



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

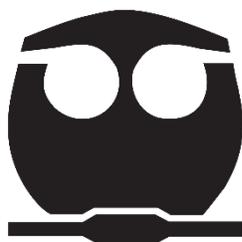
FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTOS DE LA TESTOSTERONA SOBRE
EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DERIVADAS
DE ASTROCITOMAS HUMANOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:
YAZMÍN ESTELA TORRES PAZ**



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
VOCAL: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
SECRETARIO: DRA. CAROLINA GUZMÁN ARRIAGA
1er. SUPLENTE: DRA. EDITH ARACELI CABRERA MUÑOZ
2° SUPLENTE: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN REPRODUCCIÓN HUMANA, INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA-FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS

SUSTENTANTE: YAZMÍN ESTELA TORRES PAZ

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	3
3.1. Tumores cerebrales.....	3
3.2. Gliomas humanos.....	3
3.3. Astrocitomas.....	4
3.4. Estructura y funciones de la testosterona.....	8
3.4.1. Metabolismo de la testosterona.....	10
3.4.2. Mecanismos de acción de la Testosterona.....	14
3.5. Receptor a andrógenos.....	17
3.6. Efectos de la testosterona en el crecimiento tumoral.....	18
4. Planteamiento del problema	21
5. Hipótesis	21
6. Objetivos	21
7. Metodología	22
7.1. Cultivo celular.....	22
7.2. Conteo celular.....	22
7.3. Expresión del RA.....	22
7.3.1 Tratamientos.....	22
7.3.2 Extracción de proteínas totales.....	23
7.3.3 Western Blot.....	23
7.4. Análisis densitométrico y estadístico.....	24
8. Resultados	26
9. Discusión	31
10. Conclusiones	34
11. Referencias	35

1. RESUMEN

La testosterona es una hormona esteroide del grupo de los andrógenos, que participa en la regulación de diversos procesos patológicos como el cáncer. Se ha demostrado una mayor expresión del receptor a andrógenos (RA) en pacientes con astrocitomas humanos, que son los tumores cerebrales más frecuentes y agresivos en el ser humano, en comparación con el tejido cerebral normal, sugiriendo la posibilidad de que la señalización del RA pueda desempeñar un papel importante en el crecimiento de estos tumores. Los astrocitomas se presentan en una mayor proporción en hombres que en mujeres (3:2). Sin embargo, se desconocen las causas de esta diferencia, por lo cual en el presente trabajo se determinó el efecto de la testosterona sobre el crecimiento de células U87 derivadas de astrocitomas humanos del mayor grado de malignidad. Para esto, las células U87 fueron tratadas con testosterona a diferentes concentraciones (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M) durante 5 días. Los resultados mostraron que a partir al día 3 de cultivo, la testosterona (10 nM) disminuyó significativamente el número de células U87. Posteriormente, al tratar a las células con flutamida (5 μ M), un antagonista del RA, se observó el mismo efecto que con la testosterona, ya que también disminuyó el número de células a partir del día 3 de cultivo. Por otro lado, la flutamida no bloqueó el efecto de la testosterona, lo que sugiere que la flutamida podría tener un efecto agonista sobre el RA o que la testosterona no lleva a cabo su efecto por medio de la unión con su receptor, sino a través de otros mecanismos. Finalmente, se determinó la expresión del RA en células U87 mediante la técnica de Western Blot. Se observó que el RA se expresa en dichas células y que su expresión no es regulada por andrógenos.

Los datos anteriores sugieren que la testosterona (10 nM) disminuye el número de células U87 derivadas de astrocitomas humanos de grado IV, al igual que la flutamida (5 μ M). Además, la línea celular U87 expresa el RA y su expresión es independiente de andrógenos.

2. INTRODUCCIÓN

Los gliomas son un grupo de tumores derivados de las células gliales, y representan más del 50% del total de tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), registrándose aproximadamente 6.5 casos por cada 100,000 personas por año. Los astrocitomas representan el 40-50% de todos los tumores del SNC y hasta el 70% de los tumores gliales. El astrocitoma anaplásico y el glioblastoma multiforme (grados III y IV, respectivamente) son las variantes más malignas y frecuentes de los tumores astrocíticos. El pronóstico depende de múltiples factores como son el grado de malignidad, la localización, el tamaño y el tiempo de evolución; sin embargo, el tiempo de sobrevivencia de los pacientes con diagnóstico de gliomas astrocíticos de alta malignidad es corto. Estas lesiones son generalmente incurables y, a pesar de los tratamientos y terapias existentes, dentro de los primeros 2 años después del diagnóstico, el 90% de los pacientes fallece (Pérez *et al.*, 2001).

Se han encontrado diversos factores asociados con el desarrollo y evolución en el grado de malignidad de los astrocitomas (Sarkar *et al.*, 2009). Existen informes que sugieren que las hormonas sexuales pueden participar en el crecimiento de los tumores cerebrales (Camacho-Arroyo *et al.*, 2000; Gonzalez-Agüero *et al.*, 2007). El SNC es un importante blanco para esteroides sexuales como los andrógenos, los cuales están implicados en la regulación de varios procesos fisiológicos y patológicos como el desarrollo, crecimiento, maduración, diferenciación y función de las células cerebrales, incluyendo el crecimiento tumoral (Chang *et al.* 2014).

Se han realizado distintas investigaciones *in vitro* sobre los efectos de las hormonas sexuales en líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos, sin embargo, no se han realizado investigaciones sobre el efecto de los andrógenos sobre el crecimiento de estos tumores. Por lo que en este trabajo se determinó el efecto de la testosterona sobre el crecimiento de células U87 derivadas de astrocitomas humanos de grado IV.

3. ANTECEDENTES

3.1. Tumores cerebrales

Los tumores cerebrales son la segunda causa de muerte por enfermedades neurológicas (Micheli *et al.*, 1996). La incidencia anual de tumores cerebrales primarios a nivel mundial es de aproximadamente siete por cada 100 mil individuos (Furnari *et al.*, 2007; Xie, 2009), de los cuales los gliomas representan el 70% (Schwartzbaum *et al.*, 2006). Muy poco se conoce acerca de la etiología de estos tumores. No obstante, varios informes han asociado estas neoplasias con factores genéticos, ocupacionales y ambientales (Micheli *et al.*, 1996). Las evidencias de los primeros estarían fundamentadas en la incidencia familiar y la relacionada con el grupo sanguíneo; Selversten y Cooper han encontrado una asociación entre gliomas y el grupo sanguíneo A. En trabajadores del caucho, plásticos y químicos, así como también en los granjeros fueron descritas relaciones ocupacionales. Así mismo, la oncogénesis secundaria se ha asociado a la exposición de radiaciones, ya sea terapéutica o accidental; en especial con sarcomas, gliomas y meningiomas. También se han relacionado glioblastomas en adultos con traumatismos de cráneo sufridos previamente. Infecciones del SNC, en particular virales (papovavirus y retrovirus) han sido asociadas con un mayor riesgo tumoral (Micheli *et al.*, 1996).

3.2. Gliomas humanos

Los gliomas son tumores neuroectodérmicos que tienen características de células gliales y se clasifican de acuerdo a su perfil inmunohistoquímico en: astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas, de los cuales, los astrocitomas son los más comunes (Furnari *et al.*, 2007).

Los glioblastomas representan aproximadamente del 60 a 70% de los gliomas malignos, los astrocitomas anaplásicos del 10 a 15%, y los oligodendrogliomas anaplásicos y oligoastrocitomas anaplásicos el 10%; tumores menos comunes tales

como ependimomas anaplásicos y gangliogliomas anaplásicos representan el resto (Louis *et al.*, 2007).

No se ha identificado la causa subyacente para la mayoría de los gliomas malignos. El único factor de riesgo establecido es la exposición a radiación ionizante (Fisher *et al.*, 2007). Hay pruebas que sugieren una asociación entre factores inmunológicos y gliomas. Los pacientes con atopía tienen un menor riesgo de gliomas, y pacientes con glioblastomas que tienen altos niveles de IgE parecen vivir más que aquellos con niveles normales, pero la importancia de estas asociaciones aún no es clara (Wen *et al.*, 2008). Polimorfismos de genes que afectan el daño y la reparación del DNA, así como la regulación del ciclo celular, también se han implicado en el desarrollo de los gliomas (Fisher *et al.*, 2007).

Aproximadamente el 5% de los pacientes con gliomas malignos tienen una historia familiar de gliomas. Algunos de estos casos familiares se asocian a síndromes genéticos raros, tales como neurofibromatosis tipos 1 y 2, el síndrome de Li-Fraumeni (mutaciones de la línea germinal en p53 asociadas con un mayor riesgo de varios tipos de cáncer), y el síndrome de Turcot (poliposis intestinal y tumores cerebrales) (Farrell *et al.*, 2007).

3.3. Astrocitomas

Los astrocitomas son tumores neuroepiteliales que se originan de los astrocitos (Badash, 2009; Daumas-Duport *et al.*, 1998). Son las neoplasias cerebrales primarias más comunes en humanos, al constituir el 45% de todos los tumores del SNC (Daumas-Duport *et al.*, 1988). Se presentan principalmente en adultos de entre 50 y 70 años y poseen un alto potencial de malignidad (González-Agüero *et al.*, 2001). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha elaborado una clasificación que establece una escala de progresión de acuerdo a las características histológicas del tumor (Louis *et al.*, 2007).

- Grado I (Astrocitoma pilocítico)

Es un tumor relativamente delimitado, de lento crecimiento y se presenta principalmente en niños y adultos jóvenes. Afecta más comúnmente al cerebelo, seguido por el hipotálamo, nervio y quiasma óptico, tálamo, ganglios basales, tallo cerebral y hemisferios cerebrales. Histológicamente se caracterizan por un patrón bifásico de tejidos compacto y laxo. Las zonas compactas consisten de densos agregados de astrocitos bipolares alargados, mientras que las áreas esponjosas consisten de astrocitos multipolares redondos en asociación con microquistes y gránulos eosinofílicos. En ocasiones puede observarse proliferación vascular glomerular, sin embargo, no es considerada como una señal de malignidad. Las células que componen al astrocitoma presentan fuerte inmunopositividad a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Sarkar *et al.*, 2009). Estos tumores usualmente pueden ser eliminados mediante resección quirúrgica (total o parcial) y/o radio/quimioterapia (Bristol, 2009). En la mayoría de los casos donde el tumor ha sido extraído total o parcialmente, las posibilidades de una supervivencia mayor a 20 años son de más del 85% (Tihan and Bloomer, 2010).

