

INFORME

Jarra Alkanatur Drops: Evaluación de la actividad (anti-)estrogénica y (anti-)androgénica

Prof. N. Olea
Dr. J.M. Molina-Molina
Plataforma de servicios Científico-Técnicos
Unidad Científico-Técnica: Laboratorios de Investigación
Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.Granada)
Granada

Se firma el presente informe en Granada a 18 de Julio de
2017

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'N. Olea'.

Nicolás Olea
Directo Científico
Ibs.GRANADA

Resumen

Con objeto de investigar la posible actividad biológica de carácter hormonal de la jarra Alkanatur Drops (copolímero de estireno/acrilonitrilo, código de identificación nº 7 SAN) suministrada por la empresa ALKANATUR DROPS SL y en la cual se almacena el agua tras ser filtrada, se ha utilizado, en primer lugar, una metodología basada en el empleo *in vitro* de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 que pone de manifiesto el efecto (anti-)estrogénico de un compuesto dado. En el bioensayo E-Screen, que emplea dicha línea celular, la respuesta obtenida tras la evaluación del agua mantenida en dicha jarra durante diferentes periodos de tiempo (24 y 36 horas) y temperatura (4° y 25° C), en términos de proliferación celular (efecto proliferativo) ha sido similar y no estadísticamente distinta a la mostrada por el control negativo (medio de cultivo) en todas las concentraciones testadas. Por otro lado, cuando se ha analizado la posible actividad anti-estrogénica del agua en presencia de 17 β -estradiol (100 pM), la respuesta obtenida ha sido similar a la encontrada para el control positivo. Estos datos sugieren **que no se produce liberación de compuestos ó que los compuestos liberados desde la jarra no tienen capacidad para inducir proliferación en células estrógeno-dependientes**. De la misma manera, ninguno de los posibles compuestos liberados al agua poseería capacidad anti-proliferativa en presencia de estradiol.

En segundo lugar, respecto a la posible actividad biológica de carácter androgénico y/o anti-androgénico de los posibles compuestos liberados, hemos utilizado una metodología desarrollada durante los últimos años en modelos *in vitro* utilizando células transfectadas con los elementos de respuesta a diversos receptores nucleares y un sistema de activación enzimático con luciferasa. En concreto, hemos utilizado una línea celular (PALM) derivada de la línea celular PC3 de cáncer de próstata humano, co-transfectada con un elemento de respuesta a andrógenos, con el gen del receptor humano de los andrógenos y el gen de la luciferasa. Cuando se analizó la posible actividad androgénica del agua, la respuesta obtenida, en términos de actividad luciferasa, ha sido similar a la encontrada para el control negativo (medio de cultivo).

Igualmente, cuando se ha analizado el posible efecto antagonista del agua en presencia del andrógeno sintético R1881 (0,3 nM), la respuesta obtenida ha sido similar a la encontrada para el control positivo. Estos resultados indican que **las muestras analizadas no tienen capacidad para incrementar la actividad luciferasa en estas células ni tampoco tienen capacidad para disminuir la actividad inducida en presencia de R1881**, por tanto carece de actividad hormonal androgénica/anti-androgénica en las concentraciones ensayadas.

Propósito del estudio

El objeto de este trabajo es evaluar la posible actividad hormonal de los compuestos liberados al solvente (agua destilada) que ha estado en contacto con la jarra de plástico motivo de estudio. Para ello se ha procedido a analizar si el extracto acuoso de la jarra tiene:

1. Capacidad para unirse al receptor estrogénico y activar la proliferación celular, tras 144 horas de subcultivo, en ausencia (control negativo) o presencia (control positivo) de 17β -estradiol, mediante el test de estrogenicidad *in vitro* (E-Screen) que utiliza la línea celular de cáncer de mama denominada MCF-7.

2. Capacidad para unirse al receptor androgénico y activar la transcripción de determinados genes específicos, tras 40 horas de incubación, en ausencia (control negativo) o presencia (control positivo) de metiltienolona (R1881), mediante un test de androgenicidad *in vitro* (transactivación) que utiliza la línea celular de cáncer de prostata transfectada PALM.

