
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL”

**“EFECTO DE LA DEHIDROEPIANDROSTERONA EN LAS PROTEÍNAS
INVOLUCRADAS EN LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA EN
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA”**

T E S I S
**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN ANIMAL**

Que presenta:
Biól. Zaira Colin Val

Comité Tutoral:

Co-directora
Dra. Viridiana Yazmín González Puertos

Co-directora
Dra. Rebeca López Marure

Asesora
Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero

Ciudad de México, Noviembre, 2016

Comité Tutorial:

Co-directora

Dra. Viridiana Yazmín González Puertos
ygp@xanum.uam.mx
Departamento de Ciencias de la Salud
Lab. Bioenergética y Envejecimiento Celular
UAM-Iztapalapa

Co-directora

Dra. Rebeca López Marure
rlmarure@yahoo.com.mx
Departamento de Fisiología. Instituto Nacional de Cardiología
“Ignacio Chávez”

Asesora

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero
norm@xanum.uam.mx
Departamento de Ciencias de la Salud
Lab. Bioenergética y Envejecimiento Celular
UAM-Iztapalapa

Miembros del jurado:

Dra. Mina Konigsberg Faistein
mkf@xanum.uam.mx
Departamento de Ciencias de la Salud
Lab. Bioenergética y Envejecimiento Celular
UAM-Iztapalapa.

Dra. Norma E. López Díaz-Guerrero
norm@xanum.uam.mx
Departamento de Ciencias de la Salud
Lab. Bioenergética y Envejecimiento Celular
UAM-Iztapalapa.

Dra. Erika Olivia Gómez González
eoligom@yahoo.com.mx
Academia de Biología.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dr. Javier Esteban Jimenez Salazar
jejimenezsalazar@xanum.uam.mx
Departamento de Biología de la Reproducción
UAM-Iztapalapa.

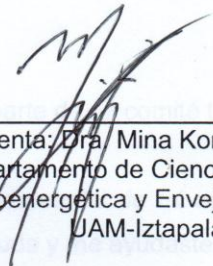
“El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT (PNPC) registro 003797”.

Debido al PNPC se otorgo la beca con el número de CVU 531182.

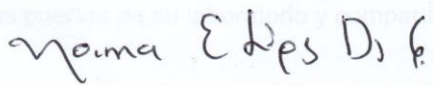
Este trabajo se realizo en el Departamento de Fisiología perteneciente al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, así como, en el Lab. Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa.

Este trabajo estuvo aprobado por el proyecto CONACyT 18234L Cuyo responsable es la Dra. Rebeca López Marure del Departamento de Fisiología perteneciente al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

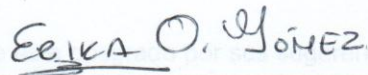
“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “EFECTO DE LA DEHIDROEPIANDROSTERONA EN LAS PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA” con fecha 3 de noviembre del 2016”.



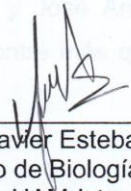
Presidenta: Dra. Mina Konigsberg Faistein
Departamento de Ciencias de la Salud
Lab. Bioenergética y Envejecimiento Celular
UAM-Iztapalapa.



Secretaria: Dra. Norma E. López Díazguerrero
Departamento de Ciencias de la Salud
Lab. Bioenergética y Envejecimiento Celular
UAM-Iztapalapa.



Vocal: Dra. Erika Olivia Gómez González
Academia de Biología.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.



Vocal: Dr. Javier Esteban Jimenez Salazar
Departamento de Biología de la Reproducción
UAM-Iztapalapa.

AGRADECIMIENTOS

Con admiración a la Dra. Rebeca por aceptarme en su laboratorio, por el tiempo dedicado y compartir conmigo sus conocimientos.

A la Dra. Viridiana por ayudarme cada vez que lo necesite, por sus consejos y brindarme su amistad.

A la Dra. Norma por aceptar ser parte de mi comité tutorial y brindarme sus conocimientos.

A la Dra. Erika por ser parte fundamental de mi aprendizaje, ya que me enseñaste que nunca hay que quedarse con la duda y me ayudaste a ampliar mis conocimientos.

A la Dra. Mina por abrirme las puertas de su laboratorio y compartir conmigo sus opiniones y conocimientos.

A mis amigos de la MBRA por su amistad, sus consejos y su apoyo.

A mis compañeros del laboratorio de bioenergética y envejecimiento celular de la UAM por el apoyo.

A él Dr. Miguel coordinador de este posgrado por sus sugerencias y recomendaciones, así como, a todos y cada uno de los profesores que me aportaron sus conocimientos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de biología celular del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez a Helen y José Antonio por su apoyo pero sobre todo a Elizabeth e Iván porque en ellos encontré más que a unos compañeros a unos grandes amigos.

Y por último pero no por ello menos importante a Gibrán por su apoyo incondicional, por sus consejos y ayudarme siempre que lo necesitaba, gracias.

DEDICATORIAS

Esta tesis la quiero dedicar a mis padres por su apoyo, porque siempre que los necesite estuvieron ahí, por hacerme la persona que soy.

A mis hermanos Miriam y Alejandro por su apoyo.

A mi sobrina por ser una nueva luz para la familia.

A toda mi familia; a mi abuelita por ser como una madre para mí y mi hijo, a mis tíos, primos y sobrinos, pues sé que puedo contar con ustedes.

Quiero que sepan que los amo a todos y solo puedo decirles GRACIAS.

Pero sobre todo esta tesis y todos mis logros van dedicados a la persona más importante de mi vida, a mi hijo por ser mi motor cada día porque todo lo que hago y cada paso que doy lo hago por él.

ÍNDICE

RESUMEN	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 DEFINICIÓN DE CÁNCER.....	12
1.2 EL CÁNCER DE MAMA	12
1.1.2 LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA	12
1.1.3 LA TEM ASOCIADA CON LA PROGRESIÓN TUMORAL Y LA METÁSTASIS	16
1.1.4 LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA TEM	17
1.1.5 LA MIGRACIÓN Y LA METÁSTASIS.....	18
1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA DHEA	20
1.2.1 EL METABOLISMO DE LA DHEA	21
1.2.2 EL RECEPTOR DE LA DHEA.....	21
1.3 MODELOS IN VIVO UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DEL CÁNCER	22
2. ANTECEDENTES	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	25
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS.....	26
6.1 OBJETIVO GENERAL	26
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES	26
7. METODOLOGÍA	27
7.1 CONDICIONES DEL CULTIVO CELULAR	27
7.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA	28
7.3 INMUNOANÁLISIS	29

7.4 INMUNOFLUORESCENCIA	30
7.5 ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUMORES	31
7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
8. RESULTADOS.....	33
8.1 EFECTO DE LA DHEA EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	33
8.2 EFECTO DE LA DHEA EN LA EXPRESIÓN DE LA E-CADERINA EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231	35
8.3 EFECTO DE LA DHEA EN LA EXPRESIÓN DE LA N-CADERINA EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231	38
8.4 EFECTO DE LA DHEA EN LA EXPRESIÓN DE LA VIMENTINA EN LA LÍNEA CELULAR MDA- MB-231	41
8.5 EFECTO DE LA DHEA EN LA EXPRESIÓN DE LA E-CADERINA EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7	44
8.6 EFECTO DE LA DHEA EN LA EXPRESIÓN DE LA N-CADERINA EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7	47
8.7 EFECTO DE LA DHEA EN LA EXPRESIÓN DE LA VIMENTINA EN LA LÍNEA CELULAR MCF- 7.....	50
8.8 EFECTO DE LA DHEA EN LA FORMACIÓN DE TUMORES IN VIVO.....	53
9. DISCUSIÓN	58
10. CONCLUSIÓN	63
11. BIBLIOGRAFÍA	63

RESUMEN

El cáncer de mama es una de las neoplasias más frecuentes en todo el mundo y constituye la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en México. Su elevada mortalidad se debe principalmente a su gran capacidad metastásica, la cual se asocia a la transición epitelio-mesénquima (TEM). Durante este proceso, se disminuye la expresión de proteínas epiteliales y se incrementan las mesenquimales. Por otro lado, se ha demostrado que la dehidroepiandrosterona (DHEA), el esteroide más abundante en el plasma humano, inhibe la migración de células de cáncer de mama; sin embargo, los mecanismos que rigen este proceso aún no se han determinado.

En este trabajo se evaluó el efecto de la DHEA en la expresión de algunas proteínas involucradas en la TEM, como la E-caderina (epitelial), la N-caderina y la vimentina (mesenquimales) en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 (fenotipo mesenquimal, invasivas y metastásicas) y MCF-7 (fenotipo epitelial, no invasivas, no metastásicas) mediante el uso de inmunoanálisis e inmunofluorescencia. También se evaluó el efecto de la DHEA en el crecimiento de tumores de células MDA-MB-231 en un modelo de xenotransplante *in vivo con ratones nu^{-/-}/nu^{-/-}*.

Nuestros resultados mostraron que la DHEA aumentó la expresión de la E-caderina y disminuyó la de la N-caderina y la vimentina en las células MDA-MB-231; sin embargo, en las células MCF-7 no tuvo ningún efecto, lo que sugiere que la DHEA revierte el fenotipo mesenquimal, pero no afecta al epitelial. En el modelo *in vivo* se observó una disminución en el tamaño de los tumores cuando la DHEA se administró una semana antes y al mismo tiempo en que se realizó la inoculación con las células de mama.

En conclusión, la DHEA podría ser útil como un agente en el tratamiento contra el cáncer de mama que presenta un fenotipo mesenquimal y metastásico.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most common neoplasia in the world and is the leading cause of cancer death in women in Mexico. Its high mortality is due mainly to its great metastatic capacity, which is associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT). During this process, a decrease in the expression of epithelial proteins and an increase of mesenchymal proteins is observed. On the other hand, it has been shown that dehydroepiandrosterone (DHEA), the most abundant steroid in human plasma, inhibits breast cancer cells migration; however, the mechanisms involved in this process have not yet been determined.

In this study, the effect of DHEA on the expression of some proteins involved in the EMT, such as E-cadherin (epithelial), N-cadherin and vimentin (mesenchymal) was evaluated in the breast cancer cells MDA-MB-231 (mesenchymal phenotype, invasive and metastatic) and MCF-7 (epithelial phenotype, non-invasive and non-metastatic) using immunoassay and immunofluorescence, also the effect of DHEA on tumor growth in a xenograft model *in vivo* with nu^{-}/nu^{-} mice was evaluated.

Our results showed that DHEA increased the expression of E-cadherin and decreased N-cadherin and vimentin in MDA-MB-231 cells; however, in MCF-7 cells it had no effect, suggesting that DHEA reverses the mesenchymal phenotype, but does not affect epithelial. In the *in vivo* model, it was observed a decrease in tumor size when DHEA was administered a week before and at the same time that inoculation with MDA-MB-231 cells.

In conclusion, DHEA may be useful in the treatment of breast cancer that has a mesenchymal and metastatic phenotype.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DEFINICIÓN DE CÁNCER

La palabra cáncer proviene del latín *cancer* (cangrejo), debido a que las células cancerosas se adhieren a cualquier parte donde se asientan y es el nombre común que se le da a las neoplasias o tumores malignos. Las neoplasias, etimológicamente "crecimientos nuevos", son masas anormales de tejido cuyo crecimiento es excesivo y desordenado respecto del normal, pudiendo invadir, propagarse a sitios distantes (metástasis) y causar la muerte. Las células neoplásicas presentan mutaciones que les permiten continuar replicándose e ignoran las señales reguladoras que controlan el crecimiento de las células (Pagani *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2001;).

1.2 EL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama, es una de las neoplasias más frecuentes en mujeres mayores de 20 años en todo el mundo, su incidencia y mortalidad ha ido en incremento paulatino en los últimos 10 años. Desde el 2005, el cáncer de mama constituye la primer causa de muerte por cáncer en México en mujeres (INEGI, 2014; Knaul *et al.*, 2008). La rápida progresión del cáncer de mama se relaciona fuertemente con procesos de neo-angiogénesis (Knaul *et al.*, 2008). Su potencial metastásico es la principal causa de tan elevada mortalidad, un proceso indispensable para que comience la metástasis es la transición epitelio-mesénquima (TEM).

1.1.2 LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA

La TEM es un proceso presente durante la embriogénesis, la carcinogénesis, la metástasis y la recurrencia tumoral. Durante este proceso, las células epiteliales pierden sus características y adquieren propiedades mesenquimales: pérdida de la polaridad y de la

adhesión celular, aumento en la movilidad e invasividad, resistencia a la apoptosis, y cambios morfológicos. Este proceso tan complejo involucra la participación de diversos factores de transcripción y de proteínas epiteliales y mesenquimales, incluyendo la E-caderina, la β -catenina, la N-caderina, y la vimentina, entre otras (Kalluri-Weinberg, 2009).

Una característica importante de las células en los organismos multicelulares es su capacidad para formar asociaciones entre células del mismo tipo. Esta adhesión celular selectiva es el resultado de la expresión de moléculas específicas en la superficie celular, llamadas moléculas de adhesión celular (Kalluri-Weinberg, 2009; Zavala-Zendejas y Rendón-Huerta, 2008).

El complejo de unión celular de los epitelios polarizados es una estructura altamente desarrollada formada por varias subunidades bien definidas, incluyendo a las uniones comunicantes (UC), los desmosomas, las uniones adherentes (UA) y las uniones estrechas (UE) (Figura 1) (Zavala-Zendejas y Rendón-Huerta, 2008).

Las UA y los desmosomas son los responsables de proporcionar la adhesión mecánica a las células, para formar un "cinturón de adhesión continuo" que sirve para mantener juntas a las células vecinas a través de una familia de moléculas de adhesión dependientes de Ca^{2+} , llamadas caderinas, que se unen a filamentos de actina y miosina. Las UE se encuentran formadas por más de 40 diferentes moléculas, entre las que se encuentran: 1) proteínas citosólicas, que pueden servir como proteínas estructurales o de anclaje, como las zonula occludens-1 (Zo-1), Zo-2, Zo-3; 2) proteínas de regulación del tráfico vesicular, involucradas en la señalización y la polaridad celular e incluso en la regulación de la expresión génica; y 3) proteínas transmembranales, como las claudinas, las ocludinas y las moléculas de adhesión de la unión (JAM). Estas proteínas interactúan con proteínas pertenecientes a su misma familia presentes en la membrana de la célula adyacente, formando canales paracelulares capaces de discriminar el paso de moléculas entre las células de acuerdo a su tamaño y carga (Jiménez-Salazar *et al.*, 2012; Thiery-Sleeman, 2006).

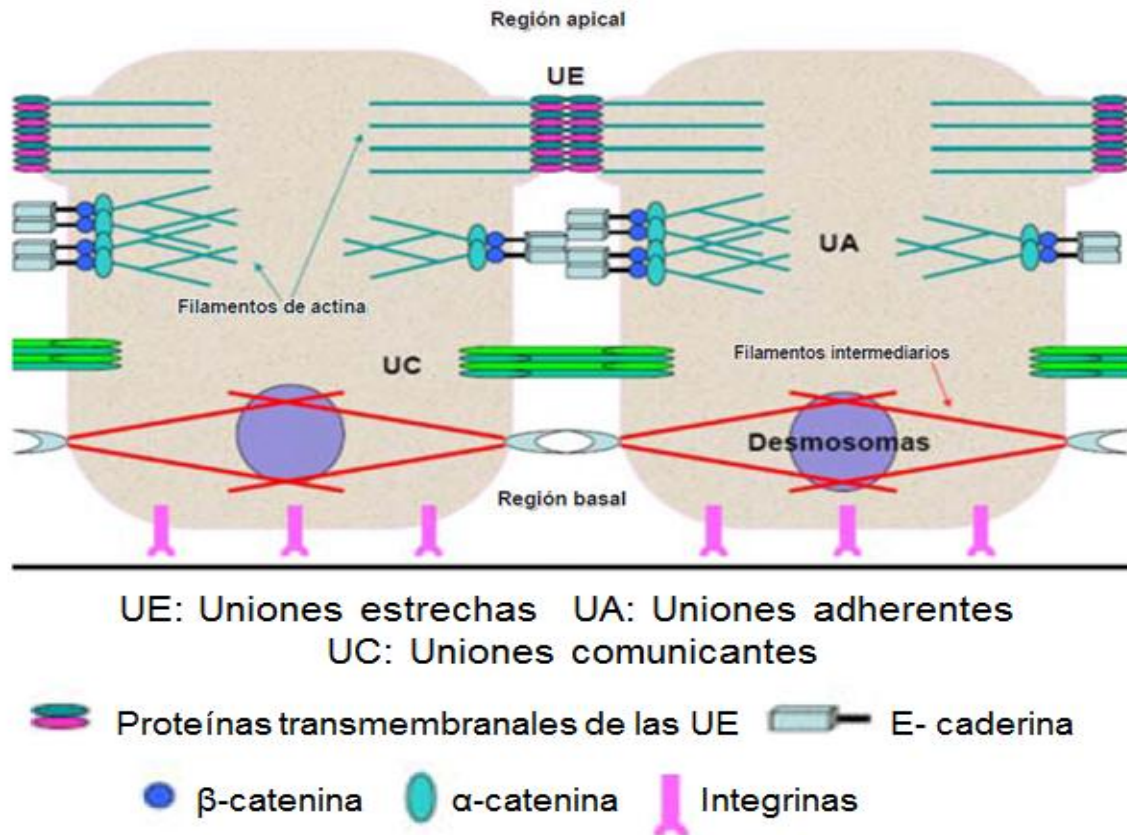


Figura 1. Estructura del complejo de unión celular. Las uniones célula-célula están formadas por desmosomas, que le dan fuerza adhesiva y mecánica a las membranas laterales de las células y proveen de sitios de anclaje para filamentos intermedios; las uniones comunicantes (UC), que forman canales entre células adyacentes permitiendo la comunicación entre ellas; las uniones adherentes (UA), que le dan fuerza mecánica a las células al estar unidas al citoesqueleto de actina; y las uniones estrechas (UE), que crean sellos en la región más apical de la membrana lateral de las células (Zavala-Zendejas y Rendón-Huerta, 2008).

Las células epiteliales y mesenquimales difieren en varias características funcionales y fenotípicas. Las células epiteliales en condiciones normales no se desprenden ni migran, aunque tienen cierta capacidad motriz dentro de la capa epitelial (Thiery Sleeman, 2006). En cultivo, las células crecen en grupos de células que mantienen las adhesiones con las células vecinas, presentan marcadores epiteliales como la E-caderina, la desmoplaquina y la citoqueratina. En contraste, las células mesenquimales

no forman capas organizadas, las adhesiones con las células mesenquimales vecinas son menos fuertes y no están asociadas a una lámina basal, lo que les permite una mayor capacidad migratoria. En cultivo, las células mesenquimales tienen forma de huso, con una morfología similar a los fibroblastos y tienden a ser motrices, presentan expresión de marcadores mesenquimales como la proteína N-caderina, filamentos intermedios (vimentina) y secretan componentes de la matriz extracelular (ECM) (Thiery-Sleeman, 2006; LaGamba *et al.*, 2005) (Figura 2).

