt en este mecanismo. Resultados similares se han observado con otros compuestos en líneas celulares de cáncer; por ejemplo, el fármaco tanshinol inhibió la fosforilación de PI3K y Akt evitando la migración e invasión de las células HepG2 (Pingting

et al., 2019). El ácido asiático (AA) inhibió la proliferación, la migración, indujo la apoptosis y modificó la expresión de marcadores TEM en células de cáncer de colon (CCR), regulando negativamente la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR (Yajuan *et al.*, 2018). El polifenol bioactivo en el té verde, epigallocatequina-3-galato (EGCG), inhibió la migración y la invasión en las células de cáncer de vejiga (T24 y 5637), disminuyendo la fosforilación de PI3K y Akt (Thr 308 y Ser473), y cuando se inhibió Akt, EGCG no mostró efecto (Ke-Wang *et al.*, 2018).

Para validar si los efectos de la DHEA en la expresión de proteínas epiteliales y mesenquimales también estaban mediados por las mismas vías y receptores, evaluamos la expresión de las proteínas E y N-cadherina en presencia de los inhibidores. La TEM es un proceso biológico en el que las células epiteliales pierden sus características y adquieren un fenotipo mesenquimal, a menudo involucrado en enfermedades, como la progresión del cáncer (Zhang y Weinberg, 2018). Uno de los principales fenómenos que ocurren en la TEM es la disminución de la expresión de la E-cadherina y el aumento de la N-cadherina que facilita la migración celular. El proceso inverso conocido como TME también juega un papel importante en la reprogramación de las células mesenquimales (Tong *et al.*, 2017). Los resultados anteriores mostraron que la DHEA produce un aumento en la expresión de la proteína epitelial E-cadherina y una disminución en la expresión de la proteína mesenquimal N-cadherina en las células MDA-MB-231 (Colín-Val *et al.*, 2017). En este trabajo, las células MDA-MB-231 tratadas con la DHEA más el inhibidor de MEK (U-0126) aumentaron la expresión de la E-cadherina de manera similar a la DHEA sola (Figura 9), lo que sugiere que la vía MEK/ERK no participa en el aumento de expresión de la E-cadherina provocado por la DHEA. En contraste, la combinación de la DHEA más los inhibidores de IGFR y EGFR (AG-538 y AG-1478) respectivamente, así como la wortmanina (inhibidor de PI3K), bloquearon el aumento de la E-cadherina producida por la DHEA sola, destacando el papel de EGFR, IGFR y PI3K/Akt en la modulación de la expresión de la E-cadherina provocada por la DHEA. Este resultado fue el único que mostro que los receptores de EGF e IGF podrían estar relacionados con el aumento de la E-cadherina provocado por la DHEA. Por otro lado, cuando las células se expusieron a la DHEA más los inhibidores de AG-538, AG-1478 y U-0126, la expresión de N-cadherina fue similar a la observada con la DHEA sola, en contraste, wortmanina abolió la disminución de la expresión de la N-cadherina producida por la DHEA en un 40%, lo que sugiere la participación de la vía PI3K/Akt como mediador de los efectos de la DHEA en la expresión de la N-cadherina (Figura 10).

Los resultados obtenidos coinciden con los de otros investigadores donde se observó que la activación de la TEM y TME induce la expresión de factores de transcripción en respuesta a varias vías de señalización entre ellas la vía de PI3K/Akt (González y Medici, 2015). Por ejemplo, el fármaco genisteína inhibió la migración de las células de cáncer de colon y revirtió la TEM al aumentar la regulación de la E-cadherina y disminuir la expresión de la N-cadherina, suprimiendo la vía Notch1/NF- κ B/slug/E-cadherina (Panpan *et al.*, 2017). En otro estudio, el sustrato asociado a crk (CAS) reguló negativamente la expresión de la E-cadherina activando la ruta de señalización de Akt en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (Li *et al.*, 2016). En las células de cáncer colorrectal (CCR), el carboxilo terminal de la proteína que interactúa con la Hsc70 (CHIP) inhibió el crecimiento celular, la migración y la invasión, regulando al alza la E-cadherina por la ruta MAPK/Akt-GSK-3 β -Slug-E-cadherina (Xu *et al.*, 2018). Otro estudio demostró que el cambio de la E- a N-cadherina en las células de melanoma maligno estaba regulado a nivel transcripcional por Twist, Snail y la vía PI3K (Hao *et al.*, 2012).

Para verificar si los efectos de la DHEA sobre la migración y las proteínas de la TME están mediados por la ruta PI3K/Akt, utilizamos otro inhibidor de esta vía, LY294002. Este compuesto sintético fue diseñado a partir de la quercetina flavonoide (Vlahos *et al.*, 1994), y es mucho más estable en solución que la wortmanina (Walker *et al.*, 2000). Nuestros resultados con el ensayo del MTT mostraron que ninguna de las concentraciones de LY 294002 resultó tóxica para las células y que la concentración utilizada (40 μ M) redujo la fosforilación de la proteína Akt confirmando la inhibición de la PI3K (Figura 11 y 12 respectivamente). Se observó que el fármaco LY294002 tiene el mismo efecto que la wortmanina, aboliendo los efectos de la DHEA en la migración celular, así como en la expresión de las proteínas E y N-cadherina en las células MDA-MB-231 (Figuras 14-16). Del mismo modo, con los demás inhibidores no se observó que el fármaco LY294002 abatiera el efecto antiproliferativo de la DHEA en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Figura 13).

Para corroborar el efecto que se observó con los inhibidores y la participación de la vía de PI3K en la migración, se utilizó un siRNA para silenciar a la proteína PI3K. El ensayo de proliferación mostró una disminución de ésta en las células transfectadas solo con el siRNA, sin embargo, en el tratamiento de las células transfectadas con el siRNA más la DHEA se

observó un aumento de la proliferación en comparación con la DHEA sola (Figura 18). A diferencia de lo que se había observado con los inhibidores, estos resultados sugieren que la vía de PI3K sí está participando en el efecto antiproliferativo de la DHEA. Por otro lado, dado que la inhibición de la ruta de PI3K por el siRNA redujo fuertemente la migración celular, no pudo observarse su efecto sobre la inhibición de la migración inducida por la DHEA (Figura 19 y 20). Sin embargo, los resultados obtenidos con los inhibidores farmacológicos muestran la participación de esta vía en la migración celular. En cuanto a los efectos de la DHEA en la expresión de las proteínas E y N-cadherina, el siRNA al igual que los inhibidores wortmanina y LY294002, lograron evitar que la DHEA tuviera efecto (Figura 21). Sugiriendo nuevamente la participación de la vía de PI3K/Akt en los efectos de la DHEA en la línea celular MDA-MB-231.

Los inhibidores farmacológicos suelen no ser tan estables en solución por lo que el uso de un siRNA para evitar la síntesis de algunas proteínas suele ser necesario ya que tiene una alta especificidad al bloquear directamente al transcrito del gen de la proteína de interés para evitar que ésta se exprese. Nuestros resultados con el siRNA para PI3K confirmaron que los efectos producidos por la DHEA en la línea celular MDA-MB-231, incluido su efecto antiproliferativo, están mediados en parte por la vía PI3K/Akt (Figura 18-21). Por otro lado, el experimento *in vivo* con ratones desnudos sugiere que la vía de PI3K/Akt participa en los efectos de la DHEA en el crecimiento de tumores, ya que el siRNA evitó el efecto de la DHEA sobre el crecimiento de los tumores (Figura 22).

La vía de PI3K/Akt tiene un papel importante en funciones celulares como proliferación, crecimiento, supervivencia, motilidad y metabolismo (Engelman, 2009). Los inhibidores wortmanina y LY294002 afectaron directamente la fosforilación de Akt mientras que el siRNA empleado disminuyó a la proteína PI3K esto evita que PIP3 recluya a Akt a la membrana y que ésta sea fosforilada por la enzima piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK) y por mTORC2. Si Akt no está fosforilada, no se activa el mTORC1 y tampoco se transloca al núcleo; por tanto, cualquier proteína localizada corriente abajo de Akt implicada en la proliferación, supervivencia celular y angiogénesis podría participar en los efectos producidos por la DHEA.

Dado que nuestros resultados anteriores mostraron que la DHEA inhibe la proliferación, la migración y altera la expresión de proteínas de la TME en otras células de cáncer de mama

como MCF-7, Hs578T y ZR-75-3012-14, planteamos la hipótesis de que la vía PI3K/Akt también podría estar relacionada con los efectos inducidos por la DHEA en estas células. La hiperactivación de esta vía se encuentra alrededor del 60% en los tumores de cáncer de mama (Thorpe *et al.*, 2015). Algunos informes muestran el efecto de otros compuestos que afectan la vía PI3K/Akt. Por ejemplo, Wanjun y colaboradores demostraron que el compuesto Baicalein tenía efectos anticancerígenos tanto *in vivo* como *in vitro*, reduciendo Akt-p en las líneas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 (Yan *et al.*, 2018). El compuesto everolimus disminuyó la presencia de la forma fosforilada de las proteínas PI3K-p, Akt-p y mTOR en las células MCF-7, provocando una disminución del crecimiento celular (Du *et al.*, 2018). En otro estudio, el extracto obtenido de *Astragalus membranaceus* (AM), inhibió el crecimiento celular e indujo apoptosis en células de cáncer de mama incluida la línea celular MDA-MB-231, y sus efectos se asociaron a su capacidad para inhibir la actividad de la vía PI3K/Akt/mTOR (Zhou *et al.*, 2018).

Nuestros resultados mostraron que los receptores IGF y EGF podrían estar relacionados con el efecto de la DHEA en el aumento de la E-cadherina por lo que la DHEA podría unirse a estos receptores para producir dicho efecto. Sin embargo, los demás resultados no mostraron que estos receptores estuvieran relacionados con los efectos de la DHEA, por lo que la DHEA podría estar actuando a través de su unión a otro receptor. En un estudio se mostro que en células endoteliales la DHEA activa la sintasa de óxido nítrico mediante un receptor de membrana específico acoplado a proteínas G (Liu y Dillon, 2002). Por otro lado, estudios demuestran que la DHEA podría unirse a proteínas de unión a lípidos, esto basado en las características propias de la DHEA. La DHEA es de carácter lipófilo por lo que esta afinidad a los lípidos logra que la DHEA pase a través de la membrana lipídica, se una a algún receptor intracelular y desencadene una cascada de señalización. Además, hay evidencia que sugiere que los efectos de la DHEA podrían deberse también por la unión de esta a un receptor nuclear o citoplasmático (Widstrom *et al.*, 2004),

La vía de PI3K puede activarse mediante receptores RTK o mediante receptores acoplados a proteína G. La PI3K activa y cataliza la conversión de PIP2 de la membrana en PIP3, que recluta a la proteína cinasa B (PKB) o Akt, posteriormente PDK, fosforila a la Akt. La Akt recibe una segunda fosforilación por mTOR. La Akt-p puede translocarse al núcleo, activando factores de transcripción como Snail, Twist y Slug, que a su vez regulan al alza la N-cadherina y regulan negativamente la E-cadherina, lo que causa un aumento de la

migración y la proliferación (Prat y Baselga, 2007; Hernández-Aya y Gonzalez-Angulo, 2011; Hemmings y Restuccia, 2012). Según nuestros resultados, proponemos que la vía PI3K/Akt podría participar en los efectos de la DHEA sobre las células MDA-MB-231, evitando la fosforilación de la Akt, su translocación nuclear y consecuentemente la activación de factores de transcripción (Figura 23). La vía de PI3K suele estar entre cruzada con otras vías por lo que los efectos de la DHEA pueden ser directos por esta vía o por la activación de otras vías que crucen con la vía de PI3K, por lo que se requieren más estudios sobretodo de afinidad para corroborar que los efectos son directos sobre esta vía.