Experimentos de proliferación celular: Test E-Screen.

El test de proliferación E-Screen se basa en el empleo de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. Las células MCF-7 [las cuales expresan de forma endógena el receptor de los estrógenos alfa ($ER\alpha$)], responden al tratamiento con estradiol incrementando su ritmo proliferativo, sintetizando nuevas proteínas y procediendo a la transcripción de ciertos genes específicos. Estas células son consideradas estrógeno-dependientes, con lo cual no proliferan cuando se exponen a un medio de cultivo suplementado con suero al que se le han eliminado los estrógenos, solamente estrógenos naturales o sintéticos cancelan esta inhibición e inducen proliferación máxima. Aprovechando estas características Soto et al. (1992) desarrollaron un ensayo biológico bajo el nombre de E-screen (Patente USA 4,859,585). El test compara el número de células o la proliferación celular obtenida después de 6 días de cultivo. Las células crecen un medio de cultivo suplementado con suero humano desprovisto de estrógenos, en presencia y/o ausencia de estradiol, así como, de los compuestos químicos de sospechada actividad estrogénica.

Ensayos de transactivación (Transactivation assay o reporter gene assay)

Estos bioensayos se basan en el empleo de líneas celulares transfectadas con diversos receptores hormonales, ya sean nativos o modificados, y analizan la expresión de genes específicos. Los compuestos han sido estudiados siguiendo una metodología desarrollada durante los últimos años en modelos de células *in vitro* transfectadas con los elementos de respuesta a diversos receptores nucleares (en nuestro caso el receptor de los andrógenos humano) y un sistema de activación enzimático de luciferasa. Estos modelos son aplicados de forma rutinaria para una evaluación cuantitativa de diferentes xenobióticos con actividad hormonal. En particular hemos utilizado una línea celular (PALM) derivada de la línea celular PC3 de cáncer de próstata humano, co-transfectada con un elemento de respuesta a los andrógenos, con el gen del receptor humano de los andrógenos y el gen de la luciferasa.

Material y métodos

Jarra de plástico Alkanatur Drops

A partir de una jarra de plástico transparente con código de identificación n° 7 SAN (copolímero de estireno/acrilonitrilo), aportada por la empresa ALKANATUR DROPS SL, fue utilizada para la determinación de la actividad (anti-)estrogénica y para la determinación de la actividad (anti-)androgénica. La jarra fue llenada y mantenida con un volumen de 2 litros de agua destilada durante: i) 24 horas a 4° C, ii) 36 horas a 4° C, iii) 24 horas a 25° C y iv) 36 horas a 25° C. El agua empleada fue sometida a un proceso de extracción en fase sólida (SPE) y concentración. Se emplearon cartuchos Isolute C18 y Supelclean ENVI-Carb para la extracción de los compuestos que podrían ser activos vía receptor de los estrógenos humano alfa (hER α) y vía receptor de los andrógenos humano (hAR), respectivamente.

Materiales y compuestos químicos

Las soluciones stock de estradiol-17 β (10 mM) y R1881 (0,1 mM) fueron preparadas en etanol. Las soluciones fueron mantenidas a -20 °C hasta su uso. Las

sucesivas diluciones tanto de las muestras problema como de estradiol y R1881, fueron realizadas en el mismo medio de cultivo.

Los medios de cultivo celular y el suero bovino fetal (FBS) fueron obtenidos de Life Technologies Inc. 17β -estradiol, metiltienolona (R1881), L-glutamina, Hepes, bicarbonato sódico, luciferina y los antibióticos piromicina y gentamicina fueron comprados a Sigma-Aldrich Inc. Todo el material plástico para el cultivo fue obtenido de Falcon (Merck Eurolab) excepto las placas de 96 pocillos, las cuales fueron obtenidas de Greiner Labortechnik.

Los cartuchos para extracción en fase sólida (SPE) [C18 (500 mg/6 mL) y ENVI-Carb (500 mg/6 mL) fueron comprados a Biotage (Uppsala, Sweden) y Supelco (Madrid, Spain), respectivamente.

