

Universidad Autónoma Metropolitana

“Unidad Xochimilco”

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Proyecto específico: “Efecto de compuestos no esteroidales
sobre la proliferación de células LNCaP”

Proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados
con la salud


Etapas: Desarrollo de reactivos analíticos y de diagnóstico

Presenta: Eduardo Salazar García 2172030789

Asesora: Dra. Marisa Cabeza Salinas

Lugar de realización: Laboratorio de Hormonas G-006,
UAM-Xochimilco

22 de Marzo-23 de Octubre del 2022



Vo. Bo. Dra. Marisa Cabeza Salinas

No. económico 2683

CONTENIDO

<i>Introducción</i>	2
<i>Marco teórico</i>	3
<i>Objetivos</i>	5
<i>Objetivo general</i>	5
<i>Objetivos específicos</i>	5
<i>Metodología</i>	6
<i>Cultivo de células LNCaP</i>	6
<i>Tripsinización, conteo celular y resiembra</i>	7
<i>Determinación de la viabilidad celular por ensayo de MTT</i>	10
<i>Resultados y discusión</i>	11
<i>Conclusiones</i>	15
<i>Referencias:</i>	16

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata es una de las principales causas de mortalidad a nivel global. En México es el segundo tipo de cáncer más diagnosticado en los hombres lo que lo hace un problema importante en salud pública [Basulto, *et al.*, 2021; Beltrán, *et al.*, 2022].

La terapia mediante castración quirúrgica es un tratamiento utilizado en todas las etapas del cáncer de próstata. Sin embargo, los pacientes podrán desarrollar cáncer de próstata resistente a la castración, lo que requerirá terapias adicionales, que bloqueen el eje de los andrógenos. Este hecho subraya la importancia de los andrógenos en la progresión de la enfermedad [Gamat y Mcneel, 2017].

Se ha descrito la relación entre el cáncer de próstata y la disminución de la testosterona (T), en hombres mayores de 40 años, debido a que los niveles de T disminuyen con el paso de los años. La dihidrotestosterona (DHT) es el metabolito reducido de la testosterona que se forma por acción de las enzimas 5 α -reductasa. Intracelularmente la T se convierte en DHT, un andrógeno más potente que tiene de 2-5 veces más afinidad por el receptor de andrógenos (RA), lo que ocasiona el crecimiento prostático [Batista y Mendonca, 2020].

Por el contrario, las enzimas AKR1C1 y AKR1C2 (aldo-ceto reductasas) catalizan la inactivación de la DHT convirtiéndola en 3 α -androstanoediol (3 α -diol) y 3 β -androstanoediol (3 β -diol) que son andrógenos inactivos [Cabeza, *et al.*, 2021].

Cabeza *et al.* Identificaron a los compuestos 2-amino-3-yodonaftaleno-1,4-diona (**2**) y 2-(yodoamino)-3-metilnaftaleno-1,4-diona (**4**) como inhibidores de la actividad de las enzimas AKR1C1 y AKR1C2. Este hecho fue respaldado por la disminución de la formación *in vitro* de 3 α y 3 β -androstanoedoles, que gradualmente bajó a medida que aumentaban las dosis de los compuestos **2** y **4**. Sin embargo, no se conoce el efecto de **2** y **4** sobre la proliferación de células cancerosas LNCaP [Cabeza, *et al.*, 2021].

Es por eso que este trabajo tuvo por objetivo determinar el efecto de los compuestos **2** y **4** sobre la proliferación de células LNCaP en cultivos. LNCaP, es una línea celular de cáncer metastásico prostático que se desarrolla en los huesos de humanos. Son células adherentes que crecen en agregados y como células individuales. Son distribuidas por ATCC en México por Científica Senna.

MARCO TEÓRICO

El cáncer de próstata es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los hombres, lo que lo posiciona como un problema importante en salud pública a nivel global. En 2018 se notificaron 1, 276,106 nuevos casos, cifra que aumentó para el año 2019 a 1, 400, 000. En México, el cáncer de próstata es el segundo tipo de cáncer más diagnosticado y se estima que es la segunda causa de muerte en hombres [Basulto, *et al.*, 2021; Beltrán, *et al.*, 2022].

