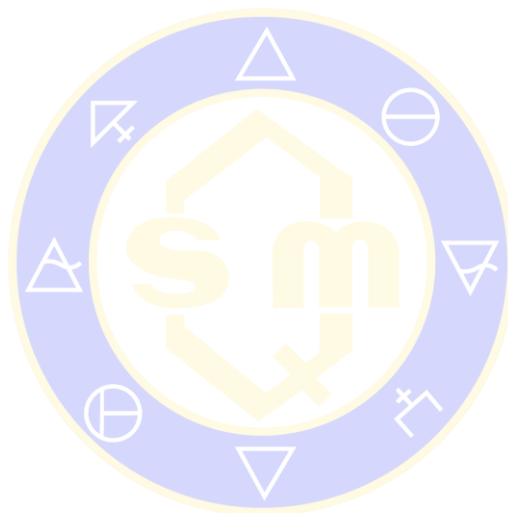


CONTENIDO

Estimulación de la sintasa de óxido nítrico inducible y NADPH oxidasa en línea celular monocítica de humano	92
Efecto del ejercicio sobre la expresión de Glut2 y Glut5 en tejido adiposo y hepático en un modelo murino de obesidad.....	95
El Acetónido de Triamcinolona y Dehidroepiandrosterona combinadas potencian la citotoxicidad en fibroblastos 3T3-L1 y fibroblastos normales.....	100



SOCIEDAD QUÍMICA
DE MÉXICO, A.C.
“La química nos une”

Estimulación de la sintasa de óxido nítrico inducible y NADPH oxidasa en línea celular monocítica de humano

Karla Aidee Aguayo Cerón, Gisela Gutiérrez Iglesias, Claudia Camelia Calzada Mendoza. cccaldadam@yahoo.com.mx

1. Escuela Superior de Medicina- Instituto Politécnico Nacional, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación.

Resumen

Los macrófagos como producto de su metabolismo producen especies reactivas de oxígeno y nitrógeno para eliminar microorganismos opsonizados por anticuerpos o por la fracción C3b. En este contexto, el NO actúa como una molécula efectora citotóxica del sistema inmune (Mosser, et al, 2008), y juega un papel importante en la inflamación crónica y autoinmunidad (Villa, et al, 2015). En cultivo celular de macrófagos humanos, se evaluó el efecto de dos estímulos: PMA y LPS en combinación con IFN- γ , sobre la actividad de iNOS, mediante la cuantificación de nitritos empleando la reacción de Griess. El estímulo de PMA, LPS e IFN γ administrados al mismo tiempo promueve mayor actividad de la iNOS.

Introducción

Los macrófagos son células elementales de la respuesta inmune innata que cumplen diferentes funciones como: erradicar restos de microorganismos, sustancias de desecho de los tejidos a través de la fagocitosis, liberar citocinas que favorecen la respuesta inflamatoria para neutralizar al agente patógeno, reparar el daño en los tejidos, y participar en la homeostasis. Para realizar estas actividades, los macrófagos adoptan diferentes fenotipos funcionales dependiendo de la estimulación del microambiente (Toniolo, et al, 2014). El fenotipo M1 es activado por vía clásica, por residuos de microorganismos en respuesta al IFN- γ en combinación con el factor de necrosis tumoral TNF- α (Koh & DiPietro, 2011), provocando efectos de tipo microbicidas, tumoricidas, y actúan como células proinflamatorias (Mosser & Edwards, 2008) liberando citocinas como: IL-6, TNF- α , IL-12, IL-16 e IL-8, lo que favorece la actividad de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) (Sierra-Filardi, 2010; Kawakami, et al, 2016). El otro fenotipo, el M2, se activa por una vía alterna con IL-4 y/o IL-3 y promueve el proceso antiinflamatorio (Villa, 2015; Toniolo, 2014). Estos macrófagos muestran mayor capacidad de endocitosis y fagocitosis, para lo cual activan el complejo enzimático NADPH oxidasa que genera especies reactivas de oxígeno (ROS), las encargadas de eliminar a los microorganismos fagocitados (Arango Rincón, et al, 2010; Vélez, et al, 2016).

Exposición

Los macrófagos se activan a través de diferentes vías dependiendo del estímulo que reciban microambiente en el que se encuentren, lo que les confiere la habilidad de adoptar diversos fenotipos. Esta característica se debe tener en cuenta cuando se quiere caracterizar una respuesta en este tipo de células en modelos *in vitro*. Por lo que se han desarrollado protocolos utilizando diferentes estímulos como el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) y vitamina D3 (VD3), lipopolisacárido (LPS) e IFN γ ; con el objetivo de favorecer un fenotipo específico y evaluar sus características morfológicas y funcionales. Sin establecer cuál es la mejor opción para inducir cada uno de los fenotipos.

Material y métodos

Para evaluar la actividad enzimática de macrófagos, se utilizó la línea celular THP-1 monocítica. Primero se cultivó en medio DMEM F/12 suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB), en atmósfera de humedad, 5% CO₂ a 37°C en placa de 48 pozos a una densidad de 10x10⁴ células/pozo y se diferenciaron con PMA (60ng/ml). Posteriormente, se agregó PMA (100ng/ml), LPS (1 μ g/ml) e IFN γ (20ng/ml), y los tres estímulos juntos. En todos los grupos (n=6) las células se incubaron durante 24h con los estímulos. Transcurrido el paso anterior se recolectó el medio y se adicionaron 100 μ l del reactivo de Griess y se cuantificó a 520 nm; a las células adheridas en la placa, se agregaron 200 μ l de NBT (1 mg/ml de PBS) y se incubó en oscuridad a 37°C durante 2 h. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS y se observaron por microscopía óptica para identificar cristales de formazán dentro de la célula, producto de la actividad enzimática NADPH oxidasa del macrófago. Posteriormente se eliminó el medio y se agregaron 100 μ l de DMSO y 70 μ l de KOH para medir la absorbancia a $\lambda=620$ nm.

Resultados

Cuantificación de Nitritos por la reacción de Griess

El óxido nítrico se forma a partir de L-arginina, reacción que es catalizada por iNOS. La cuantificación indirecta de óxido nítrico se realizó mediante la reacción de Griess y se elaboró una curva estándar de nitrito. Para calcular las concentraciones de NO₂ de los cultivos celulares, se extrajeron 100 µl del sobrenadante de los cultivos y se colocó en una placa de 96 pozos y se obtuvieron las absorbancias, con base en la metodología antes descrita. Se aplicó una regresión lineal a los resultados y se calculó la concentración. Se observó que la mayor actividad celular se obtiene al aplicar los estímulos: PMA, LPS e IFN γ en conjunto, aumentando las concentraciones de NO₂ como consecuencia de la activación de iNOS (Figura 1A). Sin encontrar diferencia estadísticamente significativa entre los grupos administrados con los estímulos de forma individual.

