

[dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.25](https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.25)

## Efecto de la dehidroepiandrosterona y el acetónido de triamcinolona sobre la línea celular 3T3-L1

### Effect of dehydroepiandrosterone and triamcinolone acetonide on 3T3-L1 cell line

G. Gutiérrez-Iglesias<sup>1</sup>, R. López-Marure<sup>2</sup>, A. Parra-Barrera<sup>1</sup>, C.C. Calzada-Mendoza<sup>1</sup>, J. R. Cáceres-Cortés<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Ciudad de México.

#### RESUMEN

La piel es el órgano más extenso en el ser humano, su integridad representa protección contra diferentes agentes químicos, biológicos y mecánicos. Las lesiones ocasionadas en este tejido se resuelven mediante la formación de una cicatriz, sin embargo, diferentes alteraciones moleculares pueden sobre estimular este proceso, lo que conlleva a la formación de cicatrices aberrantes (hipertrófica o queloide). El tratamiento más recomendado para este tipo de lesiones es la aplicación intralesional del acetónido de triamcinolona (AT) y por otro lado, la dehidroepiandrosterona (DHEA) es una pro-hormona que posee una gran variedad de efectos biológicos como: regulación de la síntesis de fibras de colágeno, protección celular, propiedades antitumorales, antiinflamatorias y antioxidante. En este trabajo, se estudió la combinación de AT-DHEA sobre la proliferación y muerte celular en la línea celular de fibroblastos 3T3-L1. Los resultados mostraron que la AT a 100 M y la DHEA a 1000 M inhiben la proliferación en un 50 y 40% respectivamente. La combinación de AT-DHEA (10000-10 M) inhibe la proliferación celular e inducen muerte celular programada, entonces esta combinación pudiera utilizarse en cicatrices hipertróficas o queloides para su eliminación.

**PALABRAS CLAVE:** Acetónido de triamcinolona, dehidroepiandrosterona, fibroblastos 3T3-L1, cicatrices queloides.

### ABSTRACT

The skin in the human is the largest organ, his integrity represents protection against various chemical, biological and mechanical agents. The injuries in this tissue are solved by forming a scar, however, different molecular alterations may overstimulate this process, leading to the formation of aberrant scars (hypertrophic or keloid). The most recommended treatment for such injuries is the intralesional application of triamcinolone acetonide (TA) and on the other hand, dehydroepiandrosterone (DHEA) is a pro-hormone that has a wide variety of biological effects such as regulation of the synthesis of collagen fibers, cell protection, anti-tumor properties, anti-inflammatory and anti-oxidant. In this paper, the combination of AT-DHEA on proliferation and cell death in fibroblast cell line 3T3-L1 was studied. The results showed that the AT 100 and 1000 M DHEA to inhibit proliferation by 50 and 40% respectively. The combination of AT-DHEA (10000-10 M) inhibits cell proliferation and induce programmed cell death, so this combination could be used in hypertrophic or keloid scars for disposal.

**KEYWORDS:** Triamcinolone acetonide, dehydroepiandroesterone, 3T3-L1 fibroblast, Keloids scars.

### Correspondencia

DESTINATARIO: G. Gutiérrez-Iglesias

INSTITUCIÓN: Departamento de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional

DIRECCIÓN: Plan de San Luis y Díaz Mirón, Col. Casco Santo Tomás, C.P 11340, Ciudad de México

