



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



***Efecto de la dehidroepiandrosterona (DHEA) en la migración
de las células de cáncer cervicouterino***

TESIS

Que para obtener el título de

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

Presenta:

YASMIN NANSI ORTEGA CALDERON

Director de Tesis

DRA. REBECA LÓPEZ MARURE

Asesor de Tesis

Q. F. B. ENRIQUE ESCALERA ZUÑIGA

Departamento de Fisiología

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

México, D.F

Mayo 2014

ÍNDICE

1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Marco teórico	5
3.1. La dehidroepiandrosterona (DHEA)	5
3.1.1. La DHEA y la edad	7
3.1.2. Función	8
3.1.3. La DHEA y el cáncer	9
3.1.4. La DHEA, la migración celular y la angiogénesis	14
3.1.5. La DHEA y la seguridad	14
3.2. Cáncer cervicouterino (CaCu)	15
3.2.1. Factores de riesgo	15
3.2.2. Cáncer invasor	16
3.3. Virus del Papiloma Humano (VPH)	18
3.4. Metástasis	20
3.4.1. Etapas de la metástasis	20
3.4.1.1. Angiogenesis	20
3.4.1.2. Invasión y migración	22
3.4.1.2.1. Adhesión celular	22
3.4.1.2.2. Degradación proteolítica	25
3.4.1.2.2.1. Proteasas de matriz extracelular	27
3.4.1.2.3. Movilidad de células tumorales	31
3.4.1.2.3.1. Quimiocinas y receptores de quimiocinas	32
3.4.1.3. Deseminación y colonización	34
3.5. Características de líneas celulares de cáncer cervicouterino	36
4. Justificación y planteamiento del problema	37
5. Hipótesis	38
6. Objetivos	38
7. Metodología	39
8. Resultados	41
8.1 Efecto de la DHEA en la proliferación	41
8.2 Efecto de la DHEA en la adhesión celular	42
8.3 Efecto de la DHEA en la migración celular	44
8.3.1 Cámaras de Boyden	44
8.3.2 Ensayo de Heridas	45
8.4 Efecto de la DHEA en la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1, Selectina-E, Sindecano-1 y el receptor de quimiocinas CXCR-4	50
9. Discusión de resultados	51
9. Conclusión	55
10. Referencias	56

1. RESUMEN

La Dehidroepiandrosterona (DHEA) es una hormona esteroidea secretada por las glándulas suprarrenales, la cual se ha observado que posee actividad antiproliferativa, apoptótica y supresora de la angiogénesis en diferentes tipos de cáncer. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de la DHEA sobre la migración de tres líneas celulares del cáncer cervicouterino (CaCu) HeLa, InBL y SiHa; evaluándose la proliferación celular mediante ensayos de proliferación, obteniéndose una disminución entre 20 al 80 % a dosis farmacológicas; en la evaluación de la adhesión celular se obtuvo una disminución entre el 15 a 44 %; mientras que en la expresión de moléculas de adhesión celular como ICAM-1, Selectina-E, Sindecano-1 y el receptor CXCR-4, se obtuvo que la DHEA puede estimular o disminuir la expresión de estas, pudiendo estimular la adhesión y migración celular; por último, se evaluó la migración de las células tumorales mediante ensayos de Cámaras de Boyden y de Heridas, obteniéndose la disminución de la migración celular entre un 1 % al 49 %; concluyéndose que la DHEA presenta la capacidad de disminuir la migración de células tumorales de CaCu, sin embargo, sería necesario realizar otros estudios antes de utilizarla en el tratamiento terapéutico contra el cáncer.

2. INTRODUCCIÓN

La Dehidroepiandrosterona (DHEA) es una hormona esteroidea producida principalmente en las glándulas suprarrenales, sintetizada a partir del colesterol, encontrándose en el torrente circulatorio en su forma sulfatada (DHEA-S) en un 90 % del total de la DHEA producida por el organismo, y tan sólo en un 10 % en su forma no sulfatada. La concentración de la DHEA en sangre es mayor en niños recién nacidos, observándose una disminución de la producción hasta los 7 y 8 años de edad, a partir de los cuales aumenta su concentración, llegando a su máximo entre los 20 y 30 años, con su posterior reducción teniendo solo de un 10 a un 15 % del total de la DHEA a la edad de 80 a 90 años. Esta disminución de la DHEA que se tiene con la edad se ha relacionado con la presencia de enfermedades como la insuficiencia cardíaca, el aumento del colesterol, la diabetes mellitus, la osteoporosis y el cáncer, entre otras.

Se ha observado que la DHEA actúa de forma benéfica en situaciones de estrés; favorece la estimulación del sistema inmunológico; disminuye el colesterol; aumenta la masa muscular; desempeña un papel neuroprotector del sistema nervioso central (SNC); ayuda a mantener la regulación del azúcar en el organismo y a proteger a las células del desgaste producido por el exceso de la misma; estimula los procesos de reparación de tendones, articulaciones y músculo; posee efectos antiinflamatorios; reduce el riesgo de aterosclerosis y se ha observado que posee funciones antiproliferativas y quimioprotectoras en una gran variedad de cánceres, entre los que destacan el de mama, piel, hígado, de tiroides, colón, tejido linfático, médula ósea, páncreas, próstata, vagina y cuello uterino. A pesar de los múltiples efectos benéficos de la DHEA en muchas enfermedades, los mecanismos mediante los cuales ejerce sus efectos aún se desconocen.

El cáncer cervicouterino, también llamado cáncer de cérvix (CaCu), es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en edad reproductiva en México. En el año 2008, el CaCu produjo 4, 036 defunciones, con una tasa media de mortalidad de 7.4 por cada 100,000 habitantes; solo superada por el cáncer de mama con 4, 668 defunciones según la INEGI. Algunos de los factores por los cuales se puede desarrollar el CaCu son las infecciones por virus oncogénicos, entre los que destaca el Virus del Papiloma Humano (VPH), principalmente causados por los VPH del tipo 16 y 18, otros de los factores que estimulan la presencia del CaCu son un nivel socioeconómico bajo, haber tenido múltiples parejas sexuales, la iniciación de la vida sexual antes de los 16 años, el uso de anticonceptivos, los múltiples embarazos y la infección por otras bacterias como *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* y clamidias.

En este trabajo se evaluó el efecto de la DHEA en la proliferación y migración de tres líneas celulares derivadas de CaCu. Los resultados mostraron que la DHEA inhibió la proliferación y la migración de todas las células tumorales.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 LA DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)

La dehidroepiandrosterona es una hormona esteroidea segregada en mayor cantidad por las glándulas suprarrenales en la zona reticularis de la corteza, y en menor cantidad por el cerebro, la piel, los ovarios (células de la teca) y los testículos^{1,2} (Figura 1).

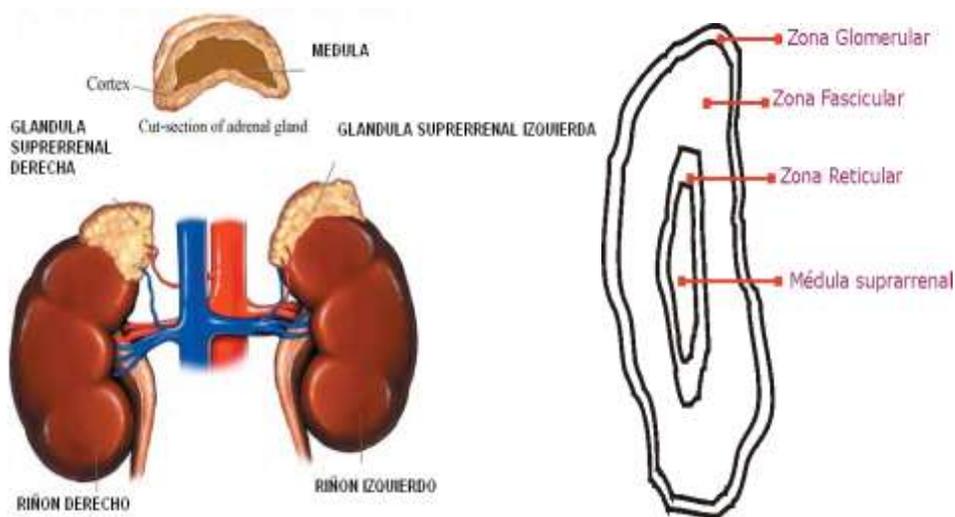


Figura 1. Glándulas suprarrenales. Tomada de: <http://goo.gl/QWCyZ>

La DHEA se sintetiza a partir de la pregnenolona que se deriva del colesterol, convirtiéndose por acción de la enzima 3β hidroesteroide deshidrogenasa en androstenediona, precursor de las hormonas sexuales femeninas y masculinas (estrón y testosterona, respectivamente), cuya síntesis depende de la edad, el sexo y la salud del individuo¹ (Figura 2).

La concentración total de la DHEA en el torrente sanguíneo se encuentra solamente en un 10 % en forma no sulfatada, y en un 90 % en su forma sulfatada (DHEA-S) (con niveles que son aproximadamente trescientas veces mayores que los de la DHEA libre). Los niveles plasmáticos de la DHEA-S en las mujeres adultas son 10,000 veces más elevados que los de la testosterona y 3,000 a 30,000 veces más altos que los del estradiol (E2), proporcionando así una gran reserva de sustrato para la conversión en los andrógenos y los estrógenos en los tejidos periféricos que poseen los mecanismos enzimáticos necesarios para transformar la DHEA en los esteroides sexuales activos (National Library of Medicine, NIH). Es de interés puntualizar que a pesar de su menor concentración en el torrente sanguíneo, la DHEA presenta mayor actividad biológica que su forma sulfatada¹.

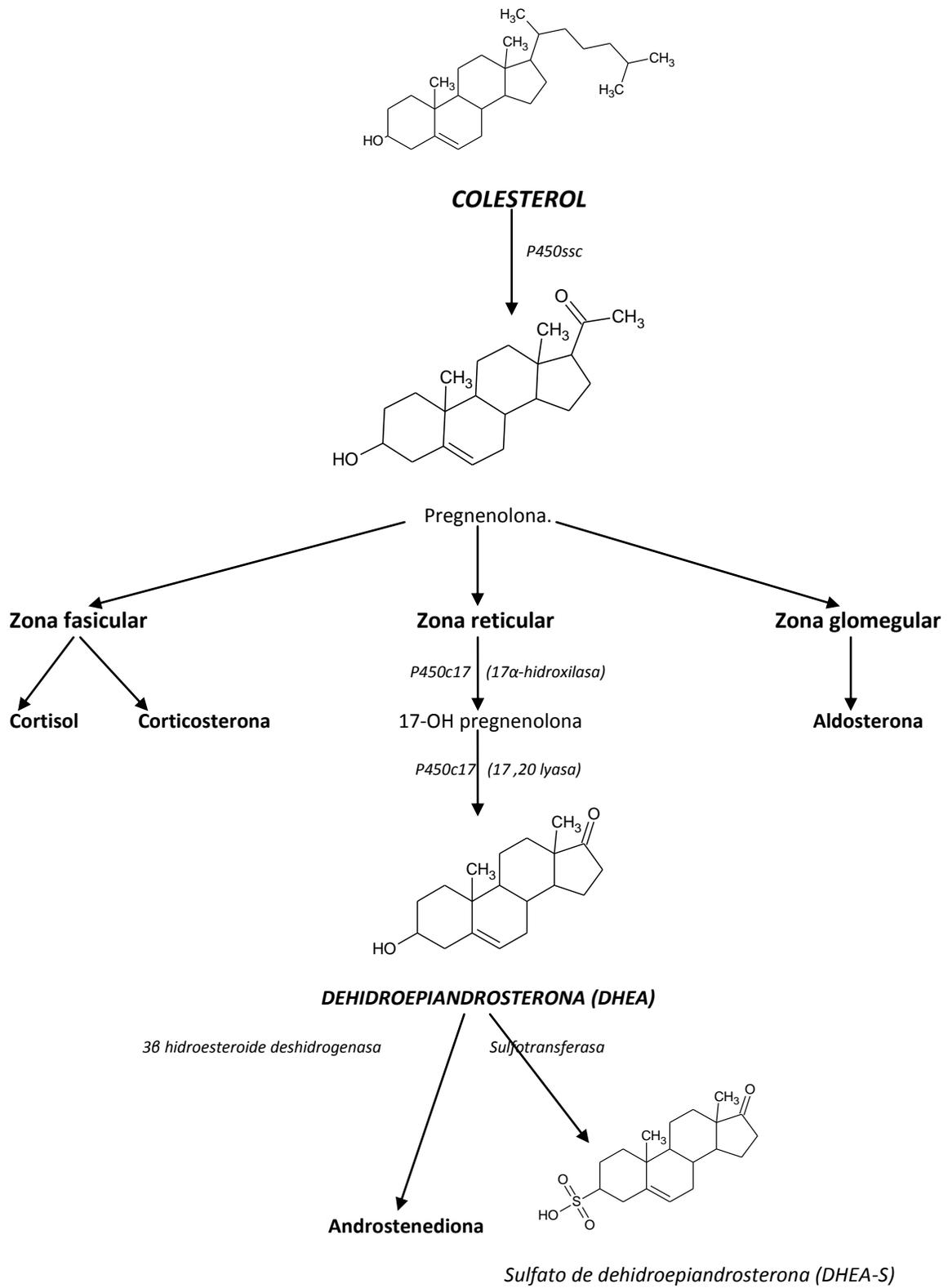


Figura 2. Esquema de la biosíntesis de hormonas esteroideas en las glándulas suprarrenales. Tomado de: <http://goo.gl/vz8GD>

La DHEA y el DHEA-S son las hormonas circulantes más abundantes en los seres humanos, cuyos niveles plasmáticos de la DHEA están entre 10 a 50 nM, con una vida media de entre 30 a 60 min, mientras que el DHEA-S posee una concentración mayor a 10 μ M, y una vida media entre 8 y 10 h³. La DHEA en el organismo es metabolizada por el hígado, eliminándose por los riñones¹.

En los hombres, más del 50 % de las hormonas sexuales masculinas se derivan de la DHEA; mientras que en las mujeres, aproximadamente el 70 % de las hormonas sexuales femeninas derivan de ella antes de la menopausia, y posteriormente en un 100 % (postmenopausia). La producción de la DHEA en hombres es de aproximadamente de 30 a 50 mg al día, mientras que en las mujeres solo se produce la mitad de esta concentración de DHEA al día^{1,3-5}.

3.1.1 La DHEA y la edad

Se ha observado que los niveles de DHEA en el organismo disminuyen con la edad, fenómeno conocido como “adrenopausia”⁴, variando en cada individuo conforme a su sexo, etnia y factores ambientales³. Esta reducción de la DHEA se produce en ambos sexos y se asocia con una reducción en el tamaño de la zona reticular de las glándulas suprarrenales⁴.

La producción de la DHEA es mayor en niños recién nacidos, cesando pocos días después del nacimiento y reanudándose su producción entre los 7 y 8 años de edad aumentando a un ritmo constante, llegando a su máxima concentración entre los 20 y 30 años de edad (en hombres el máximo se alcanza a los 25 años y en las mujeres a los 35 años), a partir de los cuales decrece aproximadamente en un 2 % por cada año que transcurre, teniendo como resultado que entre los 80 y 90 años de edad tan sólo se posea entre 10 y 15 % de la concentración máxima de la DHEA alcanzada a los 20 años de edad^{1,5} (Figura3).

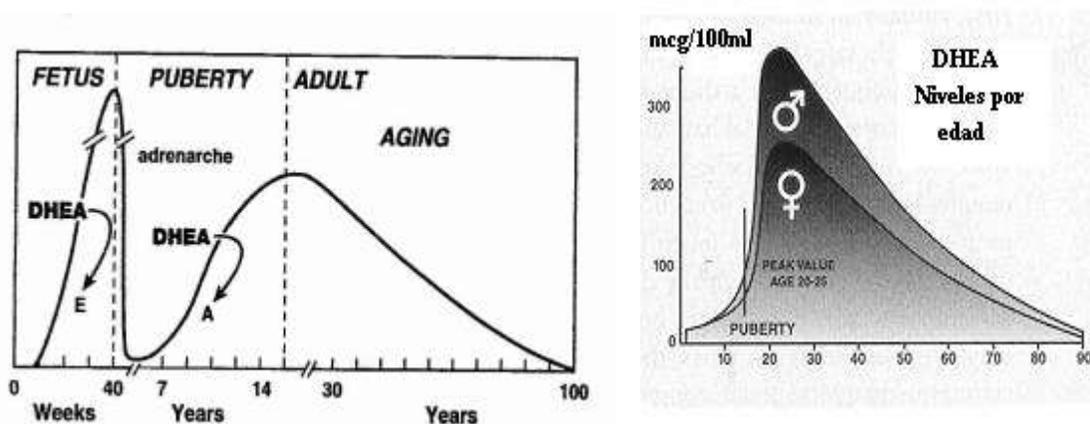


Figura 3. Relación de la DHEA y la edad. Tomada de: <http://goo.gl/WsyE1> y <http://es.paperblog.com/dhea-952343/>

La disminución de la concentración de la DHEA en los humanos se ha asociado con la aparición de enfermedades relacionadas con la edad, como la insuficiencia cardiaca, el aumento del colesterol, la diabetes mellitus, la osteoporosis, el cáncer, entre otras².

Otros casos en los cuales se han observado niveles bajos de DHEA y DHEA-S es en aquellos pacientes que sufren de alcoholismo, de enfermedades crónicas, demencia, diabetes mellitus, cáncer, desórdenes músculo-esqueléticas, obesidad, tabaquismo, enfermedad de Alzheimer, Lupus, Psoriasis, Síndrome de Cushing, etc ⁵.

3.1.2 Efectos de la DHEA

La DHEA actúa como un amortiguador de los efectos negativos de las hormonas secretadas en situaciones de estrés; estimula el sistema inmunológico; disminuye la grasa del cuerpo y el colesterol; aumenta la masa muscular; es neuroprotector del sistema nervioso central (SNC); ayuda a mantener el equilibrio del mecanismo de regulación del azúcar en el organismo; estimula el proceso de reparación de tendones, articulaciones y músculo; tiene efecto antiinflamatorio; protege a las células del desgaste producido por el exceso de azúcares ²; controla el crecimiento piloso y la secreción seboreica; reduce el riesgo de aterosclerosis; detiene la proliferación de las células cancerosas, entre otras. Se ha planteado la hipótesis que la DHEA es necesaria para las células durante la duplicación y transcripción del ADN ⁵.

Estudios realizados en mujeres postmenopáusticas han demostrado que algunos de los beneficios de la administración de la DHEA son:

- 1) El aumento en la densidad mineral ósea acompañado por el aumento de la osteocalcina en plasma, un marcador de formación ósea, lo que indica que la DHEA podría tener un uso benéfico como terapia de reemplazo hormonal en la mujer ³.
- 2) La administración de la DHEA por vía intravaginal ayuda a corregir los síntomas y signos de atrofia vaginal acompañado con el mejoramiento de la función sexual, sin aumentar los niveles de estrógenos y andrógenos sanguíneos ³.
- 3) Tras la administración por 12 semanas de DHEA, se observó una disminución en la concentración total de colesterol en plasma y un aumento en el flujo sanguíneo cutáneo, lo que sugiere que los cambios en los vasos grandes y la función microvascular endotelial observado tras la administración oral de DHEA son potencialmente benéficos ⁶.

Se ha demostrado que la DHEA protege contra el cáncer del hígado, de la tiroides ⁶, de mama, de pulmón, de colón, de piel ¹, de tejido linfático ⁶ y del cuello uterino ⁷.

3.1.3 La DHEA y el cáncer

La DHEA tiene un papel protector contra el cáncer³, asociado a su actividad antiproliferativa y apoptótica en varios tipos de cáncer como el de próstata, hepatomas, mielomas, leucemia, adenocarcinoma de colón, mama, cuello uterino, etc⁶⁻⁸. El efecto antiproliferativo de la DHEA también se ha observado en células cancerosas, sino también en las células endoteliales, en osteoblastos, en células de músculo liso y células de tejido adiposo. Algunas evidencias sugieren que el efecto protector inducido por la DHEA contra las células de cáncer se asocia con el paro del ciclo celular e inducción de la muerte⁷. La DHEA ha sido identificada como uno de los agentes quimioprotectores prometedoros por los EE.UU, en el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), División de Prevención y Control del Cáncer³.