Tratamiento de las muestras: extracción en fase sólida (SPE)

Dos diferentes tipos de cartuchos fueron utilizados debido a su diferente capacidad para retener compuestos que podrían ser activos vía hER α ó hAR. Agua destilada fue utilizada en ambos casos como control negativo.

Los cartuchos fueron acondicionados siguiendo las indicaciones del fabricante (Isolute C18 con 2 \times 4 ml de metanol y con 2 \times 4 ml de agua destilada, mientras que los cartuchos Supelclean ENVI-Carb con 2 \times 4 ml de acetona and 2 \times 4 ml de agua destilada). A continuación, 2000 ml de agua destilada ó 2000 ml de las aguas problema fueron cargadas en cada columna a un flujo de 12 ml/min. Los extractos resultantes fueron resuspendidos en 50 μ L de DMSO y mantenidos en viales a una temperatura de -20 °C hasta su posterior análisis en los diferentes bioensayos.

Ensayos agonistas y antagonistas: concentraciones testadas

En todos los ensayos, los extractos obtenidos fueron seriadamente diluidos en medio de cultivo experimental (2-0.125%) y 50 μ l son añadidos en cada pocillo, resultando en una concentración final de solvente (DMSO) de 0.5 hasta 0.03125 % (vol/vol).

Línea celular MCF-7: condiciones de cultivo

Se utiliza la línea celular de cáncer humano MCF-7. Esta línea fue establecida por Soule et al. (1973) a partir de un carcinoma de mama humano. Su gran difusión

como modelo experimental de cáncer de mama puede ser atribuida a que se trata de la primera línea celular documentada como receptor estrogénico positivo, que responde con cambios metabólicos y estructurales a la acción de los estrógenos (Soto et al., 1995). La línea celular MCF-7 presenta, además, receptores específicos para otros agentes hormonales, entre los cuales se encuentran los andrógenos, progestágenos, glucocorticoides, vitamina D3, hormonas tiroideas, prolactina, insulina, calcitonina y factores estimuladores del crecimiento celular.

En el presente estudio se utilizó el stock de las células MCF-7 BUS cedidas por el Dr. C. Sonnenschein (Tufts University, Boston, EE.UU.) y clonadas como C7MCF-7 a partir del pase 173 de la MCF-7 original cedida por el Dr. McGrath de la Michigan Cancer Foundation.

Como medio nutriente de la línea celular estudiada en este trabajo hemos utilizado los siguientes medios sintéticos:

a) *Medio de mantenimiento*: El mantenimiento en cultivo de las células MCF-7 se efectuó en medio mínimo esencial DMEM (Dulbecco's modified Eagle médium) suplementado con el 10% de suero bovino fetal (FBS), más rojo fenol (+RF), L-glutamina, y bicarbonato sódico.

b) *Medio experimental*: Debido a actividad estrogénica del rojo fenol así como del FBS, los experimentos son realizados en medio denominado experimental, esto es, medio de cultivo sin rojo fenol, quedando en este caso indicado en el texto como DMEM (-RF). En este caso la regulación del pH del medio se efectuó utilizando como tampón, bicarbonato sódico y Hepes, a concentraciones finales de 4,2 μ l y 20 mM, respectivamente. El medio experimental se suplementa con 10% de suero humano desprovisto de estrógenos (10% CDFBS).

Bioensayo de estrogenicidad

El test E-Screen se realiza siguiendo la metodología previamente descrita por Soto et al. (1992) modificada por Villalobos et al. (1995). Las células MCF-7 en confluencia son tripsinizadas y alícuotas de esta suspensión se siembran en placas de 96 pocillos a concentraciones iniciales de 4.000-5.000 células por pocillo en medio de mantenimiento, DMEM (+RF), suplementado con el 10% de FBS. Una vez que las células están adheridas al soporte plástico de la placa (generalmente 24-48 horas) se retira el medio de mantenimiento y se añade medio experimental DMEM (-RF)

suplementado con el 10% CDFBS. Estradiol-17 β y las muestras a testar se añaden al medio de cultivo en las concentraciones requeridas. El ensayo finaliza a las 144 horas de subcultivo (fase exponencial) tras la aspiración del medio y la fijación de las células para la aplicación de la técnica de la sulforrodamina-B. Por último, el crecimiento celular para cada grupo experimental se refiere al crecimiento obtenido para el control negativo (ausencia de hormona) y con respecto al estradiol (control positivo).