Se ha descrito la relación entre la testosterona (T) y el cáncer de próstata desde hace más de 70 años. Se estima que la deficiencia de T afecta hasta al 25% de los hombres mayores de 40 años, debido a que los niveles de T disminuyen con la edad [Kaplan y Golla, 2017].

La T es el principal andrógeno circulante en los hombres y se sintetiza a partir de colesterol, un esteroide de 27 carbonos que se metaboliza por vía enzimática hasta la formación de esteroides de 19 carbonos, que son los andrógenos [Kaplan y Golla, 2017].

La dihidrotestosterona (DHT) es el metabolito reducido de la T que se forma en los tejidos dependientes de andrógenos por acción de las enzimas 5 α -reductasa de tipo 1 y 5 α -reductasa de tipo 2 (SRD5A1 y SRD5A2), que catalizan esta reacción. Las enzimas SRD5A1 y SRD5A2 se expresan en diferentes tejidos, la de tipo 1 se expresa en el hígado, la piel, el cuero cabelludo y la próstata, mientras que la de tipo 2 se expresa la próstata, las vesículas seminales, el epidídimo y en el hígado

[Batista y Mendonca, 2020]. La síntesis también puede ocurrir a partir de otros precursores que son andrógenos más débiles, pero son también importantes en algunos tejidos, p. ej. en la próstata. Por el contrario, las enzimas AKR1C1 y AKR1C2 catalizan la inactivación de la DHT convirtiéndola en 3 α -androstanoediol (3 α -diol) y 3 β -androstanoediol (3 β -diol) que son andrógenos inactivos [Cabeza, *et al.*, 2021].

La DHT intracelular es un agonista androgénico más potente que la T, y su presencia en algunos tejidos, como la próstata, es necesaria para su desarrollo. También es importante para el desarrollo fetal de los órganos sexuales masculinos [Swerdloff, *et al.*, 2017; Cabeza, *et al.*, 2021]. La T y la DHT se unen al receptor de andrógenos (RA), y la activación de este complejo, da como resultado una regulación ascendente o descendente de la expresión de los genes diana [Cabeza, *et al.*, 2021].

Cabeza *et al.* Identificaron a los compuestos 2-amino-3-yodonaftaleno-1,4-diona (**2**) y 2-(yodoamino)-3-metilnaftaleno-1,4-diona (**4**) como inhibidores de la actividad de las enzimas AKR1C1 y AKR1C2. Este hecho fue respaldado por la disminución de la formación *in vitro* de 3 α y 3 β -androstanoedios, que gradualmente bajó a medida que aumentaban las dosis de los compuestos **2** y **4**. Sin embargo, no se conoce el efecto de **2** y **4** sobre la proliferación de células cancerosas LNCaP [Cabeza, *et al.*, 2021].

Las células LNCaP son una línea celular establecida en 1977 a partir de una metástasis en los ganglios linfáticos de un paciente de 50 años de origen caucásico con diagnóstico confirmado de carcinoma de próstata metastásico. De las líneas celulares de cáncer de próstata humano, LNCaP, son las únicas que expresan el receptor de andrógenos (RA) y responden a los andrógenos, estas características les confieren a las células LNCaP la capacidad para modelar la progresión del cáncer de próstata [Abate y Núñez, 2022].

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto de los compuestos **2**, **4**, **M3** y **M5** sobre la proliferación de células LNCaP.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar células de la línea LNCaP y mantener los cultivos.
- Tripsinizar y contar las células de la línea LNCaP
- Sembrar las células de la línea LNCaP en pozos pequeños.
- Aplicar a cada pocillo tratamientos: con DHT y/o **2**, **4**, Tabla 1; **M3** o **M5**, Tabla 1.1.
- Determinar la viabilidad celular en los controles y en los experimentales utilizando la prueba espectrofotométrica ($\lambda=570$ nm) de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio).

Tabla 1. Estructura, propiedades físicas y químicas, y actividad de los compuestos **2** y **4** como inhibidores.