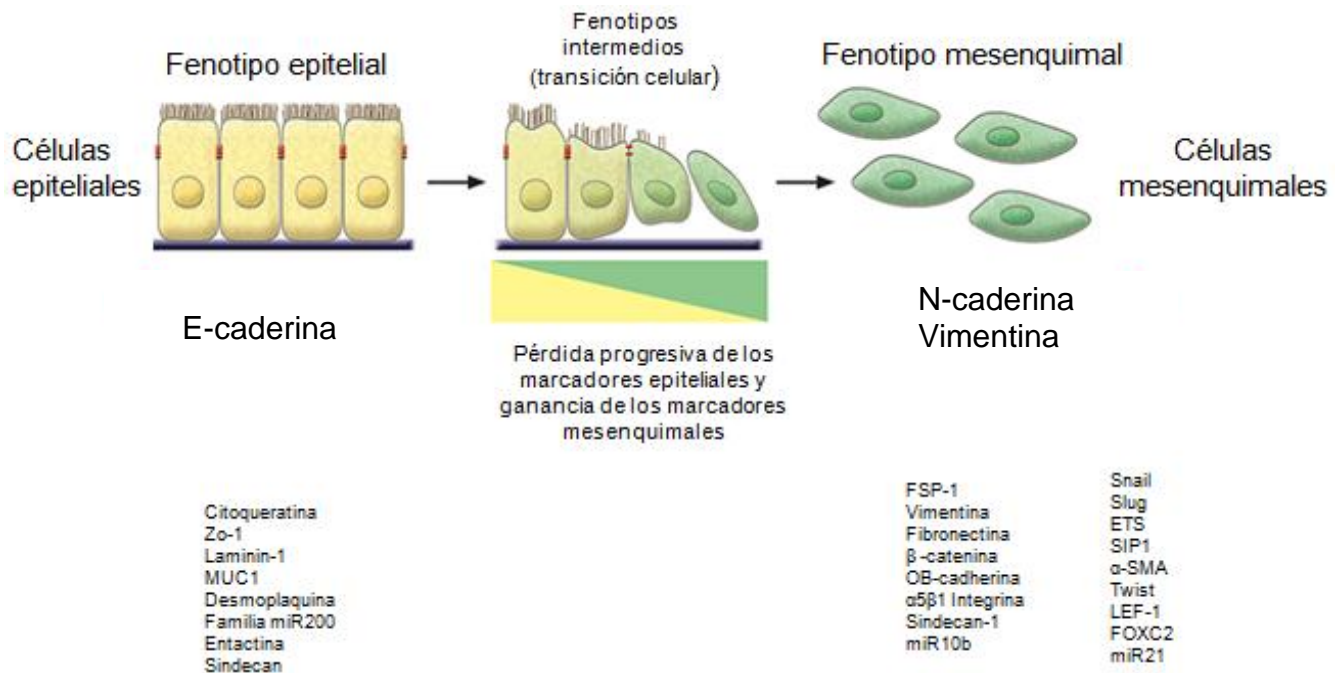


Figura 2. La transición epitelio-mesénquima (TEM). Es la transición funcional de las células epiteliales polarizadas a las células mesenquimales móviles. Algunos marcadores tanto epiteliales como mesenquimales se muestran en su respectiva imagen; la pérdida progresiva de los marcadores epiteliales y el aumento de los mesenquimales provoca un fenotipo intermedio de la TEM (Kalluri-Weinberg, 2009).

1.1.3 LA TEM ASOCIADA CON LA PROGRESIÓN TUMORAL Y LA METÁSTASIS

La activación del programa de la TEM se ha propuesto como un mecanismo crítico para la adquisición del fenotipo maligno por células epiteliales cancerosas (Thiery, 2002). Las células que presentan la TEM se encuentran en el frente invasivo de tumores primarios y expresan marcadores mesenquimales.

En su etapa inicial, los carcinomas se caracterizan por aumento en la proliferación de células epiteliales y angiogénesis. La aparición subsecuente de invasividad ocurre al inicio de la etapa final del proceso, que finalmente lleva a la diseminación metastásica (Jaggi *et al.*, 2005). En este contexto no ocurre la inducción coordinada y ordenada de una TEM completa, sino que, en su lugar, las señales ambientales altamente variables, junto con la heterogeneidad genética del tumor, pueden llevar a diversos grados de plasticidad epitelial y a reactivación de programas migratorios asociados con el desarrollo, de lo que resulta la inducción de migración celular individual o colectiva. Esto sugiere que la TEM no es simplemente un mecanismo de diseminación local de las células tumorales a partir de un sitio primario, sino que se induce un programa con las propiedades necesarias para la progresión tumoral.

Por otra parte, el hecho de que las células tumorales que formaron un tumor secundario sean histopatológicamente similares a sus progenitoras en el tumor primario implica que, además del papel facilitador de la TEM en la diseminación tumoral, se requiere que estas células se despojen de su fenotipo mesenquimal por medio de un proceso de transición mesenquimal-epitelial (TME) durante la formación de dicho tumor secundario (Yao *et al.*, 2011). Esta tendencia a desarrollar la TME probablemente refleje el microambiente local que las células encuentran en el órgano distante y muy posiblemente la ausencia de las señales presentes en el tumor primario que desencadenaron la TEM (Guarino *et al.*, 2007).

1.1.4 LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA TEM

La regulación molecular de la EMT es muy compleja, los factores de crecimiento y sus receptores, moléculas relacionadas con la matriz extracelular y varias vías de señalización celular juegan un papel principal (Guarino *et al.*, 2007). En diversos estudios llevados a cabo en líneas celulares, se han identificado numerosos factores de crecimiento como inductores de la EMT incluyendo: el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), Wnt, Snail/Slug y Twist (Whiteland *et al.*, 2012).

Snail es un factor de transcripción que media la EMT por subregulación de moléculas de adhesión como E-cadherina, claudina y ocludina, e incremento de marcadores mesenquimales como vimentina, fibronectina y metaloproteinasas (Smith *et al.*, 2012).

Además la TEM involucra una gran cantidad de vías de señalización las cuales actúan en forma independiente o interconectadas, la mayoría convergen en el control de la expresión de E-cadherina, cuya subregulación es el evento molecular clave en este proceso, pues conduce a pérdida de uniones intercelulares y a desestabilización de la arquitectura epitelial (5,6). (Kalluri-Weinberg, 2009).

Un cambio clave en la TEM es la reducción de la adhesión célula-célula mediante la represión transcripcional de las caderinas componentes de las uniones adherentes, la ocludina y la claudina componentes de las uniones estrechas y la desmoplaquina, componente de los desmosomas (De Wever *et al.*, 2008).

La expresión de los filamentos intermedios también cambia durante la TEM con la sustitución de la citoqueratina de las células epiteliales por la vimentina típica de las células mesenquimales (Omary *et al.*, 2004).

La β -catenina, es una proteína que forma parte de las uniones adherentes y su translocación al núcleo activa la expresión de Slug promoviendo la TEM; por otro lado, una característica

muy marcada de la TEM es la inactivación de la E-caderina (Thiery, 2002), esta proteína es el principal componente de las uniones adherentes y su función es esencial para la inducción y el mantenimiento de la polaridad celular. La E-caderina puede ser inactivada funcionalmente o silenciada mediante varios mecanismos, entre ellos se encuentran represores que silencian la expresión de esta proteína en células mesenquimales, como; factores de transcripción con dominios “Zinc fingers” (Snail), así como, Zeb, Twist, etc, la sobre expresión de estos factores no solo implica la represión de la E-caderina sino la reprogramación de la célula a un estado mesenquimal. La capacidad de la E-caderina de mantener la adhesión entre las células es lo que le otorga la capacidad de actuar como gen supresor de tumores. La alteración de la expresión de la E-caderina es suficiente para desencadenar una TEM (Onder, 2008).

1.1.5 LA MIGRACIÓN Y LA METÁSTASIS

La elevada mortalidad de las pacientes con cáncer de mama se debe a la frecuente capacidad de generar metástasis.

La migración celular es un proceso de múltiples etapas que involucra cambios en el citoesqueleto, en las adhesiones substrato-célula y en los componentes de la matriz extracelular. Existen proteínas como la E-caderina y proteínas de matriz extracelular que tienen una participación muy importante en procesos tales como: el crecimiento, la reorganización dinámica del citoesqueleto, la polaridad celular, la permeabilidad paracelular, la adhesión célula-célula, la migración y la invasión (Kelly *et al.*, 2007).

Por otro lado, la metástasis en el cáncer de mama es un proceso complejo que requiere de la actividad de múltiples genes que incluyen al activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), además de diversas quimiocinas como la CXCR4 y CXXL12 entre otras y metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Kang *et al.*, 2003). Muchas células tumorales secretan altas concentraciones de MMPs. Un miembro de esta familia es la metaloproteinasa-9

(MMP-9), la cual se libera por las células tumorales y se sobre-expresa en tumores de mama humanos (Scorilas *et al.*, 2001).

Según Suva y colaboradores (2009), las principales etapas involucradas en el proceso de la metástasis son:

- 1) el crecimiento y la división celular dentro del tumor primario,
- 2) la invasión del borde del tumor primario (membrana basal) y del tejido local que rodea el tumor,
- 3) la migración al sistema circulatorio: la célula entra al flujo sanguíneo o a los canales linfáticos,
- 4) la extravasación en el sitio distante: la célula invade la matriz extracelular del tejido blanco,
- 5) la proliferación de la célula cancerosa en el sitio secundario,
- 6) la formación de una micro-metástasis en el sitio secundario, y
- 7) la colonización progresiva para formar nuevas metástasis.

Teniendo en cuenta el gran problema actual del cáncer en México, se ha investigado el papel de varios fármacos en la inhibición del desarrollo del cáncer, entre ellos se encuentra la 3 β -hidroxi-5-androsten-17-ona o dehidroepiandrosterona (DHEA), la cual es uno de los esteroides más abundantes en el plasma humano producido principalmente por la corteza adrenal (Nestler *et al.*, 1988). Se ha descrito que la DHEA tiene un efecto protector contra una amplia variedad de enfermedades, entre ellas el cáncer (Schwartz *et al.*, 1986). Ha mostrado un efecto inhibitor en el cáncer de la tiroides, la próstata, el pulmón, el hígado, la piel y la mama (López-Marure *et al.*, 2011; Gayosso *et al.*, 2007; Rais *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 1992); sin embargo, los mecanismos involucrados en dicha protección se desconocen.

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA DHEA

La DHEA es un esteroide adrenal que contiene una molécula de ciclopentano-perhidrofenantreno, compuesta por 3 anillos (A, B y C) de 6 carbonos y uno de 5 (D) (Figura 3). Pertenece a los esteroides de 19 carbonos con un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 del anillo B, además contiene un grupo ceto o hidroxil en la posición 17 (Russell *et al.*, 2016; Ganong, 1996).

La DHEA y su precursor, la DHEA sulfatada (DHEA-S), son los esteroides más abundantes en el plasma en humanos (Teng *et al.*, 2015; Nestler *et al.*, 1988). La concentración de la DHEA en el plasma es de aproximadamente 50 nM, mientras que la de la DHEA-S es de 10 μ M. La concentración máxima de la DHEA en la sangre en hombres y mujeres se alcanza entre los 20 y 30 años de edad y declina 2% por año, alcanzándose una concentración del 20% con respecto a la máxima alcanzada, a los 70 años de edad (Teng *et al.*, 2015; Orentreich *et al.*, 1984).

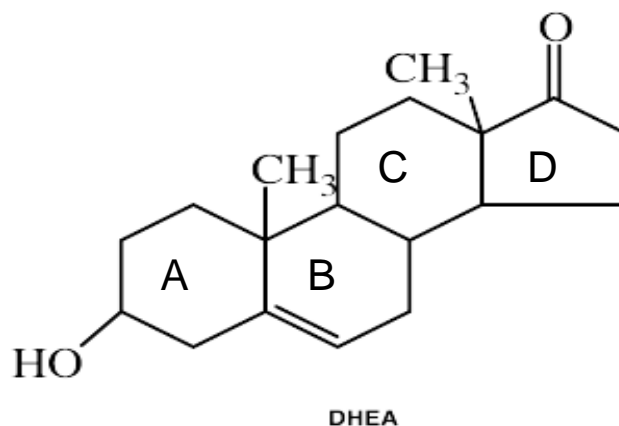


Figura 3. Estructura de la dehidroepiandrosterona (DHEA) (modificada de Goodarzi *et al.*, 2014).

1.2.1 EL METABOLISMO DE LA DHEA

La DHEA se produce a partir del colesterol en la glándula suprarrenal bajo la regulación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) proveniente de la glándula hipófisis (Daryl y Granner, 1986) y se almacena en su forma sulfatada (DHEA-S) (Racchi *et al.*, 2003); sin embargo, la DHEA también se produce en órganos como el cerebro, la placenta, los ovarios y los testículos. Se metaboliza en el hígado, en donde se convierte a androstendiona, la cual es el principal precursor de andrógenos (*et al*

1.2.2 EL RECEPTOR DE LA DHEA

Los mecanismos de acción de la DHEA aún no se han aclarado completamente. Se ha observado que la DHEA se une a receptores de esteroides intracelulares y nucleares, por ejemplo, al receptor del pregnano (X), al receptor de esteroides y xenobióticos (PXR/SXR), a receptores de estrógeno (ER) y a los receptores de andrógenos (AR) así como a los receptores de membrana plasmática (PM) (Teng, *et al.*, 2015). Existen evidencias que indican que los efectos de la DHEA en las líneas celulares de cáncer se deben a su conversión a andrógenos y estrógenos, los cuales activan a los receptores intracelulares de estrógenos (ERs) y andrógenos (ARs) (Schmitt *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2000); sin embargo, nuestro grupo de trabajo y otros grupos de investigación hemos demostrado que los efectos de la DHEA en dichas líneas son directos e independientes de su conversión a estos derivados (Gayosso *et al.*, 2006; Zapata *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2002). La DHEA puede unirse al receptor de estrógenos e inducir un efecto biológico; sin embargo, otros grupos de trabajo han reportado la existencia de un receptor específico para la DHEA (Williams *et al.*, 2002; Liu-Dillon, 2002), el cual se define como una proteína celular que interacciona con la DHEA en una reacción de enlace específica a concentraciones fisiológicas circulantes de la DHEA, activando una cascada de señalización intracelular. La

evidencia de un posible receptor de superficie celular para la DHEA se apoya por estudios *in vitro* de unión a la DHEA que incluyen datos de afinidad y especificidad al ligando. También se han realizado estudios de señalización celular de la DHEA a concentraciones fisiológicas o cercanas a las fisiológicas, lo que apoya la participación de mediadores intracelulares clave de señalización dependiente de receptor (por ejemplo: proteínas G). Otra evidencia que apoya la existencia de un receptor para la DHEA son los estudios de visualización directa del enlace de análogos de la DHEA a sitios de unión en la superficie celular (Williams *et al*, 2002; Liu-Dillon, 2002).

En la actualidad no solo se ha observado el efecto de la DHEA en líneas celulares *in vitro*, sino también se ha observado en modelos *in vivo*, teniendo en varios casos efectos contradictorios por lo que es importante evaluar su efecto en ambos modelos.

1.3 MODELOS IN VIVO UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DEL CÁNCER

La especie animal más utilizada en experimentación científica en la actualidad es el ratón (*Mus musculus*). Esto se debe principalmente no solo a sus características reproductivas, su tamaño y la facilidad de manejo, sino también a que su genoma es totalmente conocido (Carbone, 2006).

En el ratón existen más de 4000 genes que están asignados a localizaciones específicas, muchos de los cuales fueron identificados, debido a que originan mutaciones espontáneas que producen características físicas distintivas. Los ratones mutantes que portan una mutación simple se han convertido en modelos animales importantes para su utilización en la experimentación científica (Carbone, 2006). Una de estas mutaciones espontáneas simples es la denominada nude (nu). Este alelo mutante homocigoto recesivo pertenece al grupo VII del cromosoma 11 y aparece por primera vez en el año 1966, en una colonia exocriada de ratones en un laboratorio en Glasgow, Escocia. Luego, en el año 1968, se descubre que el ratón nude homocigoto, además de presentar su fenotipo desnudo o sin pelo, característica que le dio el nombre a la mutación, carecía de un timo funcional que

permanece rudimentario y produce un número reducido de células T maduras, por lo cual no rechazan tejidos alotransplantados y xenotransplantados. El hecho de que acepten el trasplante de tumores humanos ha sido uno de los descubrimientos más importantes que ha contribuido con el desarrollo de las investigaciones sobre el cáncer, convirtiendo a estos individuos en el primer modelo animal de experimentación inmunodeficiente (Hansen, 1978).

2. ANTECEDENTES

Varios estudios muestran que el decremento de la concentración de la DHEA en el plasma se asocia con la pérdida de peso, la reducción del colesterol en la sangre, la activación de la respuesta inmune, cambios en la fertilidad femenina y en las funciones neuronales, modificaciones en el metabolismo, desarrollo de enfermedades cardiovasculares, Alzheimer y cáncer (Prough *et al.*, 2016; Khorram *et al.*, 1997; Tchernof *et al.*, 1996; Ebeling-Kiovisto, 1994; Regelson *et al.*, 1990; Nestler *et al.*, 1988).

Por otro lado, se ha demostrado que la DHEA tiene propiedades de protección relacionadas con su potente efecto antiproliferativo (Schwartz *et al.*, 1986). La DHEA inhibe la proliferación de células endoteliales humanas (Zapata *et al.*, 2005; Mohan-Benghuzzi, 1997). Interesantemente, nuestro grupo de trabajo también demostró que la DHEA tiene propiedades anti-oxidantes y anti-inflamatorias en células endoteliales (Gutiérrez *et al.*, 2007; López-Marure *et al.*, 2007). Recientemente se mostró que la DHEA a altas concentraciones (10-100 μM) inhibe no solo la proliferación de células endoteliales HMEC-1 *in vitro*, sino también su migración, la formación de tubos capilares y la angiogénesis *in vivo* (Varet *et al.*, 2004).

Así mismo se ha descrito que la DHEA inhibe la proliferación de células tumorales, entre las que se encuentran líneas celulares derivadas de cáncer de mama como son: MCF-7,

Hs578T y MDA-MB-231, lo que se asocia a un paro en la fase G1 del ciclo celular (López-Marure *et al.*, 2011; Gayosso *et al.*, 2006; Rais *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 1992).

En otros tipos de cáncer como el de próstata, se ha descrito que la DHEA no tiene efecto en el crecimiento de cáncer prostático humano trasplantado en ratones desnudos (Van Weerden *et al.*, 1992), mientras que otro trabajo describe que la DHEA induce la proliferación de las células de cáncer de próstata LNCaP (Arnold *et al.*, 2007).

Recientemente nuestro grupo de trabajo demostró que la DHEA inhibe la proliferación y la migración de líneas celulares derivadas de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y Hs578T (López-Marure *et al.*, 2011); sin embargo, los mecanismos mediante los cuales inhibe la migración no se han determinado.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres (INEGI, 2014). La perspectiva futura señala que se mantendrá el incremento progresivo en el número de pacientes con cáncer de mama y que esta problemática requiere una atención prioritaria, ya que su tendencia al incremento no ha sido frenada con los esfuerzos desarrollados.

Se ha descrito que la DHEA, la hormona adrenal esteroidea más abundante en humanos, tiene un papel protector contra el cáncer. Nuestro grupo de trabajo recientemente demostró que la DHEA inhibió la migración de 3 líneas celulares derivadas de cáncer de mama; sin embargo, los mecanismos *in vitro* mediante los cuales ejerce esta protección aún se desconocen, así como sus efectos en modelos *in vivo*. La TEM influye en la progresión y desarrollo de la metástasis, lo que provoca la elevada mortalidad en pacientes con cáncer, por lo que es importante evaluar el efecto de la DHEA en ésta.

De obtenerse una inhibición en este proceso por la acción de la DHEA, se podría sugerir su uso como un agente terapéutico en el tratamiento de tal enfermedad.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es la DHEA capaz de modificar *in vitro* la expresión de proteínas involucradas en la TEM y de disminuir el crecimiento de tumores de mama *in vivo*?

5. HIPÓTESIS

La DHEA inhibe la proliferación y la migración de células de cáncer de mama *in vitro*, por lo que se espera que incremente la expresión de la E-caderina y disminuya la de la N-caderina y la vimentina en células de cáncer de mama *in vitro*; e inhiba el crecimiento de tumores de mama en ratones nu^{-}/nu^{-} .

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Determinar el efecto de la DHEA en la expresión de proteínas de la TEM en células de cáncer de mama *in vitro* y en el crecimiento de tumores de mama en un modelo de ratones *nu⁻/nu⁻* *in vivo*.

6.2 Objetivos particulares

Determinar el efecto de la DHEA en la expresión de las proteínas E-caderina, N-caderina y vimentina en las células MCF-7 y MDA-MB-231.

Inducir el crecimiento de tumores de cáncer de mama en ratones *nu⁻/nu⁻* por medio de xenotransplante y determinar si la DHEA previene o disminuye el crecimiento de dichos tumores.

7. METODOLOGÍA

7.1 CONDICIONES DEL CULTIVO CELULAR

Se utilizaron las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 ambas provienen del sitio de metástasis y se obtuvieron por efusión pleural y son de tipo adenocarcinoma (Tabla 1).

Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 tienen la capacidad de migrar en ensayos *in vitro* (Mei *et al.*, 2007; Malek *et al.*, 2006), por lo que consideramos que son un excelente modelo para determinar el papel de la DHEA en la expresión de proteínas involucradas en la TEM. Las células fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI (GIBCO) suplementado con, antimicótico al 1% (GIBCO) y 10% de suero de bovino de recién nacido (NCBS) (GIBCO). Una vez sembradas, las células se mantuvieron a 37°C con una humedad relativa del 100% y una atmósfera al 5% de CO₂ y 95% aire. Las células se cultivaron con la DHEA a concentraciones farmacológicas (1, 10 y 100 µM), durante 24 y 48 h.