- Grado II (Astrocitoma difuso)

Se caracteriza por un crecimiento lento e infiltración en estructuras cerebrales vecinas. Generalmente afecta a adultos jóvenes con un pico de incidencia entre los 30 y 40 años y tiende a evolucionar en forma maligna a astrocitoma anaplásico y glioblastoma. Histológicamente está compuesto por astrocitos fibrilares bien diferenciados. Las células tumorales se pueden acumular bajo la piamadre o alrededor de neuronas dañadas (satelitosis). Se localizan en cualquier región del SNC pero con más frecuencia se encuentra en los hemisferios cerebrales, tallo cerebral y médula espinal. El tratamiento puede incluir resección quirúrgica, quimioterapia y/o radioterapia y la medida de supervivencia después de la intervención quirúrgica va de 6 a 8 años (Arko *et al.*, 2010). En general, la media de supervivencia de los pacientes es de 5 años (Louis *et al.*, 2007).

- Grado III (Astrocitoma anaplásico)

Se localizan preferencialmente en los hemisferios cerebrales y usualmente afectan a adultos de entre 40 y 60 años de edad. Están histológicamente caracterizados por atipia nuclear, aumento celular y actividad proliferativa significativa. Señales adicionales de neoplasia incluyen células tumorales multinucleadas con anomalías en la mitosis y positivas a GFAP. Los astrocitomas anaplásicos son el grado de astrocitoma más común y tienden a progresar a tumores grado IV en tiempos cortos (Sarkar *et al.*, 2009). El tratamiento inicial estándar incluye, la máxima remoción posible del tumor sin causar deficiencias neurológicas (en la mayoría de los casos resulta muy poco efectiva), radioterapia y/o quimioterapia (Buckner *et al.*, 2007). La media de supervivencia es de 2 a 3 años y generalmente está determinado por el tiempo requerido para la progresión a un tumor de grado IV (Arko *et al.*, 2010).

- Grado IV (Glioblastoma multiforme)

Es el tumor primario del SNC de mayor frecuencia y malignidad. Comúnmente se presentan en adultos entre las edades de 45 a 70 años (Daumas-Duport *et al.*, 1988) y de forma preferencial en los hemisferios cerebrales (Sarkar *et al.*, 2009), ganglios basales y tálamo. Se caracteriza por presentar astrocitos poco diferenciados, atipia nuclear, mitosis elevada, trombosis vascular, proliferación microvascular y necrosis. (Brandes *et al.*, 2008).

Los glioblastomas pueden desarrollarse por progresión a partir de gliomas de menor malignidad (“glioblastoma secundario”) o desarrollarse de novo a partir de células madre cancerosas, es decir, sin evidencia de una lesión previa de menor malignidad (“glioblastoma primario”), los cuales representan aproximadamente el 90% de los casos (Furnari *et al.*, 2007). Morfológicamente, los glioblastomas primarios y secundarios son indistinguibles entre ellos. Clínicamente, los glioblastomas secundarios tienden a ocurrir en pacientes jóvenes (con una media de 45-50 años), mientras que los glioblastomas primarios ocurren mayormente en pacientes de edades más tardías (Sarkar *et al.*, 2009). La supervivencia de los pacientes con glioblastoma multiforme (GBM) es corta, generalmente fallecen dentro del

primer año después del diagnóstico (Louis *et al.*, 2007). Estos tumores son muy resistentes a la radioterapia y quimioterapia y debido a su alta capacidad para infiltrarse, en especial al parénquima cerebral, generalmente no es posible realizar resección quirúrgica (Hadjipanayis *et al.*, 2009).

En general, los primeros síntomas a causa de estos tumores pueden incluir: dolores de cabeza y vómito debido al aumento en la presión intracraneal, cambios visuales, ataques, cambios de personalidad, demencia o problemas con la memoria, el aprendizaje, la concentración y problemas motores. Los síntomas subsecuentes varían dependiendo de la localización del astrocitoma (Badash, 2009) y se ha reportado que la sobrevivencia de los pacientes está inversamente relacionada al grado del tumor (Daumas-Duport *et al.*, 1988).

Las alteraciones encontradas en los astrocitomas son resultado de la acumulación de anomalías genéticas, incluyendo aberraciones cromosómicas, mutaciones, así como amplificaciones y rearrreglos génicos. Un gen particularmente susceptible a sufrir modificaciones es el gen supresor de tumores p53, que juega un papel fundamental en la apoptosis, respuesta celular ante daños al DNA, arresto del ciclo celular y neovascularización. También se han encontrado alteraciones en la vía del retinoblastoma y en la expresión de genes como ciclina D1 que participa en el control del ciclo celular, así como alteraciones en la función del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y en el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que promueve la angiogénesis (Ichimura *et al.*, 2004).

El tratamiento para los astrocitomas más agresivos es muy pobre, de modo que el cuidado médico radica principalmente en el manejo paliativo de los pacientes. Es por esto que en muchos casos se busca ofrecer a los pacientes tratamientos experimentales o alternativos, entre los que se encuentran quimioterapia intrarterial, inmunoterapia génica y tratamientos endócrinos (Edward *et al.*, 2005).

Estas neoplasias son más frecuentes en hombres que en mujeres en una proporción de 3:2, la cual es más evidente en los astrocitomas de mayor grado de evolución (Schwartzbaum *et al.*, 2006). Esta diferencia en la prevalencia de astrocitomas relacionada al género se ha observado más acentuada a partir de los 14 años cuando la mujer ya presenta la menstruación y declina a los 50 años cuando

se presenta la menopausia, sugiriendo que las hormonas sexuales pueden estar implicadas en el crecimiento de los astrocitomas (McKinley *et al.*, 2000).

El SNC es un importante blanco para esteroides sexuales como los andrógenos, los cuales están implicados en la regulación de varios procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo el crecimiento tumoral (Chang *et al.*, 2014).

3.4. Estructura y funciones de la testosterona

Los andrógenos son hormonas sexuales que regulan la diferenciación y maduración de los órganos reproductivos masculinos, así como el desarrollo de las características secundarias masculinas. El principal andrógeno es la testosterona, una hormona esteroide de 19 átomos de carbono derivada del colesterol (Basu, 2010) (**figura 1**).

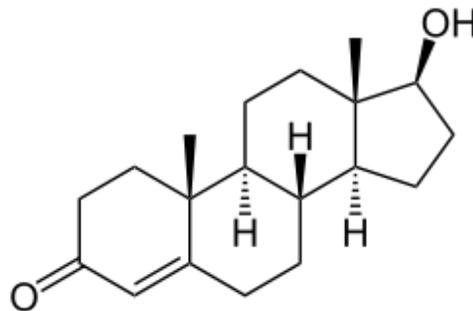


Figura 1. Estructura de la Testosterona. Hormona esteroide de 19 átomos de carbono. Presenta un doble enlace entre C4 y C5, una cetona en C3 y un radical hidroxilo (OH) en C12.

La testosterona y otros andrógenos tienen actividad biológica en prácticamente todos los tejidos en el cuerpo. Las funciones y efectos importantes de los andrógenos incluyen (Yen, 1991):

- La masculinización o diferenciación sexual masculina de los conductos de Wolff (genitales internos), genitales externos, y el cerebro en el feto humano.

- Acciones anabólicas, tales como estimulación del crecimiento lineal del cuerpo, retención de nitrógeno, y desarrollo muscular en el adolescente y hombre maduro.
- Estimulación de la maduración de los genitales externos y órganos accesorios sexuales, incluyendo el pene, el escroto, la próstata, y las vesículas seminales.
- Inducción de la ampliación de la laringe y engrosamiento de las cuerdas vocales.
- Estimulación del crecimiento del vello facial, axilar y púbico, así como la recesión del cabello y la calvicie temporal.
- Facilitación de la libido y la potencia sexual.
- Estimulación o supresión de proteínas órgano específicas en tejidos como el hígado, el riñón, y las glándulas salivales.

Los andrógenos son necesarios para el correcto desarrollo y función de numerosos tejidos, incluyendo el SNC. Además, hay evidencia que indica que la pérdida de andrógenos relacionados con la edad puede contribuir al desarrollo de trastornos neurodegenerativos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer. Tanto la testosterona como su metabolito, la dihidrotestosterona, tienen acciones amplias en el SNC, tales como la diferenciación de las neuronas en el hipotálamo y la corteza cerebral, la arborización dendrítica del hipocampo y la excitabilidad, la mejora en el crecimiento de las neuritas, y el mantenimiento de la morfología de las neuronas motoras (Nguyen *et al.*, 2007).

También, la testosterona es esencial para mantener la espermatogénesis y la fertilidad masculina (Walker, 2010). Además influye en determinados aspectos de estado de ánimo y cognición. Los niveles bajos de testosterona se asocian con una conducta dócil, mientras que los niveles altos se correlacionan con el comportamiento impulsivo y agresivo (Almeida *et al.*, 2004).

3.4.1. Metabolismo de la testosterona

Los testículos tienen dos funciones principales: la producción de espermatozoides y la producción de hormonas masculinas, principalmente la testosterona. En el caso de las mujeres, esta hormona es producida en cantidades significativamente menores en los ovarios (Dorantes, 2012).

Los componentes del testículo en donde se dan estos procesos están separados a nivel estructural, pero interrelacionados entre sí y requieren de un eje hipotalámico-hipofisario intacto para el inicio y mantenimiento de su función. Desde un punto de vista cuantitativo, el andrógeno más importante es la testosterona. Alrededor del 95% de ésta es secretada por las células de Leydig de los testículos hacia la circulación sistémica; 5% deriva de las glándulas suprarrenales (Dorantes, 2012; Yen, 1991). Pequeñas cantidades de otros esteroides potentes, tales como la dihidrotestosterona (DHT) son secretados por los testículos, pero contribuyen poco al contenido global de andrógenos de la sangre en los hombres. Esto está en marcado contraste con la mujer, en los que la DHT constituye una fracción significativa de los andrógenos totales de circulación. La androstenediona un precursor de la testosterona, también es secretada por los testículos, pero sólo es conocida su importancia en hombres como un precursor plasmático, por ejemplo, de estrógenos (Yen, 1991). Las concentraciones plasmáticas promedio de testosterona, así como los niveles urinarios se muestran en la tabla 1.

