

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Proyecto:

---

Identificación del tipo de inhibición del compuesto 2a sobre la actividad de la enzima 5 $\alpha$ -Reductasa tipo 1 presente en células LNCaP

---

Proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud

Etapas: Desarrollo de reactivos analíticos y de diagnóstico

Presenta:

Fuentes Moreno Evelyn 2173062838

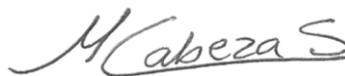
Asesora:

Dra. Marisa Cabeza Salinas 2683

Laboratorio de Hormonas G-006 de la UAM-X

07 de Febrero 2022 a 08 de Agosto 2022

VoBo Marisa Cabeza Salinas



## Contenido

Introducción	3
Marco teórico	3
Objetivo General	9
Objetivos específicos	9
Material y métodos	9
1. Obtención de la fuente de 5 $\alpha$ -reductasa de tipo 1	9
2. Lisis celular y obtención de microsomas	9
3. Método de Bradford	10
4. Características de la T radiomarcada.	10
5. Preparación de medios de incubación.	10
6. Incubación	11
7. Extracción	11
8. Identificación de la DHT)	11
Resultados	12
Análisis de resultados y conclusiones	12
Referencias	14

## Introducción

La testosterona (T) es el andrógeno más abundante en los varones; esta hormona se produce principalmente en los testículos, aunque también tiene una producción intrácrina [Sitteri Pk and Wilson, 1974]. La T comienza a secretarse en la etapa de la pubertad y sus niveles en sangre son elevados hasta la edad de 50 años en promedio; época en que la cantidad de T en sangre disminuye. La T se convierte en su metabolito más activo que es la dihidrotestosterona (DHT) en los tejidos andrógeno-dependientes, debido a la presencia de la enzima  $5\alpha$ -reductasa (SRD5A). Se ha demostrado que la producción irregular de DHT es la responsable de la hiperplasia prostática benigna [Cabeza, et al., 2004]. Esta enfermedad afecta a varones de edad avanzada, de acuerdo con la “Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012”. Para 2050, se estima que cerca del 28% de los adultos mayores sufrirán de esta afección.<sup>1</sup> Así mismo, el cáncer de próstata es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, con una tasa de mortalidad del 3.8% en 2018 y a un aumento previsto de 2.1 veces en mortalidad para el año 2040, algunos estudios han demostrado que en cáncer de próstata primario y metastásico se expresa de 2 a 4 veces más la enzima SRD5A1. [Bamodu, et al., 2021] El aumento de los casos de estas enfermedades representa un problema de salud, es por ello que resulta de gran importancia desarrollar fármacos que inhiban la actividad de la enzima SRD5A. Este trabajo se enfoca en demostrar que el nuevo esteroide **2a**, inhibe competitivamente, la actividad de la SRD5A1 presente en la línea celular LNCaP.

## Marco teórico

Los andrógenos son las hormonas responsables de los cambios corporales y del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, que se presentan en los niños a partir de la pubertad. [Ganong, 2006]. La T, es el andrógeno más abundante que se produce en los testículos, desde esta etapa de la vida. Las células de Leydig, localizadas en el espacio inter-tubular del estroma testicular, son las que producen dicha hormona.

---

<sup>1</sup> <http://132.248.9.195/ptd2019/agosto/0791885/0791885.pdf>

La producción irregular de DHT se ha implicado como causante de la progresión de la hiperplasia prostática benigna y del cáncer de esta glándula. [Cabeza, et al., 2004].

Se ha demostrado que la enzima  $5\alpha$ -reductasa convierte a la T en DHT [ Occhiato EG, et al., 2004 ]. Se conocen tres tipos de esta enzima:

- La de tipo 1 que se encuentra en la piel de todo el cuerpo, hígado y próstata; su actividad óptima se encuentra a un pH básico 6-8.5.
- La de tipo 2, se encuentra en la piel de la región genital, cuero cabelludo, próstata fetal, vesículas seminales y otros tejidos. Esta enzima muestra su mayor actividad a un pH ácido de 5-7.
- La de tipo 3, es la enzima menos estudiada; pero se sabe que se expresa en todos estos tejidos, únicamente en la edad adulta. [Azzouni, et al., 2012]