Evaluación de la actividad NADPH oxidasa con ensayo de NBT

El efecto sobre la actividad de NADPH oxidasa fue evaluada a través del ensayo con NBT, en macrófagos incubados durante 24h con: PMA, LPS e IFN γ respectivamente, y en combinación. La evaluación se realizó con las absorbancias del medio resultado de la disolución de los cristales de formazán que se formaron durante la reducción del NBT. Se encontró que hubo mayor actividad enzimática en las células que fueron incubadas con los tres estímulos, con respecto a los grupos tratados con los estímulos de forma individual. Mientras que el grupo que fue estimulado con PMA mostró mayor actividad que el grupo estimulado con LPS e IFN γ (Figura 1B).

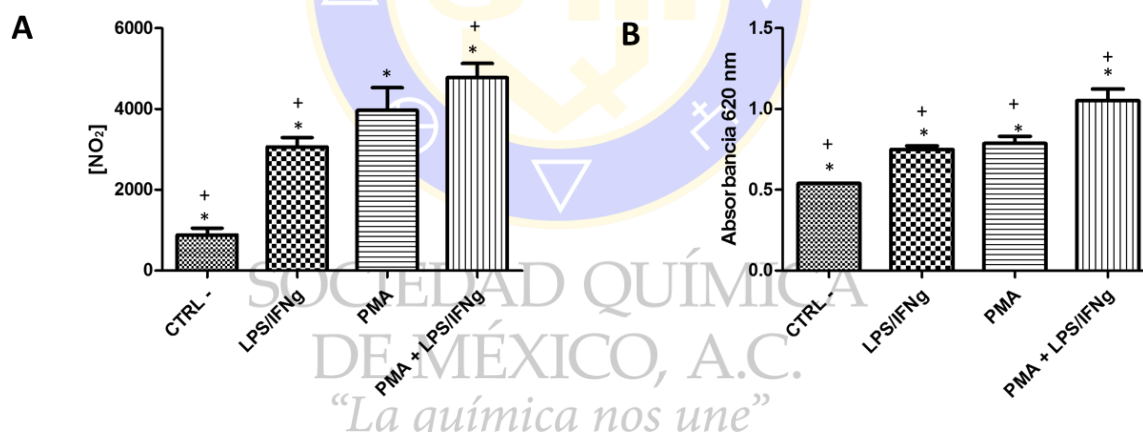


Figura 1 Evaluación de la actividad enzimática de los macrófagos. Los valores representan la media \pm DS, n=6; Las letras muestran diferencias estadísticamente significativas como sigue: * con respecto a Ctrl – que corresponden a célula que no recibieron estímulo; + con respecto al grupo al cual se administraron los tres estímulos. ANOVA ($p < 0.05$), análisis poshoc Tukey. A: Cuantificación de NO₂, a través de la reacción de Griess. B: Evaluación de la actividad NADPH oxidasa mediante la reducción de NBT. NO₂: nitrito; PMA: forbol-12-miristato-13-acetato, LPS: lipopolisacárido de *Escherichia coli*; IFN γ : interferón gamma.

Discusión

En este trabajo, tras la evaluación del efecto de tres estímulos: PMA, LPS e IFN γ se determinó que cuando los macrófagos son incubados durante 24h con los tres estímulos combinados se aumenta la actividad enzimática tanto de la iNOS como del complejo NADPH oxidasa, efecto que se reflejó en el aumento de la concentración de NO₂ y mayor formación de cristales de formazán intracelulares. Además, se encontró que el estímulo con PMA, favorece el fenotipo M1, el cual se caracteriza por una alta actividad de iNOS y formación de NO, que en este trabajo se midió de manera indirecta mediante la formación de NO₂, mientras que el estímulo con LPS disminuye esta actividad, favoreciendo al fenotipo M2.

Conclusiones

En las condiciones de cultivo que se establecieron en este trabajo: PMA favorece que el macrófago exprese un fenotipo tipo M1, mientras que el LPS el M2.

Bibliografía

- Arango Rincón, J. C.**, Gámez Díaz, L. Y., & López Quintero, J. Á. (2010). NADPH oxidase system: new challenges and perspectives. *Iatreia*, 23(4), 362-372.
- Kawakami, T.**, Kawamura, K., Fujimori, K., Koike, A., & Amano, F. (2016). Influence of the culture medium on the production of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase by activated macrophages in vitro. *Biochemistry and Biophysics Reports*.
- Koh, T. J.**, & DiPietro, L. A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, 13, e23
- Mosser, D.M.** and J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(12): p. 958-69.
- Sierra-Filardi, E.**, Vega, M. A., Sánchez-Mateos, P., Corbí, A. L., & Puig-Kröger, A. (2010). Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. *Immunobiology*, 215(9-10), 788-795.
- Toniolo, A.**, Fadini, G. P., Tedesco, S., Cappellari, R., Vegeto, E., Maggi, A., ... & Cignarella, A. (2015). Alternative activation of human macrophages is rescued by estrogen treatment in vitro and impaired by menopausal status. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(1), E50-E58.
- Vélez Tobón, G. J.**, Arrieta, R., Carolina, Y., Arias Sierra, A. A., & López Quintero, J. Á. (2016). Función del sistema NADPH oxidasa en la formación de trampas extracelulares de los neutrófilos (NETs). *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32(1), 43-56.
- Villa, A.**, Rizzi, N., Vegeto, E., Ciana, P., & Maggi, A. (2015). Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells. *Scientific reports*, 5, 15224.



SOCIEDAD QUÍMICA
DE MÉXICO, A.C.
“La química nos une”

Efecto del ejercicio sobre la expresión de Glut2 y Glut5 en tejido adiposo y hepático en un modelo murino de obesidad

Aguayo-Cerón Karla Aidee², Pérez-Ontiveros Alfredo¹, Vega-Pineda Fernando¹, López-Balderas Juan Eduardo¹, Patrick-Maillieux³, Ocharan-Hernández María Esther², Romero-Nava Rodrigo¹, Bravo Guadalupe³, Huang Fengyang¹ f_y_huang@yahoo.com

1. Hospital Infantil de México Federico Gómez-Laboratorio de Investigación en Farmacología y Toxicología.
2. Escuela Superior de Medicina- Instituto Politécnico Nacional, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación.
3. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados CINVESTAV Unidad Coapa-Laboratorio número 3.

Resumen

En la actualidad la obesidad representa un problema de salud a nivel mundial y aunque se asocia con diferentes factores, se ha descrito a la dieta y el sedentarismo como causas principales de esta patología, la cual, además incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como hipertensión, enfermedad cardiovascular y diabetes. Dichas patologías también se relacionan con resistencia a la insulina provocada por modificaciones en la expresión de los transportadores de glucosa. En un modelo murino se evaluó el efecto de una dieta (hipercalórica y alta en grasa) y del ejercicio sobre la expresión de Glut2 y Glut5 a través de la técnica de PCR. Se observó que, en la obesidad, la expresión de Glut2 y Glut5 se modifica dependiendo del tejido y el tipo de dieta, favoreciendo la resistencia a la insulina y en consecuencia el desarrollo de diabetes tipo 2.