	Hombres	Mujeres
Testosterona		
Plasma (ng/dl)	700	40
Orina ($\mu\text{g}/\text{día}$)	70	4
Androstenediona		
Plasma (ng/dl)	120	170
Dihidrotestosterona		
Plasma (ng/dl)	45	20

Tabla 1. Niveles de andrógenos en hombres y mujeres (Yen, 1991).

Con excepción de las primeras semanas de vida fetal, la producción de testosterona depende de la secreción hipofisaria de hormona luteinizante (LH), que a su vez es controlada por un factor regulador de origen hipotalámico; la producción de este último está inhibida durante la niñez y empezará a generarse de manera pulsátil durante la pubertad. Este factor sintetizado por el hipotálamo se llama hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y es un péptido compuesto de 10 aminoácidos. Las células de Leydig tienen receptores de membrana específicos para LH, los cuales están acoplados a proteínas G y contienen siete dominios transmembranales. La unión de LH al receptor estimula la secreción de andrógenos en las células de Leydig (Dorantes, 2012).

La testosterona y la DHT son los principales andrógenos biológicamente activos. La testosterona se sintetiza en las células de Leydig a partir del colesterol circulante o *de novo* a partir de acetato. El colesterol es hidroxilado en los carbonos 20 y 22, transformándose en 5-pregnenolona, a partir de la cual se originan los demás progestágenos (Flores, 2005; Jara, 2003).

Los andrógenos se forman a partir de los progestágenos, actuando en primer lugar la enzima 17-hidroxilasa (CYP17). Así surge la dehidroepiandrosterona (DHEA) desde la 17-hidroxipregnenolona y la 4-androstenediona a partir de la 17-hidroxiprogesterona. Posteriormente actúa sobre ambas la enzima 17 β -hidroxiesteroide (HSD 17 β) deshidrogenasa para formar, respectivamente, 5-androstenediol y testosterona (Jara, 2003).

En la sangre, los andrógenos y estrógenos pueden existir en forma libre o unidos a proteínas séricas. Aunque cerca del 38% de la testosterona está unida con albúmina, la principal proteína transportadora es la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG). Alrededor del 2% de la testosterona circulante no está unida con proteínas séricas, puede entrar a las células y ejercer sus efectos metabólicos. Además, parte de la testosterona unida a proteína puede disociarse de esta última y entrar a los tejidos blanco (Dorantes, 2012).

En los tejidos blanco, la testosterona sale de la circulación y atraviesa la membrana celular. En la mayor parte de las células blanco de los andrógenos, la testosterona es convertida a un andrógeno más potente, la DHT, por la isoenzima

microsomal 5 α -reductasa. Además, una pequeña fracción de testosterona puede ser convertida a estradiol por medio de una reacción de aromatización catalizada por la enzima aromatasa (**figura 2**) (Dorantes, 2012). La testosterona y la DHT se unen a la misma proteína específica, el receptor a andrógenos (RA), pero la DHT además de ser un andrógeno más potente que la testosterona, se une con mayor afinidad a este receptor. Esta mayor afinidad resulta de la lenta disociación de la DHT con el receptor (Yen, 1991). La producción de DHT ocurre en varios tejidos del tracto reproductivo masculino, incluyendo la glándula prostática, las vesículas seminales, y la piel, donde los andrógenos estimulan el crecimiento y la división celular. En contraste, en músculo y riñón, la testosterona actúa sin cambios. Finalmente, los andrógenos son metabolizados a esteroides conjugados relativamente inactivos (por ejemplo, sulfatos y glucuronidos), que son excretados del cuerpo a través de la bilis u orina (Yen, 1991).

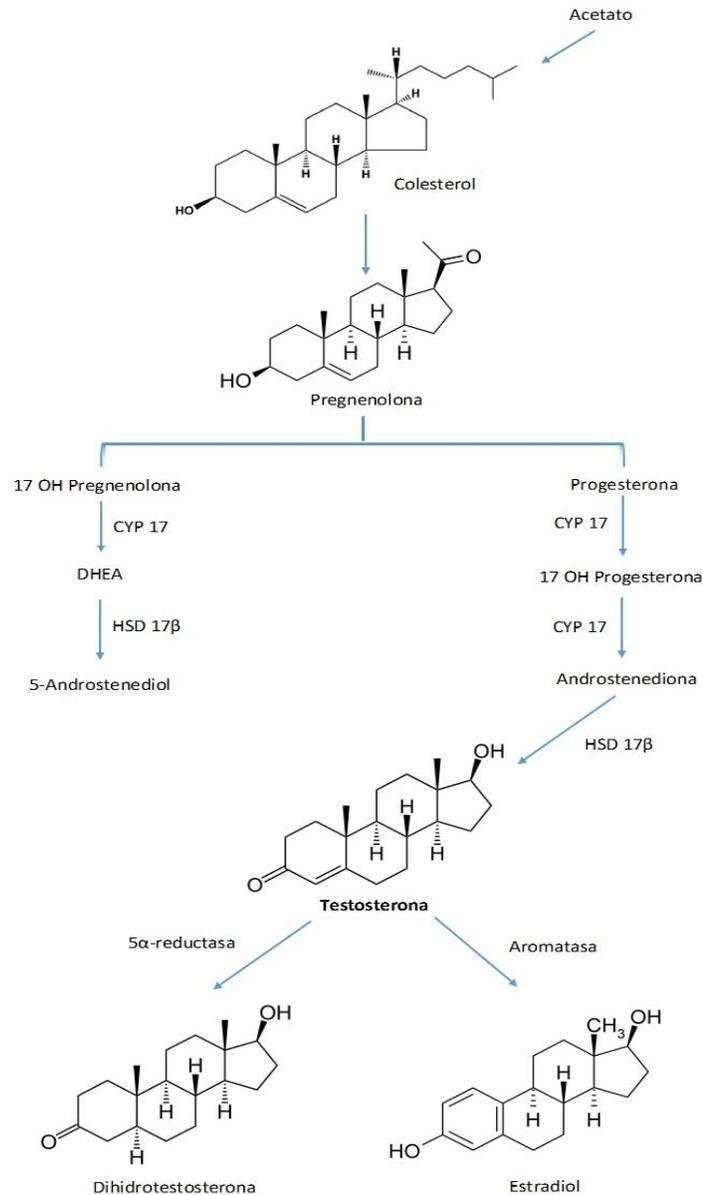


Figura 2. Síntesis de la testosterona. Conversión del colesterol a pregnenolona por la enzima CYP11A. De ésta se originan los prostágenos, a partir de los cuales se originan los andrógenos por la enzima 17-hidroxilasa (CYP17). Se forma la dehidroepiandrosterona (DHEA) desde la 17-hidroxipregnenolona y la 4-androstenodiona a partir de la 17-hidroxiprogestero, actuando sobre ambas la enzima 17β-hidroxiesteroide (HSD 17β) deshidrogenasa para formar, respectivamente, 5-androstenodiol y testosterona. Posteriormente actúan sobre la testosterona las enzimas 5α-reductasa y aromatasa para formar DHT y estradiol, respectivamente (Jara, 2003).

3.4.2. Mecanismos de acción de la testosterona

Mecanismo de acción clásico.

En general, en el mecanismo de acción clásico de la testosterona, ésta atraviesa la membrana plasmática por difusión simple debido a su carácter lipofílico y se une al RA, el cual se encuentra asociado a proteínas de choque térmico dentro del citoplasma o el núcleo. Una vez unido a su ligando, el RA sufre un cambio conformacional que le permite dissociarse de las proteínas de choque térmico y translocarse al núcleo en el caso del RA citoplásmico. Este cambio conformacional expone la región que le permite fosforilarse y dimerizarse, resultando en una estructura con alta afinidad a secuencias específicas denominadas elementos de respuesta a andrógenos (AREs) (Walker, 2010). Al unirse a esta secuencia se reclutan complejos correguladores, como los coactivadores de receptores a hormonas esteroides (SRC) que de manera dependiente de ligando facilitan el proceso de transcripción (**figuras 3 y 4**) (Walker, 2010).

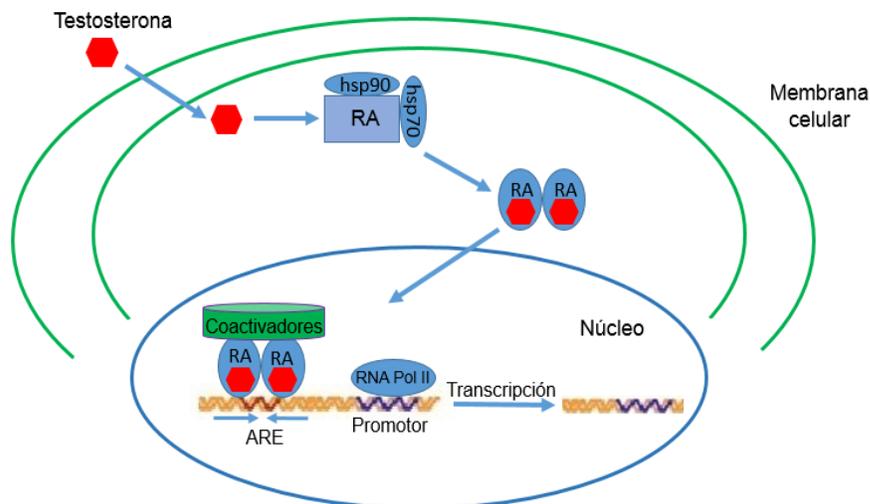


Figura 3. Mecanismo clásico de acción de la testosterona. El RA se encuentra en un estado de inactivación, unido a proteínas de choque térmico (hsp). La testosterona atraviesa la membrana plasmática, interactúa con su receptor, se liberan las hsp, el receptor se dimeriza, se une a elementos de respuesta a andrógenos (AREs) y recluta correguladores y a la maquinaria de transcripción basal (Walker, 2010).

Mecanismo de acción no-clásico.

Existen al menos dos mecanismos de acción no clásicos de acción de la testosterona en las células de Sertoli. En la vía de afluencia de $[Ca^{2+}]$ mediada por testosterona (figura 4, a la derecha (3)), la testosterona induce rápidamente el paso de $[Ca^{2+}]$ en las células de Sertoli a través de canales tipo L de $[Ca^{2+}]$. También se cree que la testosterona provoca la activación de una proteína Gq unida al receptor acoplado a proteínas G (GPCR) y la activación de la fosfolipasa C (PLC) que a continuación hidroliza a la enzima fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) en la membrana plasmática para producir inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). La disminución de los niveles de PIP_2 , un inhibidor de la activación de canales de K^+_{ATP} mediada por ATP, promueve el cierre de estos canales provocando un aumento en la resistencia de la membrana y la despolarización de la célula. Como resultado, los canales tipo L dependientes de $[Ca^{2+}]$ se abren y permiten el paso de $[Ca^{2+}]$ (Walker, 2011).