Estos diferentes tipos de isoenzimas, se agrupan en tres subfamilias: en la primera se incluyen a la  $5\alpha$ -reductasa de tipo 1 (SRD5A1) y a la  $5\alpha$ -reductasa de tipo 2 (SRD5A2); denominadas en esta forma debido a los genes que las codifican [Langlois VS, et al., 2010 ]. El primer ADNc, que se caracterizó de estas enzimas, fue a partir del hígado de rata y se le denominó gen SRD5A1, mientras que al segundo ADNc fue aislado de próstata humana y se denominó gen SRD5A2. [Russell & Wilson, 1994] La segunda subfamilia está conformada por la  $5\alpha$ -reductasa de tipo 3, que fue identificado por su perfil de expresión génica de todo el genoma y fue denominada gen  $5\alpha$ -R3 (SRDA3) y por último la tercera subfamilia, conformada por las proteínas GPSN2 y GPSN2L. [Azzouni, et al., 2012] Las tres isoenzimas de la  $5\alpha$ -reductasa (SRD5A1, SRD5A2, SRD5A3) reducen la T a DHT en los tejidos andrógeno-dependientes.

La  $5\alpha$ -reductasa, es una enzima hidrofóbica, presente en las membranas celulares; reconoce como sustratos específicos, además de a la T, a otros esteroides con la conformación  $\Delta^4$ -3-oxoesteroides y  $\Delta^{4,5}$  carbono 19/21. *“El mecanismo de activación de la SRD5A, implica su unión con el NADPH, que tiene*

una función como coenzima. El siguiente paso, es su unión con el sustrato específico. La reacción comienza cuando el enlace  $\Delta^4$  se rompe y un anión hidruro se transfiere desde NADPH directamente a la posición  $\alpha$  del carbono C-5 seguido de un protón que ataca al carbono C-4 en la cara  $\beta$ , lo que conduce a la formación del producto. Posteriormente el producto formado sale del complejo enzima-NADP<sup>+</sup>, el NADP<sup>+</sup> y en el último lugar la enzima que queda libre para iniciar otros ciclos de catálisis.” [Pérez, et al., 2020].

La inhibición de la SRD5A por diferentes fármacos tiene como objetivo, evitar la unión de la DHT con el receptor de andrógenos. [Bratoeff, et al, 2010]

Los fármacos inhibidores de la actividad de esta enzima, se utilizan para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de esta glándula. En la literatura científica se han informado varios de estos fármacos con diferente mecanismo de acción:

- Inhibidores esteroideos: 4-azasteroides: Finasterida, dutasteride y turosteride, 6-azasteroides, por ejemplo, G11s7669X, y 10 azasteroides, por ejemplo, AS97004. Ácidos androstanocarboxílicos como la epristerida. Esteres de progesterona
- Inhibidores no esteroideos como: Benzoquinolinas, ácidos arílicos, derivados del ácido butanoico. [Azzouni, et al., 2012]

De éstos solamente se encuentran dos en el mercado: la finasterida y la dutasterida.

### **Compuesto 2a**

Entre los compuestos esteroideos sintetizados por el grupo de la Dra. Cabeza M. [Cabeza M, et al., 2018] se encuentra el compuesto de nombre *p*-fluorobenzoato-17-(1H-benzimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dien-3-il identificado como compuesto **2a** en este trabajo. Se diseñó con una mayor selectividad por la isoenzima de tipo 1, por lo que se incluyó un grupo benzimidazol en posición 17 y se mantuvo el grupo formilo con el doble enlace en el C-16. El compuesto **2a** es capaz de bloquear el 50% de la acción *in vitro* de la SRD5A1, a una concentración

de  $40 \pm 5.0 \mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ). Este esteroide se hidroliza lentamente en agua, ocasionando una vida media corta, en el sistema biológico.

