



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Participación de la testosterona en la proliferación, migración e invasión de células derivadas de glioblastomas humanos.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Lic. en Psic. Dulce Carolina Rodríguez Lozano

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Facultad de Química, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ

Dra. Aliesha González Arenas
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México. Noviembre, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS:

Esta tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. Ignacio Camacho Arroyo en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en el departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM. ¡Muchas gracias Nacho!

A la Dra. Valeria Hansberg Pastor y la M. en C. Ana Gabriela Piña Medina de la Facultad de Química, UNAM por su asesoría y apoyo técnico durante la realización de este trabajo.

A los miembros del comité tutorial, la Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez y la Dra. Aliesha González Arenas por su asesoría en este proyecto.

Al Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP) de la Facultad de Química, UNAM por el financiamiento concedido para el desarrollo de este trabajo.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico otorgado para participar en un congreso nacional.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES:

Esta tesis está dedicada con mucho cariño a una persona que me apoyo desde niña y siempre confió en mí, que me enseñó la importancia de seguir luchando a pesar de las adversidades... para ti abuelita. Si bien, ya no estás conmigo físicamente sé que siempre estaremos juntas ¡Te amo!

Agradezco a la UNAM por permitirme nuevamente estudiar en sus aulas y realizar un proyecto de investigación. Con orgullo puedo gritar: ¡México, pumas, Universidad! al obtener mi título como Maestra en Ciencias.

A mi familia por compartir momentos buenos y malos y por brindarme su apoyo cuando los necesito. En especial quiero agradecer a mis padres por todo lo que me han dado y por su amor incondicional, me siento muy afortunada de ser su hija. ¡Seguimos en el camino!

A mi flaquita, mi amiga y mi hermana, por ser mi confidente y compartir las dificultades de la escuela. Por ser la mejor hermana del mundo, te quiero mucho. ¡Si se puede!

A todos mis amigos que me dan un momento de respiro cuando las cosas se ponen difíciles. Particularmente a mi amigo Dany, aún faltan muchas aventuras por compartir.

A todos mis compañeros de laboratorio, gracias por su apoyo en la realización de esta Tesis, he aprendido mucho de cada uno de ustedes. Gracias a Aylin por su fondo de ahorro y las risas, a JC por sus sabias enseñanzas, a Anita por ser buena onda, a Ale por todas las reflexiones y a Clau por ser mi amiga cubanita preferida; pero sobre todo, les agradezco por ser de lo peorcito.

Finalmente, te doy las gracias Daniel Carrillo Juárez por impulsarme para ingresar a la Maestría en Ciencias Bioquímicas, por apoyarme para concluirla y por recordarme que para esta Psicóloga el lema de tu casa de estudios (UACM) es muy real: “nada humano me es ajeno” y por lo tanto pudo realizar proyectos como el que presento ahora, con conciencia y profesionalismo. Mi amor, gracias por estar conmigo “a pedazos, a ratos, a parpados y a sueños”. Me encanta caminar a tu lado y apoyarnos para dar siempre la mejor versión de cada uno.

ÍNDICE

1. Abreviaturas.....	6
2. Resumen	7
3. Introducción	8
4. Antecedentes.....	10
4.1. Tumores cerebrales.....	10
4.1.1. Gliomas.....	11
4.1.1.1. Astrocitomas.....	12
4.1.1.1.1. Glioblastomas.....	13
4.2. Estructura y función de la testosterona.....	14
4.2.1. Metabolismo de la testosterona.....	17
4.2.2. Mecanismo de acción de la testosterona.....	18
4.3. Receptor a andrógenos (RA).....	20
4.4. Efectos de la testosterona y el RA en diferentes tipos de cáncer	22
4.5. Testosterona y glioblastomas.....	23
5. Planteamiento del problema.....	24
6. Hipótesis.....	24
7. Objetivos.....	25
7.1. Objetivo general	25
7.2. Objetivos particulares.....	25
8. Metodología.....	25
8.1. Cultivo celular.....	25
8.2. Tratamientos hormonales.....	27
8.3. Determinación del número de células.....	27
8.4. Calculo de la viabilidad celular.....	28
8.5. Ensayo de proliferación.....	28
8.6. Extracción de proteínas.....	29
8.7. Western blot.....	29
8.8. Ensayo de migración	31
8.9. Ensayo de invasión.....	31
8.10. Análisis estadístico.....	33
9. Resultados.....	33

9.1. Efecto de la testosterona sobre el crecimiento y viabilidad de las líneas celulares U87, U251 y D54.....	33
9.2. Efecto de la flutamida sobre el número de células y viabilidad de las líneas U87, U251 y D54.....	35
9.3. Papel de la testosterona y flutamida en la proliferación de células derivadas de GBM.....	37
9.4. Expresión del receptor a andrógenos a nivel de proteína en la línea celular U87.	39
9.5. Papel de la testosterona en la migración de la línea celular D54.....	40
9.6. Papel de testosterona en la invasión de la línea celular D54.....	41
9.7. Efecto de la dihidrotestosterona (DHT) sobre el crecimiento y viabilidad de la línea celular D54.....	44
9.8. Efectos de la finasterida y dutasterisa sobre el crecimiento y viabilidad de la línea celular D54.....	45
9.9. Papel de la DHT en la proliferación de células derivadas de GBM humano.	46
10. Discusión.....	47
11. Conclusión.....	51
12. Perspectivas.....	51
13. Referencias.....	52
14. Anexo.....	57

1. ABREVIATURAS

BrdU	5-bromodesoxiuridina
CaP	Cáncer de próstata
DHT	Dihidrotestosterona
E ₂	Estradiol
ECM	Matriz extracelular
ERAs	Elementos de respuesta a andrógenos
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GBM	Glioblastomas
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HSP	Proteínas de choque térmico
LH	Hormona Luteinizante
P ₄	Progesterona
RA	Receptor a andrógenos
RAm	Receptor a andrógenos de membrana
RE	Receptor a estrógenos
RP	Receptor a progesterona
SFB	Suero fetal bovino
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales
SNC	Sistema Nervioso Central
T	Testosterona

2. RESUMEN

Distintas evidencias sugieren que las hormonas sexuales pueden modular el crecimiento de los astrocitomas, tumores cerebrales derivados de astrocitos que constituyen las neoplasias primarias más comunes y agresivas del Sistema Nervioso Central en el ser humano. De acuerdo con sus características histológicas y moleculares, los astrocitomas se han clasificado en cuatro grados de malignidad, siendo los de grado I los biológicamente menos agresivos y los de grado IV o glioblastomas (GBM) los de mayor agresividad.

Datos epidemiológicos reportan que los GBMs se presentan en mayor proporción en hombres que en mujeres (3:2), lo que sugiere la participación de las hormonas sexuales en el desarrollo de estos tumores. Además, se ha reportado la expresión del receptor a andrógenos (RA) en GBMs humanos, sin embargo, se desconoce el papel de los andrógenos en el desarrollo de estos tumores. Por lo tanto, el presente proyecto tuvo el objetivo de determinar el papel de la testosterona (T) y de su receptor intracelular en la proliferación, migración e invasión de células derivadas de GBMs humanos.

Los resultados mostraron que la T (100 nM) incrementó el número de células U87, U251 y D54 derivadas de GBMs humanos, debido a un aumento en la proliferación celular. También se demostró que la T indujo migración e invasión de las células D54. Esta inducción se bloqueó con flutamida, un antagonista del RA. Mediante *Western blot* se observó una disminución en la expresión del RA después del tratamiento con T a las 24 horas, lo que sugiere una degradación del receptor inducida por su ligando. Finalmente, se determinó que el metabolito de la T: la dihidrotestosterona (DHT) incrementó el número de células derivadas de GBM. De manera interesante, el efecto inductor de la T fue bloqueado al añadir inhibidores de la 5 α -reductasa, enzima responsable de la síntesis de la DHT a partir de la T. Estos datos sugieren que los andrógenos a través del RA promueven proliferación, migración e invasión de células derivadas de GBM, y que el metabolismo de la T podría ser un factor determinante en el crecimiento de los GBMs humanos.

3. INTRODUCCIÓN

Se denomina cáncer a un conjunto de enfermedades multifactoriales que pueden afectar cualquier parte del organismo, resultado de la reducción de los procesos de muerte celular y una proliferación (reproducción) acelerada de células anormales, capaces de invadir tejido adyacente o propagarse a otros órganos y generar metástasis. En México se registran 160 mil nuevos casos de cáncer cada año y 90 mil fallecimientos relacionados con esta patología (SSA, 2017). No obstante, se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% y la mortalidad por cáncer incremente un 45% en los próximos 20 años a nivel mundial (OMS, 2018).

A pesar de que las causas de muchos tipos de cáncer permanecen desconocidas hasta ahora, se han establecido ciertos factores de riesgo externos e internos que inducen su aparición y desarrollo. Los factores externos están determinados por todos los elementos que constituyen el entorno al que están expuestas las células. En cambio, los factores internos están dados por las características propias de las células, como la constitución genómica y su regulación genética y epigenética. Los factores de riesgo pueden actuar simultáneamente o a través de una serie de pasos secuenciales que inician y/o promueven el desarrollo del cáncer, en un proceso denominado carcinogénesis, en el cual se lleva a cabo la transformación progresiva de células normales en derivados altamente malignos, denominados neoplasmas o tumores (Sharma, et. al., 2009).

Un tumor es un tejido complejo compuesto de múltiples tipos de células que interaccionan entre sí. En este sitio, se reclutan células sanas que forman un estroma asociado al tumor y contribuyen al desarrollo y a la expresión de ciertas capacidades particulares de las células cancerosas (Tabassum, et. al., 2015). Dichas características comprenden capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo del tumor, entre ellas se encuentran el mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de los mecanismos supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, capacidad replicativa ilimitada, inducción de angiogénesis, activación de la invasión al tejido adyacente y/o metástasis,

desequilibrio metabólico, inflamación, evasión de la respuesta inmune e inestabilidad genómica (Hanahan, et. al., 2011).

En el Sistema Nervioso Central (SNC) los glioblastomas (GBMs) o astrocitomas grado IV, representan el 80% de todos los tumores malignos. Éstos se manifiestan principalmente en adultos y se caracterizan por un crecimiento celular descontrolado mediado por una proliferación celular acelerada y la resistencia a la apoptosis (Davis, 2016). Estas características sumadas a la elevada capacidad de infiltración de las células de GBM, hacen prácticamente imposible la extirpación quirúrgica completa de los tumores, por lo que las terapias adyuvantes contemporáneas han tenido poco impacto en la supervivencia a largo plazo. Por lo tanto, existe un creciente interés en la comprensión de los mecanismos que regulan los procesos de proliferación, migración e invasión en GBMs, ya que éstos podrían proporcionar el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos (Carlsson, et. al., 2014).