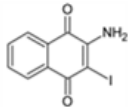
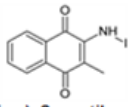
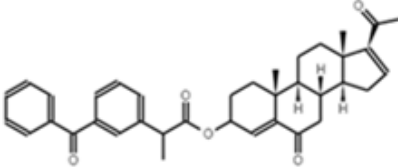
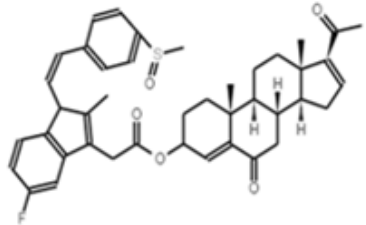
Estructura	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Log del valor P	Inhibición de la actividad de 3β -HSD IC ₅₀ [M]	Inhibición de la actividad de 3α -HSD IC ₅₀ [M]	ARU (afinidad relativa de unión) AR
 2-amino-3-yodonaftaleno-1-,4-diona (2)	C ₁₀ H ₆ NO ₂ 299.1	170	1.60	4.2x10 ⁻⁷	3.0x10 ⁻⁷	No activa
 2-(yodoamino)-3-metilnaftaleno-1,4-diona (4)	C ₁₁ H ₈ NO ₂ 313.1	158-160	1.92	1.95x10 ⁻⁶	1.52x10 ⁻⁶	No activa

Tabla 1.1. Estructura, propiedades físicas y químicas, y actividad de los compuestos **M-3** y **M-5** como inhibidores.

Estructura	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Inhibición de la actividad de SRD5A2 IC ₅₀ (µM)
 <p style="text-align: center;">M-3</p>	<p style="text-align: center;">C₃₇H₄₀O₅ 564.71</p>	<p style="text-align: center;">79-81</p>	<p style="text-align: center;">15.8</p>
 <p style="text-align: center;">M-5</p>	<p style="text-align: center;">C₄₂H₄₅FO₅S 680.87</p>	<p style="text-align: center;">88-90</p>	<p style="text-align: center;">6.1</p>

METODOLOGÍA

CULTIVO DE CÉLULAS LNCaP

Las células LNCaP se mantuvieron hasta su confluencia, con medio RPMI-1640 conteniendo rojo de fenol, complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico (AB), a una temperatura de 37°C y con un porcentaje de CO₂ del 5%. Para lograr el crecimiento óptimo de las células LNCaP, se realizaron cambios de medio de cultivo tres veces por semana de la siguiente forma:

1. Se aspiró el medio de cultivo con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío.
2. Se agregaron 3 mL de medio de cultivo nuevo a la caja.

3. Se incubaron en una incubadora symphony a 37°C y CO₂ al 5%.

Nota* El procedimiento se realizó en la campana de flujo laminar, la cual previamente se limpió y se dejó con luz UV por durante al menos 20 minutos.

Cuando el cultivo celular se visualizaba confluyente, se procedió a adaptar las células a un medio RPMI-1640 sin rojo de fenol (s/Rf) y sin AB, posteriormente se revisaron para asegurar que se encontraban libres de contaminación y con una confluencia igual o mayor a la antes vista.

Una vez asegurado que las células se encontraban libres de contaminación y con una confluencia igual o mayor, se procedió a realizar los pasos de tripsinización, conteo celular y resiembra.

TRIPSINIZACIÓN, CONTEO CELULAR Y RESIEMBRA

Para llevar a cabo la **tripsinización** se realizaron los siguientes pasos:

1. Se aspiró el medio de cultivo con una pipeta Pasteur.
2. Se lavó con 2 mL de buffer fosfato salino (PBS) y se aspiró el contenido de la caja (este paso se realiza por duplicado).
3. Se adicionaron 600 µL de PBS y 400 µL de tripsina, distribuyendo el volumen de forma homogénea por toda la superficie de la caja.
4. Se incubó durante 5 minutos a 37°C y CO₂ al 5%.
5. Se sacó de la incubadora y se le adicionaron 2 mL de medio de cultivo preparado s/Rf y S/AB, para inactivar la tripsina.
6. Se pasó el contenido de la caja a un tubo cónico de 15 mL con una micropipeta.
7. El resto del contenido de la caja, se enjuagó con 2 mL más de medio s/Rf y s/AB y también se pasó al tubo cónico utilizando una micropipeta.
8. Se centrifugó el tubo a 1200 rpm durante 6 minutos a 37°C.
9. Se desechó el sobrenadante.
10. Se resuspendieron las células en 3 mL de medio s/Rf y s/AB.