Se atribuye su acción antiproliferativa a:

a) La inhibición de la acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) que provoca el agotamiento de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH) (necesaria para la reducción del ácido fólico en ácido tetrahidrofólico, como un cofactor para la enzima ribonucleótido reductasa y en la síntesis de timidilato) y de la ribosa 5 fosfato, disminuyendo así la síntesis de nucleótidos importantes en la síntesis del ADN y de ARN⁶.

b) La DHEA se une a un receptor celular que inhibe la unión de la proteína activadora 1 (AP-1) (factor de transcripción heterodimérico implicado en diferentes procesos celulares como la diferenciación, proliferación y apoptosis) al ADN, mediante la trans-represión (proceso por el cual una proteína reprime o inhibe la actividad de una segunda proteína), o mediante la inhibición de cinasas que regulan la fosforilación de la AP-1.

c) En estudios realizados en células de cordón umbilical, se ha observado que la DHEA detiene el crecimiento celular en la fase G1 del ciclo celular, incrementando la expresión del ARNm que codifica para las proteínas p21 y p53, que se encargan de regular la proliferación celular, conocidas también como proteínas antitumorales.

d) La DHEA inhibe la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRB), mediante la inhibición de los complejos de cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y las ciclinas (ciclinas-CDK), las cuales llevan a cabo la fosforilación de estas proteínas y su inactivación. La pRB es una proteína supresora de tumores, mediante la detención del ciclo celular entre las fases G1 y S, al no permitir que las células que presenten daño en su ADN pasen a la fase mitosis, inhibiendo así la proliferación celular^{9,10}.

Parte de la acción inhibitoria de la DHEA se asocia con la interacción de los andrógenos, producidos a partir de la DHEA en las células de los tejidos periféricos, con el receptor de andrógenos (AR). El AR es un miembro de la subfamilia de receptores de esteroides, entre los que también se encuentran el receptor de glucocorticoides (GR) y el receptor de mineralocorticoides. Más recientemente, en una serie de experimentos llevados a cabo por Hardin y colaboradores en

tres líneas celulares de cáncer de mama humanos, HCC 1937, HCC 1954 y HCC 38 que no presentan receptor de estrógenos (ER) y receptor de progesterona (PR), y que fueron tratados con DHEA-S, se observó que en las líneas celulares HCC 1954 y 1937 tuvieron una expresión alta de AR, mientras que la HCC 38 tuvo una expresión débil. Análisis realizados a ensayos de proliferación, demostraron que las líneas celulares que mostraban una expresión alta de AR presentaban una disminución de la proliferación después del tratamiento con DHEA durante 7 días, en comparación con las células no tratadas, mientras que las células que tienen una expresión apenas detectable de AR no se vieron afectadas por el tratamiento con DHEA-S. La eliminación del tratamiento de DHEA-S en el cultivo de la línea celular HCC 1954, después de 10 días de cultivo, resultó en un incremento de 3,5 veces en el crecimiento celular. Experimentos de Garreau y sus colaboradores han sugerido que las células de cáncer de mama ER-/PR- responden a la terapia hormonal con DHEA, siempre que se exprese AR⁴. Por otro lado, se cree que la DHEA lleva a cabo su acción mediante la unión a un receptor específico localizado sobre la membrana celular, ya que se ha observado que la actividad antiproliferativa de la DHEA es independiente de la existencia de AR o ER.

Mientras que algunos estudios han demostrado que la DHEA tiene un efecto protector contra el cáncer, otros han concluido que la DHEA en realidad puede inducir cáncer. Se ha observado una amplia gama de efectos fisiológicos y farmacológicos tras la administración de la DHEA en animales de laboratorio y de sus células. Algunos de estos efectos incluyen la protección contra el desarrollo de tumores espontáneos e inducidos por agentes carcinogénicos, la inhibición de la unión del ADN mutado, la inhibición de la síntesis de ADN, la inhibición de la proliferación de células animales en condiciones basales y cuando son estimuladas por mitógenos diferentes, la inhibición de la lipogénesis, la supresión de la ganancia de peso en los roedores sin reducción significativa en la ingesta de alimentos, mejora genética de la diabetes en ratones, y el retraso de las enfermedades autoinmunes asociadas con el envejecimiento. Sin embargo, las acciones de la DHEA exógena dependerán de la concentración utilizada. Dosis fisiológicas inducen las funciones neurológicas e inmunológicas y la proliferación celular, mientras que las dosis farmacológicas afectan funciones cardiológicas y metabólicas, promueven efectos antineoplásicos, y la inhibición de la proliferación celular⁶.

En estudios realizados en ratas y ratones, se ha demostrado que la DHEA tiene un efecto antiproliferativo y quimioprotector a concentraciones farmacológicas, en cáncer de mama, próstata, pulmón, hígado, piel y tiroides; pero a pesar de ello, también se ha observado que puede estimular la presencia de tumores tras la administración de la DHEA en la dieta de roedores a grandes concentraciones y por largos periodos de tiempo. Por ejemplo, se observó que tras la administración de DHEA en la dieta de las ratas, a una concentración de 5,000 a 10,000 mg/Kg, estas desarrollaban hepatocarcinomas; esto debido posiblemente a la acción directa del esteroide sobre las células. En otros estudios se observó que tras la administración de la DHEA en la dieta de las ratas F-344 a una concentración de 0.45 %, por 84 semanas, de 14 a 16 ratas desarrollaron carcinomas hepatocelulares, observándose un aumento de mitocondrias y peroxisomas, haciéndolo un hepatocarcinógeno, por lo tanto, se demuestra que la DHEA provoca un aumento

de peroxisomas y es hepatocarcinogénico en ratas con tratamientos a dosis altas de 0.6 % a largo plazo en la dieta ⁶.

Efecto de la DHEA en diferentes tipos de cáncer

Los efectos de la DHEA en diferentes tipos de cáncer son:

- ❖ **Cáncer de piel:** En estudios realizados en ratones CD-1, se ha observado que la DHEA inhibe la producción de papilomas inducidos por el 7,12 dimetil antraceno (DMBA) y 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), tras su aplicación tópica. Contrario a estos resultados, se ha observado que a concentraciones de 1 nM, aumenta la invasión de células de melanoma A375-SM a través de la fibronectina e induce la proliferación de las células cuando son cultivadas sobre plástico ⁶.
- ❖ **Cáncer de mama:** En este tipo de cáncer la acción de la DHEA ha sido ampliamente estudiada. En un estudio realizado en ratas CD-1, la DHEA inhibió el desarrollo de cáncer de mama espontáneo. Se demostró en ratas que dosis crecientes de la DHEA (niveles circulantes comparables a los observados en mujeres premenopáusicas normales adultas) disminuyeron el tamaño de los tumores inducidos por DMBA; puede disminuir el número de tumores y su potencial invasivo tras la administración de 2,000 mg/Kg en la dieta de roedores. También se ha observado que la DHEA podía bloquear el efecto estimulador de N-nitroso-N-metilurea sobre el desarrollo del tumor mamario de la rata por un mecanismo dependiente de la proteína p16, y que podía inducir un fenotipo senescente en células tumorales, inhibiendo la proliferación celular y aumentando el número de células apoptóticas con la participación de las proteínas p16 y p21 que median estos efectos ⁶. Es de especial interés ver que los niveles séricos de la DHEA de 7,09 +/- 0.64 nM y 17.5 +/- 1.1 nM condujeron a una marcada inhibición del desarrollo tumoral en un 22 % y el 11 % de los animales portadores del carcinoma de mama en comparación con el 68 % en los animales control. Con la dosis más alta de la DHEA usada, lo que corresponde a los valores séricos de DHEA de 27,2 +/- 2.2 nM, la incidencia de tumores se redujo a sólo el 3,8 %. Cabe mencionar que los niveles séricos de la DHEA en las mujeres de edad entre los 20 a 30 años oscilan entre 8,3 y 17.3 nM ³.

Estudios *in vitro* sobre una gran variedad de líneas celulares, han demostrado que la DHEA tiene un efecto dual sobre la proliferación. Por ejemplo, se ha observado que la DHEA a concentraciones de 10 µM o menos, promueve la proliferación de las células de cáncer de mama ZR-75-1 y MCF-7, sin afectar la concentración de G6FD; mientras que a concentraciones mayores de 10 µM de la DHEA, se observa una inhibición de la proliferación en las células MCF-7, con una disminución de la actividad de la G6FD, indicando que la DHEA tiene un efecto antiproliferativo independiente de la actividad de la G6FD. Concluyéndose que la DHEA tiene una acción proliferativa a concentraciones fisiológicas e inhibitoria cuando se utiliza a concentraciones mayores en células MCF-7. Otros estudios atribuyen este efecto de acción mitógena de la DHEA a la transformación

de la misma en estrógenos, particularmente a estradiol; mientras otros, establecen que la DHEA inhibe la proliferación de las células MCF-7 en presencia o en ausencia del estradiol, ya que el efecto se abate en presencia de bloqueadores de los ER como la hidroxiflutamina, sugiriendo una acción específica de los AR en esta acción⁶.

Con respecto a los ER y el AR, se han realizado estudios de la acción de la DHEA sobre líneas celulares de cáncer de mama, observándose que el DHEA-S induce el crecimiento en un 43.4 % de células con ER +/AR + pero inhibe el crecimiento de células ER -/ AR + en un 22 %. La estimulación con la DHEA-S indujo proliferación a través del ER pero inhibió las células a través del AR. En las células T47D se observó que después del tratamiento con la DHEA, se mejoraba significativamente el crecimiento y la expresión del ER, y la inducción del ARNm del factor de crecimiento transformante α (TGF- α)⁶.

El efecto anticancerígeno de la DHEA en el cáncer de mama se puede explicar lógicamente por la formación predominante de los andrógenos sobre los estrógenos en el tejido mamario, proporcionando así una mayor influencia de los andrógenos, que son inhibidores bien conocidos de la proliferación de la glándula mamaria *in vitro*, así como en modelos animales y en mujeres⁴.

- ❖ Cáncer de timo: La DHEA modula la apoptosis y la proliferación de los timocitos, dando como resultado una atrofia tímica. Estudios previos sobre ratones deficientes de p53 (p53-/-) mostraron que el tratamiento con DHEA disminuye el desarrollo de linfoma⁶.
- ❖ Cáncer de páncreas: Estudios realizados sobre ratones atímicos con dos líneas celulares de cáncer de páncreas MiaPaCa-2 y Panc-1 y xenoinjertos de cáncer de páncreas, se observó que la DHEA disminuye el crecimiento, el peso y el tamaño de los tumores después de su administración. En otros estudios, con el tratamiento de DHEA-S, se produjo inhibición de la proliferación de líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas humano como MiaPaCa-2, Capan-1, Capan-2, CAV, y Panc-1, a dosis dependientes; además de que inhibe la proliferación celular en un 22 % a dosis 5×10^{-7} μ M, pero el incremento DHEA-S no aumenta más el efecto inhibitorio⁶.
- ❖ Médula ósea y leucemia: Estudios de la DHEA en la dieta de roedores se observó que provoca una disminución de ingesta de alimento y la inhibición del crecimiento de células de leucemia y de médula ósea⁶.
- ❖ Linfoma y Mieloma: La administración de la DHEA en la dieta o por medio de inyecciones, ha demostrado que inhibe las células de mieloma múltiple U-266 en ratones inmunodeficientes, además, se ha demostrado que la DHEA inhibe la interleucina 6 (IL-6) en células mononucleares de médula ósea y líneas estromales KM-102 de pacientes con mieloma, asimismo inhibe la linfopoyesis pero no la mielopoyesis. Estudios *in vitro* con la DHEA y el DHEA-S demostraron una inhibición de la proliferación de varios tipos de líneas celulares de mieloma humano como son U-266, NOP-2 y IL-KM3⁶.

- ❖ Tumor ascítico de Ehrlich: Se observó que la DHEA inhibe la proliferación de células de tumor ascítico de Ehrlich en un 46 %, observándose que en tratamientos a dosis creciente de DHEA, los tumores mostraban un aumento, dosis dependiente, de poblaciones celulares en las fases G0-G1 después del tratamiento, y una disminución de las células en la fase S y G2-M, sugiriendo que la DHEA induce una detención del ciclo celular en la fase G1 en las células tumorales a través de la inhibición del ciclo de pentosas (PC) ⁶.
- ❖ Cáncer de hígado: La DHEA inhibe la duplicación celular y la incorporación de uridina en la proliferación de células de hepatoma y los hepatocitos en perros y gatos. En estudios *in vitro* demostraron que la DHEA tiene una acción antiproliferativa en líneas celulares de hepatocarcinoma HepG2, asociada a una mayor actividad de la G6FD, por lo que la DHEA no actúa mediante la reducción de la actividad de la G6FD. Este efecto se relaciona con alteraciones en la expresión genética mitocondrial, afectando su función y morfología; y la inhibición de la vía de señalización de la Akt, sugiriendo la inducción de apoptosis ⁶.
- ❖ Cáncer de próstata: Se ha observado que la DHEA estimula la proliferación de líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP, y el aumento de la expresión de genes del antígeno prostático específico (PSA), del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) y la proteína de unión 2. La DHEA-S a concentraciones de 10^{-5} M inhibe la proliferación de las líneas de cáncer de próstata AXC/SSH, mientras que a concentraciones de 10^{-6} a 10^{-9} M no se afecta la proliferación ⁶.
- ❖ Cáncer de colon: La DHEA inhibió el crecimiento en células de adenocarcinoma de colon Caco-2 y HT-29, y este efecto no está correlacionado con la inhibición de G6PD ⁶.
- ❖ Neuroblastoma: En líneas celulares de neuroblastoma se observó que la DHEA posee un efecto neurotóxico y antiproliferativo, mientras que la DHEA-S por su parte, tiene un efecto neuroprotector, así como también tiene la capacidad de regular la expresión de metaloproteasas de matriz extracelular 9 (MMP-9) ⁶.
- ❖ Cáncer cervicouterino: En líneas celulares de cáncer cervicouterino infectadas con virus de papiloma humano (HPV) y no afectadas, se observó que la DHEA inhibe la proliferación de estas células en una forma dosis dependiente, no asociado con el bloqueo de los AR, el ER, o por la conversión de la DHEA a estrógenos; se observó además un incremento en la muerte celular por necrosis en células con HPV negativas, y de forma apoptótica en células HPV positivas ⁷.

3.1.4 La DHEA, la migración celular y la angiogénesis

Se ha observado que la DHEA inhibe la migración de líneas celulares de cáncer de mama, de manera independiente de su acción antiproliferativa. La DHEA inhibe la migración de células endoteliales y la formación de tubos capilares *in vitro* a altas concentraciones (10-100 μM)⁶. El DHEA-S inhibe la migración de líneas celulares de músculo vascular de conejo (SME-3) y músculo vascular de carótida de conejo^{6,11}. Al contrario, en líneas celulares de fibroblastos, la DHEA induce la migración celular, después de su conversión a estrógenos¹².

La DHEA tiene actividad antiangiogénica a altas concentraciones (10-100 μM), que puede deberse a la remodelación del citoesqueleto, el cual juega un papel importante en la locomoción y la proliferación celular. Entre estas modificaciones se encuentran cambios en la organización de la tubulina, lo que conlleva a una modificación en la capacidad de la célula a moverse y a realizar la mitosis. La inhibición de la angiogénesis se atribuye a la acción directa de la DHEA o a la transformación de la misma a metabolitos como el Adiol (reducción de la DHEA en el C17)⁶.

A altas concentraciones de la DHEA, se ha observado una disminución de algunas proteínas que se encargan de degradar la matriz extracelular y promover la migración celular, como las metaloproteasas de matriz extracelular 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9), así como de la proteína de matriz extracelular 1 (ECM-1)⁸. La DHEA-S tiene un efecto contrario, que puede deberse a que esta no se transporta por proteínas a través de la membrana celular⁶.

3.1.5 DHEA y la seguridad

No se han reportado efectos adversos graves relacionados con la administración de la DHEA en mujeres y hombres. Los únicos efectos secundarios reportados, a pesar de las altas dosis de uso frecuente en una pequeña proporción de las mujeres, son el acné facial leve, aumento de la producción de cebo y cambios leves en el crecimiento del cabello³. La incidencia de estos efectos secundarios leves normalmente se informó en un 50 % de la misma tasa observada en sujetos tratados con placebo (Genelabs, documento informativo, 19 de abril 2001 la FDA Arthritis Advisory Committee).

Solo se ha reportado un caso de agravamiento de cáncer de próstata tras la administración de la DHEA (200- 700 mg) como tratamiento de una anemia que no responde a la eritropoyetina; observándose un incremento en el número de células sanguíneas, eliminando su necesidad de transfusiones; sin embargo, el paciente comenzó a desarrollar entumecimiento facial, aumento en el tamaño de próstata, dificultad de micción y aumento del PSA. Síntomas que se vieron inhibidos tras la suspensión del tratamiento con la DHEA. Aun con estas evidencias, se concluyó que no hay ninguna asociación de la administración de la DHEA exógena con el riesgo de desarrollar cáncer.

3.2 CÁNCER CERVICOUTERINO (CaCu)

El cáncer es un trastorno en la diferenciación y el crecimiento celular, que ocasiona la formación de neoplasias que son masas de tejido anormal cuyo crecimiento es excesivo y no coordinado en comparación con el tejido normal, que no obedecen a controles de regulación normal de crecimiento y división; y que persisten aun después de la desaparición del estímulo que las indujo. Se piensa que derivan de mutaciones que se producen durante el proceso de diferenciación, si la mutación se presenta en una fase temprana de la diferenciación celular, el tumor resultante es una lesión mal diferenciada y muy maligna; si la mutación por el contrario, se produce en una etapa tardía de la diferenciación, el tumor resultante es más diferenciado y menos maligno. Las neoplasias malignas son masas de tejido de células indiferenciadas con anaplasia y una estructura atípica, a menudo de aspecto muy distinto al de las células del tejido de origen. Tienen a crecer con rapidez, teniendo la capacidad de invadir tejidos circundantes y acceder a los conductos linfáticos y sanguíneos para generar metástasis en otras áreas del cuerpo ¹³.

El cáncer de cuello uterino o también conocido como cáncer cervicouterino (CaCu) ¹⁴, se forma en los tejidos del cuello uterino (el órgano que conecta el útero con la vagina). Por lo general, es un cáncer que crece lentamente, como resultado de la progresión de leves anomalías epiteliales llamadas displasias o neoplasias intraepiteliales (NIC) que puede no tener síntomas pero que puede encontrarse con un frotis de Papanicolaou común (un procedimiento en el que se raspan células del cuello uterino y se observan bajo un microscopio). La causa del cáncer de cuello uterino es casi siempre por infección con el virus del papiloma humano (VPH) ¹⁵.

En el año 2005, según la OMS, se registraron más de 500,000 casos nuevos de CaCu, de los cuales el 90 % corresponde a países en vías de desarrollo; siendo América Latina y el Caribe quienes presentan una de las más altas tasas de incidencia y mortalidad, solamente superado por África Oriental y Melanesia ¹⁶. Actualmente, el CaCu es la segunda causa de muerte causada por tumores en México según estadísticas de la INEGI. En el año 2008, el CaCu produjo 4, 036 defunciones, con una tasa media de mortalidad de 7.4 por cada 100,000 habitantes; superado por el cáncer de mama con 4, 668 defunciones (INEGI).

3.2.1 Factores de riesgo

Algunos factores de riesgo para adquirir el CaCu son la presencia de infecciones causadas por virus denominados oncogénicos, entre estos virus se encuentran el virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2), Citomegalovirus y el Virus del Papiloma Humano (VPH). Otros factores pueden ser el nivel socioeconómico bajo; múltiples parejas sexuales; el número de embarazos (>3); iniciación de la vida sexual antes de los 16 años; infecciones causadas por *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* y clamidias; el uso de anticonceptivos hormonales, y el tabaquismo ^{15, 17}.

3.2.2 Cáncer invasor

La agresividad de un tipo dado de cáncer está determinada por la capacidad de las células de migrar e invadir barreras tisulares para colonizar otros sitios¹⁶ (tabla1).

Existen diferentes tipos de cáncer invasor en México. El 70 % es el carcinoma epidermoide no queratinizante de células grandes, el 21 % es el carcinoma epidermoide queratinizante, el 4 % es el carcinoma epidermoide no queratinizante de células pequeñas y adenocarcinoma endocervical, y un 1 % es del tipo carcinoide y carcinoma de células claras. El carcinoma epidermoide queratinizante se origina en el epitelio escamoso ectocervical, mientras los otros cánceres mencionados, se originan en el interior del canal endocervical¹⁴.