En la vía de activación de cinasas (**figura 4**, en medio (2)), la estimulación de las células de Sertoli con dosis de testosterona (10-250 nM) similares o inferiores a los que se encuentran en el testículo causa la unión de ésta con su receptor. Una vez unidos y localizados transitoriamente en la membrana plasmática, se recluta y activa la tirosina cinasa Src, como consecuencia de la estimulación androgénica que provoca la asociación directa de la región rica en prolina del RA (aminoácidos 352-359) y el dominio SH_3 de Src. La activación de Src mediada por testosterona provoca la fosforilación y la estimulación del receptor de EGF (EGFR) a través una vía intracelular. Como consecuencia se activa la cascada de MAP cinasas (Raf, MEK, ERK), y está a su vez activa a la cinasa p90Rsk que fosforila al factor de transcripción CREB (Walker, 2011). Se ha demostrado que la activación de esta vía no-clásica induce la expresión génica mediante la expresión de CREB. En contraste con la vía clásica, la inducción de la fosforilación de ERK y de CREB por la testosterona es rápida (menos de 1 min) y se puede mantener durante al menos 12 h (Fix *et al.*, 2004).

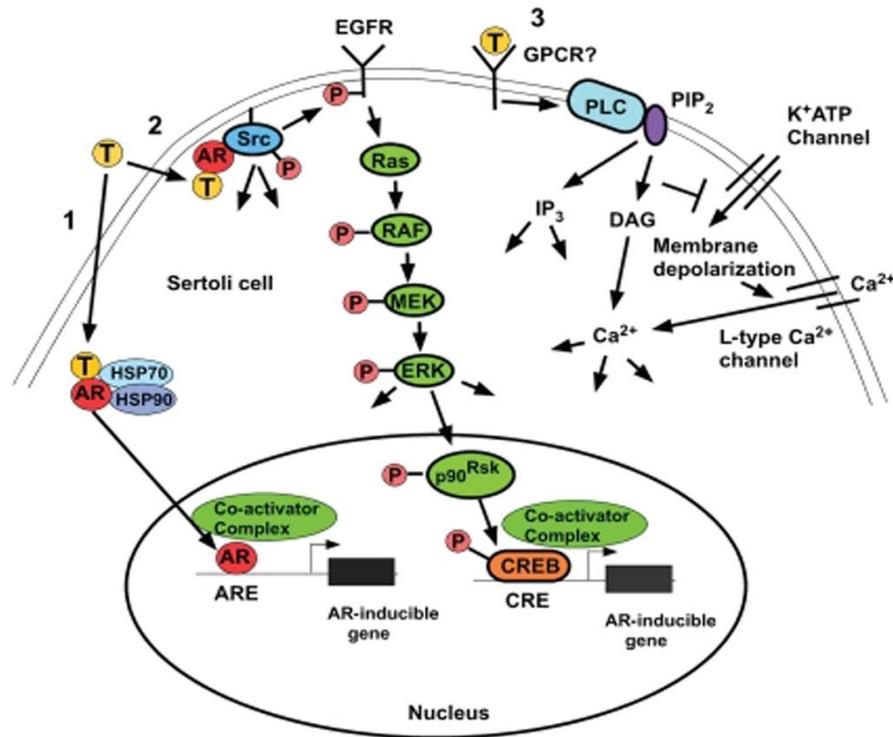


Figura 4. Mecanismo clásico y no clásico de la testosterona. (1) Mecanismo clásico. La testosterona atraviesa la membrana plasmática y se une al RA, el cual sufre un cambio conformacional y se disocia de las proteínas de choque térmico, se transloca al núcleo y se une a secuencias específicas del DNA (AREs), lo que permite el reclutamiento de coactivadores que facilitan el proceso de transcripción. Mecanismos no clásicos: (2) La testosterona interactúa con el RA. El RA es reclutado y activado por Src, causando la activación del receptor a EGF (EGFR) a través de una vía intracelular. EGFR activa la cascada de MAP quinasa a través de Ras, que resulta en la activación secuencial de RAF y MEK, y a su vez activa a la quinasa p90Rsk que fosforila al factor de transcripción CREB. (3) La testosterona induce rápidamente el paso de $[Ca^{2+}]$ en las células de Sertoli a través de canales tipo L de $[Ca^{2+}]$. La testosterona interactúa con un receptor en la membrana plasmática que tiene características de una proteína Gq unida a un receptor acoplado a proteínas G (GPCR). La fosfolipasa C (PLC) es activada para escindir a PIP_2 en IP_3 y diacilglicerol (DAG). La disminución de PIP_2 promueve el cierre de canales K^+_{ATP} provocando la despolarización de los canales tipo L dependientes de $[Ca^{2+}]$ y la entrada de $[Ca^{2+}]$ (Walker, 2011).

3.5. Receptor a andrógenos (RA)

El RA pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y funciona como un factor de transcripción activado por ligando (Dorantes, 2012). Está implicado en la diferenciación sexual, desarrollo y expresión del fenotipo masculino. Se han identificado dos isoformas del RA, las cuales se denominan RA-A (87 kDa en el humano) y RA-B (110 kDa en el humano) (Liegibel *et al.*, 2003). En un experimento previo se observó que la isoforma B constituye más del 80% del RA inmunoreactivo en diferentes tipos celulares, mientras que la isoforma A sólo constituye un 20% (Gao *et al.*, 1998). Además se ha observado que la isoforma B es la forma predominante o la única especie inmunoreactiva del RA en diferentes tejidos humanos (Wilson *et al.*, 1996).

El gen del RA está localizado en el brazo largo del cromosoma X (q11-12) y consta de ocho exones que abarcan una región de 1810 pb de ADN genómico en la rata y el humano. Consta de cuatro dominios estructurales y funcionalmente distintos que en conjunto median las acciones genómicas de la testosterona en los tejidos blanco de andrógenos (**Figura 5**). El C-terminal de la proteína consta de un dominio de unión al ligando (LBD) y dimerización del receptor. El dominio LBD está codificado por los exones 4-8. Los aminoácidos centrales 60-100, codificados por los exones 2 y 3, representan el dominio de unión al ADN (DBD), y son responsables de la unión del receptor a secuencias específicas en el genoma asociadas con sus genes blanco. El dominio N-terminal (NTD) está codificado por un solo exón (exón 1), y se encuentra implicado en la regulación transcripcional (McEwan, 2004).

Los antagonistas androgénicos o antiandrógenos se unen de forma competitiva al RA e interfieren con la acción y asociación andrógenos-RA. En general existen dos clases de antagonistas androgénicos, los de naturaleza esteroide y los no esteroides. Los antagonistas esteroideos tales como el acetato de ciproterona pueden exhibir propiedades parciales de agonistas con el RA y otros miembros de la familia de receptores de esteroides. En contraste, los antagonistas no esteroideos tales como la flutamida se consideran generalmente antiandrógenos puros, ya que no presentan actividad agonista del RA. Aunque algunas veces, tanto

antiandrógenos no esteroideos como esteroideos pueden carecer de acciones antagonistas y/o actuar como agonistas parciales del RA (Nguyen *et al.*, 2007).

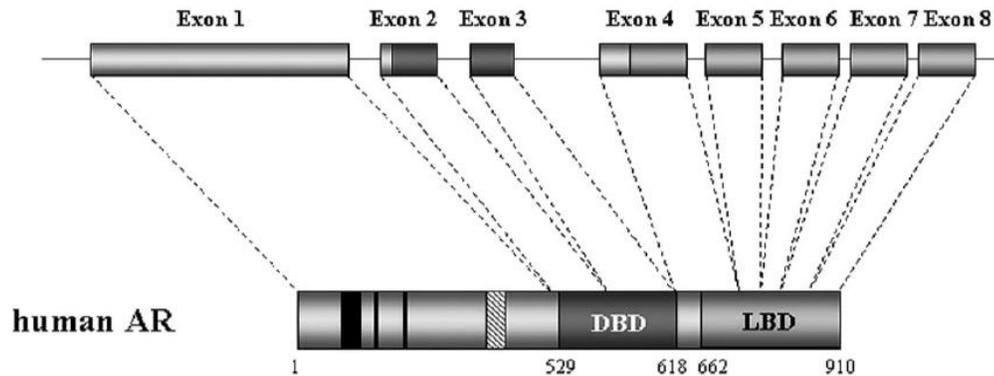


Figura 5. Esquema representativo de los dominios funcionales del RA. Los números indican las posiciones de los aminoácidos que delinean el inicio y término de cada dominio. Exón 1: dominio N-terminal (NTD), DBD: dominio de unión al ADN, LBD: dominio de unión al ligando (McEwan, 2004).

3.6. Efectos de la testosterona en el crecimiento tumoral

La importancia de los andrógenos en el desarrollo del cáncer de próstata (CaP) ha sido conocida durante más de medio siglo, ya que se sabe que el crecimiento del CaP es altamente dependiente de éstos (Linja, 2004). Por lo cual, durante mucho tiempo la terapia de privación de andrógenos ha sido el tratamiento inicial estándar para el CaP avanzado. Aunque con el tiempo, las respuestas a la terapia de privación de andrógenos dan lugar a la progresión del cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) y la necesidad de un cambio en el tratamiento o manejo de la enfermedad (Sharifi, 2013).

Estudios sobre la terapia de reemplazo hormonal en mujeres sugieren efectos tanto benéficos como perjudiciales (Hyde *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la terapia con testosterona puede reducir el riesgo de cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas, así como el crecimiento del tumor de mama en modelos animales (Arumugam *et al.*, 2014). Con respecto a la mama en particular, la

testosterona exógena tiene el potencial para ejercer ya sea acciones androgénicas o indirectamente acciones estrogénicas, con este último aumentando potencialmente el riesgo de cáncer de mama (Somboonporn *et al.*, 2004).