Dado que los GBM se presentan principalmente en hombres que en mujeres, se ha sugerido la participación de las hormonas sexuales en la fisiopatología de estos tumores. Se han realizado investigaciones sobre los efectos de las hormonas sexuales femeninas, como el estradiol (E2) y la progesterona (P4) en el desarrollo de los GBMs humanos y la expresión de sus receptores RE y RP respectivamente, como factores a considerar a nivel clínico (Tavares et al., 2016; Piña-Medina, et. al., 2016; Valadez-Cosmes et al., 2015; Germán-Castelán, et. al., 2014). Sin embargo, poco se sabe sobre el papel de los andrógenos en el desarrollo de los GBM, por lo que es necesario ampliar la información en este campo.

4. ANTECEDENTES

4.1. Tumores cerebrales

Los tumores cerebrales son patologías con múltiples características que producen diversos síntomas neurológicos y psiquiátricos como consecuencia de su tamaño, localización y capacidad invasiva. Los tumores cerebrales se clasifican de acuerdo al sistema de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y se emplea el sufijo “oma” después del tipo celular más parecido al de las células tumorales para denominarlos (Furnari et al., 2007). Dichos tumores pueden ser primarios si se originan dentro del SNC o secundarios, si se originan fuera de éste y migran al mismo. Los más comunes tanto en México, como en otros países son los de tipo primario (Hernández, et. al., 2010) con una incidencia anual de aproximadamente 6.4 casos por cada 100,000 individuos (OMS, 2018). En el SNC los gliomas representan aproximadamente el 28% de todos los tumores primarios y el 80% de los tumores malignos (Schwartzbaum, Fisher, Aldape, & Wrensch, 2006).

4.1.1. Gliomas

Los gliomas son tumores neuroectodérmicos con características de células gliales. Se ha sugerido que estos tumores provienen de células troncales neuroectodérmicas que se encuentran en el adulto y tienen una alta capacidad de proliferar, diferenciarse y migrar. (Llaguno et al., 2010). También se ha planteado la existencia de células gliales con alteraciones genéticas previas, provenientes de distintas regiones del cerebro que poseen una mayor susceptibilidad a cambios genéticos que, sumados con el microambiente y las señales de células no neoplásicas, pueden favorecer el desarrollo de los gliomas (Chen & Gutmann, 2014).

Los gliomas son los tumores más comunes y agresivos en el SNC, y su tratamiento es uno de los mayores retos oncológicos, ya que a pesar de los avances en la terapia, estos tumores permanecen asociados a una elevada morbilidad y

mortalidad (Burnet, et. al., 2005). Lo anterior demanda una mejor comprensión de la patogenicidad y la etiología tanto a nivel celular como molecular para diseñar tratamientos terapéuticos novedosos y eficaces. Los gliomas se clasifican según la OMS de acuerdo a sus características histopatológicas en: astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas; por similitudes morfológicas con los tipos de células gliales que se encuentran en el tejido cerebral sano (astrocitos, oligodendrocitos y células ependimales, respectivamente) (Weller, et. al., 2015).

4.1.1.1. Astrocitomas

Los astrocitomas son tumores neuroepiteliales derivados de astrocitos o de células troncales cancerosas (Alcántara, et. al., 2010) que presentan un alto grado de malignidad y se localizan en cualquier parte del encéfalo, especialmente en la corteza cerebral. Este tipo de tumores aparecen mayoritariamente en adultos entre los 50 y los 70 años de edad y representan el 60-70% de los gliomas (Kros, et. al., 2007). En general, los primeros síntomas a causa de estos tumores pueden incluir: dolores de cabeza y vómito debidos al aumento en la presión intracraneal, cambios visuales, convulsiones, cambios de personalidad, demencia, problemas motores, de aprendizaje y concentración. Los síntomas subsecuentes varían dependiendo de la localización del astrocitoma (Brandes et al., 2008).

Según sus características histológicas (hipercelularidad, presencia de atipia, proporción de células en mitosis, proliferación endotelial y necrosis), capacidad de invasión y progresión, la OMS clasifica a los astrocitomas en cuatro grados de malignidad, siendo los de grado I biológicamente menos agresivos y los de grado IV los de mayor agresividad (**Figura 1**). La sobrevivencia de los pacientes es inversamente proporcional al grado de evolución tumoral y desafortunadamente, los pacientes por lo general acuden a un servicio neurológico cuando presentan un tumor de grado III o IV, cuando además de tener severos problemas neurológicos o psiquiátricos, la esperanza de vida es muy corta (Louis, et. al., 2007; 2016).

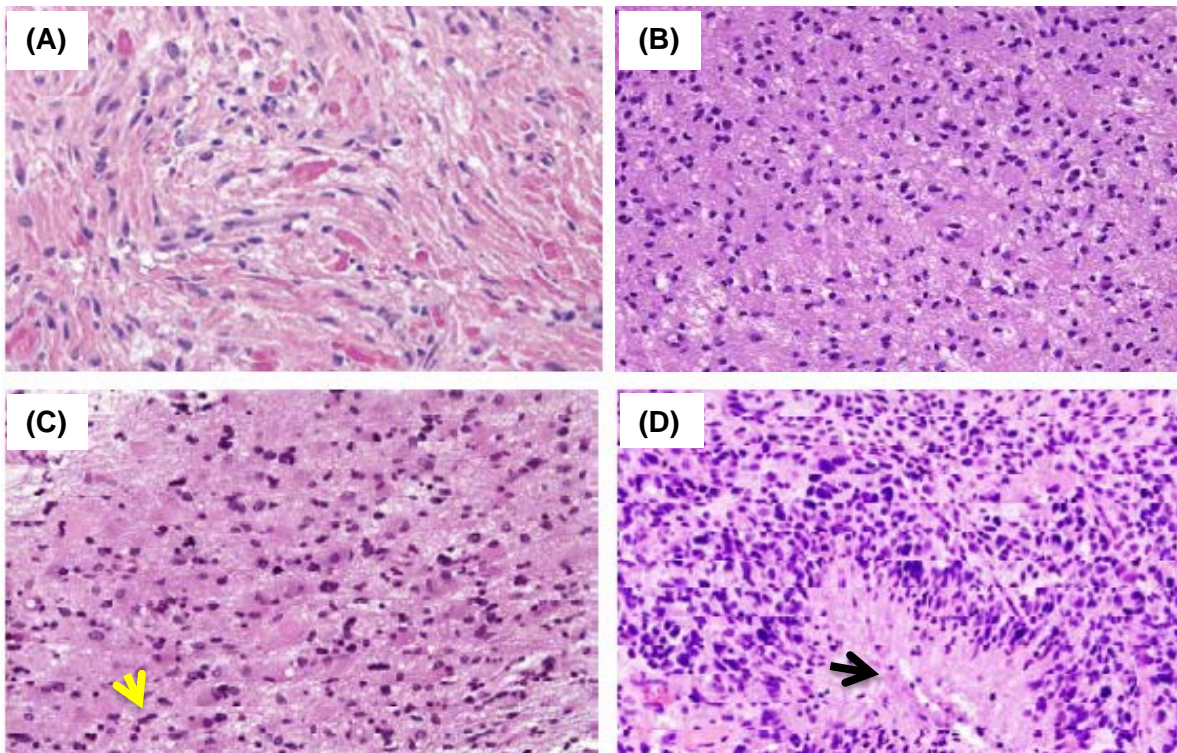


Figura 1. Clasificación histopatológica de los astrocitomas. Se pueden observar en los diferentes cortes las características histológicas de los astrocitomas, como hiper celularidad, atipia nuclear, proliferación (flecha amarilla) y necrosis (flecha negra); las cuales permiten su diagnóstico y aumentan con el grado de malignidad: grado I o pilocítico (A), grado II o difuso (B), grado III o anaplásico (C) y grado IV o glioblastoma (D). Tomado y modificado de Louis, et. al., (2007).

4.1.1.1.1. Glioblastoma o astrocitoma grado IV

En el SNC, el glioblastoma multiforme (GBM) o astrocitoma grado IV es el tumor primario de mayor frecuencia y malignidad, presenta una incidencia pico entre los 50 y los 70 años (Zhang & Ostrom et. al., 2017). Se puede generar a partir de un astrocitoma II o III, sin embargo, lo más frecuente es que aparezca de *novo* de forma preferencial en la materia blanca de la corteza cerebral (frontal, temporal, parietal y occipital), ganglios basales y tálamo. Los GBMs primarios pueden presentar un contenido alto del marcador molecular CD133+, asociado con la formación de neuroesferas, lo que sugiere que este tipo de GBMs pueden provenir de células troncales cancerosas (Ohgaki, et. al., 2013).

Los GBMs se caracterizan por presentar astrocitos poco diferenciados, atipia nuclear, mitosis elevada, trombosis vascular, proliferación microvascular, necrosis y ser altamente invasivo (**Figura 2**). El tratamiento consiste principalmente en la resección quirúrgica del tumor, así como radio y/o quimioterapia (Bai, et. al., 2011). Sin embargo, dada su capacidad infiltrante, es prácticamente imposible la extracción total del tumor por lo cual el tiempo de sobrevida es menor a 1 año.

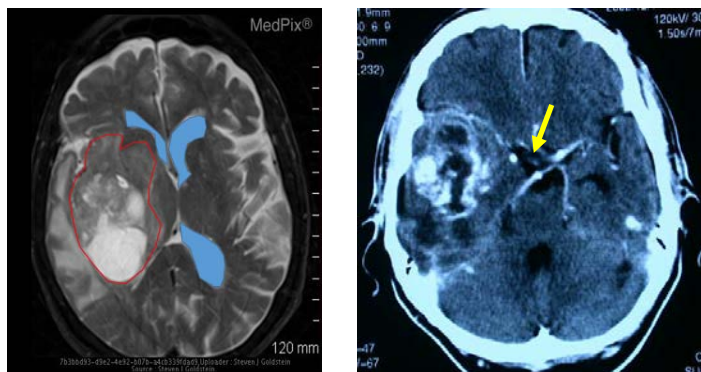


Figura 2. Diagnóstico de GBM mediante análisis de imágenes. Para el diagnóstico de GBM se realizan exámenes neurológicos, de imagenología y biopsias. En la izquierda se puede observar mediante Imagen por resonancia magnética la localización del tumor enmarcado en rojo y la compresión de los ventrículos (flecha) que generó su crecimiento. En la imagen de la derecha mediante Tomografía axial computarizada se observa necrosis en las zonas más internas del tumor (flecha) debido a la dificultad de la circulación sanguínea (García, 2018).

El proyecto del atlas del genoma del cáncer (The Cancer Genome Atlas, TCGA) clasificó las anomalías moleculares recurrentes en el GBM y, mediante estudios de perfiles genómicos a gran escala, se sugiere que los GBMs comprenden cuatro subgrupos moleculares que se caracterizan por distintos tipos de mutaciones. Estos subtipos se denominan clásico, mesenquimal, proneural y neural y pueden correlacionar con el fenotipo clínico y su respuesta al tratamiento terapéutico. Por ejemplo, se ha visto que el mesenquimal es el subtipo que presenta los fenotipos más agresivo y el que tiene el peor pronóstico entre los pacientes afectados (Olar, et. al., 2014).