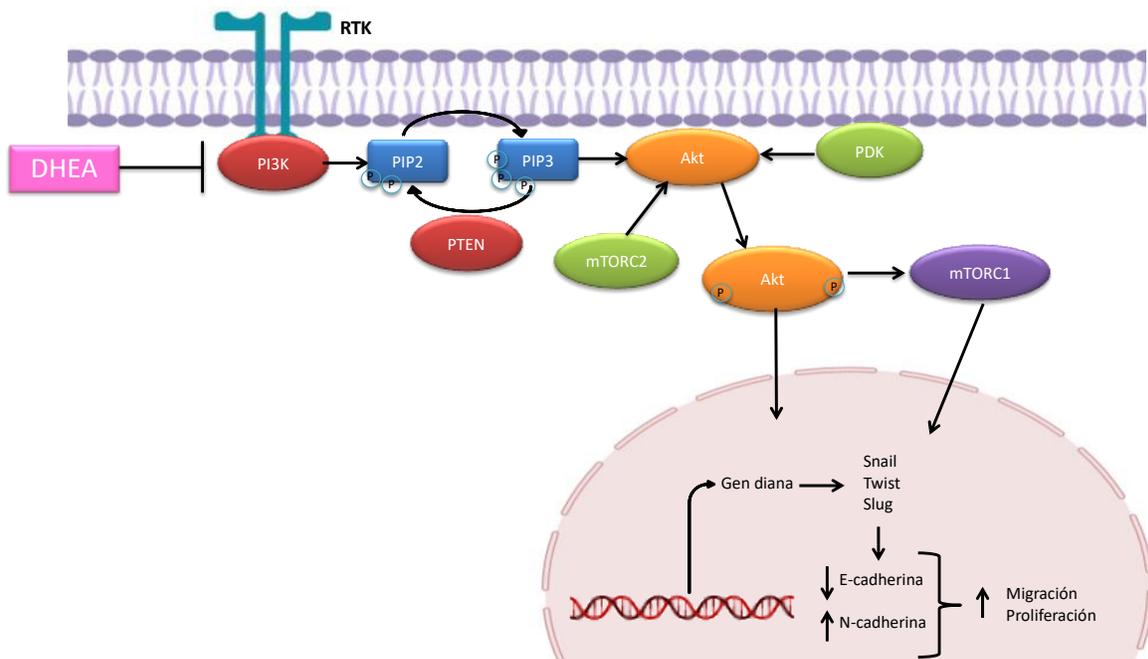


Figura 23. Papel de la vía de PI3K/Akt en el cáncer. Durante la tumorigénesis, la vía PI3K/Akt está hiperactivada.

PI3K fosforila el PIP2 y forma el PIP3. Luego, el PIP3 recluta a la PDK y la Akt a la membrana plasmática. La PDK y el mTORC2 fosforilan a la Akt. La Akt-p puede activar al mTORC1 y translocarse al núcleo activando varios factores de transcripción como Snail, Twist y Slug, que regulan la expresión de la E- y N-cadherina, la migración celular y la proliferación y finalmente la tumorigénesis. Nuestros resultados sugieren que la DHEA inhibe la vía PI3K/Akt, evitando su translocación al núcleo y la expresión de factores de transcripción, regulando el aumento de la E-cadherina, y disminuyendo la expresión de la de N-cadherina, la proliferación y la migración celular.

10. CONCLUSIÓN

La DHEA es una hormona esteroide con varios efectos beneficiosos para la salud y con propiedades anticancerígenas. En las células de cáncer de mama MDA-MB-231 la DHEA inhibe la proliferación y la migración, así mismo aumenta la expresión de la proteína epitelial E-cadherina y disminuye la expresión de la proteína mesenquimal N-cadherina, los resultados muestran que estos efectos están mediados parcialmente por la vía de PI3K/Akt. Esta vía está relacionada con el desarrollo y progresión del cáncer; por lo tanto, la DHEA podría usarse como un agente terapéutico en combinación con la quimioterapia para el tratamiento del cáncer de mama, especialmente en el triple negativo.

11. PERSPECTIVAS

Nuestros resultados anteriores mostraron que la DHEA inhibe la proliferación, la migración en otras células de cáncer de mama como MCF-7, Hs578T y ZR-75-3012-14, por lo que sería importante realizar experimentos con estas líneas celulares, para confirmar si la vía de PI3K también está involucrada o si otras vías pudieran participar en los efectos inducidos por la DHEA. Además, se requieren más experimentos *in vivo* para confirmar el papel de la vía de PI3K/Akt en los efectos de la DHEA en la disminución de tumores.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asati, V., Mahapatra, D. K., & Bharti, S. K. (2016). PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *European journal of medicinal chemistry*, 109, 314–341. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.012>
2. Bergin, A., & Loi, S. (2019). Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-1342. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18888.1>
3. Boareto, M., Jolly, M. K., Goldman, A., Pietilä, M., Mani, S. A., Sengupta, S., Ben-Jacob, E., Levine, H., & Onuchic, J. N. (2016). Notch-Jagged signalling can give rise to clusters of cells exhibiting a hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Journal of the Royal Society, Interface*, 13(118), 20151106. <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.1106>
4. Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A., & Weinberg, R. A. (2018). EMT in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 18(2), 128–134. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.118>
5. Blum, G., Gazit, A., & Levitzki, A. (2000). Substrate competitive inhibitors of IGF-1 receptor kinase. *Biochemistry*, 39(51), 15705–15712. <https://doi.org/10.1021/bi001516y>
6. Eldridge, L., & Wagner, E. M. (2019). Angiogenesis in the lung. *The Journal of physiology*, 597(4), 1023–1032. <https://doi.org/10.1113/JP275860>
7. Cadili, A., & Kneteman, N. (2008). The role of macrophages in xenograft rejection. *Transplantation proceedings*, 40(10), 3289–3293. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.08.125>
8. Chao, Y. L., Shepard, C. R., & Wells, A. (2010). Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Molecular cancer*, 9, 179. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-179>
9. Clark, B. J., Prough, R. A., & Klinge, C. M. (2018). Mechanisms of Action of Dehydroepiandrosterone. *Vitamins and hormones*, 108, 29–73. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.02.003>
10. Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., & Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *The*

- Biochemical journal, 351(Pt 1), 95–105. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3510095>
11. De Wever, O., Pauwels, P., De Craene, B., Sabbah, M., Emami, S., Redeuilh, G., Gespach, C., Bracke, M., & Berx, G. (2008). Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochemistry and cell biology*, 130(3), 481–494. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0464-1>
 12. Du, L., Li, X., Zhen, L., Chen, W., Mu, L., Zhang, Y., & Song, A. (2018). Everolimus inhibits breast cancer cell growth through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Molecular medicine reports*, 17(5), 7163–7169. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8769>
 13. Engelman J. A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature reviews. Cancer*, 9(8), 550–562. <https://doi.org/10.1038/nrc2664>
 14. Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, 5(2), 77–106. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>
 15. Fruman, D. A., & Rommel, C. (2014). PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(2), 140–156. <https://doi.org/10.1038/nrd4204>
 16. Fruman, D. A., Chiu, H., Hopkins, B. D., Bagrodia, S., Cantley, L. C., & Abraham, R. T. (2017). The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*, 170(4), 605–635. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.029>
 17. Gan, H. K., Walker, F., Burgess, A. W., Rigopoulos, A., Scott, A. M., & Johns, T. G. (2007). The epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor AG1478 increases the formation of inactive untethered EGFR dimers. Implications for combination therapy with monoclonal antibody 806. *The Journal of biological chemistry*, 282(5), 2840–2850. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605136200>
 18. Ganong M W. (1996) “Gónadas: Desarrollo y funciones del aparato reproductor”. En: *Fisiología médica*. 15a edición. Ed. El manual moderno Pp. 482-493.
 19. Gayosso, V., Montano, L. F., & López-Marure, R. (2006). DHEA-induced antiproliferative effect in MCF-7 cells is androgen- and estrogen receptor-independent. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 12(2), 160–165.

20. Gharbi, S. I., Zvelebil, M. J., Shuttleworth, S. J., Hancox, T., Saghir, N., Timms, J. F., & Waterfield, M. D. (2007). Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *The Biochemical journal*, 404(1), 15–21. <https://doi.org/10.1042/BJ20061489>
21. Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(9), a011189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011189>
22. Hernandez-Aya, L. F., & Gonzalez-Angulo, A. M. (2011). Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer. *The oncologist*, 16(4), 404–414. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0402>
23. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer, INEGI, México, DF, 2020. www.inegi.gob.mx
24. Jiang, Y., Miyazaki, T., Honda, A., Hirayama, T., Yoshida, S., Tanaka, N., & Matsuzaki, Y. (2005). Apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in the anti-proliferative actions of dehydroepiandrosterone. *Journal of gastroenterology*, 40(5), 490–497. <https://doi.org/10.1007/s00535-005-1574-3>
25. Jolly, M. K., Ware, K. E., Gilja, S., Somarelli, J. A., & Levine, H. (2017). EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? *Molecular oncology*, 11(7), 755–769. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12083>
26. Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
27. Kelly, P., Casey, P. J., & Meigs, T. E. (2007). Biologic functions of the G12 subfamily of heterotrimeric G proteins: growth, migration, and metastasis. *Biochemistry*, 46(23), 6677–6687. <https://doi.org/10.1021/bi700235f>
28. Khosravi Shahi, P., Soria Lovelle, A., & Pérez Manga, G. (2009). Tumoral angiogenesis and breast cancer. *Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 11(3), 138–142. <https://doi.org/10.1007/s12094-009-0329-7>
29. Klinge, C. M., Clark, B. J., & Prough, R. A. (2018). Dehydroepiandrosterone Research: Past, Current, and Future. *Vitamins and hormones*, 108, 1–28. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.02.002>
30. Knaul, F. M., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A., & Frenk, J.

- (2008). Breast cancer in Mexico: a pressing priority. *Reproductive health matters*, 16(32), 113–123. [https://doi.org/10.1016/S0968-8080\(08\)32414-8](https://doi.org/10.1016/S0968-8080(08)32414-8)
31. LaGamba, D., Nawshad, A., & Hay, E. D. (2005). Microarray analysis of gene expression during epithelial-mesenchymal transformation. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 234(1), 132–142. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20489>
32. Jiang, Y., Miyazaki, T., Honda, A., Hirayama, T., Yoshida, S., Tanaka, N., & Matsuzaki, Y. (2005). Apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in the anti-proliferative actions of dehydroepiandrosterone. *Journal of gastroenterology*, 40(5), 490–497. <https://doi.org/10.1007/s00535-005-1574-3>
33. Jin, L., Han, B., Siegel, E., Cui, Y., Giuliano, A., & Cui, X. (2018). Breast cancer lung metastasis: Molecular biology and therapeutic implications. *Cancer biology & therapy*, 19(10), 858–868. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1456599>
34. Liang, X., Glowacki, J., Hahne, J., Xie, L., LeBoff, M. S., & Zhou, S. (2016). Dehydroepiandrosterone Stimulation of Osteoblastogenesis in Human MSCs Requires IGF-I Signaling. *Journal of cellular biochemistry*, 117(8), 1769–1774. <https://doi.org/10.1002/jcb.25475>
35. Liu, D., & Dillon, J. S. (2002). Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). *The Journal of biological chemistry*, 277(24), 21379–21388. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200491200>
36. Liu, D., Si, H., Reynolds, K. A., Zhen, W., Jia, Z., & Dillon, J. S. (2007). Dehydroepiandrosterone protects vascular endothelial cells against apoptosis through a Galphai protein-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and regulation of antiapoptotic Bcl-2 expression. *Endocrinology*, 148(7), 3068–3076. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1378>
37. López-Marure, R., Contreras, P. G., & Dillon, J. S. (2011). Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation, migration, and death of breast cancer cells. *European journal of pharmacology*, 660(2-3), 268–274. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.03.040>
38. López-Marure, R., Zapata-Gómez, E., Rocha-Zavaleta, L., Aguilar, M. C., Espinosa Castilla, M., Meléndez Zajgla, J., Meraz-Cruz, N., Huesca-Gómez, C., Gamboa-Ávila, R., & Gómez-González, E. O. (2016). Dehydroepiandrosterone inhibits events related with the metastatic process in breast tumor cell lines. *Cancer biology & therapy*, 17(9), 915–924. <https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1195047>
39. Lu, Y., Wang, H., & Mills, G. B. (2003). Targeting PI3K-AKT pathway for cancer

- therapy. *Reviews in clinical and experimental hematology*, 7(2), 205–228.
40. Massagué, J., & Obenauf, A. C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 529(7586), 298–306. <https://doi.org/10.1038/nature17038>
 41. Mc Cubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M., & Franklin, R. A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8), 1263–1284. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.001>
 42. Mukohara T. (2015). PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Breast cancer* (Dove Medical Press), 7, 111–123. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S60696>
 43. Omary, M. B., Coulombe, P. A., & McLean, W. H. (2004). Intermediate filament proteins and their associated diseases. *The New England journal of medicine*, 351(20), 2087–2100. <https://doi.org/10.1056/NEJMra040319>
 44. Onder, T. T., Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S., & Weinberg, R. A. (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer research*, 68(10), 3645–3654. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2938>
 45. Organización Mundial de la Salud (OMS), 2020. <https://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>
 46. Ortega, M. A., Fraile-Martínez, O., Asúnsolo, Á., Buján, J., García-Honduvilla, N., & Coca, S. (2020). Signal Transduction Pathways in Breast Cancer: The Important Role of PI3K/Akt/mTOR. *Journal of oncology*, 2020, 9258396. <https://doi.org/10.1155/2020/9258396>
 47. Pantelouris E. M. (1973). Athymic development in the mouse. *Differentiation; research in biological diversity*, 1(6), 437–450. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1973.tb00143.x>
 48. Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in cell biology*, 29(3), 212–226. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>
 49. Prat, A., & Baselga, J. (2007). Bioterapia: aplicaciones actuales y futuras en oncología [Biologic therapy: current and future applications in oncology]. *Medicina clinica*, 129(5), 184–193. <https://doi.org/10.1157/13107796>