El carcinoma que se origina en la mucosa endocervical es bajo, y su origen se asocia a las infecciones por el VPH del tipo 18. Dentro de estos tipos de cáncer se encuentra el adenocarcinoma endocervical *in situ*, en donde no existe invasión estromal. Este carcinoma es precursor del adenocarcinoma endocervical invasor; en donde hay invasión estromal. El carcinoma epidermoide crece en forma de nido o masa, que ocupa los tejidos cervicales y estructuras vecinas¹⁴.

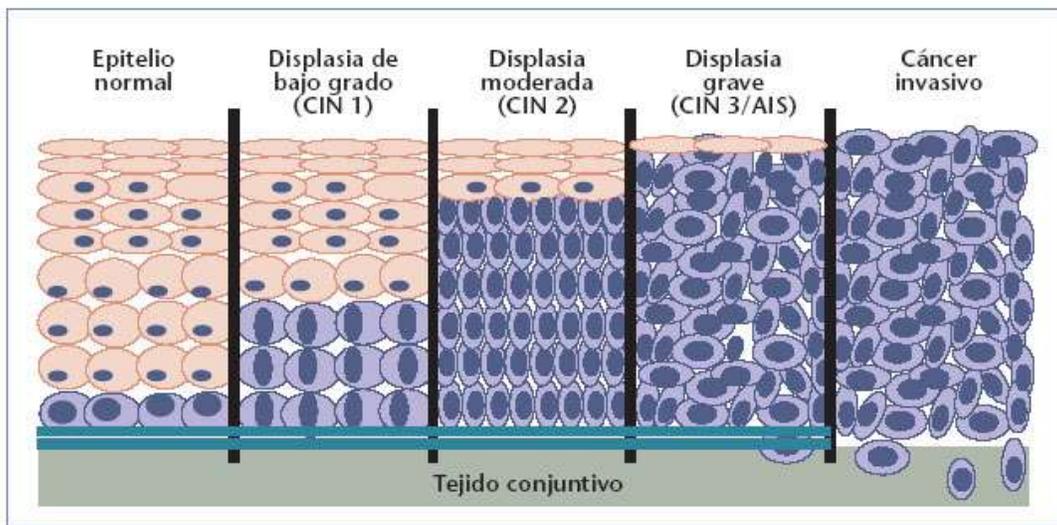


Figura 5. Neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC). NIC1 o displasias leves, NIC2 o displasias moderadas, NIC3 son las displasias avanzadas y el carcinoma *in situ* . Tomada de:

<http://goo.gl/qHfZV>

Tabla 1. Estadios de evolución del carcinoma cervicouterino ¹⁴.

Estadio.	Descripción.
0	Carcinoma pre-invasor (carcinoma intraepitelial <i>in situ</i>).
I	Carcinoma estrictamente confinado al cérvix.
Ia	Carcinoma preclínico del cérvix (diagnostico de forma microscópica).
Ia1	Evidencia de invasión estromal mínima.
Ia2	Lesiones detectadas por microscopia. La máxima profundidad de la lesión es de 5mm, tomada desde la base del epitelio sea escamoso o glandular.
Ib	Lesión de mayor dimensión que la descrita en Ia2.
II	Carcinoma invasor que se extiende más allá del cuello uterino, afectando dos tercios de la vagina o infiltración parametrial, sin alcanzar las paredes pélvicas laterales.
Ila	Carcinoma invasor que afecta a los dos tercios superiores de la vagina.
Ilb	Carcinoma con infiltración de los parámetros sin alcanzar la pared pélvica lateral.
III	Carcinoma invasor que se extiende a las paredes laterales de la pelvis o el tercio inferior de la vagina.
IIIa	Extensión al tercio inferior de la vagina.
IIIb	Extensión a la pared pélvica con o sin hidronefrosis o riñón no funcional.
IV	Carcinoma invasor que involucra la mucosa de la vejiga urinaria y/o recto o se extiende más allá de la pelvis.
IVa	Invasión a otro órgano adyacente.
IVb	Invasión a órganos distantes.

3.3 VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH)

El virus del papiloma humano (VPH) es el principal agente etiológico infeccioso asociado con la patogénesis del CaCu. Walboomers¹⁸ y colaboradores han demostrado que el CaCu invasor se asocia con la presencia del VPH en un 99.7 % de los casos¹⁵. Se han identificado cerca de 100 tipos del VPH, de los cuales sólo 20, hasta ahora, se asocian con atropismo en el tracto anogenital. El VPH produce la proliferación de células epiteliales originando transformaciones benignas conocidas como papilomas, las cuales pueden transformarse en malignas¹⁴.

El VPH infecta a células de la capa basal y parabasal. Cuando los virones intactos entran en contacto con las células indiferenciadas de la capa basal y parabasal, estas pueden diferenciarse en epitelio escamoso, glandular o neuroendócrino¹⁴. El proceso de infección ocurre fundamentalmente, a través de los receptores de integrinas presentes en las células basales, donde se produce un amplio espectro de cambios morfológicos una vez infestadas¹⁵.

Existen 20 tipos de VPH asociados con atropismo anogenital que se clasifican según el riesgo de progresión a formar cáncer invasor¹⁴. Los VPH se clasifican como virus de bajo riesgo o no oncogénicos, los que corresponden a los tipos 6, 11, 42, 43 y 44, los cuales se asocian con neoplasias anogenitales y formación de condiloma acuminado, además se asocian a las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) y rara vez con las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG). Por otro lado, se encuentran los virus de alto riesgo, que son los VPH de tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 67 y 68, que son virus oncogénicos asociados a LEIAG y a carcinoma invasor. El VPH tipo 16 se encuentra en lesiones del epitelio escamoso; mientras que el VPH del tipo 18 está asociado a las neoplasias glandulares. Se conoce que estos virus inducen la producción de las oncoproteínas E6 y E7 por las células infectadas¹⁴.

Se ha encontrado que en pacientes que padecen de CaCu causado por el VPH que el 90 % de los casos contiene ADN del VPH-16 y un 12 % presenta ADN del VPH-18¹⁴.

El VPH posee dos tipos de oncogenes que codifican para la producción de las oncoproteínas E6 y E7. La sobreexpresión de estos genes transformantes se debe a la pérdida del gen E2, que se encuentra en la región E1/E2; generalmente cuando la región E1/E2 se rompe, el genoma viral se integra en el genoma hospedero; que se encarga de producir proteínas reguladoras de la transcripción de las regiones tempranas del virus, reprimiendo la transcripción de las E6/E7. La pérdida del gen E2 provoca una sobre proliferación celular a través del epitelio, produciendo una maduración escamosa desorganizada. Couturier y colaboradores encontraron que hay secuencias integradas del VPH a los oncogenes c-myc, n-myc y c-Ha-ras en el genoma humano que podrían liberar la expresión de las proteínas E6/E7¹⁴.

La oncoproteína E6 se ha relacionado a la degradación de la proteína p53 (proteína que se encarga de controlar la proliferación celular deteniendo el ciclo celular en la fase G1 o induciendo

la muerte por apoptosis)¹⁴, uniéndose a ésta, formando un complejo E6-p53 que es blanco de degradación lo que provoca fallas en la regulación de la proliferación y la apoptosis. La E6 promueve la immortalización de las células, al activar las telomerasas y mutaciones adicionales que estabilizan los telómeros del ADN celular¹⁵.

La oncoproteína E7 promueve la transcripción viral, uniéndose al gen del retinoblastoma (Rb), liberando el factor de transcripción E2F, promoviendo la síntesis del ADN del virus y de la propia célula; impide la regulación del crecimiento celular mediante su unión competitiva con la ciclina A1 y con la proteína p107 activando complejos de ciclinas. La E7 se une a inhibidores de ciclinas como el p21cip1 (producido por la p53) bloqueando su acción¹⁵.

El VPH por sí sólo no estimula la formación del CaCu, sino que requiere de la presencia de otros factores entre los que se encuentran el tipo de virus que infecta a la célula y la presencia de la carga viral, asociados a los otros factores mencionados anteriormente^{15,17}.

3.4 METÁSTASIS

La metástasis es un proceso dinámico a través del cual las células, bajo estimulación parácrina y autócrina, salen de su ambiente primario y viajan, ya sea localmente o a distancia, dentro del cuerpo para formar un nuevo foco proliferativo¹⁹. Se lleva a cabo por aquellas células capaces de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). Estas células degradan la matriz extracelular que las rodean (invasión), y son capaces de alcanzar el torrente circulatorio (intravasación), sobreviven en el mismo y atraviesan las paredes de los capilares de otros órganos (extravasación), para invadir nuevamente la matriz extracelular y formar tumores secundarios (colonización) (Figura 6).

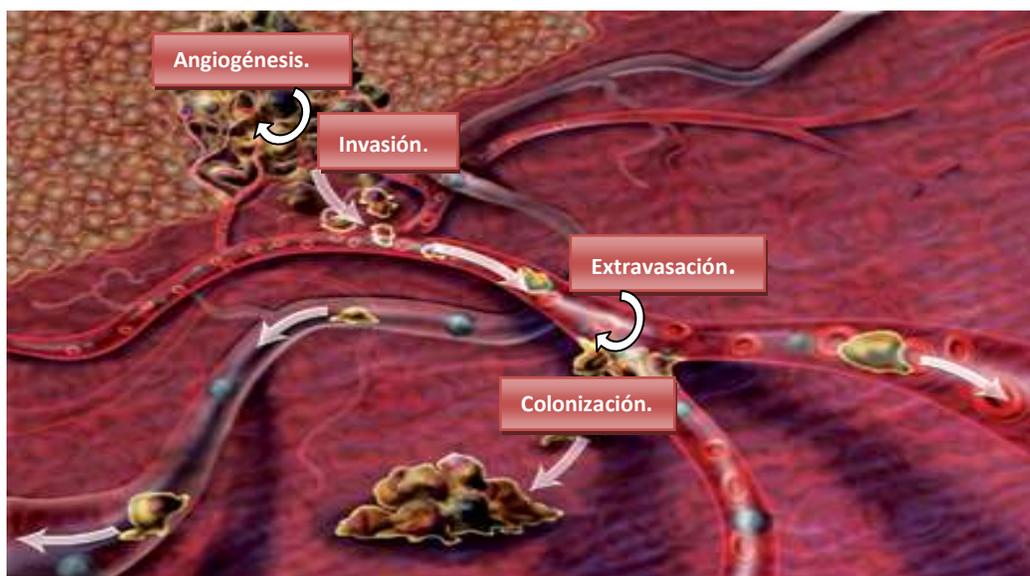


Figura 6. Etapas de la metástasis. Tomada de: <http://goo.gl/iRJkp>

La característica más notable de los tumores malignos es su capacidad para invadir los tejidos adyacentes y formar focos metastásicos en lugares alejados del cuerpo. La metástasis constituye la causa principal de muerte en pacientes con cáncer; una vez que las células tumorales alcanzan el torrente sanguíneo, el proceso se torna prácticamente irreversible²⁰. Se ha encontrado que la metástasis puede estar presente en más del 70 % de los pacientes en el momento de su diagnóstico inicial, lo que sugiere que los procesos de invasión y diseminación no son eventos tardíos, sino que se llevan a cabo de manera temprana durante el proceso de carcinogénesis¹⁹.

3.4.1 Etapas de la metástasis

3.4.1.1 Angiogénesis

Es la primera etapa de desarrollo de la metástasis, donde se lleva a cabo la obtención de nutrientes, factores de crecimiento y oxígeno para el crecimiento del carcinoma *in situ*, a partir de

la vasculatura ya existente. Este proceso se realiza normalmente en los adultos en procesos como el ciclo menstrual y la cicatrización de heridas. En el caso del cáncer, ciertas células con fenotipo maligno son capaces de estimular la proliferación de las células endoteliales de vasos próximos al tumor, promoviendo la invasión de las mismas al estroma y su migración en dirección al tumor ²¹. Evidencias experimentales sugieren que, en ausencia de soporte vascular, los tumores pueden estar presentes en el sitio donde se originaron por largos períodos, e incluso pueden eventualmente sufrir de necrosis o apoptosis en ausencia de neovascularización. Existen estudios donde se ha encontrado una relación clínica entre la vascularidad del tumor y la agresividad del mismo. Asimismo, el aumento en la incidencia de la metástasis se ha mostrado por el incremento de microvasos en tumores *in situ* en pacientes con algunos tipos de cáncer ¹⁹.

Los factores que inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos se conocen como factores angiogénicos, éstos son capaces de inducir la proliferación y/o migración de las células endoteliales (Tabla 2).

Tabla 2. Factores angiogénicos ²¹.

<i>Factor angiogénico</i>	<i>Siglas</i>	<i>Características</i>
Familia de factores de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)	aFGF, FGF-3 y FGF-4	El bFGF se almacena en la matriz extracelular, y se libera por la estimulación de la heparasa y el activador del plasminógeno. Estos factores actúan como mitógenos y quimioatrayentes de células endoteliales.
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C	Son los factores angiogénicos más potentes, cuyos receptores VEGFR1-3 (también conocidos como Flk, Flt-1 y Flt-4) se expresan exclusivamente en las células endoteliales. Estos factores actúan como mitógenos y quimioatrayentes de células endoteliales.
Angiogina y factores de crecimiento de células endoteliales derivados de plaquetas (PD-ECGF)		Estimulan la invasión de las células endoteliales y generan sustancias quimioatrayentes.
Angiopoyetina-2		Se une a los receptores Tie-2 de las células endoteliales, provocando una desestabilización de la pared vascular, permitiendo la reorganización de los vasos estimulada por el VEGF.

La acción proliferativa y de migración inducida por estos factores se inhibe por factores antiangiogénicos, entre los que se encuentran el interferon alfa (IFN- α), el factor plaquetario 4 (PF-4), los inhibidores de las metaloproteinasas tisulares (TIMP), la trombospodina y fragmentos de proteínas como la angiostatina y la endostatina.

3.4.1.2 Invasión y migración

Esta etapa de la metástasis se enfoca en la invasión de los tejidos adyacentes al tumor, debido a la capacidad que poseen ciertas células tumorales malignas de degradar la membrana basal del epitelio y la matriz extracelular que las rodea, logrando penetrar a los sistemas linfático y/o circulatorio. Actualmente se considera que el fenotipo invasivo le permite a la célula perder sus propiedades adhesivas, inducir proteólisis local y migrar, no únicamente en la membrana basal adyacente, sino en la matriz extracelular presente en diferentes partes del organismo ¹⁹.

Este proceso depende de tres fenómenos:

3.4.1.2.1 Adhesión Celular

Las células tumorales debilitan las uniones que estabilizan su localización actual para poder llevar a cabo la invasión al tejido adyacente, al mismo tiempo, las células deben de tener la capacidad de desarrollar nuevos mecanismos de adhesión al nuevo tejido circundante que les proporcione nuevas señales de supervivencia y nutrientes para su proliferación. Entre estos mecanismos se encuentra el incremento de la expresión de las moléculas de adhesión ¹⁹.

Las moléculas de adhesión son receptores de membrana que participan en funciones relacionadas con el tráfico celular, con interacciones entre célula-célula o de célula con la matriz extracelular, participando en procesos como el crecimiento, diferenciación, migración, apoptosis, la hemostasia, la reparación tisular, la metástasis y en la respuesta inflamatoria ^{22, 23}. Su característica principal es la de transducir señales al interior de la célula en su interacción con sus ligandos o contrarreceptores, desencadenando diferentes eventos funcionales celulares como la expresión génica, cambios fenotípicos de inducción y/o sobreexpresión de moléculas sobre la membrana celular, y cambios en la activación de la célula ²³.

Existen diferentes tipos de uniones entre las moléculas de adhesión que pueden promover o evitar la adhesión de las células tumorales: Las uniones homotípicas, que se dan entre moléculas de adhesión del mismo tipo, actúan como supresoras de la invasión. La reducción de este tipo de uniones permite a las células tumorales separarse de las demás células vecinas. Entre estas se encuentran las de la superfamilia de las inmunoglobulinas (proteínas de membrana independientes de calcio) como la N-CAM (molécula de adhesión de células neuronales), DCC (delecionado del cáncer de colon), CEA (antígeno carcino-embriónico) y MUC-18 y la superfamilia de las cadherinas (proteínas de membrana dependientes de calcio) como la Cadherina-E. Las uniones heterotípicas, que se dan entre moléculas de adhesión de diferente tipo, desempeñan un papel promotor de invasión y de metástasis, promoviendo la unión de las células tumorales al

endotelio vascular, facilitando su desprendimiento del tumor; ejemplo de éstas son las proteínas ICAM (moléculas de adhesión intercelular), las integrinas y los receptores de ácido hialurónico (CD44)¹⁹.

Las moléculas de adhesión celular se clasifican en 5 grandes familias: las integrinas, las selectinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas, las cadherinas y los proteoglicanos.

- a) *Las selectinas*: Son glucoproteínas membranales que tienen un dominio distal del tipo de lectinas que permite a estas moléculas adherirse a grupos de carbohidratos específicos y lípidos. Su estructura es homóloga a las inmunoglobulinas, se encargan de mediar la interacción heterotípica entre células sanguíneas y células endoteliales durante la adhesión leucocitaria en los procesos de inflamación. Esta familia consta de tres miembros: la Selectina-E (endotelio), Selectina-P (plaquetas) y Selectina-L (leucocitos). Los vasos sanguíneos de los márgenes de las lesiones tumorales invasoras expresan la Selectina-E y P, además de la ICAM-1. El aumento sérico de Selectina-E guarda relación con el pronóstico de cáncer de mama y de pulmón de células pequeñas^{24, 25}.
- b) *Superfamilia de las inmunoglobulinas*: Poseen un número variable de dominios similares a las inmunoglobulinas, incluyendo a más de 70 miembros distintos. Tienen en común el control de la conducta de algunas células y están relacionadas con el desarrollo del sistema nervioso central y la regulación del sistema inmune. Entre estas moléculas se encuentran las NCAM, BCAM, ICAM (ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3), VCAM, MadCAM, CEA, HCAM (CD-44), etc. En el cáncer colorrectal se observó un aumento en la expresión de ARNm de CEA en 2.5 veces más, lo que permite el aumento de la invasión de éstas, ya que estas moléculas actúan de forma dual, promoviendo la adhesión y como antiadhesión. Las HCAM son glucoproteínas de superficie importantes en la activación de células T y la adhesión de las proteínas de la matriz extracelular a los hialuronidatos. Muchas células tumorales, así como sus metástasis expresan altos niveles de la CD-44 estándar; en el cáncer gástrico, intestinal, de vejiga, de cuello uterino, de mama y linfoma no-Hodgkin expresan variantes de la CD-44^{24, 25}. Un aumento en la expresión de la ICAM-1 favorece la evasión de la respuesta inmune; y su disminución, decrece el contacto célula-célula, favoreciendo el proceso de metástasis²⁶.
- c) *Integrinas*: Son glucoproteínas heterodiméricas de la membrana celular, están relacionadas con la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular. Las integrinas participan en la agregación plaquetaria, la inflamación, la reacción y respuesta inmune, la curación de heridas y en patogénesis como la metástasis tumoral. Las integrinas están constituidas por unas cadenas α (16 tipos) y otra β (8 tipos), se clasifican como β 1 (participan en la adhesión de las moléculas con el fibrinógeno, colágeno y laminina), β 2 (promueven la adhesión y filtración de los leucocitos al endotelio mediante la interacción con moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas) y β 3 (poseen moléculas relacionadas con la agregación plaquetaria, la angiogénesis y el crecimiento de la placa de

ateroma). Las alteraciones en la expresión de las integrinas se ha relacionado con procesos neoplásicos. En el cáncer de próstata, de endometrio y en metástasis ganglionares, se ha observado una disminución en la expresión de las integrinas. Se ha demostrado que algunas integrinas actúan como supresoras de tumorigénesis, como es el caso de las integrinas $\alpha 2\beta 1$ en células de carcinoma de mama, y la integrina $\alpha 4\beta 1$ en células de melanoma^{24, 25}.

d) *Cadherinas*: Son glucoproteínas transmembranales dependientes de calcio. Entre ellas se encuentran la cadherina-E y la cadherina-N. La pérdida de adhesión celular mediada por cadherina-E en líneas celulares tumorales, ayuda a la adquisición de la capacidad de invasión de la matriz extracelular. En tumores de bajo grado de diferenciación, así como tumores agresivos y lesiones metastásicas, se ha encontrado una reducción o anulación de la expresión de la cadherina-E; esta disminución se relaciona con una hipermetilación de los sitios de iniciación de la transcripción de este gen, teniendo como resultado mutaciones que alteran la unión de ésta a las cateninas intracelulares. En cáncer colorrectal y gástrico, se ha demostrado que la disminución en la expresión de la cadherina-E y de las cateninas- α se relaciona con el aumento del potencial de invasión. En neoplasias pulmonares, las alteraciones en la expresión de la cadherina-E y de las cateninas α y β , disminuyen la adhesión homotípica y aumentan el número de células neoplásicas liberadas del tumor primario²⁵.

e) *Proteoglicanos (PGs)*: Son macromoléculas formadas por una proteína central, a la cual se asocian en su extremo terminal numerosas moléculas de glucosaminoglicanos (GAG) sulfatados, entre los que se encuentran el heparan sulfato (HS), condroitino sulfato (CS), dermatan o queratan sulfato y ácido hialurónico. Entre sus funciones está la de formar un gel altamente hidratado que constituye la matriz extracelular en la cual se encuentran células y fibras conjuntivas.