Para llevar a cabo el estudio del efecto hormonal de carácter antagonista (anti-estrogénico) se procede al ensayo añadiendo al medio de cultivo experimental el compuesto junto con 17 β -estradiol, a la concentración que la hormona produce proliferación máxima (100 pM). La reversibilidad del efecto anti-hormonal, ante la presencia del estrógeno natural, sirve para cuantificar la potencia del compuesto como anti-estrogénico y caracterizar sus cualidades. Los pasos a seguir son los mismos descritos en el apartado anterior.

Análisis de los resultados: Parámetros de actividad biológica

Una vez realizado el ensayo E-Screen, se procede a establecer la tasa máxima de proliferación celular inducida por la muestra, también llamada *efecto proliferativo* (EP), calculada como la relación existente entre la máxima tasa de proliferación obtenida para la muestra y la tasa de proliferación alcanzada por el control negativo. Dado que el efecto proliferativo obtenido en el ensayo E-Screen solo proporciona información relativa a esa muestra, por ejemplo, las muestras testadas al 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25 ó 0.5% equivalen a 2.5, 5, 10, 20, ó 40 ml del agua original. Por tanto, en orden de cuantificar la actividad estrogénica con respecto a la cantidad total de agua (2 litros) se calculan los equivalentes de estradiol (Eeq) mediante la extrapolación de los valores de los efectos proliferativos obtenidos en una curva dosis-respuesta de estradiol. Teniendo en cuenta que la muestra de agua fue concentrada 40.000 veces vía SPE y que posteriormente fueron testadas a concentraciones de 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25 y 0.5% en el E-Screen los factores de concentración fueron 12.5, 25, 50, 100, y 200, respectivamente. En particular, nosotros usamos aquella concentración a la cual el efecto proliferativo sea mayor. Finalmente, los Eeq obtenidos son corregidos mediante el factor de concentración y expresados como Eeq por litro de agua (Eeq/l).

Línea celular PALM: condiciones de cultivo

Las células PALM fueron obtenidas mediante co-transfección de la línea celular PC3 de cáncer de próstata con un elemento de respuesta sensible a los andrógenos (MMTV-Luc-SV-Neo) y el gen del receptor humano de los andrógenos (pSG₅AR-puro) (Terouanne et al., 2000). En el presente estudio se utilizó el stock de las células PALM cedidas por el Dr. P. Balaguer (INSERM U-896, Montpellier, Francia). El medio de mantenimiento de esta línea celular es Ham's F12 suplementado con 10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina, 1 mg/ml gentamicina y 1 µg/ml de piromicina. Para esta línea celular el medio experimental utilizado fue Ham's F12 suplementado con 6% de suero bovino, desprovisto de estrógenos (6% DCC-FBS).

Test de androgenicidad/anti-androgenicidad: actividad luciferasa

Las células se siembran a una densidad de 5×10^4 células por pocillo, en placas blancas opacas de 96 pocillos, en 150 µl de medio experimental. Transcurridas 8 horas, las muestras/compuestos a testar se añaden a cada pocillo, disueltos en medio experimental (50 µl). Las células se incuban durante 40 horas a 37°C. Al final de la incubación, el medio es eliminado y reemplazado por medio fresco conteniendo una concentración de 0,3 mM de luciferina. A esta concentración la luciferina difunde al interior celular produciendo una señal luminiscente que es estable tras 5 minutos y durante al menos 2 horas. A continuación las placas son introducidas en el luminómetro para medir la luminiscencia durante 2 segundos. Finalmente, la actividad luciferasa para cada grupo experimental se expresa como porcentaje de actividad luciferasa. Para el estudio del efecto hormonal de carácter antagonista (actividad anti-androgénica) se procede al ensayo añadiendo de forma simultánea al medio de cultivo el compuesto junto con R1881 a la concentración (0.3 nM) que este produce una actividad luciferasa del 80%. Los pasos a seguir son los mismos descritos en el apartado anterior.