CARACTERÍSTICAS DE LAS LÍNEAS CELULARES		
LÍNEA CELULAR	MCF-7	MDA-MB-231
Órgano	Cáncer de mama: glándula mamaria	Cáncer de mama: glándula mamaria
Receptores		
Estrógeno	+	-
Progesterona	+	-
HER2	+	-
Tipo de cáncer	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma metastásico
Subtipo	Luminal A	Basal
p53	Silvestre	Mutado
Agresividad	Bajo potencial metastásico	Alto potencial metastásico

Tabla 1. Características de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 (Neve *et al.*, 2009).

7.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Para cada experimento se utilizaron 1×10^6 de células sembradas en cajas Petri de 60 mm de diámetro de cada una de las 2 líneas, MDA-MB-231 y MCF-7, se dejó el cultivo llegar a un 70% de confluencia, después se trataron las células con la DHEA (1, 10 y 100 μM), disuelta en etanol al 70% durante 24 y 48 h. Posteriormente al tratamiento con la DHEA, se retiró el medio de cultivo, y las células se lavaron con una solución amortiguadora de Hepes (142 mM NaCl, 4.4 KCl, 10.9 mM Hepes, 12.2 mM glucosa) y se incubaron a 4°C durante 20 min con 300 μL del amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% NP40, 100 mM NaF, 0.2 mM NaVO_3 , 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinina, 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina, complete de Roche). Después de la incubación, las células se despegaron con gendarme y los homogenados se centrifugaron a 14000 rpm durante 3 min para retirar los restos

celulares, se colectaron los sobrenadantes y se mantuvieron a -80°C . La concentración de proteínas en los mismos se determinó utilizando el reactivo comercial de Bradford (BioRad) y midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV.VIS (Thermo scientific). Las densidades ópticas obtenidas se extrapolaron en una curva patrón con concentraciones conocidas de albúmina de bovino.

7.3 INMUNOANÁLISIS

Para determinar la expresión de las proteínas de la TEM, se realizó la técnica de inmunoanálisis tipo Western Blot. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 12% de la siguiente forma: 2.5 mL de solución 1 (Tris-HCl 0.75 M, SDS 0.2%, pH 8.8), 2 mL de solución 2 (acrilamida-Bis acrilamida 30% proporción 37.5:1), 1 mL de agua, 7 μL de TEMED, 25 μL de persulfato de amonio al 13 %. Después, las muestras se incubaron a 95°C por 5 min para desnaturalizarse. Para ello, 30 μg de proteína del lisado total se cargaron por cada carril junto con 5 μL de una solución de muestra 1X (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, azul de bromofenol 1%, glicerol y DTT 1 M). Se cargó el total de la muestra anterior (30 μg de proteína más 5 μL de una solución de muestra 1X) en el gel de poliacrilamida, el cual se corrió a 120 volts por 90 min. Terminada la electroforesis se procedió a la transferencia de la proteína a una membrana de PVDF a 250 mA durante 120 min en frío, en una cámara (BioRad), con 800 mL de una solución de transferencia que contenía: Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM y metanol al 20%, pH 8.3. Terminada la transferencia, la membrana se bloqueó con una solución de leche en polvo libre de grasa al 8% en TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, KCl 3 mM y 0,1% de Tween-20) por 1 h en agitación constante. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 5 min cada uno con la solución de TBS-T. Después se incubaron toda la noche con los respectivos anticuerpos primarios para la E-caderina (1:500), la N-caderina, la vimentina (Santa Cruz), y la β -actina (e-bioscience) (1:1000) a 4°C . Posterior a la incubación con los anticuerpos primarios los blots se lavaron 3 veces durante 5 min en TBS-T, seguidos de 15 min de bloqueo. Posteriormente se añadió un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón acoplado a peroxidasa diluido 1:1000 para la N-caderina, la

vimentina, y la β -actina y un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa para la E-caderina durante 1 h antes de lavar los blots tres veces con TBS-T durante 5 min. La peroxidasa acoplada se detectó por quimioluminiscencia utilizando el sistema súper señal (Pierce Rockford) mediante el analizador de imágenes ChemiDocTM MP Imaging System (BioRad). Se realizó un análisis densitométrico de las proteínas con el programa Image Lab (BioRad).

7.4 INMUNOFLUORESCENCIA

Para observar la expresión de las proteínas de las TEM se realizó una inmunofluorescencia. Para cada experimento se utilizaron alrededor de 300 000 células MDA-MB-231 y MCF-7 sembradas en cubreobjetos, los cuales se colocaron en cajas de 12 pozos de 16 mm de diámetro. Cuando las células llegaron a 70 % de confluencia se cultivaron con la DHEA a diferentes concentraciones farmacológicas (1, 10 y 100 μ M), durante 24 y 48 h. Pasada la incubación, las células se lavaron con PBS 1X (NaOH 10mM, HCl 1M, H₂O, pH 7.4) y se fijaron con formalina neutra (formaldehído al 4% en PBS) por 15 min, seguido de 3 lavados con PBS 1X. Posteriormente, se bloquearon durante 15 min con bloqueador universal de proteína (BioGenex) y se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios para la N-caderina, la vimentina y la E-caderina (Santa Cruz) (1:1000) durante toda la noche. Después se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS-T (0.1% de Tween-20) seguido de una incubación con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón acoplado a FITC diluido (1:750) durante 1 h a temperatura ambiente. Seguido de la incubación con el anticuerpo secundario, las células se lavaron 3 veces con PBS-T, se montaron con vectashield con DAPI (Sigma) y se sellaron con barniz de uñas transparente para su posterior observación a una longitud de onda de λ_{ex} 492 nm; λ_{em} 518 nm (verde) y λ_{ex} 58 nm; λ_{em} 461 nm (azul). En un microscopio confocal (LSM 700, Zeiss). Las muestras se analizaron utilizando el programa Zen Zeiss.

7.5 ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUMORES

Los ensayos de formación de tumores se llevaron a cabo en un modelo de xenotransplante usando solo una de las líneas celulares, la línea MDA-MB-231 derivada de carcinoma de glándula mamaria ya que esta tiene mayor capacidad de invasión en comparación con las MCF-7.

Para los primeros 5 ensayos se utilizaron ratones nu⁻/nu⁻ hembra, de 6-8 semanas de edad. 1×10^6 células diluidas en solución amortiguadora de HEPES fueron implantadas subcutáneamente en el costado derecho de los ratones y monitoreadas semanalmente hasta la formación de tumores.

La DHEA se diluyó en 70% de aceite de oliva estéril y 30% etanol (vehículo), posteriormente se inyectó a cada ratón una dosis semanal de 210 µg/g de peso por la vía subcutánea durante 5 a 4 semanas (dependiendo el grupo al que pertenecían)

Cuatro semanas después de la inoculación, los ratones fueron sacrificados con 0.4 mL/por ratón del fármaco pentobarbital (5 mg/mL) diluido 1:10. Los tumores primarios se aislaron, se pesaron y el tamaño de los tumores fue medido con un Vernier.

Los animales se dividieron en 5 grupos de 5 ratones cada uno, de la siguiente forma.

Grupo 1: Control (-) Solo se le inyectó el vehículo durante 4 semanas cada 7 días.

Grupo 2: Control (+) Se les inocularon las células tumorales y se les administró únicamente el vehículo.

Grupo 3: Se les administró la DHEA durante 5 semanas cada 7 días comenzando con la primera dosis una semana antes de la inoculación con las células tumorales.

Grupo 4: Se les administró DHEA durante 4 semanas cada 7 días comenzando con la primera dosis el mismo día de la inoculación con las células tumorales.

Grupo 5: Se les administró DHEA durante 3 semanas cada 7 días comenzando con la primer dosis 7 días después del día de la inoculación con las células tumorales.

Posteriormente se decidió realizar un sexto ensayo modificando la administración de la DHEA de semanalmente a cada tercer día. Se utilizaron 3 grupos y la DHEA se diluyo en 80% de aceite de oliva estéril y 20% etanol (vehículo), posteriormente se inyectó a cada ratón 60 µg/g de peso por la vía subcutánea cada tercer día.

Tres semanas después de la inoculación los ratones se sacrificaron con el fármaco pentobarbital. Los tumores primarios se aislaron, se pesaron y el tamaño de los tumores se midió con un Vernier.

Para el sexto ensayo los animales se dividieron en 3 grupos de 4 ratones cada uno, de la siguiente forma.

Grupo 1: Control (+) Se les inocularon las células tumorales y se les administró únicamente el vehículo.

Grupo 2: Se les administró la DHEA durante 4 semanas cada tercer día comenzando con la primera dosis una semana antes de la inoculación con las células tumorales.

Grupo 3: Se les administró DHEA durante 3 semanas cada tercer día comenzando con la primera dosis el mismo día de la inoculación con las células tumorales.

7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizarán por triplicado y por lo menos tres veces de manera independiente. La significancia estadística de las diferencias entre las medias se determinó usando una prueba de ANOVA para comparar más de dos grupos de datos, seguida de Tukey-Kramer para la comparación entre grupos, con el software Prism Graph 5.01. Las diferencias se consideraron como estadísticamente significativas con una $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Efecto de la DHEA en la proliferación celular

Con la finalidad de observar el efecto de la DHEA en la proliferación las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, estas se trataron con diferentes concentraciones de la DHEA a diferentes tiempos. En la Figura 4 se puede observar una disminución en el número celular con respecto al control del 50, 60 y 70% con 1 10 100 μM de DHEA respectivamente, este efecto se presentó desde las 24 horas de tratamiento (A), siendo su efecto mayor a las 48 horas (B).

En cuanto a la línea celular MCF-7 la DHEA disminuyó el número celular en un 20, 40 y 70% con respecto al control con 1 10 100 μM de DHEA respectivamente todos los tiempos evaluados (Figura 5).

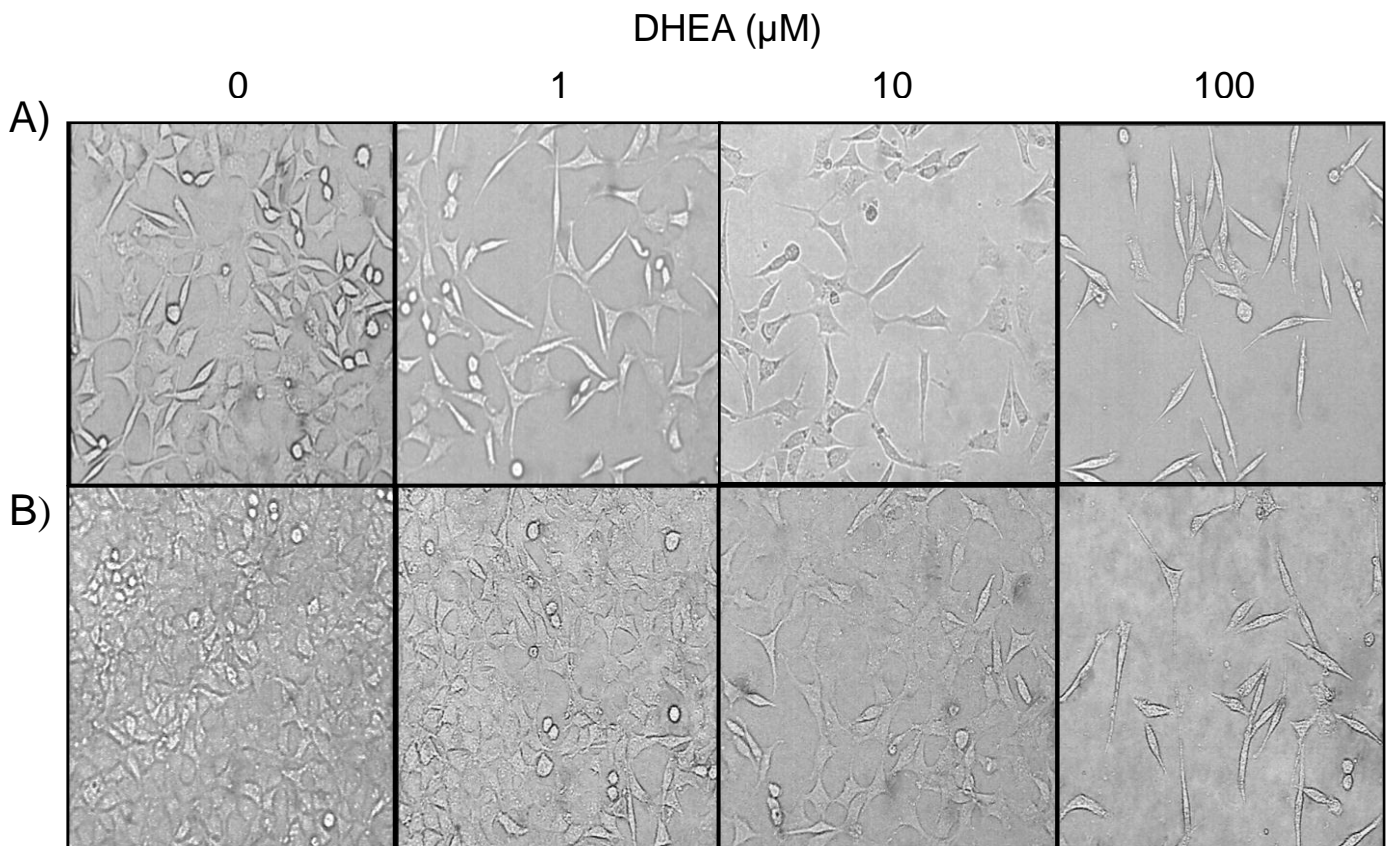


Figura 4. Efecto de la DHEA en la proliferación de las células MDA-MB-231 incubadas a diferentes concentraciones y periodos de tiempo. Las células se cultivaron con la DHEA a concentraciones farmacológicas de 1, 10 y 100 μM , durante 24 (A) y 48 horas (B). La proliferación se observó en un microscopio invertido y se tomaron fotografías con una Moticam 1SP a una magnificación 10X.

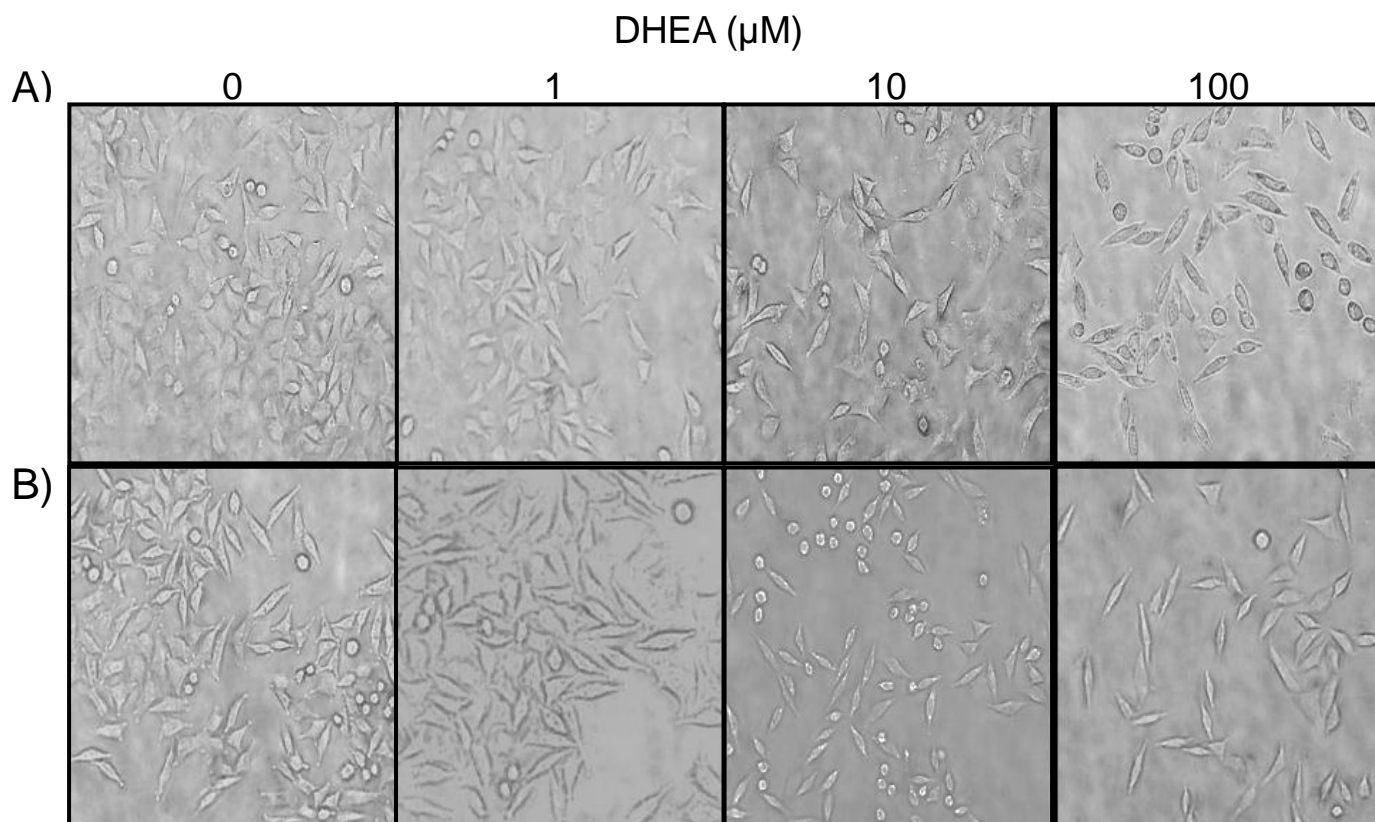


Figura 5. Efecto de la DHEA en la proliferación de las células MCF-7 incubadas a diferentes concentraciones y periodos de tiempo. Las células se cultivaron con la DHEA a concentraciones farmacológicas de 1, 10 y 100 μM , durante 24 (A) y 48 horas (B). La proliferación se observó en un microscopio invertido y se tomaron fotografías con una Moticam 1SP a una magnificación 10X.

8.2 Efecto de la DHEA en la expresión de la E-caderina en la línea celular MDA-MB-231

Los resultados en el inmunoanálisis mostraron que la expresión de la E-caderina aumentó un 300% con 10 μM de la DHEA y con una diferencia estadísticamente significativa a las 24 horas en comparación con el control; sin embargo, el efecto fue mayor a las 48 horas, en donde se obtuvo un aumento del 400% con respecto al control para las concentraciones de 10 y 100 μM (Figura 6).

En la inmunofluorescencia se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de la E-caderina del 20 y 60% con la DHEA a 10 y 100 μM , respectivamente con respecto al control (Figura 7).