Los Sindecanos son una familia de PGs constituida por cuatro miembros insertados en la membrana plasmática: Sindecano-1 se encuentra principalmente en las células epiteliales, Sindecano-2 en fibroblastos, Sindecano-3 en tejido neuronal y Sindecano-4 en fibroblastos, epitelio y músculo liso. Presentan un dominio citoplasmático, transmembrana y un dominio extracelular distinto (ectodominio) con sitios de unión de tres a cinco GAGs de HS^{26, 27}.

Se ha relacionado la expresión del Sindecano-1 con la morfología de las células epiteliales, la disminución de su expresión puede ser considerada como un evento temprano a la progresión tumoral; mientras que el aumento de la expresión del ectodominio de Sindecano-1 en el estroma debido al proceso de *shedding* (es el proceso por el cual se lleva a cabo la liberación del dominio extracelular de proteínas transmembranales mediante procesos proteolíticos al medio extracelular) está asociado con la progresión tumoral y un mal pronóstico, debido a que el ectodominio, mediante su unión a proteínas

de la matriz extracelular y a factores de crecimiento, puede estimular la señalización para inhibir el crecimiento tumoral, estimular la polimerización de la actina e inducir morfología epitelial, mientras que la degradación de esta estructura no permite la inhibición del crecimiento.

Mientras que en el caso del Sindecano-2, la sobreexpresión de este PG se relaciona con la pérdida de interacción de la célula-sustrato contribuyendo con la tumorigénesis como la angeogénesis, facilitando el crecimiento tumoral y la metástasis; ya que se ha observado en algunos cánceres que actúa como inhibidor del crecimiento de células tumorales suprimiendo a la activación de la MMP-2 por la interacción con la cadena de HS. El Sindecano-2 junto con la integrina $\alpha 5\beta 1$ participa en la regulación del citoesqueleto de actina durante la adhesión celular formando una estructura fuerte, puede inducir apoptosis y sensibilidad a drogas quimioterapéuticas²⁶.

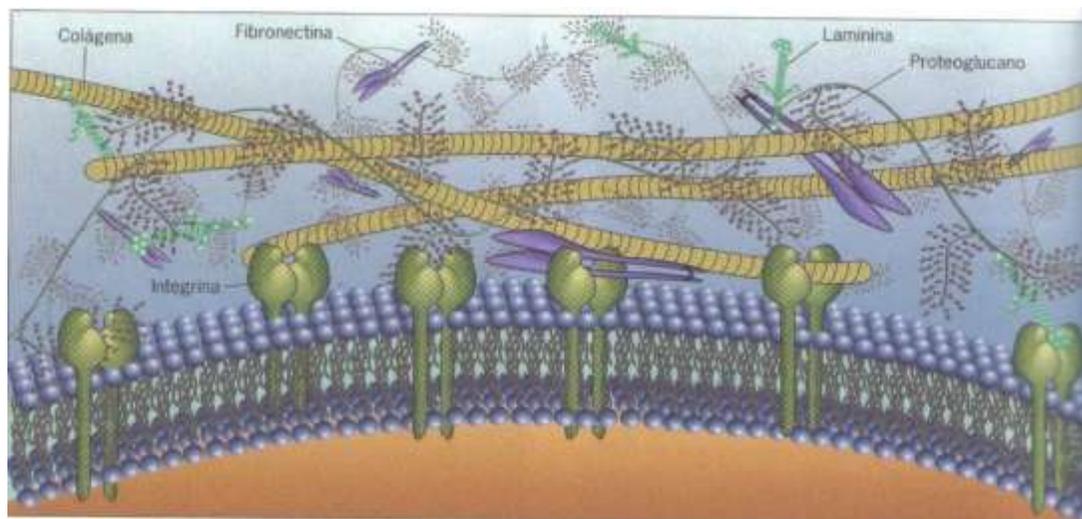
3.4.1.2.2 Degradación Proteolítica

Esta etapa se caracteriza por la degradación de la matriz extracelular adyacente a las células tumorales, por lo que se requiere de la producción, liberación y activación de una gran variedad de enzimas, lo que posibilita su migración y diseminación. Estas enzimas proteolíticas pueden ser secretadas por las mismas células tumorales o por células normales adyacentes al tumor primario, estimuladas por la secreción de citocinas y/o factores de crecimiento; o por la producción de factores que inhiben o activan proteasas presentes en el microambiente. Tanto las células normales como las tumorales secretan inhibidores de proteasas, de manera que la actividad proteolítica neta son el resultado de un balance entre la producción y activación de proteasas, y la disponibilidad de inhibidores endógenos^{19, 20}.

La matriz extracelular está conformada por dos capas fundamentales: la membrana basal y el tejido estromal intersticial. La membrana basal es una estructura extracelular continua que separa las células epiteliales y el endotelio del tejido estromal y proporciona un sustrato para el crecimiento de las células, además mantiene la arquitectura tisular. Entre sus principales componentes está el colágeno tipo IV, glucoproteínas y proteoglicanos. El colágeno tipo IV representa el 60 % de las proteínas totales de la matriz, posee una estructura de triple hélice, y distintas subunidades se agrupan en hexámeros y tetrámeros que se unen para formar una red tridimensional a las cuales están unidos los demás componentes de la matriz extracelular. Las glucoproteínas de la membrana basal son la laminina, la fibronectina y la entactina o nidogeno. La laminina y el fibrinógeno posibilitan el anclaje de muchos componentes, debido a que poseen dominios específicos de unión a colágeno, a proteoglicanos y a integrinas de la superficie de las células; además, estos dominios de unión celular desempeñan papeles en la diferenciación, división y locomoción celular. Los proteoglicanos mayoritarios de la membrana basal son el heparano sulfato y el condroitino sulfato que representan sólo un 10 % de las proteínas totales de la matriz, debido a su naturaleza hidrofílica, forman geles hidratados, por lo que ocupan un gran

volumen del espacio extracelular, proporcionando un soporte mecánico a los tejidos y facilitando la difusión de solutos y la migración celular ²⁰ (Figura 7).

El tejido estromal intersticial contiene células como fibroblastos, osteoblastos, condrocitos o macrófagos, además de colágeno fibrilar del tipo I, II, III, el cual es rígido y resistente a la degradación proteolítica. La elastina es una proteína no glucosilada e hidrofóbica, secretada como tropoelastina al exterior de la célula que forma una red de fibras que proporcionan elasticidad al estroma intersticial. El tejido estromal posee también glucoproteínas, proteoglicanos y glucosaminoglucanos que contribuyen a mantener la forma y el volumen del tejido, y a regular la permeabilidad de la matriz extracelular. Este tejido tiene una función mecánica y de soporte esencial para el cuerpo, y puede adoptar formas muy distintas como hueso, cartílago o tendones ²⁰.



Figuras 7. Estructura y componentes de la matriz extracelular. Tomada de: <http://goo.gl/6WjQH>

La matriz extracelular está sometida a un lento y continuo proceso de recambio de sus componentes, a través de su síntesis y degradación, esto para mantener su integridad. Este evento está controlado de manera moderada en procesos fisiológicos como la invasión trofoblástica, la involución uterina tras el parto y la angiogénesis. En procesos patológicos como las neoplasias malignas, se observan membranas basales defectuosas en áreas localizadas en donde las células tumorales aprovechan esta deficiencia para realizar la invasión al tejido estromal circundante. Estas anomalías se pueden deber a la disminución de la síntesis de las macromoléculas que constituyen a la matriz o al aumento de la degradación de los componentes de la misma ²⁰.

Los tejidos de tumores malignos presentan una actividad proteolítica elevada en comparación con tejidos de tumores benignos y tejidos normales. Esta proteólisis se lleva a cabo por proteasas de matriz extracelular, las cuales pertenecen a cuatro subfamilias (Tabla 3) que son:

3.4.1.2.2.1 Proteasas de matriz extracelular

- A. Serina proteasas:** Se caracterizan por poseer en su sitio activo un residuo de serina que junto a residuos de ácido aspártico e histadina, constituyen la triada catalítica esencial para el funcionamiento de esta enzima ²⁰. Las proteasas de esta familia asociadas a carcinomas humanos son los activadores del plasminógeno, la elastasa, la tripsina tumoral ovárica y la catepsina G ²⁰.

Los activadores de plasminógeno son enzimas que se encargan de la conversión de plasminógeno en plasmina que se encarga de la disolución de coágulos de fibrina y de degradar diversos componentes de la matriz extracelular, como la fibronectina, el colágeno tipo IV, la vitronectina, la laminina y el núcleo proteico de los proteoglicanos; poseen la capacidad de activar a otras metaloproteasas y elastasas.

El activador de plasminógeno del tipo de uracinasas (uPA) se encarga de acciones como la remodelación tisular y la migración celular. Se ha encontrado que el uPA al unirse a un receptor de membrana específico en las células o en el receptor de plasminógeno, permite la degradación de la matriz extracelular. Su actividad enzimática está mediada por inhibidores específicos denominados PAI-1, PAI-2, PAI-3 y proteasa nexina (PN) ^{19, 20}.

- B. Metaloproteasas de matriz extracelular (MPP):** Familia de proteínas endopeptidasas secretadas por células del tejido conectivo, fagocitos y otras células que son sintetizadas como precursores de elevado peso molecular (zimógenos) que se activan a partir de la ruptura enzimática de azufre-zinc. Estas proteasas poseen un sitio de unión de iones zinc (Zn) y un residuo de cisteína. Son activadas a pH neutro o ligeramente alcalino y participan en procesos de remodelación tisular, incluyendo el desarrollo embrionario, crecimiento y reabsorción ósea, la ovulación, la cicatrización de heridas o la involución uterina posparto; la expresión anormal de estas se relaciona con patologías como la artritis reumatoide, el enfisema pulmonar, la aterosclerosis, la invasión tumoral y la metástasis. Actualmente se han identificado 15 diferentes tipos de MMP ^{20, 28}.

Las MMP se clasifican en cuatro subfamilias: las colagenasas, las gelatinasas, las estromelisininas, matrilisininas y las metaloproteasas de membrana ²⁰ (Tabla 3).

Las MMP promueven la iniciación y el crecimiento del tumor primario y de los focos metastásicos mediante la activación de factores de crecimiento, formación de moléculas de adhesión, iniciación de la angiogénesis tumoral al movilizar o activar factores proangiogénicos. Se ha encontrado una correlación positiva con la adquisición del fenotipo maligno en las células cancerosas y el aumento de la producción de las metaloproteasas de membrana (MT-MMP) que son enzimas expresadas en la superficie de las células tumorales relacionadas con la invasión tumoral.

La capacidad degradativa de las MMP puede ser controlada por inhibidores tisulares específicos conocidos como inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP) de los cuales se han identificado 4 tipos, denominados como TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Son capaces de bloquear la invasión tumoral, inhibiendo la capacidad invasiva de las células tumorales, tanto *in vivo* como *in vitro*; y reduce la velocidad de crecimiento de los tumores^{19, 20}.

- C. *Cisteína proteasa*: Proteasas del tipo endo y exopeptidasas cuya actividad catalítica depende de la reactividad del grupo tiol de un residuo de cisteína presente en su centro activo. Hasta el momento se han identificado siete tipos de cisteínas proteasas las cuales se les denomina catepsina B, L, H, S, O, K, y C. Estas son glucoproteínas lisosomales con pH óptimo ácido. Participan en procesos fisiológicos como el recambio tisular, y su actividad está controlada por inhibidores conocidos como cistatinas. Se ha reportado que en ciertos procesos patológicos, las cisteínas son liberadas hacia el espacio extracelular como es el caso en los procesos inflamatorios, en la artritis reumatoide y en procesos neoplásicos, donde estas proteasas son capaces de degradar la matriz extracelular y propiciar la diseminación de las células neoplásicas²⁰.

La *catepsina B* es la más abundante y se ha identificado en carcinomas de mama, colon rectal y hepático. Se encuentra en la membrana plasmática de células de tumores primarios y líneas celulares tumorales. Posee la capacidad de degradar a las proteínas de la matriz extracelular como la laminina, la fibronectina o toda la serie de proteoglicanos; así como la capacidad de activar al uPA, liberar factores quimiotácticos que estimulan la migración de las células tumorales y favoreciendo la diseminación de las células tumorales; se encontró una sobre expresión en pacientes con carcinoma de células escamosas del cérvix uterino y en pacientes con carcinoma papilar de tiroides.

La *catepsina L* es una cisteína proteasa sintetizada por los lisosomas de las células del organismo, cuya función principal es la degradación intracelular de proteínas durante el recambio celular normal, además de estar relacionada con procesos como la presentación de antígeno al sistema inmune o la degradación de la membrana basal glomerular. Su actividad proteolítica se ha asociado a la degradación de una gran variedad de proteínas de la matriz extracelular como la elastina, la azocaseína, la laminina, el colágeno y la capacidad de activar al uPA. Su papel en los procesos neoplásicos está relacionado con la sobreexpresión y liberación de esta proteasa, causado por la transformación maligna de las células, situándose en la membrana plasmática de células de tumorales. Los niveles elevados de la proteína se han detectado en pacientes con cáncer papilar de tiroides, tumores renales, testiculares, en carcinomas de células no pequeñas de pulmón y carcinomas de mama, ovario, colon y vejiga^{19, 20}.

- D. *Aspartilo proteasas*: Son enzimas proteolíticas caracterizadas por poseer en su centro activo dos residuos de ácido aspártico que se activan a un pH ácido. Siendo las enzimas

más representativas de su grupo la catepsina D y E, la renina y la enzima digestiva pepsina A y pepsina C o gastrisina. Estudios recientes han demostrado que en determinados carcinomas humanos existe una sobreexpresión y una secreción abundante de este tipo de proteasas, entre las que destacan la catepsina D y el pepsinógeno C ²⁰.

La *catepsina D* es una proteasa muy abundante, cuya función principal es la degradación de proteínas de alto peso molecular, función que es inhibida por la pepstatina A que se une al centro activo de la proteasa. La importancia de esta enzima en los procesos carcinogénicos se observó en estudios de tumores hormono-dependientes, donde su alta producción es posible que esté estimulada por los estrógenos, andrógenos y algunos andrógenos adrenales como el 5-androstenediol que pueden unirse al receptor de estrógenos y estimular la expresión del gen de catepsina D. Tras la elevada expresión de catepsina D se ha observado una mayor frecuencia de metástasis, relacionada a su acción mitogénica, estimulando la proliferación celular al unirse a los receptores del factor similar a la insulina tipo 2 (IGF II) o al inactivar a los inhibidores de crecimiento intracelular. La catepsina D es capaz de activar a otras proteasas como la catepsina B, desencadenando una cascada proteolítica que culmina con una degradación tisular que acaba con la iniciación de la progresión tumoral ¹⁹.

El pepsinógeno C es el precursor inactivo de la pepsina C, un aspartilo proteasa cuya función normal es la digestión de proteínas en el estómago. En estudios de cáncer de mama se ha observado que esta proteasa se ve aumentada en células de cáncer cuando son estimuladas con andrógenos y glucocorticoides, pero no cuando son estimulados con estrógenos; por lo que se ha propuesto la determinación de los niveles del pepsinógeno C como marcador tumoral; pero los altos niveles de esta proenzima no se han asociado con los procesos de progresión tumoral ²⁰.

Los inhibidores de esta enzima se dividen en tres grupos, estefinas, cistatinas y los cinógenos pertenecientes a la familia de las cistinas. Estas bloquean el sitio activo de las catepsinas a través de su unión no covalente y reversible. Una disminución en la concentración y/o activación de estos inhibidores, pueden contribuir a la progresión de las células tumorales ¹⁹.

Tabla 3. Clasificación y especificaciones de las metaloproteasas de matriz extracelular.

<i>MMP (tipo)</i>	<i>Denominación</i>	<i>Sustracto MEC</i>
Colagenasas.		
MMP-1	Colagenasa-1	Colageno I, II, III, VII, VIII y X, gelatina, proteoglicanos, tenascina, entactina.
MMP-8	Colagenasa-2	Colageno I, II, III, V, VIII y X, gelatina, agregan.
MMP-13	Colagenasa-3	Colageno I, II, III, IV, IX, XIV, gelatina, agregan, fibronectina, tenascina, osteonectina.
Gelatinasas		
MMP-2	Gelatinasa A	Colageno I, IV, V, VII, X, XI, XIV, gelatina, proteoglicanos, elastina, fibronectina, laminina, agregan, versican, osteonectina.
MMP-9	Gelatinasa B	Colageno IV, V, VII, X, XIV, gelatina, proteoglicanos, elastina, agregan, versican, osteonectina.
Estromalisina		
MMP-3	Estromalisina-1	Colageno III, IV, V, XI, gelatina, proteoglicanos, tenascina, fibronectina, agregan, versican, osteonectina, laminina.
MMP-10	Estromalisina-2	Colageno III, IV, V, gelatina, caseína, proteoglicanos, elastina, agregan.
MMP-11	Estromalisina-3	Colageno IV, gelatina, fibronectina, laminina, caseína, transferrina.
Tipo membrana		
MMP-14	MT1-MMP	Colageno I, II, III, caseína, elastina, proteoglicanos, tenascina, fibronectina, vitronectina, laminina, entactina.
MMP-15	MT2-MMP	Tenascina, fibronectina, laminina.
MMP-16	MT3-MMP	Colágeno III, gelatina, caseína, fibronectina.
MMP-17	MT4-MMP	ND

MMP-24	MT5-MMP	ND
MMP-25	MT6-MMP	ND
Otras		
MMP-7	Matrilisina.	Colágeno IV y X, gelatina, agregan, elastina, caseína, laminina, proteoglicanos, fibronectina, vitronectina, entactina, tenascina, transferrina, integrina b ₄ , osteonectina.
MMP-12	Metaloelastasa.	Colágeno IV, gelatina, elastina, caseína, laminina, proteoglicanos, fibronectina, vitronectina, entactina.
MMP-20	Enamelisina.	Amelógenina.
MMP-23^a	MMP-21	ND
MMP-23B	MMP-22	ND
MMP-26	Matrilisina 2	Colágeno IV, fibrinógeno, fibronectina y caseína.
MMP-27	ND	ND
MMP-28	Epilisina	Caseína.

MEC: matriz extracelular; MMP: metaloproteasas; ND: no determinado. Tomada de: <http://goo.gl/zNNDN>

3.4.1.2.3 Movilidad de Células TumORAles

Las células tumorales pueden moverse en respuesta a factores extracelulares solubles de manera direccional (quimiotaxis) o aleatoria (quimocinesis) o en respuesta a componentes inmovilizados en la matriz extracelular (haptotaxis). El movimiento que desarrollan las células es del tipo ameboide, implicando reordenamiento del citoesqueleto y alteraciones en las uniones con la matriz extracelular.

El movimiento se inicia con la despolimerización de los filamentos de actina en la parte posterior de las células en movimiento, y su ensamblaje en la porción anterior, dando lugar a la formación de protuberancias como filpodios, lamelipodios y pseudópodos, este reordenamiento de la actina está regulado por la proteína G monomérica, mediante estas protuberancias se establecen uniones intercelulares de las integrinas de la superficie celular con sus ligandos en la matriz extracelular que le proporciona el anclaje para el desplazamiento de las células; las uniones en la parte posterior se debilitan permitiendo su retracción, proporcionando la fuerza para su desplazamiento por la contracción de los filamentos de actina^{19, 29}.