50. Pinzón, Carlos Eduardo, Serrano, Martha Lucía, & Sanabria, María Carolina. (2009). Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. *Revista Ciencias de la Salud*, 7(2), 47-66. Retrieved January 11, 2021, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732009000200007&lng=en&tlng=es
51. Prough, R. A., Clark, B. J., & Klinge, C. M. (2016). Novel mechanisms for DHEA action. *Journal of molecular endocrinology*, 56(3), R139–R155. <https://doi.org/10.1530/JME-16-0013>
52. Qiao, B., Gopalan, V., Chen, Z., Smith, R. A., Tao, Q., & Lam, A. K. (2012). Epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal-epithelial transition are essential for the acquisition of stem cell properties in hTERT-immortalised oral epithelial cells. *Biology of the cell*, 104(8), 476–489. <https://doi.org/10.1111/boc.201100077>
53. Raica, M., Cimpean, A. M., & Ribatti, D. (2009). Angiogenesis in pre-malignant conditions. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 45(11), 1924–1934. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.04.007>
54. Ruiz, P., Maldonado, P., Hidalgo, Y., Gleisner, A., Sauma, D., Silva, C., Saez, J. J., Nuñez, S., Roseblatt, M., & Bono, M. R. (2013). Transplant tolerance: new insights and strategies for long-term allograft acceptance. *Clinical & developmental immunology*, 2013, 210506. <https://doi.org/10.1155/2013/210506>
55. Rutkowski, K., Sowa, P., Rutkowska-Talipska, J., Kuryliszyn-Moskal, A., & Rutkowski, R. (2014). Dehydroepiandrosterone (DHEA): hypes and hopes. *Drugs*, 74(11), 1195–1207. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0259-8>
56. Sahu, P., Gidwani, B., & Dhongade, H. J. (2020). Pharmacological activities of dehydroepiandrosterone: A review. *Steroids*, 153, 108507. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108507>
57. Sajib, S., Zahra, F. T., Lionakis, M. S., German, N. A., & Mikelis, C. M. (2018). Mechanisms of angiogenesis in microbe-regulated inflammatory and neoplastic conditions. *Angiogenesis*, 21(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9583-4>
58. Schulz, S., Klann, R. C., Schönfeld, S., & Nyce, J. W. (1992). Mechanisms of cell growth inhibition and cell cycle arrest in human colonic adenocarcinoma cells by dehydroepiandrosterone: role of isoprenoid biosynthesis. *Cancer research*, 52(5), 1372–1376.
59. Sebolt-Leopold, J. S., & Herrera, R. (2004). Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nature reviews. Cancer*, 4(12), 937–947.

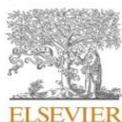
<https://doi.org/10.1038/nrc1503>

60. Sun, H. Z., Yang, T. W., Zang, W. J., & Wu, S. F. (2010). Dehydroepiandrosterone-induced proliferation of prostatic epithelial cell is mediated by NF κ B via PI3K/AKT signaling pathway. *The Journal of endocrinology*, 204(3), 311–318. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0270>
61. Teng, Y., Radde, B. N., Litchfield, L. M., Ivanova, M. M., Prough, R. A., Clark, B. J., Doll, M. A., Hein, D. W., & Klinge, C. M. (2015). Dehydroepiandrosterone Activation of G-protein-coupled Estrogen Receptor Rapidly Stimulates MicroRNA-21 Transcription in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *The Journal of biological chemistry*, 290(25), 15799–15811. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.641167>
62. Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(2), 131–142. <https://doi.org/10.1038/nrm1835>
63. Thorpe, L. M., Yuzugullu, H., & Zhao, J. J. (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature reviews. Cancer*, 15(1), 7–24. <https://doi.org/10.1038/nrc3860>
64. Vegliante, R., & Ciriolo, M. R. (2018). Autophagy and Autophagic Cell Death: Uncovering New Mechanisms Whereby Dehydroepiandrosterone Promotes Beneficial Effects on Human Health. *Vitamins and hormones*, 108, 273–307. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.01.006>
65. Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., & Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of biological chemistry*, 269(7), 5241–5248.
66. Walker, E. H., Pacold, M. E., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P. T., Wymann, M. P., & Williams, R. L. (2000). Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Molecular cell*, 6(4), 909–919. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(05\)00089-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(05)00089-4)
67. Webb, S. J., Geoghegan, T. E., Prough, R. A., & Michael Miller, K. K. (2006). The biological actions of dehydroepiandrosterone involves multiple receptors. *Drug metabolism reviews*, 38(1-2), 89–116. <https://doi.org/10.1080/03602530600569877>
68. Widstrom, R. L., & Dillon, J. S. (2004). Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulfate?. *Seminars in*

- reproductive medicine*, 22(4), 289–298. <https://doi.org/10.1055/s-2004-861546>
69. Williams, M. R., Ling, S., Dawood, T., Hashimura, K., Dai, A., Li, H., Liu, J. P., Funder, J. W., Sudhir, K., & Komesaroff, P. A. (2002). Dehydroepiandrosterone inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation independent of ARs and ERs. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(1), 176–181. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.1.8161>
70. Xu, L., Xiang, X., Ji, X., Wang, W., Luo, M., Luo, S., Li, K., Gong, S., Liu, S., Ma, L., Chen, P., & Li, J. (2014). Effects and mechanism of dehydroepiandrosterone on epithelial-mesenchymal transition in bronchial epithelial cells. *Experimental lung research*, 40(5), 211–221. <https://doi.org/10.3109/01902148.2013.879966>
71. Xu, J., Zhou, J., Dai, H., Liu, F., Li, W., Wang, W., & Guo, F. (2018). CHIP functions as an oncogene by promoting colorectal cancer metastasis via activation of MAPK and AKT signaling and suppression of E-cadherin. *Journal of translational medicine*, 16(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1540-5>
72. Yan, W., Ma, X., Zhao, X., & Zhang, S. (2018). Baicalein induces apoptosis and autophagy of breast cancer cells via inhibiting PI3K/AKT pathway in vivo and vitro. *Drug design, development and therapy*, 12, 3961–3972. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S181939>
73. Yu, Z., Ye, S., Hu, G., Lv, M., Tu, Z., Zhou, K., & Li, Q. (2015). The RAF-MEK-ERK pathway: targeting ERK to overcome obstacles to effective cancer therapy. *Future medicinal chemistry*, 7(3), 269–289. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.143>
74. Zavala-Zendejas, V. E., Torres-Martinez, A. C., Salas-Morales, B., Fortoul, T. I., Montañó, L. F., & Rendon-Huerta, E. P. (2011). Claudin-6, 7, or 9 overexpression in the human gastric adenocarcinoma cell line AGS increases its invasiveness, migration, and proliferation rate. *Cancer investigation*, 29(1), 1–11. <https://doi.org/10.3109/07357907.2010.512594>
75. Zhou, R., Chen, H., Chen, J., Chen, X., Wen, Y., & Xu, L. (2018). Extract from *Astragalus membranaceus* inhibit breast cancer cells proliferation via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2148-2>

13. ANEXOS (ARTÍCULO)

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 208 (2021) 105818



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb



DHEA inhibits proliferation, migration and alters mesenchymal-epithelial transition proteins through the PI3K/Akt pathway in MDA-MB-231 cells

Zaira Colín-Val^{a,b}, Norma Edith López-Dfazuerrero^c, Rebeca López-Marure^{a,*}

^a Departamento de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Ciudad de México, Mexico

^b Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico

^c Laboratorio de Biogerénetica y Envejecimiento Celular, Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

DHEA
Mesenchymal-epithelial transition
PI3K/Akt
Breast cancer cells

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, and breast cancer is the most common among women. Dehydroepiandrosterone (DHEA), the most abundant steroid hormone in human serum, inhibits proliferation and migration of breast cancer cells, modulating the expression of proteins involved in mesenchymal-epithelial transition (MET). However, the underlying molecular mechanisms are not fully understood. DHEA effects on the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 (mesenchymal stem-like) could be exerted by binding to receptors tyrosine kinase (RTKs) and signaling through MEK/ERK and/or PI3K/Akt pathways. In this study, MDA-MB-231 cells were exposed to DHEA in the presence of pharmacological inhibitors of these pathways and a siRNA against PIK3CA gene, which blocks PI3K pathway. Cell proliferation was measured by crystal violet staining, migration by the wound healing and transwell assays, and MET protein expression by western blot. A xenograft tumor growth in nude mice (nu/nu) using a siRNA against PI3K was also performed.

Results showed that neither of the inhibitors used reverted the antiproliferative activity of DHEA. However, wortmannin and LY294002, inhibitors of the PI3K/Akt pathway, abolished the up- and down-regulation of E- and N-cadherin expression respectively, and inhibition of migration induced by DHEA in MDA-MB-231 cells. The siRNA that blocks the PI3K pathway, abolished the effects of DHEA on proliferation, migration, MET proteins expression and the growth of tumors in nude mice.

In conclusion, these results suggest that PI3K/Akt pathway participates in the effects of DHEA on breast cancer cells.

1. Introduction

Cancer comprises a sequence of molecular events, including uncontrolled cell proliferation, morphological alterations, angiogenesis, apoptosis deregulation, invasion, and metastasis [1]. Cancer is one of the biggest causes of death worldwide, whereas breast cancer is the mainly common among women in México, with 16 % of all malignant tumors [2,3].

Among breast cancer, triple-negative cancer (TNBC) subtype, such as the cell line MDA-MB-231 (mesenchymal stem-like), is highly aggressive, conferring an unfavorable prognosis [4]. Chemotherapy has limited effectiveness for TNBC, because most patients experience relapses, metastases, and side effects given the inaccuracy of this treatment [5].

Pathways such as MEK/ERK and PI3K/Akt/mTOR play central roles in the networks signal transduction promoting tumor initiation and progression, regulating normal cellular processes including proliferation, survival, growth, and motility, this is highlighted by the high frequency of mutations in this pathways [6–8]. MEK/ERK and PI3K/Akt pathways are activated by tyrosine kinase receptors (RTKs) such as the epidermal growth factor receptor (EGFR), and the insulin-like growth factor receptor (IGFR) [9]. These markers are overexpressed frequently on TNBC cells and correlate with poor prognosis.

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated form (DHEA-S) are the most abundant steroid hormones in human serum produced by the adrenal cortex [10]. DHEA and DHEA-S levels increase in 6 to 8-year old children, reach a peak between 20–30 years and declining progressively with age, which is correlate with several pathologies [11].

* Corresponding author at: Departamento de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Badiano No. 1, Colonia Sección 16, Tlalpan, C. P. 14080, Ciudad de México, D.F., Mexico.

E-mail address: rebeca.lopez@cardiologia.org.mx (R. López-Marure).

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105818>

Received 24 September 2020; Received in revised form 19 November 2020; Accepted 8 January 2021

Available online 27 January 2021

0960-0760/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

In previous works, we described how DHEA inhibits proliferation and migration of MCF-7, MDA-MB-231, and Hs 578T breast cancer cells [12]. DHEA inhibits spheroids of MCF-7, MDA-MB-231, and ZR-75-30 cells and colony formation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells in agar medium [13]. We also found that DHEA modulates proteins involved in MET and reverses mesenchymal markers in MDA-MB-231 cells *in vitro*, which regain epithelial properties reducing N-cadherin while increasing E-cadherin expression. DHEA also inhibited tumor growth in nu⁺/nu⁻ mice [14]. However, the molecular mechanisms responsible for these effects are not fully understood.

The binding of DHEA to a receptor to induce its effects on breast cancer cells remains unknown. Our work group showed that DHEA-antiproliferative effect in MCF-7 cells was androgen- and estrogen receptor-independent [15]. To date, there is not enough data supporting an intracellular receptor for DHEA and its sulfate that indicate if DHEA acts directly or through a metabolite to induce its effects. One study strongly supported a plasma membrane receptor for DHEA, but this is yet to be isolated [16].

Several authors describe that processes such as proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) are mediated by PI3K/Akt and MEK/ERK pathways [17,18]. One study in human mesenchymal stem cells showed that DHEA acts through these pathways and binds to RTKs such as IGFR [19]. In another study, DHEA inhibited EMT in 6HBE-14 epithelial bronchial cells by PI3K [20].