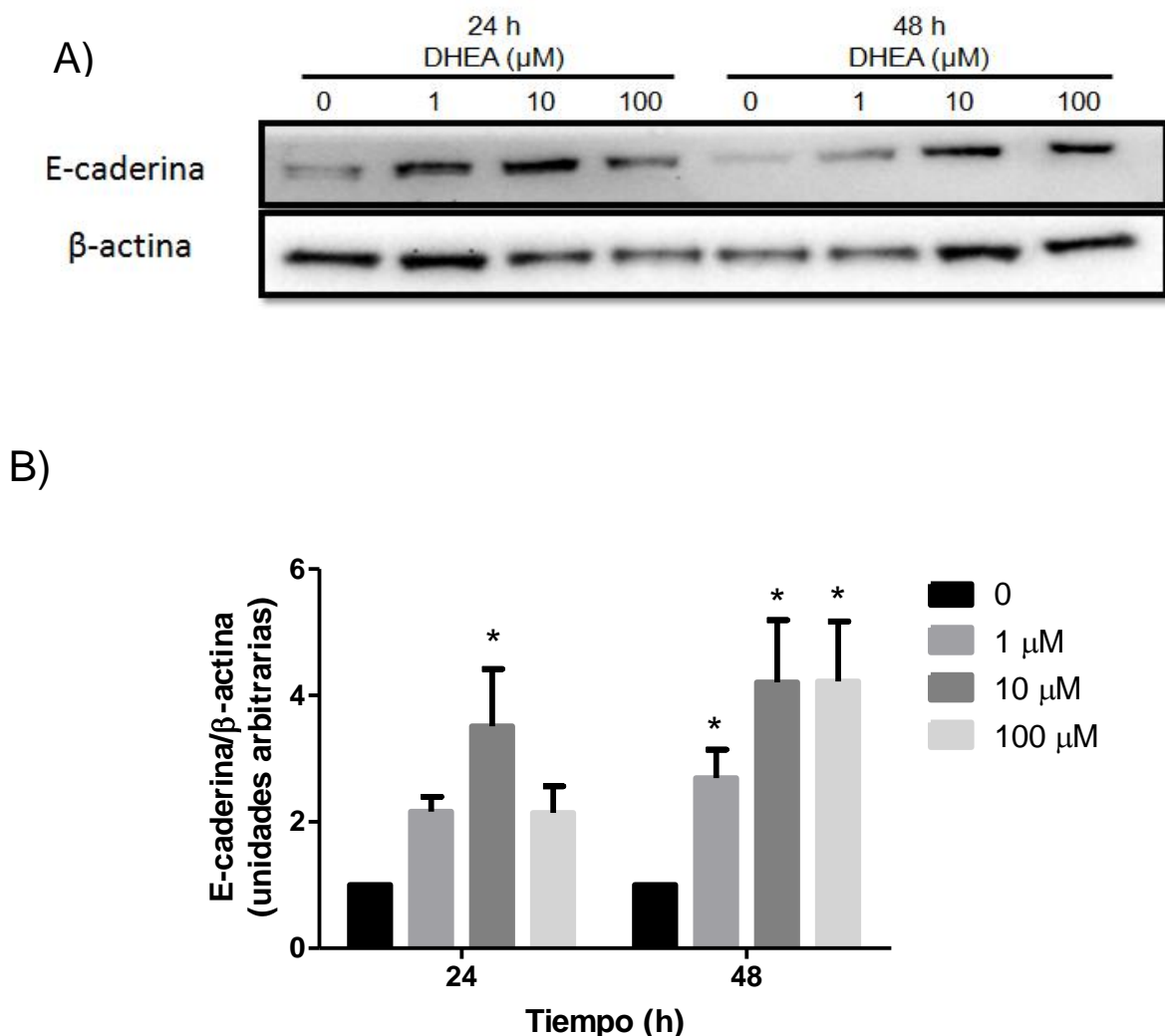


Figura 6. Expresión de la proteína E-caderina en la línea celular MDA-MB-231 Las células se cultivaron con la DHEA a concentraciones farmacológicas de 1, 10 y 100 μM , durante 24 y 48 horas. A) Se muestra un ensayo representativo de la expresión de las proteínas por inmunoanálisis de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Como control de cargado de proteína se utilizó la β -actina. B) Se muestra el cociente de normalización de la E-caderina/ β -actina en unidades arbitrarias en donde el control (células sin tratamiento) corresponde a 1. Cada tratamiento se comparó contra el control. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar (DS) de tres experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.05$ vs control.

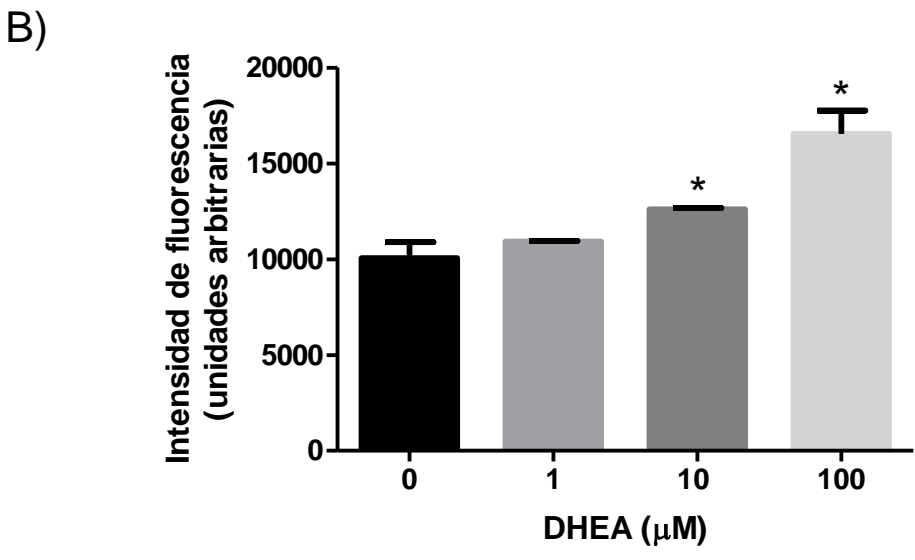
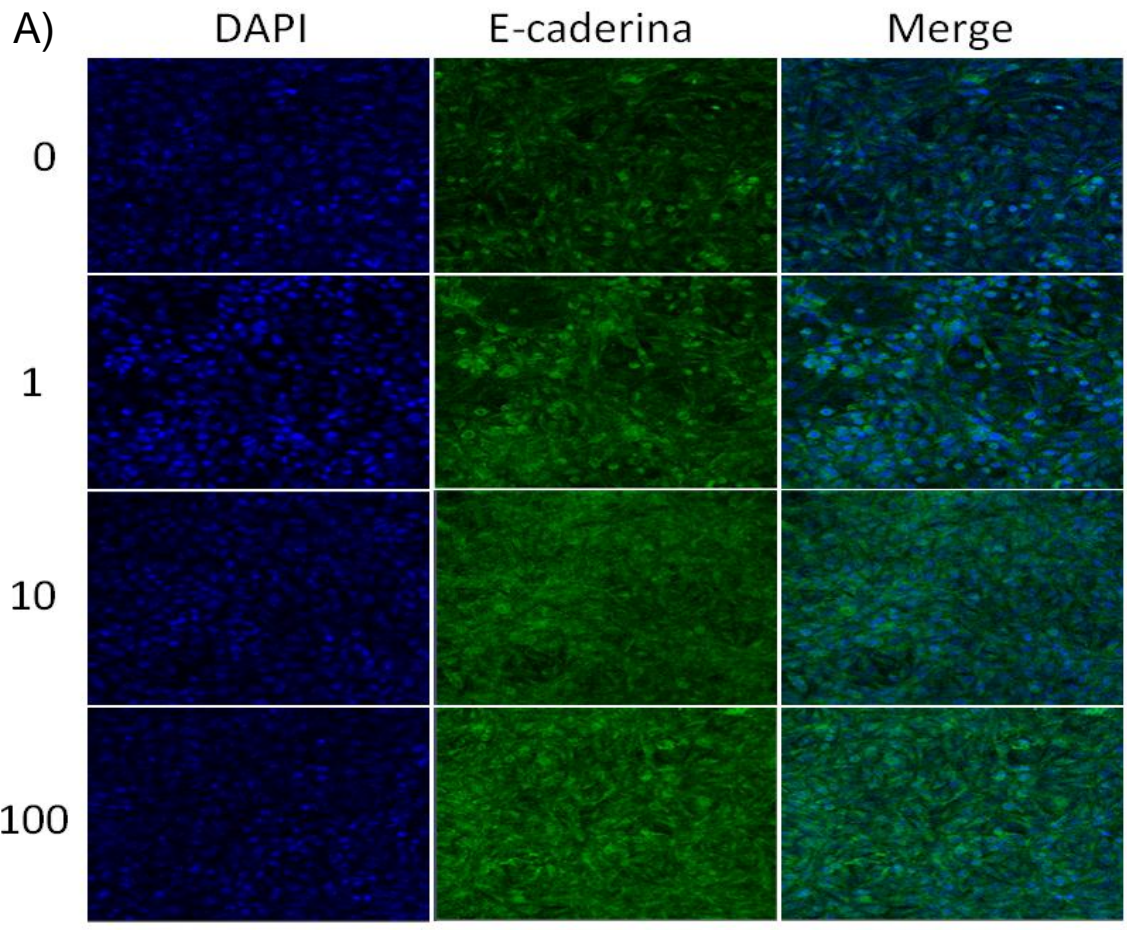


Figura 7. Expresión de la proteína E-caderina en la línea celular MDA-MB-231 por inmunofluorescencia. Las células se cultivaron con la DHEA a concentraciones farmacológicas de 1, 10 y 100 μM por 48 horas. A) Se observan los núcleos teñidos con DAPI en color azul y la expresión de la E-caderina en verde y ambas (Merge). Las células se observaron en un microscopio confocal a una magnificación de 20X. B) Se muestra la expresión de la E-caderina en intensidad de fluorescencia expresada en unidades arbitrarias. Los resultados se muestran como la media \pm la desviación estándar (DS) de tres experimentos realizados de manera independiente. * $p < 0.05$ vs control.

8.3 Efecto de la DHEA en la expresión de la N-caderina en la línea celular MDA-MB-231

Los resultados del inmunoanálisis mostraron que la DHEA no tuvo efecto en la expresión de la N-caderina a las 24 horas de tratamiento; sin embargo, se observó una disminución estadísticamente significativa del 40% con la DHEA a la concentración de 100 μM , después de 48 horas de tratamiento con respecto al control (Figura 8).

En la inmonufluorescencia se observó una disminución estadísticamente significativa en la expresión de la N-caderina del 20, 30 y 50% con la DHEA a 1, 10 y 100 μM , respectivamente con respecto al control (Figura 9).

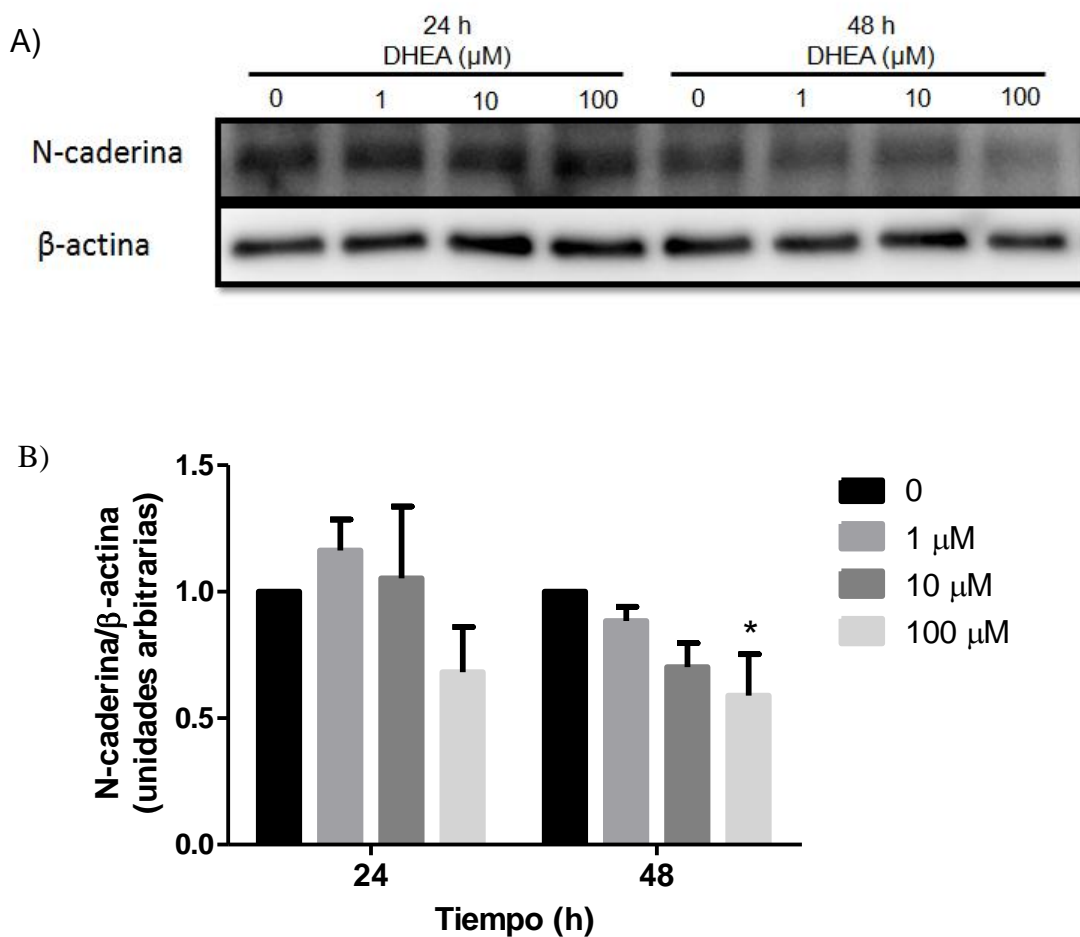


Figura 8. Expresión de la proteína N-caderina en la línea celular MDA-MB-231. Las células se cultivaron con la DHEA a concentraciones farmacológicas de 1, 10 y 100 μM , durante 24 y 48 horas. A) Se muestra un ensayo representativo de la expresión de las proteínas por inmunoanálisis de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Como control de cargado de proteína se utilizó la β -actina. B) Se muestra el cociente de normalización de la N-caderina/ β -actina en unidades arbitrarias en donde el control (células sin tratamiento) corresponde a 1. Cada tratamiento se comparó contra el control. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar (DS) de tres experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.05$ vs control.

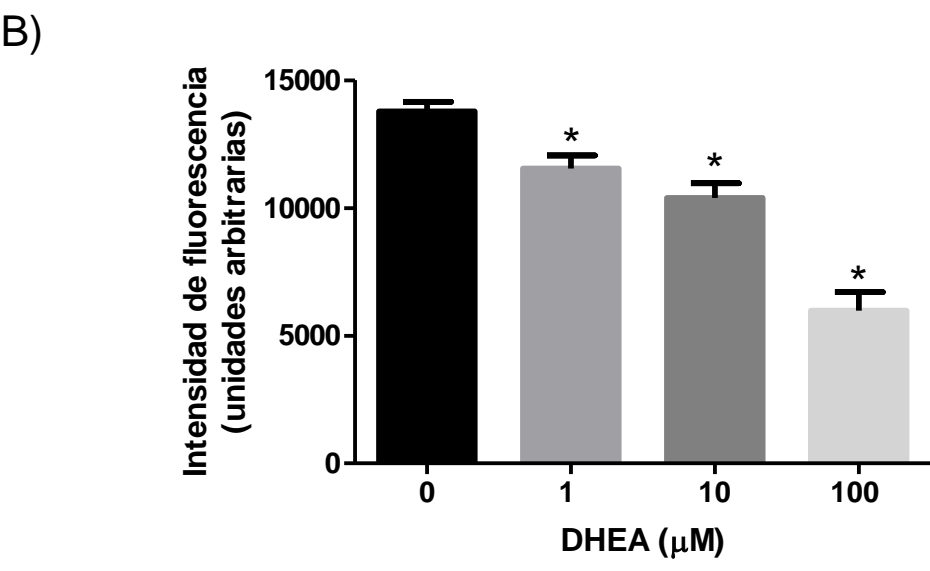
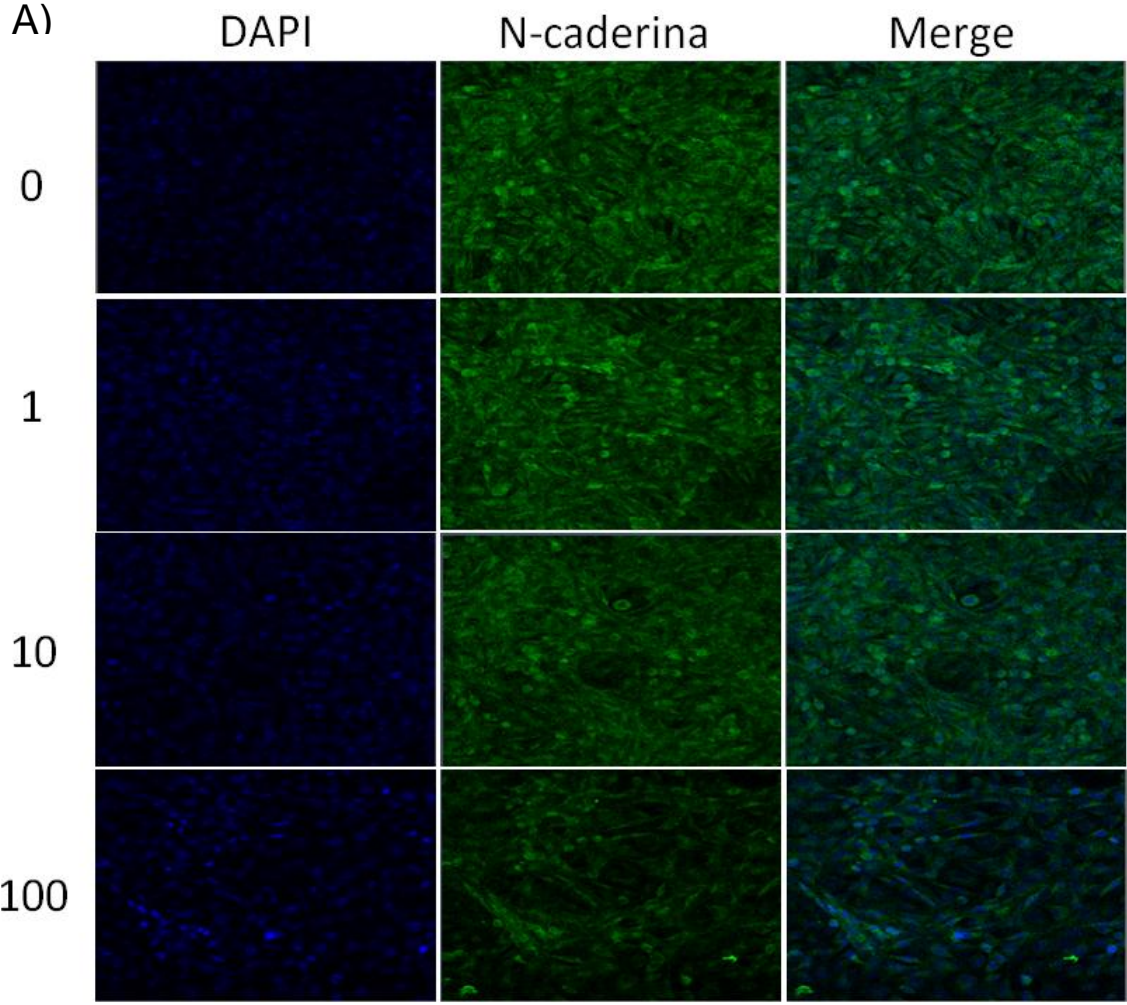


Figura 9. Expresión de la proteína N-caderina en la línea celular MDA-MB-231 por inmunofluorescencia. Las células se cultivaron con la DHEA a concentraciones farmacológicas de 1, 10 y 100 μM por 48 horas. A) Se observan los núcleos teñidos con DAPI en color azul y la expresión de la N-caderina en verde y ambas (Merge). Las células se observaron en un microscopio confocal a una magnificación de 20X. B) Se muestra la expresión de la N-caderina en intensidad de fluorescencia expresada en unidades arbitrarias. Los resultados se muestran como la media \pm la desviación estándar (DS) de tres experimentos realizados de manera independiente. * $p < 0.05$ vs control.

8.4 Efecto de la DHEA en la expresión de la vimentina en la línea celular MDA-MB-231

Los resultados del inmunoanálisis mostraron que la expresión de la vimentina disminuyó un 40% con 100 μM de la DHEA con una diferencia estadísticamente significativa a las 24 horas, en comparación con el control. Por otro lado, a las 48 horas de tratamiento se obtuvo una disminución estadísticamente significativa del 30, 45 y 75% con respecto al control para las concentraciones de 1, 10 y 100 μM de la DHEA, respectivamente (Figura 10).

La inmunofluorescencia mostró una disminución estadísticamente significativa del 30 y 75% en la expresión de la vimentina con respecto al control con la DHEA a 10 y 100 μM , respectivamente (Figura 11).