Posterior a estos pasos se realizó el **conteo celular**, y se sembraron 30,000 células en cada pozo de cada microplaca. El conteo se realizó como se describe en los pasos siguientes:

1. Se preparó una dilución de células, colocando 10 μL de células cosechadas (solución del paso 10 de la tripsinización), 40 μL de PBS y 50 μL de azul de tripano.
2. Se agitó la disolución.
3. Se limpió la cámara de Neubauer perfectamente y posteriormente sin tocar la cámara se le colocó un cubreobjetos en la parte central (entre las ranuras) de la misma.
4. Se agregaron 10 μL de la disolución en cada una de las dos muescas para que se distribuyera por capilaridad.
5. Se leyeron los cuatro cuadrantes de los extremos superior derecho e izquierdo, así como los de la parte inferior, de izquierda a derecha de las dos cámaras, para obtener una relación del método.
6. Se calculó la concentración de células totales de la caja.

Una vez realizado el conteo celular, se procedió a **sembrar** en los pozos de cada microplaca, como se describe a continuación:

1. Se colocó el volumen calculado en el paso 6 del procedimiento de conteo celular, de la solución de células resuspendidas, en cada uno de los pozos a utilizar.
2. Se agregó el volumen faltante de medio de cultivo preparado s/Rf y s/AB para tener un volumen final de 100 μL en cada uno de los pozos a utilizar.
3. El resto de la solución de células resuspendidas, se sembró en la misma caja.
4. La caja y las microplacas se introdujeron en la incubadora a 37°C con CO₂ al 5%.
5. Los pozos de las microplacas se revisaron, para verificar que las células estuvieran libres de contaminación y se encontraran adheridas a la superficie de la microplaca.

6. Una vez verificado el paso 5, se le cambió el medio a cada pozo con medio preparado s/Rf y s/AB y se metió a incubar en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Los tratamientos que se presentan en las tablas 2 y 3, se agregaron a los pocillos de las placas conteniendo las células, siempre por cuadruplicado. Los compuestos agregados se disolvieron antes en propilen glicol que alcanzó una concentración en la solución final de 1.5%.

Tabla 2. Tratamientos aplicados a las células de cáncer metastásico de próstata LNCaP. Compuestos: **2** y **4**, DHT, ácido flufenámico, como estándar de referencia, y controles.

Tratamiento	[Tratamiento/500µL]	Vol. Solución (µL)	Vol. Propilenglicol (µL)	Vol. Medio (µL)	DHT (1nM) (µL)	Ác. Flufenámico (1nM) (µL)
Vehículo	-	-	12.5	487.5	-	-
Control 1	-	-	12.5	487.5	145.22 sol. D	-
Control 2	-	-	12.5	487.5	145.22 sol. D	14.1 sol. D
Control 3	-	-	12.5	487.5	-	14.1 sol. D
JP01B (2)						
100 pM	14.95 pg	15 sol. D	12.5	487.5	145.22 sol. D	-
1 nM	149.55 pg	1.5 sol. C	12.5	487.5	145.22 sol. D	-
1 µM	149.55 ng	15 sol. B	12.5	487.5	145.22 sol. D	-
JP03 (4)						
100 pM	15.65 pg	16 sol. D	12.5	487.5	145.22 sol. D	-
1 nM	156.55 pg	1.6 sol. C	12.5	487.5	145.22 sol. D	-
1 µM	156.55 ng	16 sol. B	12.5	487.5	145.22 sol. D	-
JP01B (2)						
100 pM	14.95 pg	15 sol. D	12.5	487.5	-	-
1 nM	149.55 pg	1.5 sol. C	12.5	487.5	-	-
1 µM	149.55 ng	15 sol. B	12.5	487.5	-	-
JP03 (4)						
100 pM	15.65 pg	16 sol. D	12.5	487.5	-	-
1 nM	156.55 pg	1.6 sol. C	12.5	487.5	-	-
1 µM	156.55 ng	16 sol. B	12.5	487.5	-	-

Tabla 3. Tratamientos aplicados a las células de cáncer metastásico de próstata LNCaP. Derivados esteroidales **M3**, **M5**. Testosterona, propilenglicol (vehículo), Finasterida y sus combinaciones como controles.