CORREO ELECTRÓNICO: iglesiasgg@yahoo.com

### Fecha de recepción:

15 de octubre de 2016

### Fecha de aceptación:

26 de diciembre de 2016

## INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más extenso en el ser humano, dentro de sus funciones principales se encuentra el proteger al organismo contra agentes químicos, radiación solar o microorganismos patógenos [1]. Al estar en constante interacción con el medio físico puede sufrir heridas, que bajo condiciones normales se resuelven de forma favorable, mediante la formación de una cicatriz, sin embargo, en un grupo de personas el proceso de cicatrización es exacerbado, llegando a generar cicatrices aberrantes poco estéticas, conocidas como cicatrices queloides o hipertróficas, que pueden llegar a causar dolor, prurito y contracturas, afectando física y psicológicamente la calidad de vida [2,3]. Se cree que este tipo de condición es producida por los estímulos pro-inflamatorios generados en la zona de daño sobre los fibroblastos residentes en la dermis, por lo que, los antiinflamatorios esteroideos han sido los fármacos de elección para el tratamiento de este tipo de lesiones [4,5]. Los corticosteroides, glucocorticosteroides, glucocorticoides o esteroides son moléculas sintetizadas a partir del colesterol por las glándulas suprarrenales, estas moléculas modulan la respuesta inmunológica durante los procesos inflamatorios, y participan en una gran variedad de funciones fisiológicas como: el metabolismo de glucosa y lípidos [6,7]. Desde hace décadas, los corticoides, son muy empleados como anti-inflamatorios ya que son altamente eficaces en enfermedades caracterizadas por esta condición, incluidas las cicatrices hipertróficas y queloides; sin embargo, aunque el uso de los corticoides es realizado a nivel mundial, no se sabe con exactitud el mecanismo de acción, la dosis eficaz, o su eficacia clínica [8,6]. Una molécula sintética, el AT (9 $\alpha$ -fluoro-16 $\alpha$ -hidroxiprednisolona), posee potentes propiedades anti-inflamatorias, y su aplicación clínica se ha enfocado a condiciones inflamatorias aberrantes como es el caso de las cicatrices queloides [9]. Otra molécula, la DHEA posee una gran variedad de efectos biológicos como la regulación de la síntesis de fibras de colágeno, protección celular, propiedades antitumorales, antiinflamatorias y antioxidante [10,7,11,12]. Es por

ello que en este trabajo se realizó la aplicación de AT y/o DHEA y su combinación, sobre la línea celular de fibroblastos (3T3-L1), para saber su efecto sobre la proliferación y muerte celular, con el objetivo de emplear dosis menores en cicatrices hipertróficas o queloides a las reportadas por otros autores.

## METODOLOGÍA

La línea celular fibroblástica de ratón 3T3-L1 fue cultivada en medio de cultivo DMEM-F12 suplementada con suero fetal de bovino (SFB) al 10%, antibiótico-antimicótico 1X, y fueron mantenidas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en un ambiente húmedo.

*Ensayo de cristal violeta:* Las concentraciones utilizadas fueron tomadas de estudios *in vitro* y clínicos, realizados por diferentes autores. Se sembraron 1x10<sup>3</sup> cél/pozo en una placa de 96 pozos y fueron cultivadas en presencia/ausencia de diferentes concentraciones de AT (0.1, 1, 10, 100, 1000, 10,000 y 20,000  $\mu$ M), DHEA (0.1, 1, 10, 100 y 200  $\mu$ M) o AT-DHEA (AT 1000 + DHEA 50  $\mu$ M; AT 10,000 + DHEA 10  $\mu$ M) durante 48 horas. Transcurrido el tiempo, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1% por 5 minutos, se lavaron 2 veces con solución amortiguadora de fosfatos (SAF) (SIGMA) y dejaron secar al aire. Se agregó cristal violeta (50  $\mu$ L/pozo al 0.1%, pH 6), en agitación constante. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua bidestilada, para retirar el colorante no asimilado. Por último, se adicionó ácido acético al 10% (50  $\mu$ L/pozo), se agitó por 10 minutos a temperatura ambiente para desteñir a las células y se tomaron lecturas de cada pozo en un lector de placas de ELISA (Elx800; Bio-Tek) a una  $\lambda$  de 570 nm. Las densidades ópticas fueron graficadas como % de proliferación celular respecto al control (sin ningún estímulo).

*Microscopía de fluorescencia:* Se sembraron 2x10<sup>3</sup> cél/pozo en placas Lab-tek y se estimularon con diferentes concentraciones de DHEA (10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M), AT (1000  $\mu$ M y 10,000  $\mu$ M) y combinadas (AT 1000  $\mu$ M + DHEA 50  $\mu$ M y AT 10,000  $\mu$ M +DHEA 10  $\mu$ M) durante 6 horas.

