

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**“EFECTO DE LA DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA),
SOBRE LA EXPRESION DE LAS PROTEINAS QUE
REGULAN EL CICLO CELULAR: p53, p21 y Rb EN
CELULAS ENDOTELIALES DE CORDON UMBILICAL
HUMANO (HUVEC’s)”**

TESIS que presenta la
BIOL: ESTRELLA ZAPATA GOMEZ
Para obtener el Grado de
MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Cotutora: Dra. Rebeca López Marure
Cotutor: Dr Pablo G. Damian Matzumura

Diciembre 2004

I n d i c e

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
I. DHEA	
1.1. Características.....	3
1.2. Síntesis.....	4
1.3. Metabolismo.....	6
1.4. Mecanismo de acción.....	8
1.5. Antecedentes.....	9
II. Ciclo Celular	
2.1. Definición y características.....	13
2.2. Regulación del ciclo celular	14
2.3. La proteína del Retinoblastoma (Rb).....	15
2.4. La proteína p53.....	18
2.5. La proteína p21.....	19
2.6. DHEA y ciclo celular.....	21
III. Endotelio	
3.1. Características.....	22
3.2. DHEA y endotelio.....	23
Justificación.....	24
Hipótesis.....	25
Objetivo General.....	25
Objetivos Particulares.....	26
Material y Métodos.....	27
Resultados.....	39
Discusión.....	59
Conclusiones y Perspectivas.....	65
Bibliografía.....	66

R e s u m e n

La dehidroepiandrosterona (DHEA), es una hormona esteroide sintetizada en las glándulas suprarrenales, su importancia biológica radica en ser precursor de importantes hormonas esteroideas. Se ha observado que su concentración en la circulación disminuye conforme avanza la edad, lo cual se asocia con el desarrollo de varias enfermedades crónico degenerativas. En este trabajo, se evaluó el efecto de la DHEA sobre la proliferación y expresión de proteínas reguladoras del ciclo y muerte celular, en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVECs). La proliferación celular fue evaluada por medio de tinción con cristal violeta. La expresión de los ARNm de las proteínas p53 y p21 se evaluó por RT-PCR y densitometría. Asimismo, se definió el estado de fosforilación de la proteína Rb por Western blot y finalmente, por citometría de flujo se determinó la muerte celular por translocación de fosfatidilserina. Los resultados obtenidos mostraron que la DHEA en dosis suprafisiológicas (100 μ M), inhibió la proliferación de las HUVECs de una manera dosis-dependiente, mientras que la forma sulfatada (DHEA-S) y la testosterona no mostraron este efecto y el estradiol mostró efecto estimulador. El efecto antiproliferativo de la DHEA, se asoció con la detención del ciclo celular en la fase de G₁, sin provocar la muerte celular. Por otra parte, la DHEA disminuyó la presencia de la forma fosforilada de la proteína Rb y adicionalmente causó un aumento de la expresión de las proteínas p53 y p21. En conclusión, los resultados muestran que la DHEA inhibió la proliferación celular de las HUVECs, al regular proteínas importantes para el control del ciclo celular.

A b s t r a c t

Dehydroepiandrosterone (DHEA), is a steroid hormone synthesized by adrenal glands. The DHEA is known a steroid hormone precursor, but it has been observed that DHEA can have actions for itself. DHEA blood concentration diminishes while the age, this fact has been related with development of several chronic degenerative diseases. The aim of this work was to evaluate the effect of DHEA on proliferation, and its relation on cell cycle proteins and cell death in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

Proliferation was evaluated by crystal violet staining, expression of p53 and p21 proteins by RT-PCR, Rb phosphorylation was determinate by Western blot and cell death by phosphatidylserine membrane translocation. Results showed that DHEA inhibited HUVECs proliferation at 100 μ M in a dose-dependent way, while the effect observed with DHEA sulphate (DHEA-S), estradiol and testosterone, was different. Antiproliferative effect of DHEA was associated with an arrest in G1 phase of cell cycle without cell death. DHEA diminished the phosphorylated form of Rb protein, increased mRNAs of p53 and p21 proteins. These results show that DHEA inhibits proliferation of HUVECs by regulating relevant proteins that control the cell cycle.

I n t r o d u c c i ó n

I. LA DHEA

1.1. Características.

La dehidroepiandrosterona (DHEA; 3 β -hidroxi-5-androsten-17-ona) es la hormona esteroide más abundante en la circulación de los primates y junto con su forma sulfatada (DHEA-S) es la principal hormona esteroide sintetizada en la corteza de las glándulas suprarrenales (Howard, 1996; Labrie *et al*, 1998).

La DHEA tiene efectos fisiológicos de gran importancia. En el feto estimula la eritropoyesis, en los adolescentes es responsable de la aparición del acné, así como del desarrollo y mantenimiento del vello axilar y pubiano. Su acción androgénica (virilizante) es poco apreciable en condiciones normales tanto en hombres como en mujeres. En el varón, su función es opacada por las altas concentraciones de la testosterona, razón por la cual, se le ha considerado como un andrógeno débil (Jara y González, 2001).

Al igual que los demás esteroides su molécula tiene el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno el cual es una estructura química de 19 átomos de carbono (androstano) con un radical hidroxilo en el carbono 3, un grupo ceto en el carbono 17 y una doble ligadura en el carbono 5 (Fig.1).

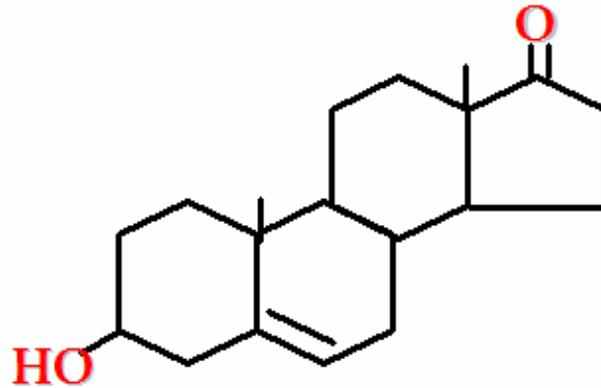


Fig.1 Estructura de la DHEA (3 β -hidroxi-5-androsten-17-ona).

1.2. Síntesis

La biosíntesis de la DHEA se realiza principalmente en la zona reticular de la corteza suprarrenal y comienza con la transformación de la molécula del colesterol (esteroide C₂₇) a pregnanos (esteroides C₂₁) mediante la participación de complejos enzimáticos (citocromo P₄₅₀); posteriormente con la ruptura del enlace C₁₇-C₂₀ se convierten a andrógenos (esteroides C₁₉) entre ellos, la DHEA y su sulfato (Fig 2). La DHEA es el precursor de un andrógeno más potente, la androstendiona, la cual se forma por la participación de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD) isomerasa. La androstendiona se reduce por acción de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β HSD) y origina a la testosterona. Por acción de la P₄₅₀ aromatasas, la testosterona se aromatiza y se convierte a estrógenos (esteroides C₁₈) (Yen, 1994; Celec, 2002) (Fig. 2).

1.3. Metabolismo

En humanos, la mayor parte de la DHEA circulante se encuentra como DHEA-S, por lo que se le considera a esta forma como el reservorio circulante, ésta se une con mayor afinidad a la albúmina lo que disminuye su biodisponibilidad. Los niveles plasmáticos de la DHEA-S reflejan la capacidad de síntesis de la corteza suprarrenal, donde se origina la mayor cantidad de la forma conjugada. La DHEA también se une a la ABP (proteína que une andrógenos) de manera específica, y solamente de 3-5% de la DHEA en circulación se encuentra en forma libre, la cual es la fracción biológicamente importante porque puede difundirse con libertad en los tejidos (Yen, 1994). La DHEA es la forma activa de la hormona, se obtiene por la eliminación del grupo sulfato de la DHEA-S, realizada por sulfatasas específicas presentes en la mayoría de los tejidos y principalmente en la placenta, el hígado, los ovarios y los testículos (Jara y González, 2001; Shealy, 1995)

En el adulto joven la producción diaria de la DHEA por la suprarrenal es de 15-30 mg/día y se almacena en su forma sulfatada donde la concentración sérica alcanza los 250-350 µg/dl. La presencia en sangre de ambas formas varía conforme avanza la edad, de este modo, en el feto se encuentra elevada hasta el momento del nacimiento, disminuye durante la niñez y se eleva nuevamente al inicio de la pubertad. La DHEA y la DHEA-S alcanzan sus niveles máximos entre los 25 y 30 años con una concentración en sangre de 30 nM y 10 µM respectivamente, para después disminuir progresivamente hasta llegar a un mínimo del 8-10% a los 80 años (Hornsby *et al*, 1995; Jara y González, 2001; Allolio y Artl, 2002; Celec, 2002) (Fig 3).

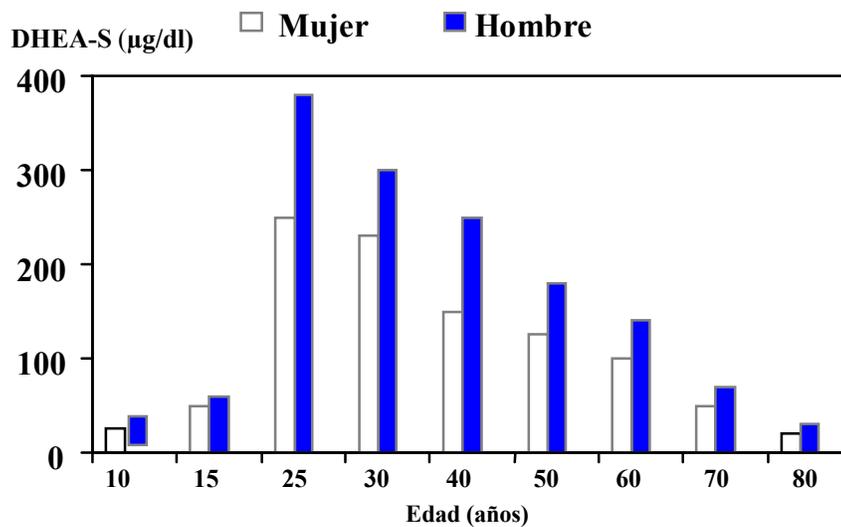


Fig.3 Concentración de la DHEA-S a lo largo de la vida.

El lugar principal para el metabolismo de la DHEA es el hígado, donde es convertida rápidamente a androstendiona, el cual sirve como el principal precursor de esteroides, particularmente en la placenta durante el embarazo. Por otro lado, el metabolismo de la DHEA-S es lento, manteniendo de este modo las concentraciones de la DHEA. Su degradación también se realiza en el hígado, por medio de cambios estructurales formando ésteres, sulfatos y glucurónidos, los cuales son hidrosolubles y pueden ser excretados por el riñón.

La síntesis de la DHEA se encuentra principalmente bajo la regulación de la hormona adenocorticotrópica (ACTH) proveniente de la glándula hipófisis (Eisentein, 1970; Daryl y Granner, 1986). Esta regulación se observa principalmente en la glándula suprarrenal, donde se produce el 50% de la DHEA circulante. Aunque no está clara la participación de la ACTH en otros tejidos, se sabe que la síntesis de la DHEA a nivel cerebral, recientemente descrito (Robel y Baulieu, 1995; Racchi *et al*, 2003) es independiente de la ACTH.

1.3. Mecanismo de acción

El mecanismo directo de acción de la DHEA hasta la fecha no se conoce con exactitud. Los estudios que soportan la idea de su función como pre-hormona, mencionan que una vez convertida a otras hormonas esteroides como andrógenos y estrógenos, sigue el camino de acción descrito para éstas. Después de difundirse al interior de la célula del tejido blanco, se une a los receptores esteroides en el citoplasma o en el núcleo, los activa para fijarse a los elementos reguladores del ADN y de este modo, modula la transcripción de genes específicos.

Estudios recientes han mostrado la existencia de posibles receptores específicos para la DHEA, lo cual podría explicar un mecanismo de acción directo de la misma. Investigaciones recientes demuestran la presencia de un receptor de membrana acoplado a proteínas G (Williams *et al*, 2002; Williams *et al*, 2004) el que parece estar involucrado en la regulación de las vías de las MAPK cinasas y del AMP cíclico, las cuales pueden estar relacionadas con mecanismos de protección en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, conferidos a la DHEA (Simoncini *et al*, 2003). La existencia de receptores específicos para la DHEA sugiere la posibilidad de que los efectos de ésta sean realizados por sí misma y no debidos a su conversión a otras hormonas esteroides, lo que implica que también tenga un mecanismo de acción no genómico.

1.4. Antecedentes

Anteriormente a la DHEA se le atribuía el papel de pre-hormona por ser precursor de otros esteroides (Einsentein, 1970; Allolio y Arlt, 2002) debido a esto, se utiliza en terapias de reemplazo hormonal en mujeres postmenopáusicas (Lasco, 2001; Allolio y Arlt, 2002). Dado que se ha observado una disminución sérica de la DHEA con el envejecimiento celular y con la aparición de varias patologías, como: el Alzheimer, la artritis reumatoide, la arterioesclerosis, la diabetes, entre otras, se le ha atribuido un papel protector (Schwartz *et al*, 1988; Orentreich *et al*, 1992; Montanini *et al*, 1998; Hinson y Raven, 1999). Sin embargo, se ha generado gran controversia en su uso terapéutico debido a algunos efectos secundarios que se han presentado como la androgenización. Es probable, que el no conocer los mecanismos de acción exactos por los cuales actúa la DHEA, evite diseñar tratamientos adecuados.

La administración de la DHEA ha demostrado mejoría en distintos padecimientos, pues disminuye el crecimiento de tumores cancerosos y produce mejorías en enfermedades auto inmunes (Hampl y Starka, 2000). Además, se ha mostrado que la DHEA-S a la que no se le ha conferido acción biológica, tiene efectos antidiabéticos en ratas (Kanauchi *et al*, 2001) al inhibir la producción de radicales libres. Estas propiedades antioxidantes se relacionan con la liberación de la insulina por las células β pancreáticas (Aragno *et al*, 2000; Dillon *et al*, 2000).

En estudios relacionados con la obesidad, se encontró que la administración de la DHEA reduce el tejido adiposo y favorece el metabolismo de los lípidos (Richards *et al*, 2000). En ratones, la DHEA disminuye el peso corporal e inhibe a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,

una enzima importante en el metabolismo de la glucosa (Cleary *et al*, 1984) y cuando se ha utilizado la DHEA en terapia de reemplazo hormonal en humanos, se ha observado que produce mayor sensibilidad a la insulina (Lasco, 2001). Por lo tanto, a la DHEA se le atribuyen propiedades anti-obesidad.

En mujeres postmenopáusicas, la administración prolongada de la DHEA, produce una mayor absorción del Ca^{++} óseo, lo que reduce los riesgos para desarrollar osteoporosis (Baulieu *et al*, 2000). Sin embargo, en modelos de ratas ovariectomizadas, la DHEA disminuye la densidad ósea debido a la producción local de andrógenos (Martel *et al*, 1998).

En relación con otras patologías, la administración de la DHEA produce mejorías en los síntomas de la depresión crónica y aumenta la memoria y el aprendizaje en roedores y en pacientes con Alzheimer (Beer *et al*, 1996; Wolkowitz *et al*, 1999; Racchi *et al*, 2003). En conejos se ha observado que la DHEA disminuye el proceso de la arterioesclerosis y se especula que este efecto puede deberse a su conversión a estradiol y por acción de éste, al aumento del óxido nítrico (Hayashi *etal*, 2000). Aunque, un estudio reciente en células endoteliales humanas, ha mostrado que la DHEA puede regular en forma directa la producción de óxido nítrico (Simoncini *et al* 2003).

Por otro lado, la administración de la DHEA ha sido muy benéfica en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Piketty *et al*, 2001) y con isquemia cerebral (Li *et al*, 2001). Sus efectos en el sistema nervioso central aun no son claros, pero se especula que la DHEA podría modular los receptores neuronales o bien, podría actuar directamente como antiglucocorticoide, regulando el sistema autoinmune (Canning *et al*, 2000; Jarrar, 2001). El uso de la DHEA de forma terapéutica en lupus eritomatoso y otras enfermedades reumáticas, ha mostrado grandes beneficios en la sintomatología de las mismas (Schwartz, 2002; Chang *et al*, 2002).