Tratamiento	[Tratamiento/ 500 µL]	Vol. Solución (µL)	Vol. Propilenglicol (µL)	Vol. Medio (µL)	Testosterona 1 µM (µL)	Finasterida 8 nM (µL)
Vehículo	-	-	12.5	487.5	-	-
Control 1	-	-	12.5	487.5	14.42 sol. B	-
Control 2	-	-	12.5	487.5	14.42 sol. B	14.90 sol. C
Control 3	-	-	12.5	487.5	-	14.90 sol. C
M3						
100 pM	28.24 pg	28.24 sol. D	12.5	487.5	14.42 sol. B	-
1 nM	282.4 pg	2.82 sol. C	12.5	487.5	14.42 sol. B	-
1 µM	282.4 ng	28.24 sol. B	12.5	487.5	14.42 sol. B	-
M5						
100 pM	34.04 pg	34.04 sol. D	12.5	487.5	14.42 sol. B	-
1 nM	340.4 pg	3.40 sol. C	12.5	487.5	14.42 sol. B	-
1 µM	340.4 ng	34.04 sol. B	12.5	487.5	14.42 sol. B	-

Nota * Los datos se presentan como el volumen agregado a cada muestra. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado.

DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR POR ENSAYO DE MTT

Después se realizó la prueba de viabilidad celular con MTT. Los valores de absorbancia se obtuvieron a una longitud de onda de 570 nm de la siguiente forma:

1. Se aspiró el contenido de cada pozo de las microplacas.
2. Se lavó cada uno de los pozos con 150 µL de solución salina equilibrada de Hank (HBSS, por sus siglas en inglés) y se aspiró el contenido (este paso se realizó por duplicado).
3. Se agregaron 100 µL de medio preparado s/Rf y s/AB a cada pozo y 10 µL de solución MTT 12 mM.
4. Se metieron a incubar durante 4 h a 37°C con CO₂ al 5%.
5. Se extrajo el contenido líquido de cada pozo con una micropipeta.

6. Se agregaron 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril para diluir completamente el contenido de cada pozo de las microplacas.
7. Se leyeron cada una de las microplacas a 570 nm a 36°C utilizando un lector de microplacas UV-vis (Biotek epoch 2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