To test the hypothesis that DHEA effects on breast cancer cells are mediated by binding to RTKs, which activate MEK/ERK and/or PI3K/Akt pathways, the MDA-MB-231 cells were exposed to DHEA in the presence of pharmacological inhibitors of these pathways or a siRNA against PI3K/Akt pathway, while proliferation, migration, and expression of MET proteins were evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The monoclonal antibody against N-cadherin (CD325) was purchased from eBioscience (San Diego, CA, USA). Anti-beta-actin (AC-15) was acquired from Abcam (Cambridge, MA, USA). Monoclonal antibodies against Akt 1/2/3 (5C10), Akt-p 1/2/3 (C-11), ERK 1/2 (C-9), ERK-p (pT202/pY204.22A), polyclonal antibodies against E-cadherin (H-108) and PI3-kinase p110 α (4F3), secondary antibodies m-IgGk BPHRP (sc-526102) and chicken anti-rabbit IgG-HRP (sc-516087) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA). Inhibitors Ag-538 (CAS 133550-18-2), Ag-1478 (CAS 175178-82-2), U-0126 (CAS 109511-58-2), and Wortmannin (CAS 19545-26-7) were also provided by Santa Cruz Biotechnology, Inc. Western blot reagents were obtained from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). DMEM-high glucose medium and other cell culture reagents were acquired from GIBCO/BRL (Grand Island, NY, USA). LY294002 hydrochloride (I9908) and Laemmli sample buffer were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ambion® Silencer Pre-designed siRNA against PIK3CA gene (Ambion Cat #: AM16708), siRNA negative control (Ambion Cat #: AM461), and Lipofectamine® 2000 reagent (Invitrogen Cat #: 11668-030) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

2.2. Cell culture

MDA-MB-231 cells were cultured in DMEM-high glucose supplemented with 10 % newborn calf serum (NBCS) and 1% antibiotic-antimycotic solution. For all experiments, cells were exposed to inhibitors (40 μ M) 1 h before DHEA addition (10 μ M). The inhibitors are shown in the following table.

Inhibitor	Target
Ag-538	EGFR

(continued on next column)

(continued)

Inhibitor	Target
Ag-1478	IGFR
U-0126	MEK
Wortmannin	PI3K
LY294002	PI3K

2.3. MTT assay

The cytotoxic effect of the inhibitors was measured by the MTT assay. MDA-MB-231 cells (3×10^3 /well) were seeded in 96-well plates and exposed to different concentrations of inhibitors (2.5, 5, 10, 20, and 40 μ M) and DHEA (10 μ M) for 48 h. Untreated cells were used as controls. At the end of each treatment, 20 μ L of MTT solution (5 mg/mL) was added to each well, and plates were incubated in the dark for 4 h at 37 °C. After removing culture medium, formazan crystals were dissolved with acid isopropanol (0.04 N HCl), and optical density was measured at 570 nm in a microplate spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

2.4. Crystal violet staining

Cell proliferation was measured by crystal violet. To this, MDA-MB-231 cells (3×10^3 /well) were plated in 96-multiwell plates and exposed to inhibitors (40 μ M) for 1 h, and cells were then cultured with DHEA (10 μ M) for 48 h. After fixing cells with 100 μ L of 1.1 % glutaraldehyde in HEPES buffer (150 mM NaCl, 10.9 mM HEPES, 4.4 mM KCl, 12.2 mM glucose, pH 7.4) for 15 min, plates were washed three times with distilled water, air-dried, and stained for 20 min with 100 μ L of 0.1 % crystal violet solution (200 mM formic acid buffer, pH 6). Crystal violet was removed, plates were thoroughly washed with distilled water, and air-dried. The bound dye was solubilized with 100 μ L of a 10 % acetic acid solution for 10 min. Optical density was measured at 590 nm in a microplate spectrophotometer.

2.5. Migration assay

MDA-MB-231 cells (2.5×10^5 /well) were seeded into 8 μ m pore-size transwell filters in 250 μ L of the NBCS-free medium. To the lower chamber, 1 mL of medium with 10 % NBCS, and inhibitors with or without DHEA was added. After 48 h of treatment, cells on the top side of the filter were removed by scrubbing twice with a tipped swab. The migration of cells on the bottom side of the filter, and cells adhered to the plate (migrating cells) were stained with crystal violet.

2.6. Scratch motility assay (wound assay)

Cells were seeded and grown to confluence. After this, cell monolayers were scratched with a 200 μ L-pipette tip to create a wound. The culture medium was removed, and cells were washed twice with a phosphate buffer solution containing Ca⁺² and Mg⁺² (0.1 g MgCl₂, 0.1 g CaCl₂, 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 2.16 g NaH₂PO₄, 0.2 g K₂HPO₄, pH 7.2) to remove suspended cells. Fresh medium with 2% NBCS was added with different treatments: control (non-treated cells), DHEA, inhibitors alone, and inhibitors plus DHEA for 48 h. Cells migrating from the leading edge were photographed at 0 and 48 h. The percentage of open wound area (cell-free space) was calculated using the Image J software (version 1.50i).

2.7. Protein extraction and quantification

MDA-MB-231 cells were seeded in 35 mm Petri dishes and grown until 70 % confluence, after they were treated with different inhibitors, DHEA, and DHEA plus inhibitors for 48 h. The culture medium was

removed, and cells were washed with HEPES buffer. Cells were incubated with 100 μ l of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5 % NP40, 100 mM NaF, 0.2 mM NaVO₃, 1 μ g/mL aprotinin, 1 mM PMSF, 1 μ g/mL leupeptin) at 4 °C for 15 min. After, cells were detached with a scraper, and cell debris was removed by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min. Supernatants were collected and stored at -80 °C. Protein levels were measured with the Bradford assay. Absorbance was read at 595 nm in a GENESYS™ 10S UV-vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Protein concentration was calculated from a standard bovine serum albumin (BSA) curve.

2.8. Western blot

Proteins were analyzed by electrophoresis using 8 % SDS-polyacrylamide gels as follows: 2.5 mL of solution 1 (0.75 M Tris-HCl, 0.2 % SDS, pH 8.8), 2 mL of solution 2 (30 % acrylamide-bisacrylamide in 37.5:1 ratio), 1 mL of water, 7 μ l of TEMED, 25 μ l of 13 % ammonium persulfate. Samples were denatured at 95 °C for 5 min. Then, 30 μ g of protein from the total lysate was loaded per lane with 1:1 1X sample buffer, 2X Laemmli sample buffer. Samples were run at 120 V for 90 min with 1X Tris/Glycine/SDS buffer. Proteins were transferred to PVDF membranes at 250 mA for 120 min at 4 °C, with 800 mL of transfer solution (25 mM Tris-base, 192 mM glycine, and 20 % methanol, pH 8.3). Membranes were blocked with 8% fat-free milk in TBS-T (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.01 % Tween-20, pH 7.6) for 1 h with constant stirring, and then membranes were incubated overnight with all primary antibodies. Antibodies against β -actin and E-cadherin were used at 1:5000 and 1:2000 dilution, respectively. All other primary antibodies were used at 1:1000 dilution. After, blots were washed three times for 5 min in TBS-T and incubated with 8% fat-free milk in TBS-T for 15 min. The secondary antibodies (diluted 1:2500) were added for 1 h before washing the blots three times with TBS-T for 5 min. Chemiluminescent detection of bands was performed with the SuperSignal® system and the ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad). Densitometric analysis of proteins was carried out with the Image Lab™ V 4.0 Software (Bio-Rad).

2.9. siRNA transfection

The cells were seeded in 35 mm Petri dishes and grown until 70 % confluence. After, cells were seeded again in DMEM medium without serum, incubated with 600 pM of the predesigned siRNA directed against PIK3CA gene, and with 9 μ l of siRNA negative control previously diluted with 450 μ l of serum-free DMEM medium for 72 h. Transfection was performed using Lipofectamine® 2000 according to the manufacturer's instructions. Transfection was confirmed by western blot analyzing PI3K expression.

2.10. In vivo assay

The *in vivo* study was conducted according to the Official Mexican Standard (NOM-062-ZOO-1999) for production, care and use of laboratory animals. A mouse xenograft model was performed. We used 12 female of 10 weeks old athymic nude (nu-/nu-) mice weighing between 20–25 g. A total of 1×10^6 MDA-MB-231 cells per mouse were used for implantation. Previously, cells were treated with 600 pM siRNA against PIK3CA for 48 h. After, cells were suspended in 100 μ l of 1X HEPES buffer and were implanted subcutaneously into the right flank of the mouse. DHEA was diluted in 20 % ethanol (vehicle) and 80 % sterile pure extra olive oil and was injected subcutaneously into the dorsal plane of mice every third day at 60 μ g of DHEA/g of body weight during 5 weeks. Tumor formation was monitored every third day.

Animals were divided into the follow groups (3 mice per group):

Group 1 = negative control, only vehicle was injected.

Group 2 (control) = positive control, tumor cells were inoculated and only the vehicle was administered.

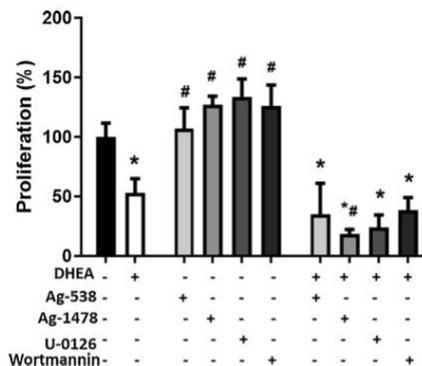


Fig. 1. DHEA inhibition of proliferation of MDA-MB-231 cells was not affected by the inhibitors. Cells (3×10^3) were plated in each well and incubated with 40 μ M Ag-538, Ag-1478, U-0126, and wortmannin alone or combined with 10 μ M DHEA for 48 h. Cells were incubated with inhibitors for 1 h before adding DHEA. Cell proliferation was measured by crystal violet. Data are shown as the percentage of proliferation where the control group represents 100 %. Results are expressed as mean \pm SD from three independent experiments by triplicate. *, # $p < 0.05$ compared to control and DHEA, respectively.

Group 3 (DHEA) = DHEA was administered beginning with the first dose one week before inoculation with tumor cells.

Group 4 (siRNA) = tumor cells were previously treated with siRNA and DHEA was administered beginning with the first dose one week before inoculation.

Four weeks after tumor cells implantation, mice were narcotized with 0.4 mL/mice pentobarbital (6.3 g/100 mL) diluted 1:10 in HEPES buffer by peritoneal injection. Tumors were isolated and weighed.

2.11. Statistical analysis

At least three independent experiments were performed per condition. Results are presented as mean \pm standard deviation (SD). Multiple comparisons were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's pairwise comparison (GraphPad Prism software, version 5.01). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of DHEA and inhibitors on viability and Akt-p/ERK-p expression

Each inhibitor was tested for potential toxicity, measuring cell viability by the MTT assay. Results showed that none of the inhibitors or concentrations affected the cell viability (Fig. 1S, supplementary material). On the other hand, all inhibitors acted on their respective targets at 40 μ M (Fig. 2S, supplementary material); therefore, this concentration was selected for further experiments. DHEA did not affect cell viability neither Akt nor ERK expression (Fig. 1S and 2S, supplementary material).

3.2. Effect of inhibitors on the decrease of proliferation induced by DHEA

To determine whether DHEA affects cell proliferation through PI3K/Akt, MEK/ERK, IGFR, or EGFR, cells were exposed to 40 μ M of inhibitors alone or in combination with 10 μ M DHEA for 48 h. Cell proliferation was evaluated by crystal violet. DHEA inhibited 50 % MDA-MB-231 cells proliferation. DHEA combined with Ag-1478, U-0126, and wortmannin

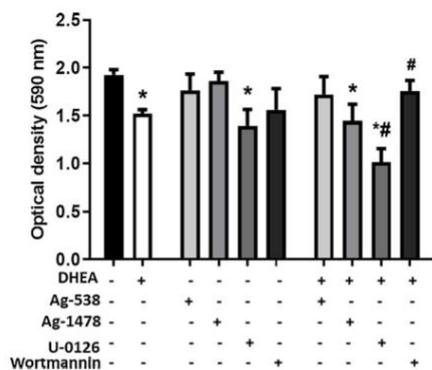


Fig. 2. DHEA diminished transwell migration through the PI3K/Akt pathway. In the upper chamber of transwell, cells (250×10^3) were cultured without (control) or with DHEA ($10 \mu\text{M}$), inhibitors ($40 \mu\text{M}$), and inhibitors plus DHEA, NBSCs free for 48 h. In the lower chamber, medium plus 10 % NBSCs was added. Cell migration was evaluated by the transwell assay, and migrating cells were stained with crystal violet. Data are shown as optical density and expressed as mean \pm SD from three independent experiments performed by triplicate. *, # $p < 0.05$ compared with control and DHEA, respectively.

reduced cell proliferation more than DHEA alone (Fig. 1), suggesting that none of these pathways is responsible for the antiproliferative effect of DHEA.