También se ha informado una asociación negativa entre niveles altos de testosterona y la mortalidad por cáncer de pulmón, aunque no ha habido casos suficientes para llevar a cabo un análisis multivariante. Además, la testosterona estimula la proliferación de cáncer de pulmón de células pequeñas en líneas celulares (Hyde *et al.*, 2012). Los tumores de pulmón de hombres y mujeres también expresan CYP19 (aromatasa), enzima limitante en la síntesis de estrógenos que convierte la testosterona a estrona y 17β -estradiol. Por lo tanto, la testosterona actúa como un precursor para la producción de estrógenos en los tumores de pulmón, independientemente de los órganos reproductivos (Siegfried *et al.*, 2014).

En supervivientes de cáncer testicular a menudo se ha demostrado una disminución en los niveles de testosterona, así como una elevación en los niveles de la hormona luteinizante, con tasas de hipogonadismo bioquímico de 15-40% reportado en un seguimiento mínimo de 5 años. Los mecanismos de deficiencia de testosterona en los supervivientes de cáncer testicular son multifactoriales, e incluyen preexistentes defectos testiculares, la sustitución de las células de Leydig por tumores o su pérdida por la orquidectomía bilateral, los efectos de la quimioterapia y la radioterapia, y el avance de la edad (O’Carrigan *et al.*, 2014).

En un estudio que tuvo como objetivo investigar el papel del RA en la patogénesis de glioblastomas multiformes como motivo de su alta incidencia en los hombres adultos, se encontró que la expresión del RA era mayor en pacientes con glioblastoma multiforme en comparación con el tejido cerebral normal de los mismos pacientes. Además, se observó la expresión del RA en 8 líneas celulares derivadas de glioblastomas multiformes, A172, LN-18, LN-229, M059, T-98G, U87-MG, U118-MG y U138-MG. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la señalización del RA puede desempeñar un papel importante en el crecimiento de glioblastomas multiformes en hombres (Yu *et al.*, 2014).

En relación al metabolismo de la testosterona y como se mencionó anteriormente, el estradiol es un estrógeno producido a partir de la testosterona. Los

estrógenos son hormonas sintetizadas por la enzima aromatasa, la cual ha sido utilizada como biomarcador en cáncer de mama y pulmón. Las actividades biológicas de los estrógenos son ejecutadas por sus receptores clásicos (ER α y ER β), de los cuales, el ER α ha sido descrito como un promotor, mientras que ER β como un posible supresor de tumores (Dueñas *et al.*, 2014). En un estudio realizado en biopsias de pacientes con astrocitomas de diferentes grados de malignidad (I-IV), se evaluó la expresión de la aromatasa y del RE, así como la concentración de estradiol (E₂) en dichas biopsias. Se observó que la concentración de E₂ aumentó conforme aumentaba el grado de malignidad de los astrocitomas. Por el contrario, la expresión del ER α disminuyó conforme aumentaba el grado de malignidad, y su decremento mostró una correlación negativa tanto con la concentración de E₂ como con el riesgo de muerte.

Por otro lado, la aromatasa se expresó en todas las muestras independientemente del grado de malignidad, la edad y el género. Además, su expresión aumentó conforme al grado de malignidad, mostrando una correlación negativa con la supervivencia de los pacientes, así como una correlación positiva con la concentración de E₂. Lo cual favorece la idea de que los glioblastomas multiformes podrían ser tumores dependientes de estrógenos que podrían formarse a partir de andrógenos (Dueñas *et al.*, 2014).

En tumores cerebrales se ha demostrado que la testosterona induce proliferación celular en la línea celular T98G de glioblastoma multiforme. Para este ensayo las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de testosterona (5, 10, 500, 1000, 5000 y 10,000 nM) y se incubaron durante 5 días a una temperatura de 37°C. Al día 5 se realizó un conteo celular por medio del ensayo MTT, donde se obtuvo que a la concentración 1000 nM, la testosterona incrementó la viabilidad celular (Merritt *et al.*, 2007). Por otro lado, en un estudio realizado con muestras de tejido de tumores neuroepiteliales, se observó que la testosterona inhibió su crecimiento a concentraciones de 50, 10, 2 y 0.4 $\mu\text{g/ml}$ (Paoletti *et al.*, 1990).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los astrocitomas son más frecuentes en hombres que en mujeres en una proporción de 3:2, la cual es más evidente en los astrocitomas de mayor grado de evolución. Sin embargo, se desconoce el efecto de los andrógenos sobre el crecimiento de estos tumores, por lo que en este proyecto se estudió el efecto de la testosterona sobre el crecimiento de la línea celular U87 derivada de astrocitomas humanos de grado IV.

5. HIPÓTESIS

La testosterona aumentará el crecimiento de células U87 derivadas de astrocitomas humanos de grado IV a través de la interacción con el RA.

6. OBJETIVOS

Objetivo general

- Caracterizar el efecto de la testosterona sobre el crecimiento de células U87 derivadas de astrocitomas humanos de grado IV.

Objetivos particulares

- Determinar la concentración de la testosterona que modifique el número de células U87.
- Evaluar la expresión del RA en células U87.

7. METODOLOGÍA

7.1. Cultivo celular

La línea celular de astrocitomas humanos U87 (grado IV) fue cultivada en medio DMEM con rojo fenol adicionado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Las células se incubaron bajo condiciones estandarizadas de 37°C, 95% aire - 5% CO₂ y 95% de humedad. El medio fue cambiado cada 48 horas hasta alcanzar una confluencia celular de 70- 80%.

7.2 Conteo celular

En cajas de 24 pozos se sembraron homogéneamente 10,000 células derivadas de astrocitomas humanos de grado IV, las cuales se trataron con testosterona a diferentes concentraciones (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 µM) durante 5 días. El vehículo que se utilizó fue etanol al 10%. Posteriormente, para determinar el efecto de la testosterona sobre el número de células U87, se cuantificaron las células vivas durante 5 días consecutivos por medio de la técnica de tinción por exclusión con colorante azul de tripano, un colorante vital que no se absorbe por células viables, utilizando una cámara de Neubauer. Una vez obtenida la concentración de testosterona que modificó significativamente el número de células U87, se sembraron 10,000 células derivadas de astrocitomas humanos de grado IV en cajas de 24 pozos, los cuales se trataron con vehículo (Etanol al 10%), testosterona (10 nM), Flutamida (5 µM) o flutamida + testosterona durante 5 días. La flutamida se agregó una hora antes de adicionar la testosterona. Posteriormente se cuantificaron las células vivas durante 5 días consecutivos.

7.3 Expresión del RA

7.3.1 Tratamientos

En cajas de 6 pozos se sembraron homogéneamente 100,000 células derivadas de astrocitomas humanos de grado IV, las cuales se trataron con

testosterona 10 nM, flutamida 5 μ M o flutamida + testosterona durante 24 horas. El vehículo que se utilizó fue etanol al 10%.

7.3.2 Extracción de proteínas totales

Con la finalidad de determinar la expresión del RA, se realizó la extracción de proteínas a partir de las células U87, para lo cual, se les agregaron 500 μ L de amortiguador RIPA con una mezcla de inhibidores de proteasas [Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Nonidet P-40/Tritón 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1 mM, AEBSF (amino etil bencenil sulfonil fluoruro) 2 mM, aprotinina 0.3 μ M, bestatina 130 μ M, E-64 14 μ M, leupeptina 1 μ M y PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 100 μ g/mL] a 4°C y se incubaron durante 1 hora en hielo. Para asegurar el lisado de las células, las muestras se hicieron pasar a través de una aguja de 21G x 32 mm. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 min a 4°C, se separó el sobrenadante y fue almacenado a 4°C en tubos eppendorf de 1.5 mL para su posterior cuantificación y separación de las proteínas mediante electroforesis. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó espectrofotométricamente a 280 nm en un Thermo Scientific NanoDrop.

7.3.3 Western blot

100 μ g de proteína total, se mezclaron con amortiguador de Laemmli 2X (Tris-base pH 6.8 100 mM, azul de bromofenol al 0.1%, glicerol al 20%, SDS al 4%, β -mercaptoetanol al 10%) en una proporción proteína-amortiguador de 2:1 (v/v) a 4°C, se hirvieron durante 5 min. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 7.5%. Las muestras se desplazaron en el gel concentrador (poliacrilamida al 4%) a 80 volts y posteriormente se separaron en el gel de corrida (poliacrilamida al 7.5%) a 80 volts durante 2 horas. Las proteínas fueron transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) a 60 mA durante 3 h en una cámara semihúmeda. Posteriormente, las membranas se

bloquearon con una solución rica en proteínas al 3% (GE Healthcare) en TBS-Tween durante 2 h a 37°C. Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario anti-RA en una dilución 1:500 (0.4 µg/mL) (rabbit anti-AR polyclonal antibody sc-815, Santa Cruz, CA, USA). Posteriormente fueron lavadas con TBS-Tween 3 veces durante 5 minutos e incubadas a temperatura ambiente durante 45 min con un anticuerpo secundario “mouse anti-rabbit” conjugado a peroxidada (IgG-HRP, Santa Cruz sc-2357) en una dilución de 1:7500 (0.05 µg/mL). Las membranas fueron lavadas con glicina ácida (pH= 2.5) durante 1 h a 50°C y se bloquearon durante 2 h a 37°C. Posteriormente se incubaron con anticuerpo primario anti- α tubulina en una dilución 1:1000 (0.2 µg/mL) (mouse anti- α tubulina monoclonal antibody sc-5286, Santa Cruz, CA, USA) como control de carga. Finalmente, fueron lavadas con TBS-Tween 3 veces durante 5 minutos e incubadas a temperatura ambiente durante 45 min con un anticuerpo secundario “goat anti-mouse” conjugado a peroxidada (IgG-HRP, Santa Cruz sc-2005) en una dilución de 1:5000 (0.08 µg/mL). Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la presencia de las proteínas estudiadas. Con este sistema, el peróxido de luminol junto con un activador son sustrato de la peroxidasa, que acoplada al anticuerpo secundario reaccionan y generan una señal de quimioluminiscencia la cual es detectada al exponer las membranas a placas fotográficas (Kodak BioMax light film).

7.4 Análisis densitométrico y estadístico

Las imágenes obtenidas fueron sometidas a un análisis densitométrico mediante el uso del Software ImageJ, para analizar las bandas obtenidas por western blot y cuantificar la expresión de la proteína del RA.

A los datos obtenidos se les realizó un análisis estadístico a través de la prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba Post Hoc de Bonferroni para la comparación de cada tratamiento con el control. Se utilizó el programa GraphPad Prism 4 para calcular los valores de probabilidad. En todas las pruebas estadísticas

se utilizó un intervalo de confianza del 95% por lo que se consideraron como estadísticamente significativos aquellos datos que tuvieron un valor de $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Efecto de la testosterona sobre el número de células U87 derivadas de astrocitomas humanos de grado IV.