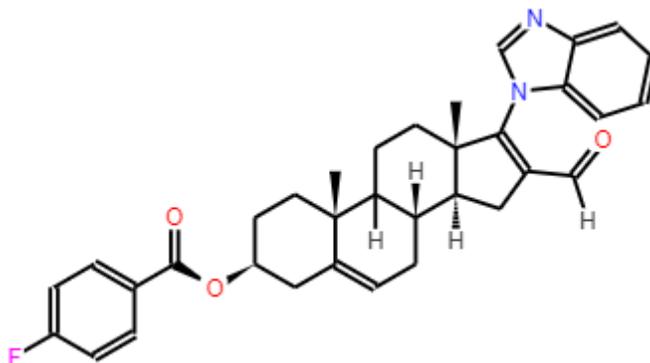
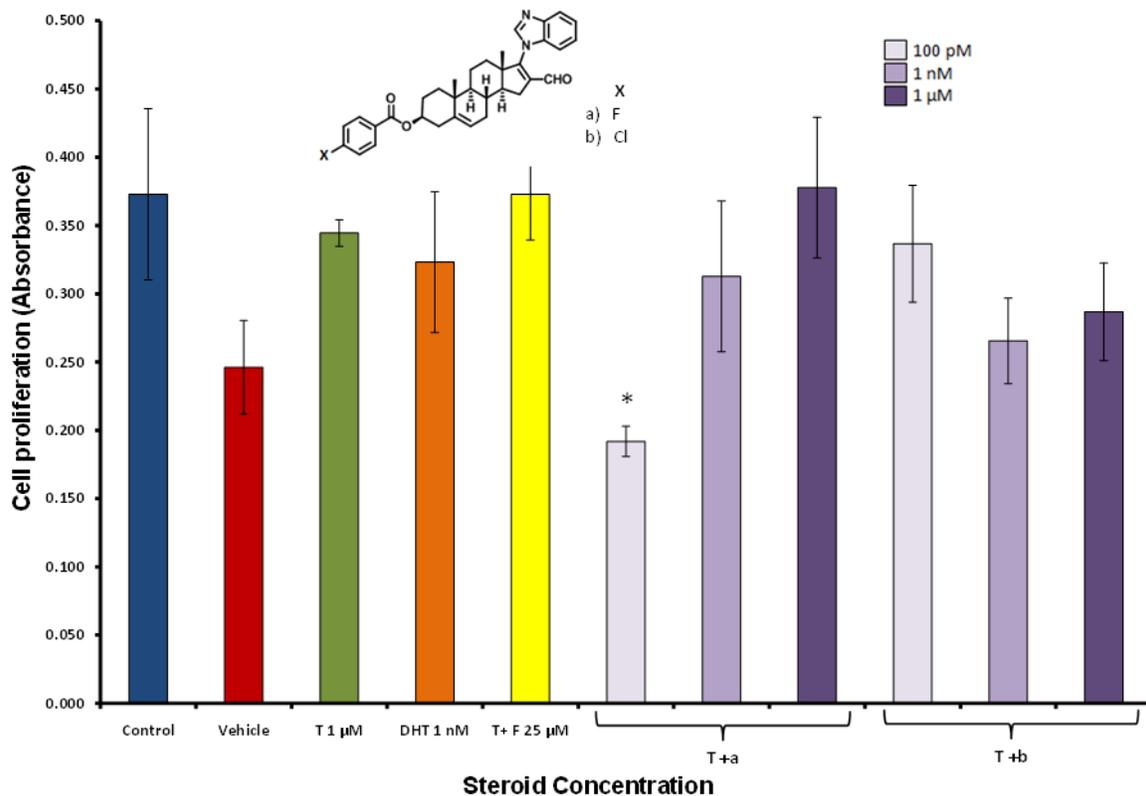


Fig. 1 Estructura del compuesto **2a**

Los ensayos de inhibición de la actividad de la SRD5A1, utilizando **2a** en diferentes concentraciones (100 pM, 1 nM, 1  $\mu\text{M}$ ) en la línea celular de cáncer de próstata humana, LNCaP, han demostrado que este compuesto (**2a**) disminuye la proliferación de células LNCaP de manera efectiva con la concentración de 100 pM como indica el Gráfico 1. Estos resultados indican la presencia de SRD5A1 en las células LNCaP, como se ha informado anteriormente [Lazier CB, *et al.*2004]



**Gráfico 1.** Viabilidad de células LNCaP bajo diferentes tratamientos con esteroides

Vehículo- propilén glicol; **T**-testosterona; **DHT**, dihidrotestosterona; **F**, finasterida; **2a**-Nuevo compuesto; **2b**, nuevo compuesto.