Los factores extracelulares capaces de estimular la movilidad de las células tumorales se clasifican en tres grupos:

Los factores autócrinos, secretados por las mismas células tumorales; factores parácrinos, secretados por las células del huésped; y proteínas de la matriz extracelular. Dentro de los factores de movilidad autócrinos se encuentran el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF/SF), el ligando del protooncogén c-met, una tirosina cinasa con capacidad de inducir disociación de las células epiteliales; la autotaxina es una lisofosfolipasa D que estimula el crecimiento y la migración celular mediante la producción del ácido lisofosfatídico.

Los factores extracelulares parácrinos son conocidos como *homing factor*, porque provocan la migración de las células tumorales hacia los órganos que los producen, entre estos factores se pueden incluir el IGF-1, la interleusina-8 (IL-8), las histaminas o quimiocinas como SDF-1 (también conocida como CXCL12). Por último, diversos componentes de la matriz extracelular pueden estimular la movilidad de las células cancerosas, no sólo cuando éstas se encuentran inmobilizadas en la matriz extracelular, sino también cuando son solubilizadas por los procesos de proteólisis de la matriz extracelular, estas macromoléculas implicadas en la movilización de las células cancerosas son la fibronectina, la laminina y el colágeno tipo IV²⁹.

3.4.1.2.3.1 Quimiocinas y receptor de quimiocinas

Las quimiocinas son una familia de “citocinas quimiotácticas” de bajo peso molecular (8-17 kDa) que poseen propiedades quimioatrayentes que les permiten regular el tráfico celular hacia determinado órgano o tejido. Pertenecen a una superfamilia de pequeños polipéptidos que conservan cuatro residuos de cisteína que se unen formando un puente disulfuro. Se subclasifican en cuatro grupos dependiendo de la localización de los dos primeros residuos de cisteína cercanos al grupo amino terminal de la proteína madura, éstas son CXC o alpha, CC o beta, C o gamma y CX3C o delta. Se conocen hasta ahora 50 quimiocinas que reconocen a 19 receptores celulares^{30,31}.

Dentro de las quimiocinas con la estructura CXC existe una subclasificación que las distingue entre quimiocinas inflamatorias y las inmunoquimiocinas; se diferencian en que las primeras tienen la capacidad de atraer a los monocitos y neutrófilos, a demás de poseer una secuencia de aminoácidos antes del primer residuo de cisteína, conocida como ELR (ácido glutámico-leucina-arginina); las segundas poseen la capacidad de atraer los linfocitos^{30, 31}. Son secretadas por células como leucocitos, células tumorales, macrófagos, monocitos, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, células del músculo liso, hepatocitos, etc. Su expresión suele estar en respuesta a estímulos como factores inflamatorios crónicos y agudos, quimiocinas, antígenos, irritantes, factores de crecimiento, etc³⁰.

Su papel biológico se ha relacionado con procesos como la migración, la adhesión, la proliferación y la apoptosis celulares, morfogénesis tisular y modulación de la hematopoyesis. Participa en la respuesta inmune, regulación de la angiogénesis, exocitosis de gránulos, transcripción de genes y síntesis de glicosaminoglicanos y colágeno³⁰.

Los receptores de las quimiocinas, son receptores transmembranales con un extremo amino terminal extracelular y un extremo carboxilo terminal intracelular, acoplado a una proteína G heterotrimétrica que se encarga del envío y transducción de señales al interior de la célula, entre las que se encuentran las MAP cinasas, fosfolipasa C β , fosfoinositol-3-cinasa, RAS y GTPasas de la familia Rho; posee 7 dominios transmembranales orientados perpendicularmente a la membrana plasmática. Estos receptores pueden estar expresados en la membrana plasmática celular o ser inducidos, las células que las expresan son células hematopoyéticas, células de respuesta inmune, endoteliales, del músculo liso, timocitos, queratinocitos, neuronas y células tumorales ^{30,31}.

Algunos receptores de quimiocinas poseen afinidad y selectividad por más de una quimiocina, y las quimiocinas pueden unirse a más de un receptor. Algunos receptores van a transducir diferentes señales dependiendo del tipo de quimiocina con la cual se unan, del tipo de célula que la expresa y en el momento en que son expresadas ³⁰.

Las quimiocinas en los procesos neoplásicos está relacionado con las alteraciones en la producción, expresión y señalización de las mismas. Entre las funciones que desempeñan son el control de la migración selectiva de las células tumorales (fenómeno conocido como “homing”), esto debido a la producción de un gradiente de concentración de las quimiocinas secretadas en los órganos diana que tras su síntesis se unen a las proteínas de la matriz extracelular, y que guían a las células tumorales que expresan sus respectivos ligandos. Entre otras de sus funciones se encuentra el control del crecimiento y proliferación de los tumores, el control de la infiltración leucocitaria que puede ser utilizada como factor de crecimiento para las células tumorales, la regulación del proceso de angiogénesis estimulado por las quimiocinas CXCL-ELR, y la estimulación de la adhesión e invasión tumoral y la respuesta inmune ³⁰.

El ligando del receptor CXCR4 (también conocido como fusin o CD184) se trata de la quimiocina CXCL12 (Stromal Cell Derived Factor-1 α o factor derivado del estroma 1 α (SDF-1 α)), el cual responde específicamente. Entre sus funciones biológicas se encuentra la de participar en el desarrollo fetal, la movilización de las células tallo hematopoyéticas y el tráfico basal de linfocitos ³⁰.

Entre las funciones que desempeñan el complejo CXCL12/CXCR4 en las neoplasias son la de dirigir la migración de células tumorales hacia los órganos diana que expresan un gradiente de concentración de CXCL12 (CXCL12 se unen a los proteoglicanos de heparina, heparina sulfatada y fibronectina de la matriz extracelular) como el hígado, pulmón, médula ósea, sistema nervioso central (SNC) y ganglios linfáticos. Los tumores donde han sido estudiados estos efectos son el cáncer de mama, ovario, próstata, páncreas, pulmón, melanoma maligno cutáneo, riñón, neuroblastoma, glioblastoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiple y el rhabdomiocarcinoma. También se ha observado que actúan promoviendo la proliferación de las células tumorales, como en los casos de los cánceres de ovario, próstata, melanoma maligno cutáneo, mieloma múltiple y glioblastoma. En situaciones como la hipoxia (estado de deficiencia de oxígeno en sangre, órganos y tejidos, con compromiso de la función de éstos), donde se observa un aumento en la expresión

del llamado “factor inducible por hipoxia”, se produce un aumento en la expresión del CXCR4 en células neoplásicas (Figura 8) ³⁰⁻³².

Por su parte, el CXCL12 estimula la angiogénesis, la proliferación celular al actuar como factor de crecimiento, la invasión de células tumorales mediante la estimulación de la producción de MMP y la disminución de la respuesta inmune frente al tumor ³⁰.

Se ha propuesto como terapia para el cáncer el empleo de antagonistas, bloqueadores o inactivadores de los receptores o ligados de quimiocinas, para evitar el proceso de diseminación metastásica en melanomas así como en otros tipos de cáncer ³¹.

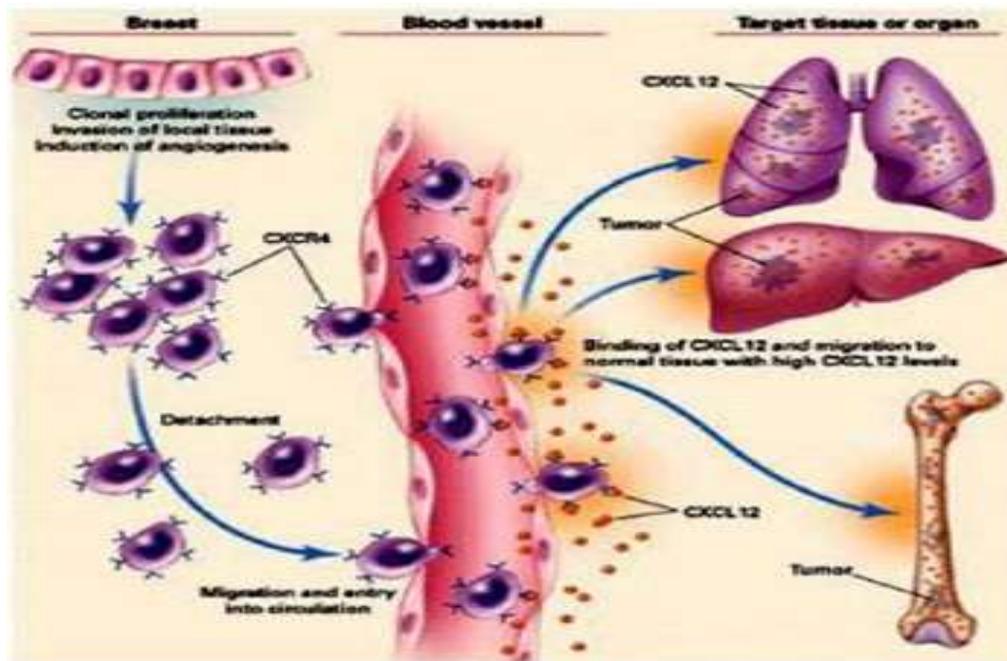


Figura 8. Relación CXCR4/CXCL12 en los procesos metastásicos. Tomada de: <http://goo.gl/H00i>

3.4.1.3 Diseminación y colonización

Tras abandonar el tumor primario, las células tumorales invasivas pueden intravasarse en los vasos sanguíneos o linfáticos, y terminar en la circulación venosa, en cualquiera de las dos rutas. Un pequeño porcentaje de las células capaces de llegar a la circulación venosa podrán formar tumores secundarios ²⁹.

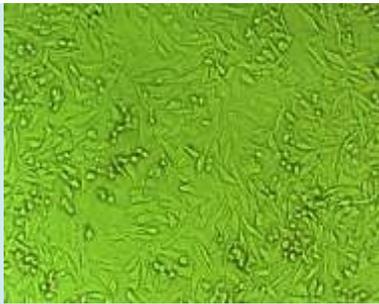
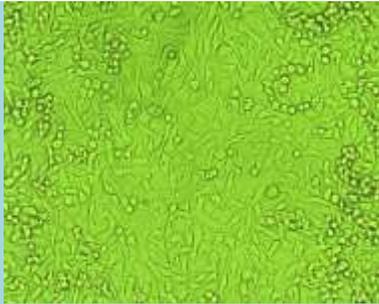
Una vez en el torrente circulatorio, las células tumorales deben detenerse en la vasculatura de los órganos diana, extravasándose al parénquima de dicho órgano, mediante la migración activa de las células tumorales, por diapédesis, siguiendo la migración de los leucocitos o a través de la disrupción mecánica de la pared vascular, causada por la proliferación intravascular de las células tumorales ³³.

La extravasación inicia cuando las células tumorales se adhieren a las células endoteliales del órgano, induciendo la retracción de las células endoteliales, habitualmente a nivel de la unión de dos células adyacentes; pasando las células tumorales a la membrana basal, donde se encargará de degradar o desestructurar los componentes de la membrana basal mediante proteólisis; posteriormente las células tumorales migran a través de la zona de lisis, efectuando movimientos ameboides mediante la emisión de pseudópodos y para finalizar, las células tumorales ya en el espacio extravascular, iniciaran su proliferación estableciéndose micrometástasis que necesitarán para su crecimiento factores de crecimiento tanto paracrinos como autocrinos y una nueva red vascular que proporcione los nutrientes necesarios para su crecimiento. De lo contrario, la pequeña colonia tumoral será destruida o permanecerá quiescente, en un estado de latencia conocido como “tumor dormido”³⁴.

3.5 CARACTERÍSTICAS DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO

En el presente trabajo se realizaron ensayos con tres líneas celulares de cáncer cervicouterino conocidas como HeLa, InBl y SiHa, seleccionadas por su capacidad de proliferación y de llevar a cabo metástasis. A continuación se describen algunas de las características de estas líneas en la Tabla 4.

Tabla 4. Características de líneas celulares de cáncer cervicouterino, HeLa, InBl y SiHa.

Línea celular.	Características.	
HeLa	Denominadas así por el nombre de la paciente Henrietta Lacks, siendo considerada como una de las primeras líneas celulares establecidas desde 1951. Es una línea celular epitelial derivada de adenocarcinoma de cáncer de cuello uterino, de estadio IV-b. Posee VPH del tipo 18, baja expresión de p53 y niveles normales de pRB y alteraciones en el cromosoma 1, 3, 5 y 6. Con un tiempo de duplicación de 23 h	
SiHa	Línea celular carcinoma de cuello uterino, produce tumores epidermoides poco diferenciados grado III, infectado por VPH tipo 16.	
InBl	Línea celular proveniente de carcinoma epidermoide de células grandes queratinizadas, en estadio IV-a, infectadas por el VPH tipo 18.	

4. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaCu es la segunda causa de muerte en mujeres de edad reproductiva en México, solo superada por el cáncer de mama, según datos de la INEGI (2008); representando un grave problema de salud a nivel mundial, principalmente en países subdesarrollados, siendo considerada la población femenina de origen latinoamericano, con mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad, encabezando la lista de mortalidad en Latinoamérica, México y Chile y las más bajas Argentina, Cuba y Puerto Rico.

Para el desarrollo de esta enfermedad están implicados múltiples factores de riesgo entre los que se encuentra un nivel socioeconómico bajo, inicio de la vida sexual antes de los 16 años de edad, múltiples parejas sexuales, múltiples embarazos, sistema inmune deprimido, uso de anticonceptivos hormonales, etc.; siendo el de mayor importancia, la infección por el VPH de alto riesgo como son los tipos 16 y 18.

La principal causa de muerte en pacientes con cáncer se debe a la capacidad que poseen cierto tipo de células malignas de poder desprenderse del foco neoplásico principal, degradar la matriz extracelular que las rodea y pasar al torrente circulatorio, pudiendo sobrevivir a las condiciones inmunitarias de el huésped y adherirse a las células endoteliales de nuevos vasos sanguíneos lejanos del foco neoplásico principal, logrando penetrar al espacio extravascular, a partir del cual, si existen las condiciones necesarias, volverá a proliferar y formar nuevos focos neoplásicos, conociéndose este proceso como metástasis. Con el fin de evitar este desenlace trágico de los pacientes con cáncer, se han realizado múltiples estudios para detener o inhibir una o varias etapas del proceso de metástasis, utilizando una gran variedad de productos sintéticos y naturales para este fin.

Se ha demostrado que la DHEA posee cierta capacidad antiproliferativa y quimioprotectora en una gran variedad de cánceres, como los de piel, mama, próstata, páncreas, hígado, timo, médula ósea, cuello uterino, etc. Teniéndose como únicas evidencias de su acción antimigratoria algunos estudios realizados sobre líneas celulares de cáncer de mama, células endoteliales y células de músculo vascular de conejo; por lo que en el presente trabajo se realizaron una serie de ensayos para evaluar el efecto antimigratorio de la DHEA en tres diferentes líneas celulares de CaCu de estadios de migración de grado III y IV, teniendo la capacidad de invadir y migrar hacia otros órganos u otros sitios del mismo órgano.

Dada la importancia de los estudios actuales de descubrir compuestos sintéticos o naturales que tengan la capacidad de detener o retrasar las etapas del proceso de metástasis en pacientes con cáncer, con el fin de desarrollar nuevos tratamientos que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes, se plantea la posibilidad que la DHEA pueda inhibir o mitigar la migración celular de tres líneas celulares de cáncer cervicouterino, denominadas invasivas, como un posible compuesto para el tratamiento del cáncer en un futuro.

5. HIPÓTESIS

Debido a que se han observado múltiples beneficios de la DHEA en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades, entre las que se encuentra el cáncer, con efectos antiproliferativos, quimioprotectores y antimigratorios, en estudios *in vivo* e *in vitro* de diferentes tipos de cáncer; suponemos que la DHEA disminuirá el efecto migratorio e invasivo de tres líneas celulares de cáncer cervicouterino infectadas con VPH, mediante la disminución de la expresión de proteínas involucradas en la migración.

6. OBJETIVOS

General:

- Evaluar el efecto anti-proliferativo y anti-migratorio de la DHEA en las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, InBl y SiHa.

Específicos:

- Determinar la concentración de la DHEA que inhiba el 50% la proliferación celular (IC50).
- Comprobar la adhesión celular de las líneas celulares de CaCu.
- Evaluar la capacidad migratoria de las líneas células de CaCu posterior a su tratamiento con DHEA.
- Medir la expresión de las moléculas de adhesión CXCR-4, ICAM-1, Selectina-E y Sindecano-1.

7. METODOLOGÍA

Cultivo celular

Las células HeLa, InBl y SiHa se cultivaron en medio RPMI-1640 (GIBCO, USA), suplementado con 0.4 g de L-glutamina (GIBCO, BRL), antimicótico al 1 %, antibiótico y con 10 % de suero de recién nacido de bovino (NBCS). Se mantuvieron a 37° C con una humedad relativa del 100 %, a 5 % de CO₂ y 95 % de aire.

Proliferación celular

Se sembraron 3,000 células/pozo en placa de 96 pozos, con 100 µL de medio de cultivo y se trataron con diferentes concentraciones de la DHEA (de 10 a 100 µM) por 24 h. Concluido el periodo de cultivo, las células se fijaron por 10 min con glutaraldehído al 1.1 %. Posteriormente, las células se lavaron con agua destilada y se dejaron secar al aire. Enseguida, las células fueron teñidas con cristal violeta al 0.1 % en solución amortiguadora de ácido fórmico a pH 6.0 por 30 min en agitación constante. Después, los pozos se lavaron con agua destilada, hasta ya no se observara desprendimiento de colorante y se dejaron secar al aire. El colorante incorporado a las células fue solubilizado con ácido acético al 10 % y se dejaron en agitación por 5 min. La absorbancia se midió a 595 nm en un lector de placas ELISA Microplate Autoreader EL311 (Bio-Tek instruments).

Adhesión celular (Attachment assay)

Se cultivaron 200,000 células/pozo de una placa de 6 pozos, con 2 mL de medio de cultivo suplementado por 24 h. Se trataron posteriormente con la concentración de la DHEA calculada para la IC50 por 24 h. Posteriormente se desprendieron estas células previamente tratadas con la DHEA, y se cultivaron 50,000 células/pozo en placas de 4 pozos con 500 µL de medio e incubación por 2 h. Terminado este periodo, se eliminó el medio de cultivo y realizaron 2 lavados a los pozos, cuidando de no desprender las células adheridas al fondo de la placa, dejando secar al aire. Se añadió glutaraldehído al 1.1 % para fijar a las células y posteriormente se realizó el procedimiento antes mencionado para la medición de la proliferación celular con cristal violeta. Se midió el colorante incorporado a las células adheridas por medio del lector de placas de ELISA Microplate Autoreader EL311 (Bio-Tek instruments) a 595 nm.

Migración celular

Cámaras de Boyden.

En placas de 24 pozos se colocaron 1 mL de RPMI-1640 sin suero y con antibiótico en cada pozo. Posteriormente se prepararon los pozos para control negativo (medio de cultivo sin suero), control positivo (medio de cultivo con suero de fetal de bovino (SFB)), uno de los pozos con el tratamiento con DHEA (concentración de IC50) y un pozo con el tratamiento con DHEA y SFB. Enseguida se colocó la cámara de Boyden y adicionaron 250,000 células en 250 µL de RPMI-1640

sin SFB, dejándose en incubación por 24 h. Terminado este periodo, se eliminó el medio de cultivo de las cámaras de Boyden y de los pozos, realizando 2 lavados con agua destilada y dejando secar al aire, las células que migraron a la parte inferior de la cámara y al fondo del pozo se evaluaron por medio del colorante cristal violeta.

Ensayo de Heridas

Se colocaron células de las diferentes líneas celulares en pozos de placas de 24 pozos, dejándose en cultivo hasta la formación de una monocapa celular. Sobre la capa confluyente se realizaron 3 heridas con la ayuda de una punta de micropipeta estéril pequeña. Se realizaron lavados con PBS con calcio y magnesio hasta la eliminación de las células suspendidas, enseguida se colocó medio RPMI-1640 sin suero tomando la primera foto como el tiempo 0 h; posteriormente se realizó el tratamiento de los pozos con la concentración de DHEA previamente calculado para su IC50 correspondiente a cada línea, también se trataron pozos con sólo SFB como patrón positivo, y pozos con el tratamiento con DHEA y SFB. Se tomaron fotografías de los cultivos cada 24 h hasta la observación del cierre de heridas.