Transcurrido el tiempo, se lavaron con SAF estéril, fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 minutos y se realizó otro lavado con SAF. Las células fueron permeabilizadas con una solución de EDTA 0.5 M, ácido cítrico 0.1 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M, glucosa 1% y tritón X-100 1% por 5 minutos, posteriormente fueron teñidas con naranja de acridina cubriendo toda la superficie por 5 minutos, finalmente se realizaron 3 lavados con SAF, se montaron con medio de montaje Dako para observarlas en un microscopio de fluorescencia NIKON Eclipse-E600 por la emisión de dos colores a 530-640 nm bajo el objetivo 20X.

*Análisis estadístico:* El análisis de los resultados se realizó mediante *t-student* para muestras relacionadas con el programa Microsoft Excel, se consideró con diferencia significativa los datos con  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*La AT y DHEA solas o en combinación inhiben la proliferación celular de los fibroblastos 3T3-L1:* El AT inhibe la proliferación celular de manera significativa ( $p < 0.05$ ) en un 50% con respecto al control a concentraciones de  $\geq 100 \mu\text{M}$  (ver Figura 1). De igual forma, la DHEA, inhibe la proliferación celular de manera significativa ( $p < 0.05$ ) en un 40% a concentraciones  $\geq 1,000 \mu\text{M}$  (ver Figura 2). Debido a esto, se eligió una concentración de ambos compuestos por debajo de 100 y 1000 M para AT y DHEA respectivamente. La combinación de ambos compuestos disminuye la proliferación celular de los fibroblastos 3T3-L1 de manera significativa en un 30% con respecto al control ( $p < 0.05$ ) (ver Figura 3).

*La DHEA, AT y su combinación inducen muerte celular programada en la línea 3T3-L1.* Para determinar si la DHEA, AT o su combinación inducen muerte celular por apoptosis en la línea 3T3-L1 se realizó la tinción con naranja de acridina, considerando que las células en apoptosis temprana presentan condensación de la cromatina observando un color verde más brillante mientras que las células apoptóticas tardías generan un color anaranjado brillante más intenso.

Las células cultivadas en medio DMEM y 10% SFB (control) presentan un núcleo redondo, granular, céntrico y homogéneo (ver Figura 4a), mientras que las células tratadas con DHEA 10 y 50  $\mu\text{M}$  presentan alteraciones en membrana nuclear y se evidencia deformación nuclear (hipercromía moderada) y también se evidencian células en apoptosis temprana (ver Figura 4b y 4c). Sin embargo, a concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  de DHEA todas las células muestran condensación o fragmentación nuclear y del citoplasma evidenciando de esta forma un estado de apoptosis tardía (ver Figura 4d). Todos estos cambios morfológicos indican que las células en presencia de DHEA son inducidas a un proceso de muerte celular por apoptosis. Por otro lado, cuando las células 3T3-L1 son cultivadas con AT a 1,000  $\mu\text{M}$  se observan tanto células que presentan condensación de la cromatina (apoptosis) y también células con hipercromía moderada (aumento del tamaño del núcleo con difusión de la cromatina al citoplasma), (ver Figura 4e). De igual forma, las células cultivadas con AT a 10,000  $\mu\text{M}$  presentaron disminución del espacio citoplasmático y condensación de la cromatina encontrándose en un estado de apoptosis temprana (ver Figura 4f). Finalmente, las células estimuladas con AT 1,000 más DHEA 50  $\mu\text{M}$  se observan con cromatina condensada y con hipercromía evidente lo cual indica que se encuentran en un estado de apoptosis tardía (ver Figura 4g), mientras que el tratamiento con AT 10,000 más DHEA 10  $\mu\text{M}$  se observa homogeneidad en la disminución del tamaño celular, se preservan los organelos y la membrana celular y condensación de la cromatina por lo que es evidente un estado de apoptosis temprana en todas las células (ver Figura 4h). Los resultados muestran que la combinación de AT/DHEA evidencian una muerte celular más homogénea en la línea celular 3T3-L1 a diferencia de las tratadas por separado.