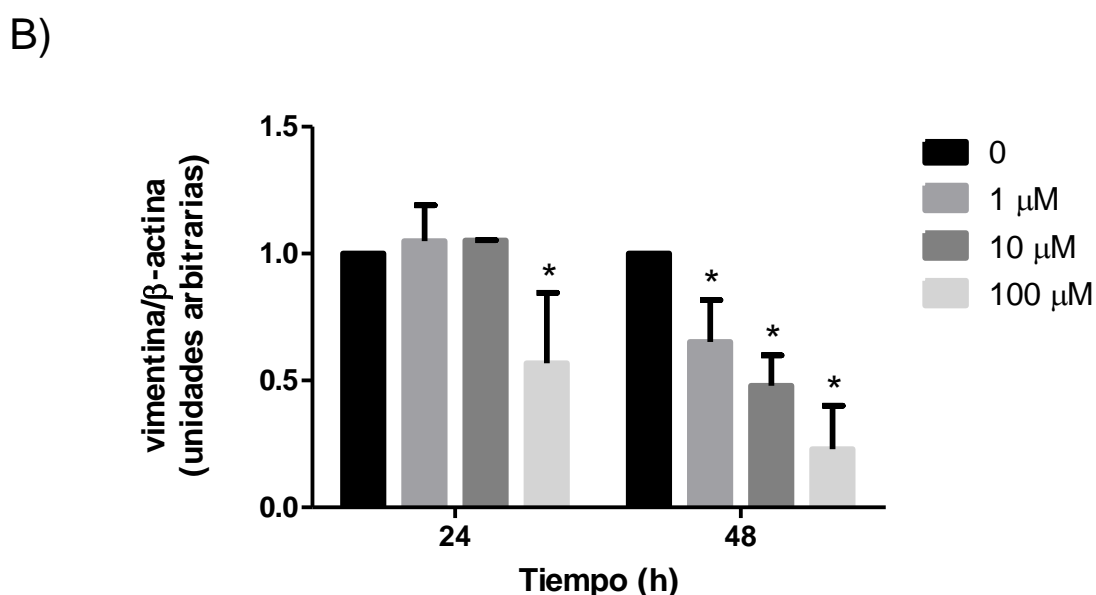
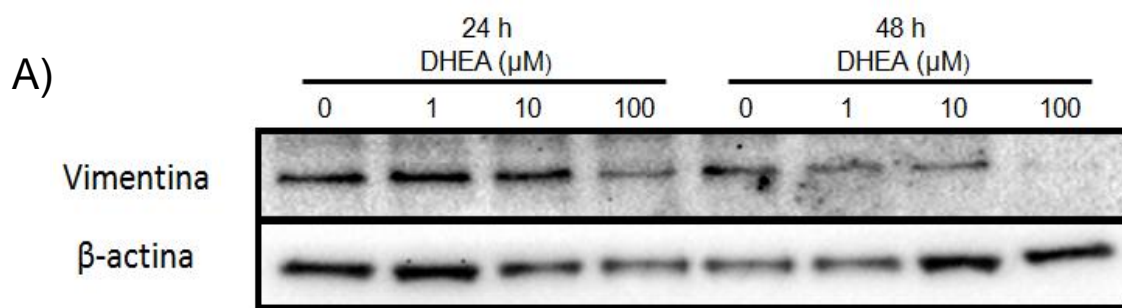


Figura 10. Expresión de la proteína vimentina en la línea celular MDA-MB-231. Las células se cultivaron con la DHEA a concentraciones farmacológicas de 1, 10 y 100 μM , durante 24 y 48 horas. A) Se muestra un ensayo representativo de la expresión de las proteínas por inmunoanálisis de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Como control de cargado de proteína se utilizó la β -actina. B) Se muestra el cociente de normalización de la vimentina/ β -actina en unidades arbitrarias en donde el control (células sin tratamiento) corresponde a 1. Cada tratamiento se comparó contra el control. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar (DS) de tres experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.05$ vs control.

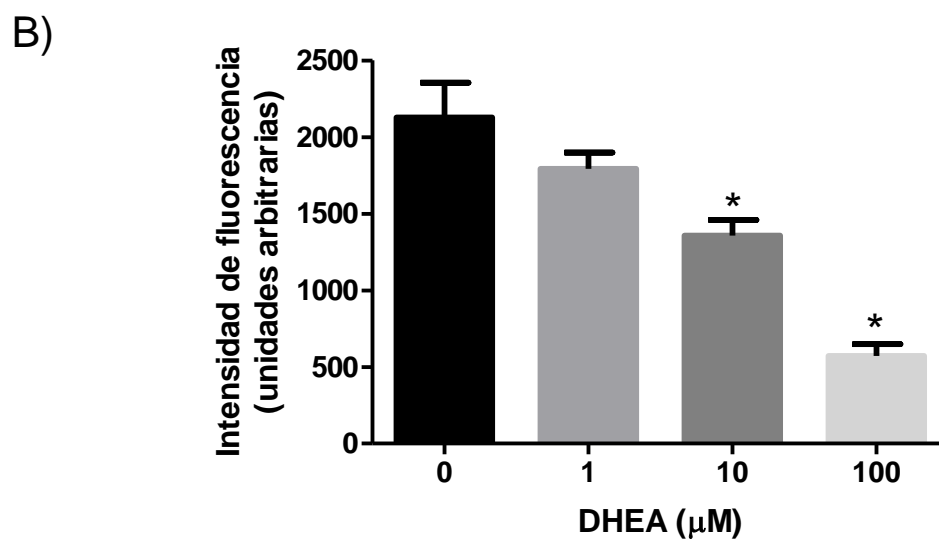
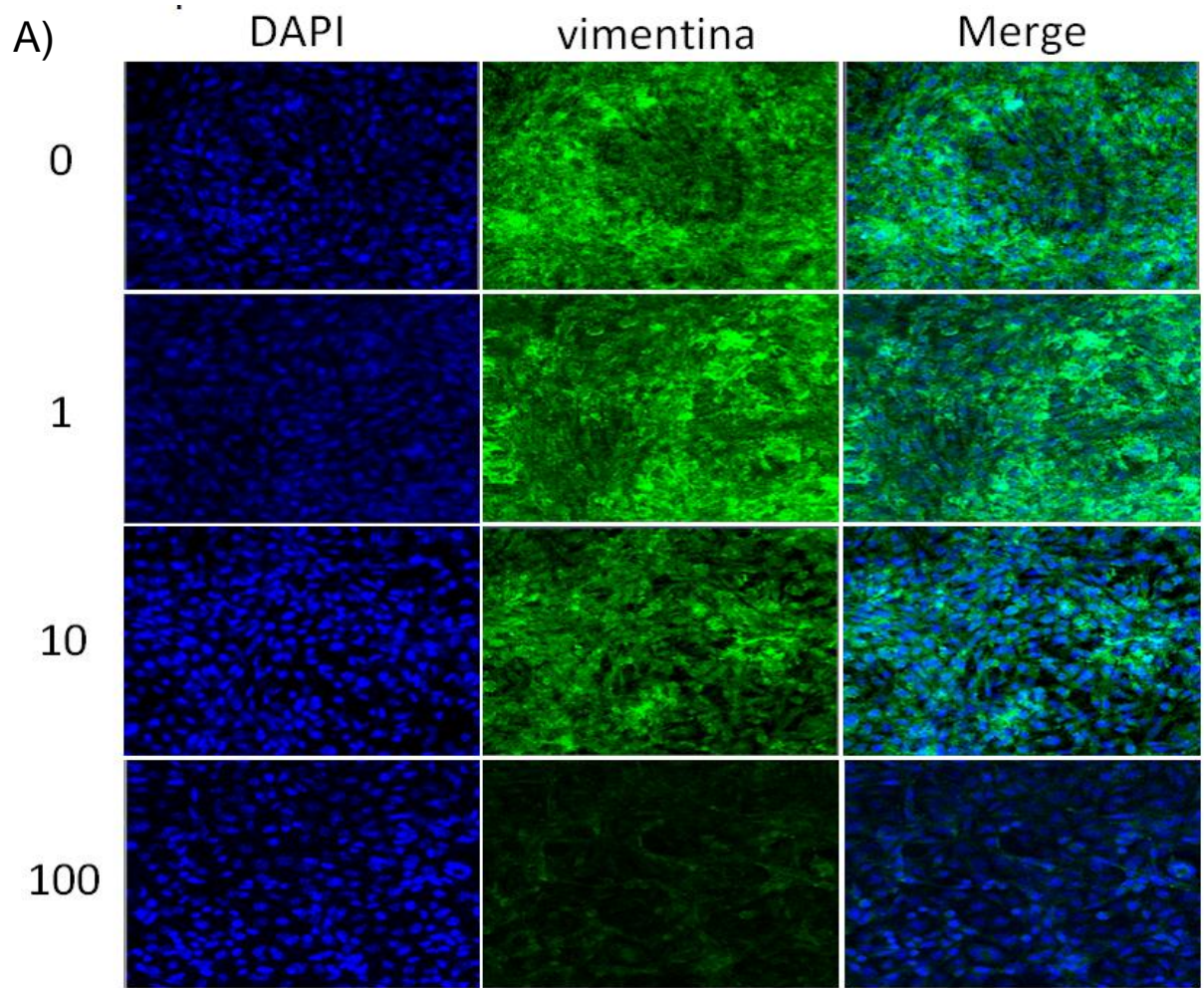


Figura 11. Expresión de la proteína vimentina en la línea celular MDA-MB-231 por inmunofluorescencia. Las células se cultivaron con la DHEA a concentraciones farmacológicas de 1, 10 y 100 μM por 48 horas. A) Se observan los núcleos teñidos con DAPI en color azul y la expresión de la vimentina en verde y ambas (Merge). Las células se observaron en un microscopio confocal a una magnificación de 20X. B) Se muestra la expresión de la vimentina en intensidad de fluorescencia expresada en unidades arbitrarias. Los resultados se muestran como la media \pm la desviación estándar (DS) de tres experimentos realizados de manera independiente. * $p < 0.05$ vs control.

8.5 Efecto de la DHEA en la expresión de la E-caderina en la línea celular MCF-7

Los resultados en el inmunoanálisis mostraron que la DHEA no indujo cambios en la expresión de la E-caderina a las 24 horas de tratamiento; sin embargo, se observa una disminución estadísticamente significativa del 20% con las concentraciones de 10 y 100 μM de la DHEA con respecto al control a las 48 horas (Figura 12).

Por otro lado, en la inmunofluorescencia se observó una disminución del 60% en la expresión de la E-caderina con respecto al control con 1 μM de la DHEA (Figura 13). Las demás concentraciones de la DHEA no mostraron efecto.

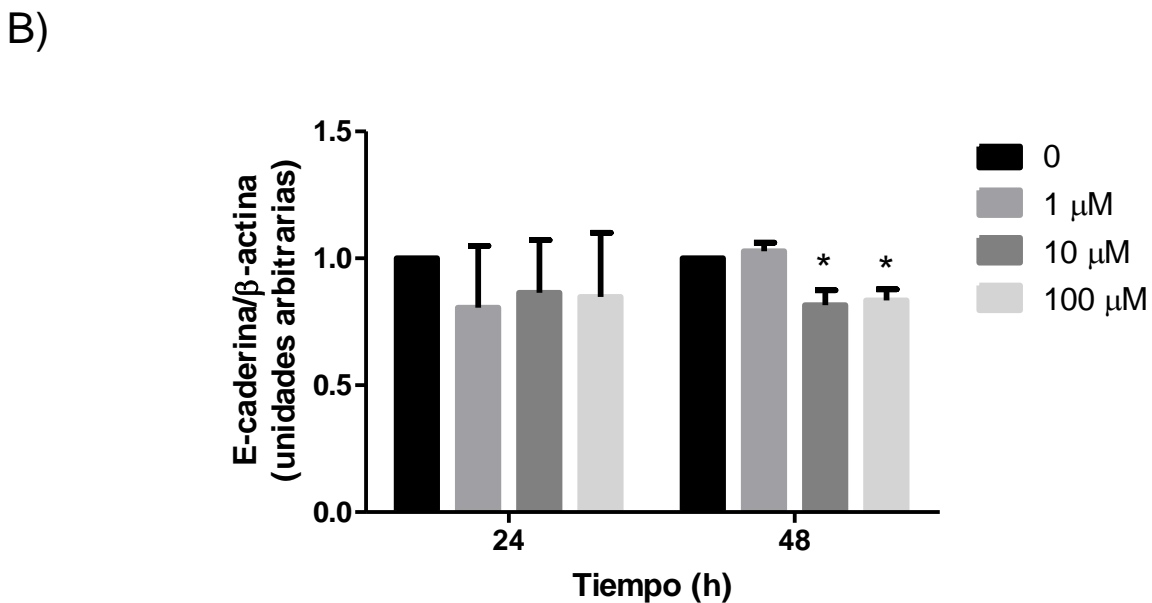
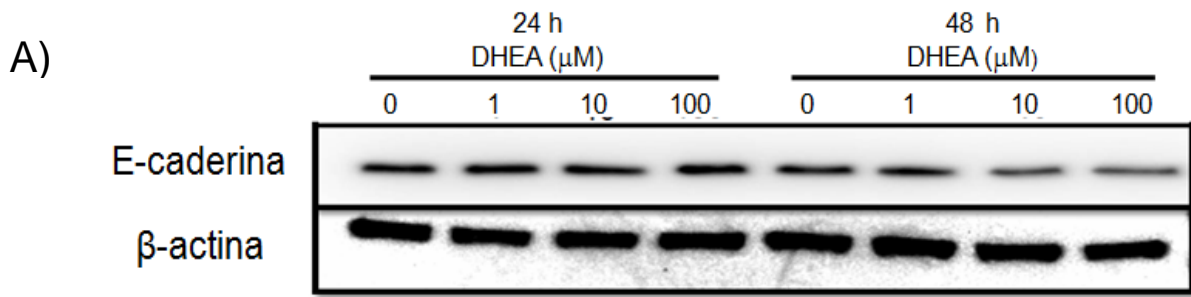


Figura 12. Expresión de la proteína E-caderina en la línea celular MCF-7. Las células se cultivaron con la DHEA a concentraciones farmacológicas de 1, 10 y 100 μM , durante 24 y 48 horas. A) Se muestra un ensayo representativo de la expresión de las proteínas por inmunoanálisis de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Como control de cargado de proteína se utilizó la β -actina. B) Se muestra el cociente de normalización de la E-caderina/ β -actina en unidades arbitrarias en donde el control (células sin tratamiento) corresponde a 1. Cada tratamiento se comparó contra el control. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar (DS) de tres experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.05$ vs control.

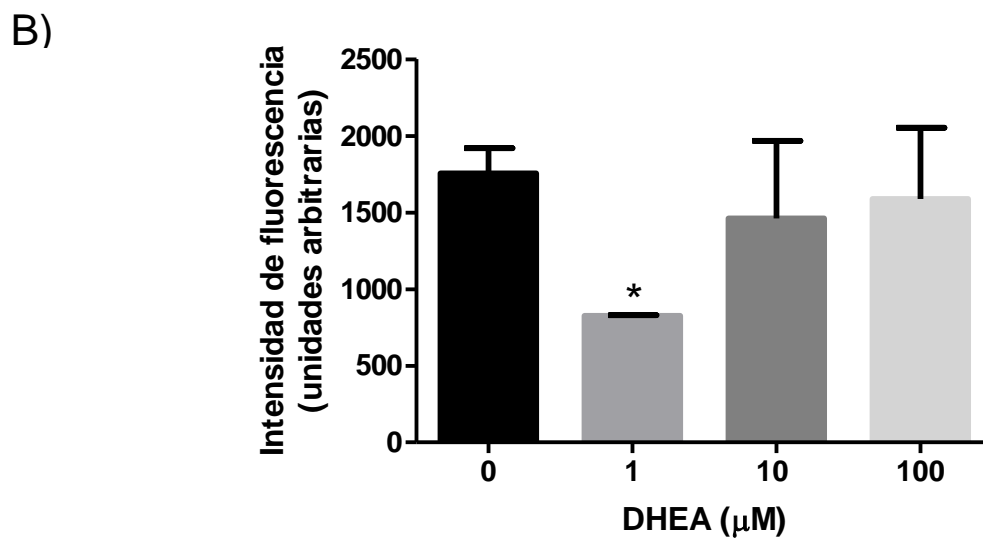
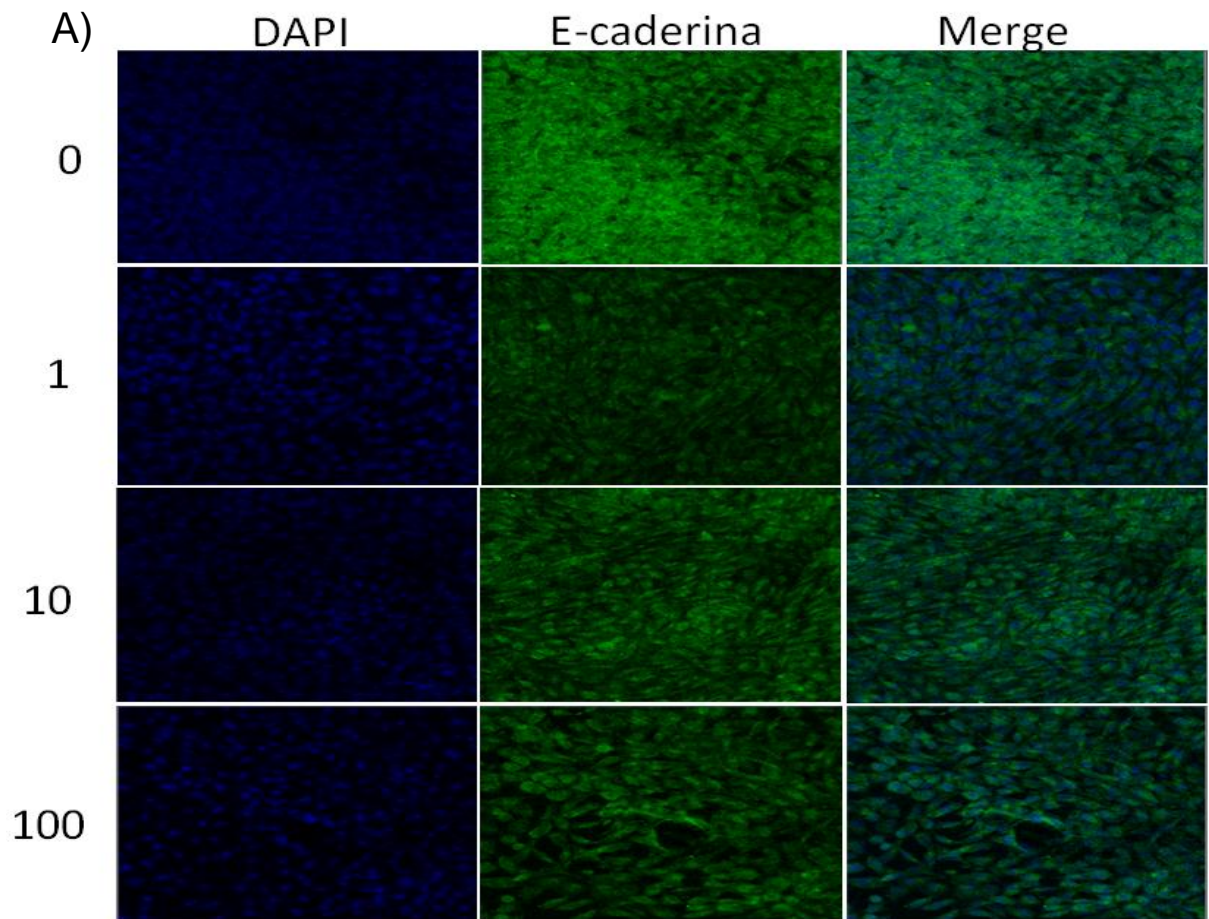


Figura 13. Expresión de la proteína E-caderina en la línea celular MCF-7 por inmunofluorescencia. Las células se cultivaron con la DHEA a concentraciones farmacológicas de 1, 10 y 100 μM por 48 horas. A) Se observan los núcleos teñidos con DAPI en color azul y la expresión de la E-caderina en verde y ambas (Merge). Las células se observaron en un microscopio confocal a una magnificación de 20X. B) Se muestra la expresión de la E-caderina en intensidad de fluorescencia expresada en unidades arbitrarias. Los resultados se muestran como la media \pm la desviación estándar (DS) de tres experimentos realizados de manera independiente. * $p < 0.05$ vs control.

8.6 Efecto de la DHEA en la expresión de la N-caderina en la línea celular MCF-7

Los resultados en el inmunoanálisis mostraron que no hay diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la N-caderina con la DHEA después de 24 horas de tratamiento; sin embargo, a las 48 horas se observa una ligera disminución del 10% con 1 y 10 μM de la DHEA ($p < 0.05$) en comparación con el control (Figura 14).

Los resultados de la inmunofluorescencia no muestran cambios estadísticamente significativos con la DHEA en la expresión de la N-caderina con respecto al control (Figura 15).