Introducción

La obesidad es una patología que promueve la resistencia a la insulina y, por lo tanto, aumenta el riesgo de desarrollar diabetes y enfermedades cardiovasculares. Se ha descrito que existen diferentes causas del origen de la resistencia a la insulina: 1) defectos en la actividades de los transportadores de glucosa (GLUT's) (Saengsirisuwan, Kinnick et al. 2001); 2) activación de la cascada de serina-cinasa que promueve que la insulina disminuya la fosforilación de IRS-1 durante el metabolismo de los lípidos (Morino, Petersen et al. 2006); 3) en hígado, se reduce la estimulación de síntesis de glicógeno por acción de la insulina como resultado de la activación de la proteína-cinasa C (DeFronzo 2010); 4) modificaciones en la actividad mitocondrial relacionadas con la fosforilación oxidativa (Kwak 2013). Por otro lado, la obesidad también se asocia con incremento de marcadores de inflamación como: IL-1 β , IL-6 y TNF- α , los cuales estimulan la expresión de GLUT 1 y GLUT 3 en precursores de adipocitos (Docanto, Ham et al. 2015)

Exposición

El músculo esquelético es el sitio principal donde se lleva a cabo el metabolismo de glucosa y es altamente susceptible a la acción de la insulina que se ve afectada por el aumento de las concentraciones de los ácidos grasos libres, por tal motivo se han desarrollado estudios clínicos en pacientes obesos, en los que se han demostrado que el ejercicio restaura la capacidad oxidativa de ácidos grasos en pacientes con una dieta alta en grasa (Battaglia, Zheng et al. 2012), mejora la actividad de la insulina (Bajpeyi, Tanner et al. 2009) y de las células β (Slentz, Tanner et al. 2009). Si bien se han descrito los efectos benéficos del ejercicio en el manejo de la obesidad, los mecanismos moleculares en los que participa y que promueven la disminución de la resistencia a la insulina aún no han sido esclarecidos.

Material y métodos

Se utilizaron ratas Wistar macho de 10 a 12 semanas de edad y se mantuvieron en un ciclo de luz y oscuridad de 12:12-h. Las ratas se sometieron a dos dietas: hipercalórica con sacarosa al 30% y con pellet comercial de Test Diet High Fat (alta en grasa 45% de energía). Fueron tratadas por 8 semanas a un régimen dietético como se describe a continuación: en el primer grupo (n=8) las ratas tenían libre acceso a un alimento

hipercalórico con sacarosa al 30% *at libitum* en sus bebederos y con pellet estándar para roedores (SC, contenido 11% de energía). En el segundo grupo (n=8), la dieta consistió en un pellet comercial de dieta alta en grasas 45% de energía de Test Diet High Fat DIO. Se incluyó un grupo control (n=8), el cual se sometió a una dieta estándar con pellet comercial LabDiet (Dt. Louis, MO). Cada uno de los grupos se subdividió en otros grupos a los cuales se les realizó intervención mediante ejercicio. La intervención del ejercicio se clasificó en: intensidad leve y moderada en una caminadora marca Treadmil (Bioseb - In Vivo Research Instruments) con cinco líneas de trabajo o pasillos de animales. La intervención de ejercicio se realizó por 4 semanas todos los días a la misma hora con una intensidad inicial para la primera semana de 15 cm/seg y de manera continua se fue incrementado por semana 5 cm de intensidad, hasta concluir en la cuarta semana 30 cm/seg, con una frecuencia de 20 minutos en todas las semanas. Para la determinación de la expresión de Glut2 y Glut5, se extrajo el ARN total de tejido adiposo abdominal e hígado, utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y la calidad del ARN total se evaluaron y cuantificaron usando el NanoPhotometer NP80 (Implen, Alemania). La transcripción inversa del ARN total (1 µg) para obtener el DNAc se realizó usando M-MVL (Thermo Fisher Scientific). Los genes de referencia, de interés, el número de acceso y la sonda se enumeran en la tabla 1. Los cebadores para el ARNm se diseñaron en el centro de diseño de ensayos de la Biblioteca Universal Probe (LifeScience, Roche) y fueron sintetizados por Sigma Aldrich. La especificidad de los cebadores fue verificada por NCBI Blast. Los análisis de RT-PCR se realizaron en PCR Prime Pro 48 en tiempo real (TECHNE) en un volumen final de 10 µl. Se añadieron 5 µl de tampón de reacción, se colocaron 0,3 µl de cebadores directos e inversos y 0,15 µl de sonda, el resto se colocó de agua para completar un volumen final de 9 µl, y finalmente 1 µl (1000 ng de muestra) de ADNc. Las reacciones de PCR se iniciaron con una etapa de precalentamiento de 10 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de amplificación (desnaturalización durante 10 segundos a 95°C, recocido 40 segundos a 60°C y extensión durante 10 segundos a 72°C). Todas las PCR se ejecutaron por triplicado. Los niveles de expresión de HPRT, Glut5 y Glut2 se determinaron mediante el método comparativo 2- $\Delta\Delta C_t$, normalizando la expresión con HPRT.

Los datos se expresaron como la media \pm error estándar (EE). El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) realizando un post hoc Tukey mediante el software GraphPad Prism 7.02. Las diferencias con valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0.05$) se consideraron significativas.

Tabla 1. Genes de referencia y genes de interés

Símbolo del gen	Secuencia Primers 5' - 3'	Tm (°C)	Numero de acceso Gen	Sonda Roche
Housekeeping				
Hprt1	F: GGTCCATTCCTATGACTGTAGATT TT	60	NM_012583.2	22
	R: AACAAATCAAGACGTTCTTTCCAG	59		
Genes de interés				
Glut 5	F: AATGACCTCCACCTGCTAC	59	NM_031741.1	21
	R: ACTGGCCATACTGCCTGGT	60		
Glut 2	F: AAAGCCCCAGATACCTTTACCT	59	NM_012879.2	122
	R: TGCCCCTTAGTCTTTTCAAGC	60		

Resultados

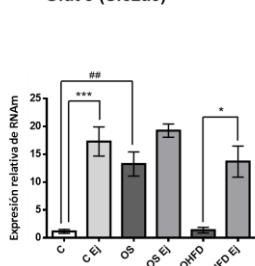
Se desarrolló un modelo de obesidad en ratas las cuales se sometieron a dos tipos de dieta y diferentes intensidades de ejercicio, los parámetros fisiológicos y bioquímicos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros fisiológicos y bioquímicos por grupo de tratamiento

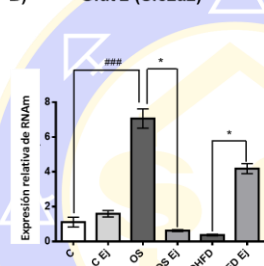
Medición		Wistar Control		Wistar Obesa			
		Sin ejercicio	Con ejercicio	Dieta sacarosa 30%		Dieta alta en grasa (DAG)	
				Sin ejercicio	Con ejercicio	Sin ejercicio	Con ejercicio
Peso	(g)	586.33 ± 15.28	536.17 ± 12.7	669.17 ± 11.02*	688.5 ± 30.34	667.33 ± 10.77*	670.67 ± 19.6
Glucosa	(mm Hg)	93.89 ± 5.72	103.09 ± 3.33	118.19 ± 3.11*	69.36 ± 3.77 ^Δ	125.17 ± 2.25***	123.32 ± 2.89
Triglicéridos	(mg/d L)	110 ± 5.6	61.0 ± 3.88**	160.67 ± 7.4**	47.67 ± 6.37 ^Δ	166.50 ± 13.62***	79.33 ± 8.43 ^Δ
Colesterol total	(mg/d L)	52.17 ± 4.11	47.50 ± 3.59	58.67 ± 2.03	52.33 ± 1.33	76.17 ± 2.64***	72.83 ± 5.69