En las lesiones cutáneas, los factores inflamatorios y antiinflamatorios juegan un papel muy importante para la sanación de las mismas, sin embargo, factores endocrinos, genéticos, fisiológicos y/o traumas,

pueden alterar este proceso, e incrementan la proliferación de los fibroblastos y la síntesis de moléculas de la matriz extracelular, principalmente el colágeno, dando lugar a una cicatriz queloide o hipertrófica [13,3]. Las cicatrices queloides o hipertróficas son generalmente tratadas con una inyección intralesional de corticosteroides, principalmente el AT, sin embargo, la principal desventaja es que las cicatrices presentan una tasa de recurrencia muy significativa [14]. La línea celular de fibroblastos 3T3-L1 representa un modelo apropiado para el estudio de los efectos sobre la proliferación y muerte celular inducida por los corticosteroides, a diferencia de los cultivos primarios, los fibroblastos 3T3-L1 pueden cultivarse y mantenerse *in vitro* fácilmente, por lo que facilita la obtención de información para comprender a fondo los procesos antes mencionados. En literatura se ha demostrado que los esteroides poseen alta actividad de glucocorticoides *in vivo* como el AT, así a una concentración de  $0.1 \mu M$  estimulan la síntesis de DNA y la división celular de la línea celular 3T3-L1 [15]. Por otro lado, una concentración superior a  $1,000 \mu M$  de AT inhibe de forma significativa la proliferación de las células troncales mesenquimales [16]. Estos antecedentes concuerdan con nuestros resultados, ya que de forma similar, se observó que bajas concentraciones de AT aumenta la proliferación celular y altas concentraciones la inhiben (ver Figura 1). Otro estudio demostró que el AT a concentraciones de  $0.7-33 nM$  estimula o inhibe la proliferación de las células 3T3-L1 dependiendo de la interacción con diferentes factores de crecimiento, por ejemplo el FGF que aumenta la proliferación, y el EGF que la inhibe, por lo que el efecto del AT es tejido específico y para tratar ciertas patologías, como las cicatrices queloides, se debe tener en consideración la etiopatogenia de la misma, así como un estudio detallado de la expresión de citocinas y factores de crecimiento involucrados en dicha enfermedad, además, se deben estudiar moléculas alternas para lograr un tratamiento más efectivo [17]. Al igual que el AT, la DHEA, posee propiedades antiinflamatorias y

también antioxidantes, por ello se le ha considerado para el tratamiento de desórdenes inflamatorios; el antecedente más reciente reporta que la DHEA ( $0.1-10 \mu M$ ) disminuye la proliferación celular de las células 3T3-L1 en forma dosis dependiente [18]. En el presente trabajo, no se observó este fenómeno por lo que se amplió el rango hasta  $200 \mu M$ . Los resultados demuestran una disminución significativa de la proliferación a una concentración de  $100 \mu M$  de DHEA (ver Figura 2), nuestros resultados concuerdan con otro trabajo donde se reporta una disminución significativa de en la línea 3T3-L1 con DHEA  $100 \mu M$  [19]. La acción de la DHEA sobre los adipocitos es opuesta a la acción de los glucocorticoides, los cuales potencian la adipogénesis, altera la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y adipocinas, como el TNF- $\alpha$  en modelos de ratas obesas. También regula la expresión de colágeno y de las metaloproteinasas de matriz [7,20,21]. Estas propiedades podrían ser aprovechadas para controlar desórdenes inflamatorios e hiperproliferativos, como las cicatrices queloides e hipertróficas.