### Estudios en líneas celulares

Las células LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) son células prostáticas obtenidas a partir de carcinoma prostático metastásico de hueso humano. Presentan morfología epitelial, con adherencia *in vitro*, además de que crecen como células individuales y racimos sueltos. Esta línea de células es muy utilizada en la investigación sobre el cáncer. Esta línea celular se utilizará en el presente estudio para determinar los parámetros cinéticos de velocidad máxima y Km de la enzima SRD5A de tipo 1 en presencia y en ausencia de un inhibidor

esteroidal previamente sintetizado por el grupo de la Dra. Cabeza M [Cabeza M, et al., 2018] y conocido como **2a** (Figura 1).<sup>2</sup>

La cinética enzimática mide los índices de reacciones catalizados por enzimas, y estudia los factores que afectan estos índices. La ecuación de Michaelis-Menten ilustra en términos matemáticos, la relación que existe entre la velocidad de reacción inicial  $v_i$  y la concentración de sustrato. La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) es la concentración de sustrato a la cual  $v_i$  es la mitad de la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}/2$ ) alcanzable a una concentración particular de la enzima en estudio. [Kenelly y Rodwell, 2010]

Como para lograr la medición gráfica del valor numérico de  $V_{m\acute{a}x}$  y por consiguiente el cálculo de  $K_m$  se requiere a menudo de concentraciones altas de sustrato, se utiliza una forma lineal de la ecuación de Michaelis-Menten, conocido como gráfico de doble recíproco o de Lineweaver-Burck Este gráfico, permite calcular  $V_{max}$  y  $K_m$  utilizando concentraciones menores de sustrato. Asimismo, el gráfico de doble recíproco facilita la evaluación de bloqueadores competitivos clásicos. El inhibidor se une al sitio de unión del sustrato (sitio activo) bloqueando el acceso del sustrato al mismo. Las líneas que conectan los puntos experimentales, convergen en el eje y, lo que indica que cuando  $1/[S]$  se aproxima a 0,  $v_i$  es independiente de la presencia de inhibidor. Un inhibidor competitivo no tiene efecto sobre  $V_{max}$  pero aumenta el valor de la  $K_m'$ ; sin embargo el valor de la  $K_m$  aparente para el sustrato y para el bloqueador en la inhibición no competitiva estricta; no se afecta para la formación del complejo enzima-sustrato, ya que el complejo inhibidor de enzima aún puede unirse a su sustrato específico, en este caso, su eficiencia para transformar el sustrato en un producto, se ve reflejada por el valor de la  $V_{m\acute{a}x}$ , que se encuentra disminuido. [Kenelly y Rodwell, 2010]

---

<sup>2</sup> 1. ATCC (2021). Clon LNCaP. Tomado de: <https://www.atcc.org/products/crl-1740>

## Objetivo General

Determinar del tipo de inhibición que produce el esteroide **2a** (Figura 1) sobre la actividad de la enzima SRD5A1 presente en la línea celular LNCaP.

## Objetivos específicos

1. Determinar los parámetros de Km y velocidad máxima en una cinética de la enzima SRD5A1 por el método de Lineweaver-Burck utilizando T marcada con tritio.
2. Determinar los parámetros de Km y velocidad máxima en la cinética de la enzima SRD5A1 por el método de Lineweaver-Burck, utilizando T marcada con tritio en presencia de 100 pM, del compuesto **2a**.
3. Evaluar gráficamente el tipo de inhibición que produce este compuesto.