En células gliales, la DHEA reduce la expresión de la óxido nítrico sintasa inducida por adición de lipopolisacáridos; lo que manifiesta un efecto antioxidante y como consecuencia un efecto protector a las neuronas del hipocampo en un ambiente neurotóxico inducido por glutamato, (Cardounel *et al*, 1999; Wang *et al*, 2001). También se ha observado que la DHEA aumenta la producción de serotonina en casos de depresión e inhibe los receptores al ácido γ -aminobutírico (GABA)(Kaassik *et al*, 2001; Ketan y Sreekumaran, 2003).

Con el avance de la edad, algunas citocinas como la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y este aumento se relaciona con la inmunosenescencia. Aunque se ha mostrado que la DHEA inhibe la producción de la IL-6 en células mononucleares y disminuye la proliferación de las células de músculo liso, lo que sugiere un efecto anti-arteriogénico (Straub *et al*, 1998; Williams *et al* 2002).

En resumen, la administración experimental de la DHEA en humanos y en otros modelos biológicos, muestran que pudiera tener diferentes efectos como se muestra en el siguiente esquema:

- ↑ Interés sexual
- ↑ Funciones autoinmunes
- ↑ Sueño y masa muscular
- ↑ Capacidad de memoria y aprendizaje
- ↑ Captación de glucosa
- ↓ Problemas cardiovasculares
- ↓ Desmineralización ósea
- ↓ Tejido adiposo
- ↓ Masa de tumores
- ↓ Depresión

(Schwartz, 1988; Berdanier *et al*, 1993; Ebeling y Koivisto, 1994; Allolio y Arlt, 2002; Celec, 2002; Ketan y Sreekumaran, 2003).

Todo lo anterior sugiere que el papel que pudiera desempeñar la DHEA por sí misma es muy importante, no sólo como precursor hormonal, sino como modulador directo dentro de las vías de señalización intracelular, tanto genómicas como no genómicas.

II. El Ciclo Celular

2.1. Definición y Características.

El ciclo celular es una serie ordenada de procesos que permiten a la célula crecer, duplicar su material genético, segregarlo en dos juegos ese material duplicado y dividirse para dar lugar a dos células hijas (Izquierdo, 1995; Paniagua *et al*, 1999).

El ciclo celular de las células animales se divide en cuatro fases. Después de la mitosis la célula ingresa a la fase **G₁**, durante la cual la célula es metabólicamente muy activa, aumenta de tamaño, pero no hay síntesis del ADN. La célula prosigue a la fase **S** (síntesis), durante la cual se duplica el ADN. En seguida de ocurrida la duplicación del ADN, la célula prosigue a la fase **G₂**, en la que la célula se prepara para entrar en la fase de mitosis y posteriormente dividirse en dos células hijas (Murray y Hunt, 1993; Izquierdo, 1995)(Fig. 5).

Existe una fase llamada **G₀**, en la cual las células entran en un estado quiescente y no se reproducen, como sucede en las células nerviosas y en los cardiomiocitos.

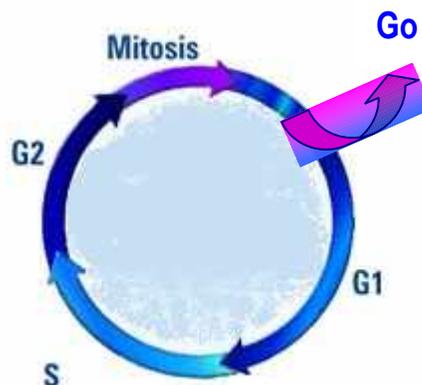


Fig. 5. Las fases del ciclo celular.

2.2. Regulación del Ciclo Celular.

La secuencia de los acontecimientos del ciclo celular está regulada por un sistema complejo de control que vigila cada uno de los pasos que realiza la célula para completar el ciclo o llevarla a la muerte. El que la célula complete el ciclo o no, depende de que se cumplan los requisitos en los puntos de regulación para continuar en la siguiente etapa.

Dentro de la regulación del ciclo celular existen tres puntos especialmente importantes llamados puntos de regulación; el primero de ellos está entre las fases G_1 y S (también llamado punto de restricción), el segundo entre las fases G_2 y la mitosis y un tercero en la anafase durante la mitosis. En estos puntos el ciclo se puede detener en caso de daño al ADN o cuando los eventos moleculares para la transición a la siguiente fase no se han completado (Izquierdo, 1995; Paniagua *et al*, 1999).

El sistema de regulación es altamente complejo e involucra varias familias de proteínas como: las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las ciclinas, los inhibidores de las CDKs (CDKI) y las proteínas supresoras de tumores como la del retinoblastoma (Rb) y la p53 (Donjerkovic y Scout, 2000; Vidal y Koff, 2000). Fig.6. Las ciclinas y las CDKs forman complejos ciclina-cinasa que actúan fosforilando serinas y treoninas de las proteínas blanco. Dichas fosforilaciones permiten la progresión de las células en las diferentes fases del ciclo celular (Donjerkovic y Scout, 2000; Vidal y Koff, 2000)(Fig 6).

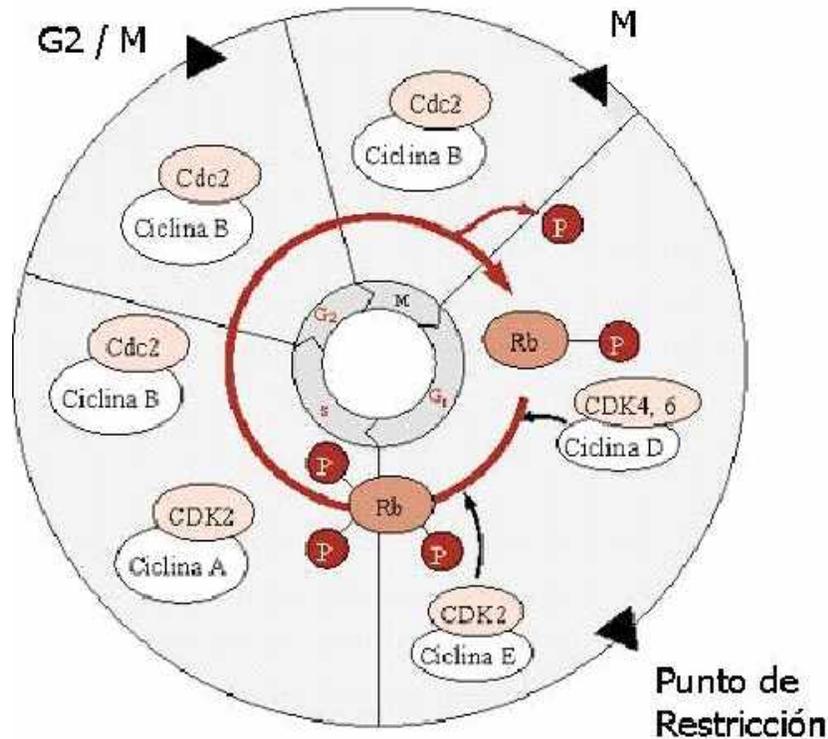


Fig 6. Fases del ciclo celular donde se señalan el punto de restricción en la fase G₁ y los puntos de regulación en las fases G₂ y M. También se observan los sitios donde participan los complejos Ciclina/CDK y la proteína Rb.

2.3. La proteína del Retinoblastoma (Rb).

La proteína Rb tiene un papel importante en el control de la división celular y la entrada a la fase S en células de mamíferos y se ha demostrado su función en la supresión de tumores. La pérdida de la función de la Rb por mutación da lugar a tumores retinales invasivos y a otras neoplasias. La Rb es una proteína nuclear de 105-110 kD que puede ser fosforilada por los complejos ciclina-CDK en múltiples residuos de serina o treonina y en su forma activa actúa como una proteína supresora de tumores (Vidal y Koff, 2000).

La proteína Rb activa se caracteriza por su estado hipofosforilado y se encuentra unida al factor de transcripción de elongación E2F. Esta unión favorece el reclutamiento de histonas, lo que hace más compacta la cromatina, evita que la maquinaria de la transcripción actúe. De esta manera el E2F permite la regulación de varios genes importantes para la fase S del ciclo y para la duplicación del ADN; entre esos genes se encuentran: c-myc, ciclina D, ciclina A, ciclina E, ADN-polimerasa, Cdk2, Cdc2, Cdc25 y el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) entre otros. La activación de estos genes sólo se da cuando el E2F se encuentra en su forma libre y no unido a la Rb (Donjerkovic y Scout, 2000; Vidal y Koff, 2000)(Fig. 7).

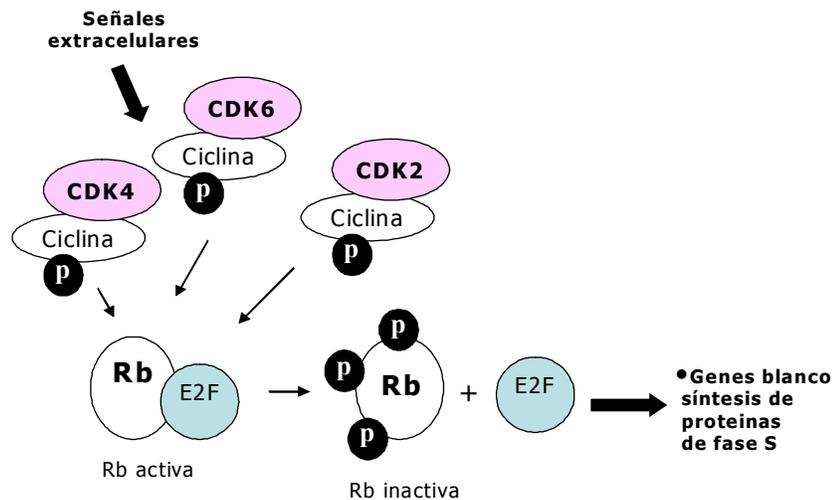


Fig.7. Relación entre la proteína Rb y el factor de transcripción E2F para la continuidad del ciclo celular.

El estado de fosforilación de la Rb es importante para la activación del E2F, la forma hipofosforilada de la Rb o forma activa (unida al E2F) actúa como un inhibidor de la proliferación celular. En las células que se encuentran en las fases G₀ y en G₁ temprana, la Rb se encuentra activa. A la mitad de G₁, la Rb es fosforilada por los complejos ciclina-CDK y gradualmente pasando a su forma inactiva, lo cual permite la transición de la fase G₁ a la fase S; al final de la fase M, la Rb es desfosforilada por proteínas fosfatasas PP1 y se mantiene así hasta ser nuevamente fosforilada al inicio del siguiente ciclo (Green, 1989; Goodrich *et al.* 1991; Hinds *et al.*, 1992) (Fig. 8).

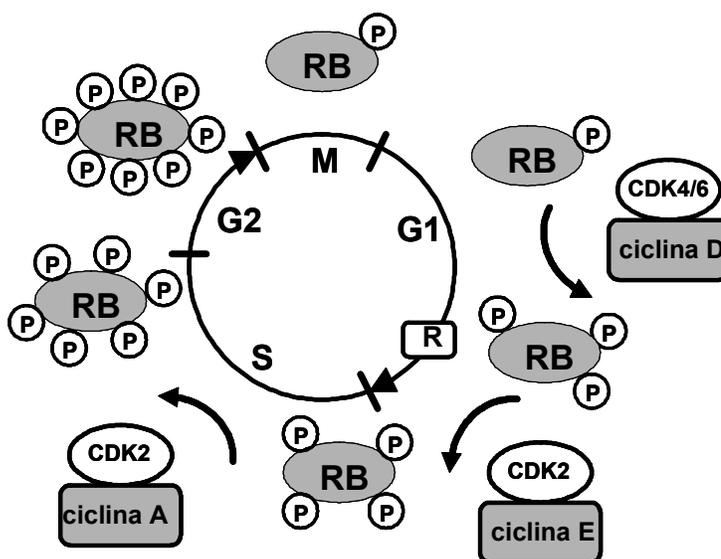


Fig.8 Estados de fosforilación de la proteína Rb durante las fases del ciclo celular.

2.4. La proteína p53.

La proteína p53, es un potente inhibidor del crecimiento celular de 53 kD; la función es altamente controlada durante el crecimiento celular normal por diferentes mecanismos moleculares, que involucran su regulación, su transcripción, su translación, su estabilidad, su localización y su actividad. La inducción de la función de la p53 se da en respuesta a muchas formas de estrés por mecanismos post-transcripcionales que permiten su estabilización y activación (Ryan *et al*, 2001).

El mecanismo de acción de la p53 es complejo ya que se le conocen por lo menos dos funciones; por una parte, es un factor de la transcripción y por otra, puede interrumpir el ciclo celular en la fase G₁ si el ADN se encuentra dañado. Las células que carecen de la p53, la tienen dañada, o inactiva no se detienen en la fase G₁ y prosiguen el ciclo sin haber reparado las lesiones genómicas; de este modo la p53 actúa como factor de transcripción para moléculas que funcionan como inhibidores de la proliferación, como la proteína p21. Sin embargo, si los daños al ADN son muy graves, la p53 es capaz de inducir la señalización para que el daño no prosiga e induce apoptosis. Por todo lo anterior, se le considera una proteína supresora de tumores capaz de interrumpir la proliferación celular gracias a las interacciones específicas que tiene con genes que controlan el ciclo celular y la apoptosis (Hemerking y Eick, 1994; Izquierdo, 1995; Vousden, 2000). La p53 es regulada por la proteína MDM2, la cual inhibe su transcripción y la transporta del núcleo al citoplasma para su ubiquitinación y degradación en el proteosoma. Cuando la actividad de la p53 aumenta se induce la expresión de la MDM2 y la pérdida de este regulador es letal para la célula (Ryan *et al*, 2001; Vousden, 2000) (Fig. 9).

2.5. La proteína p21.

La proteína p21 de 21 kD, también llamada Cip 1 o Waf1, pertenece a la familia de los CDKI y tiene un importante papel para inducir una interrupción del ciclo celular cuando se produce daño en el ADN, previo a la fase S e inhibe la formación de los complejos ciclinas-CDKs. De esta forma si el ADN se daña antes de la fase S, un incremento en la expresión de la p21 bloquea la progresión del ciclo y, al igual que la proteína p27 (otro miembro de la familia de los CDKI, impide la fosforilación de la proteína Rb por los complejos ciclina-CDK (Donjerkovic y Scout, 2000)(Fig. 9).

La expresión de la p21 está regulada por la activación de la p53; sin embargo, su producción puede ser independiente de ella (El-Deiry, 1993; Donjerkovic y Scout, 2000). Estudios recientes han mostrado que además de ser un inhibidor, la p21 también actúa como una proteína estructural del complejo ciclina D-CDK4/CDK6 (Cheng, 1999) y puede inhibir directamente la duplicación del ADN interactuando con el PCNA e inhibiendo la actividad de la ADN- polimerasa δ (Waga, 1994). Además, la proteína p27 (otro CDKI), puede estar involucrada en el control del punto de restricción, pues se expresa en células quiescentes cuando comienza la proliferación, y existe una relación entre el aumento de la expresión de la p27 con la detención del ciclo celular de la fase G₁ y la salida a G₀.

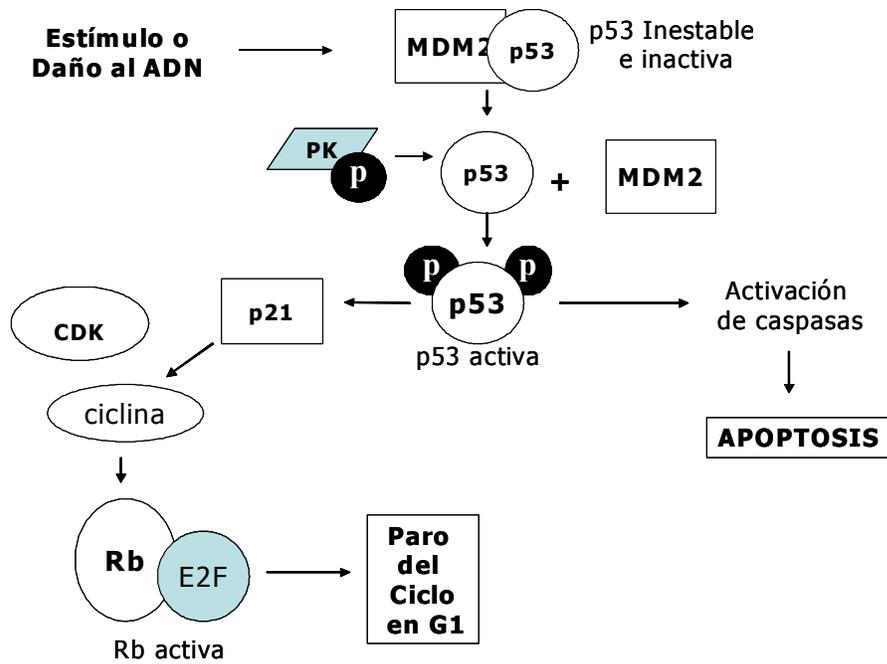


Fig.9. Mecanismo de acción de las proteínas p53 y p21, mostrando su relación con la proteína Rb.