Ensayo de moléculas de adhesión

Se cultivaron previamente 250,000 células/pozo en placas de 6 pozos con RPMI-1640 suplementado y la DHEA (concentración IC50). Después de 24 y 48 h de cultivo, las células se despegaron con tripsina y se centrifugaron para obtener un botón celular. Estas se resuspendieron en PBS con albúmina al 0.8 % y azida de sodio al 0.02 %, del resuspendido se trasvasaron 20 µL a 4 tubos eppendorf de 250 µL a los cuales se les añadirá 1 µL de anticuerpo contra las moléculas de adhesión ICAM-1, Selectina-E, CXCR-4 y Sindecano-1, este se homogenizó y dejó en reposo por 1 h a temperatura ambiente protegido de la luz. Terminado este periodo, se realizaron dos lavados con 300 µL de Hepes 1X y centrifugo decantando el sobrenadante. El botón celular se resuspendió de nuevo con 300 µL de Hepes 1X y se trasvasó a tubos de ensayo para realizar la medición en el citómetro de flujo FACSCalibur 30318 (Becton Dickinson).

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se realizaron de 3 a 5 experimentos independientes. Algunos resultados se expresaron como valores promedio \pm la desviación estándar de la media. Una prueba de T de Student se usó para determinar la significancia estadística con una $P < 0.01$.

8. RESULTADOS

8.1 Efecto de la DHEA en la proliferación

Se evaluó el efecto de la DHEA a diferentes concentraciones (10 a 100 μM) sobre la proliferación de las líneas celulares de CaCu HeLa, InBl y SiHa. La proliferación se midió mediante el método de tinción con cristal violeta a 24 h posteriores al tratamiento con la hormona. Se observó en el caso de la línea celular HeLa que a concentraciones de 70 a 100 μM de la DHEA, se disminuye la proliferación entre un 40 % a un 60 % comparado con los cultivos control. En el caso de la línea celular InBl, se observó una disminución de la proliferación entre el 40 % a un 60 % a concentraciones de 20 a 100 μM de la DHEA, y por último, los cultivos de SiHa presentaron una disminución de su proliferación entre el 20 a 80 % a concentraciones de la DHEA de 10 y 100 μM (Figura 9).

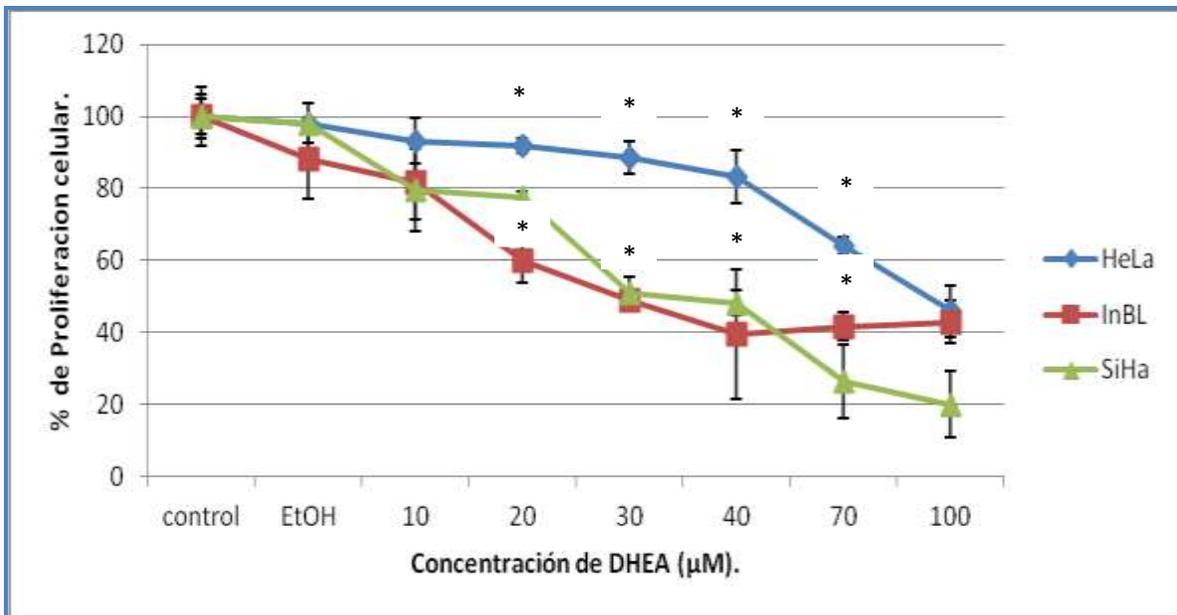
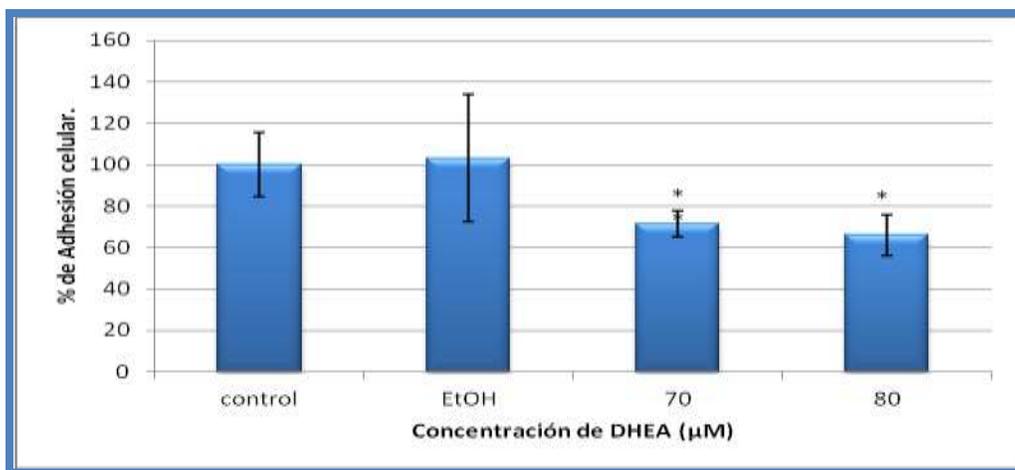


Figura 9. Efecto de la DHEA en la proliferación de las líneas celulares HeLa, InBl y SiHa. Se sembraron 3,000 células en pozos con 100 μL de medio suplementado y diferentes concentraciones de DHEA (10 μM a 100 μM), evaluándose el número de células por pozo mediante la técnica de cristal violeta 24 h posterior. * Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.01$) comparada con el control.

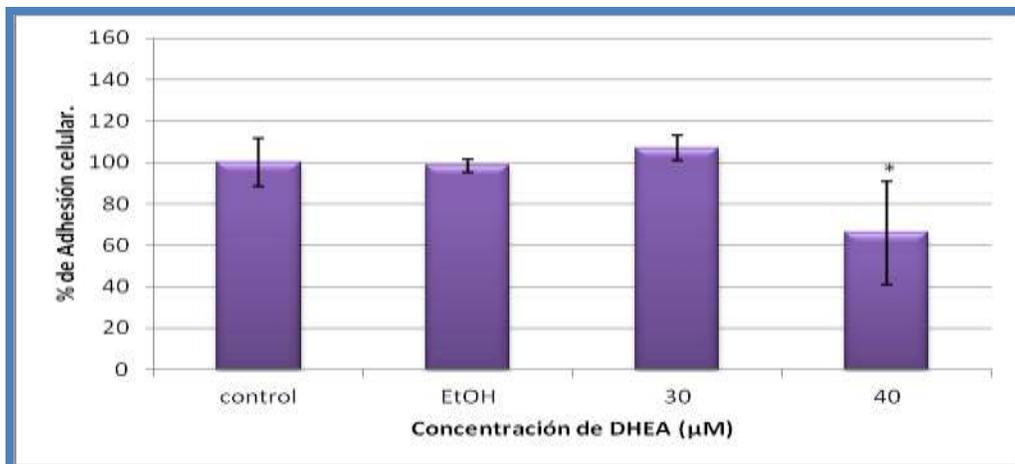
8.2 Efecto de la DHEA en la adhesión celular

En este estudio se evaluó el efecto de la DHEA en la adhesión de las células HeLa, InBl y SiHa mediante el ensayo de Attachment. Se observó una disminución de la adhesión de las células HeLa del 28 al 34 % a concentraciones de 70 y 80 μM de la DHEA respectivamente, en comparación del cultivo control (Figura 10 A); en las células InBl se observó una disminución de la adhesión celular del 34 % a 40 μM de la DHEA (Figura 10 B); por otra parte, en la línea celular SiHa se observó una disminución de la adhesión del 33 % a una concentración de 30 μM de la DHEA, observándose una menor disminución de la adhesión celular a 30 μM de DHEA en el caso de las células InBl y a 40 μM de DHEA en el caso de las células SiHa (Figura 10 C).

A)



B)



c)

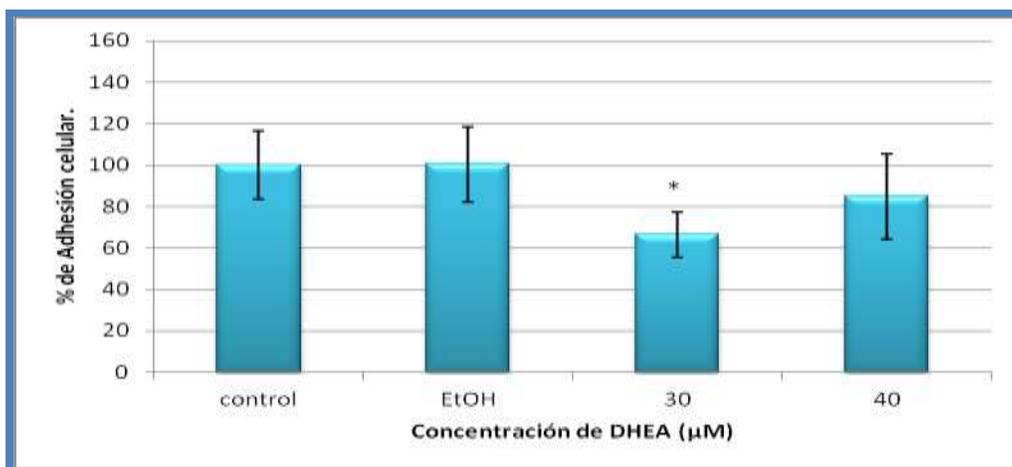


Figura 10. Efecto de la DHEA en la adhesión celular de las líneas celulares HeLa, InBl y SiHa. Se cultivaron 200,000 células en pozos con 2 mL de medio de cultivo suplementado con la concentración de DHEA determinada por el ensayo de proliferación que inhibió la proliferación de las células tumorales en un 50 % (IC50) durante 24 h. Se desprendieron y recultivaron estas células previamente tratadas a una densidad de 50,000 células por pozo durante 2 h, posteriormente se evaluó el número de células adheridas al fondo del pozo mediante la técnica de tinción con cristal violeta. (A) células HeLa, (B) células InBl, y (C) células SiHa. * Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.01$) comparada con el control.

8.3 Efecto de la DHEA en la migración celular

Para evaluar la migración de las líneas celulares de CaCu, se realizó el ensayo de cámaras de Boyden y el ensayo de heridas.

8.3.1 Cámaras de Boyden

Se evaluó la capacidad que poseían las células tumorales de migrar a través de una membrana de 8 μm de diámetro de la cámara de Boyden, al fondo de los pozos de la placa. El SFB utilizado como control positivo, aumentó la migración en un 50 al casi un 300 % en comparación a la migración presentada por las células control. La DHEA no disminuyó la migración de las células HeLa; sin embargo, si disminuyó en un 49 y 26 % la migración de las células InBl y SiHa respectivamente. Las células tratadas con DHEA y el SFB presentaron una migración menor a las células tratadas únicamente con SFB, pero está migración fue mayor a la obtenida por las células tratadas únicamente con DHEA. (Figura 11).

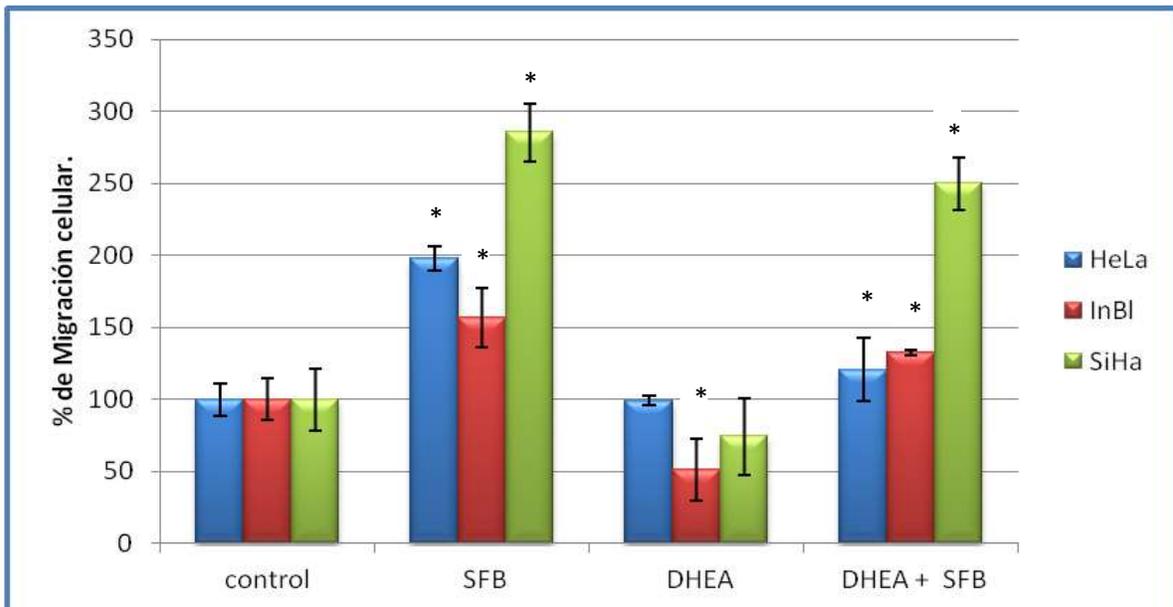


Figura 11. Efecto de la DHEA en la migración de las diferentes líneas celulares de CaCu utilizando cámaras de Boyden. Se cultivaron 250,000 células en la parte superior de las cámaras de Boyden colocadas sobre los pozos tratados con medio RPMI-1640 sin suero (control negativo), medio RPMI-1640 con 10 o 20 % de SFB (control positivo), y con diferentes concentraciones de la DHEA 30, 40 y 70 μM de DHEA y se incubaron por 24 h. La migración celular se evaluó mediante la tinción con cristal violeta. * Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.01$) comparada con el control.

8.3.2 Ensayo de Heridas

En este ensayo se evaluó la capacidad que poseen las células tumorales de CaCu para poder migrar hacia un área libre de células y cerrar la herida sobre la monocapa celular. Los resultados obtenidos demuestran que la DHEA disminuye la migración celular. En el caso de las células HeLa tratadas con 10 y 40 μM de la DHEA en ausencia de SFB, no se observó el cierre de la herida a las 72 h, en comparación con las células tratadas con el SFB solamente, en donde se observó migración celular pero no cierre de la herida; mientras que en los casos en los cuales se utilizó conjuntamente la DHEA con el SFB, se observó que las células migraron cerrando parcialmente la herida (Figura 12 A).

En las células InBl, la DHEA a 30 μM no disminuyó la migración de las células en su totalidad, ya que se logra observar un cierre incompleto de la herida en comparación a las células sólo tratadas con el SFB, mientras que en las células tratadas con 40 μM de la DHEA, se observó una mayor disminución de la migración celular a las 72 h. En las células InBl, el tratamiento con la DHEA y el SFB produjo un cierre total de las heridas (Figura 12 B).

En las células SiHa se observó que a concentraciones de 30 y 40 μM de la DHEA, disminuyó la migración celular al no haber cierre de la herida a las 72 h, en comparación a las células tratadas solo con el SFB. Al igual que las células InBl tratadas con la DHEA y el SFB, las células SiHa también cierran la herida (Figura 12 C).

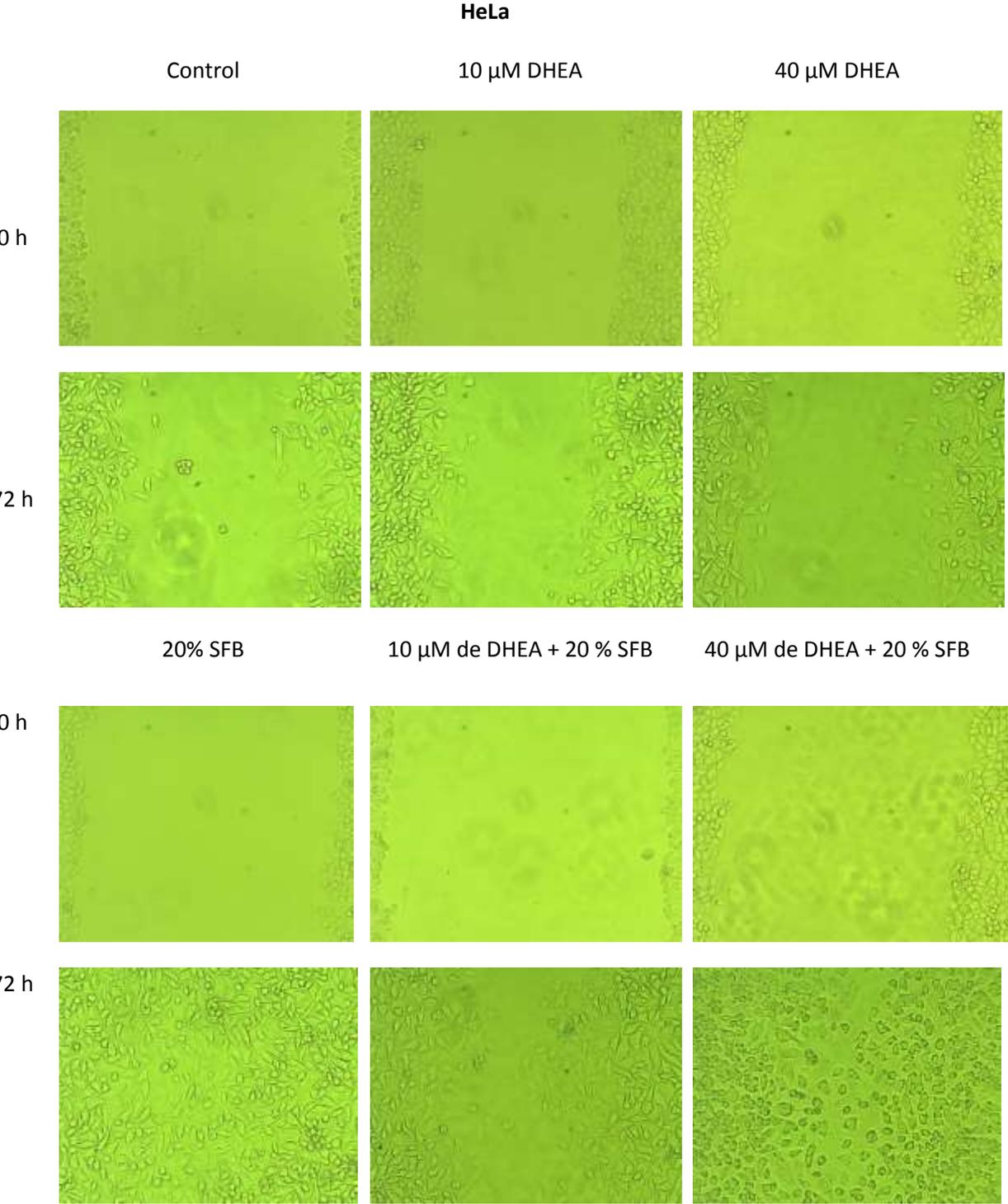
Por otro lado, se calculó el porcentaje de la apertura de las heridas (% de herida abierta) que es el porcentaje de la imagen que no es ocupada por las células, calculado mediante el uso del programa TScratch³⁴. Se observó que el tratamiento con 40 μM de DHEA en el caso de las células HeLa, mantiene casi en un 100 % la herida abierta, impidiendo la migración de las células, mientras que el tratamiento con 10 μM de DHEA permite el cierre de la herida en casi un 26 %; las células tratadas con las dos concentraciones de DHEA y SFB no demostraron diferencias significativas al mantener un porcentaje de la herida abierta similar (Figura 12 A).