Para determinar el papel de la testosterona en el crecimiento de astrocitomas humanos de grado IV, las células U87 fueron tratadas con testosterona a diferentes concentraciones (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M) durante 5 días. El conteo celular se realizó durante 5 días consecutivos por medio de la técnica de tinción por exclusión con colorante azul de tripano.

En la **figura 6** se puede observar que las concentraciones 1 nM, 100 nM y 1 μ M de testosterona no produjeron ningún cambio significativo en el número de células a lo largo de los 5 días en comparación con el control, sin embargo, a la concentración 10 nM se observó una disminución significativa en el número de células a partir del tercer día de cultivo.

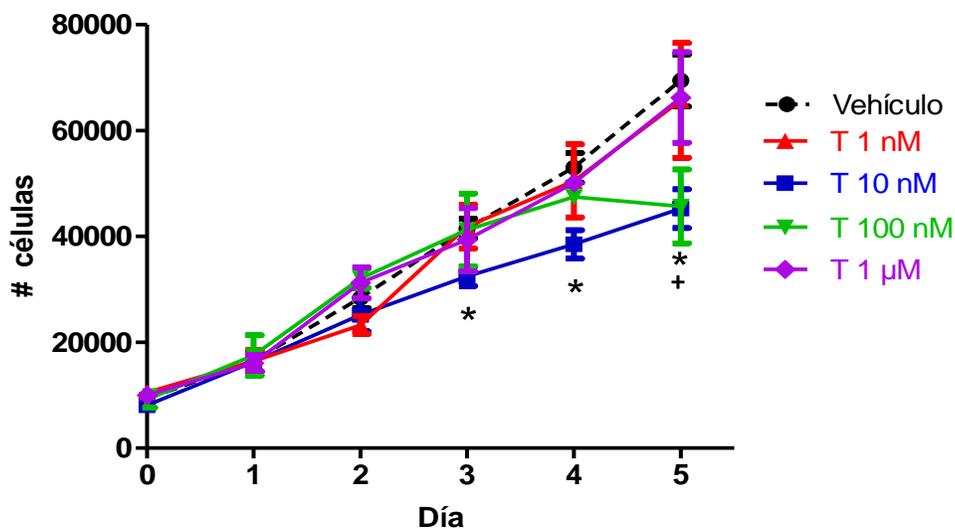


Figura 6. Efectos de la testosterona sobre el número de células U87. Resultados del conteo celular de células U87 a diferentes concentraciones de testosterona (T) (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M) durante 5 días. Cada punto representa la media \pm E.S, n=5. *p < 0.05 T (10 nM) vs vehículo. *p < 0.05 T (100 nM) vs vehículo.

8.2 Efecto de la testosterona sobre la viabilidad de células U87 derivadas de astrocitomas humanos de grado IV.

En la **figura 7** se muestra que a lo largo de 5 días de tratamiento con testosterona, no se observaron cambios en la viabilidad de las células a las concentraciones de 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M; sin embargo, al día 5 del tratamiento con testosterona 10 nM, se observó una disminución significativa en la viabilidad celular en comparación con el vehículo.

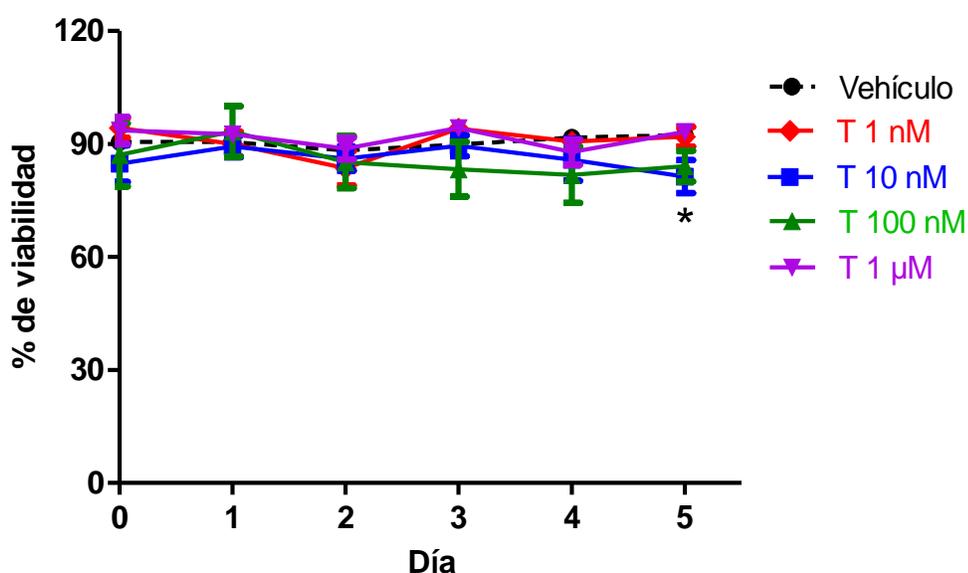


Figura 7. Efectos de la testosterona sobre la viabilidad de células U87. Resultados obtenidos de la cuantificación de células U87 a diferentes concentraciones de testosterona (T) (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M) durante 5 días. Cada punto representa la media \pm E.S, n=5. *p < 0.05 T (10 nM) vs vehículo.

8.3 Efecto de la flutamida sobre el número de células U87 derivadas de astrocitomas humanos de grado IV.

Para determinar si el RA está involucrado en el mecanismo de acción por medio del cual la testosterona disminuyó el número de células U87 de astrocitomas

humanos, las células fueron tratadas con flutamida (5 μM), un antagonista competitivo del RA; testosterona (10 nM); y flutamida (5 μM) + testosterona (10 nM) durante 5 días. El conteo celular se realizó durante 5 días consecutivos por medio de la técnica de tinción por exclusión con colorante azul de tripano.

En la **figura 8** se puede observar que, tanto la flutamida como el tratamiento conjunto presentaron el mismo comportamiento que la testosterona, disminuyendo significativamente el número de células en comparación con el vehículo a partir del tercer día de cultivo. Por otra parte, no hubo cambios significativos entre los diferentes tratamientos.

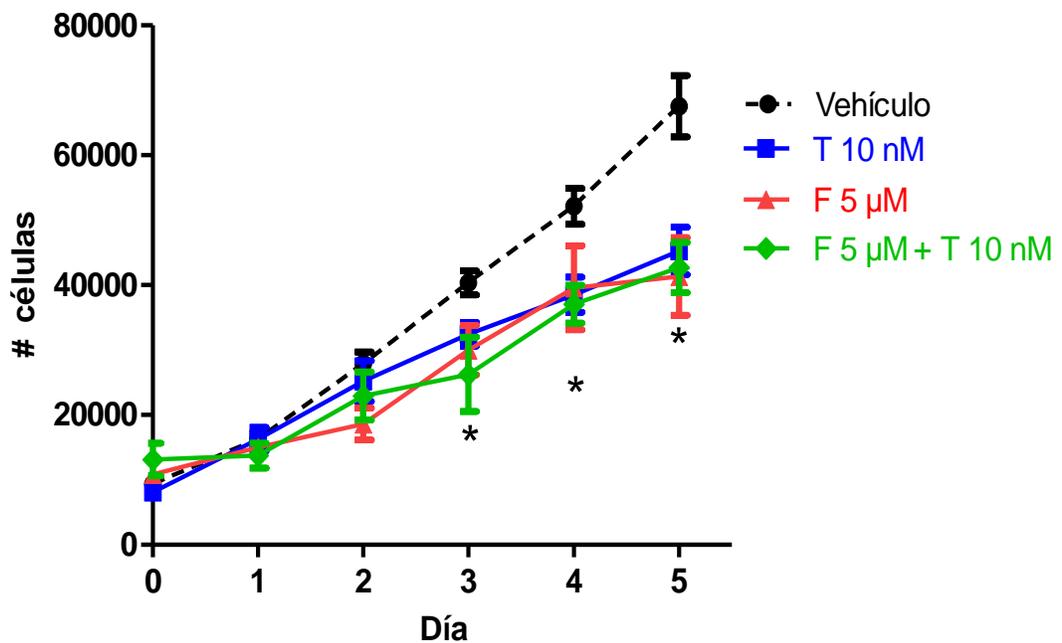


Figura 8. Efectos de la flutamida sobre el número de células U87. Resultados del conteo celular de células U87 con vehículo (etanol al 10%), testosterona (T) (10 nM), flutamida (F) (5 μM), y F (5 μM) + T (10 nM) durante 5 días. Cada punto representa la media \pm E.S, n=3. *p < 0.05 T (10 nM), F (5 μM), F (5 μM) + T (10 nM) vs vehículo.

8.4 Efecto de la flutamida sobre la viabilidad de células U87 derivadas de astrocitomas humanos de grado IV.

En la **figura 9** se puede observar que a lo largo de 5 días la flutamida (5 μM) no modificó la viabilidad celular. El único efecto observado fue la disminución en la viabilidad celular producida por la testosterona en el día 5, como se había encontrado previamente (**figura 7**).

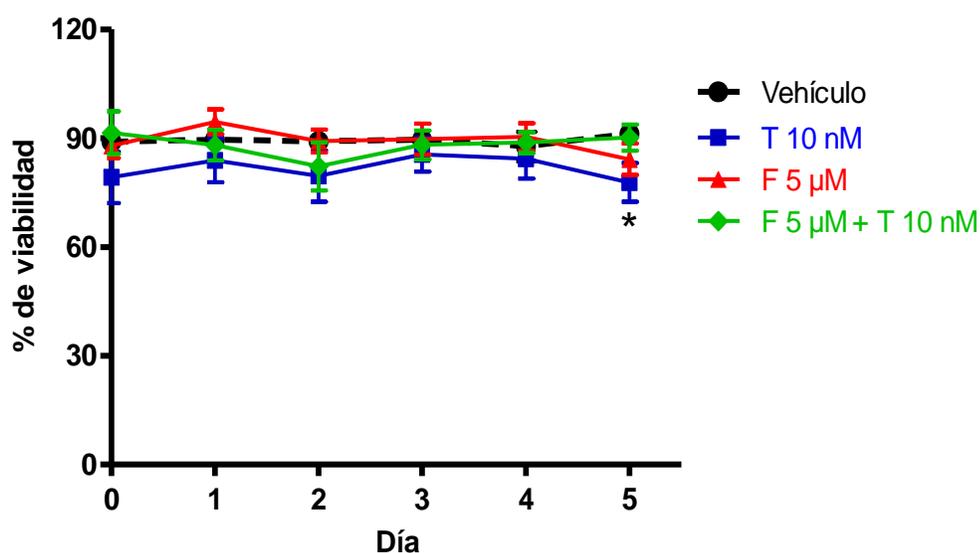


Figura 9. Efectos de la flutamida sobre la viabilidad de células U87. Resultados obtenidos de la cuantificación de células U87 con vehículo (etanol al 10%), testosterona (T) (10 nM), flutamida (F) (5 μM), y F (5 μM) + T (10 nM) durante 5 días. Cada punto representa la media \pm E.S, n=3. *p < 0.05 T (10 nM) vs vehículo.