De manera general, las alteraciones genéticas en los GBMs convergen en la activación aberrante de varias vías promotoras de tumores, incluidas las cascadas

de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPK) y de la proteína cinasa B (también conocida como AKT). Además, las vías supresoras de tumores importantes están alteradas, en particular la regulación de la apoptosis y la progresión del ciclo celular dependientes de p53 y de la proteína de retinoblastoma 1 (RB1) (McLendon, et. al., 2008). El rápido crecimiento tumoral que conduce a la hipoxia tisular no solo causa necrosis, sino que también regula las dos isoformas del factor inducible por hipoxia (Hypoxia-Inducible Factor 1/2, HIF1/2), que incrementan la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (vascular endothelial growth factor, VEGF), factor clave que impulsa la angiogénesis en los GBMs. Otra característica importante de la patogenia del GBM, es la influencia del tumor en el sistema inmune, incluida la supresión de una respuesta inmune antitumoral eficaz, por ejemplo, mediante la regulación positiva del factor de crecimiento transformante β (Transforming Growth Factor- β , TGF β) (Frei, et. al., 2015).

Dado que el tratamiento para los GBMs es limitado, el cuidado médico radica principalmente en el manejo paliativo de los pacientes. Por lo tanto, en muchos casos se busca ofrecer a los pacientes tratamientos experimentales o alternativos, entre los que se encuentran quimioterapia intrarterial e inmunoterapia (Edward, et. al., 2005). Considerando que el SNC es un importante blanco para esteroides sexuales como los andrógenos, los cuales están implicados en la del crecimiento tumoral (Liu, et. al., 2014), es probable la participación de estas hormonas en el desarrollo de los GBMs humanos. Lo anterior se reafirma por el hecho de que estas neoplasias son más frecuentes en hombres que en mujeres en una proporción de 3:2 (Schwartzbaum et al., 2006).

4.2 Estructura y función de la testosterona

La testosterona (T) es una hormona esteroide sexual y es el principal andrógeno (*andros* = hombre y *gennan* = producir) circulante en el hombre, constituido por 19 átomos de carbono, un doble enlace entre C4 y C5, una cetona

en C3 y un radical hidroxilo (OH) en C12 (Heemers & Tindall, 2007). Aproximadamente el 90% de la T se sintetiza en las células de Leydig de los testículos. Cuando los niveles de testosterona son bajos, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es liberada por el hipotálamo que a su vez estimula a la glándula pituitaria para liberar a la hormona folículo estimulante (FSH) y a la hormona luteinizante (LH) (Dorantes, 2012; Yen, 1991). Estas dos hormonas estimulan a los testículos para sintetizar T. Los altos niveles de esta última actúan en el hipotálamo y la pituitaria a través de una retroalimentación negativa para inhibir la liberación de GnRH y FSH/LH, respectivamente (**Figura 3**). En el hombre adulto el testículo produce entre 2.5 y 11 mg/día de T. En la mujer, los ovarios y las glándulas suprarrenales producen aproximadamente 0.25 mg/día de T (Gardner, et. al., 2012).

La T y otros andrógenos ejercen sus acciones en todos los tejidos de los mamíferos. Dentro de los efectos importantes de la T se puede resaltar una función anabólica que permite el incremento en la masa y fuerza musculares, maduración de los genitales externos, inducción de la ampliación de la laringe y engrosamiento de las cuerdas vocales, estimulación del crecimiento del vello facial, axilar y púbico; facilitación de la libido y la potencia sexual, mantenimiento de la espermatogénesis y la fertilidad masculina; y masculinización o diferenciación sexual masculina en los genitales y en el cerebro en el feto humano (Smith & Walker, 2014; Gardner, et. al., 2012).

Además de las funciones sexuales, los andrógenos son necesarios para el control del desarrollo y función de numerosos tejidos, incluyendo el SNC. Evidencias indican que la pérdida de andrógenos relacionados con la edad puede contribuir al desarrollo de trastornos neurodegenerativos (Welk, e. al., 2017). Tanto la T como su metabolito la DHT, participan en la diferenciación de las neuronas en el hipotálamo y en la corteza cerebral, la arborización dendrítica del hipocampo y el mantenimiento de la morfología de las neuronas motoras (Nguyen, Yao, & Pike, 2007). La T también influye en el estado emocional y la cognición, por ejemplo, niveles bajos de T se asocian con una conducta dócil, mientras que los niveles altos

se correlacionan con el comportamiento impulsivo y agresivo (Almeida, Waterreus, Spry, Flicker, & Martins, 2004).

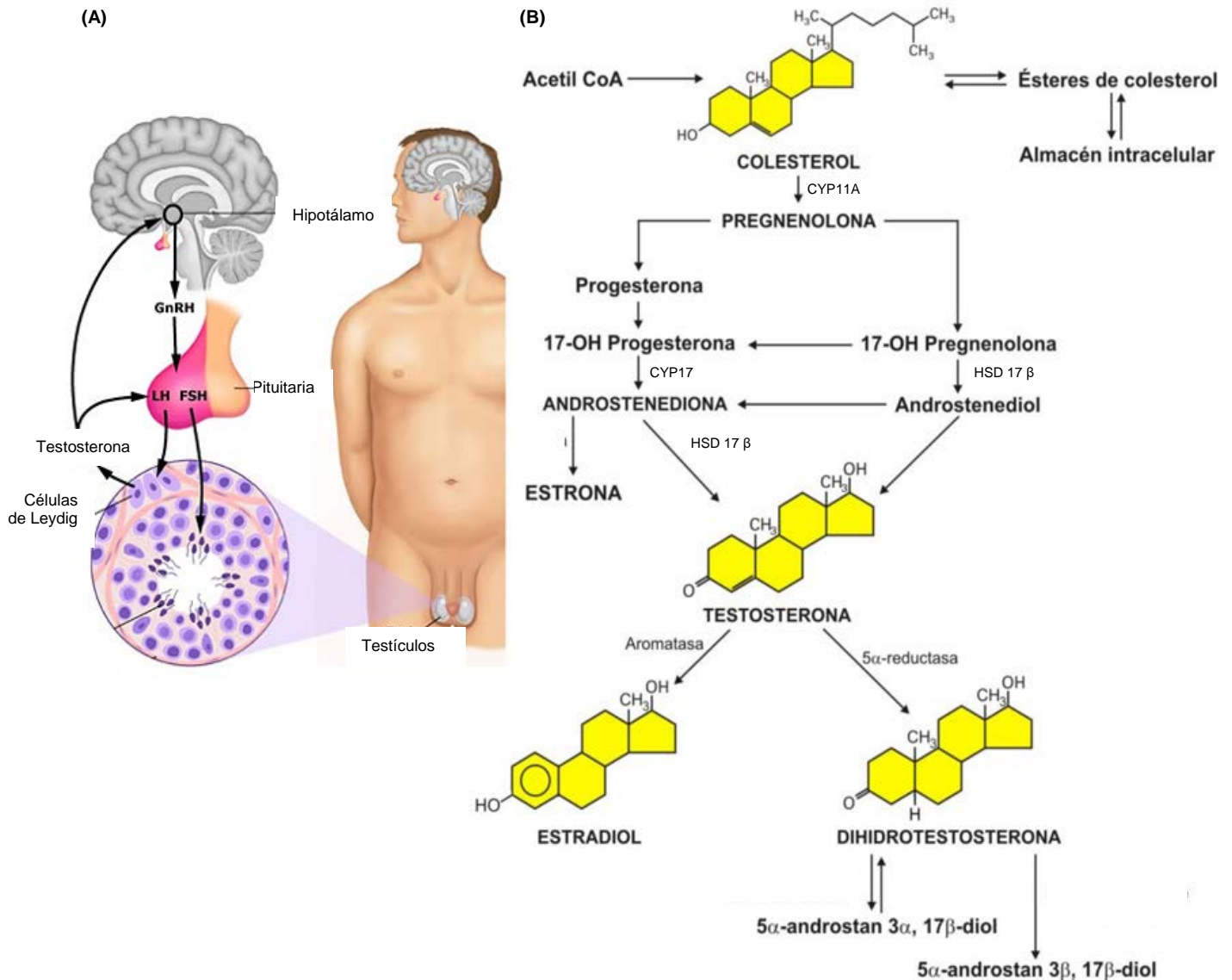


Figura 3. Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y metabolismo de la testosterona. La función testicular está controlada por la secreción hipotalámica de GnRH que a su vez promueve la liberación en la hipófisis de FSH y LH, estas últimas estimulan la síntesis y liberación de T en los testículos para modular al eje mediante retroalimentación negativa. En los testículos a partir del colesterol se sintetiza la pregnenolona por la enzima CYP11A. De ésta se originan los progestágenos, a partir de los cuales se originan los andrógenos por la enzima 17-hidroxilasa (CYP17). Se forma la dehidroepiandrosterona a partir de la 17-hidroxipregnenolona y la 4-androstenediona a partir de la 17-hidroxiprogesterona, actuando sobre ambas la enzima 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD 17β) para formar, respectivamente, 5-androstenediol y testosterona. Posteriormente actúan sobre la testosterona las enzimas aromatasa y 5α-reductasa para formar respectivamente E2 y DHT esta última se metaboliza en esteroides conjugados. Tomado y modificado de Bórraz-León, et. al., 2015

4.2.1. Metabolismo de la testosterona

Con excepción de las primeras semanas de vida fetal, la producción de T depende de la secreción hipofisaria de LH (Dorantes, 2012). La T se sintetiza en las células de Leydig a partir del colesterol circulante o de *novo* a partir de acetato. El colesterol es hidroxilado por enzimas mitocondriales en los carbonos 20 y 22, transformándose en pregnenolona, posteriormente en progesterona, dihidroepiandrostediona, androstenediona y finalmente en T (**Figura 3**) (Flores, 2005).

La T es una hormona lipofílica, por lo que, en sangre el 98% se transporta unida a proteínas, y solo el 2% de forma libre, que es la porción biológicamente activa. El 60% de T circulante va ligada con alta afinidad a la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), el porcentaje restante está unido laxamente a la albúmina. Parte de la T unida a proteína puede disociarse de esta última y entrar a las células blanco. En la mayor parte de las células blanco, la T es convertida a un andrógeno más potente, la DHT, por la isoenzima microsomal 5 α -reductasa. Además, una pequeña fracción de T puede ser convertida a estradiol por medio de una reacción de aromatización catalizada por la enzima aromatasa (Dorantes, 2012).

La T 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 T, se une con mayor afinidad a este receptor. La afinidad de la DHT a los RA resulta de la lenta disociación de la DHT con el receptor. Finalmente, los andrógenos son metabolizados a esteroides conjugados relativamente inactivos (por ejemplo, sulfatos y glucurónidos), que son excretados del cuerpo a través de la bilis u orina (Arrondo, 2004; Yen, 1991).

4.2.2. Mecanismos de acción de la testosterona

Mecanismo de acción clásico.