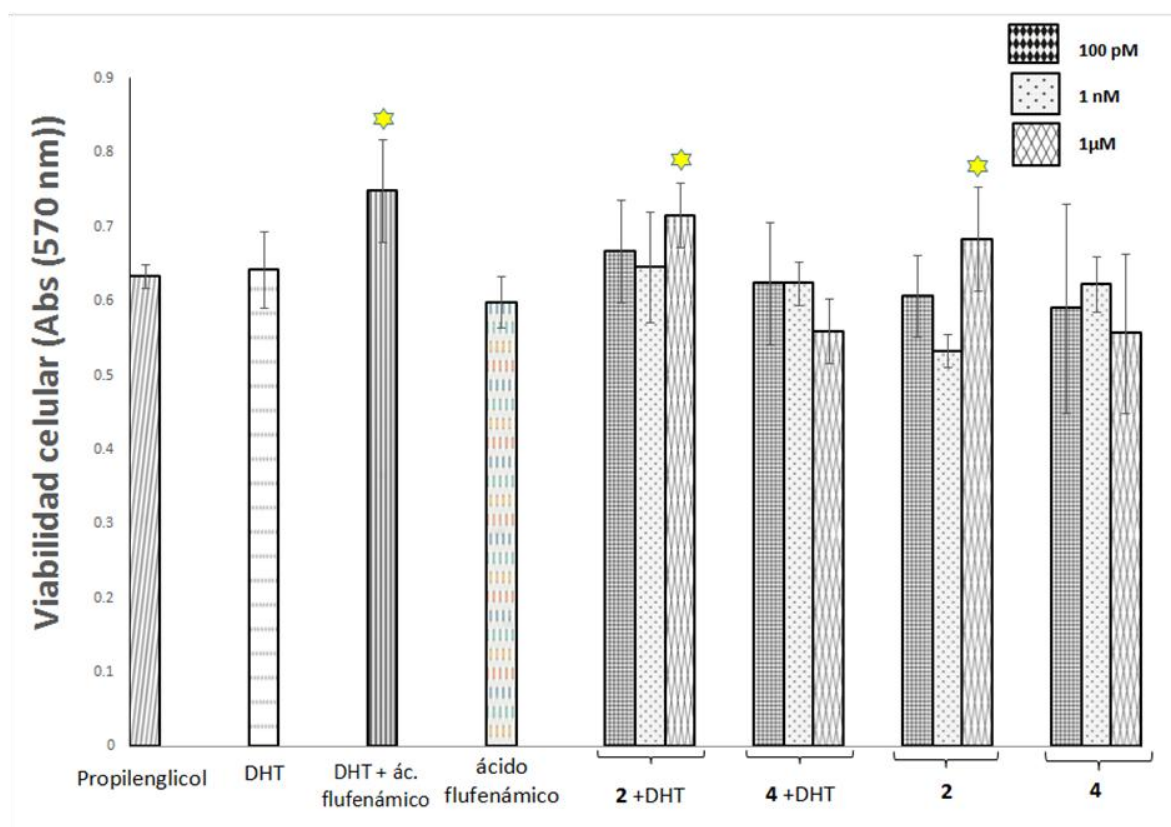
Compuestos 2 y 4

Los resultados de viabilidad celular obtenidos con los tratamientos **2** y **4** en diferentes concentraciones se presentan en la tabla 4, así también los obtenidos con los controles de propilén glicol, DHT, y ácido flufenámico, así como de sus combinaciones. También se presentan los promedios de cada tratamiento, con las desviaciones estándar para realizar una comparación estadística de los resultados.

Tabla 4. Promedio de la viabilidad de las células LNCaP \pm error estándar de la media, obtenida después de los tratamientos con dihidrotestosterona (DHT) más los compuestos a probar, por el método de MTT descrito en la sección de métodos. El ácido flufenámico se utilizó como estándar de referencia de la inhibición de la actividad de las enzimas AKR1C.

Tratamiento	Absorbancia a una λ de 570 nm \pm error estándar
Vehículo (propilén glicol al 1.5%)	0.633 \pm 0.02
DHT (1 nM)	0.643 \pm 0.05
DHT+ Ac. Flufenámico	0.749 \pm 0.07
Ac. Flufenámico	0.599 \pm 0.034
DHT + 2 (100 pM)	0.667 \pm 0.069
DHT + 2 (1 nM)	0.646 \pm 0.07
DHT + 2 (1 μ M)	0.716 \pm 0.04
DHT + 4 (100 pM)	0.624 \pm 0.08
DHT + 4 (1 nM)	0.624 \pm 0.03
DHT + 4 (1 μ M)	0.560 \pm 0.044
2 (100 pM)	0.607 \pm 0.055
2 (1 nM)	0.533 \pm 0.022
2 (1 μ M)	0.684 \pm 0.070
4 (100 pM)	0.591 \pm 0.14
4 (1 nM)	0.623 \pm 0.04
4 (1 μ M)	0.557 \pm 0.107

Los datos de la tabla 4 indican que el compuesto **2** tuvo un efecto similar al del estándar del ácido flufenámico, en presencia de DHT, gráfica 1. Asimismo, hubo un aumento en la viabilidad celular en el control con DHT + ácido flufenámico. Este mismo comportamiento se determinó en presencia del compuesto **2** en la más alta concentración cuando se aplicó junto con DHT, gráfica 1. En el tratamiento con **2** sin DHT a la concentración de 1 nM, se presentó una disminución de la viabilidad celular. En el caso de los demás tratamientos no se presentaron resultados con diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 1. Viabilidad de cultivos de células LNCaP bajo diferentes tratamientos. La presencia de ácido flufenámico más dihidrotestosterona (DHT) incrementó la viabilidad celular. Esta viabilidad también se incrementó en presencia de **2** en las mayores concentraciones.

La estrella indica que existe una diferencia significativa $P < 0.05$ vs DHT. Se ha demostrado que los compuestos **2** y **4** son potentes inhibidores de las enzimas AKR1C1 y AKR1C2, en la misma forma que el ácido flufenámico [Cabeza, *et al.*,

2021]. Estos resultados indican que **2** y **4** tuvieron un comportamiento semejante al estándar de ácido flufenámico utilizado sobre la viabilidad de las células LNCaP.