3.3. Wortmannin reverted DHEA inhibition of migration

Since DHEA inhibits migration of MDA-MB-231 cells, these were exposed to $40 \mu\text{M}$ of inhibitors with or without $10 \mu\text{M}$ DHEA for 48 h, and migration was evaluated by Boyden chamber assay (transwells) (Fig. 2) and the wound assay (Fig. 3). Transwell assay results showed that DHEA decreased cell migration by 17 %. Similar results were observed with U-0126 reducing 28 %. U-0126 plus DHEA diminished migration by 45 %. DHEA with wortmannin increased migration by 12 % compared to DHEA alone (Fig. 2). Wound assay results showed that DHEA reduced cell migration by around 70 %, similar to our previous results [11,14]. Each inhibitor decreased cell migration compared to controls; however, in combination with DHEA, only wortmannin reverted DHEA inhibition of migration by 40 % (Fig. 3B). These results together indicate that PI3K/Akt could mediate DHEA inhibition of migration.

3.4. PI3K/Akt pathway participates on effect DHEA induced on MET proteins expression

E- and N-cadherin proteins are specific markers of epithelial and mesenchymal phenotypes, respectively. We previously showed DHEA upregulated E-cadherin and downregulated N-cadherin expression in MDA-MB-231 cells [14]. Therefore, to validate whether DHEA effects are mediated by PI3K/Akt or MEK/ERK pathways or through IGFR and EGFR signaling, we measured E- and N-cadherin expression from cells treated with DHEA alone, and in combination with different inhibitors of these pathways and receptors. Western blot results showed that inhibitors alone reduced E-cadherin expression (28 %) compared to control cells (Fig. 4A and 4B). DHEA plus U-0126 increased E-cadherin expression as DHEA alone, suggesting that the MEK/ERK pathway is not involved in DHEA effects on E-cadherin expression. On the other hand, Ag-538, Ag-1478, and wortmannin addition prevented E-cadherin upregulation by DHEA, highlighting EGFR, IGFR, and PI3K/Akt pathway as mediators of DHEA effects on E-cadherin expression.

All inhibitors reduced N-cadherin expression by around 30 % (Fig. 4C and 4D). Addition of Ag-538, Ag-1478, and U-0126 inhibitors did not change DHEA effects on N-cadherin expression; however, wortmannin abolished 40 % of N-cadherin downregulation induced by DHEA, suggesting that the PI3K/Akt pathway participates in DHEA effect on N-cadherin expression.

3.5. LY294002 reverted DHEA inhibition of migration and MET proteins expression

To confirm whether PI3K/Akt pathway mediates DHEA effects, we used another PI3K inhibitor, LY294002. First, we tested the potential cell toxicity of LY294002 by the MTT assay. LY294002 showed no toxic effects at different concentrations (2.5, 5, 10, 20, and $40 \mu\text{M}$). PI3K inhibition was confirmed by western blot using $40 \mu\text{M}$ LY294002 (Fig. 3S, supplementary material).

Cells were exposed to DHEA plus LY294002, and proliferation and migration were evaluated. LY294002 alone did not affect cell proliferation (Fig. 5A). DHEA alone decreased around 50 % proliferation and in combination with LY294002, cell proliferation was not affected compared with DHEA alone. To test whether PI3K/Akt pathway mediates other of the effects produced by DHEA, migration, and E- and N-cadherin expression were also evaluated. LY294002 abolished the DHEA effect on migration tested by the transwell assay (Fig. 5B). Similarly, wound assays showed that DHEA and LY294002 alone prevented wound closure by 80 % and 50 %, respectively (Fig. 5C), but in combination, a similar inhibition to the inhibitor alone was observed.

Western blots results revealed that LY294002 alone increased E-cadherin expression by 33 % compared to control (Fig. 5D); however, in cells exposed to LY294002 plus DHEA, E-cadherin expression decreased 45 % compared to DHEA alone. Finally, N-cadherin expression decreased with LY294002 alone by 18 %, but the combination with DHEA restored N-cadherin expression (Fig. 5E). These results together to the obtained with wortmannin, suggest that the PI3K pathway could be related to the DHEA effect on migration and MET protein expression.

3.6. The effects of DHEA are mediated through the PI3K/Akt pathway

To confirm the participation of the PI3K pathway in the effects induced by DHEA, a siRNA that mediates silencing of PI3KCA gene was transfected to cells. After cell transfection with siRNA, a western blot assay against PI3K protein was performed to check the effectivity of transfection (Fig. 4S, supplementary material).

Once that the PI3K protein expression inhibition was confirmed, cells were treated with DHEA for 48 h and proliferation, migration, E- and N-cadherin proteins expression were evaluated. The siRNA decreased proliferation by 25 % while DHEA did so by 50 % (Fig. 6A). Proliferation results using all inhibitors showed that the combination of DHEA plus inhibitors did not abolish the decrease of proliferation induced by DHEA (Fig. 1). However, the use of siRNA plus DHEA increased by 30 % proliferation compared to DHEA alone, probably because the inhibitors are not as specific as siRNA and can inhibit other signaling pathways. This result demonstrates the participation of the PI3K/Akt pathway in the antiproliferative effect of DHEA.

Transwell assay showed that DHEA decreased 30 % migration, and this effect was reversed by 10 % when cells were treated with siRNA plus DHEA; however, this difference was not significant (Fig. 6B). Similar results were obtained with the wound assay, where DHEA and siRNA alone prevented wound closure by 60 and 70 %, respectively. When cells were cultured with siRNA plus DHEA, siRNA abolished 16 % of the migration inhibition induced by DHEA alone (Fig. 6C), indicating that PI3K/Akt pathway could be involved in the migration effects induced by DHEA on MDA-MB-231 cells.

The western blot test revealed that siRNA decreased N-cadherin expression by 50 %, while DHEA decreased it by 55 %, compared to the control, and the combination of siRNA with DHEA reversed the effect of

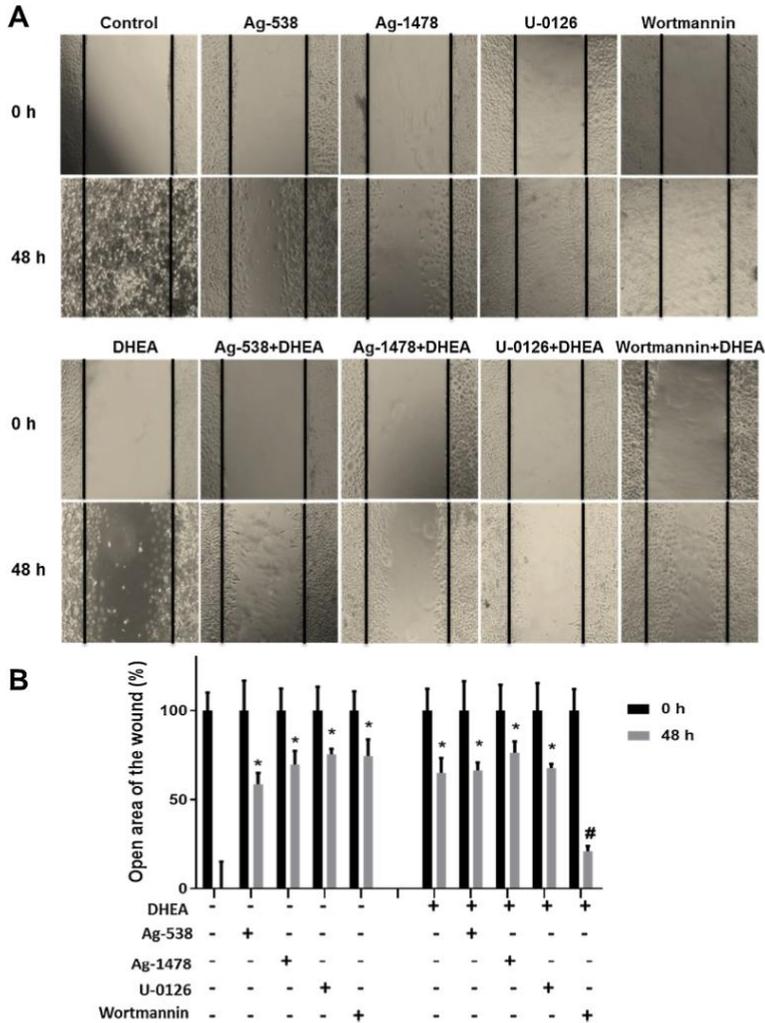


Fig. 3. DHEA impaired cell migration through the PI3K/Akt pathway. Confluent monolayers from MDA-MB-231 cells were cultured without (control) or with DHEA (10 μM), inhibitors (40 μM), and inhibitors plus DHEA with 2% NBCS for 48 h. Cell migration was evaluated by the wound assay. A) Cells were photographed at 0 and 48 h after treatment. B) Analysis of the percentage of open wound area was performed with the Image J software. Data are shown as the mean of open wound area ± SD from three independent experiments performed by triplicate, where control cells were 100 %, *, # *p* < 0.05 compared with control and DHEA, respectively.

DHEA alone by 30 % (Fig. 6D). Regarding E-cadherin expression, siRNA increased 225 % its expression compared with control, while DHEA increased the expression by 275 %; however, when cells were exposed to siRNA plus DHEA, E-cadherin expression decreased by 30 % compared to DHEA alone (Fig. 6D). These results, along with the previous ones, confirm that the PI3K/Akt pathway is involved in the effect of DHEA on the expression of E- and N-cadherin.

3.7. PI3K pathway is involved in the reduction of tumor formation caused by DHEA in nude mice

We previously showed that DHEA reduces tumor formation in nude mice, and to confirm the participation of PI3K pathway in this effect, we use a siRNA against PIK3CA gene. To this, cells were treated with the

siRNA for 48 h and after were inoculated in nude mice previously treated with DHEA. The negative control group (vehicle) no showed growth of tumor. In the positive control group (cells + vehicle), all mice developed big tumors (around 1.6 g). In the group of DHEA, just one mouse developed tumor and its weight (0.95 g) was significantly reduced compared to the tumors obtained in the positive control group (Fig. 7). siRNA abolished the effect of DHEA in the reduction and formation of tumors with a mean tumor weight (0.96 g); indicating the participation of PI3K pathway in this effect.

4. Discussion

Over the last years, increasing evidence supports DHEA benefits for health, including anticancer properties [21]. Our group previously

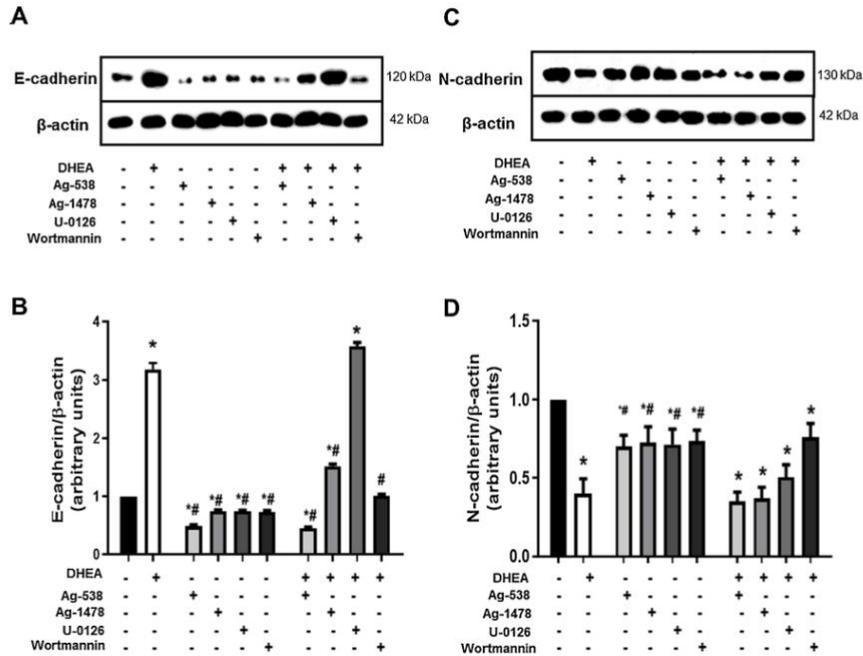


Fig. 4. DHEA upregulated E-cadherin and downregulated N-cadherin expression through the PI3K/Akt pathway. Cells (1×10^6) were exposed to inhibitors alone (40 μ M) and in combination with DHEA (10 μ M) for 48 h. A) E-cadherin expression level was measured by western blot. B) E-cadherin expression level was normalized against the β -actin level. C) N-cadherin expression was measured by western blot. D) N-cadherin expression level was normalized against the β -actin level. In A and C, a representative experiment is shown. In B and D, results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments with similar results. *, # $p < 0.05$ compared with control and DHEA, respectively.

demonstrated DHEA inhibition of proliferation, migration, and modulation of E- and N-cadherin expression on several breast cancer cells such as MCF-7, ZR-75-30, Hs 578T, and MDA-MB-231 [12–14]; however, the mechanisms underlying these effects still are unknown. Therefore, in this study we explored the possible mechanisms involved in the DHEA effects in MDA-MB-231 cells, a cell line highly invasive, metastatic and with a mesenchymal phenotype. To this, proliferation, migration and MET proteins expression were evaluated in cells cultured with DHEA alone or in combination with pharmacological inhibitors of PI3K/Akt and MEK/ERK pathways, as well as IGF and EGF receptors. A siRNA directed against PIK3CA gene was also used.