Los datos representan la media (n=8) ± error estándar de los parámetros fisiológicos y bioquímicos, ANOVA, post hoc de Tukey. Los asteriscos (*) representan las diferencias significativas con respecto a la

A) **Glut 5 (Slc2a5)**



B) **Glut 2 (Slc2a2)**

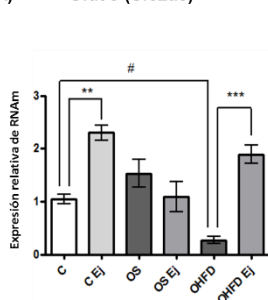


obesidad y Δ con respecto al ejercicio. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001

Los resultados obtenidos muestran que la expresión más alta de receptores Glut5 en tejido adiposo se obtuvo en el grupo sometido a una dieta alta en grasa, mientras que en el grupo con dieta hipercalórica la expresión disminuyó incluso con respecto al grupo control. Con respecto a la intervención del ejercicio, se observó que éste aumenta la expresión de los receptores Glut5. Sin embargo, al combinar la dieta con el ejercicio: la dieta hipercalórica aumenta la expresión de este tipo de receptores con respecto al grupo control, mientras que la dieta alta en grasa no produce cambios estadísticamente significativos con respecto al control ni al grupo con dieta hipercalórica (Figura 1A). Por otra parte, la expresión génica de los receptores Glut2 en tejido adiposo disminuyó tanto en el grupo con dieta alta en grasa, como en el de dieta hipercalórica. También se observó que en el grupo que realizó ejercicio la expresión disminuyó con respecto a los grupos en los cuales además de ser sometidos a realizar ejercicio, mantuvieron una dieta ya sea hipercalórica o alta en grasa (Figura 1B). La expresión de los transportadores Glut5 en tejido hepático aumentó en el grupo sometido a ejercicio, con respecto al grupo control, mientras que la menor expresión se obtuvo en el grupo sometido a una dieta hipercalórica. Con respecto a las dietas, el grupo con una dieta alta en grasa aumentó la expresión génica, mientras que la dieta

Figura 1. Expresión génica de Glut5 (A) y Glut2 (B) en tejido adiposo. C: control; C Ej: control + ejercicio; OS: Obeso sacarosa 30%; OS Ej: Obesos sacarosa 30% + ejercicio; OHFD: Obeso con dieta alta en grasa; OHFD Ej: Obeso con dieta alta en grasa + ejercicio. Las barras representan la media ± error estándar de la expresión relativa, normalizado con HPRT, post hoc de Tukey. Los asteriscos (*) representan las diferencias significativas p < 0.05 con respecto al ejercicio y # con respecto a la obesidad.

A) **Glut 5 (Slc2a5)**



B) **Glut 2 (Slc2a2)**

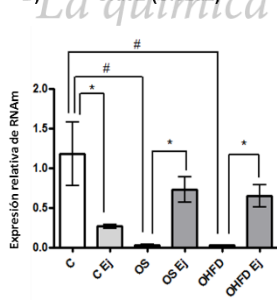


Figura 2. Expresión génica de Glut5 (A) y Glut2 (B) en tejido hepático. C: control; C Ej: control + ejercicio; OS= Obeso sacarosa 30%; OS Ej: Obesos sacarosa 30% + ejercicio; OHFD: Obeso con dieta alta en grasa; OHFD Ej: Obeso con dieta alta en grasa + ejercicio. Las barras representan la media ± error estándar de la expresión relativa, normalizado con HPRT y post hoc de Tukey. Los asteriscos (*) representan las diferencias significativas p < 0.05 con respecto al ejercicio y # con respecto a la obesidad.

hipercalórica la disminuyó. Además, se observó que, el ejercicio en combinación con una dieta alta en grasa aumenta la expresión de Glut5, mientras que en el grupo sometido a ejercicio y una dieta hipercalórica disminuye (Figura 2A). En cuanto a la expresión de los receptores Glut2 en tejido adiposo, se observó la mayor expresión en el grupo con dieta alta en grasa, mientras que el grupo con dieta hipercalórica disminuyó. Por otro lado, en el grupo sometido a ejercicio y dieta hipercalórica y alta en grasa, respectivamente, la expresión disminuyó, encontrando una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control (Figura 2B).

Discusión

La prevalencia de la obesidad se ha incrementado rápidamente y ha alcanzado cifras preocupantes a nivel mundial, ya que constituye un factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades que merman la calidad de vida de las personas. Se ha demostrado que la dieta y el estilo de vida son factores clave en el desarrollo de la obesidad. Como consecuencia de la modernización y avances en la industria y procesamiento de alimentos, el consumo de fructuosa ha aumentado significativamente, y se ha asociado a una dieta alta en este azúcar con el desarrollo de síndrome metabólico, en el que se incluyen afecciones como resistencia a la insulina, dislipidemias, incremento de la grasa corporal, factores que desencadenan en obesidad y diabetes tipo 2. La fructuosa es un carbohidrato que utiliza los transportadores GLUT, específicamente el GLUT5, que es el encargado del transporte en la membrana apical del intestino delgado, para que posteriormente en la membrana basolateral sea el GLUT2 el que continúe su transporte. Sin embargo, la presencia de estos transportadores no se limita a los enterocitos, ya que se ha reportado su presencia en hígado, riñón, músculo esquelético, tejido graso, cerebro. En este modelo, se encontró que existe una mayor expresión del transportador Glut2 que de Glut5 tanto en tejido adiposo como hepático. Sin embargo, se observó que la dieta es un factor que modifica la expresión de estos transportadores. En tejido adiposo, la dieta alta en grasa aumento Glut5, mientras que la dieta alta en fructuosa lo disminuyo, pero con respecto al Glut2, los dos tipos de dieta disminuyeron la expresión (Figura 1 y 2). En cuando al tejido hepático se observó que la dieta alta en grasa incrementa los dos transportadores, en tanto que la dieta alta en fructuosa disminuye esta expresión (Figura 1 y 2). Como se mencionó con anterioridad, el estilo de vida tiene un papel fundamental en el desarrollo de ciertas enfermedades. El ejercicio es una actividad que ha demostrado efectos benéficos en la reducción del riesgo y como tratamiento para enfermedades como la obesidad, ya que promueve el metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos para satisfacer las necesidades energéticas durante la actividad. En este estudio se observó que el ejercicio tiene un efecto benéfico en la disminución del perfil lipídico en el grupo con dieta alta fructuosa, no así en el grupo con una dieta alta en grasa. En el modelo que se desarrolló, en donde las ratas se sometieron a ejercicios con intensidad leve y moderada, se encontró que el ejercicio es un factor que modifica la expresión de los transportadores de fructuosa: en tejido adiposo incrementó la expresión de Glut5, mientras que disminuyo la del Glut2. Observando un comportamiento similar en tejido hepático. Por otro lado, al evaluar el efecto de la dieta y el ejercicio se observó que en tejido adiposo en el grupo con dieta alta en fructuosa que además se sometió a ejercicio la expresión de Glut5 se incrementó con respecto al grupo control sin ninguna intervención. Mientras que en el Glut2 no se observó una diferencia estadísticamente significativa, comportamiento que se observo también en tejido hepático, ya que cuando se realiza actividad el metabolismo de los carbohidratos se favorece y es el hígado el encargado de regular este proceso (Kwak 2013) y como consecuencia de las cantidades elevadas de fructuosa por la dieta, se favorece su metabolismo y la expresión de Glut5, que es específico para fructuosa, mientras que Glut2 puede transportar además a la glucosa (Helliwell, Richardson et al. 2000). En este estudio se observó que, en el grupo con dieta alta en fructuosa, el ejercicio muestra efectos favorables en la disminución tanto de los parámetros bioquímicos que incluyen a los lípidos, así como en los expresión del transportador de fructuosa, hecho que favorece el metabolismo del azúcar y además contribuye a la disminución de los factores que favorecen el desarrollo de resistencia a la insulina, y en consecuencia también disminuyen la obesidad. Sin embargo, se observó que la dieta alta en grasa, si bien es un antecedente para que se instaure la obesidad, también contribuye a