Debido a las características que comparten el AT y la DHEA y a los diferentes mecanismos moleculares por los cuales inhiben la proliferación celular, se probó la combinación de ambos compuestos para observar los efectos que ocasionan sobre las células 3T3-L1. La combinación de ambos disminuye de forma significativa la proliferación con dos condiciones combinadas (DHEA 10 más AT  $10,000 \mu M$  y DHEA 50 más AT  $1,000 \mu M$ ) (ver Figura 3), estos resultados mostraron que no eran necesarias concentraciones elevadas de ambos compuestos para inhibir la proliferación celular. También se optó por estudiar los cambios morfológicos inducidos por AT y DHEA solas y en combinación (ver Figura 4) mediante la tinción con naranja de acridina. La variabilidad de la fluorescencia nuclear indica las anomalías y alteraciones morfológicas que sufren las células sanas [22]. Un hallazgo importante es que al combinar ambas moléculas (ver Figura 4g-h) se incrementa el número de células en muerte celular al

presentar cambios morfológicos característicos de muerte celular programada o apoptosis, como compactación del núcleo, hipercromía del citoplasma y presencia de cuerpos apoptóticos. La hipercromía puede deberse a una gran cantidad de síntesis de RNA

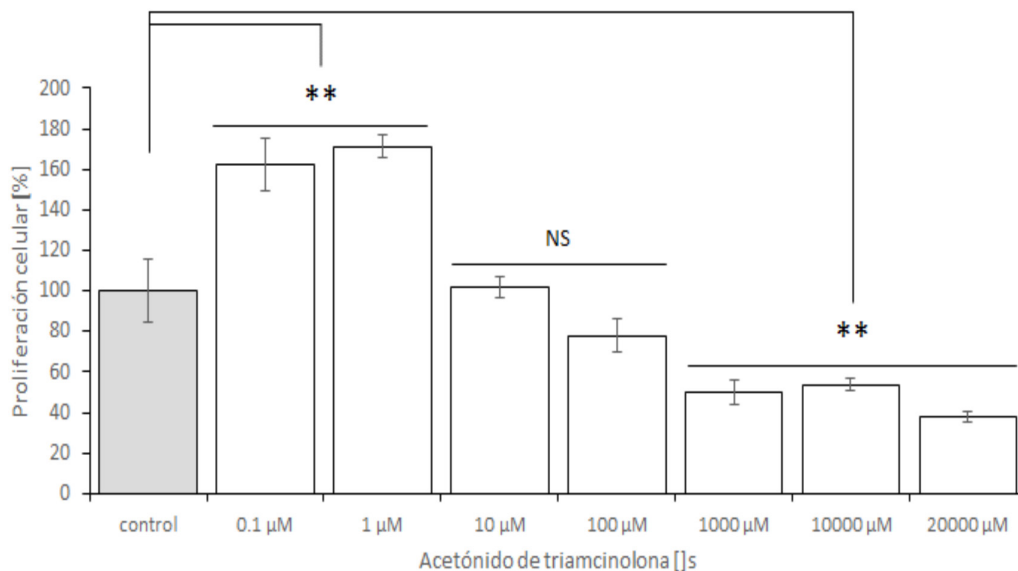
o incluso un proceso de reciclaje del contenido citoplasmático llamado autofagia, que se caracteriza por un mecanismo de supervivencia celular que también puede formar un papel en la muerte celular programada [23].

## CONCLUSIÓN

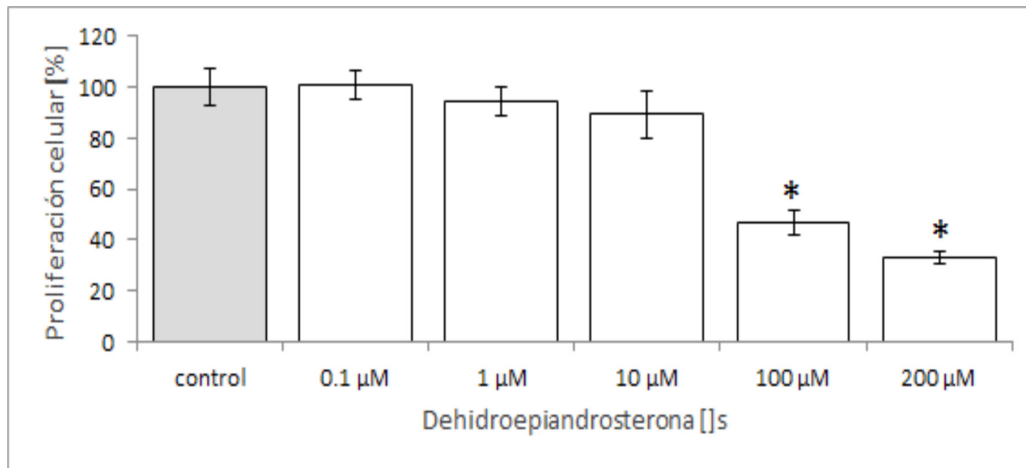
Nuestros resultados indican que posiblemente el tratamiento combinado de la DHEA (10 M) y AT (10,000 M) inducen muerte celular por apoptosis, aunque estos hallazgos son relevantes, aún falta por determinar si el efecto sobre la proliferación es similar en cul-