En el mecanismo de acción clásico la T atraviesa la membrana plasmática por difusión simple debido a su carácter lipofílico y se une al RA, dentro del citoplasma o del núcleo. En el citoplasma, los monómeros del RA están inactivos debido a que están unidos a proteínas llamadas chaperonas, como las Hsp 90, Hsp 70, Hsp 56, p23y las repeticiones de tipo tetratricopéptido (TPR). Estas chaperonas se unen al RA e impiden que lleve a cabo su actividad transcripcional, pero también inducen una conformación de alta afinidad por el ligando. Cuando la DHT o la T, se unen al RA, éste sufre un cambio conformacional, las chaperonas se disocian y el RA es fosforilado y se transloca al núcleo en donde el RA se dimeriza y se une a secuencias específicas del ADN conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ARE) para llevar a cabo la transcripción y posterior síntesis de las proteínas. Al unirse al ADN, se reclutan complejos correguladores, como los coactivadores de receptores a hormonas esteroideas (SRC) que, de manera dependiente de ligando facilitan el proceso de transcripción (**Figura 4**) (Smith & Walker, 2014). La estabilidad del RA es mantenida por la fosforilación y se ha mostrado que el factor de crecimiento transformante β (TGF β), el factor de crecimiento parecido a insulina tipo 1 (IGF-1) y la interleucina 6 (IL6) aumentan la actividad del RA a través de la fosforilación del mismo receptor por MAPK o de sus correguladores (Weigel & Moore, 2017). Tras la transcripción, el RA y los correguladores se degradan de manera dependiente de ligando a través de la vía ubiquitina-proteosoma (Villalmar-Cruz, et.al., 2006).

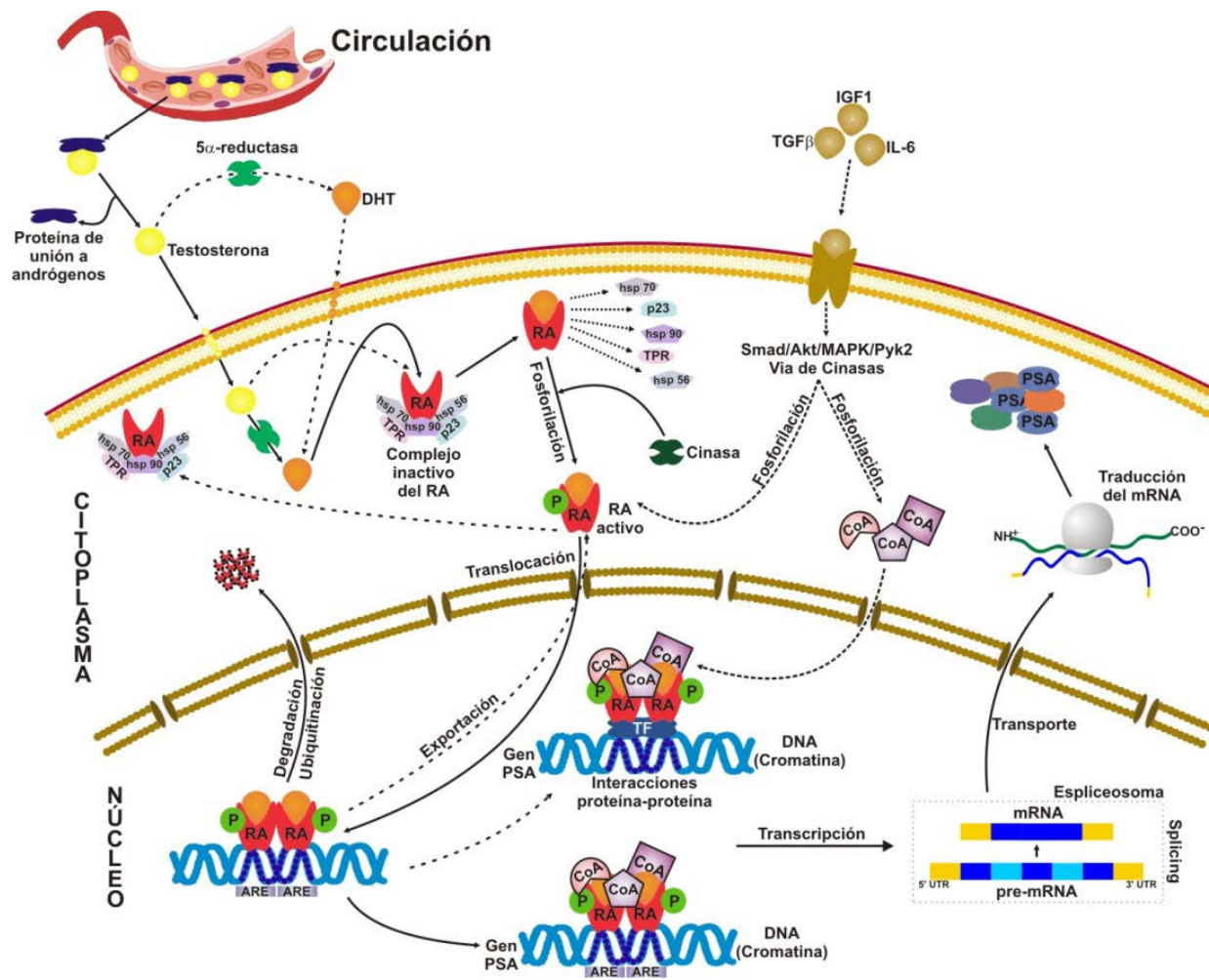


Figura 4. Mecanismo clásico de acción de la testosterona. El RA se encuentra en un estado de inactivación, unido a proteínas de choque térmico (hsp). La T es metabolizada a DHT, en el estroma fibromuscular, por la enzima 5α-reductasa y se transporta por difusión pasiva al citoplasma. La T puede también difundir al citoplasma y metabolizarse a DHT en la membrana del retículo endoplásmico en otros tejidos. En el citoplasma la T o la DHT interactúan con su receptor y se liberan las hsp; el receptor se transloca al núcleo, se dimeriza, se une a elementos de respuesta a andrógenos (AREs) y recluta correguladores y a la maquinaria de transcripción basal. Tomado de Smith & Walker, 2014.

Mecanismo de acción no-clásico.

La T puede inducir rápidamente el paso de $[Ca^{2+}]$ en las células de Sertoli a través de canales de calcio tipo L. También se cree que la T provoca la activación de una proteína Gq unida al receptor acoplado a proteínas G (GPCR) y la activación de la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza a fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) en la

membrana plasmática para producir inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). La disminución de los niveles de PIP2, un inhibidor de la activación de canales de potasio dependientes de ATP (K^+_{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 se abren y permiten el paso de $[Ca^{2+}]$ (Walker, 2011). Por otro lado, puede existir la estimulación de las células de Sertoli con dosis de T (10-250 nM) similares o inferiores a las que se encuentran en el testículo causan la unión de ésta con su receptor membranal. Una vez unidos y localizados transitoriamente en la membrana plasmática, se recluta y activa a 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 SH3 de Src. La activación de Src mediada por T 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 (Smith & Walker, 2014). 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 T es rápida (menos de 1 min) y se puede mantener durante al menos 12 h (Fix, Jordan, Cano, & Walker, 2004).

4.3. Receptor de andrógenos

Los efectos biológicos de la T y la DHT son mediados principalmente a través del RA, un factor de transcripción dependiente de ligando que pertenece a la super familia de receptores nucleares para esteroides, retinoides, vitamina D, hormonas tiroideas, metabolitos del hidrocolesterol y agentes xenobióticos; estructuralmente están relacionados y se activan después de unirse a su ligando correspondiente. El RA media efectos importantes durante el transcurso de nuestras vidas, desde los efectos obvios durante el desarrollo en la pubertad, hasta alteraciones en su regulación que conllevan a la calvicie. Estos efectos son llevados a cabo cuando los

andrógenos se unen al RA, que como se mencionó, éste se activa, dimeriza y se transloca al núcleo donde se une a los ARE en las regiones reguladoras de los genes blanco (Zhu & Kyprianou, 2008).

Tanto el RA como el receptor a estrógenos (RE), el receptor a progesterona (RP), el receptor a glucocorticoides (RG) y el receptor a mineralocorticoides (RM), entre otros, se caracterizan por tener estructuras similares (Dorantes, 2012). 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 en el humano. Consta de cuatro dominios estructurales y funcionalmente distintos, que en conjunto median las acciones genómicas de la T en los tejidos blanco de andrógenos. El dominio N-terminal (NTD) está codificado por un solo exón (exón 1) y se encuentra implicado en la regulación transcripcional. 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 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 (**Figura 5**) (McEwan, 2004).

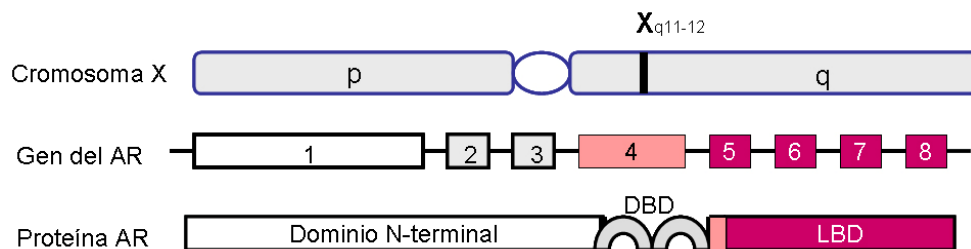


Figura 5. Esquema representativo de los dominios funcionales del RA. Los números indican los exones del gen del AR. Exón 1: dominio N-terminal (NTD), exones 2 y 3: dominio de unión al ADN (DBD), exón 4: región bisagra y exones 5-8: dominio de unión al ligando (LBD) (McEwan, 2004).

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). Se ha

observado que la isoforma B constituye más del 80% del RA inmunoreactivo en diferentes tipos celulares, mientras que la isoforma A sólo constituye un 20%. Se ha observado que la isoforma B es la forma predominante o la única especie inmunoreactiva del RA en diferentes tejidos humanos (Li & Al-Azzawi, 2009; Smith & Walker, 2014; Wilson & McPhaul, 1994).

Los efectos de RA pueden ser modulados por antagonistas androgénicos o antiandrógenos que 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 (Arrondo, 2004). Aunque evidencias indican que tanto antiandrógenos no esteroideos como esteroideos pueden carecer de acciones antagonistas y/o actuar como agonistas parciales del RA (Nguyen et al., 2007).

4.4. Efectos de la testosterona y RA en diferentes tipos de cáncer

Como ya se ha mencionado, el RA es un factor de transcripción que puede modular diversos procesos biológicos, no obstante también puede participar en el desarrollo y progresión de las patologías asociadas con el envejecimiento como el cáncer de próstata (CaP) (Bennett, Gardiner, Hooper, Johnson, & Gobe, 2010; Gelmann, 2002). La importancia de los andrógenos en el desarrollo del CaP ha sido conocida durante más de medio siglo, ya que se sabe que el crecimiento del CaP es altamente dependiente de éstos. Por tal razón, la terapia de privación de andrógenos es el tratamiento inicial estándar para el CaP avanzado, sin embargo, se ha observado que el uso prologando de ésta puede dar lugar a la progresión del CaP resistente a la castración y la necesidad de un cambio en el tratamiento o manejo de la enfermedad (Sharifi, 2013).