2.6 La DHEA y el Ciclo Celular.

Existen estudios en diferentes modelos experimentales donde se relaciona la administración de la DHEA con el ciclo celular y se ha encontrado que la DHEA actúa como un anticancerígeno (Rao *et al.* 1999; Rais *et al.* 1999), al detener tempranamente el ciclo celular y evitar la proliferación de las células cancerosas. Además, se ha encontrado que la DHEA disminuye la proliferación de preadipocitos estimulando su diferenciación (McIntosh *et al.*, 1999); y que la DHEA regula el ciclo celular al disminuir la proliferación de las células tumorales de colon y reducir su crecimiento e inmortalización (Schultz *et al.*, 1992). Disminuye la expresión de las proteínas p53 y p34^{cdc2}, y junto con el ácido mevalónico, detiene el ciclo celular en la fase G1. Yao y col. (2001) mencionan que la DHEA tiene un efecto antitumoral al bloquear el cambio de fase G1 a S por vía Ca⁺⁺-DG(diacil glicerol)-PCK (proteína cinasa C). La DHEA favorece la apoptosis en la atrofia del timo (Wang *et al.*, 1997). Se han hecho múltiples estudios con este andrógeno para el tratamiento de varios tipos de cáncer y otras patologías, donde la proliferación celular es un factor importante en el desarrollo de las mismas (Shealy, 1995; Schwartz *et al.*, 1988; Ebeling y Koivisto, 1994; Oner *et al.*, 1998; Kroboth *et al.*, 1999; Rais *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2003).

III. El Endotelio

3.1. Características

Las células endoteliales (CEs) forman una capa continua de células poliédricas que recubre la superficie luminal de los vasos sanguíneos (arteriales y venosos), vasos linfáticos, cavidades cardíacas, cuerpos cavernosos y la cámara anterior del ojo. Las CEs se orientan en sentido del flujo sanguíneo y es, la estructura del organismo, que hasta hace veinte años se consideraba un recubrimiento pasivo que sólo permitía el paso de moléculas al interior de los tejidos vecinos. En las últimas dos décadas se han estudiado las CEs de humanos en cordón umbilical, vellosidades sinoviales, prepucio, placenta, y tejido adiposo de mama y de abdomen, en donde se ha observado que tienen una gran actividad en procesos de embriogénesis, histogénesis, organogénesis, cicatrización, angiogénesis, tumogénesis y metástasis (Michiels, 2003).

El recubrimiento endotelial tiene funciones vasoconstrictoras y vasodilatadoras, procoagulantes y anticoagulantes, pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, regula la angiogénesis y participa activamente en la respuesta inflamatoria e inmune (Pober, 1988). El endotelio interviene en todos los procesos fisiológicos y patológicos del organismo, sintetiza una gran cantidad de moléculas como neurotransmisores, citocinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y receptores de membrana. Controla el intercambio de metabolitos entre el torrente sanguíneo y los tejidos, y participa en ciertas respuestas biológicas que se presentan en una gran cantidad de padecimientos (Michiels, 2003). Debido a ello, constituyen un excelente modelo *in vitro* para estudiar la respuesta celular frente al efecto de factores

externos que participan en la regulación negativa y positiva en el desarrollo de varias enfermedades.

3.2. La DHEA y Endotelio.

Poco se sabe sobre el efecto que tiene la DHEA sobre células endoteliales, estudios recientes se enfocan en las diferentes funciones que éstas tienen en la homeostasis vascular. Se ha encontrado que la DHEA puede tener un efecto en el endotelio como un antioxidante y como un antiarteriosclerótico. Mohan y Benghuzzi (1997) demostraron que la administración de la DHEA tiene un efecto antiproliferativo en células endoteliales disminuyendo la proliferación en un 50 %. Contrario a esto, Williams y col. (2004) recientemente encontraron que la DHEA incrementa la proliferación en dos diferentes líneas celulares de endotelio, mencionando que su acción es independiente de receptores a andrógenos y estrógenos.

J u s t i f i c a c i ó n

Las enfermedades cardiovasculares en la población mexicana tienen el segundo lugar en el índice de mortalidad, por lo que es importante que se realicen investigaciones que permitan generar tratamientos contra éstas. Estudios previos han demostrado que la DHEA tiene un efecto protector en el desarrollo de varias enfermedades, entre ellas la arterioesclerosis.

Se postula que la protección que se le atribuye a la DHEA sobre la arterioesclerosis, puede deberse a una disminución en la proliferación de las células endoteliales, las cuales sufren disfunción durante el desarrollo de la placa ateromatosa. Existe mucha controversia en las dosis de la DHEA empleadas en humanos con fines terapéuticos y preventivos, así como en su mecanismo de acción. Por lo que en este trabajo, se estudió el efecto de diferentes dosis de la DHEA en la proliferación, el ciclo celular y la muerte de las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs), con la finalidad de determinar alguno de sus posibles mecanismos en la protección contra la arteriosclerosis.

Hipótesis

Si la DHEA es capaz de inhibir la proliferación de un cultivo primario de las células endoteliales, entonces posiblemente se observará la detención de su ciclo celular, ocasionado por aumento en la expresión de las proteínas p53 y p21, una modificación en la fosforilación de la proteína Rb y apoptosis.

Objetivo General

Determinar si el efecto antiproliferativo de la DHEA sobre cultivos primarios de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) está asociado a la modificación en la expresión de las proteínas que regulan el ciclo celular, como las proteínas p53 y p21, a el estado de fosforilación de la proteína Rb y a la apoptosis.

Objetivos Particulares

1. Determinar la concentración de la DHEA para inhibir en un 50% la proliferación celular y su reversibilidad.
2. Evaluar si dos de los derivados de la DHEA como la testosterona y el estradiol tienen el mismo efecto sobre la proliferación.
3. Determinar si la DHEA es capaz de inhibir la síntesis del ADN, alterando la proporción de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular.
4. Evaluar si la DHEA modifica el estado de fosforilación de la proteína Rb.
5. Cuantificar la expresión del ARNm de las proteínas p53 y p21 basal y tratadas con la DHEA.
6. Determinar si el efecto de la DHEA se asocia a muerte celular apoptótica.

Material y Métodos

Las células endoteliales tienen importancia en la fisiología y patología de la red vascular. Una forma de obtenerlas de manera accesible es de la vena de cordones umbilicales humanos (HUVECs) en donde su función termina al momento del nacimiento. El uso de las HUVECs como un modelo experimental proporciona varias ventajas como: **a)** la semejanza funcional con las células endoteliales de adultos, **b)** son de un tejido que termina su función en el momento del nacimiento, por lo que se pueden obtener fácilmente, **c)** se pueden manejar y subcultivar para obtener una alta cantidad de células, **d)** no presentan procesos de arterioesclerosis por tanto es un modelo muy cercano al fisiológico normal, permitiendo observar los efectos de diversas sustancias.

1. Obtención y caracterización de las HUVECs.

Las células endoteliales se obtuvieron de cordones umbilicales humanos de partos eutócicos o cesáreas de sujetos sanos por el método de Gimbrone y col. (1974). Los cordones fueron proporcionados por el departamento de ginecostetricia del Hospital General de Zona de Troncoso del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), se colectaron en solución salina con Hepes (NaCl, 150 mM; KCl, 4mM; Hepes, 10mM; glucosa, 20 mM). La vena umbilical fue profundida con colagenasa tipo II (Gibco) al 0.02% (p/v) en solución de Hepes durante 20 min a 37°C y la colagenasa fue neutralizada con 500µl de suero fetal de bovino (SFB) (Sigma). Las células se recuperaron por centrifugación a 1200 rpm por 3 min y el botón celular fue sembrado de acuerdo con las condiciones de cultivo celular.

Las células endoteliales se caracterizaron con base en su morfología típica, la cual asemeja a un conjunto de adoquines cuando las células están confluentes y por su capacidad de producir el factor Von Willebrand, el cual fue detectado por inmunocitoquímica. Se sembraron 10×10^3 células en un cubreobjetos en presencia de Medio 199 durante 24 h. Las células ya adheridas al cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído (Sigma) al 4% (p/v) en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (Na_2HPO_4 , 0.015M; $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$, 0.015M; NaCl, 0.15M, pH 7.4) durante 10 min, después de los cuales se lavaron con PBS. Las preparaciones se lavaron con una solución bloqueadora de albúmina sérica bovina, BSA (Sigma) al 0.1% (p/v) en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Después se hizo una primera incubación durante 45 min con el anticuerpo anti-von Willebrand humano desarrollado en conejo, fracción IgG (Sigma) en dilución 1:100 BSA 0.1% (p/v) en PBS. Posteriormente las preparaciones se lavaron con PBS y se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado con rodamina (Sigma) en una dilución 1:200 BSA en PBS 0.1 % (p/v) para revelar la presencia del anticuerpo primario, incubando durante 45 min. Posteriormente las preparaciones se lavaron con PBS y se observaron en el microscopio de fluorescencia con filtro para rodamina, haciendo 4 conteos de 100 células en 3 campos diferentes.

2. Condiciones del Cultivo Celular.

Las células se mantuvieron en medio de cultivo M199 (Gibco) suplementado con glutamina al 1% (p/v), 30 µg/ml de factor de crecimiento endotelial, 5 U/ml de heparina, antibiótico al 1% (penicilina sódica 100 U/ml, estreptomina 0.1mg/l, anfotericina B 2.5 µg/ml) y SFB al 15% (v/v). Los cultivos permanecieron en incubación a 37°C, con una humedad relativa del 95% y una atmósfera de CO₂ al 7% hasta que llegaron a confluencia. La propagación celular se realizó cuando las células se encontraron confluentes: Se despegaron con una solución de tripsina al 0.5% (P/V)-EDTA (1mM) a 37°C, durante 2-3 min a temperatura ambiente. Las células se recuperaron al centrifugarse a 1200 rpm durante 3 min y el botón celular se resembró en 1-2 botellas de 75 cm² con medio M199. Para los ensayos se utilizaron células entre el 2º y 4º pase.

3. Sincronización Celular

Para la obtención de células en el mismo estadio del ciclo celular se procedió a sincronizarlas, es decir que la mayor parte de las células estuvieran en la misma fase del ciclo celular. Las células se mantuvieron en 100% de confluencia durante 48 h sin cambio de medio. Después se despegaron con tripsina y se resembraron con medio fresco.

4. Proliferación Celular (cristal violeta)

Para determinar la concentración de la DHEA (Sigma) que inhibe la proliferación de las HUVECs, se empleó la técnica de incorporación del colorante cristal violeta a los núcleos celulares. Esta técnica consistió en sembrar 1×10^3 células/pozo en placas de 96 pozos, las cuales se trataron con diferentes concentraciones de la DHEA y de la DHEA-S (Sigma) (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM), usando como vehículo etanol, durante 72 h. Posteriormente las células se fijaron durante 10 min con glutaraldehído (Sigma) al 1.1% (p/v), se lavaron con agua desionizada y bidestilada y se secaron al aire; se añadieron 50 μl /pozo del colorante cristal violeta al 0.1% (p/v) en solución amortiguadora de ácido fórmico pH 6.0 y se mantuvieron durante 10 min en agitación constante. Después de la tinción se realizó un lavado exhaustivo con agua para retirar el colorante no asimilado y se dejó secar a temperatura ambiente. Para desteñir a las células se añadieron 50 μl /pozo de ácido acético al 10% (v/v) durante 20 min a temperatura ambiente. La incorporación del cristal violeta por los núcleos celulares se midió mediante la determinación de la absorbancia en un lector de placas para ELISA (Bio-Tek Instruments) a una longitud de onda de 595 nm. Los resultados obtenidos se graficaron como porcentaje de proliferación con respecto al control (células sólo con el vehículo).

5. La síntesis del ADN (incorporación de la timidina tritiada).

Para evaluar la síntesis del ADN, se utilizó la técnica de incorporación de timidina tritiada (New England Nuclear) donde, la timidina lleva una marca radiactiva de tritio (86.50 Ci/mmol). La timidina se incorpora cuando ocurre la síntesis de ADN y permite estimar la cantidad del ADN que se está sintetizando en un momento dado. Se sembraron 5×10^4 células/pozo en placa de 24 pozos, con 1 ml de medio de cultivo y se trataron con diferentes concentraciones de la DHEA y la DHEA-S (1, 10 y 100 μM) durante 24 h. Seis horas antes de este tiempo se adicionó 0.1 $\mu\text{Ci/ml}$ de timidina tritiada a cada pozo. Al cumplirse las 24 h de cultivo, el medio de cultivo se retiró y las células se lavaron con PBS, se fijaron con una solución de metanol al 95% (v/v) en PBS durante 10 minutos, se lavaron 3 veces con PBS para eliminar los residuos de timidina tritiada que no fue incorporada. Para lisar a las células se agregó a cada pozo 500 μl de NaOH 200 mM, el lisado se resuspendió y se transfirió a viales con 3 ml de líquido de centelleo (Beckman). La radioactividad fue leída como cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo líquido (Packard, 2200 CA).

6. Proliferación con los derivados de la DHEA

Para determinar si el efecto de la DHEA no era debido a su biotransformación a un derivado posterior, se realizaron experimentos de proliferación en presencia de diferentes concentraciones de la testosterona y del estradiol. Se sembraron 3×10^3 células/pozo en placas de 96 pozos y se cultivaron en presencia de 0.1, 1, 10 y 100 μM de la testosterona y de 0.001, 0.01, 0.1 y 1 μM del estradiol. La proliferación se evaluó por la técnica de cristal violeta. Todos los experimentos de proliferación se realizaron por quintuplicado y 3 repeticiones de manera independiente.

7. Viabilidad Celular.

Para determinar la viabilidad celular se utilizó la prueba de exclusión al azul tripano, para el cual se sembraron 2×10^5 células/pozo en placas de 6 pozos y se trataron con $100 \mu\text{M}$ de la DHEA por 24, 48 y 72 h. Como control negativo se usaron células con vehículo. Después de cada tiempo de incubación las células se despegaron con una solución de tripsina 0.5% (P/V)-EDTA (1mM) durante 2-3 min a temperatura ambiente, se centrifugaron y se tiñeron con una solución 1:10 de azul tripano al 0.4 % (p/v) (Sigma), se observaron al microscopio y se contaron las células teñidas (muertas) y las células sin teñir (vivas) en cuatro campos diferentes y se calculó el porcentaje de viabilidad con la siguiente formula:

$$\% \text{ de viabilidad} = [(\text{No. células Muertas} / \text{No. células vivas}) \times 100]$$

8. Reversibilidad.

Para determinar si el efecto de la DHEA es reversible, se hizo un experimento donde se sembraron 3×10^3 células/pozo en placas de 96 pozos, se estimularon con $100 \mu\text{M}$ de la DHEA y se incubaron por 3, 6, 24 y 72 h. Al final de cada tiempo se retiró el medio y se añadió medio nuevo sin la DHEA. La proliferación se evaluó a las 72 h por la técnica del cristal violeta.