En el caso de las células InBl se obtuvo un mayor porcentaje de la herida abierta en las células tratadas con 30 μM de DHEA en comparación con células tratadas con 40 μM de DHEA, observándose un caso similar en las células tratadas con ambas concentraciones de DHEA y SFB; siendo estos resultados opuestos a los observados en las imágenes, posiblemente por qué las células tratadas con 30 μM de DHEA mantienen una distribución más dispersa de el área de la herida en comparación con células tratadas con 40 μM de DHEA, por lo que se observó en la imagen un mayor espacio de la herida ocupada por las células tratadas con 30 μM de DHEA (Figura 12 B).

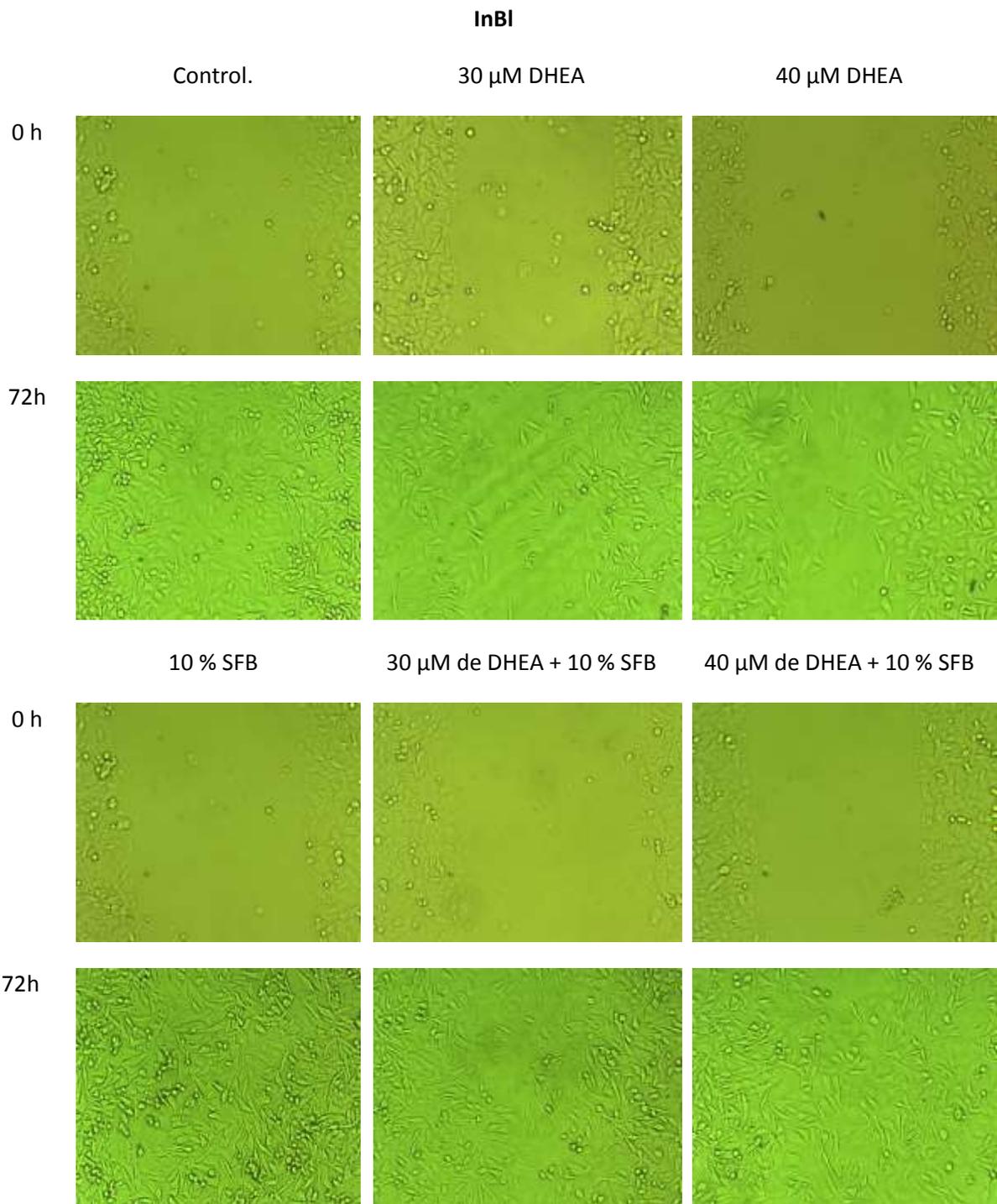
Las células SiHa tratadas con 30 μM de DHEA y 40 μM de DHEA mantienen un porcentaje de herida abierta muy similar, por lo cual ambas concentraciones son adecuadas para disminuir la migración de las células, sin embargo, se mantiene un mayor porcentaje de la herida abierta en las

células tratadas con 30 μM de DHEA y SFB en comparación con las células tratadas con 40 μM de DHEA y SFB, donde se obtuvo un cierre total de la herida (Figura 12 C).

A)



B)



C)

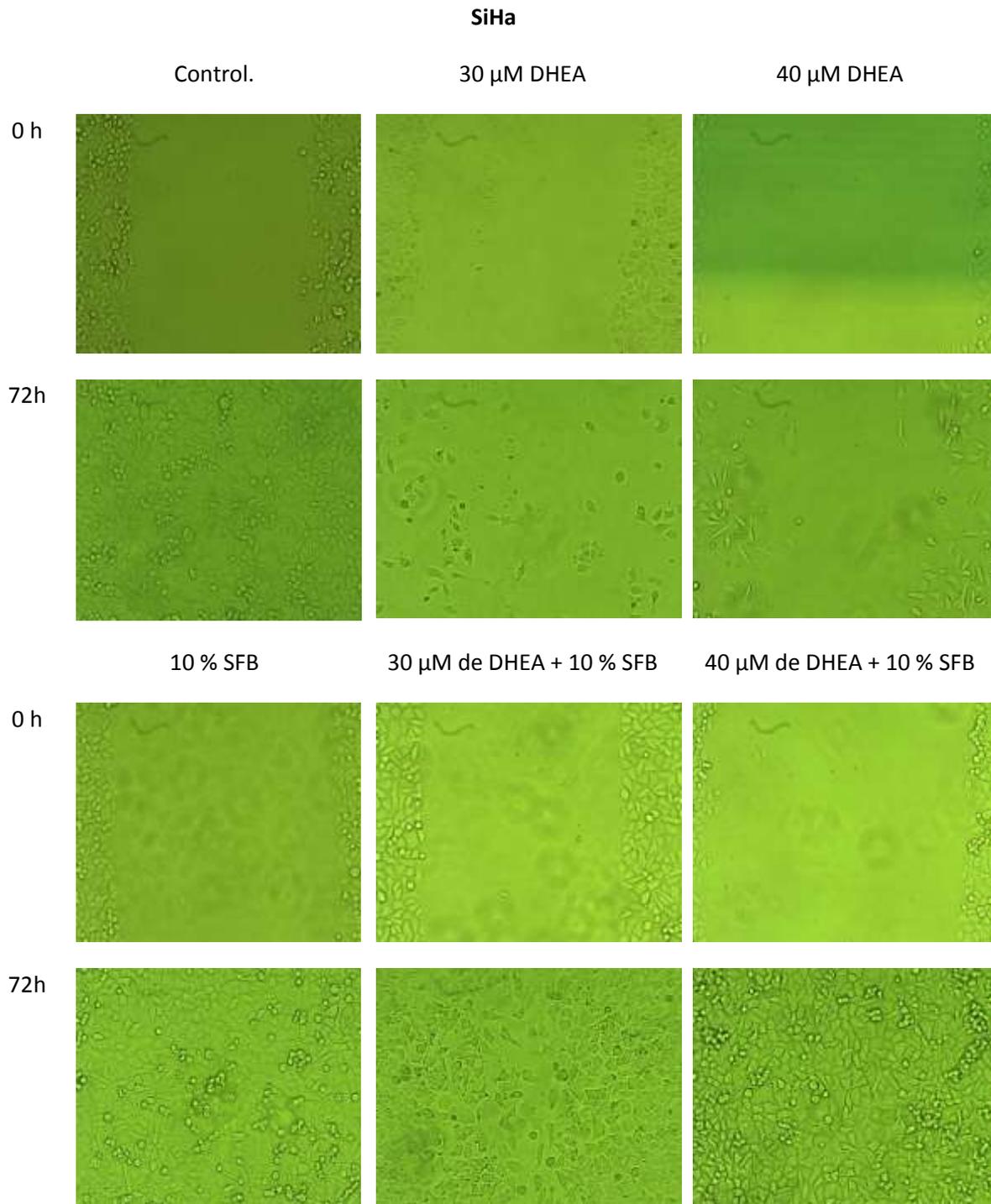
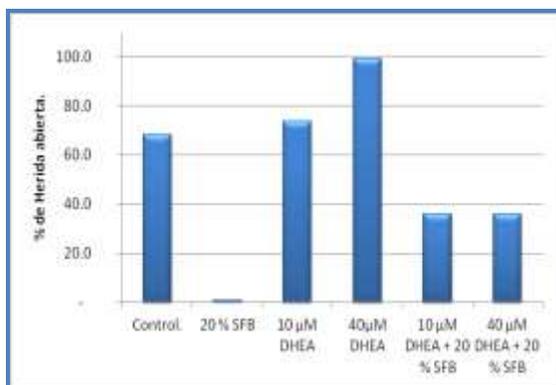


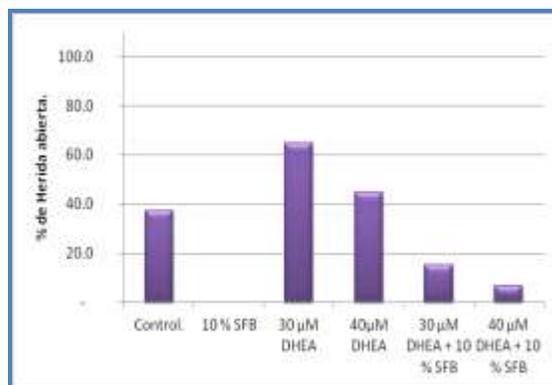
Figura 12. Efecto de la DHEA en la migración celular de las diferentes líneas celulares de CaCu mediante el ensayo de Heridas. Se cultivaron hasta su confluencia las líneas celulares A) HeLa, B) InBl y C) SiHa en pozos de una placa de 24 pozos con medio de cultivo suplementado,

posteriormente el medio se sustituyó por medio de cultivo libre de suero 24 h antes de la realización de las heridas; se realizaron dos heridas a la monocapa celular con ayuda de una punta estéril de micropipeta, haciendo múltiples lavados con PBS para eliminar las células desprendidas, posteriormente fueron tratadas con medio de cultivo sin SFB, medio de cultivo más SFB al 10 ó 20 % (concentraciones determinadas por pruebas previas) y la DHEA a diferentes concentraciones, dejándose en incubación hasta el cierre de las heridas (72 h) tomándose fotografías de las heridas a las 0 y 72 h.

A)



B)



C)

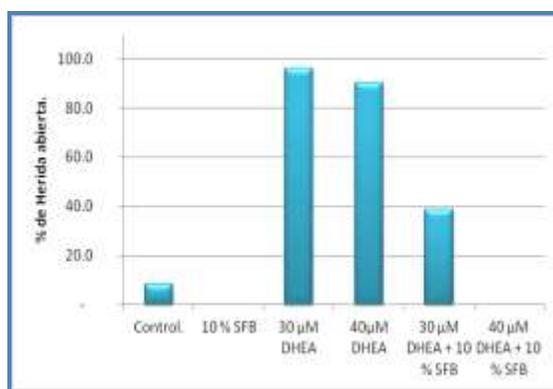


Figura 13. Cálculo del porcentaje de apertura de las heridas mediante el programa TScratch. Las imágenes obtenidas del ensayo de heridas fueron sometidas al cálculo del área libre de células mediante el software TScratch, tomándose como 100 % de la apertura de la herida a las imágenes obtenidas durante el tiempo cero, calculando así el porcentaje del área ocupada por las células posteriores a las 72 h del tratamiento.

8. 4 Efecto de la DHEA en la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1, Selectina-E, Sindecano-1 y el receptor de quimiocinas CXCR-4

Se evaluó la expresión de las moléculas de adhesión mediante la utilización de anticuerpos anti ICAM-1, Selectina-E, Sindecano-1 y CXCR-4, unidos a fluorocromos cuya fluorescencia se midió mediante un citómetro de flujo. Se observó que la DHEA no indujo cambios en la expresión de ICAM-1 y CXCR-4 en las tres líneas celulares a las 48 h posteriores al tratamiento; sin embargo, la DHEA disminuyó la expresión de la Selectina-E entre un 29 a un 64 % y del Sindecano-1 entre un 3 a un 33 % en las células HeLa e InBl. En las células SiHa, la DHEA sólo disminuyó la expresión de la Selectin-E en un 30 % sin afectar a las demás moléculas (Figura 14).

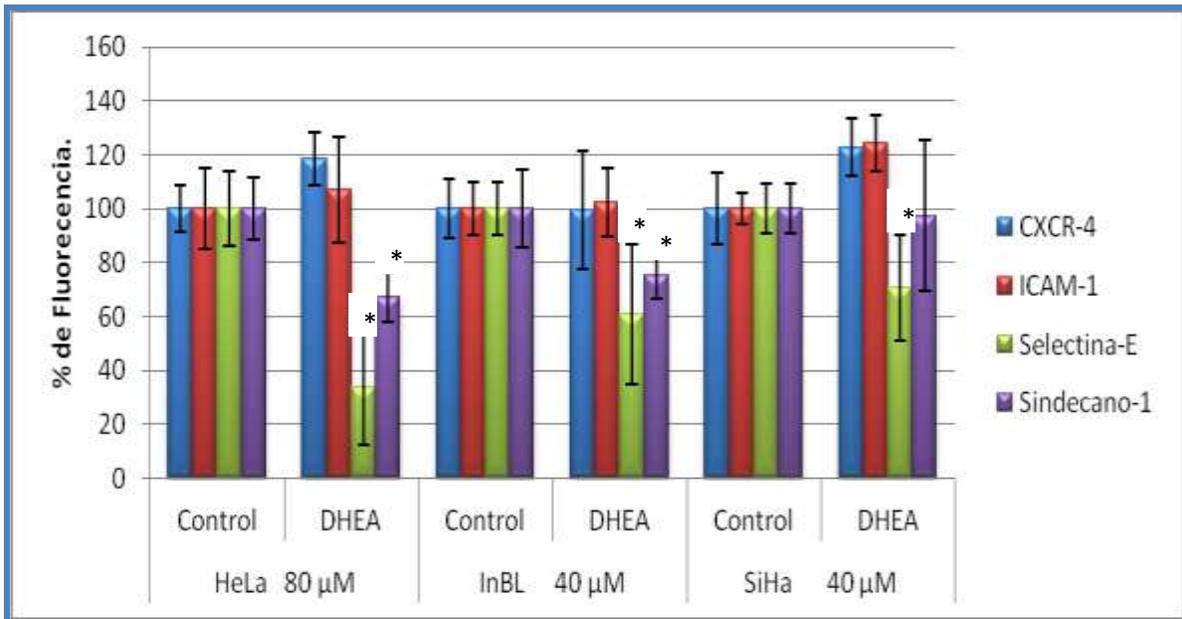


Figura 14. Efecto de la DHEA en la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1, Selectina-E, Sindecano-1 y el receptor de quimiocinas CXCR-4 en las células HeLa, InBl y SiHa. Se sembraron 250,000 células en pozos de una placa de 6 pozos, y se trataron con la DHEA (40 μM para InBl y SiHa, y 80 μM para HeLa) durante 48 h. Posteriormente las células se incubaron con los anticuerpos anti- ICAM-1, anti- CXCR-4, anti- Selectina-E y anti- Sindecano-1 y se evaluaron en el citómetro de flujo.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Durante años, ha sido ampliamente estudiada la acción antiproliferativa que presenta la DHEA en diferentes líneas celulares tanto de cáncer, células endoteliales, en osteoblastos, en células de músculo liso, células de tejido adiposo, linfocitos, etc.⁷; sin embargo, su efecto sobre la proliferación de células de cáncer de cervicouterino no se ha evaluado, por lo que, decidimos estudiar el efecto antiproliferativo de la DHEA, sobre las líneas celulares de CaCu₂, HeLa, InBl y SiHa a diferentes concentraciones que oscilaron de 10 a 100 μ M.

Los resultados mostraron que al igual que en otros tipos de cáncer, la DHEA disminuyó la proliferación en las tres líneas celulares. Estos resultados concuerdan con lo reportado por *Girón et al.* donde evaluaron el efecto de la DHEA en proliferación de tres líneas celulares de CaCu, observando que la DHEA tiene acción antiproliferativa de forma directa al interactuar con un receptor presente en la membrana celular, independientemente de su conversión a estrógenos u otros andrógenos, induciendo la muerte celular sin paro del ciclo celular⁷.

Estudios recientes han demostrado que la DHEA puede interferir en diferentes vías metabólicas de la célula (metabolismo del glutatión, de la lisina, de lípidos y de la *s*-adenosilmetionina (SAM)), provocando la reducción del contenido de ATP y por ello la muerte celular³⁵; o interfiriendo con la expresión de genes mitocondriales, provocando alteraciones morfológicas y funcionales que intervienen en el agotamiento del ATP intracelular³⁶. Aunque se ha observado que la DHEA promueve la muerte celular por medio de la apoptosis, mediante la detección de la vía Akt^{37,38} (Akt es una serina/treonina cinasa, factor antiapoptótico que induce la proliferación, crecimiento y supervivencia celular, así como la formación de tumores) con una posterior activación de la vía GSK-3 β (proteína glucógeno sintasa cinasa inductora de apoptosis), que conduce a una despolarización mitocondrial³⁶; estos son nuevos hallazgos por los cuales se demuestra la función antiproliferativa de la DHEA, sin necesidad de detener el ciclo celular.

En nuestros resultados observamos que la línea celular HeLa fue más resistente a la acción antiproliferativa de la DHEA, mientras que las líneas celulares InBl y SiHa fueron más sensibles. Esta acción de resistencia, puede deberse a que las células HeLa se encuentran en un mayor estado de malignidad (estado IV-b), como lo explica *Girón et al.* quienes atribuyen la resistencia de las células HeLa a que se encuentran en un mayor estado de malignidad, y pudieran poseer una mutación en la proteína p53 o a la presencia de genes que le confieren cierta resistencia a los fármacos⁷.

La migración de las células tumorales está influenciada por varios factores, entre los que se encuentra la interacción de las células con fenotipo maligno con su entorno, ya sea su interacción extracelular de célula-célula mediante la intervención de las moléculas de adhesión; mediante su interacción célula-matriz extracelular donde son de vital importancia las proteasas de matriz extracelular que llevarán a cabo su degradación de la matriz que rodea a la célula tumoral dándole paso hacia la circulación ya sea linfática o venosa; también mediante a factores de crecimiento o

quimiotácticos producidos por las células tumorales o células vecinas al tumor, o atrapados en la matriz extracelular. Es por ello por lo que se evaluó el efecto de la DHEA sobre la migración de las células tumorales de CaCu mediante cámaras de Boyden y el ensayo de heridas.

Los resultados mostraron que en las células HeLa a 70 μ M de DHEA no se observó disminución de la migración celular perceptible en los ensayos de las cámaras de Boyden; mientras en los ensayos de heridas, se observó que a esta dosis de DHEA las células tumorales se desprendieron en los extremos de las heridas, provocando también cambios en la morfología celular normal de las células (imágenes no mostradas) indicando toxicidad por lo que decidimos realizar pruebas con dosis menores de la DHEA, obteniéndose que la DHEA a partir de 10 a 40 μ M disminuye la migración en el ensayo de heridas sin provocar cambios en su morfología y desprendimiento de las células en la monocapa celular de los extremos de la herida. En las células InBl si se logró observar una disminución de la migración a través de la membrana semipermeable de la cámaras de Boyden a 40 μ M de la DHEA, lo cual coincidió con lo observado en el ensayo de heridas. Por su parte, las células SiHa también muestran disminución de la migración con 30 μ M de la DHEA evaluada mediante las cámaras de Boyden y por el ensayo de heridas. Por lo que podemos concluir que la DHEA si provoca la disminución de la capacidad migratoria de las células tumorales de CaCu de las líneas InBL y SiHa, pero no de las línea HeLa, posiblemente por su mayor capacidad invasiva que presenta, pudiendo poseer genes que le confieran resistencia a la acción de la DHEA⁷.