Por otro lado, se ha demostrado que la terapia con T puede reducir el riesgo de cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas, así como el crecimiento de tumores de mama en modelos animales (Arumugam, Lissner, & Lakshmanaswamy, 2014). En cáncer de pulmón se ha descrito que la T estimula su proliferación y que los tumores de pulmón de hombres y mujeres también expresan a la aromatasa; por lo tanto, la T puede actuar como un precursor para la producción de estrógenos en los tumores de pulmón, independientemente de los órganos reproductivos (Siegfried, 2014; Hyde et al., 2012).

4.5. Testosterona y glioblastomas

En un estudio que tuvo como objetivo investigar el papel del RA en la patogénesis de GBM dada su alta incidencia en varones adultos, se encontró que la expresión del RA era mayor en pacientes con estos tumores en comparación con el tejido cerebral normal de los mismos pacientes (Yu et al., 2015). Por su parte, Bao (2017) observó que la expresión del RA aumenta conforme progresa el grado de malignidad de los astrocitomas, siendo los GBM los que presentan mayor expresión. Adicionalmente se ha descrito una correlación negativa entre la expresión del RA y el puntaje de rendimiento de Karnofsky utilizado para medir la capacidad de los pacientes de realizar tareas rutinarias, lo que sugiere una correlación entre la expresión de AR y agresividad tumoral (Zalcman, et. al., 2018).

Del mismo modo, se ha observado mediante western blot la sobreexpresión del RA en 8 líneas celulares derivadas de GBM: A172, LN-18, LN-229, M059, T-98G, U87-MG, U118- MG y U138-MG (Yu et al., 2015); y su bloqueo mediante el uso del antagonista MDV3100 (10 μ M) disminuye el crecimiento de células U87 (Bao, et. al., 2017) e incrementa la muerte de células derivadas de GBM con el antagonista enzalutamide (40 μ M y 80 μ M) (Zalcman, et. al., 2018).

Por otra parte, se ha demostrado un incremento significativo en las concentraciones de T de pacientes con algún tipo de glioma en comparación con

pacientes con algún otro tumor benigno o lesión cerebral (Bao, et. al., 2017). Así mismo, se demostró que la T incrementa la viabilidad celular en la línea T98G de GBM. Para este ensayo las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de T (5, 10, 500, 1000, 5000 y 10,000 nM) y se incubaron durante 5 días. Al día 5 se realizó un conteo celular por medio del ensayo MTT, donde se obtuvo que a la concentración de 1000 nM, la T incrementó la viabilidad celular (Merritt & Foran, 2007). Estos resultados sugieren la posibilidad de que la señalización del RA activada por T puede desempeñar un papel importante en el crecimiento de los GBMs.

En biopsias de pacientes con astrocitomas, se ha determinado un aumento en la expresión de la aromatasa (enzima que sintetiza estrógenos a partir de T) conforme aumenta el grado de malignidad, mostrando una correlación negativa con la supervivencia de los pacientes, así como una correlación positiva con la concentración de estrógenos. Estos datos favorecen la hipótesis de que los GBMs podrían ser tumores dependientes de estrógenos que podrían formarse a partir de andrógenos (Dueñas Jiménez et al., 2014).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los GBMs son más frecuentes en hombres que en mujeres en una proporción de 3:2. Sin embargo, el papel de los andrógenos sobre la fisiopatología de estos tumores ha sido pobremente estudiado. Por lo tanto, en el presente proyecto se evaluó el efecto de la T sobre la proliferación, migración e invasión en líneas celulares derivadas de GBMs humanos.

6. HIPÓTESIS

La T aumentará la proliferación, migración e invasión de células derivadas de GBMs humanos a través de su interacción con el RA.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Caracterizar el efecto “*in vitro*” de la T y el RA sobre la proliferación, migración e invasión de células derivadas de GBMs humanos en un sistema.

7.2. Objetivos particulares

- Determinar la concentración de la T que modifique el número de células U87, U251 y D54, derivadas de GBMs humanos.
- Estudiar el efecto de la T sobre la proliferación de las células derivadas de GBMs humanos.
- Evaluar la participación de la T en la migración e invasión de células derivadas de GBMs humanos.
- Determinar el efecto de la T en la expresión del RA a nivel proteína en células derivadas de GBMs humanos.
- Estudiar el papel del RA en los efectos de la T en células derivadas de GBMs.
- Evaluar la concentración de DHT que modifique el número de células derivadas de GBMs.
- Conocer el efecto de la DHT sobre la proliferación de células derivadas de GBMs humanos.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Cultivo celular

Para el procedimiento experimental se utilizaron las líneas celulares U87, U251 y D54 derivadas de GBMs humanos (**Figura 6**). La línea U87, es proveniente de una biopsia de un hombre de edad desconocida, la línea celular U251 es derivada de una biopsia de un hombre de 75 años y la línea celular D54 fue

generada por la Universidad de Duke y proviene de una biopsia de una mujer caucásica de 36 años.

También se cultivaron las células LnCaP y PC3 derivadas de cáncer de próstata CaP. Como control positivo de la expresión del RA se utilizaron las células LnCaP ya que tienen una sobreexpresión de este receptor, son provenientes de un hombre caucásico de 50 años. Por su parte, las células PC3 provienen de la biopsia de un hombre de 61 años y no expresan al RA, por lo que fueron utilizadas control negativo.

Las líneas celulares se cultivaron en cajas Petri de 10 cm con Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM; Biowest, FRA) con rojo fenol y suplementado con suero fetal bovino (SFB; Biowest, FRA) al 10%, piruvato (1 mM), aminoácidos no esenciales (0.1 mM; InVitro SA, MEX) y antibióticos (1 mM; InVitro SA, MEX). Las células se incubaron con una concentración de CO₂ al 5% y a 37 °C hasta alcanzar una confluencia del 70-80% para proceder a la realización de los experimentos

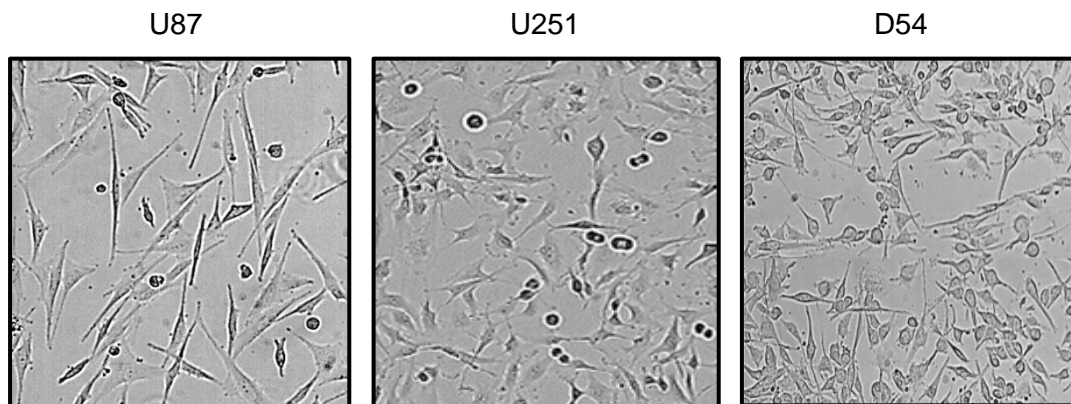


Figura 6. Imágenes de las líneas celulares U87, U251 y D54. Se puede observar en las fotografías que las células U87 son de mayor tamaño con respecto a las otras dos líneas utilizadas en este estudio. Las células U87 y U251 presentan una morfología estrellada con prolongaciones bien definidas con cierta semejanza a los atrociitos. Las células de la línea D54 tienen una menor cantidad de prolongaciones y su morfología es poligonal.

8.2. Tratamientos hormonales.

24 horas previas a los tratamientos, se cambió el medio a las células por medio DMEM sin rojo de fenol, suplementado con SFB al 10% libre de hormonas. Para determinar la concentración de T (Sigma, NLD) que cambiará significativamente el número de células U87, U251 y D54, se sembraron 10,000 células U87 y 7,000 células U251 y D54 en cajas de 24 pozos. Las células se trataron con diferentes concentraciones de testosterona (T; 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M en etanol al 0.01%) el día 0 de cada experimento por 5 días. Después de obtener estos datos, se realizaron los siguientes tratamientos: T (100 nM), flutamida 5 μ M (F, Sigma, CHN) para estudiar el efecto del RA en la proliferación y western blot; y flutamida 10 μ M, en los experimentos de migración e invasión, el tratamiento conjunto T + F (se añadió la F una hora antes que la T); y vehículo (etanol 0.01%).

Debido a que el principal metabolito de la T es la DHT, el cual es más potente que la propia T, se evaluó también la participación de este andrógeno en el crecimiento y motilidad de células derivadas de GBM. Se realizó inicialmente una curva de crecimiento celular con DHT (0.1 nM, 1 nM, 10 nM en etanol al 0.01%; Sigma, USA) para determinar la concentración con mayor efecto. Para el resto de los experimentos se utilizó DHT (10 nM) y dos inhibidores de la enzima 5 α -reductasa, responsable del metabolismo de la DHT a partir de la T: finasterida (Fin, 5 μ M; Sigma, USA) y dutasterida (D, 2.5 μ M; EDQM, FRA), tratamientos conjunto T + Fin y T + D, y vehículo.

8.3. Determinación del número de células

Se sembraron 1×10^4 células U87 y 7×10^3 células U251 y D54 en cajas de 24 pozos con 1 mL de medio DMEM suplementado con las condiciones descritas en el apartado 8.1. Después de 24 horas de incubación se procedió a los tratamientos como se describe en el apartado 8.2. Se cuantificó el número de células vivas con un hemocitómetro (cámara de Neubauer) 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 las células viables. Al momento del conteo, se reemplazó el medio de cada pozo por 1 mL de PBS-EDTA (1 mM), posteriormente se tomó una alícuota de 10 μ l y se tiñó con 2 μ L de azul de tripano. Para contar el número de células, se colocó un cubreobjetos en la cámara y se depositó en un extremo la alícuota (12 μ L) de la suspensión celular de cada pozo por duplicado. Las células se dispersaron en la cámara por capilaridad y se contaron con un microscopio invertido (Olympus BX41, JPN) tomando en cuenta las células presentes en cuatro de los nueve cuadros de la cámara.