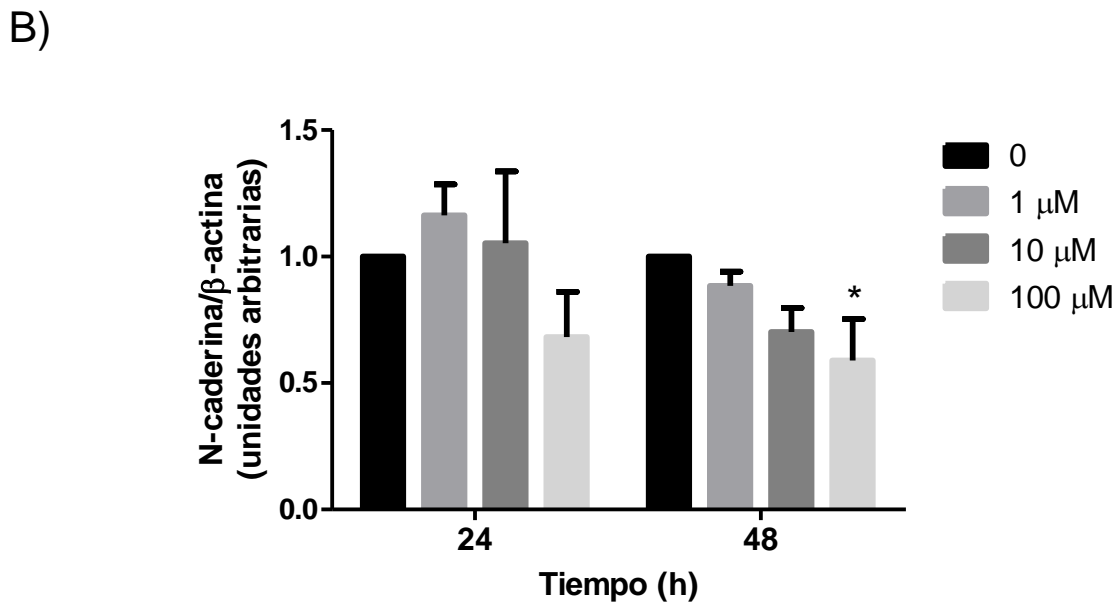
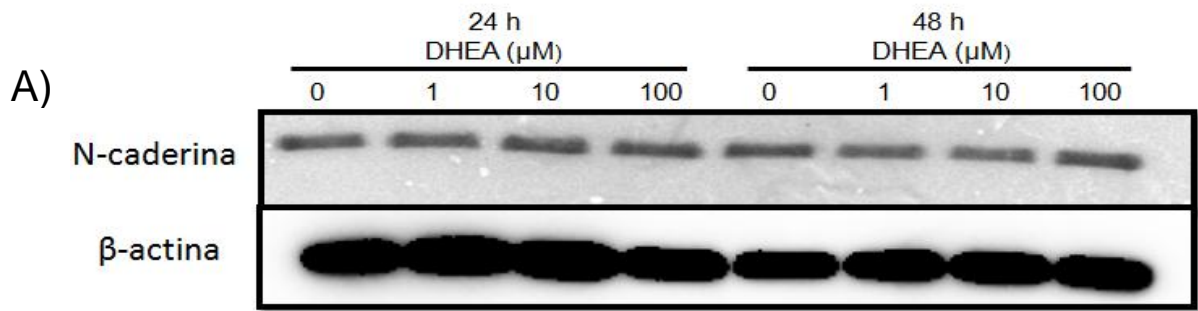


Figura 14. Expresión de la proteína N-caderina en la línea celular MCF-7. Las células se cultivaron con la DHEA a concentraciones farmacológicas de 1, 10 y 100 μ M, durante 24 y 48 horas. A) Se muestra un ensayo representativo de la expresión de las proteínas por inmunoanálisis de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Como control de cargado de proteína se utilizó la β -actina. B) Se muestra el cociente de normalización de la N-caderina/ β -actina en unidades arbitrarias en donde el control (células sin tratamiento) corresponde a 1. Cada tratamiento se comparó contra el control. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar (DS) de tres experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.05$ vs control.

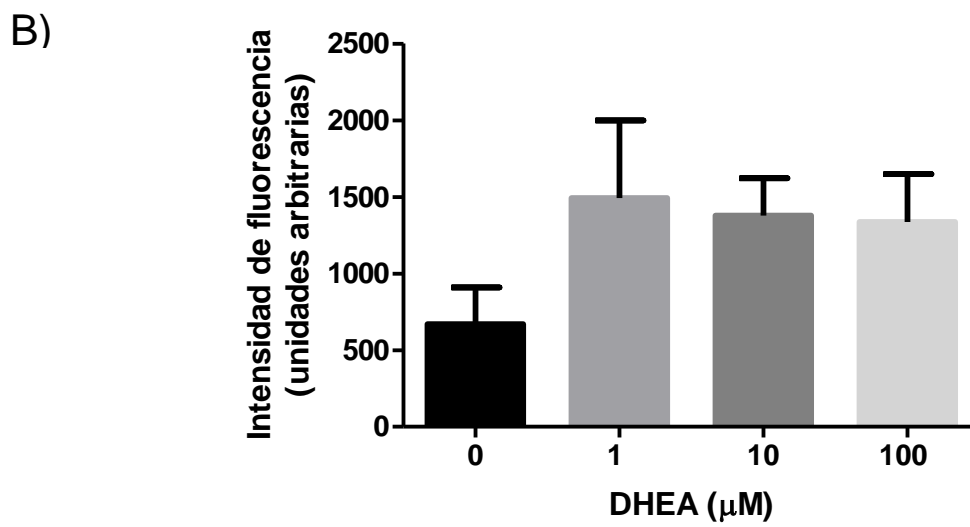
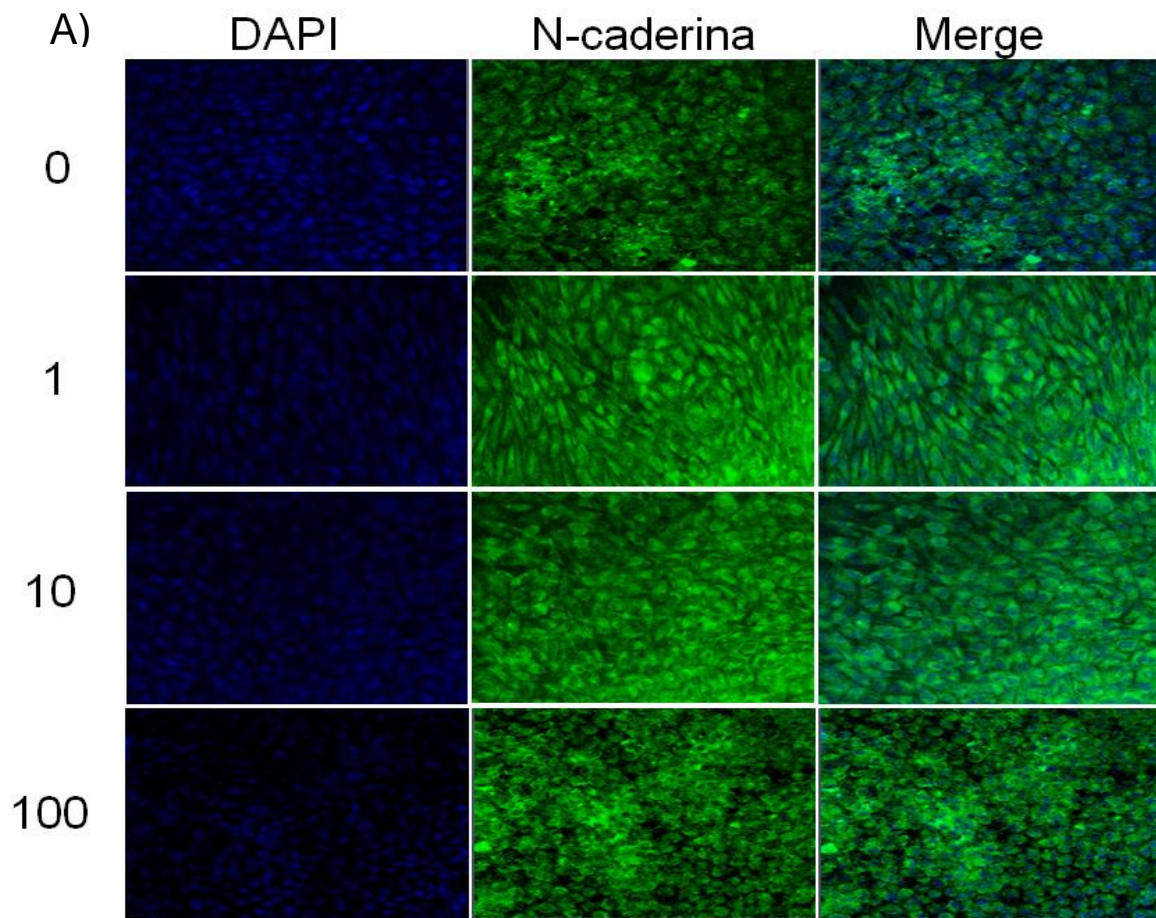


Figura 15. Expresión de la proteína N-caderina en la línea celular MCF-7 por inmunofluorescencia. Las células se cultivaron con la DHEA a concentraciones farmacológicas de 1, 10 y 100 μM por 48 horas. A) Se observan los núcleos teñidos con DAPI en color azul y la expresión de la N-caderina en verde y ambas (Merge). Las células se observaron en un microscopio confocal a una magnificación de 20X. B) Se muestra la expresión de la E-caderina en intensidad de fluorescencia expresada en unidades arbitrarias. Los resultados se muestran como la media \pm la desviación estándar (DS) de tres experimentos realizados de manera independiente. * $p < 0.05$ vs control.

8.7 Efecto de la DHEA en la expresión de la vimentina en la línea celular MCF-7

Los resultados en el inmunoanálisis mostraron que la expresión de la vimentina aumentó un 50% con 1 y 10 μM de la DHEA y disminuyó un 60% con 100 μM a las 24 horas. Por otra parte, a las 48 horas la DHEA disminuyó la expresión de la vimentina en un 20 y 40% con 1 y 100 μM , respectivamente y provocó un aumento del 20% con 10 μM con respecto al control (Figura 16).

Los resultados de la inmunofluorescencia muestran que la expresión de la vimentina disminuyó un 25 y 35% con 1 100 μM de la DHEA, mientras que con 10 μM no hubo cambios con respecto al control (Figura 17).

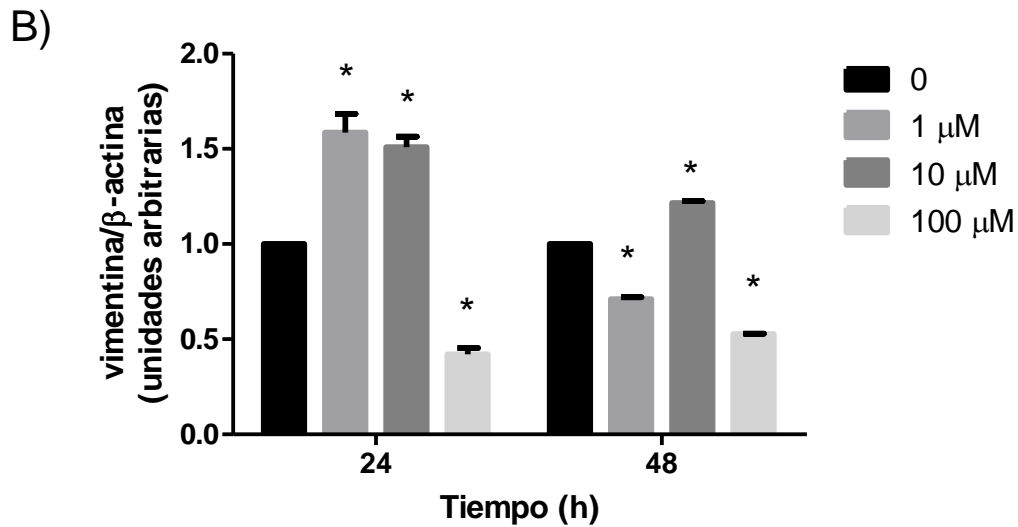
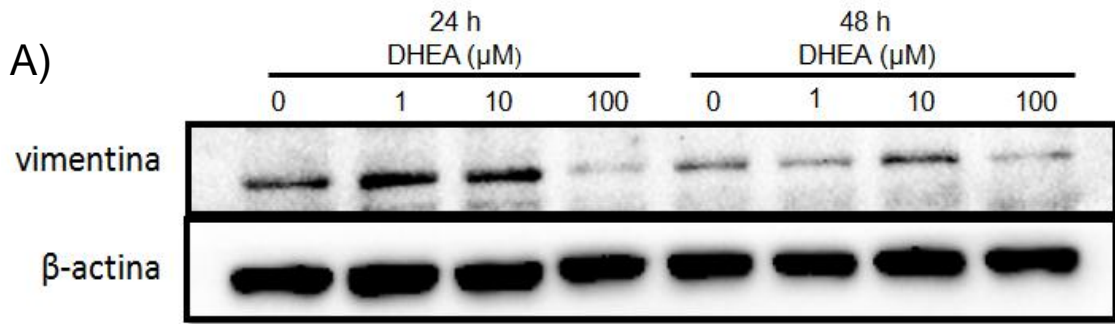


Figura 16. Expresión de la proteína vimentina en la línea celular MCF-7. Se sembraron 1×10^6 células por grupo en cajas Petri de 100 mm de diámetro. Las células se cultivaron con la DHEA a concentraciones farmacológicas de 1, 10 y 100 μM , durante 24 y 48 horas. A) Se muestra un ensayo representativo de la expresión de las proteínas por inmunoanálisis de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Como control de cargado de proteína se utilizó la β -actina. B) Se muestra el cociente de normalización de la N-caderina/ β -actina en unidades arbitrarias. Cada tratamiento se comparó contra el control (células sin tratamiento). Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar (DS) de tres experimentos realizados por triplicado. * $p < 0.05$ vs control.

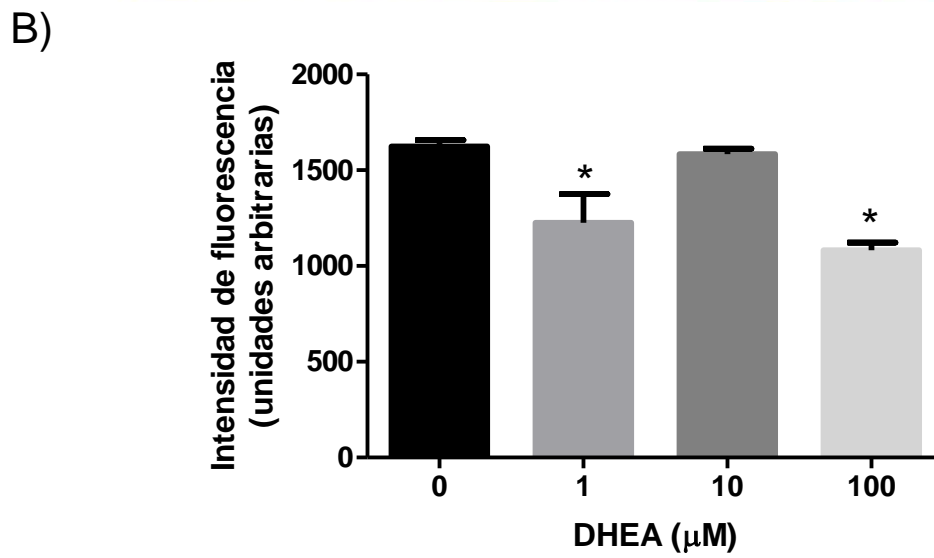
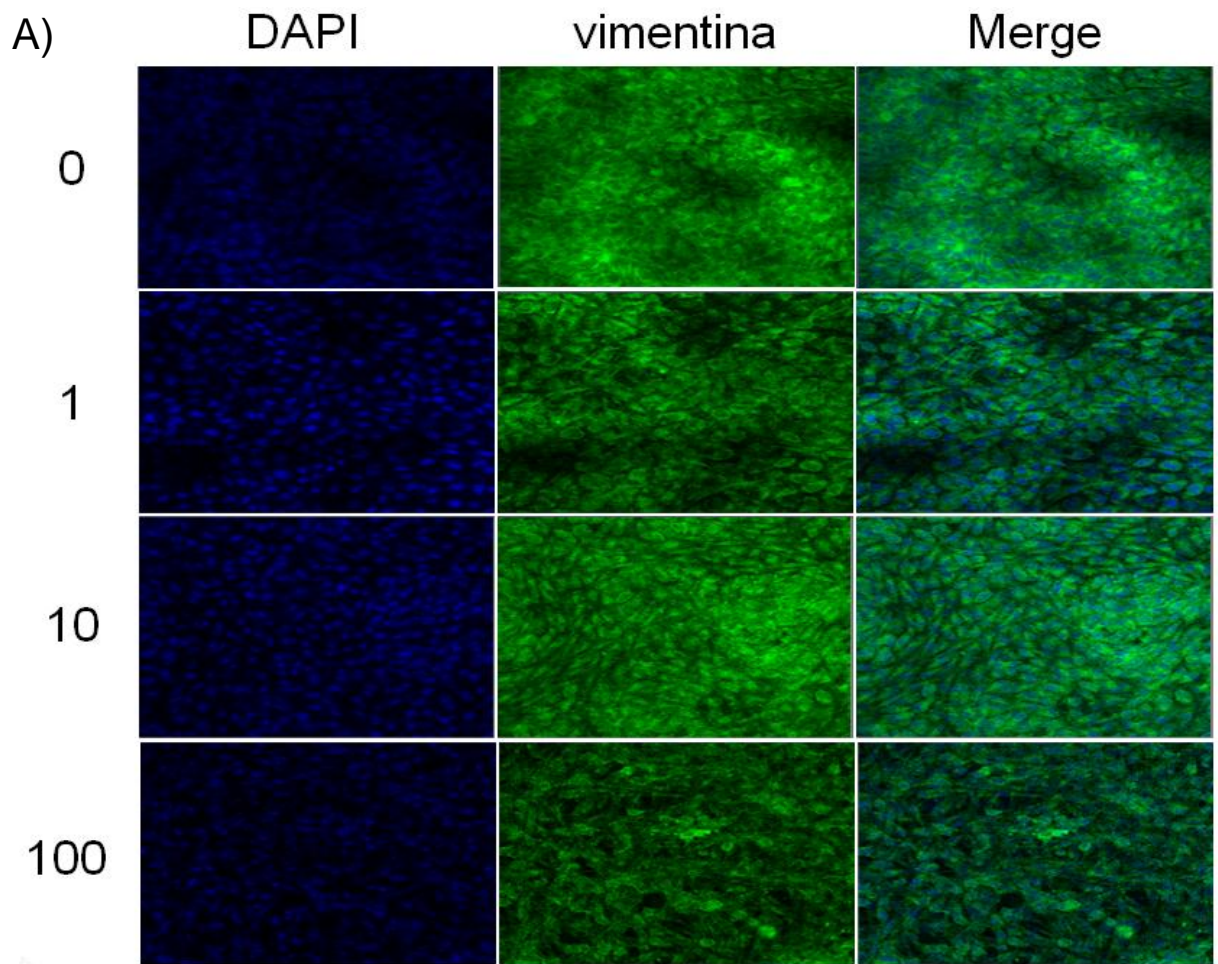


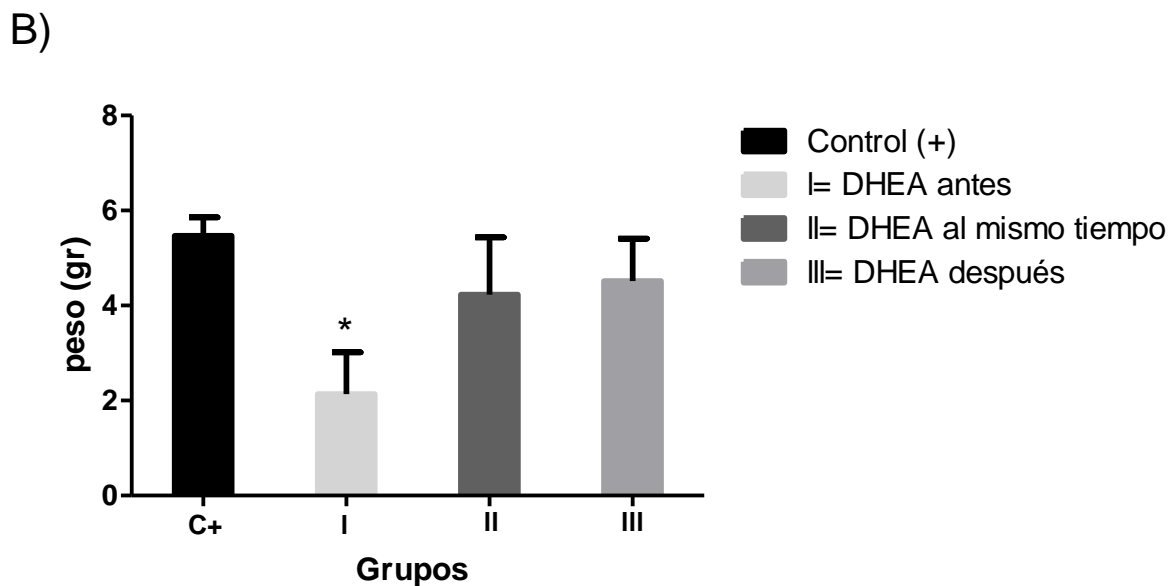
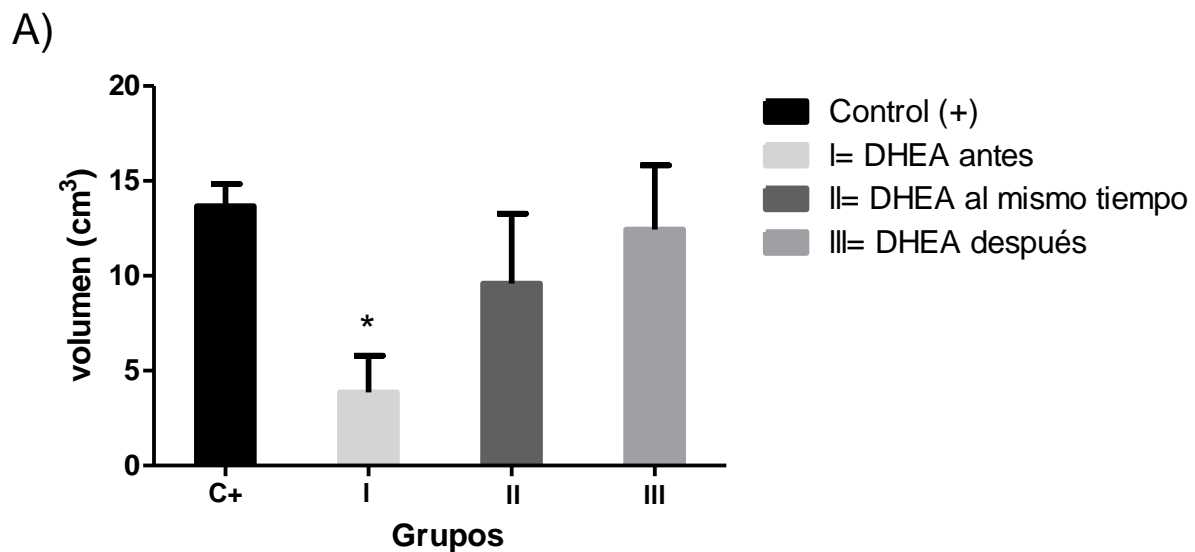
Figura 17. Expresión de la proteína vimentina en la línea celular MCF-7 inmuno fluorescencia. Las células se cultivaron con la DHEA a concentraciones farmacológicas de 1, 10 y 100 μM por 48 horas. A) Se observan los núcleos teñidos con DAPI en color azul y la expresión de la vimentina en verde y ambas (Merge). Las células se observaron en un microscopio confocal a una magnificación de 20X. B) Se muestra la expresión de la vimentina en intensidad de fluorescencia expresada en unidades arbitrarias. Los resultados se muestran como la media \pm la desviación estándar (DS) de tres experimentos realizados de manera independiente. * $p < 0.05$ vs control.