9. Fases del ciclo celular (citometría de flujo).

Para determinar la proporción de células presentes en cada fase del ciclo celular, se utilizaron células endoteliales sincrónicas, y se evaluó el porcentaje de células para cada fase del ciclo celular. Se sembraron 5×10^5 células/pozo en placas de 6 pozos con 2 ml de medio, se cultivaron con $100 \mu\text{M}$ de la DHEA durante 30 h. Después de este tiempo las células se despegaron con solución de tripsina 0.5% (P/V)–EDTA (1mM), durante 2-3 min a temperatura ambiente preparada en solución amortiguadora de citratos (citrato de sodio 3.4 mM, pH 7, tritón X-100 0.1% (v/v), espermina 0.5 mg/ml y Tris 0.5 mM, pH 7). Después se incubó a temperatura ambiente por 10 min mezclando ocasionalmente. Se adicionó 750 μl de una solución conteniendo un inhibidor de proteasas y RNAasa (Sigma) (50 $\mu\text{g/ml}$), se incubó en hielo por 10 min, Los núcleos fueron teñidos con 750 μl de Ioduro de propidio (4 $\mu\text{g/ml}$) por 2 min e inmediatamente se hizo el análisis del ADN nuclear en un citómetro de flujo con el programa Modiff (Becton Dickinson Facscalibur).

10. Fosforilación de la proteína Rb (Western blot).

El análisis del estado de fosforilación de la proteína Rb se determinó por Westernblot. Se sembraron 1.5×10^6 células sincrónicas en cajas de Petri y se les agregaron $100 \mu\text{M}$ de la DHEA, se incubaron posteriormente por 30 h, se lavaron con solución de TBS (Tris, NaCl y KCl pH 8) y se lisaron con $350 \mu\text{l}$ por caja con solución de lisis (Tris pH7, NaCl, NP-40, NaF, vanadato de sodio e inhibidores de proteasas: Leupeptina (10 mg/ml), Aprotinina (10 mg/ml), PMSF (fenilmetil sulfonilfluoruro, 1.74 mg/ml en isopropanol) durante 20 min a 4°C . El lisado se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min y la proteína total se cuantificó por el método de Bradford (Bio-Rad). Posteriormente $150 \mu\text{g}$ de proteína total fue separada por electroforesis en un gel de acrilamida al 7.5 % (p/v), el cual se transfirió a una membrana de nitrocelulos. La membrana fue bloqueada con una solución de TBS-Tween (0.1%) con 5% de leche descremada, con la finalidad de evitar interacciones inespecíficas de los anticuerpos con la membrana. Posteriormente fue incubada con el anticuerpo anti-Rb (sc-102, Santa Cruz, Biotechnology), en una dilución de 1:500. El segundo anticuerpo fue anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (31430, Pierce) en una dilución 1:5000, el cual fue revelado usando un estuche comercial Supersignal, Pierce. Las bandas obtenidas fueron analizadas en un densitómetro Ultrosan XL(LKB), utilizando el programa GelScanXL 2.1 (Pharmacia).

11. Expresión de las proteínas p53 y p21 (RT-PCR).

La expresión de los ARNm que codifican para las proteínas p53 y p21 fue realizada por la técnica de transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se sembraron en cajas de Petri 5×10^5 células sincrónicas, se incubaron con $100 \mu\text{M}$ de la DHEA y se mantuvieron en cultivo por 30 h. Posteriormente sin despegar a las células se obtuvo el ARN total lisando a las células con $500 \mu\text{l}$ de Trizol (Gibco) por caja. Las células se colectaron en un tubo de 1.5 ml, se agregaron $100 \mu\text{l}$ de cloroformo y se mezcló vigorosamente durante 15 seg, dejando reposar 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 rpm por 20 min a 4°C . La fase acuosa fue colectada en otro tubo y se le adicionaron $250 \mu\text{l}$ de isopropanol para precipitar el ARN total. La suspensión se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min a 4°C . El sobrenadante se removió y el botón del ARN se lavó con $500 \mu\text{l}$ de etanol al 75% (v/v) en agua tratada con DEPC 0.1%(v/v) (dietilpirocarbonato; inhibidor de las ARNasas) y se centrifugó a 7500 rpm por 5 min a 4°C ; el sobrenadante se retiró y el botón fue resuspendido en $22 \mu\text{l}$ de agua-DEPC.

Para la reacción de RT se utilizó 1 µg de ARN al cual se le adicionó 1 µl de oligo DT, 4 µl de Buffer (5x) y 10 µl de agua-DEPC, la mezcla se incubó a 70° C por 10 min seguido por un minuto a 4° C, después se le agregó 2 µl 0.1 M de ditioneitol (DTT), 1 µl de una mezcla de desoxinucleótidos (dNTP) y 1 µl de Transcriptasa Reversa 200 U/ml (Gibco). La mezcla se incubó a 42° C por 50 min y posteriormente a 70° C por 15 min. El cDNA resultante fue amplificado por PCR. Los oligonucleótidos utilizados para la proteína **p21** fueron: sentido 5' ACCCTCTCATGCTCCAGGT 3', antisentido 5'CCTTGTTCCGCTGCTAATCA3' y para la proteína **p53**: sentido 5'ACATCTGGCCTTGAAACC3', antisentido 5' TGACCCAGAGCGAAACAA 3'. Como control de normalización se utilizó el gen constitutivo de la ciclofilina y los oligonucleótidos fueron: sentido 5' CCCCACCGTGTCTTCGACAT 3', antisentido 5' TCCAGGAATGGCAAGACCAG 3'. Las condiciones del PCR fueron las mismas para las tres moléculas. La desnaturalización se realizó a 95° durante 45 s, el alineamiento a 54° C por 45 s y la elongación a 72° C por 1 min. La amplificación se realizó durante 30 ciclos utilizando 0.5 µl de Ampli Taq DNA polimerasa. Los productos del PCR fueron de 570 pb para la ciclofilina, 351 para la p53 y 335 pb para la p21, los cuales fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (p/v), teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador. Las bandas obtenidas fueron analizadas con un densitómetro Ultrosan XL(LKB), utilizando el programa GelScanXL 2.1 (Pharmacia).

12. Muerte Celular (citometría de flujo y Western blot).

Para determinar si la DHEA lleva a las HUVECs a un proceso de apoptosis se hicieron dos diferentes pruebas; una para procesos apoptóticos tempranos por determinación de la exposición de la fosfatidilserina (FS) en la membrana extracelular, usando la Anexina-V marcada con fluoresceína, y otra para procesos apoptóticos tardíos evaluando el rompimiento de la proteína poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) mediante la activación de la caspasa-3. Para la primera prueba se sembraron 5×10^5 células/pozo en placas de 6 pozos con 2 ml de medio de cultivo, se incubaron con $100 \mu\text{M}$ de la DHEA por 30 h. Después se lavaron con PBS y se despegaron con tripsina 0.5% (P/V)-EDTA (1mM), las células se centrifugaron a 1200 rpm por 3 min, el botón se lavó nuevamente con PBS y posteriormente se procesaron las células de acuerdo con el protocolo del estuche comercial para Anexina-V-Fluoresceína (Roche), resuspendiendo el botón celular en 100 μl de solución de Anexina-V (20 μl de Anexina-V- Fluoresceína en 1 ml de HEPES (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl_2), la cual se completó con 20 μl de solución de Ioduro de Propidio (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Como control negativo se usó un cultivo sin la DHEA, y como control positivo, células expuestas con luz ultravioleta por 5 min para inducir la exposición de la FS en la membrana. Después de la incubación se analizaron 10×10^3 eventos celulares en un citómetro de flujo con el programa Modifit (Becton Dickinson Facscalibur).

Para la prueba del rompimiento de la proteína PARP se sembraron 5×10^5 células/pozo en placas de 6 pozos. Se utilizaron células sin DHEA como control negativo y tratadas con $100 \mu\text{M}$ de la DHEA durante 24, 48 y 72 h. Después se lavaron con PBS y se lisaron las células con buffer de lisis (62.5 mM Tris, pH 6.8, 6 M urea, 10% glicerol, 2% de SDS, 0.003% (p/v) de azul de bromofenol, 5% (v/v) 2-mercaptoetanol) para obtener la proteína total. Como control positivo se utilizaron células tratadas con luz U.V. por 10 min para inducir la activación de las caspasas que rompen a la proteína PARP, en este caso la proteína se obtuvo a las 12 h. Para el análisis por Western blot, 150 μg de proteína total se separaron en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 10%, la proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Hybond Amersham) de $0.22 \mu\text{M}$ durante 8 h a 22 V en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 20% metanol). Para eliminar la unión inespecífica de las proteínas, la membrana se incubó con una solución bloqueadora (5% leche descremada, 0.1% (p/v) de Tween 20 en PBS) durante 1 h, se lavó con PBS y se incubó toda la noche con el anticuerpo anti-PARP (IgG monoclonal anti-PARP, Inmunogen) en una dilución 1:10 000 en PBS, después de la incubación se lavó con PBS y se incubó con el segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón acoplado con peroxidasa, Sigma) en una dilución 1: 2500 por 30 min. La membrana se lavó con PBS y la PARP se detectó por quimioluminiscencia usando el estuche comercial para el sustrato de Supersignal, Pierce.

Análisis Estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con la prueba "t" de Student con una $p \leq 0.05$ de significancia.

R e s u l t a d o s

1. Caracterización Celular

Para determinar la pureza de los cultivos obtenidos, se evaluó el porcentaje de células endoteliales obtenidas, se realizó una prueba inmunohistoquímica y se detectó la presencia del factor Von Willebrand (glycoproteína, sintetizada por las células endoteliales; Lip y Blann, 1997). Los resultados mostraron que más del 99.9% de las células obtenidas resultaron positivas a la tinción, lo que indicó una alta pureza en los cultivos de células endoteliales de este trabajo.

2. Viabilidad y proliferación celular.

Con la finalidad de determinar si la DHEA era tóxica para las células, se evaluó la viabilidad por exclusión al azul tripano. Los resultados mostraron que la administración de la DHEA no resultó tóxica para las HUVECs en ninguna de las concentraciones utilizadas, debido a que se observó un 99.5% de viabilidad en comparación al 100% de las células sin la DHEA.

Para analizar el efecto de la administración de la DHEA de diferentes concentraciones sobre la proliferación de las HUVEC, éstas se cultivaron con concentraciones fisiológicas (0.001, 0.01, 0.1 μM) y suprafisiológicas (1, 10 y 100 μM) y la proliferación fue evaluada por tinción con cristal violeta y se comparó con las células control. Los resultados obtenidos mostraron un efecto antiproliferativo de manera dosis-dependiente con una inhibición del 50% a 100 μM , por lo que en todos los experimentos posteriores se utilizó a

una concentración de 100 μM . Este efecto antiproliferativo no se observó en células tratadas con la DHEA-S a las mismas concentraciones (**Fig. 1**).

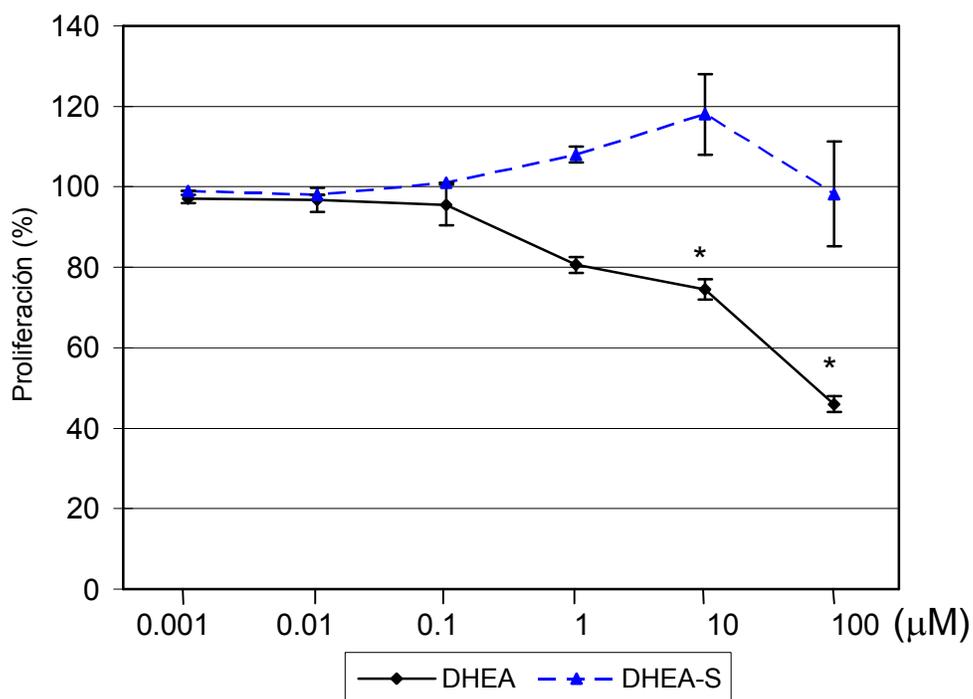


Fig. 1. Curva dosis-respuesta que muestra el porcentaje de proliferación de las HUVECs en presencia de concentraciones crecientes de la DHEA y de la DHEA-S. La evaluación se realizó por tinción nuclear con cristal violeta a las 72 h y se consideró al control como el 100% de proliferación (HUVECs sin DHEA y sin DHEA-S). La gráfica muestra los valores promedio con su desviación estandar y los asteriscos representan una diferencia estadísticamente significativa ($n = 5$; $p \leq 0.05$) con respecto al control.

3. Efecto de la DHEA en la síntesis del ADN.

Para determinar si el efecto inhibitorio de la DHEA ocasiona una disminución en la síntesis del ADN, las HUVECs se incubaron con diferentes concentraciones de la DHEA y la DHEAS, y la cantidad del ADN se determinó midiendo la incorporación de la timidina tritiada a las 24 h.

Los resultados obtenidos muestran que la DHEA inhibe la incorporación de timidina tritiada de manera dosis-dependiente, y se observó una disminución en la incorporación del 40% con la concentración de 100 μM . De la misma forma, que en el resultado anterior evaluado por cristal violeta, la forma sulfatada no presentó el mismo efecto que la molécula libre (**Fig.2**), por tal motivo ya no se utilizó en los experimentos subsecuentes.

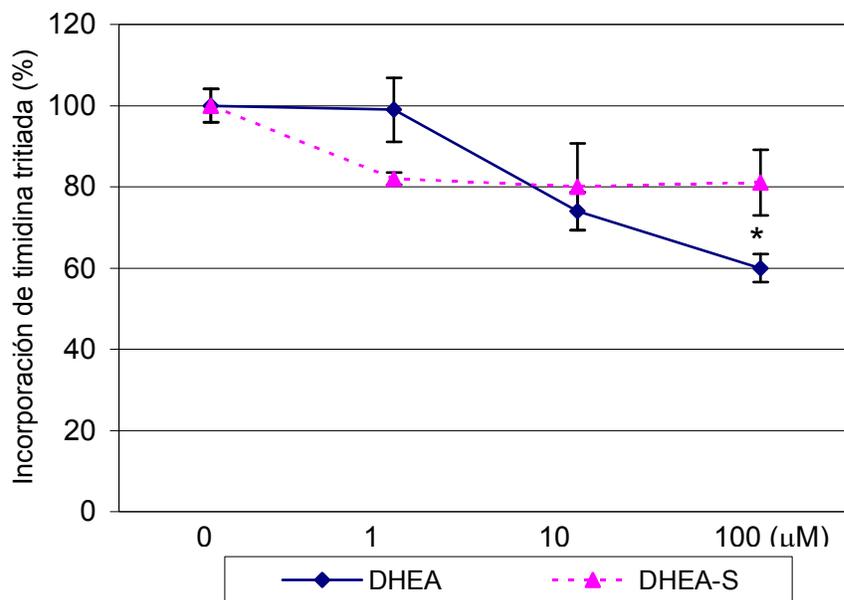


Fig.2. Curva dosis-respuesta que muestra el porcentaje de incorporación de timidina tritiada de las HUVECs en presencia de 1, 10 y 100 μM de la DHEA y de la DHEA-S. La evaluación se realizó por incorporación de timidina tritiada ($1\mu\text{Ci/ml}$) a las 24 h y se consideró al control como el 100% (HUVECs sin DHEA). Se muestran los valores promedio con su desviación estándar y el asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa ($n=5$; $p\leq 0.05$) con respecto al control.