Análisis de los resultados

Tras el ensayo de transactivación, se procede a establecer la actividad luciferasa inducida por el compuesto, calculada como porcentaje de máxima actividad luciferasa (100%), que es aquella obtenida en presencia del control positivo (100 nM R1881). Los datos de actividad luciferasa correspondientes a las sucesivas concentraciones de la muestra se transforman, tras la aplicación del factor de corrección para la concentración de cada punto experimental, procediendo al cálculo de la media aritmética de los datos

obtenidos. Los valores de actividad luciferasa obtenidos fueron analizados usando el test estadístico ANOVA (one way-de una vía). Las diferencias son consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

De nuevo, en orden de cuantificar la actividad anti-androgenica con respecto a la cantidad total de agua se calculan los equivalentes de procimidona (Proceq) mediante la extrapolación de los valores de la actividad luciferasa obtenidos en una curva dosis-respuesta de procimidona. Los datos de actividad luciferasa correspondientes a las sucesivas concentraciones de la muestra se transforman, tras la aplicación del factor de concentración para cada punto experimental, procediendo al cálculo de la media aritmética de los datos obtenidos. Finalmente, los datos son expresados como Proceq por litro de agua (Proceq/l).

Resultados

En este trabajo hemos utilizado el test de estrogenicidad/anti-estrogenicidad E-Screen, empleado habitualmente para identificar la actividad hormonal de compuestos que interaccionan específicamente con el receptor de los estrógenos alfa ($ER\alpha$) y un bioensayo de transactivación, usando las células PALM para la determinación de la actividad androgénica/anti-androgénica. Los ensayos fueron realizados por triplicado para cada concentración (0.5 hasta 0.03125 %) en dos experimentos independientes.

Los resultados obtenidos tras la realización del bioensayo E-Screen (Tabla 1) expresados como efecto proliferativo, indican claramente que el agua mantenida en la jarra durante diferentes periodos de tiempo y temperatura, no induce una proliferación celular significativa con respecto al control negativo (medio de cultivo libre de hormona), en todo el rango de concentraciones testadas. Por lo general, se considera que un compuesto tiene actividad estrogénica cuando su efecto proliferativo es de 2 ó superior. Igualmente, ninguna de las muestras ensayadas presenta efecto anti-proliferativo con respecto al control positivo, es decir, no revierten la proliferación máxima inducida por estradiol 100 pM (Tabla 2), y por tanto no tienen actividad anti-estrogénica para el receptor alfa.

Los resultados obtenidos tras el bioensayo de transactivación, usando las células PALM y expresados como porcentaje de actividad luciferasa (Tabla 3), indican también que ninguna muestra fue capaz de inducir un incremento en la actividad luciferasa mas

allá del valor obtenido con el control negativo (medio de cultivo libre de hormona) en todo el rango de concentraciones testadas. Por otro lado, ninguna de las muestras fue capaz de reducir el porcentaje de actividad luciferasa inducido por el andrógeno sintético R1881 usado como control positivo (Tabla 4). Por tanto, podemos considerar todas las muestras ensayadas carecen de actividad androgénica y de actividad anti-androgénica.

Conclusión

Dada la sensibilidad y especificidad de la metodología empleada, podemos concluir que los “posibles compuestos liberados” a partir de la jarra Alkanatur Drops, no presentan actividad hormonal para el receptor estrogénico alfa cuando son investigados en ensayos en cultivo. De forma similar, en cuanto al receptor de los andrógenos, ninguna de las muestras fue capaz de activarlo.

Bibliografía

Soto, A.M., Lin, T.M., Justicia, H., Silvia, R.M., Sonnenschein, C., 1992. An in culture bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics. In: *Chemically Induced Alterations in Sexual Development: The Wildlife/Human Connection* (Colborn T, Clement CR, eds). Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing, 295-309.