tivos de fibroblastos derivados de cicatrices queloides, y si estos resultados concuerdan con modelos *in vivo*, podrían darnos un indicio sobre el uso y eficiencia de la DHEA-AT en procesos similares.

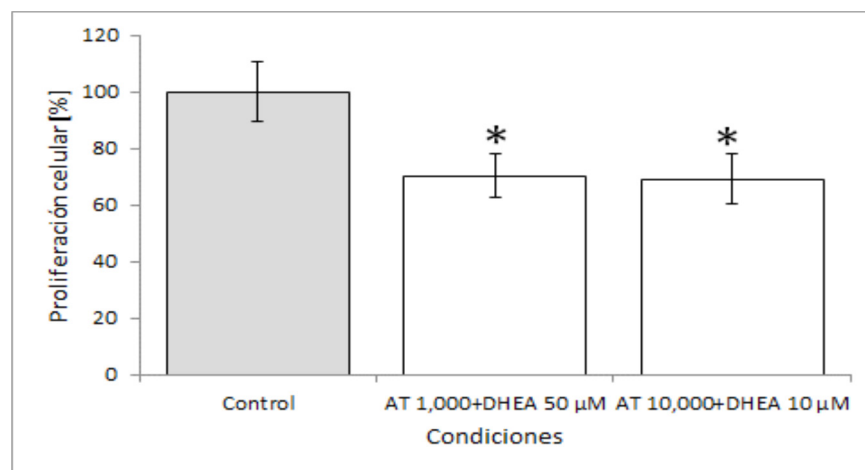
## FIGURAS



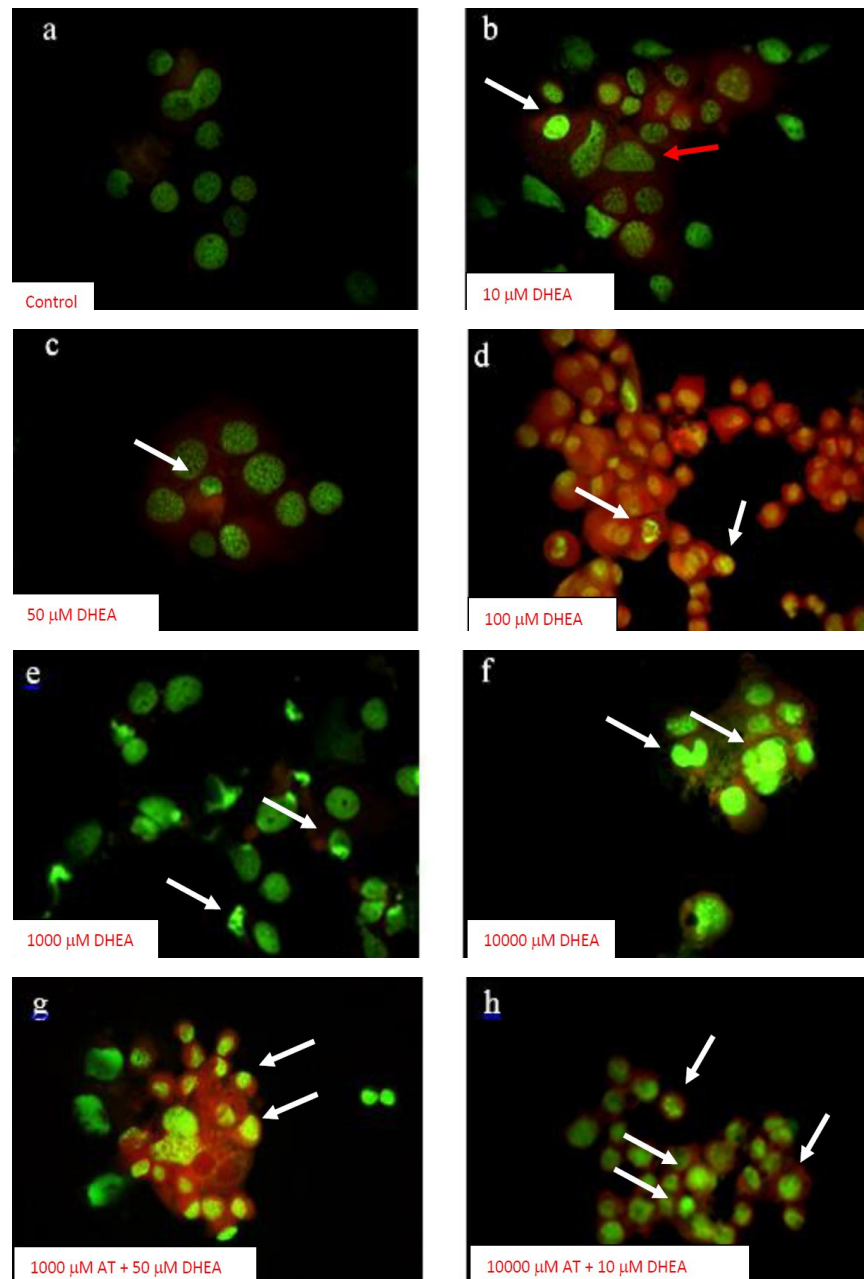
**FIGURA 1.** Efecto del AT sobre la proliferación de células 3T3-L1. Concentraciones  $\geq 1000 \mu\text{M}$  de AT inhiben la proliferación celular en un 50% de manera significativa con respecto al control. El porcentaje de proliferación fue determinado a las 48 horas de estímulo como se describe en materiales y métodos. Donde el 100% fue tomado con la proliferación de células sin estímulo. t-student de una vía,  $p < 0.05$ .



**FIGURA 2.** Efecto de la DHEA sobre la proliferación de células 3T3-L1. Concentraciones  $\geq 100 \mu\text{M}$  de DHEA inhiben la proliferación celular en un 40% de manera significativa con respecto al control. El porcentaje de proliferación fue determinado a las 48 horas de estímulo como se describe en materiales y métodos. Donde el 100% fue tomado con la proliferación de células sin estímulo. t-student de una vía,  $p < 0.05$ .



**FIGURA 3.