4. Efecto de algunos derivados de la DHEA en la proliferación celular.

Debido a que la DHEA es considerada una pre-hormona que puede dar lugar a compuestos como la testosterona y el estradiol, se procedió a determinar si el efecto antiproliferativo de la DHEA es debido a la acción de esta molécula o a estos derivados. Por lo tanto, las HUVECs se trataron con dos concentraciones fisiológicas del estradiol (0.001 y 0.01 μM) y de la testosterona (0.1 y 1.0 μM) y con dos suprafisiológicas de cada una, 0.1, y 1 μM para el estradiol y 10 y 100 μM para la testosterona. La proliferación celular fue evaluada por tinción con cristal violeta a las 72h.

Los resultados obtenidos muestran que el estradiol a concentraciones fisiológicas induce la proliferación de las HUVECs hasta del 40%; sin embargo, la testosterona a concentraciones fisiológicas no tuvo ningún efecto inhibitorio significativo sobre la proliferación; lo mismo se observó en las concentraciones suprafisiológicas del estradiol, no obstante, la gráfica muestra un efecto inhibitorio con las dos concentraciones suprafisiológicas de la testosterona; sin embargo, en este caso se observó una baja viabilidad (<50%) de las HUVECs, en estas mismas concentraciones **(Fig. 3)**.

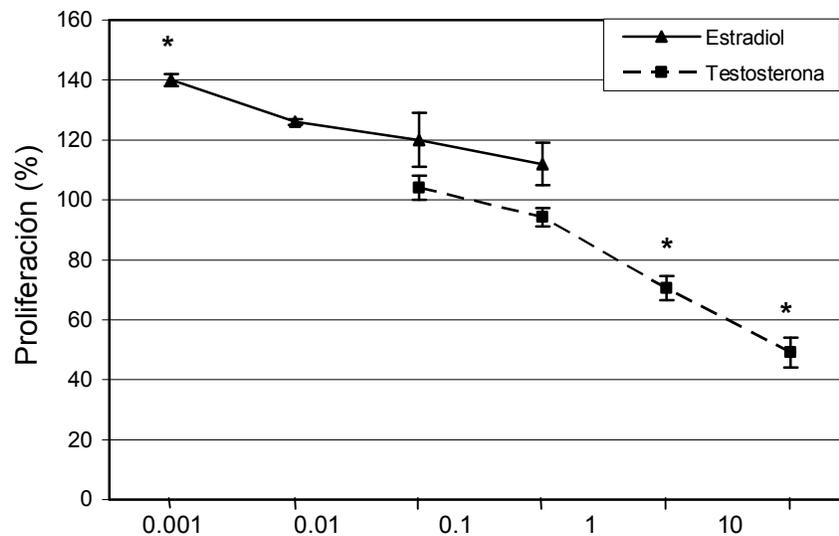


Fig. 3. Curva dosis-respuesta que muestra el porcentaje de proliferación de las HUVECs en presencia de 0.001, 0.01, 0.1, y 1 μM del estradiol y de 0.1, 1 10 y 100 μM de la testosterona. La evaluación se realizó por tinción nuclear con cristal violeta a las 72 h y se consideró al control como el 100% de proliferación (HUVECs sin testosterona y sin estradiol). Se muestran los valores promedio con su desviación estándar y los asteriscos representan una diferencia estadísticamente significativa ($n=5$; $p \leq 0.05$) con respecto al control.

5. Efecto de la DHEA con respecto al tiempo.

Una vez determinada la concentración de la DHEA en la cual se presenta un efecto antiproliferativo, se procedió a realizar un experimento para observar la duración del efecto de la DHEA en función del tiempo de exposición y saber si era tiempo-dependiente. Las HUVECs fueron incubadas durante 24, 48 y 72 h con 100 μ M de la DHEA, al término de cada tiempo la DHEA fue retirada y la proliferación evaluada. El porcentaje de proliferación se cuantificó por tinción con cristal violeta y el resultado se comparó con respecto a las células control para cada tiempo.

Los resultados obtenidos muestran que el efecto antiproliferativo de la DHEA en las HUVECs, no solamente se mantiene, sino que aumenta con respecto al tiempo de exposición a la DHEA. Se observó que el efecto de inhibición fue mayor con respecto al tiempo, ya que a las 24 h de exposición fue del 15%, a las 48 fue del 35 % y a las 72 h fue del 50% **(Fig.4)**.

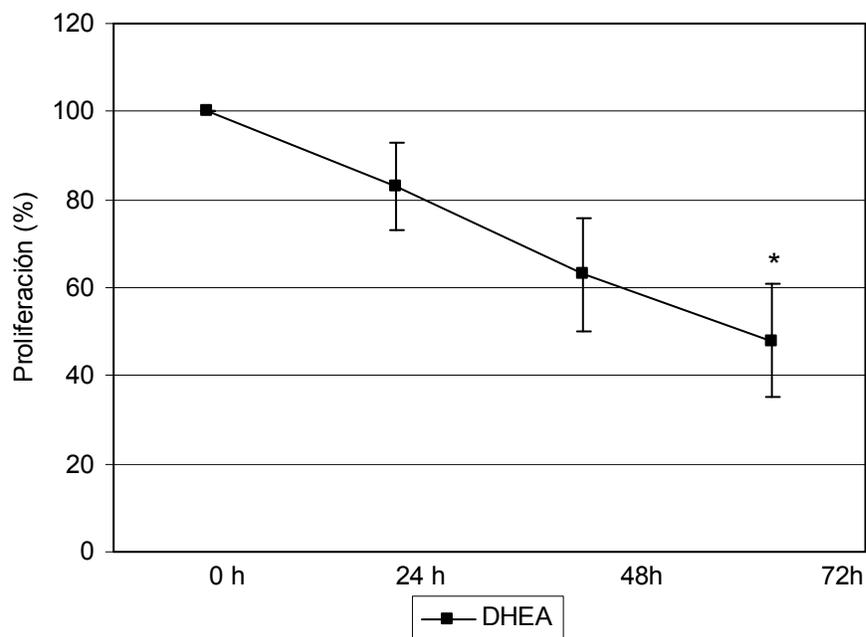


Fig. 4. Curva dosis-respuesta que muestra el porcentaje de proliferación de las HUVECs en presencia de 100 μM de la DHEA. La proliferación se evaluó por tinción nuclear con cristal violeta a las 24, 48 y 72 h, y se consideró al control como el 100% de proliferación (HUVECs sin DHEA). Se muestran los valores promedio con su desviación estándar y los asteriscos representan una diferencia estadísticamente significativa ($n=5$; $p \leq 0.05$) con respecto al control.

6. Reversibilidad.

Se ha observado que el efecto inhibitorio de algunas sustancias sobre la proliferación se pierde al momento de que éstas sustancias son retiradas; debido a esto y con la finalidad de observar si el efecto antiproliferativo de la DHEA se mantiene a lo largo del tiempo aún retirando a la DHEA, se realizó un ensayo de reversibilidad, donde las HUVECs se incubaron con 100 μM de la DHEA (tiempo cero) durante 3, 6, 24, 48 y 72 h después de los cuales la DHEA se retiró. La proliferación se evaluó a las 72 h en todos los casos por medio de tinción con cristal violeta y el resultado de las células tratadas se comparó con el de las células control para cada tiempo.

Los resultados obtenidos muestran que la DHEA a partir de las 24 h empieza a tener un efecto inhibitorio del 20% y éste se mantiene aún después de 48 h en ausencia de la DHEA. Este efecto se mantiene y va en aumento mientras las HUVECs permanecen por más tiempo expuestas con la DHEA, observando que las células no proliferan incluso después de haberla retirado. La inhibición de la proliferación llega hasta más del 40% a las 72 h de exposición (**Fig 5**).

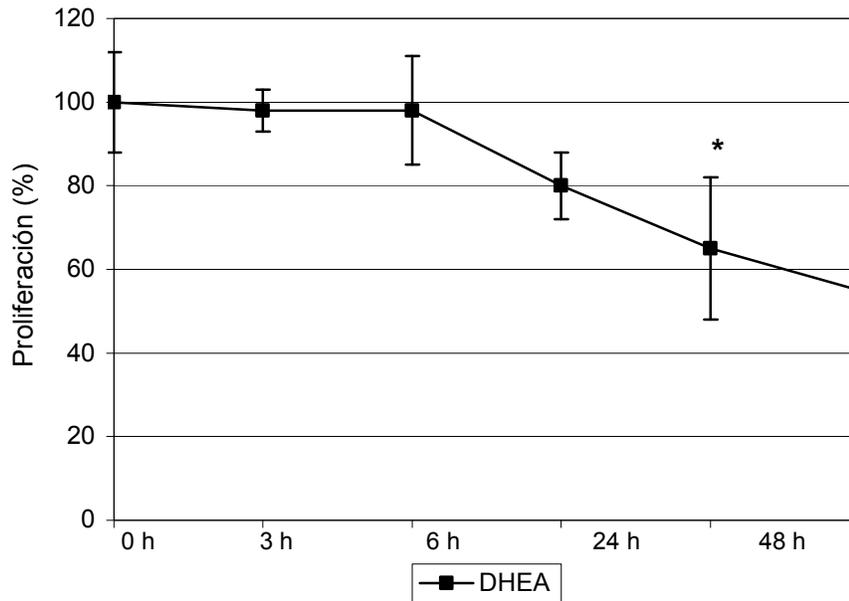


Fig.5. Efecto irreversible de la proliferación de las HUVECs con la DHEA. Las células se cultivaron en ausencia y en presencia de 100 μ M de la DHEA durante 3, 6, 24, 48 y 72 h, y se consideró al control como el 100% de proliferación (HUVECs sin la DHEA). Después de estos tiempos la DHEA se retiró y se adicionó medio de cultivo fresco, sin la DHEA. La proliferación celular se evaluó por cristal violeta a las 72 h en todas las condiciones. Se muestran los valores promedio con su desviación estándar y los asteriscos representan una diferencia estadísticamente significativa ($n=5$; $p\leq 0.05$) con respecto al control.

7. Efecto de la DHEA sobre la progresión del ciclo celular.

Los resultados previos demostraron que la DHEA inhibe la proliferación celular y la síntesis del ADN. Para determinar si estos efectos se asociaban con cambios en la progresión del ciclo celular de las HUVECs, se realizó un experimento donde las células se incubaron con 100 μM de la DHEA y 10 ng/ml del TNF- α (control positivo). La síntesis de ADN se evaluó por incorporación de timidina tritiada después de 30 h. Los resultados mostraron una disminución en la incorporación de timidina mayor al 50% tanto en las células tratadas con la DHEA, como en las células tratadas con el TNF- α , en comparación con las células control (**Tabla 1**).

Al mismo tiempo, para determinar el porcentaje de células en cada fase del ciclo, las HUVECs se incubaron con 100 μM de la DHEA y 10 ng/ml del TNF- α , después fueron evaluadas por citometría de flujo después de 30 h de incubación. Los resultados mostraron que el TNF- α provocó una detención del ciclo celular en la fase G₁, en comparación con el control. De la misma forma la DHEA indujo un aumento en el porcentaje de células que se encuentran en la fase G₁ de 88%, de manera similar a las células tratadas con el TNF- α (**Fig.6**).

Control	DHEA	TNF- α
100 %	36% \pm 7 *	40% \pm 4 *

Tabla 1. Síntesis del ADN de HUVECs sincrónicas con 100 μ M de la DHEA y 10 ng/ml del TNF- α . La evaluación se realizó por incorporación de timidina tritiada (1 μ Ci/ml) a las 30 h y se consideró al control como el 100% (HUVECs sin la DHEA). Se muestran los valores promedio con su desviación estándar y el asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa (n=5; p \leq 0.05) con respecto al control.

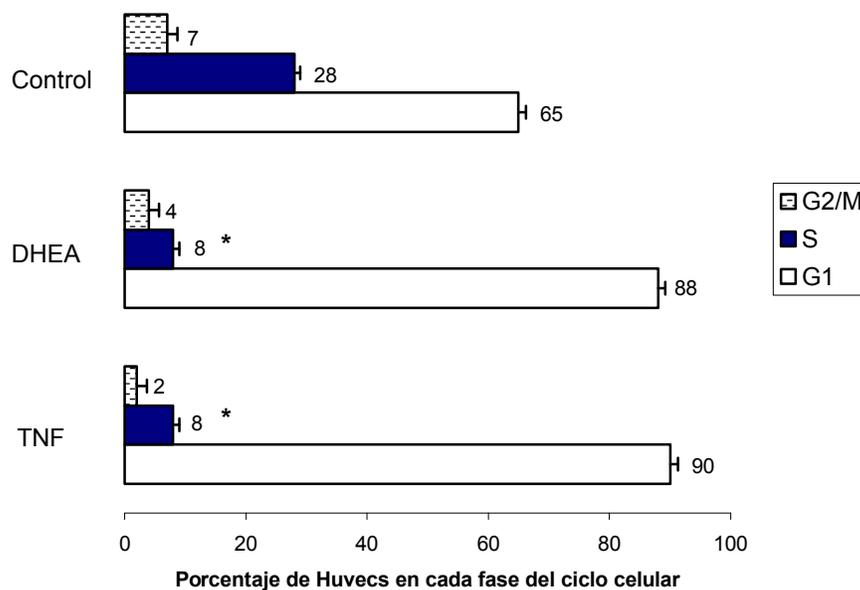


Fig 6. Cantidad del ADN en HUVECs con 100 μ M de la DHEA y 10 ng/ml de TNF- α . La evaluación se realizó por citometría de flujo, con tinción del ADN con Ioduro de Propidio a las 30 h. Se muestran los valores promedio en porcentaje de células presentes en cada fase del ciclo celular y el asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa (n=5; p \leq 0.05) con respecto al control.

8. Efecto de la DHEA en el estado de fosforilación de la proteína Rb.

El estado de fosforilación de la proteína pRb determina la progresión del ciclo celular, ya que cuando está hipofosforilada, se une fuertemente al factor de transcripción E2F, deteniendo el ciclo celular en G₁, pero cuando la Rb es fosforilada, se separa del E2F y las células progresan hacia la fase S. Por tal motivo, se determinó si la detención del ciclo celular en la fase G₁ inducida por la DHEA se debe a cambios en el estado de fosforilación de la proteína Rb. Por lo tanto, las HUVECs sincrónicas fueron incubadas con 100 μ M de la DHEA y con 10 ng/ml de TNF- α (control positivo) durante 30 h, al término de este tiempo la DHEA y el TNF- α fueron retirados y la proteína total fue extraída. La evaluación se realizó por Western blot, utilizando un anticuerpo contra la Rb, y se comparó con las células control.

Los resultados obtenidos por Western blot señalan que el estado de fosforilación de la proteína Rb en las células tratadas es diferente con respecto a las control. En las células que se encuentran en la fase G₀/G₁ (control 1), la Rb se encuentra fosforilada en un 25%. Cuando las células entran a la fase S (control 2), ésta aumenta hasta un 35 %; lo que no sucede en presencia de la DHEA, puesto que solo se observó el 19%. Resultados similares fueron observados con el TNF- α en donde se observa el 22% de la forma fosforilada. **(Fig.7).**

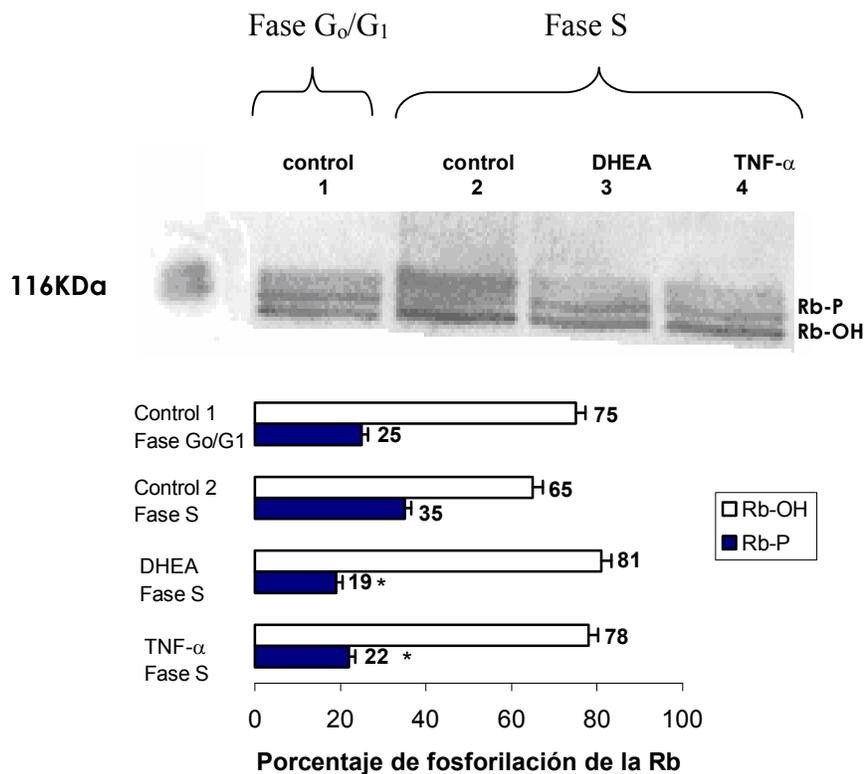


Fig 7. Efecto de la DHEA sobre el estado de fosforilación de la proteína Rb. Se utilizaron HUVECs sincrónicas tratadas con 100 μ M de la DHEA y 10 ng/ml del TNF- α . La proteína total se obtuvo al momento de la siembra (fase G₀/G₁, control 1) y a las 30 h cuando las células se encontraban en la fase S (S, control 2). La evaluación se realizó por Western blot y como marcador del peso molecular se utilizó β -galactosidasa. Carril 1: células en fase G₀/G₁; carriles 2, 3, y 4: células en la fase S sin tratamiento, con la DHEA y el TNF- α , respectivamente. El análisis densitométrico se muestra en la gráfica con los valores promedio y se consideró la suma de ambas formas de la Rb como el 100%. El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa (n=5; p \leq 0.05).