que se desencadene la resistencia a la insulina. Además, en este grupo, la intervención no tuvo efecto en la disminución de los parámetros bioquímicos, pero si en la expresión de los transportadores, sin embargo, esto no fue suficiente para restaurar los parámetros bioquímicos.

Conclusiones

La dieta es un factor que tiene contribuciones genéticas al favorecer la expresión de los transportadores Glut5 y Glut2 en tejido adiposo y hepático. Mientras que el ejercicio puede restaurar los parámetros bioquímicos (glucosa y perfil lipídico) en ratas obesas con un adieta alta en fructuosa, no así en ratas sometidas a una dieta alta en grasa.

Agradecimientos

Hospital Infantil de México Federico Gómez. Protocolo HIM/2015/039 SSa. 1181

Bibliografía

Bajpeyi, S., C. J. Tanner, C. A. Slentz, B. D. Duscha, J. S. McCartney, R. C. Hickner, W. E. Kraus and J. A. Houmard (2009). "Effect of exercise intensity and volume on persistence of insulin sensitivity during training cessation." Journal of applied physiology **106**(4): 1079-1085.

Battaglia, G. M., D. Zheng, R. C. Hickner and J. A. Houmard (2012). "Effect of exercise training on metabolic flexibility in response to a high-fat diet in obese individuals." American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism **303**(12): E1440-E1445.

DeFronzo, R. A. (2010). "Overview of newer agents: where treatment is going." The American journal of medicine **123**(3): S38-S48.

Docanto, M. M., S. Ham, A. Corbould and K. A. Brown (2015). "Obesity-associated inflammatory cytokines and prostaglandin E2 stimulate glucose transporter mRNA expression and glucose uptake in primary human adipose stromal cells." Journal of Interferon & Cytokine Research **35**(8): 600-605.

Helliwell, P. A., M. Richardson, J. Affleck and G. L. KELLETT (2000). "Regulation of GLUT5, GLUT2 and intestinal brush-border fructose absorption by the extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase intracellular signalling pathways: implications for adaptation to diabetes." Biochemical Journal **350**(1): 163-169.

Kwak, H.-B. (2013). "Exercise and obesity-induced insulin resistance in skeletal muscle." Integrative medicine research **2**(4): 131-138.

Morino, K., K. F. Petersen and G. I. Shulman (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction, Am Diabetes Assoc.

Saengsirisuwan, V., T. R. Kinnick, M. B. Schmit and E. J. Henriksen (2001). "Interactions of exercise training and lipoic acid on skeletal muscle glucose transport in obese Zucker rats." Journal of Applied Physiology **91**(1): 145-153.

Slentz, C. A., C. J. Tanner, L. A. Bateman, M. T. Durheim, K. M. Huffman, J. A. Houmard and W. E. Kraus (2009). "Effects of exercise training intensity on pancreatic β -cell function." Diabetes care **32**(10): 1807-1811.

El Acetónido de Triamcinolona y Dehidroepiandrosterona combinadas potencian la citotoxicidad en fibroblastos 3T3-L1 y fibroblastos normales

Aguayo-Cerón KA¹, Parra-Barrera A¹, Suarez-Souto MA¹, Mejía-Barradas CM¹, Calzada-Mendoza CC¹ y Gutiérrez-Iglesias G¹
iglesiasgg@yahoo.com.mx

2. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. Escuela Superior de Medicina- Instituto Politécnico Nacional.

Resumen

El tratamiento habitual de las lesiones hipertróficas y queloides es la aplicación tópica de acetónido de triamcinolona (AT), sin embargo estas lesiones reinciden si se suspende el tratamiento, por lo que es importante buscar otras alternativas. La dehidroepiandrosterona (DHEA) inhibe la proliferación celular de varias estirpes celulares, por lo que en el presente trabajo, evaluamos *in vitro* el efecto de AT, DHEA y la combinación de ambos en la proliferación de la línea celular 3T3-L1 y fibroblastos obtenidos de una biopsia de prepucio. En los cultivos de los fibroblastos, la combinación AT/DHEA a 200/150 mM tiene un efecto citotóxico mayor que cuando usamos la AT o DHEA solos. Por lo cual se puede considerar esta combinación para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento y control de las cicatrices hipertróficas o queloides.

Introducción

La piel es el uno de los órganos más extensos en el ser humano y su función principal es proteger al organismo contra agentes químicos, radiación solar o el ingreso de microorganismos patógenos (Derler and Gerhardt, 2012). Cuando hay una herida física, normalmente se desencadenan mecanismos celulares y de reparación que culmina en la formación de una cicatriz, sin embargo en algunas ocasiones dicho proceso es exacerbado y forman cicatrices aberrantes y poco estéticas conocidas como queloides o hipertróficas. Los síntomas incluyen dolor, prurito, contracturas y a largo plazo afectan la vida diaria en los aspectos físicos o psicológicos (Aderounmu, y cols. 2013; Gauglitz y cols, 2011). Los mecanismos celulares de las cicatrices involucran estímulos pro-inflamatorios en la zona de daño, los cuales activan principalmente a los fibroblastos residentes en la dermis, de modo que fármacos anti-inflamatorios esteroideos son los más adecuados para el tratamiento de este tipo de lesiones (Jumper y Bayat 2015; Shin y cols. 2014). Los corticoides o corticoesteroides son moléculas anti-inflamatorias sintetizadas por las glándulas suprarrenales, capaces de regular dichas respuestas inflamatorias (Barnes 2006; Tagawa, y cols. 2011), por ello dan resultado para el tratamiento de enfermedades que inducen inflamación, cicatrices hipertróficas y queloides. Sin embargo, aunque hoy en día los mecanismos de acción se conocen, la dosis y su eficacia clínica son cuestionables (Barnes 2006; Galofré 2009). La molécula sintética llamada 9 α -fluoro-16 α -hidroxiprednisolona o AT, posee potentes propiedades anti-inflamatorias y su aplicación clínica se ha enfocado en el tratamiento de cicatrices queloides/hipertróficas (Saikh 2006). Otra molécula llamada DHEA, posee una gran variedad de efectos biológicos, entre los que destacan la regulación de la síntesis de fibras de colágeno, protección celular, propiedades anti-tumorales, anti-inflamatorias y antioxidantes (Tagawa 2011; Lee 2000 Schwartz 1986; Gutiérrez 2007). Es por ello que en este trabajo se evaluó el efecto del AT, DHEA solas y en combinación sobre la proliferación de la línea celular de fibroblastos (3T3-L1) y fibroblastos normales, con el objetivo de proponer dosis menores a las usadas en la actualidad en cicatrices hipertróficas o queloides.