Soto, A., Sonnenschein, C., Cheng, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Olea-Serrano, F., 1995. The E-Screen as a tool to identify estrogens: an update on oestrogenic environment pollutants. *Environ. Health Perspect.* 103,113-122.

Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M.J., 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1400-1413.

Villalobos, M., Olea, N., Brotons, J.A., Olea, M.F., Ruiz deAlmodóvar, J.M., Pedraza, V., 1995. The E-SCREEN assay: comparison among different MCF7 cell stocks, *Environ. Health Perspect.* 103, 844-850.

Terouanne, B., Tahiri, B., Georget, V., Belon, C., Poujol, N., Avances, C., Orio, F. J., Balaguer, P., Sultan, C., 2000. A stable prostatic bioluminescent cell line to investigate androgen and anti-androgen effects. *Mol. Cell. Endocrinol.* 160, 39-49.

Tabla 1: Crecimiento celular relativo obtenido en el bioensayo E-screen para las muestras indicadas. Las células MCF-7 fueron tratadas con dichas muestras a las indicadas concentraciones. Los resultados son expresados como la tasa máxima de proliferación celular inducida por el compuesto (efecto proliferativo), calculada como la relación existente entre la máxima tasa de proliferación obtenida para la muestra y la tasa de proliferación alcanzada por el control negativo.

Efecto proliferativo (EP)					
	24 h a 4° C (media±DE)	24 h a 25° C (media±DE)	36 h a 4° C (media±DE)	36 h a 25° C (media±DE)	Control (media±DE)
Control positivo E ₂ (1x10 ⁻¹⁰ M)	6.28* ± 0.19	6.30* ± 0.26	6.14* ± 0.22	6.14* ± 0.35	5.98 * ± 0.04
Control negativo (Medio de cultivo)	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.11
0,03125%	1.06 ± 0.04	0.98 ± 0.04	1.00 ± 0.01	1.02 ± 0.11	1.09 ± 0.14
0,0625%	1.05 ± 0.06	1.10 ± 0.00	1.05 ± 0.03	1.03 ± 0.02	1.11 ± 0.04
0,125%	1.10 ± 0.01	1.11 ± 0.01	1.10 ± 0.05	1.03 ± 0.05	1.10 ± 0.01
0,25%	1.04 ± 0.03	1.13 ± 0.04	1.13 ± 0.01	1.07 ± 0.01	1.08 ± 0.03
0,5%	1.02 ± 0.01	1.12 ± 0.06	1.11 ± 0.02	1.05 ± 0.06	1.19 ± 0.01

DE: Desviación estándar.

*: Diferencia significativa frente al control negativo estimando un crecimiento igual a 1; p< 0.05

Tabla 2: Crecimiento celular relativo obtenido en el bioensayo E-screen para las muestras indicadas. Las células MCF-7 fueron tratadas con dichas muestras a las indicadas concentraciones en presencia de E₂ (100 pM). Los resultados son expresados como la tasa máxima de proliferación celular inducida por la muestra (efecto proliferativo), calculada como la relación existente entre la máxima tasa de proliferación obtenida para la muestra y la tasa de proliferación alcanzada por el control negativo.

Efecto proliferativo (EP)					
	24 h a 4° C (media±DE)	24 h a 25° C (media±DE)	36 h a 4° C (media±DE)	36 h a 25° C (media±DE)	Control (media±DE)
Control positivo E ₂ (1x10 ⁻¹⁰ M)	6.12 ± 0.15	6.03 ± 0.16	6.46 ± 0.12	6.14 ± 0.35	6.44 ± 0.51
Control negativo (Medio de cultivo)	1.00* ± 0.17	1.00* ± 0.11	1.00* ± 0.05	1.00* ± 0.26	1.00* ± 0.14
0,03125%	5.95 ± 0.02	6.09 ± 0.36	6.53 ± 0.11	6.48 ± 0.54	6.52 ± 0.37
0,0625%	5.96 ± 0.21	6.03 ± 0.31	6.57 ± 0.11	6.40 ± 0.43	6.36 ± 0.67
0,125%	6.04 ± 0.01	6.09 ± 0.17	6.38 ± 0.14	6.24 ± 0.15	6.41 ± 0.62
0,25%	6.03 ± 0.06	6.11 ± 0.35	6.65 ± 0.04	6.69 ± 0.47	6.39 ± 0.54
0,5%	5.93 ± 0.03	5.96 ± 0.22	6.67 ± 0.02	6.40 ± 0.39	6.45 ± 0.69

DE: Desviación estándar.