9. Efecto de la DHEA sobre las proteínas p53 y p21.

Además de la función que tiene la proteína Rb en la regulación del ciclo celular, existen otras proteínas como la p53 y la p21 que tienen un papel importante en la regulación de la continuidad del ciclo celular, por lo que se decidió determinar si la DHEA modifica la expresión de los ARN mensajeros, que codifican para estas proteínas por medio de la técnica de RT-PCR. Por tanto, las HUVECs sincrónicas fueron incubadas con 100 μ M de la DHEA y con 10 ng/ml de TNF- α (control positivo) durante 30 h, al término de este tiempo la DHEA y el TNF- α fueron retirados y se extrajo el ARN. La evaluación se realizó por medio de RT-PCR y se comparó con respecto al ARNm de las células control.

Los resultados mostraron que la DHEA induce cambios en la expresión del ARNm que codifican para las proteínas p53 y p21, mostrando aumento en su expresión 4 veces más para la proteína p53, (**Fig. 8**) y 3.3 veces más para la proteína p21, (**Fig. 9**), con respecto al control sin DHEA. Las células tratadas con el TNF- α , mostraron un aumento de 5.6 más en la expresión de la p53 y de 5.4 más para la p21.

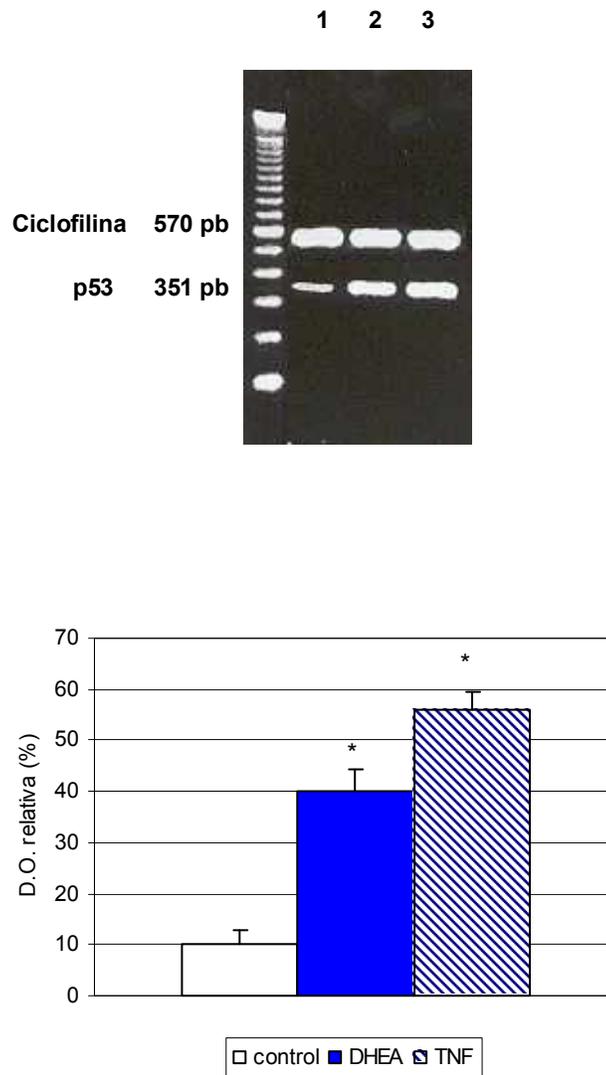


Fig 8. Expresión del ARNm de la proteína p53 en las HUVECs. Las HUVECs fueron incubadas, con 100 μ M de la DHEA (2) y con 10 ng/ml del TNF- α (3). La evaluación se realizó por RT-PCR a las 30 h, usando ciclofilina para la normalización. El fragmento obtenido para la ciclofilina fue de 570 pb y de 351 para la p53 y se compararon con la expresión basal de la p53 en el control (1, células sin la DHEA). La gráfica inferior muestra la densitometría de los valores promedio con su desviación estándar y los asteriscos representan una diferencia estadísticamente significativa (n = 5; p < 0.05) con respecto al control.

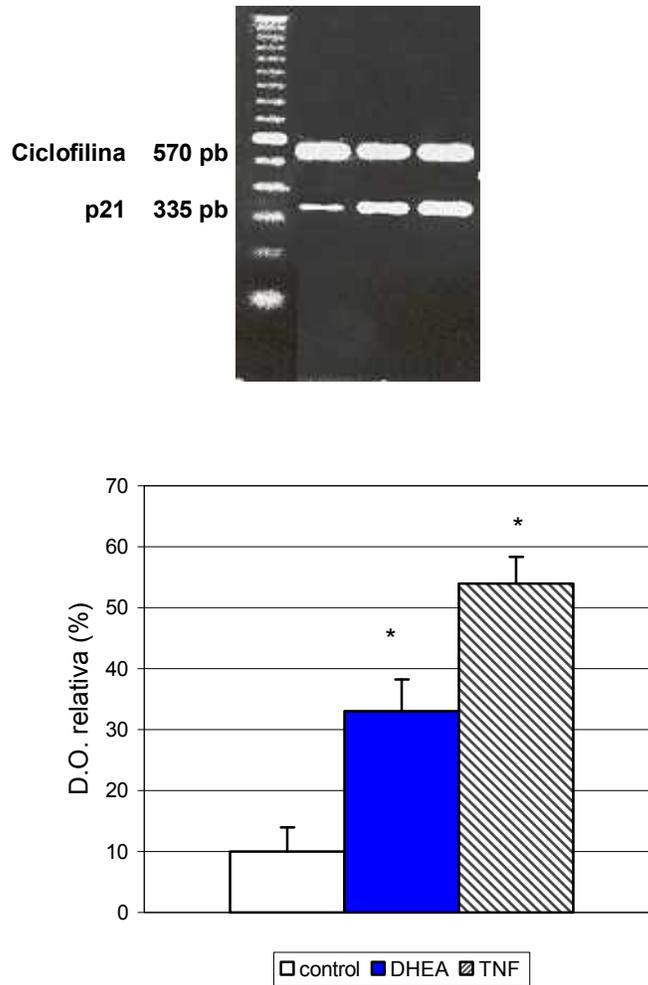


Fig 9. Expresión del ARNm de la proteína p21 en las HUVECs. Las HUVECs fueron incubadas, con 100 μ M de la DHEA (2) y con 10 ng de TNF- α (3). La evaluación se realizó por RT-PCR a las 30 h, usando ciclofilina para la normalización. El fragmento obtenido para la ciclofilina fue de 570 pb y de 335 para la p21 y se compararon con la expresión basal de la p21 en el control (1, células sin la DHEA). La gráfica inferior muestra la densitometría de los valores promedio con su desviación estándar y los asteriscos representan una diferencia estadísticamente significativa (n = 5; p \leq 0.05).

10. La DHEA y Apoptosis.

Con la finalidad de discernir si la DHEA detiene el ciclo celular o induce procesos de apoptosis, se determinó la exposición de la fosfatidilserina en la membrana citoplasmática por medio de la anexina-V marcada con fluoresceína. Por lo tanto, las HUVECs sincrónicas se incubaron con 100 μ M de la DHEA, y otras se expusieron por 10 min a luz U.V. (control positivo). Después de 30 h de incubación las células se evaluaron por citometría de flujo, y se compararon con respecto a las células control.

En el cuadro **A** se muestran las células tratadas con luz U.V. observando un 28% de células en apoptosis, en comparación con las células control (**B**) en donde se aprecia menos del 2% de células en apoptosis. En el cuadro (**C**) se muestra que la DHEA no indujo un aumento del porcentaje de células apoptóticas en comparación con las células control (**Fig.10**).

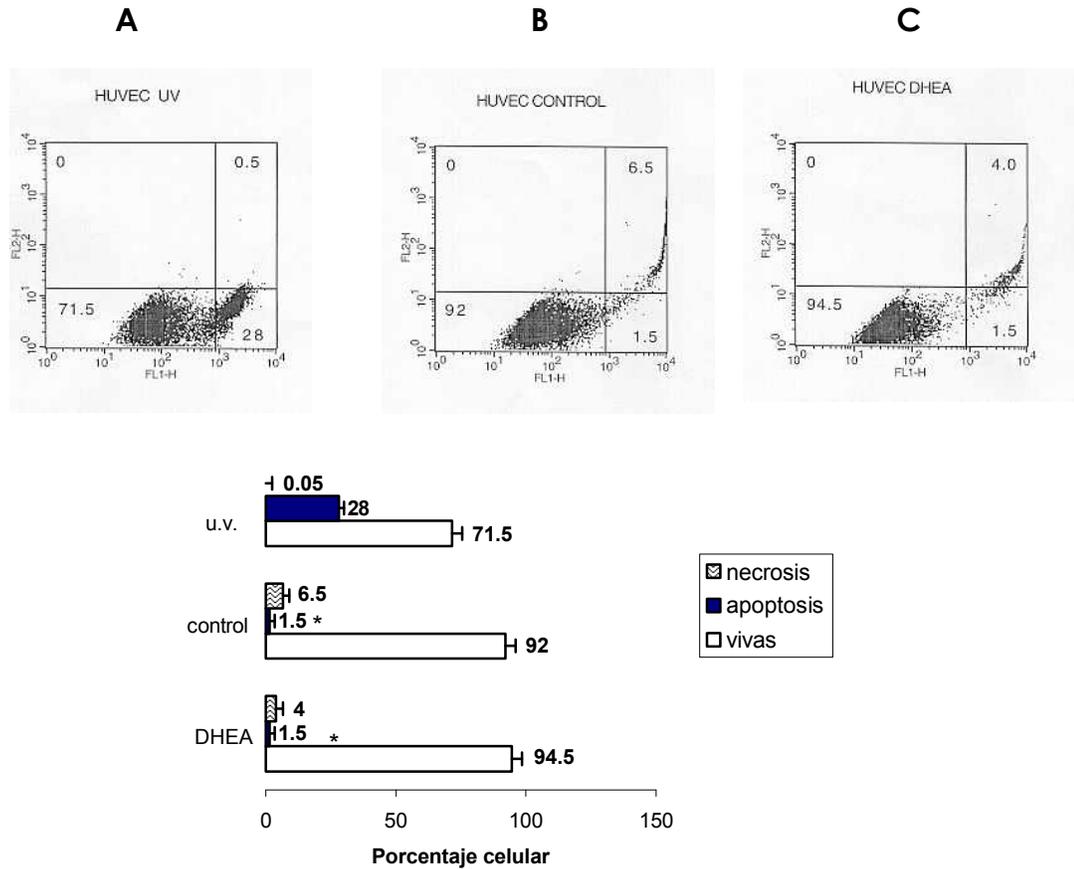


Fig. 10. Efecto de la DHEA sobre la exposición de fosfatidilserina. A) HUVECs expuestas a la luz U.V. (control positivo) durante 10 min, B) HUVECs sin tratamiento (control negativo) y C) HUVECs con 100 μ M de la DHEA. La evaluación se realizó por citometría de flujo, después de 30 h de cultivo. La citometría está representada en los cuadros superiores donde se observan cuatro cuadrantes internos; el de la derecha/abajo muestra las células positivas a la anexina-V (células en apoptosis); el de la izquierda/arriba muestra las células positivas a el ioduro de propidio (células en necrosis); de la derecha/arriba muestra a las células dobles-positivas (para anexina-V y para ioduro de propidio) y por último, el cuadrante a la izquierda/abajo muestra las células que resultaron negativas a ambas marcas (células vivas). La gráfica inferior muestra los valores promedio en porcentaje de células en cada condición con su desviación estándar y los asteriscos representan una diferencia estadísticamente significativa ($n = 5$; $p \leq 0.05$) con respecto al control positivo.

Por otro lado se determinó otro marcador de apoptosis a través de la activación de la caspasa-3, la cual rompe a la proteína PARP. Por lo tanto, las HUVECs sincrónicas se incubaron con 100 μM de la DHEA, y otras se expusieron por 10 min a luz U.V. (control positivo), después de 24, 48 y 72 h de incubación, se extrajo la proteína total. La evaluación se realizó por Western blot utilizando un anticuerpo contra la proteína PARP, con extracto de proteínas obtenidas después de cada tiempo y se comparó con las células control (sin la DHEA).

Los resultados del Western blot muestran que en las HUVECs que fueron tratadas con luz U.V., la proteína PARP se fragmentó, lo que no se observó en las células control y en las HUVECs con la DHEA, incluso después de 72 h de tratamiento (**Fig. 11**).

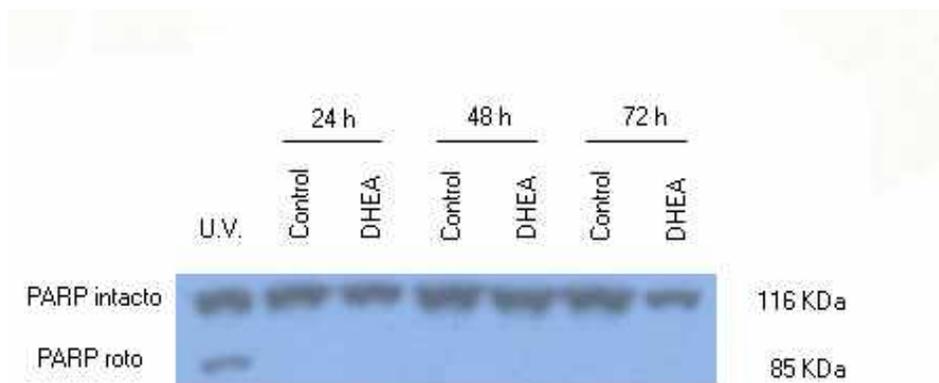


Fig. 11. Efecto de la DHEA sobre la activación de la caspasa 3. Las HUVECs se incubaron con 100 μM de la DHEA y la evaluación del rompimiento de la proteína PARP se realizó por Western blot a las 24, 48 y 72 h y se comparó con las células expuestas a luz U.V. durante 10 min (control positivo) y con las células control (n = 5; $p \leq 0.05$).

D i s c u s i ó n

La DHEA es un andrógeno que tiene un papel protector contra la arterioesclerosis (Porsova-Dutoit *et al*, 2000), esta protección ha sido asociada con su habilidad para disminuir la proliferación celular, mas el mecanismo de acción por el cual está actuando, todavía no se conoce. La arterioesclerosis es una enfermedad que se origina con un proceso inflamatorio y la acumulación de lípidos en la luz arterial, en donde la disfunción endotelial tiene una participación importante. El que las células endoteliales conserven su integridad y su normal funcionamiento es necesario para asegurar los procesos como la inflamación y la reparación de tejidos (Michiels, 2003). Por lo tanto, las células endoteliales son frecuentemente usadas para el estudio de la arteriosclerosis (Ross, 1999). En este trabajo se evaluó el efecto de la DHEA en la proliferación y el ciclo celular de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs).