First, the effect of these inhibitors was evaluated on the inhibition of proliferation induced by DHEA. Results showed that the anti-proliferative effect of DHEA was not reverted with any of the inhibitors (Fig. 1), suggesting that any of the inhibited pathways participate in this effect. It is known that cell proliferation can be inhibited by different signaling pathways, such as RAS and Wnt/ β -catenin [22,23]. The Wnt/ β -catenin is a signaling pathway that regulates several processes among them; cell proliferation, differentiation and migration, and its mutation is often associated with tumor aggressiveness [24]. It has been showed that some compounds inhibit proliferation mediating this pathway. For example, aluminum trichloride (AlCl₃), pifrenidone and curcumin decreased proliferation through a mechanism involving the inhibition of Wnt/ β -catenin in osteoblastic cells, hepatocellular carcinoma cells (HCC), and gastric carcinoma cells, respectively [25–27]. Another pathway related with proliferation is JAK-STAT pathway. For example, in retinoblastoma cells (SO-Rb50 and Y79), curcumin reduced

viability, migration, proliferation and invasion decreasing phosphorylation of JAK1, STAT1, and STAT3 [28]. It has also been observed that the therapeutic agent ECPIRM inhibited cell proliferation, promoting apoptosis in cutaneous T lymphocyte cells (HUT78) through the JAK/STAT pathway by reducing phosphorylation levels of JAK1, STAT3, STAT5 [29]. Since these pathways are very important in regulate proliferation, it will be interesting to determine whether play a role in the antiproliferative activity of DHEA on breast cancer cells.

In our study, we also evaluated whether all inhibitors modulate DHEA effects on the migration of MDA-MB-231 cells. Wortmannin, a PI3K/Akt inhibitor, reduced DHEA inhibition of migration measured by wound healing and transwell migration assays (Figs. 2 and 3). To verify whether the PI3K/Akt pathway mediates DHEA effects on migration, we used another inhibitor of this pathway, LY294002. This synthetic compound was designed from the flavonoid quercetin [30] and is much more stable in solution than wortmannin [31]. Our results showed LY294002 had the same effect as wortmannin, strongly abolishing DHEA effects on cell migration (Fig. 5B and C). To corroborate the participation of PI3K pathway on migration, a siRNA against PIK3CA gene was used. The siRNA alone induced diminution of migration similar to the obtained with DHEA alone, indicating that PI3K/Akt pathway activation is correlated to cell migration. When cells were cultured in presence of siRNA + DHEA, a 10 % reversion of the decrease in migration induced by DHEA alone was observed (Fig. 6B and C); however, this difference was not significant. Since the inhibition of the PI3K pathway by siRNA strongly reduced cell migration, its effect on the inhibition of migration induced by DHEA could not be observed; though,

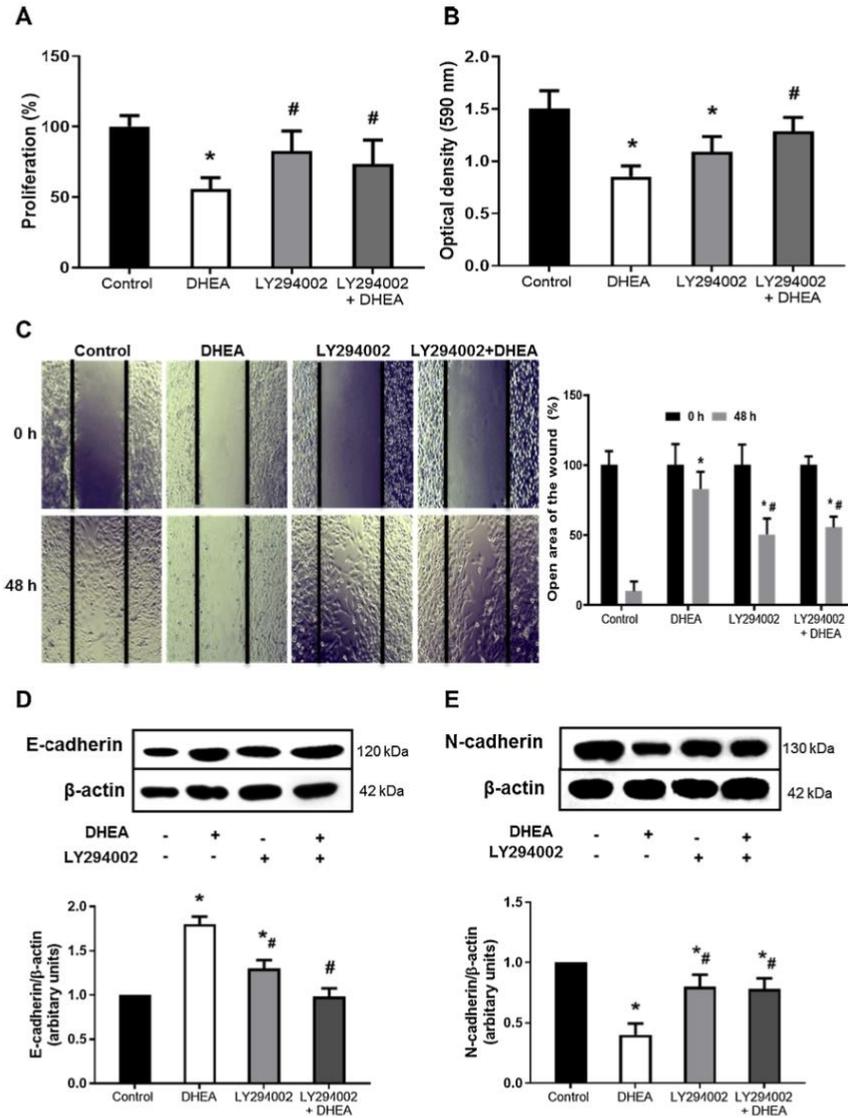


Fig. 5. Effects of LY294002 on MDA-MB-231 cells treated with DHEA. A) Cells were plated in each well and incubated with 40 μM LY294002 alone or combined with 10 μM DHEA for 48 h. Cells were incubated with the inhibitor for 1 h before adding DHEA. Cell proliferation was measured with crystal violet. B) Cells were cultured without (control) or with DHEA (10 μM), LY294002 (40 μM), and LY294002 plus DHEA for 48 h. Cell migration was evaluated by the transwell assay, and migrating cells were stained with crystal violet. In A and B, data are shown as percentage of proliferation and optical density, respectively, where the control group represents 100 %. C) Confluent monolayers of cells were cultured without (control) or with DHEA (10 μM), LY294002 (40 μM), and LY294002 plus DHEA for 48 h. Cell migration was evaluated by the wound assay. Cells were photographed at 0 and 48 h after the treatments, and analysis of the percentage of open wound area was performed with Image J software. D and E) Cells were exposed to LY294002 alone (40 μM) and in combination with DHEA (10 μM) for 48 h. E- and N- cadherin expression was determined by western blot, respectively. The protein expression level was normalized against the β-actin level. A representative experiment of E- and N-cadherin (blots) is shown. Results are expressed as mean ± SD from three independent experiments by triplicate. *, # *p* < 0.05 compared with control and DHEA, respectively.

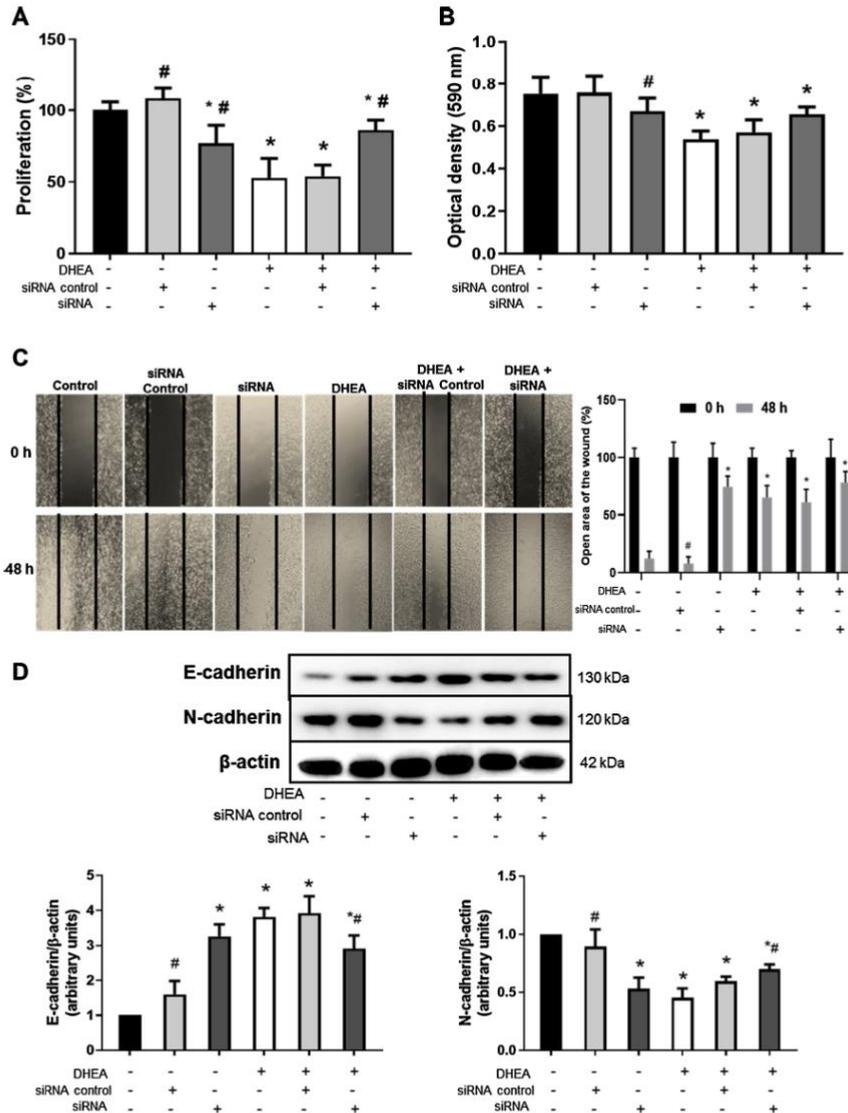


Fig. 6. The PI3K/Akt pathway mediates the effects of DHEA on MDA-MB-231 cells. A) Cells (3×10^5) were seeded in each well, incubated with 600 pM siRNA and its control for 72 h, and after treated with DHEA (10 μ M) for 48 h more. Cell proliferation was measured with crystal violet. Data are shown as the proliferation percentage, where the control group represents 100 %. B) Cells were incubated with siRNA and its control (72 h) then treated with DHEA (48 h). Cell migration was assessed by transwell assay and migratory cells stained with crystal violet. Data are shown as optical density and expressed as the mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. C) Confluent monolayers of MDA-MB-231 cells were cultured without (control) or with siRNA, DHEA, and siRNA plus DHEA for 48 h. Cell migration was assessed by wound assay. Cells were photographed at 0 and 48 h after the treatments. An analysis of the percentage of the open area of the wound was performed with Image J software. Data are shown as the mean of the open area of the wound \pm SD. D) Cells were incubated with siRNA and its control (72 h) then treated with DHEA (48 h). The expression of E- and N-cadherin is shown, the expression level of the proteins was normalized against the level of β -actin from three independent experiments performed in triplicate. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments in triplicate. *, # $p < 0.05$ compared to the control group and DHEA, respectively.