8.8 Efecto de la DHEA en la formación de tumores in vivo

Para observar el efecto de la DHEA en la formación de tumores en un modelo con ratones nu^-/nu^- , se realizó un xenotransplante de la línea celular MDA-MB-231, y se les dio tratamiento con la DHEA en una concentración de 30 $\mu\text{g/g}$ de peso/día disuelta en 70% de aceite de oliva estéril y 30% de etanol (vehículo). La administración del vehículo sin xenotransplante, no ocasionó ningún efecto en los ratones (datos no mostrados); sin embargo, se observó una disminución estadísticamente significativa del 60% ($p < 0.05$), tanto en el peso como en el volumen de los tumores, en el grupo (I) al que se le administró la DHEA antes del xenotransplante cuando se comparó con respecto al grupo control (+) al que solo se les administró el vehículo y se le realizó el xenotransplante. Por otro lado, se observó que la DHEA administrada al mismo tiempo y después del xenotransplante, no tuvo ningún efecto en el peso y el tamaño de los tumores, lo que indica que la DHEA solo afecta el crecimiento de los tumores cuando se administra 1 semana antes de la inoculación de las células tumorales de mama (Figura 18).

Debido a que en los ensayos anteriores la DHEA no inhibió la formación de tumores como se esperaba, se realizó un experimento más en donde la DHEA se administró ya no semanalmente, sino cada tercer día. Además de que la administración de la DHEA 1 semana posterior al xenotransplante no mostró ningún efecto con una diferencia estadísticamente significativa, se decidió eliminar este grupo experimental. Los resultados mostraron que la DHEA administrada 1 semana antes y al mismo tiempo del

xenotransplante, disminuyó el volumen y el peso de los tumores en un 75% con respecto al grupo control (+), al que solo se le administró el vehículo (Figura 19).



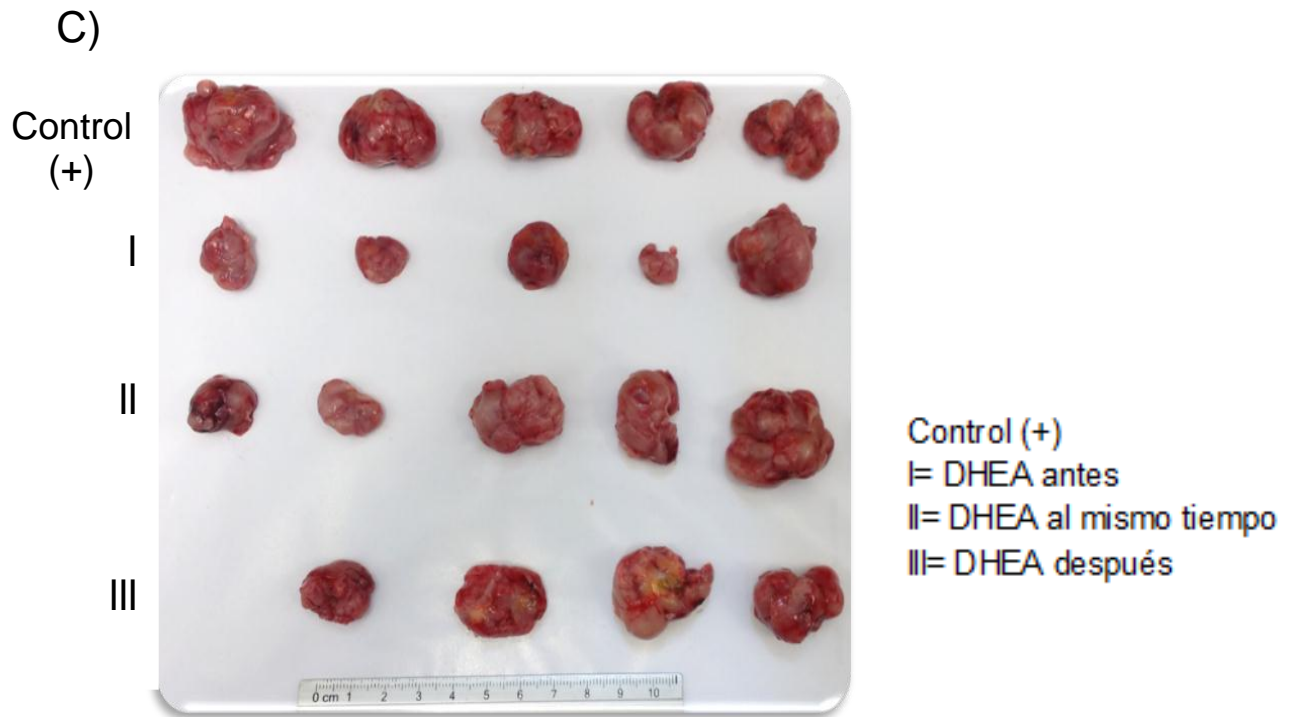
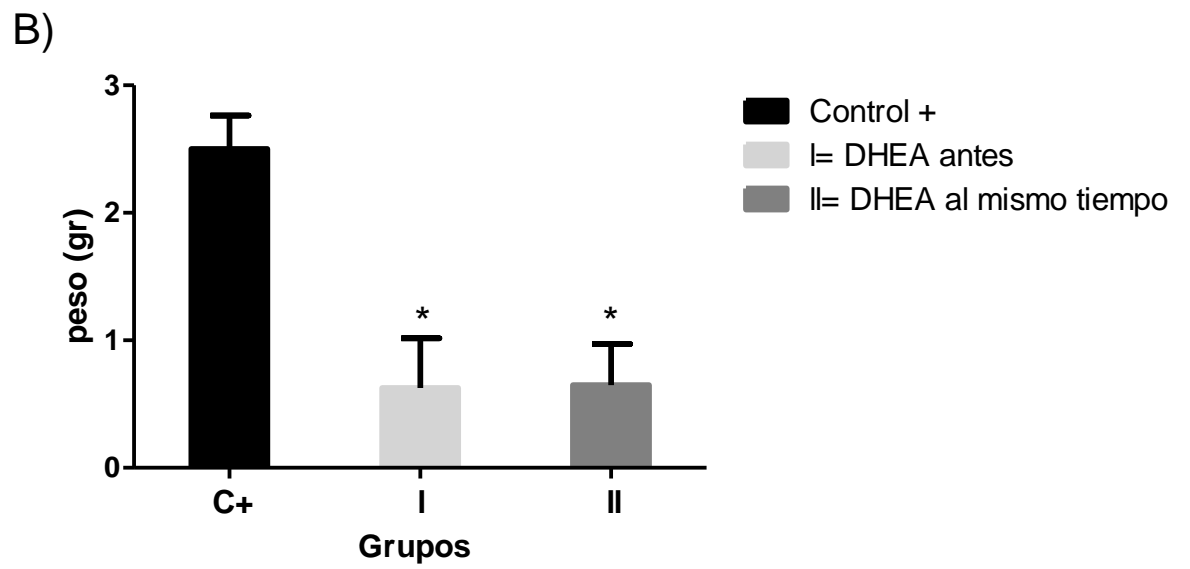
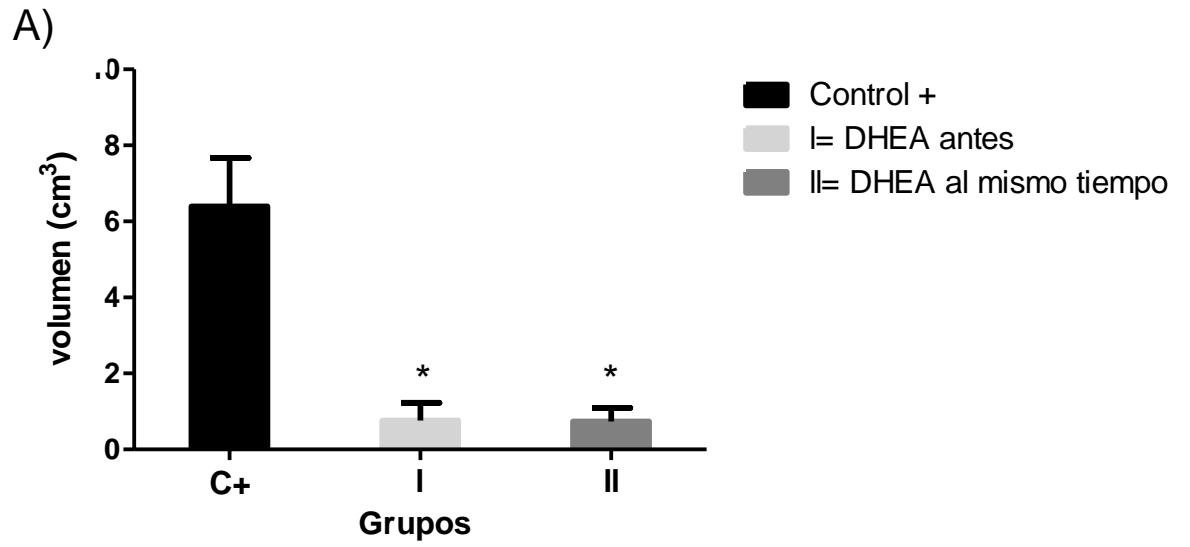


Figura 18. Ensayo de formación de tumores *in vivo* en ratones nu-/nu-. Cuatro semanas después del xenotransplante los ratones se sacrificaron con el anestésico pentobarbital y se extrajeron los tumores los cuales se pesaron y midieron. Los resultados se muestran como volumen (cm^3) (A) y peso (gr) (B) de los tumores. También se muestra una fotografía de los tumores extraídos (C). El grupo control (-, vehículo) no presentó formación de tumores. Se muestra un ensayo representativo de 5 realizados de manera independiente. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar (DS) de un experimento con una $n=5$ por grupo * $p < 0.05$ vs control.



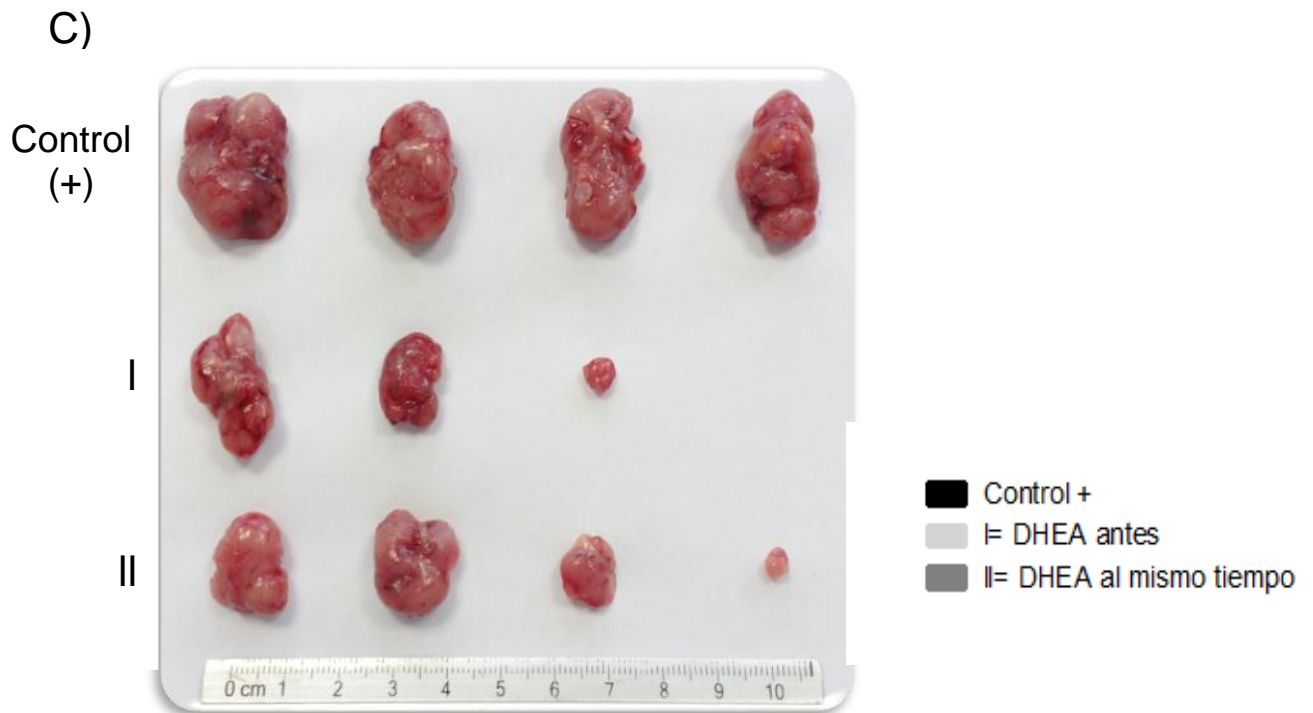


Figura 19. Ensayo de formación de tumores *in vivo* en ratones *nu-/nu-*. Tres semanas después del xenotransplante los ratones se sacrificaron con el anestésico pentobarbital y se extrajeron los tumores los cuales se pesaron y midieron. Los resultados se muestran como volumen (cm^3) (A) y peso (gr) (B) de los tumores. También se muestra una fotografía de los tumores extraídos (C). Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar (DS) de un experimento con una $n= 4$ por grupo $*p < 0.05$ vs control.

9. DISCUSIÓN

La TEM es un conjunto de eventos celulares que ocurre durante la embriogénesis, la fibrosis y el cáncer, se caracteriza por cambios genéticos y morfológicos provocando que las células epiteliales adquieran un fenotipo mesenquimal. La baja expresión de moléculas de adhesión celular como la E-caderina, produce la pérdida de la adhesión celular y de la polaridad, y provoca que las células epiteliales adquieran características mesenquimales y aumenten su capacidad invasiva (Günther y Pedernera-Astegiano, 2011). Se ha reportado que la sola disminución de la expresión de la E-caderina es suficiente para desencadenar la TEM (Chen, 2014).

Durante la TEM, ocurre una disminución de la expresión de los marcadores epiteliales, y aumentan los marcadores mesenquimales como las proteínas N-caderina y vimentina, entre otros. En este trabajo, se evaluó el efecto de la DHEA en la expresión de algunas proteínas involucradas en la TEM, como la E-caderina, la N-caderina y la vimentina en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7, así como su efecto en el crecimiento de tumores de células de mama en un modelo *in vivo*.

Estas dos líneas celulares se utilizaron como modelo de estudio debido a que una presenta un fenotipo mesenquimal y la otra epitelial, y se determinó si la DHEA tenía el mismo efecto en ambas. Se ha descrito que la línea celular MDA-MB-231 es de tipo basal, posee una gran capacidad metastásica y presenta un fenotipo mesenquimal, debido a que las proteínas N-caderina y vimentina se encuentran altamente expresadas, mientras que la E-caderina, se encuentra disminuida o no está presente (Neve RM *et al.*, 2009). Por otro lado, la línea celular MCF- 7 es de tipo luminal A, este tipo de cáncer es de bajo grado, posee un fenotipo epitelial, y esto está relacionado con la baja capacidad de la línea celular de producir metástasis (Neve *et al.*, 2009).

Los resultados mostraron que la DHEA inhibió la proliferación de ambos tipos celulares, lo que ya se había demostrado previamente por nuestro grupo de trabajo (López-Marure *et al.*, 2011).

Por otro lado nuestros resultados mostraron que la DHEA provocó un aumento en la expresión de la E-caderina y una disminución en la expresión de la N-caderina en la línea celular MDA-MB-231, lo que podría sugerir que la DHEA está revirtiendo la TEM y favoreciendo que las células adquieran nuevamente un fenotipo epitelial, disminuyendo su capacidad de migrar. Se han encontrado resultados similares en las células MDA-MB-231 con otras moléculas; por ejemplo, el tratamiento con el glipicano 3 disminuye la expresión de la N-caderina y de la vimentina, las células adquieren nuevamente un fenotipo epitelial y disminuyen su migración (Gunter, 2010). Se ha reportado en las mismas células que la baja expresión del oncogén “mouse double minute 2” (MDM2), provoca un incremento en la expresión de la E-caderina y una disminución de la N-caderina y de la vimentina, lo que altera su morfología ocasionando que las células adquieran un fenotipo epitelial (Xiangdong *et al.*, 2016).

En un estudio con células bronquiales, se observó que el tratamiento con el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1), induce la TEM provocando la pérdida de la E-caderina y la adquisición de un fenotipo mesenquimal, el cual es revertido cuando se administra la DHEA, restaurando la expresión de la E-caderina (Xu, 2014).

Por otro lado, se sabe que la vimentina induce una reorganización en la arquitectura del citoesqueleto provocando que la célula adquiera la capacidad de migrar (Nakashima *et al.*, 2015). Varios estudios señalan que la sobreexpresión de la vimentina está relacionada con un mal pronóstico y la adquisición de un fenotipo mesenquimal (Selenko *et al.*, 2016). En un estudio donde se inactivó el gen para la vimentina en células MDA-MB-231, se observó un decremento en la expresión de otras proteínas como la Slug revirtiendo la TEM (Ching-Yi *et al.*, 2015). En experimentos realizados con otras células como las de glioblastoma multiforme (GBM), se observó que el tratamiento con el “withaferin-A”, un fármaco inhibidor

de la vimentina, indujo la inhibición de la migración, la invasión y la viabilidad de dichas células (Zhao, 2016).

En los resultados obtenidos en este trabajo, se observó que el tratamiento con la DHEA provocó una disminución de la vimentina en las células MDA-MB-231 de manera dependiente de la concentración a las 48 horas de tratamiento. Resultados previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo muestran que la DHEA disminuyó la migración en las células MDA-MB-231 (López-Marure *et al.*, 2016), lo que se asocia a la disminución de las proteínas mesenquimales y al aumento de las epiteliales, favoreciendo la transición mesénquima-epitelio (TME).