** Efecto de la combinación de AT y DHEA sobre la proliferación de células 3T3-L1. La combinación de AT a 1000-10000 mM más 50-10  $\mu\text{M}$  de DHEA inhiben la proliferación celular en un 30% con respecto al control de manera significativa. El porcentaje de proliferación fue determinado a las 48 horas de estímulo como se describe en materiales y métodos. Donde el 100% fue tomado con la proliferación de células sin estímulo. t-student de una vía,  $p < 0.05$ .



**FIGURA 4.** La AT, DHEA y la combinación de ambas inducen muerte celular programada de las células 3T3-L1. a) células control, donde hay integridad de la membrana celular y nuclear; b) y c) células tratadas con 10 y 50  $\mu\text{M}$  de DHEA, algunas células presentan alteraciones en núcleo (flechas), citoplasma y hay condensación del material genético (flechas); d) células tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de DHEA, todas las células presentan compactación nuclear e hiperchromía del citoplasma (flechas); e) y f) células tratadas con 1000 y 10000  $\mu\text{M}$  AT, hay condensación nuclear (dispersión de la cromatina en el citoplasma) (flechas); g) la combinación de 1000 mM de AT + 50 mM de DHEA, algunas células presentan compactación y fragmentación de los núcleos (característicos de células apoptóticas tardías) e hiperchromía del citoplasma; h) la combinación de 10,000 mM de AT + 10 mM de DHEA, todas las células presentan fragmentos nucleares rodeados por membrana celular intacta, (cuerpos apoptóticos).