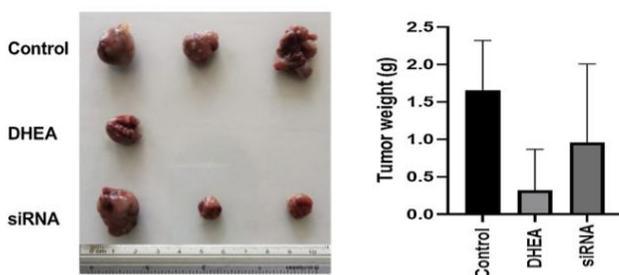


Fig. 7. siRNA against PIK3CA gene abolished the effect of DHEA in tumor growth of MDA-MB-231 cells xenografts in nude mice. Athymic nude mice were divided into four groups: 1) negative control group (20 % ethanol, 80 % olive oil), 2) positive control group (MDA-MB-231 cells + vehicle), 3) DHEA (MDA-MB-231 cells + DHEA administered one week before tumor cells inoculation), and 4) siRNA group (MDA-MB-231 cells with siRNA + DHEA). Mice were injected subcutaneously into the right flanks with 1×10^6 MDA-MB-231 cells. Vehicle and DHEA (60 $\mu\text{g/g}$) were injected subcutaneously into the dorsal plane every third day. Tumor photographs and tumor weight (g) is showed as mean \pm SD of three mice.

the results obtained with the pharmacological inhibitors show the participation of this pathway on cell migration. Similar results have been observed with several compounds in other cancer cell lines; for example, tanshinol inhibited PI3K and Akt phosphorylation preventing migration and invasion of HepG2 cells [32]. Asiatic acid (AA) inhibited proliferation, migration, induced apoptosis, and modified the expression of EMT markers on colon cancer cells (CRC), downregulating PI3K/Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway [33]. The bioactive polyphenol in green tea, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), inhibited migration and invasion in bladder cancer cells (T24 and 5637) measured by wound healing and transwell migration assays, decreasing phosphorylation of PI3K and Akt (Thr 308 and Ser473), and when Akt was inhibited, EGCG did not show effect [34].

To validate whether MEK/ERK and/or PI3K/Akt pathways and RTKs also mediated DHEA effects on epithelial and mesenchymal protein expression, we evaluated the level of EMT proteins in presence of the inhibitors and siRNA. EMT is a biological process where epithelial cells lose their characteristics and acquire a mesenchymal phenotype, often involved in diseases, such as cancer progression [35]. One of the main phenomena occurring in EMT is the decrease of E-cadherin expression and the increase of N-cadherin facilitating cell migration. The reverse process is known as MET, also plays an essential role in reprogramming mesenchymal cells [36]. Previous results from our group showed DHEA upregulated E-cadherin and downregulated N-cadherin expression in MDA-MB-231 cells [14]. In this work, MDA-MB-231 cells treated with DHEA plus a MEK inhibitor (U-0126) increased E-cadherin expression as DHEA alone (Fig. 4A and B), suggesting the MEK/ERK pathway does not participate in E-cadherin upregulation by DHEA. In contrast, the combination of DHEA plus the IGFR and EGFR inhibitors (Ag-538 and Ag-1478, respectively), wortmannin and LY294002 (PI3K/Akt inhibitors), as well as siRNA, blocked E-cadherin upregulation produced by DHEA alone, highlighting EGFR, IGFR, and PI3K/Akt pathway role in DHEA modulation of E-cadherin expression. In contrast, when cells were exposed to DHEA plus Ag-538, Ag-1478 or U-0126 inhibitors, N-cadherin expression was similar to that observed with DHEA alone (Fig. 4C and D). This difference between the two cadherins could be because they can interact with different receptors. E-cadherin expression has been related to the IGFR and EGFR [37,38] and strongly bound p120 catenin and β -catenin avoiding to activate Wnt/ β -catenin and PI3K pathways. Instead, N-cadherin induces the stabilization of fibroblast growth factor receptor (FGFR), to activate MEK/ERK and PI3K pathways in association with PDGFR to enhance cell survival and migration [39,40]. On the other hand, our results also showed that wortmannin, LY294002, and siRNA abolished DHEA downregulation of N-cadherin expression (Figs. 4C and D, 5E and 6D), suggesting the participation of PI3K/Akt pathway as a mediator of DHEA effects on N-cadherin expression.

Wortmannin and LY294002 affect directly Akt phosphorylation avoiding that PIP3 recluses Akt and be phosphorylated by mTORC2. If Akt is not phosphorylated no activate to mTORC1 [41]; therefore, any protein located downstream of Akt pathway involved in proliferation,

cell survival and angiogenesis could participate in the effects produced by DHEA.

Activation of EMT and MET induces the expression of transcription factors in response to various signaling pathways [42]. For example, genistein inhibited colon cancer cells migration and reversed EMT by upregulation of E-cadherin and downregulation of N-cadherin expression, suppressing the Notch1/NF- κ B/slug/E-cadherin pathway [43]. In another study, Crk-associated substrate (CAS) downregulated E-cadherin expression activating the Akt signaling pathway in non-small cell lung cancer [44]. In a colorectal cancer cells (CRC) study, the carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) inhibited cell growth, migration, and invasion, upregulating E-cadherin by MAPK/Akt-GSK-3 β -Slug-E-cadherin pathway [45]. It has been demonstrated the switch from E- to N-cadherin in malignant melanoma cells is regulated at the transcriptional level by Twist, Snail, and the PI3K pathway [46]. It would be important to evaluate the participation of these transcription factors on the effects of DHEA on breast cancer cells.

The use of pharmacological inhibitors to block protein kinases is unspecific, because sometimes they are much more potent to inhibit many protein kinases than their targets and the results obtained from their use in experiments using cell cultures are likely to be erroneous [47]. Therefore, the use of siRNAs to block some pathways with a high specificity is necessary. Our results with the siRNA against PIK3CA gene confirmed that the effects produced by DHEA in the MDA-MB-231 cell line, including its antiproliferative effect are mediated in part by the PI3K/Akt pathway (Fig. 6). *In vivo* experiment using nude mice confirmed these results, since the siRNA reverted the effect of DHEA on tumors growth (Fig. 7). These results were supported by the decrease of PI3K expression obtained in cultured cells with DHEA (supplementary material, Fig. 4S). Since our previous results showed that DHEA inhibits proliferation, migration and alters MET proteins expression in other breast cancer cells such as MCF-7, Hs 578T, and ZR-75-30 [12–14], we hypothesize that PI3K/Akt pathway could be also related to the effects induced by DHEA in these cells.

It is known that the PI3K/Akt pathway plays a vital role in cellular functions such as proliferation, growth, survival, motility, and metabolism [48]. The hyperactivation of this pathway is found around 60 % in breast cancer tumors [49]. Some reports show the effect of other compounds that affect the PI3K/Akt pathway. For example, Wanjun and collaborators demonstrated that the compound Baicalein had anticancer effects both *in vivo* and *in vitro*, reducing Akt-p in the MCF-7 and MDA-MB-231 cells [50]. The compound everolimus decreased the expression of PI3K-p, Akt-p, and mTOR in MCF-7 cells, causing a diminution in cell growth [51]. In another study, the extract obtained from *Astragalus membranaceus* (AM), inhibited cell growth and induced apoptosis in breast cancer cells including the MDA-MB-231 cell line, and its effects were associated with its ability to inhibit the activity of the PI3K/Akt/mTOR pathway [52].

PI3K can be activated by RTK receptors or by G protein-coupled receptors. PI3K catalyzes the conversion of membrane

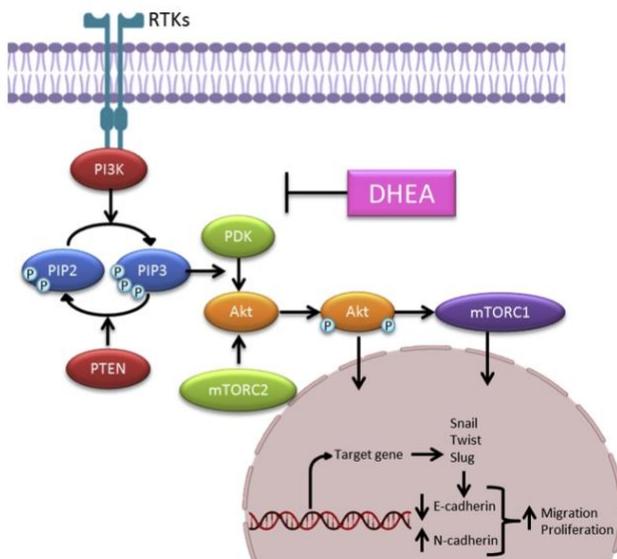


Fig. 8. Role of PI3K/Akt pathway signaling in cancer. During tumorigenesis, the PI3K/Akt pathway is hyper-activated. PI3K phosphorylates PIP2 into PIP3. Then, PIP3 recruits PDK and Akt to the plasma membrane. PDK and mTORC2 phosphorylates Akt. Akt-p can activate mTORC1 and translocate to the nucleus activating several transcription factors such as Snail, Twist, and Slug, which regulate E- and N-cadherin expression, cell migration, and proliferation; finally, conducting tumorigenesis. Our results suggest DHEA inhibition of the PI3K/Akt pathway, preventing nuclear translocation by Akt-p and expression of transcription factors, upregulating E-cadherin, downregulating N-cadherin expression, decreasing cell proliferation and migration.

phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) to phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3), which recruits the phosphoinositide-dependent protein kinase (PDK) and Akt. When PDK is activated, it phosphorylates Akt and this receives a second phosphorylation by mammalian target of rapamycin (mTORC2). Akt-p can activate to mTORC1, and translocate to the nucleus, activating transcription factors such as Snail, Twist, and Slug, which in turn upregulate N-cadherin and negatively regulate E-cadherin, causing an increase in migration and proliferation [53–55]. According our results, we propose that the PI3K/Akt pathway could participate on the effects of DHEA on MDA-MB-231 cells, avoiding Akt phosphorylation, its nuclear translocation and consequently the activation of transcription factors (Fig. 7).

The binding of DHEA to a receptor to induce its effects on breast cancer cells remains unknown. Our work group showed that DHEA-antiproliferative effect in MCF-7 cells was androgen- and estrogen receptor-independent [54]. To date, there is not enough data supporting an intracellular receptor for DHEA and its sulfate that indicate if DHEA acts directly or through a metabolite to induce its effects. One study strongly supported a plasma membrane receptor for DHEA, but this is yet to be isolated [55] (Fig. 8).

5. Conclusion

In the MDA-MB-231 cell line, DHEA inhibited migration, increased E-cadherin and decreased N-cadherin expression, and these effects were partially mediated by PI3K/Akt signaling. This pathway is strongly related to cancer development and progression; therefore, DHEA could be used as a single therapeutic agent or in combination with chemotherapy for breast cancer treatment.

Author agreement

The authors certify that all have seen and approved the final version of the manuscript being submitted. They also warrant that the article is the authors' original work, has not received prior publication and is not under consideration for publication elsewhere.

CRedit authorship contribution statement

Zaira Colín-Val: Methodology, Validation, Writing - original draft, Data curation. **Norma Edith López-Díazguerrero:** Resources, Writing - review & editing. **Rebeca López-Marure:** Conceptualization, Validation, Visualization, Resources, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

Colín-Val Zaira (PhD student from the Posgrado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa) was supported by CONACYT scholarship number 570169.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2021.105818>.

References

- [1] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 100 (2011) 646–674.
- [2] World health statistics overview, Monitoring Health for the SDGs, Sustainable Development Goals, World Health Organization, Geneva, 2019, 2019(WHO/DAD/2019.1). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [3] Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Estadística a propósito del día mundial contra el Cáncer, INEGI, México, DF, 2018. www.inegi.gob.mx.
- [4] C. Choi, J. Kwon, S. Lim, D.M. Helfman, Integrin $\beta 1$, myosin light chain kinase and myosin IIA are required for activation of PI3K-Akt signaling following MEK inhibition in metastatic triple negative breast cancer, *Oncotarget* 7 (2016) 63466–63487.
- [5] J. Collignon, L. Lousberg, H. Schroeder, G. Jerusalem, Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions, *Breast Canc. Targ. Ther.* 8 (2016) 3–107.