Material y métodos

La línea celular fibroblástica de ratón 3T3-L1 y los fibroblastos normales fueron cultivados en medio DMEM-F12 suplementado con S.F.B. al 10%, antibiótico-antimicótico 1X y se mantuvieron a 37°C, 5% de CO₂ en un ambiente húmedo. Se sembraron 8x10³ cel/pozo en placas de 96 pozos en presencia/ausencia de diferentes concentraciones de AT (200, 400 y 800 μ M), DHEA (40, 80 y 150 μ M) o AT-DHEA (200-40, 200-150 μ M) por 72 horas. Las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1% por 5 min., lavadas 2 veces con PBS y se dejó secar al aire para realizar la tinción con cristal violeta (50 μ L/pozo al 0.1%, pH 6) por 10 min. Se lavó 3 veces con agua bidestilada y se adicionó ácido acético al 10% (50 μ L/pozo), agitó por 10 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia fue analizada en un lector de placas de ELISA

(Elx800; Bio-Tek) a una λ de 570 nm. Las densidades ópticas fueron graficadas como % de citotoxicidad respecto al control (sin estímulo).

Resultados

Se realizó una curva concentración-respuesta (datos no mostrados) con DHEA como estímulo por 48 horas con los fibroblastos normales y 3T3. Los resultados obtenidos sirvieron para seleccionar las siguientes concentraciones de trabajo: 40, 80 y 150 μM . La DHEA causó citotoxicidad de manera concentración-dependiente en ambas estirpes celulares, es decir, en presencia de 40 μM no se afecta la viabilidad celular; sin embargo, en presencia de 150 μM de DHEA en ambas estirpes celulares puede observarse aproximadamente 50 y 60% de citotoxicidad en fibroblastos normales y 3T3-L1 respectivamente de forma significativa (fig. 1A y 1B).

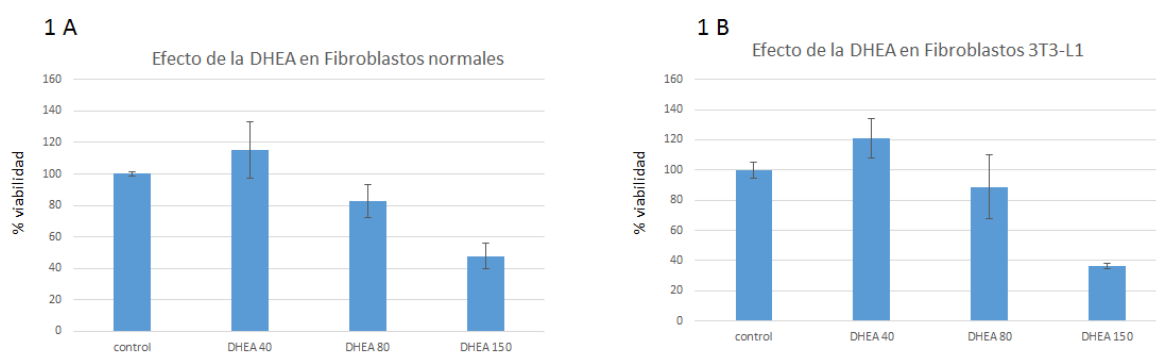


Figura 1. Efecto de la DHEA sobre la viabilidad de fibroblastos normales (A) y las células 3T3-L1 (B). En ambos fibroblastos, las concentraciones $\geq 150 \mu\text{M}$ de DHEA no afectan la viabilidad celular. Las células sin estímulo fueron tomadas como control del 100%.

Por otro lado, se realizó otra curva concentración-respuesta de los fibroblastos ahora estimulados con AT (datos no mostrados). De los resultados obtenidos se seleccionaron las siguientes concentraciones: 200, 400 y 800 μM . Se observó un 72% de citotoxicidad celular en los fibroblastos normales con 400 μM , mientras que con esa misma concentración en la línea 3T3-L1 un 63% de citotoxicidad celular. A 800 μM se indujo un 80% de citotoxicidad en ambos cultivos (figura 2A y 2B). Para observar si la DHEA tenía un efecto aditivo, decidimos trabajar adicionando 200 μM de AT (donde la citotoxicidad celular no es muy elevada) en combinación con la concentración menor y mayor utilizada de DHEA.

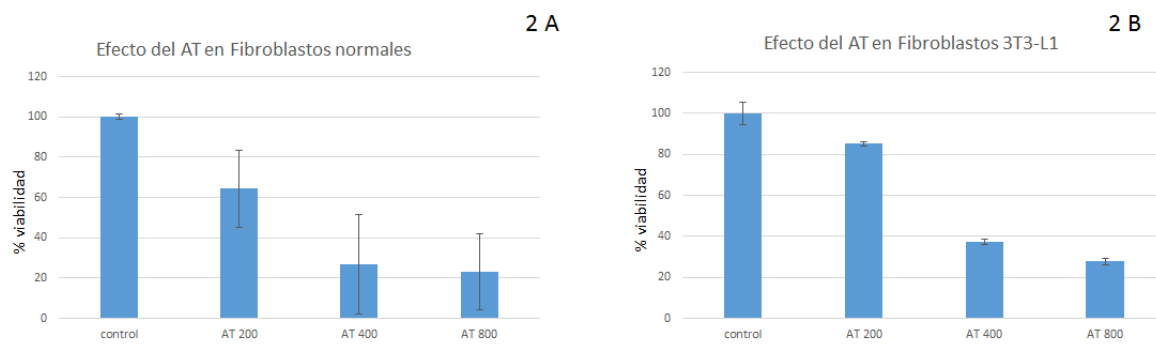


Figura 2. Efecto de la AT sobre la viabilidad celular de fibroblastos normales (A) y las células 3T3-L1 (B). Concentraciones $\geq 200 \mu\text{M}$ de AT causan un 73% de citotoxicidad en fibroblastos normales mientras que

con las mismas concentraciones pero en la línea 3T3-L1 solo se alcanza un 60-65 % de citotoxicidad. Las células sin estímulo fueron tomadas como control del 100%.

Finalmente, se evaluó el efecto de 200 μM de AT en combinación con 40 y 150 μM de DHEA con ambos tipos de fibroblastos. Los resultados muestran un efecto aditivo de la DHEA sobre el AT con una concentración de 150 μM de DHEA en la línea 3T3-L1 (68%), pero es mucho más evidente el efecto citotóxico en los fibroblastos normales (90%) (figuras 3A y 3B).