La disminución de la migración de las células tumorales InBl y SiHa se puede explicar debido a que durante la migración celular, varios factores autocrinos que intervienen en este proceso promoviendo la motilidad celular, como el factor autocrino de motilidad o factor “scatter”, el factor de necrosis tumoral (TNF), y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)³⁹; se ha observado que en otros estudios, tratamientos con 100 μ M de la DHEA, ha logrado inhibir la expresión del TNF- α en células HUVEC⁴⁰ por lo cual, se puede explicar la acción de disminución de la migración de las células tumorales, al inhibir la expresión de uno de sus factores co-estimulantes de la motilidad celular, es probable que la DHEA pueda estar alterando la expresión del TNF- α en nuestras células tumorales.

Se ha observado que la DHEA también inhibe la migración de una gran variedad de células entre las que se destacan células de cáncer de mama; otros informes han demostrado que la DHEA-S, inhibe la migración de una línea celular muscular vascular de conejo (SME-3) y de células musculares de carótida de conejo, la inhibición de la migración del músculo vascular inducida por la DHEA, se asoció con una detención en la fase G1 del ciclo celular y la apoptosis⁴¹. Caso similar se observó en las células endoteliales, donde se observó que a concentraciones de 10 a 100 μ M, la DHEA inhibió la migración de las células endoteliales en la formación de túbulos capilares en el proceso de angiogénesis, lo que fue atribuido a la disminución de la G6PD y a la modificación de la red de tubulina⁴².

Las células en el ensayo de cámaras de Boyden tratadas con las diferentes concentraciones de DHEA y SFB mostraron una migración menor a la obtenida por las células tratadas con SBF únicamente, pero mayor a la presente por las células tratadas con DHEA, esto posiblemente debido a que dicho suplemento posee diferentes factores de crecimiento, hormonas, enzimas minerales, metabolitos, inactivadores tóxicos, etc. que pudieran promover el aumento de la migración de las células tumorales, sin embargo, la DHEA promueve la disminución de esta migración debido quizá a la inactivación de algunos de estos componentes.

Durante la migración celular las células necesitan disminuir la expresión de las moléculas de adhesión homotípicas para facilitar el rompimiento de la unión célula-célula que existe entre las células tumorales y así poder migrar hacia la matriz extracelular e iniciar el proceso de invasión; de igual forma, ya en el torrente sanguíneo o linfático, las células tumorales deben de expresar moléculas de adhesión que le permitan adherirse al endotelio celular de otras zonas del cuerpo, facilitando su extravasación y así iniciar la invasión hacia otros órganos y formar nuevos focos metastásicos. En este estudio realizamos la evaluación de los efectos de la DHEA sobre la adhesión de las células de CaCu; para ello realizamos los ensayos de Attachment sobre las tres líneas celulares a diferentes concentraciones de la DHEA y se evaluó la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1, Selectina-E y sindecano-1, así como la expresión del receptor de quimiocinas CXCR-4 después de 48 h del tratamiento con DHEA.

En el ensayo de Attachment se evaluó la capacidad de las células tumorales de adherirse al fondo de los pozos de la placa, después de haberlas tratado previamente a diferentes dosis de DHEA. Se observó una disminución en la adhesión de las células de HeLa, InBL y SiHa, observándose un efecto dependiente de la concentración en el caso de las células HeLa. Este fenómeno, puede ser posiblemente explicado por la disminución en la expresión de las integrinas, ya que son estas moléculas las que llevan a cabo la primera interacción de las células tumorales libres con la matriz extracelular, funcionando como receptores de la laminina, colágeno tipo I, fibronectina, vitronectina y trombospondina, en las cuales se ha identificado a la secuencia peptídica de Arg-Gly-Asp (RGD) como uno de los sitios de unión a las integrinas; debilitando posiblemente su adhesión al fondo de los pozos de la placa⁴³. Se ha demostrado que las células neoplásicas producen menos integrinas que las células normales, lo que facilitaría la motilidad de las células tumorales dentro de los vasos sanguíneos; mientras otros estudios establecen que las células neoplásicas producen nuevas integrinas, dependiendo del microambiente invadido que le ayudarían en la motilidad y facilitarían la interacción de las células tumorales con la matriz extracelular^{44,45}. Un efecto similar se ha observado en los monocitos, donde la DHEA ha inhibido la capacidad de adhesión de los monocitos al endotelio cardiovascular, de esta forma, previniendo la formación de placas de aterosclerosis, a través de sus metabolitos de estradiol (E₂) y dihidrotestosterona (DHT)³⁷.

La sobre-expresión de algunas moléculas como la ICAM-1 y el receptor de quimiocinas CXCR4 se ha relacionado con un mal pronóstico en la progresión del cáncer. El aumento de su expresión en diferentes tipos de cáncer se asocia con el desarrollo de la invasión tumoral y la metástasis^{46,47}, ya que estas moléculas desempeñan un papel muy importante como medio de anclaje a las células endoteliales de los vasos sanguíneos de otros órganos promoviendo la formación de nuevos focos metastásicos⁴⁶, la evasión de la respuesta inmune⁴³ y estimulando el desprendimiento de las células tumorales del tumor primario iniciando la migración celular¹⁹. Nuestros resultados mostraron que la DHEA no afectó la expresión de ICAM-1 y CXCR4.

La DHEA disminuyó la expresión de la selectina-E en las 3 líneas celulares estudiadas. La selectina-E es una glucoproteína de membrana del tipo de lectina que permite mediar la interacción heterotípica entre células sanguíneas y células endoteliales en los procesos inflamatorios^{24,27}; el aumento de los niveles séricos de la selectina-E se asocia con estados avanzados de cáncer de mama y la presencia de células tumorales circulantes⁴⁸; el aumento sérico en la concentración de la selectina-E es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama y de pulmón de células pequeñas^{24,27}. Nuestros resultados concuerdan con estudios anteriores donde se observó que la DHEA induce una disminución de la selectina-E y otras moléculas de adhesión sobre las células endoteliales evaluadas a diferentes tiempos^{49,50}; relacionando esta acción con una posible influencia de la DHEA sobre las diferentes vías de señalización como la de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/ AKT, p38, GSK-3 β , etc., inhibiendo estas cinasas a través de la desfosforilación⁴⁹.

Otra de las moléculas de adhesión evaluadas fue la de Sindecano-1, perteneciente a la familia de los proteoglicanos (PGs) que actúa como un co-factor entre la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular, mediante la interacción de su ectodominio de HS con los factores de crecimiento, citocinas y las proteínas de la matriz extracelular²⁷. Nuestros resultados mostraron que la DHEA disminuyó la expresión del sindecano-1 en las células HeLa e InBl, pero no afectó la expresión en las células SiHa. Se ha observado en líneas celulares de cáncer de mama que la sobre expresión del Sindecano-1 restablece su morfología celular, mientras que la disminución de la expresión de está, tiende a cambiar la morfología de las células a un estado de motilidad. En carcinomas hepatocelulares con alto grado metastásico existe una alta disminución de la expresión del sindecano-1, al igual que en carcinoma colorrectal donde se relaciona con metástasis a nódulos linfáticos y aumenta su expresión en el estroma local. En cáncer endometrial se ha reportado un sobre-expresión del sindecano-1 que se correlaciona con carcinogénesis, grado tumoral y viabilidad de las células malignas en el endometrio²⁶. La disminución de la expresión del sindecano-1 inducida por la DHEA, podría indicar una disminución en su carácter carcinogénico y de viabilidad, ya que se presenta una disminución de la interacción de las células carcinogénicas con los factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular. Basándose en estos hallazgos obtenidos, podemos concluir que la DHEA si lleva a cabo una acción sobre la adhesión de las células tumorales de CaCu al disminuir la expresión de Selectina-E, y disminuir la motilidad de las células cancerígenas al disminuir la expresión de Sindecano-1.

10. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se concluye que:

1. La DHEA ejerce un efecto antiproliferativo sobre las líneas celulares de cáncer cervicouterino entre las dosis de 30 y 80 μM .
2. La DHEA disminuye la adhesión y la migración celular.
1. La DHEA afecta a las moléculas que intervienen en el proceso de adhesión y migración celular al disminuir la expresión de algunas de ellas.

Por lo que la DHEA sí interviene en la disminución de varias etapas en el proceso de la metástasis, pudiendo ser una alternativa terapéutica para la disminución de la mortalidad de los pacientes con cáncer. Sin embargo, es necesario aun estudiar mejor los procesos por los cuales lleva a cabo estas acciones antes de ser utilizada en el tratamiento contra el cáncer.

11. REFERENCIAS

1. Stevens N. La DHEA: ¿Fuente de la eterna juventud?. Barcelona: SIRIO; 1997.
2. Clares NB, Ruiz MA, Gallardo LV. Hormonas antienvjecimiento: Melatonina y Dehidroepiandrosterona. *Piel*. 2008; 23(10):582-5.
3. Labrie F. DHEA and cancer risk or prevention?. In: Ross WR, editors. *DHEA in Human Health and Aging*. New York: CRC Press. Taylor & Francis Group; 2012. p. 153-171.
4. Nahleh Z, Tajeja N. DHEA, androgen receptors, and their potential role in breast cancer. In: Ross WR, editors. *DHEA in Human Health and Aging*. New York: CRC Press. Taylor & Francis Group; 2012. p. 253-261.
5. Terrés S, Arturo M. Estado actual de la terapia de reemplazo hormonal con dehidroepiandrosterona (TRH-DHEA). *Rev Mex Patol Clin*. 2005; vol. 52, núm. 4, p. 210-221.
6. López-Marure R. Dehydroepiandrosterone: Its effects on cell proliferation and cancer. In: Ross WR, editors. *DHEA in Human Health and Aging*. New York: CRC Press. Taylor & Francis Group; 2012. p. 69-85.
7. Girón RA, Montañó LF, Escobar ML. *et al.* Dehydroepiandrosterone inhibits the proliferation and induces the death of HPV-positive and HPV-negative cervical cancer cells through an androgen-and estrogen-receptor independent mechanism. *FEBS J*. 2009; 276:5598-609.
8. López-Marure R, Huesca-Gómez C, Ibarra-Sánchez M. J. *et al.* Dehydroepiandrosterone delays LDL oxidation in vitro and attenuates several oxLDL-induced inflammatory responses in endothelial cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2007; 6:174-82.
9. De La Cruz K. Efecto de la dehidroepiandrosterona (DHEA) en la expresión del ARNm que codifica para las proteínas que regulan el ciclo celular: p53 y p21, en células endoteliales de cordones umbilicales humanos [Tesis de licenciatura]. Distrito Federal: Universidad Autónoma Metropolitana (UAM); 1998.
10. Zapata E. Dehidroepiandrosterona inhibe la proliferación de las células endoteliales de vena umbilical mediante la mejora de la expresión de p53 y p21, la restricción de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma, y es receptores de andrógenos y de estrógeno-independiente [Tesis de maestría]. Distrito Federal: Universidad Autónoma Metropolitana (UAM); 2004.
11. Furutama D, Fukui R, Amakawa M, Ohsawa N. Inhibition of migration and proliferation of vascular smooth muscle cells by dehydroepiandrosterone sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* 1988; 1406. 107-114.
12. Stevenson S, Sharpe DT, Thornton M.J. Effects of oestrogen agonists on human dermal fibroblasts in an in vitro woundinf assay. *Exp. Dermatol*. 2009; 18, p. 988-990.
13. Contran SR, Kumar V, Collins T. Robbins. *Patología estructural y funcional*. 6ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2000.

14. Alfonso P, Lazcano E, Hernández M. Cáncer Cervicouterino: Diagnóstico, prevención y control. 2ª ed. Distrito Federal: Médica Panamericana; 2005.
15. León CG, Bosques D, de Jesús O. Infección por el virus del papiloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del cáncer de cuello uterino. Rev Cubana Obstet Ginecol. 2005; vol.31, n.1. ISSN 0138-600X.
16. Garay B. Efecto del sistema de factores de crecimiento similar a la insulina en la expresión en las proteínas de membrana en células de cáncer uterino [Tesis doctoral]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2010.
17. Tirado-Gómez LL, Mohar-Betancourt A, López-Cervantes M, García-Carrancá A, Franco-Marina F, Borges G. Factores de riesgo de cáncer cérvicouterino invasor en mujeres mexicanas. Salud Publica Mex. 2005; 47: 342-350.
18. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, *et al*. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999; 189(1):12-9.
19. Rodríguez-Fragoso L, Jurado-León FR, Reyes-Esparza JA. La proteólisis en la invasión y la metástasis de la célula tumoral. Rev. Inst. Nal. Cancerología. Ene-Feb 2000; vol. 46, núm. 1, p. 33-46.
20. Gonzales SF, Guinovart JJ. Patología Molecular. México: Masson; 2003. p. 127-149.
21. Cadiñanos J, Freiji JMP, López-Otin C. Proliferación celular y cáncer. Monografías de la Real Academia Española [Revista en línea] 2000 [accesado 31 May 12] vol. VIII. Disponible en: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/422>
22. Alberts B, Johnson AE, Lewis J. Molecular Biology of the Cell. 4ª ed. New York: Garland Publishing Group; 2002.
23. Macias AC. Moléculas de adhesión: Importancia en la respuesta inmune e inflamatoria. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2006; 22(2).
24. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Inmunología. 5ª ed. México: McGraw-Hill; 2006. p. 357-9.
25. Roa EI, Villaseca HM, Araya O JC, Roa SJ, Aretxabala UX, Miranda UM. Moléculas de adhesión celular y cáncer. Rev. Chilena de Cirugía. Octubre 2001; Vol 53 No.5, p. 504-10.
26. Muñoz R VD. Evaluación de ectodominios de E-cadherina, Sindecano-1, Sindecano-2 y su implicación en el cáncer de próstata [tesis magisterial].Santiago: Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéutica; 2010.
27. Salmivirta M, M Jalkanen. Sindecano familia de proteoglicanos de la superficie celular: los receptores extracelulares desarrollo regulado de moléculas efectoras. Experientia. Sep 1995; 51 (9-10):863-72.
28. Rodríguez B, VM, Quintana QJ, Melguizo G, LM. Las metaloproteasas de matriz y sus funciones en diferentes tipos de cáncer. Biocáncer. 2006; 6.
29. Suárez C, Gil-Carcebo LM, Marco J, Medina JE, Ortega P, Trinidad J. Tratado de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. 2ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2007. p. 287- 295.

30. Esmerado AC. Estudio de la expresión inmunohistoquímica de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 en el melanoma maligno de úvea y su asociación con otros factores clínico-patológicos conocidos [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona [en línea]; 2006 [accesado 14 Ene 12]. Disponible en: <http://tesisenred.net/bitstream/handle/10803/4305/cea1de1.pdf?sequence=1>
31. Monteagudo C, Pellin-Carcelen A, Martín JM, Ramos D. Papel de las quimiocinas en el papel la progresión del melanoma. *Actas Dermosifiliogr*. 2011. Doi: 10.1016/j.ad. 03.004.
32. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS., McCauley LK. Use of the stromal cell derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate Cancer Metastasis to bone 1. *Cancer Research*. 15 de Mar 2002; 62, 1832.
33. Róman CC, Armijo MM. El proceso metastásico III. Extravasión y proliferación en el órgano diana. *Actas Dermosifiliogr [Revista en línea]*; 1999 [accesado 28 may 12] 90: 343-357. Disponible en: <http://www.elsevier.es/sites/default/files/elsevier/pdf/103/103v90n7a13003512pdf001.pdf>
34. Gebäck T, Peter SMM, Koumoutsakos P, Detmar M. *TScratch: a novel and simple software toll for automated analysis of monolayer wound healing assays*. *BioTechniques*. April 2009; 46: 265-274.
35. Honma N, Saji S, Hirose M, Horiguchi S, Kuroi K, Hayashi S, Utsumi T, et al. Sex steroid hormones in pairs of tumor and serum from breast cancer patients and pathobiological role of androstene-3 β , 17 β -diol. *Cancer Sci*. Oct 2011; 102(10):1848-54.
36. Ho HY, Cheng ML, Chiu HY, Weng SF, Chiu DT. Dehydroepiandrosterone induces growth arrest of hepatoma cells via alteration of mitochondrial gene expression and function.. *Int J Oncol*. Nov 2008; 33 (5):969-77.
37. Bonnet S, Paulin R, Sutendra G, Dromparis P, Roy M, Watson KO, et al. Dehydroepiandrosterone reverses systemic vascular remodeling through the inhibition of the Akt/GSK3- β /NFAT axis. *Circulation*. 29 Sep 2009; 120(13):1231-40.
38. Jiang YF, Zhao PW, Tan Y, Liu LH, Li MH, Matsuzaki Y, et al. Molecular mechanisms of DHEA and DHEAs on apoptosis and cell cycle arrest via Akt pathway in hepatoma cell lines. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. Jun 2007; 15 (6):441-4.
39. Arvelo F, Poupon MF. Aspectos moleculares y celulares de la metástasis cancerosa. *Acta Científica Venezolana*, 2001, 52: 304–312.
40. Gutiérrez G, Mendoza C, Zapata E, Montiel A, Montaña LF, et al. *Dehydroepiandrosterone inhibits the TNF-alpha-induced inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells*. *Atherosclerosis*. Enero 2007; 190: 90-99.
41. López-Marure R, Gómez CP, Dillon JS. Effects dehydroepiandrosterone on proliferation, migration, and death of breast cancer cells. *Eur.J. Pharmacol*. (2011), doi:10.1016/j.ejphar.2011.03.040.
42. Varet J, Vincent L, Akwa Y, Mirshahi P, Lahary A, Legrand E, et al. *Dose-dependent effect of dehydroepiandrosterone, but not of its sulphate ester, on angiogenesis*. *Eur J Pharmacol*. 11 Oct 2011; +502(1-2):21-30.

43. Velasco-Velásquez MA, Molina-Guarneros JA, Barrera OD, Jiménez OA, Mendoza-Patiño N, Mandoki JJ. Anomalías en el sistema adhesivo de neoplasias pulmonares. Rev del Inst Nal de Cancerología. Jul–Sep 2000; Vol. 46, Núm 3, p. 189-195.
44. Bordón RE, Fontes NF, Sáez-Bravo ML, Pinar SB, Rey A, Apolinario R, *et al.* Estudios predictivos y moleculares de invasión y metástasis. Biocáncer. Revista electrónica de formación en oncología. 2007: 1-9.
45. Zentella DA, Frías S, Galicia VG, Ruis MEJ, Córdova AE, Ventura GJL, *et al.* Cáncer de glándula mamaria y metástasis: un creciente problema de salud pública en México. Mensaje Bioquímico, vol. XXXI (2007): 172-195.
46. Hayes HS, Seigel MG. Immunoreactivity of ICAM-1 in Human Tumors, Metastases and Normal Tissues. Int J Clin Exp Pathol. Jun 2009; 2(6): 553–560.
47. Dymicka-Piekarska V, Kemon H. Does colorectal cancer clinical advancement affect adhesion molecules (sP- selectin, sE- selectin and ICAM-1) concentration?. Volumen 124, Número 1 , mayo de 2009, páginas 80-83.
48. Natri CO, Martins WP, Reis FJC, Ferriani RA. Câncer de mama e disfunção endotelial. Rev. Assoc. Med. Bras. [online]. 2008, vol.54, n.5, pp. 467-470.
49. Barkhausen T, Westphal BM, Pütz C, Krettek C, van Griensven M. Dehydroepiandrosterone administration modulates endothelial and neutrophil adhesion molecule expression in vitro. Crit Care. Jul 2006; 10(4):109.
50. Wang L, Hao Q, Wang YD, Wang WJ, Li DJ. Protective effects of dehydroepiandrosterone on atherosclerosis in ovariectomized rabbits via alleviating inflammatory injury in endothelial cells. Atherosclerosis. Jan 2011; 214(1):47-57.