8.5 Expresión del RA

En la **figura 10** se observa que la expresión del RA es mayor en las células incubadas en el medio basal sin ningún tratamiento en comparación con los tratamientos de testosterona, flutamida, testosterona + flutamida y del vehículo. Por

otro lado, los demás tratamientos no presentaron diferencias significativas en comparación con el vehículo.

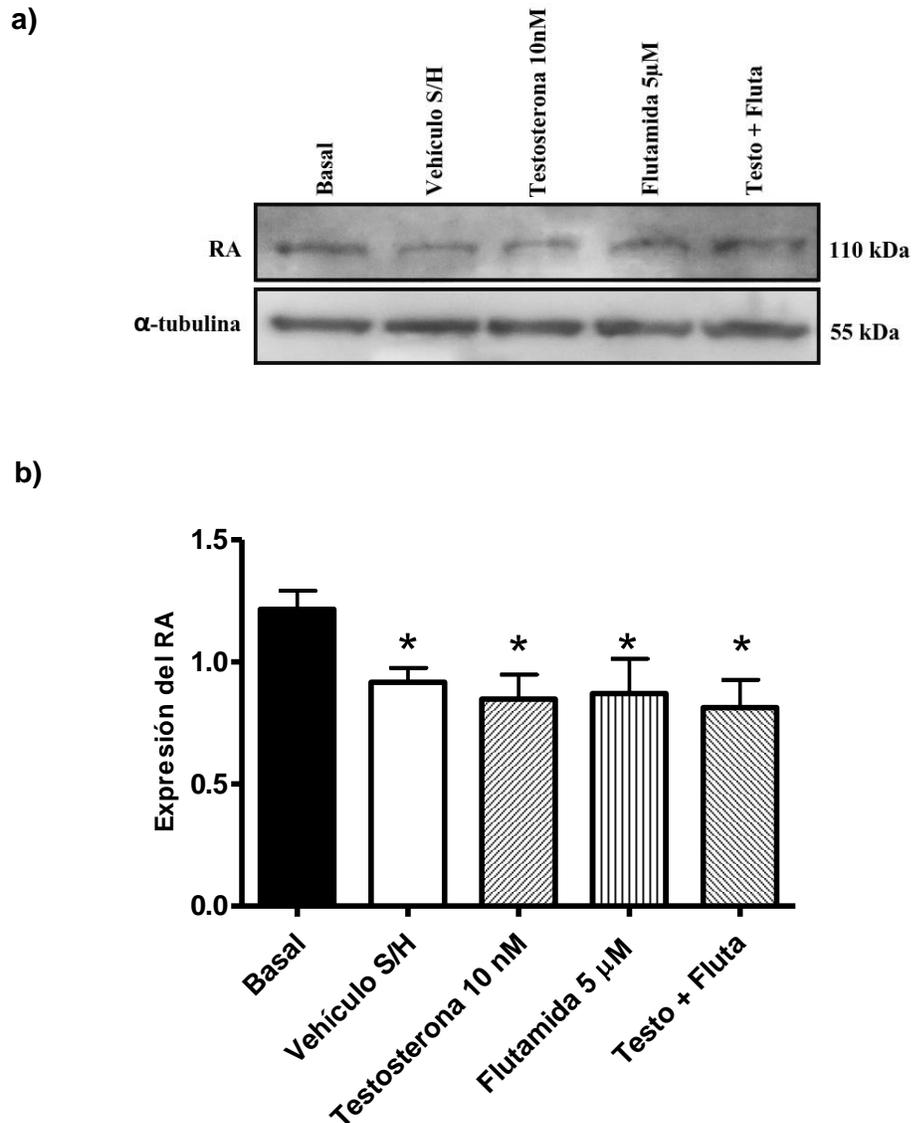


Figura 10. Expresión del RA en células U87. **a.** Resultados obtenidos del western blot de células incubadas en un medio DMEM con rojo fenol adicionado con SFB al 10% (basal), y tratamientos con vehículo sin hormonas (S/H) (etanol al 10%), testosterona (10 nM), flutamida (1 μ M) y flutamida + testosterona durante 24 horas. **b.** Análisis densitométrico de los experimentos de western blot. Cada barra representa la media \pm E.S, n=3. *p < 0.05 vs tratamiento basal.

9. DISCUSIÓN

Los andrógenos están implicados en la regulación de varios procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo el crecimiento tumoral (Chang Liu, *et al.* 2014). De acuerdo con estudios anteriores, se ha demostrado que en tumores cerebrales la testosterona induce proliferación celular en la línea celular T98G de glioblastoma multiforme (Merritt *et al.*, 2007), así como la inhibición del crecimiento de tumores neuroepiteliales (Paoletti *et al.*, 1990). De acuerdo con nuestros resultados, en la línea celular U87 derivada de astrocitomas humanos de grado IV, se puede observar que la testosterona (10 nM) disminuye significativamente el crecimiento de las células a partir del tercer día de tratamiento en comparación con el vehículo (**figura 6**). La única concentración de testosterona a la cual se observó una disminución significativa en la viabilidad de las células, en comparación con el vehículo, fue 10 nM al día 5 de tratamiento (**figura 7**).

Por otro lado, el tratamiento con flutamida (5 μ M) disminuyó significativamente el crecimiento de células U87 en comparación con el vehículo, comportándose de la misma manera que la testosterona. La flutamida no antagonizó el efecto de la testosterona, sino que tuvo el mismo comportamiento que la testosterona, disminuyendo significativamente el crecimiento de las células en comparación con el vehículo (**figura 8**). De acuerdo con los antecedentes descritos, generalmente la flutamida se considera un antiandrógeno puro, ya que no presenta actividad agonista del RA. Aunque algunas veces, los antiandrógenos pueden carecer de acciones antagonistas y/o actuar como agonistas parciales del RA (Nguyen *et al.*, 2007). Por ejemplo, mutaciones en el RA pueden alterar las actividades antagonistas y agonistas de los antiandrógenos, tal es el caso de la mutación del RA de la línea celular de cáncer de próstata humana LNCaP, Thr877 a Ala, la cual aumenta la actividad agonista de la hidroxiflutamida, metabolito activo de la flutamida. Otras mutaciones en el dominio de unión a ligando del RA en muestras de cáncer de próstata incluyen Leu 701 a His, Val 730 a Met, Val 715 a Met, Arg 726 a Leu, y His 874 a Tyr, entre otras. Algunas de estas mutaciones aumentan la activación transcripcional a través de la hidroxiflutamida, y otras alteran la especificidad de unión del ligando de la activación del RA (Kempainen *et al.*, 1996).

Por ejemplo, en algunos paradigmas, los antiandrógenos no logran bloquear la señalización inducida por andrógenos o aquella mediada por el RA, pudiendo imitar también los efectos de los andrógenos (Nguyen *et al.*, 2007). Por lo que los resultados observados podrían deberse a una mutación en el RA, la cual pudo haber provocado una alteración en la actividad antagonista de la flutamida e imitar así los efectos de la testosterona, sin embargo, es necesario realizar estudios para verificar esta sospecha.

En cuanto a la expresión del RA, recientemente se ha reportado su presencia en 8 líneas celulares derivadas de glioblastoma multiforme, incluyendo la línea U87 (Yu *et al.*, 2014), lo cual fue confirmado con nuestros resultados. De acuerdo con los datos obtenidos, se puede observar en la **figura 10** que el RA se encuentra presente en las células U87, independientemente de los tratamientos con testosterona y flutamida, y que su expresión no presentó cambios significativos entre éstos. Lo cual conlleva a dos posibilidades: una de estas es que el efecto observado por la testosterona se lleva a cabo por la unión de ésta a su receptor, y que la flutamida actúa como agonista del RA. La otra posibilidad es que la testosterona no lleve a cabo su efecto por medio de la unión con su receptor, dejando la posibilidad de que la testosterona actúe por medio de algún mecanismo de señalización no genómico.

La expresión del RA en las células U87, independiente de andrógenos, también sugiere que éste puede estar implicado en otras funciones en los astrocitomas como la migración e invasión, que son eventos fundamentales en la infiltración tumoral. Se ha demostrado que el RA está relacionado con el desarrollo de diversos tipos de cáncer, como el cáncer gástrico, fibrosarcoma y cáncer de próstata, mediante el incremento en la migración e invasión celulares en respuesta a diversos estímulos, incluyendo factores inflamatorios (Zhang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013).

Contrario a nuestra hipótesis de trabajo, encontramos que la testosterona disminuye el crecimiento de células derivadas de astrocitomas humanos, por lo que probablemente la testosterona no sea el único factor involucrado en la mayor prevalencia de glioblastomas humanos que se presenta en hombres adultos.

Posiblemente, esta prevalencia se deba a factores externos que propician el desarrollo de astrocitomas humanos, y una vez que haya iniciado el cáncer, los mecanismos moleculares por medio de los cuales se propaga pueden ser diversos.

10. CONCLUSIONES

- La testosterona (10 nM) y la flutamida (5 μ M) disminuyen el número de células U87 derivadas de astrocitomas humanos de grado IV.

- La línea U87 expresa al RA y dicha expresión es independiente de andrógenos.