Compuestos de la serie M (M-3 y M-5)

Se presentan los resultados de viabilidad de células LNCaP, obtenidos con los compuestos **M-3**, **M-5**, T, finasterida y vehículo, medidos a una longitud de onda de 570 nm, tabla 5.

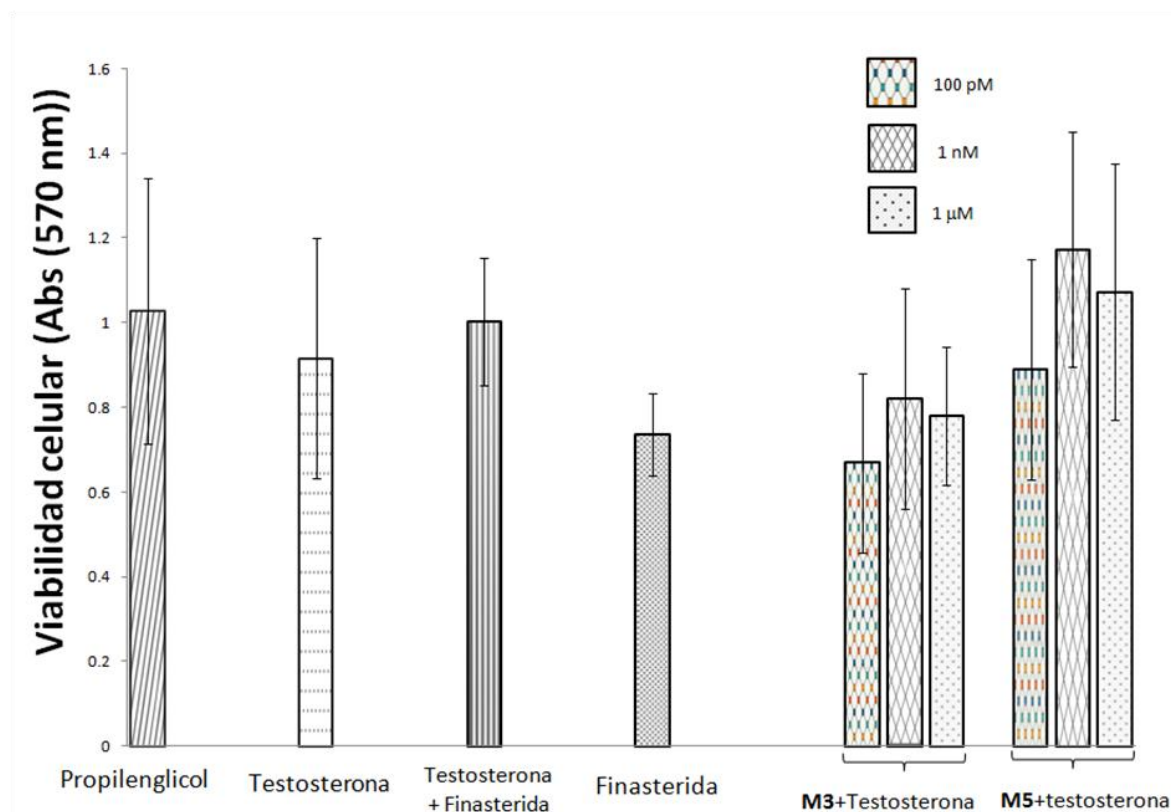
Tabla 5. Promedio de la viabilidad de las células LNCaP \pm error estándar de la media, obtenida después de los tratamientos con T, finasterida, vehículo, **M-3** y **M-5** por el método de MTT. La finasterida se utilizó como estándar de referencia de la inhibición de la actividad de las enzimas SRD5A.

Tratamiento	Absorbancia a una λ de 570 nM \pm error estándar
Vehículo (propilén glicol al 1.5%)	1.028 \pm 0.313
Testosterona	0.916 \pm 0.283
Testosterona + finasterida	1.002 \pm 0.151
Finasterida	0.735 \pm 0.097
M-3 (100 pM)	0.669 \pm 0.211
M-3 (1 nM)	0.820 \pm 0.261
M-3 (1 μ M)	0.780 \pm 0.162
M-5 (100 pM)	0.890 \pm 0.261
M-5 (1 nM)	1.172 \pm 0.277
M-5 (1 μ M)	1.072 \pm 0.302

Los datos de la tabla 5 indican que se obtuvieron valores similares en la viabilidad celular para el caso de las células tratadas con vehículo, T y T + finasterida, gráfica 2.