## Material y métodos

1. Obtención de la fuente de 5 $\alpha$ -reductasa de tipo 1

Las células LNCaP proporcionadas por ATCC (San Diego, CA.) se sembraron en un medio base RPMI-1640 pH 7.4 filtrado en condiciones de temperatura de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

2. Lisis celular y obtención de microsomas

La lisis celular se llevó a cabo con la finalidad de cuantificar las proteínas celulares: se aspiró el medio de cultivo de un recipiente confluyente, por duplicado se realiza un lavado con 3 mL de solución buffer PBS. Por triplicado, agregar 1 mL de tampón A (Fosfato de sodio 20 mM pH 6.5, Sacarosa 0.3 M, ditioneitol (DTT) 1 mM PMSF 1 mM). Rastrillar las células. Recolectar las células y transferirlas a un homogeneizador Potter-Elvehjem ubicado sobre la cama de hielo. Recolectar células en tubos de centrifuga, centrifugar a 27,000 rpm durante 1 hora a 0°C, retirar sobrenadante y agregar 500  $\mu$ L de tampón B (Citrato de sodio 100 mM, Cloruro de potasio 100 mM, DTT 1 mM, Lubrol PX 0.1 %, Glicina 20 % y NADPH 100 mM). Pasar el lisado a través de una aguja de 21G 5 veces e incubar en hielo

por 30 min. Recolectar sobrenadante en tubos de microcentrífuga, centrifugar a 14000 rpm durante 3 horas a 0°C. Recolectar el sobrenadante en tubos de microcentrífuga, rotularlos y congelarlos a -80°C. Determinar proteínas con método de Bradford.

### 3. Método de Bradford

El método de Bradford permite cuantificar la proteína obtenida en la lisis celular, para estandarizar el método se utiliza una curva estándar con las siguientes concentraciones de albúmina: 25 µM, 50 µM, 75 µM y 100 µM. Se emplea un espectrofotómetro ajustado a una longitud de onda de 595 nm.<sup>3</sup>

### 4. Características de la T radiomarcada.

La testosterona [ $H^3$ ]T con una actividad específica: 95 Ci/mmol proporcionada por Perkin Elmer Life and Analytical Sciences se utilizó en este estudio. El Laboratorio de Hormonas donde se realizó este estudio cuenta con el permiso de compra y uso de material radiactivo. Licencia N°A00.200/1259/2019 proporcionada por la Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardas.

### 5. Preparación de medios de incubación.

Para determinar los valores de velocidad máxima ( $V_{max}$ ) y  $K_m$  de la SRD5A1, agregar en tubos de ensayo una concentración 2 nM de T [ $H^3$ ] además de diferentes concentraciones de T no marcada (fría) disueltos en etanol. Añadir 10 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) y dejar evaporar el solvente de disolución.

Para determinar el tipo de inhibición que produce el compuesto **2a** (Fig.1). Preparar una serie de tubos de la misma forma que se indicó en el párrafo anterior, pero agregar 100 nL del compuesto **2a** a una concentración de 1 µM. Agregar a ambas series 10 µL de NADPH 200 mM. Adicionar solución tampón de fosfatos 20 mM pH 7.5 para completar 100 µL. Comenzar la reacción agregando 30 µg (adicionar la cantidad de proteína) obtenida por extracción de las células LNCaP.

---

<sup>3</sup> <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20METODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACION%20DE%20PROTEINAS.pdf>

## 6. Incubación

Incubar ambas series de tubos a una temperatura de 37.5°C durante 15 minutos en una incubadora Julabo SW22. Detener la reacción con 100 µL de diclorometano.

## 7. Extracción

Agitar en vortex durante 1 min, centrifugar a 3700 rpm durante 5 min. Centrifugadora Microfuge 22 R Centrifuge (Beckman-Coulter).

Extraer el diclorometano (fase inferior) y colocar en tubos cónicos; Realizar esta operación por 5 veces más. Evaporar el solvente a sequedad.

## 8. Identificación de la DHT)

Adicionar 100 µL de metanol a los tubos cónicos y aplicar en cromatoplasas Merck, (HPTLC Silica gel 60 F254, 20x 20) con ayuda de jeringas gotas de los extractos obtenidos en cada tubo, utilizando un autospotter (Romer TLc. Analtech Inc.)

Aplicar en ambos lados de las placas en tres carriles diferentes 5 µL de T, DHT y la combinación de ambos.