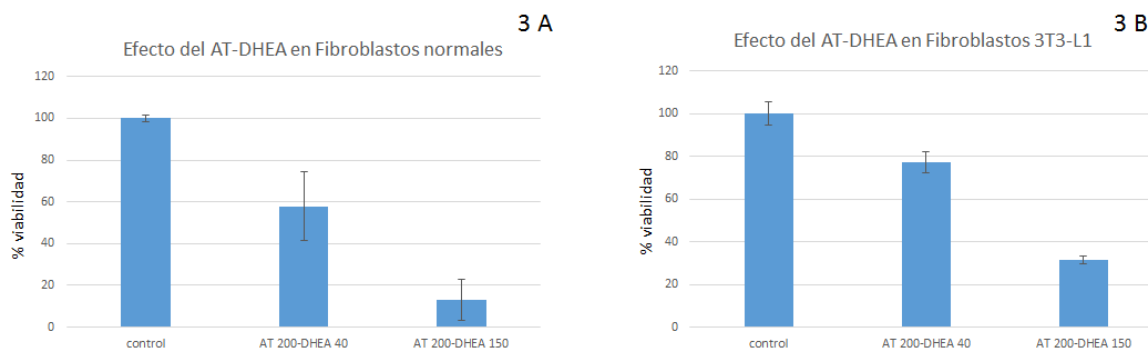


Figura 3. Efecto aditivo del AT-DHEA sobre la viabilidad de los fibroblastos normales (A) y 3T3-L1 (B). La combinación de AT-DHEA 200-150 μM inducen citotoxicidad en fibroblastos normales y en la línea 3T3-L1. Las células sin estímulo se tomaron como control del 100%.

Discusión

La cicatrización de una lesión cutánea, involucra un equilibrio entre los diferentes mecanismos de reparación celular. Sin embargo factores endócrinos, genéticos o traumáticos, pueden alterar dicho equilibrio por lo que se ve incrementada la proliferación de los fibroblastos de la dermis y la síntesis de moléculas de matriz extracelular de tipo rígido (como el colágeno), generándose una cicatriz abultada y excesiva llamada aberrante (queloide o hipertrófica) (Gauglitz 2011; Burgos 2006). El tratamiento habitual para este tipo de crecimientos cutáneos, es la inyección intralesional de AT, sin embargo estas lesiones son recurrentes (Hakan 2013) y resulta importante buscar otras opciones para controlar el crecimiento de estas cicatrices.

Un modelo celular adecuado para estudiar posibles fármacos anti-proliferativos, es utilizar la línea celular fibroblástica 3T3-L1, la cual tiene alta tasa proliferativa, es sensible y susceptible a este tipo de fármacos. Estudios previos demostraron que concentraciones de 0.1 μM de AT estimula la síntesis de DNA y división celular de las células 3T3-L1 (Thrash 1974), sin embargo, concentraciones farmacológicas por arriba de 1,000 μM de AT, inhiben considerablemente la proliferación en células troncales mesenquimales (Gutiérrez 2017). Nuestros resultados, demuestran que se pueden utilizar 400 μM de AT para inhibir la proliferación tanto de los fibroblastos normales como para la línea celular 3T3-L1, siendo más susceptible a la inhibición ésta última (fig. 2). Por otro lado, se ha demostrado que la DHEA es un precursor con propiedades antiinflamatorias como antioxidantes y puede considerarse para el tratamiento de desórdenes inflamatorios, ya que a concentraciones de 0.1-10 μM disminuye la proliferación celular en la línea 3T3-L1 en forma dosis dependiente (Fujioka 2012). Nuestros resultados, indican que concentraciones por debajo de 200 μM hay un 50% de inhibición de proliferación de fibroblastos normales y un 60% en la línea celular 3T3 (fig. 2). Estos resultados coinciden con una disminución significativa de la proliferación observada en 3T3-L1 en presencia 100 μM de DHEA (Lea-Currie 1998). La acción de la DHEA en general es opuesta a lo que inducen los glucocorticoides (GC) en adipocitos, donde éstos potencian la adipogénesis, inducen la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, adipocinas y en modelos de rata obesas, incrementan la síntesis del TNF- α , la síntesis de colágeno y activación de los genes que codifican para algunas metaloproteinasas o MMP (Kimura 1998; Shi 2005; Tagawa 2011). Este estudio muestra que los efectos de la DHEA en combinación con la AT puede ser de utilidad en el tratamiento tópico para controlar desórdenes inflamatorios e hiperproliferativos, como las cicatrices queloides e hipertróficas.

La combinación AT/DHEA probablemente involucre la inhibición de la proliferación celular, citotoxicidad o muerte celular por la vía de apoptosis o autofagia. Se propone que posteriores estudios esclarecerán los mecanismos inducidos por dicha combinación. La proliferación en células 3T3-L1 y fibroblastos normales demostraron que la combinación AT/DHEA (200/150 μM) son muy similares a los obtenidos a altas concentraciones individuales, donde se inhibió la proliferación más del 50% (Fig. 3); estos resultados demuestran que no son necesarias altas concentraciones de ambos fármacos para inhibir la proliferación celular, como se ha reportado en previos estudios (Gutiérrez y cols. 2017). El presente trabajo revela que pueden realizarse otras combinaciones y todavía disminuir las concentraciones de cada uno de los fármacos y lograr optimizar el resultado. Sería interesante investigar más adelante para estos mismos fibroblastos, si el efecto inhibitor de la proliferación que en este trabajo se muestra, se debe a procesos de apoptosis, como lo observado cuando se usan altas concentraciones de ambos compuestos de manera individual (Gutiérrez y cols. 2017).

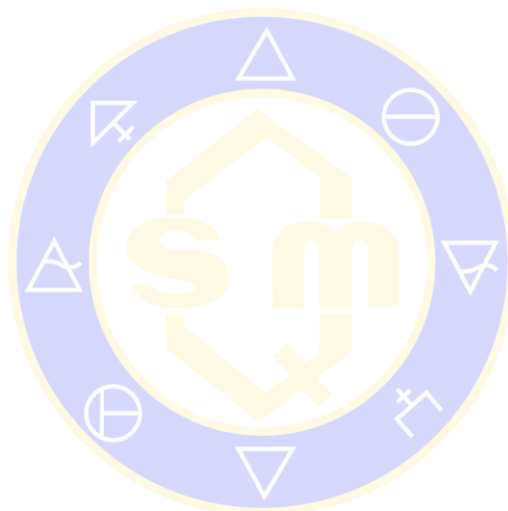
Conclusiones

La DHEA a dosis de 40 μM no induce citotoxicidad, con 150 μM hay un 50 y 60% de citotoxicidad celular en fibroblastos normales y en la línea 3T3-L1 respectivamente. El AT a 200 μM , se induce un 40 y 20% de citotoxicidad en los fibroblastos normales y la línea 3T3-L1 respectivamente. Finalmente, la combinación de AT/DHEA a concentraciones de 200 μM AT más 150 μM de DHEA causa 90 y 70% de citotoxicidad en los fibroblastos normales y en la línea 3T3-L1.