Tinción con naranja de acridina. 40X.



## REFERENCIAS

- [1] 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)
- [2] Aderounmu, A.O., Omonisi, A.E., Akingbasote, J.A., Makanjuola, M., Bejide, R.A., Orafidiya, L.O., et al. "Wound-healing and potential anti-keeloidal 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)
- [3] 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)
- [4] 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)
- [5] Shin, J., Park, J., Heen, J., Hoon, K., Kim, Y., Yun, C. and W., Jai. "Extranarginal excision is preferable for hypertophic scars". *International Journal of Dermatology*, no 53, pp.1138-1144, 2014. DOI: [10.1111/jid.12481](https://doi.org/10.1111/jid.12481)
- [6] 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)
- [7] Tagawa, N., Minamitani, E., Yamaguchi, Y., and Y. Kobayashi. "Alternative mechanism for anti-obesity of dehydroepiandrosterone: Possible contribution of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition in rodent adipose tissue". *Steroids*, no 76, pp. 1546-1553, 2011. [oi.org/10.1016/j.steroids.2011.09.005](https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.09.005)
- [8] Galofré, J. C. "Manejo de los corticoides en la práctica clínica". *rev med univ Navarra.*, vol 53, no 1, pp. 9-18, 2009.
- [9] 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)
- [10] 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)
- [11] Schuwartz, A.G., Pashko, L., and J. M. Whitcomb. "Inhibition of tumor development by dehydroepiandrosterone and related steroids". *Toxicocouicp athology*, no 14, pp. 357-362, 1986.
- [12] Gutiérrez, G., Mendoza, C., Zapata, E., Montiel, A., Reyes, E., Montaña, 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)
- [13] Burgos, B. I., "QUELOIDES Desde la fisiopatogenia a la terapéutica". *Act Terap Dermatol*, no 29, pp. 156, 2006.
- [14] Hakan, U., Ozan, B., Rümeyns, 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. DOI: [10.1097/PRS.0b013e31829acf0a](https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31829acf0a)
- [15] 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.
- [16] 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. DOI: [10.1007/s11999-014-3925-y](https://doi.org/10.1007/s11999-014-3925-y)
- [17] Otto, M. A., Natoli, K. M. C., Richmond, V., Iacobelli S., and A. L., Jimenez. "Glucocorticoids inhibit the stimulatory effect of epidermal growth factor on the initiation of DNA synthesis". *Journal of cellular physiology*, no 107, pp. 155-163, 1981. DOI: [10.1002/jcp.1041070117](https://doi.org/10.1002/jcp.1041070117)
- [18] 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](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00112.2011)
- [19] 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. DOI: [10.1006/bbrc.1998.8996](https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8996)
- [20] Kimura, M., Tanaka, S., Yamada, Y., Kiuchi, Y., Yamawa, T., and H. Sekihara. "Dehydroepiandrosterone decreases serum tumor necrosis factor- $\alpha$  y resortes insulin sensitivity: independent effect from secondary weight reduction in genetically obese zucker fatty rats". *Endocrinology*, no 139, pp. 3249-3253, 1998. DOI: [10.1210/endo.139.7.6118](https://doi.org/10.1210/endo.139.7.6118)
- [21] 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. DOI: [10.1111/j.0022-202X.2004.23588.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23588.x)
- [22] Atale, N., Gupta, S., U.C.S. and V., Rani. "Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques". *Journal of Microscopy*, no 255, pp. 7-19, 2014. DOI: [10.1111/jmi.12133](https://doi.org/10.1111/jmi.12133)
- [23] Wilson, E. N., Bristol, M. L., Maltese, W. A., Koterba, K., and M.J. Beckman. "A switch between cytoprotective and cytotoxic autophagy in the radio sensitization of breast tumor cells by chloroquine and vitamin D". *Horm Cancer*, no 2, pp. 272-285, 2011. DOI: [10.1007/s12672-011-0081-7](https://doi.org/10.1007/s12672-011-0081-7)