Para las células tratadas con finasterida, se observó una disminución de la viabilidad, debido a que es un inhibidor de la enzima SRD5A presente en las células LNCaP; donde inhibe la conversión de T a DHT, reduciendo el tamaño de la próstata y los niveles séricos del antígeno prostático [Wang *et al.*, 2020].

Para el caso de las células con el compuesto **M-3** + T, se observó una disminución de la viabilidad celular en las tres concentraciones probadas, siendo mayor a la concentración de 100 pM, gráfica 2. Para el caso de **M-5** + T, se observaron resultados de viabilidad celular muy parecidos a los valores de los controles (T y T + finasterida), así como a los obtenidos con el vehículo. Con estos resultados se comprueba que el compuesto **M-5** no tiene relación directa sobre la proliferación de las células LNCaP y tampoco inhibe su crecimiento.



Gráfica 2. Viabilidad de cultivos celulares LNCaP bajo tratamientos del grupo de compuestos **M-3** y **M-5**. Se observó una disminución de la viabilidad celular por parte del compuesto **M-3** sobre la viabilidad de las células, presentando valores parecidos a los obtenidos con el control de finasterida.

Las células bajo el tratamiento con **M-3** presentaron una disminución en la viabilidad celular. Es decir, **M-3** presentó actividad inhibitoria, sin embargo, no tuvo diferencias significativas con los demás compuestos, por esta razón no se puede

asegurar su papel como inhibidor de las células LNCaP. Por tal motivo, se recomienda poner a prueba este compuesto en futuros experimentos.

CONCLUSIONES

1. Se logró cumplir con los objetivos planteados en este trabajo.
2. Los compuestos **2** y **4** aumentaron la viabilidad celular en comparación con el tratamiento con DHT. Siendo el compuesto **2** el que aumentó la proliferación en forma similar al estándar de ácido flufenámico.
3. El esteroide **M-3**, inhibió el crecimiento de las células LNCaP.

REFERENCIAS:

1. Abate, C., Núñez, F. Establishment of the LNCaP Cell Line - The Dawn of an Era for Prostate Cancer Research. *Cancer Res.* 2022 ; 82(9):1689-1691.
2. Basulto, M., Ojeda, J., Velueta, I., Cueto, G., Flores, J., González, M. Prostate cancer early detection among primary care physicians in Mexico: A cross-sectional study. *Cir.* 2021; 89(2):163-169.
3. Batista, R., Mendonca, B. Integrative and Analytical Review of the 5-Alpha-Reductase Type 2 Deficiency Worldwide. *Appl Clin Genet.* 2020; 13:83-96.
4. Beltrán, A., Fernández, A., Moreno, M., Contreras, A., Madueña, J., Arámbula, E., Leal, E., Becerril, M., Picos, J., Angulo, C., Velázquez, Z., Jiménez, F., Gallardo, F., Diaz, D. Incidence, Mortality, and Trends of Prostate Cancer in Mexico from 2000 to 2019: Results from the Global Burden of Disease Study 2019. *Cancers (Basel).* 2022; 14(13):3184.
5. Cabeza, M., Soriano, J., Heuze, Y., Ahumado, M., y Piermattey, J. New Nonsteroidal Molecules as Blockers of the Steroidogenic Pathway. *Current enzyme Inhibition* 2022; 18:19-31.
6. Gamat, M., McNeel, D. Androgen deprivation and immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2017; 24(12):297-310.
7. Kaplan, A., y Golla, V. Testosterone Therapy on Active Surveillance and Following Definitive Treatment for Prostate Cancer. *Curr Urol Rep* 2017; 18:49.
8. Swerdloff, R., Dudley, R., Page, S., Wang, C., y Salameh, W. Dihydrotestosterone: Biochemistry, Physiology, and Clinical Implications of Elevated Blood Levels. *Endocr Rev* 2017; 38(3):220-254.
9. Wang, L., Lei, Y., Gao, Y., Cui, D., Tang, Q., Li, R., Wang, D., Chen, Y., Zhang, B., Wang, H. Association of finasteride with prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2020; 99(15): e19486.