La participación fisiológica exacta de la DHEA aún es desconocida, no obstante, estudios clínicos en humanos demuestran que los altos niveles de la DHEA circulante reducen significativamente el riesgo de enfermedades vasculares (Barret y Goodman, 1995), y que la administración de la DHEA en concentraciones de 0.1 mM o más altas no tienen efectos en humanos y en castores (Jesse *et al*, 1995; Farrukh *et al*, 1998). En este trabajo se evaluaron dosis de la DHEA dentro de rangos séricos fisiológicos en humanos (1-10 μM) y una dosis suprafisiológica (100 μM = 0.1 mM) para determinar el efecto de concentraciones similares a las dosis farmacológicas.

Los resultados obtenidos mostraron que la DHEA a 100 μ M, inhibió la proliferación de las HUVECs en un porcentaje mayor al 50%, lo que no sucedió en concentraciones fisiológicas. Mohan y Benghuzzi (1997) encontraron un efecto inhibitor en el endotelio. Este mismo efecto ha sido descrito en otros tipos celulares como células del músculo liso y adiposas (McIntosh, 1999); sin embargo, recientemente Williams y col. (2004) demostraron que la DHEA aumenta la proliferación del endotelio, no obstante se debe aclarar que todos ellos utilizaron una concentración máxima de 100 nM, mientras que en este trabajo se utilizó una concentración de la DHEA 1000 veces más alta.

La DHEA-S no mostró efecto sobre la proliferación de las HUVECs, a las mismas concentraciones que la DHEA, lo que confirma su falta de actividad biológica (Ebeling, 1994), y su participación como una molécula de reserva circulante de la forma activa de la DHEA. Otra explicación a esto es que la unión de la DHEA-S con su transportador, la albúmina, es mucho más estrecha, lo que evita que la DHEA-S entre con mayor facilidad a la célula. También es probable que la sulfatasa no esté activa o no se encuentre en las HUVECs; sin embargo, dicha enzima ha sido encontrada en endotelio de pulmón (Milewich *et al*, 1983). También mencionan que tanto las HUVECs como el endotelio de pulmón presentan enzimas como la 3β HDS oxidoreductasa, 3α HDS oxidoreductasa 17β HDS oxidoreductasa 5,4-isomerasa y 5α -reductasa (Milewich *et al*, 1987) las cuales participan en la conversión de la DHEA a estrógenos y andrógenos.

Otros autores sostienen que la DHEA ejerce su acción en el endotelio debido a que ésta se convierte en estradiol (Milewich *et al*, 1983; Hayashi *et al*, 2000; Mukherjee *et al*, 2002); sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que el estradiol y la testosterona, no inhibieron la proliferación de las HUVECs a concentraciones fisiológicas, al contrario, el estradiol indujo un aumento en la proliferación, similar a lo estudios realizados por Lippert (2002) quien demuestra que el estradiol en concentraciones fisiológicas tiene un efecto proliferativo sobre las HUVECs. A concentraciones suprafisiológicas, la testosterona tuvo un efecto tóxico, lo que sugiere que la DHEA no se está convirtiendo a estradiol y testosterona para producir su efecto antiproliferativo. Sería importante, evaluar el efecto antiproliferativo de la DHEA en presencia de inhibidores de las enzimas que promueven su conversión, inhibidores de los receptores a andrógenos y estrógenos, así como evaluar su metabolismo utilizando una DHEA marcada.

A pesar de que la DHEA puede interaccionar con receptores de otras hormonas, varios autores mencionan que dicha interacción depende del tejido en cuestión (Hinson y Raven, 1999). Vázquez y col. (1999) han encontrado que en endotelio hay receptores tanto para estrógenos, andrógenos y progesterona, lo que no excluye que la DHEA utilice alguno de estos receptores para ejercer su acción. Sin embargo, otros investigadores apoyan la hipótesis de la existencia de un receptor específico para la DHEA (Williams *et al*, 2002), el cual está acoplado a proteínas G (Liu y Dillon, 2002) e involucra la vía de señalización de las ERKs (quinasas extracelulares reguladoras de la señal). Esto confirma que no necesariamente actúa como un precursor de hormonas, sino que la DHEA podría estar involucrada en otras vías importantes de señalización de tipo no genómico, como los resultados de Rarchí y col. (2001) que demuestran que en células neuronales la DHEA

participa en la señalización a través de la vía de la PKC (proteína cinasa C) y la expresión de RACK (receptor activado por la cinasa C); además de los resultados de Simoncini y col. (2003), que demuestran que la DHEA en el endotelio activa la oxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) a través de una vía no genómica que depende de las ERK1/2, sin una conversión a estrógenos ni a andrógenos.

Por otro lado, el efecto antiproliferativo inducido por la DHEA, se asoció al incremento en el porcentaje de células en la fase G₁, deteniendo la progresión del ciclo celular en dicha fase. Estos resultados concuerdan con los realizados en células de tumor de colon (Schulz *et al*, 1992), células de tumor de Ehrlich (Rais *et al*, 1999) y células BV-2 de glioma (Yang, *et al* 2002), en donde se demuestra que la DHEA induce la detención en la fase G₁ del ciclo celular.

Una de las proteínas que participa en la regulación del ciclo celular durante la fase G₁ y en el punto de restricción entre las fases G₁ y S, es la proteína Rb. Su forma activa, es decir hipofosforilada, genera una detención del ciclo (Goodrich *et al*, 1991). Los resultados obtenidos mostraron que la DHEA, interfirió con la fosforilación de esta molécula, lo que pudiera estar manteniendo a las células detenidas en la fase G₁. Estos resultados sugieren que la fosforilación de la proteína Rb está involucrada en el efecto antiproliferativo de la DHEA, y que es similar al inducido por el TNF- α en las HUVECs (López-Marure *et al*, 1997). En células endoteliales humanas de dermis (HDECs) y de endometrio (HEEC), la progesterona afecta la progresión del ciclo celular, inhibe la proliferación, provoca la detención del ciclo en la fase G₁, reduce la actividad de las CDKs, disminuye la fosforilación de la Rb y baja la expresión de la ciclina E (Vázquez *et al*, 1999), por lo que es probable

que la DHEA inactive a proteínas que la fosforilan como los complejos ciclinaD-CDK4/6 (Alberts *et al*, 1993; Yoshida *et al*, 2003), de manera similar al efecto de la progesterona.

Se sabe que la proteína p53 expresada en situaciones de daño celular, induce la expresión de la proteína p21 e inhibe la formación de los complejo ciclina-CDK, y como consecuencia impide la fosforilación de la Rb. Toda esta serie de señales previenen el paso de las células de la fase G1 a la fase S y permiten que las células se mantengan en la fase G1 hasta que el daño sea reparado. Los resultados encontrados en este trabajo mostraron que la DHEA, al igual que el TNF- α , incrementaron la expresión de los ARNm, tanto para la p53 como para la p21. La proteína p53 induce la transcripción de la p21 al actuar directamente sobre su promotor en el ADN, y su expresión es necesaria y suficiente para la regulación de la p53 (Lohr, 1998). Es posible que el incremento en la expresión en la p21, inducido por la DHEA, desencadene la señal para proteger a la célula contra la muerte, semejante a lo encontrado en keratinocitos por Basile y col. (2003). Otra posibilidad, es que el incremento de la expresión de la p21 podría darse de una forma independiente a la p53, lo cual ya ha sido descrito previamente (Zeng y El-Deiry, 1996). El argumento de que la DHEA pueda proteger contra un proceso de muerte, es soportado por otros estudios ya realizados en células del glioma C6 (Shin *et al*, 2001) y de riñón en monos Rhesus (Coach *et al*, 2001).

Se ha demostrado que el TNF- α induce un aumento en la expresión de la p53 y la p21, provocando un efecto antiproliferativo y detención del ciclo celular en fase G1 lo cual se ha asociado con daño al ADN, estrés e inducción de apoptosis (Donato y Pérez, 1998; López-Marure *et al*, 1997; López-Marure *et al*, 2000). Los experimentos realizados para observar

indicios de muerte temprana o tardía en este trabajo, demostraron que la DHEA no indujo la activación de la caspasa-3 y la exposición de la fosfatidilserina; sin embargo, se ha observado que la DHEA administrada en dosis farmacológicas (100 μ M), puede inducir la inhibición del crecimiento y la apoptosis en células BV-2 (Yang *et al*, 2002) y en células de timo de ratón carentes de la p53 (Wang *et al*, 1997). La ausencia de las señales que conducen a la muerte celular (apoptosis), como se muestra en este trabajo, sugiere que la DHEA tiene un efecto citoprotector sobre las HUVECs ante la presencia de alguna alteración del microambiente; un ejemplo de esto, es la respuesta proinflamatoria contra citocinas como el TNF- α y contra otras moléculas como los radicales libres que generan el estrés oxidativo, lo que ha sido estudiado por Bednarek-Tupikowska y col. (2000) quienes demostraron que la DHEA tiene efectos antioxidantes sobre el endotelio en conejos.

En resumen, la capacidad de la DHEA para provocar la detención del ciclo celular en las HUVECs y modificar la expresión de algunas moléculas que lo controlan como la proteína Rb, la p53 y la p21 sin inducir procesos de muerte, sugiere que ésta podría inducir un estado quiescente provocando la protección de la HUVECs hasta que las condiciones del microambiente sean favorables nuevamente.

Conclusiones y Perspectivas

En conclusión, los resultados de este trabajo mostraron que la DHEA en una dosis suprafisiológica de 100 μ M, afecta la progresión del ciclo celular de las HUVECs al inhibir la proliferación de manera dependiente de la dosis y el tiempo. Este efecto se asoció con la detención del ciclo celular en la fase G1, la disminución en la fosforilación de la proteína Rb, aumento en la expresión de las proteínas p53 y p21 y ausencia de apoptosis.

El probable mecanismo de acción que tiene la DHEA sobre las HUVECs parece ser diferente a una biotransformación a andrógenos o a estrógenos y sugiere que la DHEA actúa a través de un receptor propio. Es necesario realizar más estudios como el determinar si la DHEA mantiene su efecto aún con la presencia de antagonistas o inhibidores a los receptores de estos derivados. Así mismo, sería interesante evaluar otras proteínas del ciclo celular que intervienen en el efecto antiproliferativo inducido por la DHEA, como las ciclinas, las CDKs, los CDKIs y otras proteínas supresoras de tumores.

El significado fisiológico del efecto antiproliferativo de la DHEA sobre las HUVECs es poco claro, pero pudiera ser relevante durante la respuesta inflamatoria temprana, previniendo su proliferación, reteniéndolas en un estado quiescente y evitando su muerte y destrucción como sucede en la arterioesclerosis. Sería importante evaluar si la DHEA interviene en algunos eventos que se presentan durante dicha patología, como la disfunción endotelial donde se observa un aumento en la expresión de moléculas quimioatrayentes y de adhesión, en la adhesión y la trans migración de leucocitos y en el estrés oxidativo, entre otros.

B i b l i o g r a f í a

1. **Alberts A**; Thorburn A; Shenolikar S; Mumby M; Feramisco J, **1993**. Regulation of cell cycle progression and nuclear affinity of the retinoblastoma protein by protein phosphatases. **Proc Natl Acad Sci 90: 388-396**
2. **Allolio B**; Arlt W, **2002**. DHEA treatment: myth or reality? **Trends End Metab 13: 288-292**
3. **Aragno M**; Parola S; Brignadello E; Mauro A; Tamango E; Manti R; Danni O; Boccuzzi G, **2000**. Dehydroepiandrosterone prevents oxidative injury induced by transient ischemia/reperfusion in the brain of diabetic rats. **Diabetes 49: 1924-1931**
4. **Barret E**; Goodman D, **1995**. The epidemiology of DHEAS and cardiovascular disease. **Ann N Y Acad Sci 774: 259-270**
5. **Basile JR**, Eichten A; Zacny V; Munger K, **2003**. NF-kappaB-mediated induction of p21(Cip1/Waf1) by tumor necrosis factor alpha induces growth arrest and cytoprotection in normal human keratinocytes. **Mol Cancer Res 1(4): 262-70**
6. **Baulieu EE**; Thomas G; Legrain S; Lahlou N ; Roger M; Debuire B; Faucounau V; Girard L; Hervy MP; Layour F; Leaud MC; Mokrane A; Pitti-Ferranndi H, Trivalle C; Delacharriere O, Nouveau s; Rakoto- Arison B; Souberbielle JC; Raison J; Le Bouc Y; Raynaud A; Girerd X; Forette F, **2000**. Dehydroepiandrosterone(DHEA), DHEA sulfate, and aging: Contribution of the DHEAage study to sociobiomedical issue. **Proc Natl Acad Sci USA 97:427-484**
7. **Bednarek-Tupikowska G, Gosk I, Szuba A, Bohdanowicz-Pawlak A, Kosowska B, Bidzinska B, Milewicz A, 2000**. Influence of dehydroepiandrosterone on platelet aggregation, superoxide dismutase activity and serum lipid peroxide concentrations in rabbits with induced hypercholesterolemia. **Med Sci Monit 6(1):40-45**

8. **Beer C**; Lafont S; Debuire B; Dartigues JF; Baulieu EE, **1996**. Relationships of dehydroepiandrosterone sulfate in the elderly with functional, psychological and mental status, and short-term mortality: a French community based study. **Proc Natl Acad Sci 93: 13410-13415**
9. **Berdanier CD**; Parente JA; McIntosh MK, **1993**. Is dehydroepiandrosterone an antiobesity agent? **FASEB J 7(5): 414-419**
10. **Canning MO**; Grotenhuis K; De Wit HJ; Drexhage HA, **2000**. Opposing effects dehydroepiandrosterone and dexametaxone on the generation of monocyte-derived dendritic cells. **Eur J Endocrinol 143: 687-695**
11. **Cardounel A**; Regelson W; Kalimi M, **1999**. Deydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotoxin-induced cell death: mechanism of action. **Proc Soc Exp Biol Med 222:145-149**
12. **Celec P**; Starka L, **2002**. Dehydroepiandrosterone-Is the fountain of youth drying out? **Physiol Res 52: 397-407**
13. **Chang DM**; Lan JL; Lin HY; Luo SF, **2002**. Dehydroepiandrosterone treatment of women with mild-to-moderate systemic lupus erythomatosus: a multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial. **Arthritis Rheum 46: 2924-2927**
14. **Cheng M**; Olivier P; Diehl JA; Ferro M; Roussel MF; Roberts JM; Sherr CJ, **1999**. The p21 (Cip1) and p27(Kip1) CDK inhibitors are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. **Eur Mol Biol Organ J 18(6): 1571-1583**
15. **Cleary MP**; Sheperd A; Jenks B, **1984**. Dehdroepiandrosterone on growth in lean and obese Zucker rats. **J Nutr 114:1242-1251**
16. **Coach C**; Benghuzzi H; Tucci M, 2001. The effect of ultraviolet radiation and pretreatment of dehydroepiandrosterone on RMK cells in culture. **Biomed Sci Instrum 37: 31-36**
17. **Donato NJ**; Pérez M, **1998**. Tumor necrosis factor-induced apoptosis stimulates p53 accumulation and p21 WAF1 proteolysis in ME-180 cells. **J Biol Chem 273: 5067-5072**

18. **Dillon JS**; Yaney GC; Zhou Y; Voilley N; Bowen S; Chipkin S; Bliss CR; Schultz V; Schuit FC; Prentki M; Waxman DJ; Corkey BE, **2000**. Dehydroepiandrosterone sulfate and beta cell function: enhanced glucose- induced insulin secretion and altered gene expression in rodent pancreatic beta cells. **Diabetes 49: 2012-2020**

19. **Daryl K**, Granner MD, **1986**. Hormonas de la corteza suprarrenal. En: Bioquímica de Harper, 10ª. Ed. El Manual Moderno, México. **pp 619-626**

20. **Donjerkovic D; Scout DW, 2000**. Regulation of G1 phase of the mammalian cell cycle. **Cell Reseach 10(1): 1-16**

21. **Ebeling P**; Koivisto VA, **1994**. Physiological importance of dehydroepiandrosterone. **Lancet 343: 1479-1481**

22. **Einsentein AB, 1970**. La Corteza suprarrenal, Ed. Torray S A, Barcelona, España **pp 63-96**