8.4. Cálculo de viabilidad celular

El porcentaje de viabilidad se calculó usando la siguiente fórmula para cada tratamiento durante los diferentes días que duró el experimento:

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{(\text{Células no viables}) (100\%)}{\text{Total de células contabilizadas (viables y no viables)}}$$

8.5. Ensayo de proliferación celular

Para conocer si los cambios en el número de células se debían a un incremento en la proliferación celular, se realizó un ensayo de incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). 6,000 células U87 y 4,000 células D54 se sembraron por pozo de "cámaras slides" de cuatro compartimentos y se mantuvieron como se describe en el apartado 8.1. Pasadas 24 horas el medio se cambió por DMEM libre de hormonas y rojo de fenol y 24 horas después las células se trataron durante 5 días con T 100 nM (mínima concentración que causó el efecto inductor en el número de células). Después del tratamiento se utilizó el estuche comercial de detección y marcado de BrdU (Roche, DE) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El colorante fluorescente Hoechst 33342 se utilizó para marcar el ADN. La señal de

fluorescencia se observó a longitudes de onda de 486 y 515-565 nm con la ayuda de un microscopio de fluorescencia Olympus Bx43F (Olympus, JPN). Posteriormente se realizó el ensayo de BrdU con el resto de los tratamientos. El número de células que incorporaron el BrdU se cuantificó con el programa Image J (NIH, USA), el porcentaje de células positivas para BrdU se calculó considerando el número total de células marcadas con Hoechst.

8.6. Extracción de proteínas

Para determinar el contenido del RA en la línea celular U87 después de los tratamientos mencionados en el apartado 8.2. a tiempos cortos (24 horas), se realizó la extracción de proteínas totales. Las células se lisaron con solución amortiguadora de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tritón 1%, SDS 0.01% y ácido etilendiamino tetraacético (EDTA 0.5 M, 1 mL) con una mezcla de inhibidores de proteasas (p8340, Sigma-Aldrich, USA) a 4 °C y se incubaron durante 1 hora en agitación. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm a 4 °C por 5 minutos y el sobrenadante se separó para almacenarse a 4 °C para después proceder a su cuantificación. Los lisados se cuantificaron con el reactivo Pierce 660 nm Protein Assay (Thermo Scientific, IL) en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

8.7. Western Blot

30 µg 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 y se hirvieron durante 5 min. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 7.5%. Las muestras se separaron a 80 volts durante 2 horas. Las proteínas fueron transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Millipore, USA) a 60 mA durante 3 horas en una cámara semihúmeda.

Posteriormente, las membranas se bloquearon con una solución de Albúmina Sérica Bovina (BSA al 2%; InVitro SA., MEX) y leche al 3% en TBS-Tween al 0.1% durante 2 h a 37 °C o toda la noche a 4 °C. Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo primario anti-RA en una dilución 1:300 (0.7 µg/mL; rabbit anti-AR polyclonal antibody sc-815, Santa Cruz, USA) a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, fueron lavadas con TBS-Tween al 0.1% 3 veces durante 5 minutos e incubadas a temperatura ambiente durante 45 minutos 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). Para retirar el anticuerpo las membranas fueron lavadas con una solución de glicina a pH ácido (glicina 0.1 M y SDS 0.5%, pH= 2.5) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario anti- α tubulina en una dilución 1:1000 (0.2 µg/mL) (mouse anti- α tubulina monoclonal antibody, Santa Cruz sc-5286) como control de carga. Finalmente, fueron lavadas con TBS-Tween 3 veces durante 5 minutos e incubadas a temperatura ambiente durante 45 minutos con un anticuerpo secundario “goat anti-mouse” conjugado a peroxidasa (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 (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate; ThermoScientific, USA) 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, USA). Las imágenes obtenidas fueron sometidas a un análisis densitométrico mediante el uso del programa ImageJ, para analizar las bandas obtenidas por western blot y cuantificar la expresión de la proteína del RA.

8.8. Ensayo de migración.

Debido a que el efecto inductor de la T fue mayor en la proliferación de las células D54, se decidió trabajar con esta línea para evaluar la participación de la T sobre la migración de células derivadas de GBMs humanos. Se realizó el ensayo de "Cierre de herida" para estudiar movimiento colectivo y direccional de poblaciones celulares (Etienne-Manneville Hall, 2001; Magdalena et.al. 2003). En cajas de 6 pozos se sembraron 400,000 células D54 en medio DMEM completo y se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 60-70%, posteriormente se realizó el cambio de medio por DMEM sin rojo fenol, suplementado con SFB sin hormonas al 10%. Transcurridas 24 horas (confluencia del 80-90%), las células se lavaron con PBS, se agregaron 500 μ L de PBS-EDTA (1 mM) a cada pozo e inmediatamente, con una punta de pipeta desechable de 200 μ L, se realizó una estría en la monocapa de células. Posteriormente, se llevó a cabo 1 lavado con PBS para eliminar a las células desprendidas. A continuación, se colocó 1 mL de medio DMEM sin rojo fenol y sin hormonas; se agregó clorhidrato de citosina β -D-arabinofuranósido (Ara-C, inhibidor de la síntesis de ADN; Sigma, USA) a una concentración final de 10 μ M para descartar que los cambios observados en el número de células que migran se debieran a un aumento en la proliferación, y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Sin retirar el medio, se adicionaron los tratamientos hormonales (descritos en el punto 8.2) y se tomaron fotografías con una cámara Infinity12C acoplada a un microscopio invertido Olympus CKX41 a un aumento de 10X de la zona de "Scratch" a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas. A las 24 horas, el medio y los tratamientos fueron reemplazados por medio y tratamientos frescos. Se cuantificó con el programa ImageJ el número de células que migraron para su posterior análisis estadístico.

8.9. Ensayo de invasión.

Para determinar el efecto de la T en la invasión de las células D54 se realizó el ensayo de invasión en Transwell (Boyden, 1962; Grem et. al. 1995). En este ensayo se utiliza una cámara de cultivo adicional llamada inserto, la cual contiene

una membrana de policarbonato en la parte inferior con un tamaño de poro definido, dicho inserto es colocado dentro de un pozo de una caja de cultivo. Las células se siembran en el inserto con medio libre de suero, mientras que en el pozo se coloca medio con suero o algún otro quimioatrayente (Chen, 2005).

Las células se cultivaron en las condiciones mencionadas en el apartado 8.1 y 24 horas antes de los tratamientos se realizó el cambio de medio a las células por medio DMEM sin rojo fenol y suero sin hormonas. Simultáneamente se descongeló el gel de ECM (matriz extracelular, Sigma-Aldrich, USA) durante toda la noche a 4 °C, una vez descongelado se realizó una dilución con medio DMEM sin rojo fenol y sin SFB a una concentración final de 2 mg/mL. El gel de ECM es una mezcla de proteínas gelatinosas secretadas por las células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), esta mezcla asemeja el medio ambiente extracelular complejo que se encuentra en muchos tejidos (Kleinman y Martin, 2005). Se colocaron los insertos (Corning, USA) en cajas de cultivo de 6 pozos. Posteriormente se colocó 1 mL de ECM en cada inserto. Se incubaron los pozos (con el inserto) a 37 °C y 5% de CO₂ durante 2 horas para permitir la gelificación. Se lavaron las células con 2 mL de PBS y posteriormente se despegaron con 2 mL de PBS-EDTA. Las células se resuspendieron en medio DMEM sin rojo fenol y sin SFB, se sembraron 400,000 células por inserto en 1.5 mL del mismo medio y se administraron los tratamientos antes mencionados. Se colocaron 2 mL de medio DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB al 10% libre de hormonas en los pozos. La placa se incubó durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo se eliminó el medio y el gel de ECM del inserto y se realizó un lavado con PBS. Se fijaron las células con paraformaldehído (PFA, 4 %) por 20 minutos, para quitar el excedente de PFA se realizó un lavado con PBS por 5 minutos. Las células se tiñeron con cristal violeta al 1% durante 20 minutos y después se realizó un lavado con etanol al 95% durante 30 segundos y dos lavados adicionales con PBS de 5 minutos. Finalmente, se dejó secar el inserto y se observó al microscopio, se tomaron cinco fotografías al azar por inserto con una cámara Infinity1-2C acoplada a un microscopio invertido Olympus CKX41 a un aumento de 10X. Se cuantificó el número de células invasoras

(las que atravesaron el Matrigel) en los campos tomados al azar y se realizaron las pruebas estadísticas correspondientes.

8.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico que se realizó para los experimentos descritos fue una ANOVA de una sola vía seguida de una prueba Tukey con el programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software versión7, Inc., USA) para calcular los valores de probabilidad.

9. RESULTADOS

9. 1. Efectos de la Testosterona sobre el crecimiento y viabilidad de células derivadas de GBM.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la T en el número de células U87, U251 y D54 derivadas de GBM humanos. Las células fueron tratadas con T 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 7** se observa un aumento significativo en el número de células tratadas con T a la concentración 100 nM en las tres líneas derivadas de GBM a partir del día 3 (D54) y 4 (U87 y U51) de tratamiento con respecto al vehículo. A la concentración de 10 nM, la T incrementó el número de células U87 al quinto día de tratamiento. No se observó diferencia significativa a las concentraciones 1 nM y 1 μ M en comparación al grupo control.

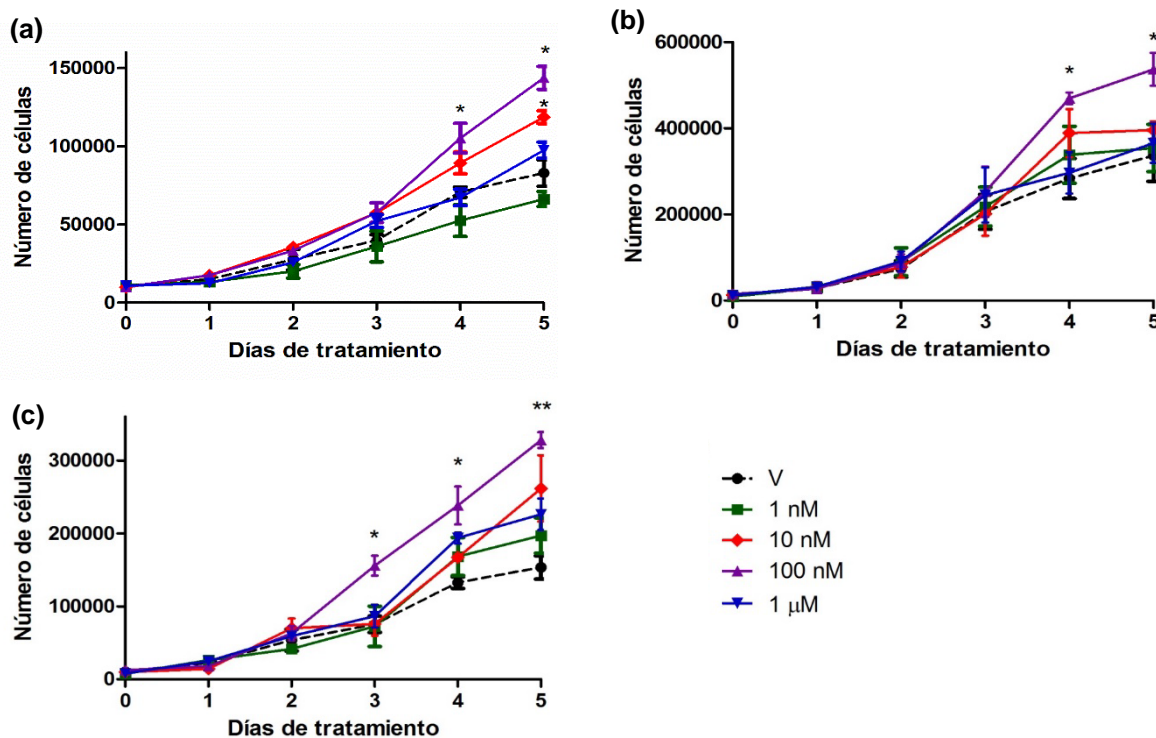


Figura 7. Efecto de la testosterona sobre el crecimiento de células derivadas de GBM. Resultados del conteo de células U87 (a), U251 (b) y D54 (c) con diferentes concentraciones de testosterona (T) durante 5 días. A las concentraciones 10 nM (U87) y 100 nM T aumentó significativamente el número de células con respecto a su control. Cada punto representa la media \pm E.S., n=5 ensayos independientes. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ vs el vehículo (V).