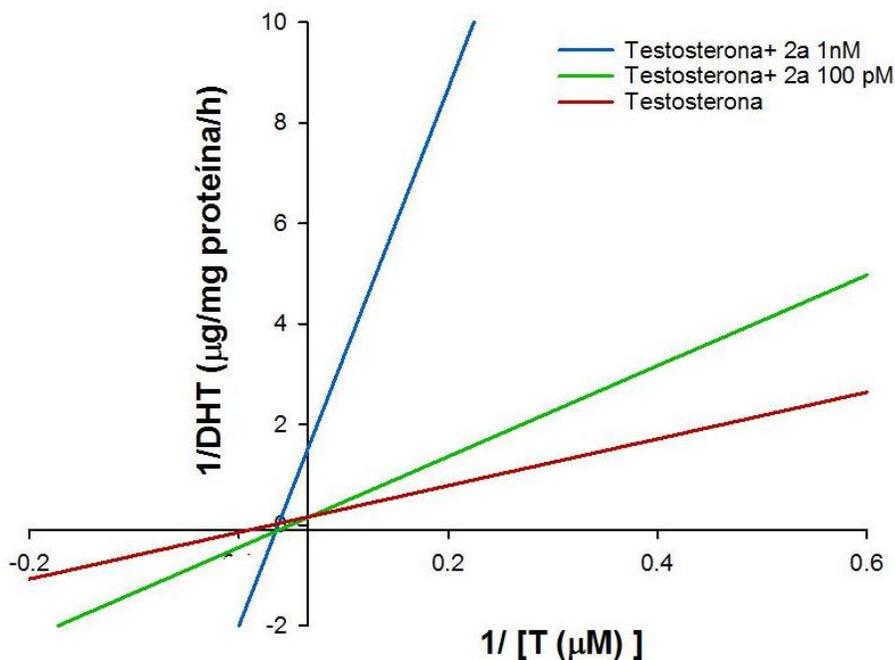
Secar las placas al medio ambiente durante 30 minutos.

Eluir las cromatoplasas en un sistema de solventes de cloroformo: acetona =9:1 por 2 horas aproximadamente.

Retirar y secar las placas a temperatura ambiente, revelar los estándares de T con ayuda de lámpara de luz UV a 254 nm. Leer en bioescaner (Bioscan 2000) imprimir los gráficos y determinar los valores de Rf. Comparar los valores de Rf obtenidos con los determinados para los estándares de referencia.

Promediar las replicar y realizar un análisis gráfico por el método de Lineweaver-Burck.

## Resultados



### Valores de la cinética:

$V_{max}$ -7.7 µg /mg de proteína/h de DHT formada

$K_m$  Testosterona=8.3 µM

$K_m$  Testosterona + **2a** 100 pM= 26.3 µM

$K_m$  Testosterona + **2a** 1 nM = 26.3 µM

$V_{max}$  (Testosterona +**2a** 1nM)=0.7 µg /mg de proteína/h de DHT formada

**Gráfico 2.** Tipo de inhibición del compuesto **2a** sobre la enzima SRD5A1

### Análisis de resultados y conclusiones

El gráfico 2 de Lineweaver-Burck, muestra que el esteroide **2a** a una concentración de 100 pM, produce una inhibición de tipo competitivo, sobre la actividad de la enzima SRD5A1, presente en las células LNCaP. Este hecho se evidencia por los valores cinéticos de  $K_m$  y  $V_{max}$  determinados sobre este gráfico.

El gráfico 2 demuestra que la línea correspondiente al inhibidor, así como la correspondiente al sustrato sin inhibidor, se cruzan en el eje de las Y, lo que indica que tienen el mismo valor de  $V_{max}$ . Este valor resultó ser igual a 7.7 µg/mg de proteína/h de DHT formada. Mientras que los valores de  $K_m$  difirieron

enormemente entre las dos líneas. La  $K_m$  determinada en ausencia del inhibidor fue de  $8.3 \mu\text{M}$  y en presencia de **2a** fue igual a  $26.3 \mu\text{M}$ . Estos valores indican que se requiere de mayor cantidad de T, en presencia de **2a**, para que la enzima produzca la misma cantidad de DHT, que en su ausencia.

Estos resultados indican que la T y el inhibidor compiten por el sitio activo de la enzima; es por ello que se observan diferentes valores de  $K_m$  en presencia y en ausencia del inhibidor.