23. **El-Deiry WS**; Harper JW; O'Connor PM; Velculescu VE; Cabman CE; Jackman j; Pietenpol JA, Burell M, Hill DE, Wang Y Wiman KG; Mercer WE; Kastan MB; Kohn KW; Elledge SJ; Kinzler KW Vogelstein B, **1994**. WAF1/CIP1 Is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. **Cancer Res 54: 1169-1174**

24. **Farrukh IS**; Peng W; Orlinska U; Hoidal JR, **1998**. Effect of dehydroepiandrosterone on hypoxic pulmonary vasoconstriction: a Ca²⁺-activated K⁺-channel opener. **Am J Physiol 274: L186-L195**

25. **Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Folkman J; 1974**. Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA síntesis. **Journal of Cellular Biology, 60: 673-84**

26. **Goodrich DW**; Wang N; Quian, Y; Lee E; Lee W, **1991**. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. **Cell 67(2): 293-302**

27. **Green MR, 1989**. When the products of oncogenes and the anti-oncogenes meet. **Cell 56: 1-3**

28. **Hampfl R**; Starka L, **2000**. 16α -hydroxylated metabolites of dehydroepiandrosterone and their biological significance. **Endocr Regul** **34**: 161-163
29. **Hayashi T**, Esaki T, Muto E, Kano H, Asai Y, Kumar N, Sumi D, Jayachandran M, Iguchi A; **2000**. Dehydroepiandrosterone retards atherosclerosis formation through its conversion to estrogen. **Arterio Throm, Vascul Biol** **20**: 782-792
30. **Hemerking H**; Eick D, **1994**. Mediation of c-myc-induced apoptosis by p53. **Science** **265**: 2091-2093
31. **Hinds P**; Mitnacht S; Dulic V; Arnold A; Reed S; Weinberg R, **1992**. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. **Cell** **70**: 993-1006
32. **Hinson JP**; Raven PW, **1999**. DHEA deficiency syndrome: a new term for old age. **J Endoc** **163**:1-5
33. **Hornsby PJ**, **1995**. Biosynthesis of DHEAS by human adrenal cortex and its age-related decline. **Ann N Y Acad Sci** **774**: 29-46
34. **Howard JM**, **1996**. Dehydroepiandrosterone, melatonin and testosterone in human evolution. A new explanation of human evolution. <http://www.naples.net>
35. **Izquierdo RM**, **1995**. Biología molecular del cáncer. Editorial Síntesis, Barcelona España. **pp 15-40**
36. **Jara AA**; González GG; **2001**. Fisiología de la Corteza Suprarrenal en Endocrinología, Ed. Panamericana, Madrid España, **900 pp**.
37. **Jarrar D**; Kuebler JF; Wang P; Bland KI; Chaudry IH, **2001**. DHEA: a novel adjunct for the treatment of male trauma patients. **Trends Mol Med** **7**: 81-85
38. **Jesse RL**; Loesser K; Eich DM; Qian YZ; Hess ML; Nestler JE, **1995**. Dehydroepiandrosterone inhibits human platelet aggregation in vitro and in vivo. **Ann NY Acad Sci** **774**: 281-290

39. **Kanauchi M**; Nakajima M; Dohi K, **2001**. Dehidroepiandrosterone sulfato and estradiol in men with diabetic nephropathy. **Nephron 88: 95-96**
40. **Kaassik A**; Kalda A; Jaako K; Zharkovsky A, **2001**. Dehidroepiandrosterone sulphato prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture. **Neuroscience 102: 427-432**
41. **Ketan KD; Sreekumaran N, 2003**. Dehidroepiandrosterone: is there a role for replacement? **Mayo Clin Proc 78: 1257-1273**
42. **Kroboth PD**; Salek FS; Pittenger AL; Fabian TJ; Frye RF, **1999**. DHEA and DHEA-S: a review. **J Clin Pharmacol 39(4): 327-348**
43. **Lasco F**; Frisina F; Morabito N; Gaudio A; Trifiletti A; Basilea, Nicita-Mauro V; Cucinotta D, **2001**. Metabolic effects of dehidroepiandrosterone replacement therapy in postmenopausal women. **Eur J Endocrinol 145: 457-461**.
44. **Labrie F** ; Luu-The V; Labrie C; Simard J; Cusan S; Gomez JL; Candas B, **1998**. DHEA and the intercrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: its role during aging. **Steroids 63: 322-328**
45. **Labrie F** ; Luu-The V; Lin SX ; Simard J; Labrie C; El-Alfy M; Pelletier G; Bélanger A, **2000**. Intracrinology: role of the family of 17 β -hydroxysteroid dehidrogenases in human physiology and disease. **J Molec Endo 25: 1-16**
46. **Li H**, Klein G; Sun P; Buchan AM, **2001**. Dehidroepiandrosterone (DHEA) reduces neuronal injury in a rat model of global cerebral ischemia. **Brain Res 888: 263-266**.
47. **Lippert C**; Seeger H; Wallwiener D; Mueck AO, **2002**. Comparison of the effects of 17 α -ethinylestradiol and 17 β -estradiol on the proliferation of human breast cancer cells and human umbilical vein endothelial cells. **Clin Exp Obstet Gynecol 29: 87-90**.
48. **Liu D**; Dillon JS, **2002**. Dehidroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor. **J Biol Chem 277: 21379-21388**.

49. **Lip GY**; Blann A, **1997**. Von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? **Cardiovas Resch 34: 255-265**
50. **Liu D**; Dillon JS, **2004**. Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. **Steroids 69: 279-289**
51. **Lohr K**; Moritz C; Contente A; Dobbstein M, **2003**. p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. **J Biol Chem 278: 32507-32516**
52. **López-Marure R**; Estrada A; Zentella A, **1997**. Interference with c-myc expression and RB phosphorylation during TNF-mediated growth arrest in human endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun 236: 819-824**
53. **López-Marure R.**; Ventura JL; Sánchez L; Montaña LF; Zentella A, **2000**. Ceramide mimics tumor necrosis factor- α in the induction of cell cycle arrest in endothelial cells. Induction of the tumor suppressor p53 with decrease in retinoblastoma/protein levels. **Eur J Biochem 267: 4325-4333**
54. **Martel SD**; Sourla A Pelletier G, Labrie C; Fournier M, Picards S; Li S, Stojanovic M; Labrie F, **1998**. Predominant androgenic component in the stimulatory effect of dehydroepiandrosterone on bone mineral density in the rat. **J Endocrinol 157: 433-442**.
55. **McIntosh MK**; Lea-Currie YR; Geigerman C; Paseavouras L, **1999**. Dehydroepiandrosterone alters the growth of stromal vascular cells from human adipose tissue. **Int J Obes Rel Metab Disord 23(6): 595-602**
56. **Michiels C**; **2003**. Endothelial cell functions. **J Cell Physiol 196: 430-43**
57. **Milewich L**; Garcia RL; Johnson AR, **1983**. Steroids sulfatase activity in human lung tissue and in endothelial pulmonary. **J Clin Endocrinol Metab 57(1): 8-14**
58. **Milewich L**; Hendricks TS; Johnson AR, **1983**. Metabolism of dehydroisoandrosterone and androstenedione in human pulmonary endothelial cells in culture. **J Clin Endocrinol. Metab 56: 930-935**

59. **Milewich L**; Hendricks TS; Johnson AR, **1987**. Steroid 5 alpha-reductasa activity in endothelial cells from human umbilical cord vessels. **J steroid Biochem 26(5): 561-567**
60. **Mohan PF**; Benghuzzi H, **1997**. Effect of Dehydroepiandrosterone on endothelial cell proliferation. **Biomed Sci Instrum 33: 550-555**
61. **Montanini V**; Simoni M; Chiossi G; Baraghini GF; Velarde A; Baaraldi E; Marrama P, **1998**. Age related changes in plasma dehydroepiandrosterone sulfato, cortisol, testosterone and free testosterone circadian rhythms in adult men. **Hormon Res 29: 1-6**
62. **Mukherjee TK**; Dinh H; Chaudhuri G; Nathan L, **2002**. Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: implications in atherosclerosis. **Proc Natl Acad Sci 99: 4055-4060**
63. **Murray AW**; Hunt T, **1993**. The cell cycle: an introduction. Oxford University Press, NY, USA. **pp 1-65**
64. **Nephew KP**; Sheeler CQ; Dudley MD; Gordon S; Hayfield SG; Khan SA, **1998**. Studies of dehydroepiandrosterone (DHEA) with the human estrogen receptor in yeast. **Mol Cell Endocrinol 143: 133-142**
65. **Oner GA**; Hendricks JD; Abogast D; Williams DE, **1998**. Modulation of aflatoxin- B1 hepatocarcinogenesis in trout by dehydroepiandrosterone: initiation / post initiation and latency effects. **Carcinogenesis 19(1): 161-167**
66. **Orentreich N**; Brind JL; Vogelmann JH; Andres R; Baldwin H, **1992**. Long-Term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in normal men. **J Clin Endocrinol Metab 75: 1002-1004**
67. **Paniagua R**; Nistal M; Sesma P; Alvarez-Uría M; Fraile B; Anadón R; Sáez FJ, Paz de Miguel M, **1999**. Biología Celular, McGraw- Hill, Interamericana Editores, España. **pp 309-314**

68. **Piketty C**; Jayle D; Leplege A; Castiel P; Ecosse E; Gonzalez-Canali G, Sabatier B; Boulle N; Debuire B; LE Bounc Y; Baulieu EE, Kazatchkine MD, **2001**. Double-blind placebo-controlled trial of oral dehydroepiandrosterone in patients with advanced HIV disease. **Clin Endocrinol 55: 325-330**.
69. **Pober JS, 1988**. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium: physiology and pathology. **Am J Pathol 133: 426-433**
70. **Porsova-Dutoit I**; Sulcova J; Starka L, **2000**. Do DHEA/DHEAS play a protective role in coronary heart disease? **Physiol Res 49: 43-56**
71. **Racchi M**; Balduzzi C; Corsini E, **2003**. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and the aging brain: Flipping a coin in the "Fountain of Youth", **CNS Drugs Rev 9(1): 21-40**
72. **Rais B**; Comin B; Puigjaner J; Brandes JL; Creppy E; Saboureau D; Ennamany R; Lee Wn; Boros LG; Cascante M, **1999**. Oxitiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cell through of the pentose cycle. **FEBS Lett 456 (1): 113-118**
73. **Rao KV**; Jooohnson WD; Bosland MC, Lubet RA, Steele VE; Kellof GJ; McCormick DL, **1999**. Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by early and delayed administration of dehydroepiandrosterone. **Cancer Res 59(13): 3084-3089**
74. **Richards RJ**; Porter JR; Svec F, **2000**. Serum leptin lipids, free faty acids, and fat pads in long-term dehydroepiandrosterone-treated Zucker rats. **Proc Soc Exp Biol Med 223: 258-262**
75. **Robel P**; Baulieu EE, **1995**. Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a neuroactive neurosteroid. **Ann N Y Acad Sci 774: 82-110**
76. **Ross R, 1999**. Atherosclerosis-an inflammatory disease. **N Engl J Med 340: 115-126**
77. **Ryan KM**; Phillips AC; Vousden KH, **2001**. Regulation and function of p53 tumor suppressor protein. **Curr Opin Cell Biol 13: 332-337**.

78. **Schulz S**; Klann RC; Schonfeld S; Nyce JW, **1992**. Mechanisms of cell growth inhibition and cell cycle arrest in the human colonic adenocarcinoma cells by dehydroepiandrosterone. **Cancer Res 52 (5): 1372-1376**
79. **Schwartz AG**; Whitcomb JM; Nyce JW; Lewbrat ML; Paassshko LL, **1988**. Dehydroepiandrosterone and structural analogs: a new class of cancer chemopreventive agents. **Adv Can Resch 51: 391-424**
80. **Schwartz KE**, **2002**. Autoimmunity, dehydroepiandrosterone(DHEA) and stress. **J Adolesc Health 30: 33-43**
81. **Shealy CN**, **1995**. A review of dehydroepiandrosterone (DHEA). **Integr Physiol Behav Sci 30(4): 308-313**
82. **Shin CY**; Choi JW; Jang ES; Ju C; Kim WK; Kim HC; Choi CR; Ko KH, **2001**. Dehydroepiandrosterone inhibits the death of immunostimulated rat C6 glioma cells deprived of glucose. **Brain Res 922: 267-275**
83. **Simoncini T**; Mannella P; Fornari L; Varone G; Caruso A; Genazzani AR, **2003**. Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms. **Endocrinol 144 (8): 3449-55**
84. **Straub RH**; Konecna L; Hrach S; Rothe G; Kreutz M; Scholmerich J; Falk W; Lang B, **1998**. Serum dehydroepiandrosterone(DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6(IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. **J Clin Endocrinol Metab 83: 2012-2017**
85. **Vazquez F**; Rodriguez-Mansanequez JC; Lydon JP, Edwards DP, O'Malley BW; Iruela-Arispe ML, **1999**. Progesterone regulates proliferation of endothelial cells. **J Biol Chem 274(4): 2185-2192**
86. **Vidal A**; Koff A, **2000**. Cell cycle inhibitors: three families united by a common cause. **Gene 247: 1-15**
87. **Vousden KH**, **2001**. p53: Death star. **Cell 103: 691-694**

88. **Waga S**; Hannog GJ; Beach D; Stillman B, **1994**. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases control DNA replication by interaction with PCNA. **Nature 369: 520-521**
89. **Wang MJ**; Huang HM; Chen HL; Kuo JS; Jeng KC, **2001**. Dehydroepiandrosterone inhibits lipopolisaccharide-induced nitric oxide production in BV-2 microglia. **J Neurochem 77: 830-838**
90. **Wang TT**; Hursting SD; Perkinns SN; Phang JM, **1997**. The effects of the dehydroepiandrosterone and caloric restriction in the path Bcl-2/Bax-mediated apoptotic in the mice faulty p53. **Cancer Lett 116(1): 61-69**
91. **Williams M**; Ling S, Dawood T; Hashimura K; Dai A; Li H; Liu JP; Funder J; Sudhir K; Komesaroff P, **2002**. Dehydroepiandrosterone inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation independent of ARs and ERs. **J Clin Endocrinol Metab 87: 176-181**
92. **Williams M**; Dawood T; Ling S; Dai A; Lew R; Myles K; Funder J; Sudhir K ; Komesaroff P, **2004**. Dehydroepiandrosterone increases endothelial cell proliferation *in vitro* and improves endothelial function *in vivo* by mechanisms independent of androgen and estrogen receptors. **J Clin Endocrinol Metab 89: 4708-4715**
93. **Wolkowitz O**; Reus V; Keebler A; Nelson N; Friedland M; Brizendine L; Roerts E, **1999**. Double-Blind treatment of major depression with dehydroepiandrosterone. **Am J Psychiatry 156: 646-649**
94. **Yang S**; Fu ZD; Han R, **2001**. Studies on the anti-tumorpromotion activities of dehydroepiandrosterone and its mechanism of action. **Yao Xue Xue Bao 36(8): 576-80**
95. **Yang NC**; Jeng KC; Ho WM; Hu ML, **2002**. ATP depletion is an important factor in DHEA-induced growth inhibition and apoptosis in BV-2 cells. **Life Sci 70: 1979-1988**
96. **Yen SC**; Jaffe RB, **1994**. Endocrinología de la Reproducción: fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 3ª. ed, Ed. Panamericana, Buenos Aires pp 912

97. **Yoshida S**; Honda A; Matsuzaki Y; Fukushida S; Tanaka N; Takaiwa A; Fujimoto Y; Miyazaki H, Salen G, **2003**. Anti-Proliferative action of endogenous dehydroepiandrosterone metabolites on human cancer cell lines. **Steroids 68: 73-83**
98. **Zeng YX**; El-Deiry WS, **1996**. Regulation of p21 WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. **Oncogene 12:1557-1564**

Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis el día 15 de diciembre de 2004.



Dra. Reyna C. Fierro Pastrana
Presidente



Dra. Rebeca López Marure
Secretario



Dr. Pablo G. Damian Matzumura
Vocal



Dr. Luis Felipe Montaña Estrada
Vocal



Dra. Emma Rodríguez Maldonado
Vocal