*: Diferencia significativa frente al control positivo; p< 0.05

Tabla 3: Actividad transcripcional del receptor de los andrógenos humano (hAR) en respuesta a las muestras testadas. Las células PALM fueron tratadas con las muestras indicadas a las concentraciones indicadas. Los resultados se expresan como porcentaje de máxima actividad luciferasa (100%), obtenida en presencia de 100 nM R1881.

	Actividad luciferasa (%)				
	24 h a 4° C (media±DE)	24 h a 25° C (media±DE)	36 h a 4° C (media±DE)	36 h a 25° C (media±DE)	Control (media±DE)
Control positivo R1881 (1x10 ⁻⁷ M)	101.20* ± 0.99	102.95* ± 3.75	101.50* ± 1.13	102.0* ± 2.55	101.05* ± 0.21
Control negativo (Medio de cultivo)	9.05 ± 0.49	9.80 ± 0.14	8.35 ± 0.49	9.60 ± 0.57	9.65 ± 0.49
0,03125%	9.25 ± 0.35	10.05 ± 0.	8.50 ± 0.57	9.35 ± 1.06	9.90 ± 0.28
0,0625%	9.25 ± 1.06	9.80 ± 0.42	8.55 ± 0.78	9.45 ± 1.20	10.00 ± 0.00
0,125%	9.15 ± 0.64	10.05 ± 1.20	8.60 ± 1.14	9.85 ± 1.06	10.10 ± 0.00
0,25%	9.00 ± 0.71	9.15 ± 0.64	9.05 ± 1.34	9.15 ± 0.78	9.60 ± 0.42
0,5%	9.30 ± 0.14	9.80 ± 0.42	8.90 ± 1.27	8.85 ± 0.64	9.90 ± 0.14

DE: Desviación estándar.

*: Diferencia significativa frente al control negativo; p< 0.05

Tabla 4: Actividad transcripcional de hAR en respuesta a las muestras indicadas. Las células PALM fueron tratadas con las muestras indicadas a las indicadas concentraciones en presencia de R1881 (0.3 nM). Los resultados se expresan como porcentaje de máxima actividad luciferasa (100%), obtenida en presencia de 10 nM R1881.

	Actividad luciferasa (%)				
	24 h a 4° C (media±DE)	24 h a 25° C (media±DE)	36 h a 4° C (media±DE)	36 h a 25° C (media±DE)	Control (media±DE)
Control positivo R1881 (3×10^{-10} M)	82.85 ± 6.86	80.25 ± 0.49	78.95 ± 0.07	78.75 ± 1.06	79.45 ± 0.64
Control negativo (Medio de cultivo)	9.15* ± 0.19	9.85* ± 0.56	9.15* ± 0.24	9.25* ± 0.33	9.30* ± 0.54
0,03125%	78.35 ± 0.07	81.05 ± 1.63	82.55 ± 0.21	79.50 ± 3.25	78.30* ± 0.14
0,0625%	81.50 ± 0.42	80.25 ± 0.35	80.60 ± 0.29	80.10 ± 8.49	80.55 ± 1.63
0,125%	80.90 ± 2.69	81.30 ± 1.70	81.60 ± 1.70	78.70 ± 1.13	80.60 ± 1.13
0,25%	79.90 ± 1.27	81.25 ± 4.31	76.15 ± 4.03	79.90 ± 2.79	80.00 ± 0.71
0,5%	83.35 ± 3.32	77.95 ± 1.06	80.60 ± 0.85	77.45 ± 1.21	80.35 ± 0.35

DE: Desviación estándar.

*: Diferencia significativa frente al control positivo; $p < 0.05$