- [6] L.C. Cantley, The phosphoinositide 3-kinase pathway, *Science* 296 (2002) 1655–1657.
- [7] J.A. Engleman, J. Luo, L.C. Cantley, The evolution phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism, *Nat. Rev. Genet.* 7 (2006) 606–619.
- [8] O.K. Mirzoeva, D. Das, L.M. Heiser, S. Bhattacharya, D. Siwak, R. Genfeldman, N. Bayani, N.J. Wang, R.M. Neve, Y. Guan, Z. Hu, Z. Knight, H.S. Feiler, P. Gascard, B. Parvin, P.T. Spellman, K.M. Shokat, A.J. Wyrobek, M.J. Bissell, F. McCormick, W.L. Kuo, G.B. Mills, J.W. Gray, W.M. Kora, Basal subtype and MAPK/ERK Kinase (MEK)-phosphoinositide 3-kinase feedback signaling determine susceptibility of breast cancer cells to MEK inhibition, *Cancer Res.* 69 (2009) 565–572.
- [9] V. Asati, D.K. Mahapatra, S.K. Bharti, PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: structural and pharmacological perspectives, *Eur. J. Med. Chem.* 15 (109) (2016) 314–341.
- [10] R.L. Widstrom, J.S. Dillon, Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulfate? *Semin. Reprod. Med.* 22 (2004) 289–298.
- [11] F. Labrie, V. Luu-The, C. Labrie, J. Simard, DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology, *Front. Neuroendocrinol.* 22 (2001) 185–212.
- [12] R. López-Marure, P.G. Contreras, J.S. Dillon, Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation, migration, and death of breast cancer cells, *Eur. J. Pharmacol.* 2 (2011) 268–274.
- [13] R. López-Marure, E. Zapata-Gómez, L. Rocha-Zavaleta, M.C. Aguilar, M. Espinosa Castilla, J. Meléndez Zajgla, N. Meraz-Cruz, C. Huesca-Gómez, R. Gamboa-Ávila, E. O. Gómez-González, Dehydroepiandrosterone inhibits events related with the metastatic process in breast tumor cell lines, *Cancer Biol. Ther.* 17 (2016) 915–924.
- [14] Z. Colín-Val, V.Y. González-Puertos, C. Mendoza-Milla, E.O. Gómez, C. Huesca-Gómez, R. López-Marure, DHEA increases epithelial markers and decreases mesenchymal proteins in breast cancer cells and reduces xenograft growth, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 333 (2017) 26–34.
- [15] V. Gayosso, L.F. Montano, R. López-Marure, DHEA-induced antiproliferative effect in MCF-7 cells is androgen- and estrogen receptor-independent, *Cancer J.* 12 (2006) 160–165.
- [16] R.L. Widstrom, J.S. Dillon, Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulfate? *Semin. Reprod. Med.* 22 (2004) 289–298.
- [17] X.F. Chen, H.J. Zhang, H.B. Wang, J. Zhu, W.Y. Zhou, H.J. Zhang, M.C. Zhao, J. M. Su, W. Gao, L. Zhang, K. Fei, H.T. Zhang, H.Y. Wang, Transforming growth factor- β induces epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancer cells via PI3K/Akt and MEK/Erk1/2 signaling pathways, *Mol. Biol. Rep.* 39 (4) (2012) 3549–3556.
- [18] T. Reungwetwattana, S.J. Weroha, J.R. Molina, Oncogenic pathways, molecularly targeted therapies, and highlighted clinical trials in non-small-cell lung cancer (NSCLC), *Clin. Lung Cancer* 13 (July 4) (2012) 252–266.
- [19] X. Liang, J. Glowacki, J. Hahne, L. Xie, M.S. LeBoff, S. Zhou, Dehydroepiandrosterone stimulation of osteoblastogenesis in human MSCs requires IGF-1 signaling, *J. Cell. Biochem.* 117 (2016) 1769–1774.
- [20] L. Xu, X. Xiang, X. Ji, W. Wang, M. Luo, S. Luo, K. Li, S. Gong, S. Liu, L. Ma, P. Chen, J. Li, Effects and mechanism of dehydroepiandrosterone on epithelial-mesenchymal transition in bronchial epithelial cells, *Exp. Lung Res.* 40 (2014) 211–221.
- [21] C.M. Klinge, B.J. Clark, R.A. Prough, Dehydroepiandrosterone research: past, current, and future, *Vitam. Horm.* 108 (2018) 1–28.
- [22] V.M. Valdespino-Gómez, P.M. Valdespino-Castillo, V.E. Valdespino-Castillo, Interacción de las vías de señalización intracelulares participantes en la proliferación celular: Potencial blanco de intervencionismo terapéutico, *Cirugía y Cirujanos* 83 (2015) 165–174.
- [23] A.L. Mihaljevic, C.W. Michalski, H. Friesz, J. Kleff, Molecular mechanism of pancreatic cancer—understanding proliferation, invasion, and metastasis, *Langenbecks Arch. Surg.* 395 (4) (2010) 295–308.
- [24] M.A. Feitelson, A. Arzumanyan, R.J. Kulathinal, S.W. Blain, R.F. Holcombe, J. Mahajna, M. Marino, M.L. Martínez-Chantar, R. Nawroth, I. Sanchez-García, D. Sharma, N.K. Saxena, N. Singh, P.J. Vlachostergios, S. Guo, K. Honoki, H. Fujii, A.G. Georgakias, A. Bilalvand, A. Amedei, E. Nicolai, A. Amin, S.S. Ashraf, C. S. Boosani, G. Guha, M.R. Criolo, K. Aquilano, S. Chen, S.I. Mohammed, A.S. Azmi, D. Bhakta, D. Halleka, W.N. Keith, S. Nowshheen, Sustained proliferation in cancer: mechanisms and novel therapeutic targets, *Semin. Cancer Biol.* 35 (Suppl) (2015) S25–S34.
- [25] R. Zheng, Q. Deng, Y. Liu, P. Zhao, Curcumin inhibits gastric carcinoma cell growth and induces apoptosis by suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway, *Med. Sci. Mon.* 23 (2017) 163–171.
- [26] W. Huang, P. Wang, T. Shen, C. Hu, Y. Han, M. Song, Y. Bian, Y. Li, Y. Zhu, Aluminum trichloride inhibited osteoblastic proliferation and downregulated the Wnt/ β -catenin pathway, *Biol. Trace Elem. Res.* 177 (2017) 323–333.
- [27] W.J. Zou, Z. Huang, T.P. Jiang, Y.P. Shen, A.S. Zhao, S. Zhou, S. Zhang, Pifenidone inhibits proliferation and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway, *Med. Sci. Monit.* 23 (2017) 6107–6113.
- [28] Y. Li, W. Sun, N. Han, Y. Zou, D. Yin, Curcumin inhibits proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis of retinoblastoma cell lines through modulation of miR-99a and JAK/STAT pathway, *BMC Cancer* 18 (2018) 1230.
- [29] H. Yang, P. Ma, Y. Cao, M. Zhang, L. Li, J. Wei, L. Tao, K. Qian, ECPIRM, a potential therapeutic agent for cutaneous T-Cell lymphoma, inhibits cell proliferation and promotes apoptosis via a JAK/STAT pathway, *Anticancer Agents Med. Chem.* 18 (2018) 401–411.
- [30] C.J. Vlahos, W.F. Matter, K.Y. Hui, R.F. Brown, Specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002), *J. Biol. Chem.* 7 (1994) 5241–5248.
- [31] E.H. Walker, M.E. Parold, O. Perisic, L. Stephens, P.T. Hawkins, M.P. Wymann, R. L. Williams, Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine, *Mol. Cell* 6 (4) (2000) 909–919.
- [32] P. Zhu, Z. Liu, J. Zhou, Y. Chen, Tanshinol inhibits the growth, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via regulating the PI3K-Akt signaling pathway, *Onco. Ther.* 12 (2019) 87–99.
- [33] Y. Hao, J. Huang, Y. Ma, W. Chen, Q. Fan, X. Sun, M. Shao, H. Cai, Asiatic acid inhibits proliferation, migration and induces apoptosis by regulating Pdc4 via the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway in human colon carcinoma cells, *Oncol. Lett.* 15 (2018) 8223–8230.
- [34] K.W. Luo, W.Y. Lung, Luo X.L. Chun-Xie, W.R. Huang, EGCG inhibited bladder cancer T24 and 5637 cell proliferation and migration via PI3K/Akt pathway, *Oncotarget* 9 (2018) 12261–12272.
- [35] Y. Zhang, R.A. Weinberg, Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities, *Front. Med.* 12 (2018) 361–373.
- [36] T. Chen, Y. You, H. Jiang, Z.Z. Wang, Epithelial-mesenchymal transition (EMT): a biological process in the development, stem cell differentiation and tumorigenesis, *J. Cell. Physiol.* 232 (2017) 3261–3272.
- [37] A. Yasmeen, T.A. Bismar, A.E. Al Moustafa, ErbB receptors and epithelial-cadherin-catenin complex in human carcinomas, *Future Oncol.* 2 (6) (2006) 765–781.
- [38] A.M. Nagle, K.M. Levine, N. Tasdemir, J.A. Scott, K. Burlbaugh, J. Kehm, T.A. Katz, D.N. Boone, B.M. Jacobsen, J.M. Atkinson, S. Oesterreich, A.V. Lee, Loss of E-cadherin enhances IGF1-IGF1R pathway activation and sensitizes breast cancers to anti-IGF1R/IGF1R inhibitors, *Clin. Cancer Res.* 24 (20) (2018) 5165–5177.
- [39] J.B. Kim, S. Islam, Y.J. Kim, R.S. Prudoff, K.M. Saks, M.J. Wheelock, N-Cadherin extracellular repeat 4 mediates epithelial to mesenchymal transition and increased motility, *J. Cell Biol.* 151 (2000) 1193–1206.
- [40] C.Y. Loh, J.Y. Chai, T.F. Tang, W.F. Wong, G. Sethi, M.K. Shanmugam, P.P. Chong, C.Y. Looi, The E-Cadherin and N-Cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges, *Cells* 8 (10) (2019) 1118.
- [41] T. Ersahin, N. Tuncbaga, R. Cetin-Atalay, PI3K/AKT/mTOR interactive pathway, *Mol. Biosyst* 11 (2015) 1946–1954.
- [42] D.M. Gonzalez, D. Medici, Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition, *Sci. Signal.* 7 (2015) re8.
- [43] P. Zhou, C. Wang, Z. Hu, W. Chen, W. Qi, A. Li, Genistein induces apoptosis of colon cancer cells by reversal of epithelial to mesenchymal via a Notch1/NF- κ B/slug/E-cadherin pathway, *BMC Cancer* 17 (2017) 813.
- [44] A. Li, W. Zhang, H. Xia, Y. Miao, H. Zhou, X. Zhang, E. Wang, Overexpression of CASS4 promotes invasion in non-small cell lung cancer by activating the Akt signaling pathway and inhibiting E-cadherin expression, *Tumour Biol.* 37 (2016) 15157–15164.
- [45] J. Xu, J. Zhou, H. Dai, F. Liu, W. Li, W. Wang, F. Guo, CHIP functions as an oncogene by promoting colorectal cancer metastasis via activation of MAPK and Akt signaling and suppression of E-cadherin, *J. Transl. Med.* 6 (2018) 169.
- [46] L. Hao, J.R. Ha, P. Kuzel, E. Garcia, S. Persad, Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail, *Br. J. Dermatol.* 166 (2012) 1184–1197.
- [47] S.P. Davies, H. Reddy, M. Caivano, P. Cohen, Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors, *Biochem. J.* 351 (Pt1) (2000) 95–105.
- [48] J.A. Engelman, Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations, *Nat. Rev. Cancer* 9 (2009) 550–562.
- [49] L.M. Thorpe, H. Yuzugullu, J.J. Zhao, PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting, *Nat. Rev. Cancer* 15 (2015) 7–24.
- [50] Y. Wanjun, M. Xingcong, Z. Xiaoyao, Z. Shuqun, Calcitriol induces apoptosis and autophagy of breast cancer cells via inhibiting PI3K/AKT pathway in vivo and vitro, *Drug Des. Devel. Ther.* 12 (2018) 3961–3972.
- [51] D. Liyan, L. Xiaomei, Z. Linhong, C. Weiling, M. Lingguang, Z. Yang, S. Ailin, Everolimus inhibits breast cancer cell growth through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, *Med. Res.* 17 (2018) 7163–7169.
- [52] Z. Ruijuan, C. Hongjin, C. Junpeng, C. Xuemei, W. Yu, X. Leqin, Extract from Astragalus membranaceus inhibit breast cancer cells proliferation via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, *Complement. Altern. Med.* 18 (2018) 83.
- [53] A. Prat, J. Baselga, Bioterapia: Aplicaciones actuales y futuras en oncología, *Medicina Clínica* 129 (2011) 184–193.
- [54] L.F. Hernández-Aya, A.M. González-Angulo, Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer, *Oncologist* 16 (2011) 404–414.
- [55] B.A. Hemmings, D.F. Restuccia, PI3K-PKB/Akt pathway, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4 (2012), a011189.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00112

Matrícula: 2171801239

Mecanismo de acción de la dehidroepiandrosterona en la transición mesénquima-epitelio en células de cáncer de Mama MDA-MB-231.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 11:00 horas del día 15 del mes de junio del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO
DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
DRA. MARIA ISABEL SOTO CRUZ
DRA. CRISELDA MENDOZA MILLA
DRA. REBECA LOPEZ MARURE

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: ZAIRA COLIN VAL

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

ZAIRA COLIN VAL
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO

VOCAL

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

VOCAL

DRA. MARIA ISABEL SOTO CRUZ

VOCAL

DRA. CRISELDA MENDOZA MILLA

SECRETARIA

DRA. REBECA LOPEZ MARURE