Empero, cuando la concentración de **2a** se aumenta a  $1 \text{ nM}$ , el gráfico 2 muestra que la línea no sigue la cinética de Michaelis-Menten. La determinación de los parámetros cinéticos de esta línea indicó un valor de  $V_{\text{max}} = 0.7 \mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína/ h de DHT y un valor de  $K_m = 23.6 \mu\text{M}$ . A pesar de que el valor de  $K_m$  es igual al que se determinó en presencia de  $100 \text{ pM}$  de **2a**, el valor de la velocidad de producción de DHT es muy diferente, por esa razón no se trata de una inhibición de tipo competitivo. Cuando se incremento la concentración de **2a** a  $1 \mu\text{M}$  no se presentó ningún tipo de inhibición (datos no mostrados).

El gráfico 1 indica que el esteroide **2a** en concentración de  $1 \text{ nM}$  inhibe ligeramente la proliferación celular, mientras que a  $100 \text{ pM}$ , esta inhibición tiene valores significativos.

## Conclusión

En conclusión, el compuesto **2a** produce una inhibición de tipo competitivo sobre la actividad de la enzima  $5\alpha$ -reductasa presente en las células LNCaP; pero solamente a una concentración de  $100 \text{ pM}$ . Cuando esta concentración se aumenta ( $1 \text{ nM}$ ) se produce una inhibición que no sigue la cinética de Michaelis-Menten. Sin embargo, en presencia de  $1 \mu\text{M}$  de **2a**, la enzima no sufre inhibición. Estos datos coinciden con los ensayos obtenidos con las células LNCaP.

## Referencias

1. Azzouni F, Godoy A, Li Y, Mohler J. The 5-alpha-reductase isozyme family: A review of basic biology and their role in human diseases. *Adv Urol.* 2012; 530121.
2. Bamodu OA, Tzou KY, Lin CD, Hu SW, Wang YH, Wu WL, Chen KC, Wu CC. Differential but Concerted Expression of HSD17B2, HSD17B3, SHBG and SRD5A1 Testosterone Tetrad Modulate Therapy Response and Susceptibility to Disease Relapse in Patients with Prostate Cancer. *Cancers (Basel).* 2021 Jul 12;13(14):3478. doi: 10.3390/cancers13143478. PMID: 34298692; PMCID: PMC8303483.
3. Bratoeff E, García P, Heuze Y, Soriano J, Mejía A, Labastida AM, Valencia N, Cabeza M. Molecular interactions of progesterone derivatives with 5 $\alpha$ -reductase types 1 and 2 and androgen receptors. *Steroids* 2010; 75: 499-505.
4. Cabeza M, Bratoeff E, Ramírez E, Flores E. Mecanismo de acción de antiandrógenos esteroidales. UAM Xochimilco. México. 2004.
5. Ganong, W. F. Gónadas: desarrollo y función del sistema reproductor. En: *Fisiología médica*, México: Editorial El Manual Moderno; 2006, pp.339-407.
6. Kennelly P., Rodwell V. Enzimas: cinética. En *Bioquímica ilustrada 29ª edición*. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.; 2010.
7. Langlois VS, Zhang D, Cooke GM, Trudeau VL. Evolution of steroid-5 $\alpha$ -reductases and comparison of their function with 5 $\beta$ -reductase. *General and Comparative Endocrinology.* 2010; 166(3):489–497.
8. Lazier CB, Thomas Ln, Douglas Rc, Vessey JP, Rittmaster RS. Dutasteride, the Dual 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitor, Inhibits Androgen Action and Promotes Cell Death In The Lncap Prostate Cancer Cell Line. *The prostate.* 2004; 58:130-144.

9. Occhiato EG, Guarna A, Danza G, Serio M. Selective non-steroidal inhibitors of 5 $\alpha$ -reductase type 1. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2004;88(1):1–16.
10. Pérez A, Muñoz S, Jiménez I, Torres R. Diagnóstico genético de hipospadia pseudovaginal perineoescrotal en paciente adolescente. *Actualidad médica*. 2020; 810: 125-127.
11. Russell DW, Wilson JD. Steroid 5 $\alpha$ -reductase: two genes/two enzymes. *Annual Review of Biochemistry*. 1994;63:25–61
12. Siiteri PK, Wilson JD. Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1974;38(1):113–125.