Bibliografía

- Derler, S.**, and L.C., Gerhardt. "Tribology of Skin: Review and Analysis of Experimental Results for the Friction Coefficient of Human Skin". *Tribol Lett*, no 45, pp. 1–27, 2012. DOI: [10.1007/s11249-011-9854-y](https://doi.org/10.1007/s11249-011-9854-y)
- Aderounmu, A.O.**, Omonisi, A.E., Akingbasote, J.A., Makanjuola, M., Bejide, R.A., Orafidiya, L.O., et al. "Wound-healing and potential anti-keloidal properties of the latex of calotropis procera (aiton) asclepiadaceae in rabbits". *Afr J Tradit Complement Altern Med*, no 10 pp. 574-579, 2013. DOI: [10.1155/2010/413238](https://doi.org/10.1155/2010/413238)
- Gauglitz, G.**, Korting, H. C., Pavicic, T., Ruizicka T., and M. G., Jeschke. "Hypertrophic Scarring and Keloids: Pathomechanisms and Current and Emerging Treatment Strategies". *Mol. Med*, no 17, pp. 113-125, 2011. DOI: [10.2119/molmed.2009.00153](https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00153)
- Jumper N.**, and A., Bayat. "Functional histopathology of keloid disease". *Histol Histopathol*, no 30, pp. 1033-1057, 2015. DOI: [10.14670/HH-11-624](https://doi.org/10.14670/HH-11-624)
- Shin, J.**, Park, J., Heen, J., Hoon, K., Kim, Y., Yun, C. and W., Jai. "Extranarginal excision is preferable for hypertrophic scars" *International Journal of Dermatology*, no 53, pp.1138–1144, 2014. DOI: [10.1111/ijd.12481](https://doi.org/10.1111/ijd.12481)
- Barnes, P.J.** "How corticosteroids control inflammation: Quintiles. Prize Lecture 2005". *British Journal of Pharmacology*, no 148, pp. 245–254, 2006. DOI: [10.1038/sj.bjp.0706736](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706736)
- Tagawa, N.**, Minamitani, E., Yamaguchi, Y., and Y. Kobayashi. "Alternative mechanism for anti-obesity of dehydroepiandrosterone: Possible contribution of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition in rodent adipose tissue". *Steroids*, no 76, pp. 1546-1553, 2011. DOI: [org/10.1016/j.steroids.2011.09.005](https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.09.005)
- Galofré, J. C.** "Manejo de los corticoides en la práctica clínica". *rev med univ Navarra*, vol 53, no 1, pp. 9-18, 2009.
- Saikh, S.**, Engelmann, L. A., and S.W., Klemann. "Cell viability effects of triamcinolone acetonide and preservative vehicle formulations". *Br J Ophthalmol*, no 90, pp. 233–236, 2006. DOI: [10.1136/bjo.2005.076190](https://doi.org/10.1136/bjo.2005.076190)
- Lee, K.S.**, Oh, K.Y., and B.C. Kim. "Effects of dehydroepiandrosterone on collagen and collagenase gene expression by skin fibroblasts in culture". *J Dermatol Sci*, no 23, pp.103–110, 2000. DOI: [10.1016/S0923-1811\(99\)00094-8](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(99)00094-8)
- Schwartz, A.G.**, Pashko, L., and J. M. Whitcomb. "Inhibition of tumor development by dehydroepiandrosterone and related steroids". *Toxicol Pathol*, no 14, pp. 357-362, 1986.
- Gutiérrez, I. G.**, Mendoza, C., Zapata, E., Montiel, A., Reyes, E., Montañó, L.F., and R. López. "Dehydroepiandrosterone inhibits the TNF-alpha-induced inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells". *Elsevier*, no 190, pp. 90–99, 2007. DOI: [10.1016/j.atherosclerosis.2006.02.031](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.02.031)
- Gutiérrez I. G.**, López-Marure, R., Parra-Barrera, A., Calzada-Mendoza, C.C., and J. R. Cáceres Cortés. "Efecto de la Dehidroepiandrosterona y el Acetonido de Treamsinolona sobre la línea celular 3T3-L1". *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, vol. 38, pp. 297-305, 2017. DOI: [dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.25](https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.25)
- Gauglitz, G.**, Korting H. C., Pavicic T., Ruizicka T., and M. G., Jeschke. "Hypertrophic Scarring and Keloids: Pathomechanisms and Current and Emerging Treatment Strategies". *Mol. Med.*, no. 17, pp. 113-125. 2011.
- Burgos, B. I.** "QUELOIDES Desde la fisiopatogenia a la terapéutica". *Act Terap Dermatol*, no.29 pp. 156, 2006.
- Hakan, U.**, Ozan B., Rümeyts H., Pergin A., and U. Aycan. "Angiotensin-converting enzyme inhibitor enalapril reduces formation of hypertrophic scars in a rabbit ear wounding model". *Plastic and Reconstructive Surgery*, no 132, pp. 3610e-371e, 2013.

- Thrash**, R. C., Tsung-Sang H., and D. D. Cunningham. "Structural Features of steroids which initiate proliferation of density-inhibited 3t3 mouse fibroblasts" *J. Biol. Chem.*, no 249, pp. 6099-6103, 1974.
- Wyles**, C.C., Houdek, M.T., Wyles S.P., Wagner E.R., Behfar A., and R.J., Sierra. "Differential cytotoxicity of corticosteroids on human mesenchymal stem cells". *Clin Orthop Relat Res*, no 473, pp. 1155-1164, 2015.
- Fujioka**, K., Kajita, K., Wu, Z., Hanamoto, T., Ikeda, T., Mori, I., Okada, H., Yamauchi, M., Uno, Y., Morita, H., Nagano, I., Takahashi, Y. and T. Ishizuka. "Dehydroepiandrosterone reduce preadipocyte proliferation via androgen receptor". *J Physiol Endocrinol Metab*, no 302, pp. E694-E704, 2012. **DOI: 10.1152/ajpendo.00112.2011**
- Lea-Currie**, Y. R., Wen P., and M. K. McIntosh. "Dehydroepiandrosterone reduces proliferation and differentiation of 3t3-l1 preadipocytes". *Biochemical and biophysical research communications*, no 248, pp. 497-504, 1998.
- Tagawa**, N., Minamitani E., Yamaguchi Y., and Y. Kobayashi. "Alternative mechanism for anti-obesity of dehydroepiandrosterone: Possible contribution of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition in rodent adipose tissue". *Steroids*, no 76, pp. 1546-1553, 2011.
- Kimura**, M., Tanaka S., Yamada Y., Kiuchi Y., Yamawa T., and H., Sekihara. "Dehydroepiandrosterone decreases serum tumor necrosis factor- α y resortes insulin sensitivity: independent effect from secondary weight reduction in genetically obese zucker fatty rats". *Endocrinology*, no. 139, pp. 3249-3253, 1998.
- Shi**, M., Rhie, G., Park, C., Kim K., Cho, K., Eun, H., et al. Modulation of Collagen Metabolism by the Topical Application of Dehydroepiandrosterone to Human Skin. *Journal Invest Dermatol*. no.124, pp. 315-323, 2005.



SOCIEDAD QUÍMICA
DE MÉXICO, A.C.
"La química nos une"