Por otro lado, en la **Figura 8** se observa que la viabilidad de las células U87, U251 y D54 se mantuvo constante en todas las concentraciones a lo largo de los 5 días de tratamiento con respecto al control, lo que indica que ninguna concentración de T ocasiona toxicidad celular que pudiera estar afectando la progresión tumoral de estas células.

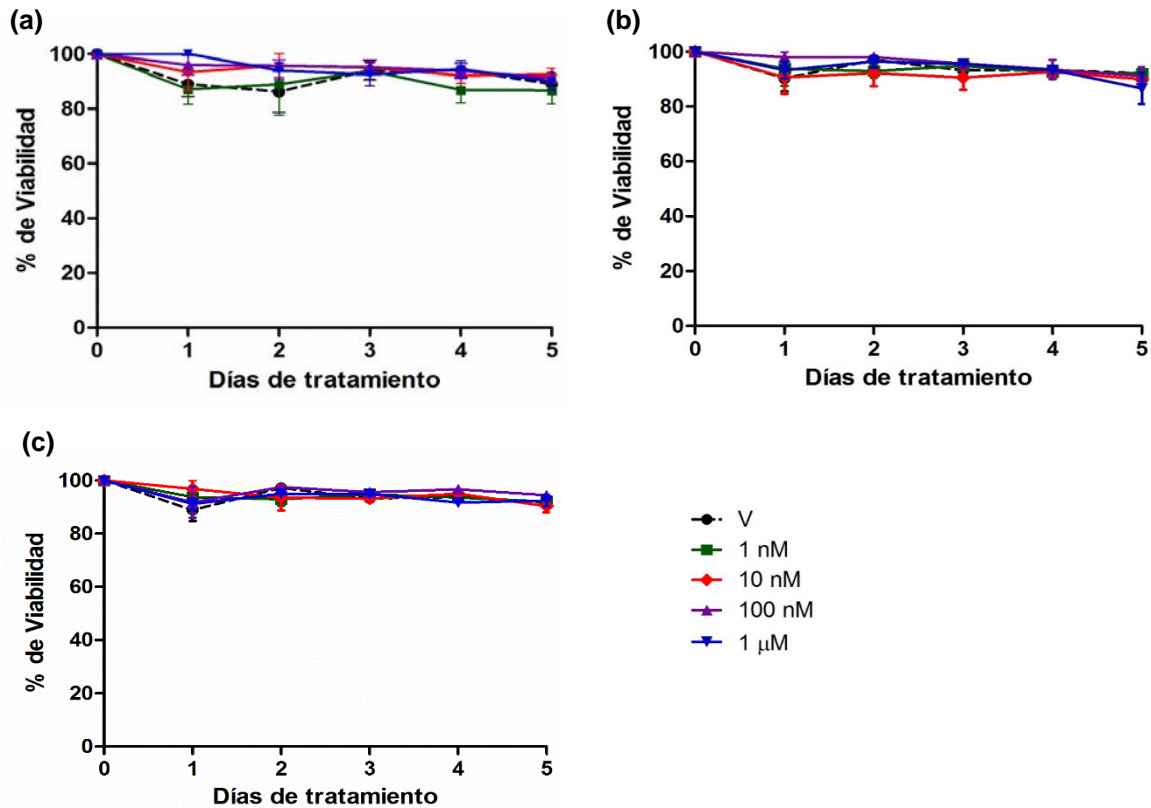


Figura 8. Efecto de la testosterona sobre la viabilidad de células derivadas de GBM. Porcentaje de viabilidad de las células U87 (a), U251 (b) y D54 (c) a diferentes concentraciones de testosterona (T) durante 5 días. Cada punto representa la media \pm E.S. $n=5$ ensayos independientes.

9.2. Efecto de la flutamida sobre el número de células y viabilidad de células derivadas de GBM.

Para determinar si el incremento en el número de células derivadas de GBM tras la administración de T es mediado por el RA, las células fueron tratadas con flutamida: un antagonista competitivo del RA (F, 5 μ M), testosterona (T 100 nM) y el tratamiento conjunto (F + T) 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. Nuevamente se observó un aumento significativo en el número de células U87, U251 y D54 tratadas con T (100 nM). Dicho efecto fue bloqueado por la F. La administración única del antagonista no modificó significativamente el número de células (**Figura 9**).

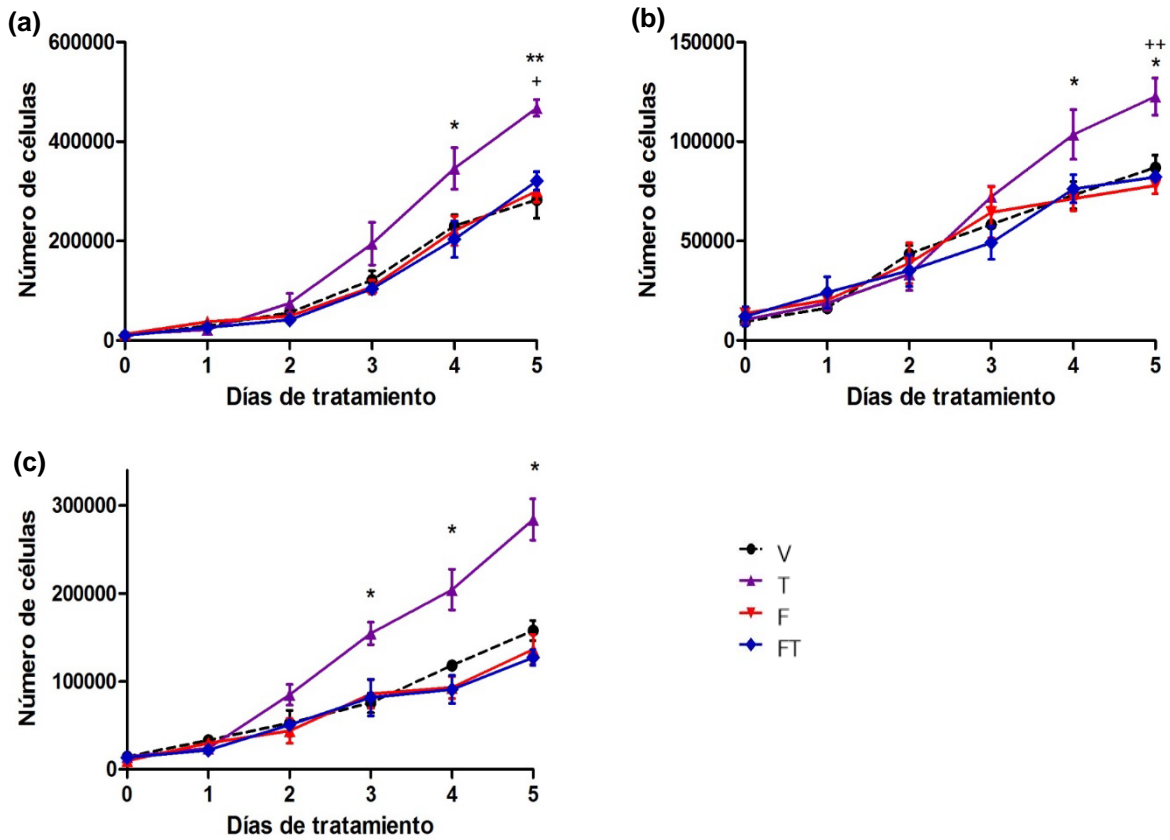


Figura 9. Efecto de la flutamida sobre el crecimiento de células derivadas de GBM. Resultados del conteo de células U87 (a), U251 (b) y D54 (c) durante 5 días con vehículo (V), testosterona (T 100 nM), flutamida (F 5 μ M), y F + T (FT). Cada punto representa la media \pm E.S, n=5 ensayos independientes. *p < 0.05; **p < 0.01: T vs V; o+ p < 0.05, ++ p < 0.01 T vs F y T+F.

En la **Figura 10** se muestra que la viabilidad de las células U87, U251 y D54 no se modifica en forma significativa con ninguno de los tratamientos a lo largo del tiempo en el que se mantuvieron los experimentos.

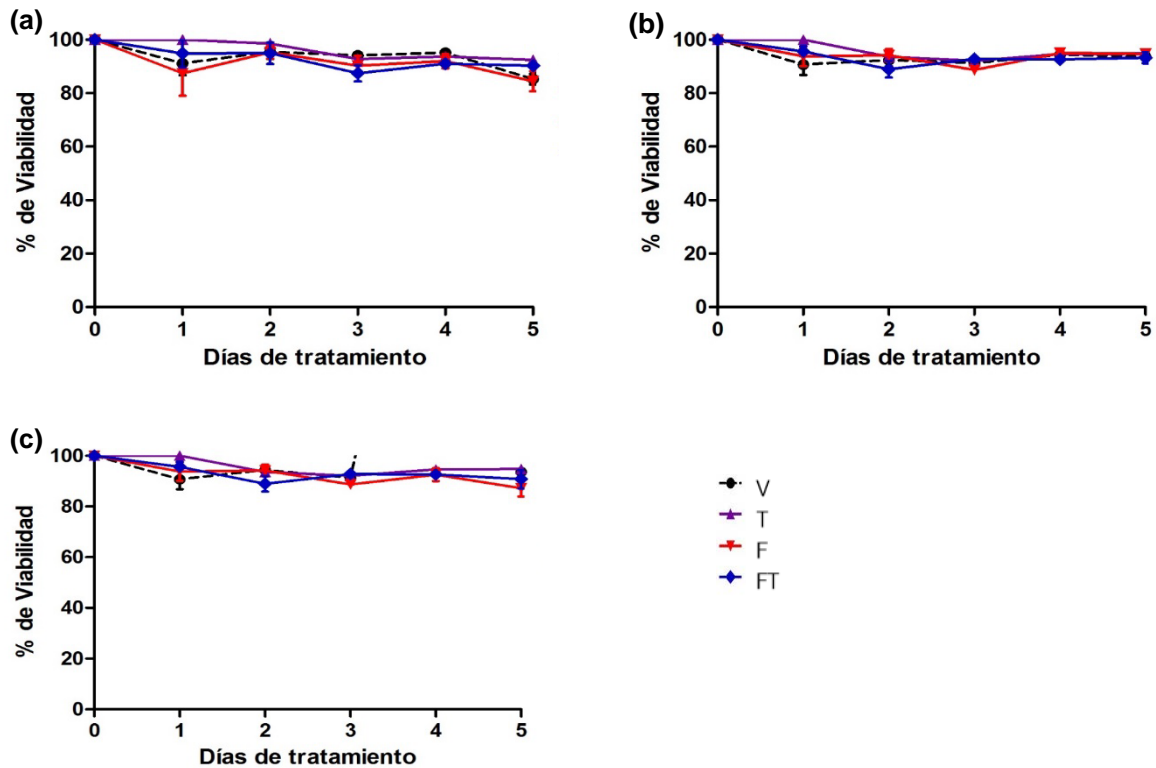


Figura 10. Efecto de la flutamida sobre la viabilidad de células derivadas de GBM. Porcentaje de viabilidad de las células U87 (a), U251 (b) y D54 (c) durante 5 días. Cada punto representa la media \pm E.S., n=5 ensayos independientes.