Por otro lado, en las células MCF-7 se observó que la DHEA no indujo cambios significativos en la expresión de las proteínas membranales E-caderina y la N-caderina; sin embargo, si se observó una disminución en la expresión de la vimentina dependiente de la concentración. Se ha reportado, que la disminución en la expresión de la vimentina reduce la migración y la invasión de las células GBM (Zhao, 2016), lo que coincide con resultados previos de nuestro grupo de trabajo, en donde se encontró que la DHEA disminuye la migración e invasión de las células MCF-7 (López-Marure *et al.*, 2016). Varios autores reportan que la línea celular MCF-7 aun presenta un fenotipo epitelial, lo que está relacionado con su baja capacidad de producir metástasis (Mezencev *et al.*, 2016; Kamiya *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016).

En resumen, nuestros resultados indican que la DHEA no es capaz de modificar significativamente la expresión de las proteínas del tipo epitelial evaluadas aquí, cuando las células presentan este fenotipo, pero si pueden modificar la expresión de dichas proteínas cuando las células tienen un fenotipo mesenquimal.

Teniendo en cuenta que la DHEA logró disminuir la expresión de las proteínas mesenquimales y aumentar la proteína epitelial evaluadas en las células MDA-MB-231, se decidió evaluar su efecto en el crecimiento de tumores en un modelo *in vivo*, para lo que se utilizaron ratones desnudos nu^{-/-}/nu^{-/-} hembras de 8 semanas a las que se les administraron 30

$\mu\text{g/g/día}$ de la DHEA y se les realizó un xenotransplante con las células MDA-MB-231. Los resultados mostraron que la DHEA administrada semanalmente disminuyó ligeramente el crecimiento de tumores derivados de las células MDA-MB-231 cuando se administró una semana antes de la inoculación con las células; sin embargo, cuando el tratamiento con la DHEA se dio al mismo tiempo y una semana después del xenotransplante, no tuvo efecto. Esto se pudo deber a que se ha descrito que la biodisponibilidad de la DHEA es muy corta, algunos autores reportan que es de <48 h (Baulieu *et al.*, 1965; Morales *et al.*, 1994), por lo que la administración semanal no asegura que la DHEA se encuentre disponible durante toda la semana, lo que pudo favorecer el crecimiento de los tumores. Debido a lo anterior, se realizaron experimentos similares a los anteriores pero con la administración de la DHEA cada tercer día. Los resultados mostraron que la DHEA disminuyó fuertemente el crecimiento tumoral cuando se administró una semana antes y al mismo tiempo de la inoculación con las células tumorales.

En estudios *in vivo* se ha observado que el pre-tratamiento durante 4 semanas con la DHEA así como con la DHEA-S (0.6% en el alimento) en ratones macho nu^-/nu^- inhibió la inducción de cáncer pancreático (Muscarella *et al.*, 1998; Melvin *et al.*, 1997). En un estudio con ratas Sprague-Dawley en donde se les indujo un proceso carcinogénico en la glándula mamaria con el compuesto “A'-methyl-N'-nitrosourea” (50 mg/kg), se les dio tratamiento con la DHEA (0.2% en el alimento) y uno de sus análogos la DHEA 8354 (0.2% en el alimento) una semana antes y una semana después de la inducción de la carcinogénesis, se observó que el tratamiento con la DHEA y su análogo lograron inhibir en un 33% la inducción de la carcinogénesis, así como disminuir la metástasis en un 26% (Ratko *et al.*, 1991). Se ha observado el efecto quimiopreventivo de la DHEA en la glándula mamaria de ratas hembras Sprague-Dawley, en donde se les dio tratamiento con la DHEA (800-400 mg/kg en el alimento) una semana antes de la inducción de la carcinogénesis con “A'-methyl-N'-nitrosourea” (35 mg/kg), encontrándose que la DHEA en dosis bajas redujo el riesgo de cáncer de mama hasta en un 70% (McCormick *et al.*, 1996).

Varios autores mencionan que la DHEA puede actuar a través de su unión a varios receptores, entre ellos se encuentran tanto receptores de hormonas como receptores de la familia tirosina quinasa (RTKs) como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R) y el receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Teng, *et al.*, 2015; Schmitt *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2000).

Se ha observado que la DHEA puede estar activando o inhibiendo varias rutas de transducción de señales, como la vía de PI3/AKT y la vía de MEK/EKT a través de su unión a un RTKs. En un estudio con líneas celulares provenientes de cáncer de hígado (HepG2) y de adenocarcinoma de colon (HT-29) se observó que la DHEA provocaba apoptosis e inhibía la proliferación mediante la inhibición de la vía PI3K/AKT (Jiang *et al.*, 2005).

En otro estudio la DHEA inhibió la TEM en células bronquiales epiteliales (6HBE-14) inhibiendo la vía de PI3K/Akt (Xu *et al.*, 2014).

Por lo que se sugiere que la DHEA podría estar actuando en estas líneas celulares por su unión a un RTKs inhibiendo alguna de estas vías (PI3/AKT y MEK/EKT) las cuales están relacionadas con, muerte celular, proliferación, migración, TEM, metástasis, síntesis de proteínas, como las Sin embargo se requieren realizar más estudios para confirmar esto.

Teniendo en cuenta todos los efectos benéficos observados de la DHEA tanto *in vitro* como en modelos *in vivo*, sería muy interesante evaluar el efecto de la DHEA en la prevención y en el tratamiento del cáncer de mama, sola o en combinación con algún otro fármaco utilizado actualmente en la quimioterapia.

10. CONCLUSIÓN

La DHEA disminuyó la expresión de dos proteínas mesenquimales la N-caderina y la vimentina e incremento la de la E-caderina la cual es una proteína epitelial en la línea celular MDA-MB-231, mientras que en la línea celular MCF-7 solo disminuyó la vimentina.

En el ensayo de formación de tumores *in vivo*, el tratamiento con la DHEA administrada cada tercer día disminuyó el crecimiento de tumores cuando se administró antes y al mismo tiempo de la inoculación con las células, lo que podría sugerir su uso como tratamiento o prevención en el cáncer de mama.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Arnold JT, Liu X, Allen JD, Le H, McFann KK, Blackman MR. Androgen receptor or estrogen receptor-beta blockade alters DHEA-, DHT-, and E (2)-induced proliferation and PSA production in human prostate cancer cells. *Prostate*, 2007, 67:1152-62.
- Baulieu E, Corpechot C, Dray F, Emiliozzi R, Lebeau MC, Mauvais Javis P, Robel P. An adrenal-secreted "androgen": dehydroisoandrosterone sulfate. Its metabolism and a tentative generalization on the metabolism of other steroid conjugates in man. *Recent Prog Horm Res*, 1965, 21:411-500.
- Brem SS, Jensem HM, Gullino PM. Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. *Cancer*, 1978, 41:239-44.
- Carbone C, Maschi F. El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia. *Química Viva*, 2006, 1: 19-23.
- Castillo L, Tascón R, Lago MA, Novack G, Llorens MC, Ferreira dos Santos A, Shortrede J, Cabanillas AM, Bal de Kier Joffé E, Labriola L, Peters M. Glypican-3 induces a mesenchymal to epithelial transition in human breast cancer cells. *Oncotarget*, 2016, 6:60133-60154.

- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F, Adélaïde J, Cervera N, Fekairi S, Xerri L, Jacquemier J, Birnbaum D, Bertucci F. Gene expression profiling of breast cancer cell lines identifies potential new basal markers, *Oncogene*, 2006, 25: 2273-2284.
- Daryl-Granner K. The effect of phorbol esters and diacylglycerol on expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) Gene in rat hepatoma H4IIE cells. *J. Biol. Chem*, 1986, 261:16848-1685.
- De Wever O, Pauwels P, De Craene B, Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Gespach C, Bracke M, Berx G: Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol*, 2008, 130: 482-494.
- Ebeling P, Koivisto VA. Physiological importance of dehydroepiandrosterone. *Lancet*, 1994, 343:1479-1481.
- Ganong FW. *Fisiología Médica*. 15ª Edición. Editorial El manual moderno. México, D.F. 1996, pp. 402-404.
- Gayosso V, Montano LF, López-Marure R. DHEA-induced antiproliferative effect in MCF-7 cells is androgen- and estrogen receptor-independent. *Cancer J*, 2006, 12:160-165.
- Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*, 2007, 39(3):305-18.
- Gutiérrez G, Mendoza C, Zapata E, Montiel A, Reyes E, Montañó LF, López-Marure R. Dehydroepiandrosterone inhibits the TNF-alpha-induced inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis*, 2007, 190:90-99.
- Günther J, y Pedernera-Astegiano E. E-cadherina: pieza clave en la transformación neoplásica. *Evidencia e investigación clínica*, 2011, 1:15-20.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100: 57-70.
- Hansen C.T. The nude gene and its effects. *The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research*, J. Fogh and B. Giovanella, eds. New York: Academic Press, 1978, 1-35.
- Hayashi T, Esaki T, Muto E, Kano H, Asai Y, Thakur NK, Sumi D, Jayachandran M, Iguchi A. Dehydroepiandrosterone retards atherosclerosis formation through its conversion to

estrogen: the possible role of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20:782-792.

- Hughes L, Malone C, Chumsri S. Characterization of breast cancer cell lines and establishment of a novel isogenic subclone to study migration, invasion and tumorigenicity. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25:549-557.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Estadística a propósito del día mundial contra el Cáncer, 2014, México, DF: INEGI. www.inegi.gob.mx.
- Jaggi M, Johansson SL, Baker JJ, Smith LM, Galich A, Balaji KC. Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer. *Urol Oncol*, 2005, 23(6):402-6.
- Jiménez-Salazar JE, González-Núñez L, Königsberg-Fainstein M, Gómez-Quiroz LE, Zentella-Dehesa A y Pablo Damián-Matsumura P. Estructura y función de las uniones estrechas en la transición epitelio-mesénquima (TEM) y la tumorigénesis del cáncer de mama humano. *REB*, 2012, 31(2): 49-59.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 2009, 119:1420-1428.
- Kamiya T, Goto A, Kurokawa E, Hara H, Adachi T. Cross Talk Mechanism among EMT, ROS, and Histone Acetylation in Phorbol Ester-Treated Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 16:1284-372.
- Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, 2003, 3:537–549.
- Kelly P, Casey PJ, Meigs TE. Biologic functions of the G12 subfamily of heterotrimeric G proteins: growth, migration, and metastasis. *Biochemistry*, 2007, 46:6677–6687.
- Khorram O, Vu L, Yen SS. Activation of immune function by dehydroepiandrosterone (DHEA) in age-advanced men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 1997, 52:M1-7.
- Khosravi Shahi P, Soria Lovelle A, Pérez Manga G. Tumoral angiogenesis and breast cancer. *Clin Transl Oncol*, 2009, 11:138-142.
- Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. Breast cancer in México: a pressing priority. *Reprod Health Matters*, 2008, 16:113-123.

- LaGamba D, Nawshad A, Hay ED. Microarray analysis of gene expression during epithelial-mesenchymal transformation. *Dev Dyn*, 2005, 234:132-142.
- Li S, Lu J, Chen Y, Xiong N, Li L, Zhang J, Yang H, Wu C, Zeng H, Liu Y. MCP-1-induced ERK/GSK-3 β /Snail signaling facilitates the epithelial-mesenchymal transition and promotes the migration of MCF-7 human breast carcinoma cells. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13:1–10.
- Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to G α (i2,3). *J Biol Chem*, 2002, 277:21379-88.
- López-Marure R, Huesca-Gómez C, Ibarra-Sánchez Mde J, Zentella A, Pérez-Méndez O. Dehydroepiandrosterone delays LDL oxidation in vitro and attenuates several oxLDL-induced inflammatory responses in endothelial cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2007, 6:174-182.
- López-Marure R, Contreras PG, Dillon JS. Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation, migration, and death of breast cancer cells. *Eur J Pharmacol*, 2011, 3:268-74.
- López-Marure R, Zapata-Gómez E, Rocha-Zavaleta L, Aguilar MC, Espinosa Castilla M, Meléndez Zajgla J, Meraz-Cruz N, Huesca-Gómez C, Gamboa-Ávila R, Gómez-González EO. Dehydroepiandrosterone inhibits events related with the metastatic process in Breast tumor cell lines. *Cancer Biol Ther*, 2016, 3:1-10.
- Lu Y, Zhang J, Beech DJ, Myers LK, Jennings LK. P16 downregulates VEGF and inhibits angiogenesis in breast cancer cells. *Cancer Therapy*, 2003, 1:143–151.
- Malek D, Gust R, Kleuser B. 17- β -estradiol inhibits transforming-growth-factor- β -induced ZR-75-1 cell migration by Smad3-repression. *Eur J Pharmacol*, 2006, 534:39–47.
- Mark O, Enrico C, Ricardo A. DHEA, DHEAS and PCOS. *Steroid Biochem Mol. Biol*, 2014, 145, 213-225.
- McCormick DL, Kandala VN, Rao WD, Bowman-Gram TA, Steele EV, Lubet AR, and Kelloff GJ. Exceptional Chemopreventive Activity of Low-Dose Dehydroepiandrosterone in the Rat Mammary Gland *Advances in Brief. Cancer Research*, 1996, 56:1724-1726.

- Mei Liang, Ping Zhang, Jian Fu. Up-regulation of LOX-1 expression by TNF- α promotes trans-endothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Letters*, 2007, 25:831–837.
- Melvin WS, Boros LG, Muscarella P. Dehydroepiandrosterone-sulfate inhibits pancreatic carcinoma cell proliferation in vitro and in vivo. *Surgery*, 1997, 121(4):392.
- Mezencev R, Matyunina L, Jabbari N and. McDonald JF. Snail-induced epithelial-to-mesenchymal transition of MCF-7 breast cancer cells: systems analysis of molecular changes and their effect on radiation and drug sensitivity. *BMC Cancer*, 2016, 16:236.
- Morales A, Nolan J, Nelson J, Yen S : Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 78:1360-1367,
- Muscarella P, Boros L, Fisher W, Rink C, and Scott M. Oral Dehydroepiandrosterone inhibits the growth of human pancreatic cancer in nude mice. *Journal of surgical research*, 1998, 79: 154–157.
- National Cancer Institute. INC. <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>.
- Nestler JE, Barlascini CO, Clore JN, Blackard WG. Dehydroepiandrosterone reduces serum low density lipoprotein levels and body fat but does not alter insulin sensitivity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*, 1988, 66:57-61.
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 2006, 10(6):515-27.
- Omary MB, Coulombe PA, McLean WH. Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med*, 2009, 352:2087-2100.
- Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promoter metastasis via multiple downstream transcriptional pathway. *Cancer Res*, 2008, 68:3645-3654.

- Orentreich N, Brind JL, Rizer RL, Vogelmann JH. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984,59:551– 555.
- Prough R, Clark B, and Klinge C. Novel mechanisms for DHEA action. *Journal of molecular endocrinology*, 2016, 56:R139–R155.
- Racchi M, Balduzzi C, Corsini E. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and the aging brain: Flipping a coin in the “Fountain of Youth”, *CNS Drugs Rev*, 2003, 9:21-40.
- Raicca M, Cimpeana AM, Ribattib D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Canc*, 2009, 45:1924-1934.
- Rais B, Comin B, Puigjaner J, Brandes JL, Creppy E, Saboureau D, Ennamany R, Lee WN, Boros LG, Cascante M. Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich’s tumor cells through inhibition of the pentose cycle. *FEBS Letters*, 1999, 456:113-118.
- Ratko TA, Detrisac CJ, Mehta RG, Kelloff G J, and Moon RC. Inhibition of rat mammary gland chemical carcinogenesis by dietary Dehydroepiandrosterone or a fluorinated analog of dehydroepiandrosterone. *Cancer Res*, 1991, 51:481.
- Regelson W, Kalimi M, Loria R. DHEA: Some thoughts as to its biologic and clinical action. In: Kalimi M., Regelson W. (eds) *The biologic role of dehydroepiandrosterone (DHEA)*. Walter de Gruyter & Co, Berlin, New York, 1990, pp. 405-445.
- Russell A, Prough J, Clark, Carolyn M. Novel mechanisms for DHEA action. *Society for Endocrinology*, 2016, 56(3):R139-55.
- Zelenko Z , EJ Gallagher EJ, Tobin-Hess A, Belardi V, Rostoker R, Blank J, Dina Y and LeRoith D. Silencing vimentin expression decreases pulmonary metastases in a pre-diabetic mouse model of mammary tumor progression, *Oncogene*, 2016, 1–10.
- Schmitt M, K. Klinga, B. Schnarr, R. Morfin, D. Mayer. Dehydroepiandrosterone stimulates proliferation and gene expression in MCF-7 cells after conversion to estradiol, *Mol. Cell Endocrinol*, 2001, 173:1-13.
- Schwartz AG, Pashko L, Whitcomb JM. Inhibition of tumor development by dehydroepiandrosterone and related steroids. *Toxicol Pathol*, 1986, 14:357-362.

- Schulz S, Klann RC, Schonfeld S, Nyce JW. Mechanisms of cell growth inhibition and cell cycle arrest in human colonic adenocarcinoma cells by dehydroepiandrosterone: role of isoprenoid biosynthesis. *Cancer Res*, 1992, 52:1372-1376.
- Scorilas A, Karameris A, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Bassilopoulos P, Trangas T, Talieri M: Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer*, 2001, 84:1488-1496.
- Suva LJ, Griffin RJ, Makhoul I. Mechanisms of bone metastases of breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2009, 16:703-713.
- Thiery JP. Epitelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2:442-454.
- Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epitelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7:131-142.
- Tchernof A, Labrie F, Belanger A, Despres JP. Obesity and metabolic complications: contribution of dehydroepiandrosterone and other steroid hormones. *J. Endocrinol*, 1996, 150 (suppl):155-164.
- Teng Y, Radde B, Litchfield LM, Ivanova MM, Prough R, Clark BJ, Doll MA, Hein DW, Klinge MC. Dehydroepiandrosterone activation of G-protein-coupled estrogen receptor rapidly stimulates MicroRNA-21 transcription in human hepatocellular carcinoma cells, 2015, pp. 15799–15811.
- Schulz S, Klann RC, Schonfeld S, Nyce JW. Mechanisms of cell growth inhibition and cell cycle arrest in human colonic adenocarcinoma cells by dehydroepiandrosterone: role of isoprenoid biosynthesis. *Cancer Res*, 1992, 52:1372-1376.
- Schwartz AG, Pashko L, Whitcomb JM. Inhibition of tumor development by dehydroepiandrosterone and related steroids. *Toxicol Pathol*, 1986, 14:357-362.
- Smith BN, Odero-Marah VA. The role of Snail in prostate cancer. *Cell Adh Migr*, 2012, 5:433-41.
- Van Weerden WM, Van Kreuningenn A, Elissen NM, de Jong FH, van Steenbrugge GJ, Schröder FH. Effects of adrenal androgens on the transplantable human prostate tumor PC-82. *Endocrinology*, 1992, 131:2909-13.

- Varet J, Vincent L, Akwa Y, Mirshahi P, Lahary A, Legrand E, Opolon P, Mishal Z, Baulieu EE, Soria J, Soria C, Li H. Dose-dependent effect of dehydroepiandrosterone, but not of its sulphate ester, on angiogenesis. *Eur J Pharmacol*, 2004, 502:21-30.
- Whiteland H, Spencer-Harty S, Thomas DH, Davies C, Morgan C, Kynaston H, et al. Putative prognostic epithelial-to-mesenchymal transition biomarkers for aggressive prostate cancer. *Exp Mol Pathol*, 2013, 2:220-6.
- Williams MR, Ling S, Dawood T, Hashimura K, Dai A, Li H, Liu JP, Funder JW, Shudir K & Komesaroff PA. Dehydroepiandrosterone inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation independent of ARs and Ers. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87:176–181.
- Yang C, Chen H, Yu L. Inhibition of FOXM1 transcription factor suppresses cell proliferation and tumor growth of breast cancer. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20:117-24.
- Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(12):1608-20.
- Zapata E, Ventura JL, De la Cruz K, et al. Dehydroepiandrosterone inhibits the proliferation of HUVEC by enhancing the expression of p53 and p21, restricting the phosphorylation of RB, and is androgen- and estrogen-receptor independent. *FEBS J*, 2005, 272:1343-1353.
- Zavala-Zendejas VE, Rendón-Huerta EP. El papel de las claudinas. *Bioquímica*, 2008, 33:19-29.