REFERENCIAS

- Almeida, O, Waterreusa, A, Spryb, N, Flickerc, L, Martins, R (2004). One year follow-up study of the association between chemical castration, sex hormones, beta-amyloid, memory and depression in men. *Psychoneuroendocrinology* (29): 1071–1081.
- Arko, L, Katsyv, I, Park, GE, Luan, WP, and Park, JK (2010). Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. *Pharmacology & Therapeutics* (128): 1-36.
- Arumugam, A, Lissner, E, Lakshmanaswamy, R (2014). The role of hormones and aromatase inhibitors on breast tumor growth and general health in a postmenopausal mouse model. *Reproductive Biology and Endocrinolog: RB&E*, 12(1): 66.
- Badash, M (2009). Astrocitoma. New York: New York University Medical Center.
- Basu, S, Tindall, D (2010). Androgen Action in Prostate Cancer. *HormCanc* (1):223–228.
- Brandes, AA, Tosoni, A, Franceschi, E, Reni, M, Gatta, G, Vecht, C (2008). Glioblastoma in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*67, 139-152.
- Bristol, RE (2009). Low-grade glial tumors: are they all the same? *SeminPediatrNeurol* 16(1): 23-26.
- Buckner, JC, Brown, PD, O’Neill, BP, Meyer, FB, Wetmore, CJ, Uhm, JH (2007). Central Nervous System Tumors. *Mayo ClinProc* 82(10): 1271-1286.
- Camacho-Arroyo, I, González-Agüero, G, Gamboa-Dominguez, A, Cerbon, MA, Ondarza, R (2000). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas. *J Neurooncol* 49(1): 1-7.
- Chang, L, Yanlei, Z, Kaiyuan, Z, Chen, B, Yangang Z, Jiqiang, Z (2014). Expression of estrogen receptors, androgen receptor and steroid receptor coactivator-3 is negatively correlated to the differentiation of astrocytic tumors. *Cancer Epidemiology* (26): 1-7.
- Daumas-Duport, C, Scheithauer, B, O’Fallon, J, Kelly, P (1988). Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 62 (10): 2152-2165.

- Dorantes, A, Martinez, C, Guzmán, A (2012). Endocrinología clínica; Testículos. 4a edición. México: *El Manual Moderno*. p.p 693-697.
- Dueñas, J, Candanedo, A, Santerre, A, Orozco, S, Sandoval, H, Feria, I, López, R, Alonso, M, Netel, B, de la Torre, B, Dueñas, S (2014). Aromatase and estrogen receptor alpha mRNA expression as prognostic biomarkers in patients with astrocytomas. *J Neurooncol* (119):275–284.
- Edward, A, Longo, D (2005). Principios del tratamiento del cancer: cirugía, quimioterapia y tratamiento biológico. In: HARRISON, Principios de Medicina Interna, Kasper D., Braunwald E., Fauci A., Hauser S., Longo D., Jameson J., Isselbacher K (eds). 16a edición. México: *McGrawHill/Interamericana de México*. p.p 2804-2820.
- Farrell, CJ, Plotkin, SR (2007). Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. *NeuroClin* (25):925-46.
- Fisher, JL, Schwartzbaum, JA, Wrensch, M, Wiemels, JL (2007). Epidemiology of brain tumors. *NeuroClin* (25):867-90.
- Fix, C, Jordan, C, Cano, P, Walker, WH (2004). Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (101):10919-24.
- Fleishman, SB, Khan, H, Homel, P, Suhail, MF, Strebel-Amrhein, R, Mohammad, F, Suppiah, K (2010). Testosterone levels and quality of life in diverse male patients with cancers unrelated to androgens. *Journal of Clinical Oncology* 28(34): 5054-60.
- Flores, F, Cabeza, A, Calarco, E (2005). Endocrinología; Testículo. 5a edición. México: *Méndez editors*. p.p 281-293.
- Furnari, FB, Fenton, T, Bachoo, RM, Mukasa, A, Stommel, JM, Stegh, A, Hahn, WC, Ligon, KL, Louis, DN, Brennan, C, Chin, L, DePinho, RA, Cavenee, WK (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21 (21): 2683-2710.

- Gao, T, McPhaul, M (1998). Functional activities of the A and B forms of the human androgen receptor in response to androgen receptor agonists and antagonists. *Molecular Endocrinology* 12(5):654-63.
- González-Agüero, G, Gutierrez, AA, González-Espinoza, D, Solano, JD, Morales, R, González-Arenas, A, Cabrera-Muñoz, E, Camacho-Arroyo, I (2007). Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 32(2): 129-135.
- González-Agüero, G, Ondarza, R, Gamboa-Domínguez, A, Cerbon, MA, Camacho-Arroyo, I (2001). Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull* 56(1): 43-48.
- Hadjipanayis, CG, Van Meir, EG, (2009). Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends Mol Med* 15(11): 519-530.
- Hyde, Z, Flicker, L, McCaul, K, Almeida, OP, Hankey, GJ, Chubb, SP, Yeap, BB (2012). Associations between testosterone levels and incident prostate, lung, and colorectal cancer. A population-based study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 21(8): 1319–29.
- Ichimura, K, Ohgaki, H, Kleihues, P, Collins, VP (2004). Molecular pathogenesis of astrocytic tumors. *J Neurooncol* 70(2): 137-160.
- Jara, A, González, G (2001). Endocrinología; Fisiopatología de la cortezasuprarrenal. 1a edición. México: *Editorial MédicaPanamericana*. p.p 235-241.
- Kemppainen, JA, Wilson, EM (1996). Agonist and antagonist activities of hydroxyflutamide and Casodex relate to androgen receptor stabilization. *Urology* (48):157–163.
- Liegibel, UM, Sommer U, Boercsoek, I, Hilscher, U, Bierhaus, A, Schweikert, HU, Nawroth, P, Kasperk C (2003). Androgen receptor isoforms AR-A and AR-B display functional differences in cultured human bone cells and genital skin fibroblasts. *Steroids* (68): 1179–1187.
- Linja, MJ, Visakorpi, T (2004). Alterations of androgen receptor in prostate cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 92(4): 255–64.

- Louis, DN, Ohgaki, H, Wiestler, OD, Cavenee, WK, Burger, PC, Jouvet, A, Scheithauer, BW, Kleihues, P (2007). The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114(2): 97-109.
- McEwan, IJ (2004). Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure–function analysis of the AF-1 domain. *Endocrine-Related Cancer* (11): 281–293.
- McKenna, NJ, Lanz, RB, O'Malley, BW (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20(3): 321-344.
- McKinley, BP, Michalek, AM, Fenstermaker, RA, Plunkett, RJ (2000). The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995. *J Neurosurg* 93(6): 932-939.
- Merritt, R, Foran, C (2007). Influence of Persistent Contaminants and Steroid Hormones on Glioblastoma Cell Growth. *J Toxicol Environ Health A*. 70(1):19-27.
- Micheli, F, Fernández, M (1996). Neurología del anciano. 1a edición. Buenos Aires: *Editorial Médica Panamericana*. p.p 305-311.
- Muraleedharan, V, Hugh Jones, T (2014). Testosterone and mortality. *Clinical Endocrinology* 9–17.
- Nguyen, T, Yao, M, Pike, C (2007). Flutamide and Cyproterone Acetate Exert Agonist Effects: Induction of Androgen Receptor-Dependent Neuroprotection. *Endocrinology* 148(6):2936–2943.
- O'Carrigan, B, Fournier, M, Olver, IN, Stockler, MR, Whitford, H, Toner, GC, Grimison, P (2014). Testosterone deficiency and quality of life in Australasian testicular cancer survivors: a prospective cohort study. *Internal Medicine Journal* 44(8): 813–7.
- Paoletti, P, Butti, G, Zibera, C, Scerrati, M, Gibelli, N, Roselli, R, Magrassi, L, Sica, G, Rossi, G, Robustelli della Cuna, G (1990). Characteristics and biological role of steroid hormone receptors in neuroepithelial tumors. *J Neurosurg* 73 (5):736-42.

- Pérez, OL, Rodríguez, RE, Figueredo, RR, Barroso, GE (2001). Astrocitoma anaplásico y glioblastoma multiforme. Factores que influyen en la supervivencia. *Rev Cubana Cir* 40(2): 87-91.
- Sarkar, C, Jain, A, Suri, V (2009a). Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian J Cancer* 46(2): 108-119.
- Sarkar, C, Jain, A, Suri, V (2009b). Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian J Cancer* 46(2): 108-119.
- Schwartzbaum, JA, Fisher, JL, Aldape, KD, Wrensch, M (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pr. Neurol* (2): 494-503.
- Sharifi, N (2013). Mechanisms of androgen receptor activation in castration-resistant prostate cancer. *Endocrinology* 154(11): 4010–7.
- Siegfried, JM (2014). Smoking out reproductive hormone actions in lung cancer. *Molecular Cancer Research* 12(1): 24–31.
- Somboonporn, W, Davis, SR (2004). Testosterone effects on the breast: implications for testosterone therapy for women. *Endocrine Reviews* 25(3): 374–88.
- Tihan, T, Bloomer, MM (2010). Astrocytic neoplasms of the central nervous system and orbit: a morphologic perspective. *Seminars in Diagnostic Pathology* (27): 114-121.
- Walker, W (2010). Non-classical action of testosterone and spermatogenesis. *Phil.Trans.R.Soc.B* (365): 1557–1569.
- Walker, W (2011). Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Landes Bioscience* 1(2):116-120.
- Wang, X, Lee, SO, Xia, S, Jiang, Q, Luo, J, Li, L, Yeh, S, Chang, C (2013). Endothelial cells enhance prostate cancer metastasis via IL-6→androgen receptor→TGF-β→MMP-9 signals. *Mol Cancer Ther* 12(6): 1026-37.
- Wen, P, Kesari, S (2008). Malignant Gliomas in Adults. *N Engl J Med* (359):492-507.
- Wilson, CM, McPhaul, MJ (1996). A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Mol Cell Endocrinol* 120(1):51-7.
- Xie Z (2009). Brain tumor stem cells. *Neurochem Res* (34): 2055-2066.

- Yen, S, Jaffe, R (1991). Reproductive Endocrinology. Physiology, Pathophysiology and Clinical Management. 3rd edition. Philadelphia: *W.B. Saunders Company*. p.p 156-170; 420-431.
- Yu, X, Jiang, Y, Wei, W, Cong, P, Ding, Y, Xiang, L, Wu, L (2014). Androgen receptor signaling regulates growth of glioblastoma multiforme in men. *Tumour Biol* 1-6.
- Zhang, BG, Du, T, Zang, MD, Chang, Q, Fan, ZY, Li, JF, Yu, BQ, Su, LP, Li C, Yan, C, Gu, QL, Zhu, ZG, Yan, M, Liu, B (2014). Androgen receptor promotes gastric cancer cell migration and invasion via AKT-phosphorylation dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9. *Oncotarget* 15; 5(21): 10584-95.