9.3. Papel de la testosterona y flutamida en la proliferación de células derivadas de glioblastoma humano.

Para conocer si el aumento de células generado por la T es ocasionado por un incremento en la proliferación celular, se realizó un ensayo de incorporación del análogo de la timina, 5-bromo-2' desoxiuridina (BrdU) a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas. El tratamiento con T se decidió tomando en consideración la concentración que causó el aumento significativo en el número de células (100 nM). En la **Figura 11** se puede observar que la T aumentó el porcentaje de células que incorporaron BrdU a partir de las 48 horas, lo que sugiere que el incremento en el número de células se debe principalmente a un aumento en la proliferación.

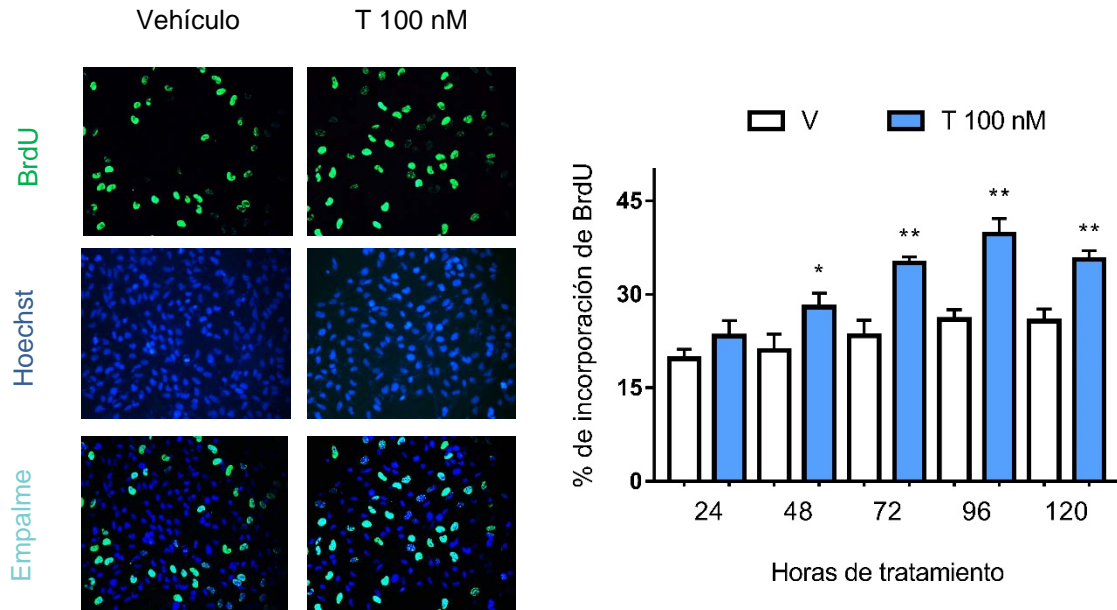


Figura 11. Efecto de la testosterona sobre la proliferación de células U87. Evaluación de la proliferación de células derivadas de GBM mediante el ensayo de incorporación de BrdU. Las células fueron tratadas con testosterona (T 100 nM) y vehículo (V) durante 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Las fotografías (amplificación 400X) representan resultados de los experimentos de inmunofluorescencia de células positivas a BrdU (panel superior), del núcleo (Hoechst, panel de en medio), y el empalme (panel inferior). La gráfica representa el porcentaje de células que incorporaron BrdU. Cada barra señala la media \pm E.S., n=3 ensayos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ T vs V a cada tiempo.

A partir de estos resultados se decidió evaluar el papel del RA en la proliferación celular de la línea D54 mediante el ensayo de incorporación de BrdU al día 3 de tratamiento; para determinar si el efecto de la T es mediado por su receptor nuclear. Los datos demostraron que el tratamiento con el antagonista del RA, la F abatió el efecto inductor de la proliferación de la T, mientras que la administración única de la F no modificó la proliferación celular (**Figura 12**).

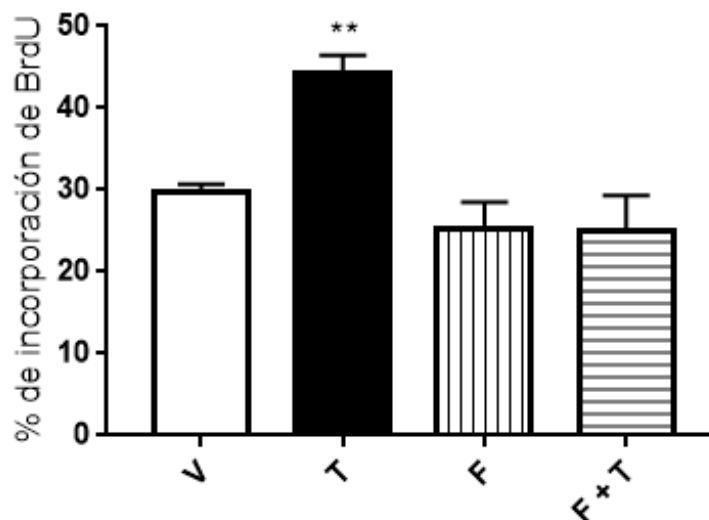


Figura 12. Efecto de la flutamida sobre la proliferación de células D54. La gráfica muestra los resultados del ensayo de incorporación de BrdU de la línea D54 durante 3 días con vehículo (V), testosterona (T 100 nM), flutamida (F 5 μ M) y F + T. Cada barra señala la media \pm E.S, n=3 ensayos independientes. **p < 0.01; T vs V, F y F+T.

9.4. Expresión del RA a nivel de proteína en células derivadas de GBMs humanos.

Para conocer si la expresión del RA en la línea celular U87 es modulada por T se detectó esta proteína por medio de la técnica de Western blot. En la **Figura 13** se observa que la expresión del RA es menor en las células que se trataron con T (100 nM) durante 24 horas con respecto al vehículo. El tratamiento con F (5 μ M) y el tratamiento conjunto no presentaron diferencias significativas en comparación con el vehículo. Como controles de la técnica se utilizaron a las células LnCaP como control positivo y a las células PC3 como control negativo, ambas derivadas de CaP.

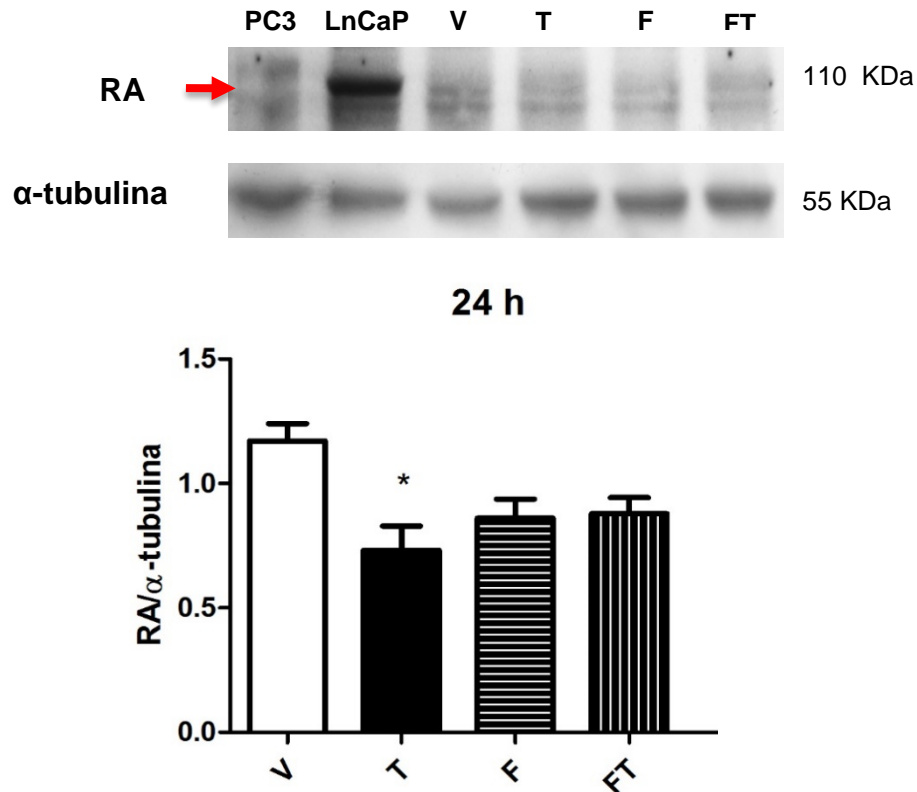


Figura 13. Expresión del RA en células U87. Resultados obtenidos del Western blot de células PC3 (control -), LnCaP (control +), y U251 tratadas con vehículo (V), testosterona (T 100 nM), flutamida (F 5 μ M) y F + T (FT) durante 24 horas. La gráfica representa el análisis densitométrico de los experimentos. Cada barra indica la media \pm E.S., n=3 ensayos independientes. *p < 0.05, T vs V.

9.5. Papel de la testosterona en la migración de la línea celular D54.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la T sobre la migración de células derivadas de un GBM humano se realizó el ensayo de “Cierre de Herida”. La concentración que se decidió evaluar fue la de 100 nM debido a que, en el presente trabajo, dicha concentración aumentó el número de células derivadas de GBM. Se observó que la T aumentó el número de células que migran con respecto al vehículo a partir de las 12 horas. El tratamiento con F y F + T no tuvo efecto en la migración de células D54 en los tiempos evaluados en comparación con el vehículo (**Figura 14**). El tratamiento de F + T bloqueó parcialmente el efecto de la T a las 24 horas.

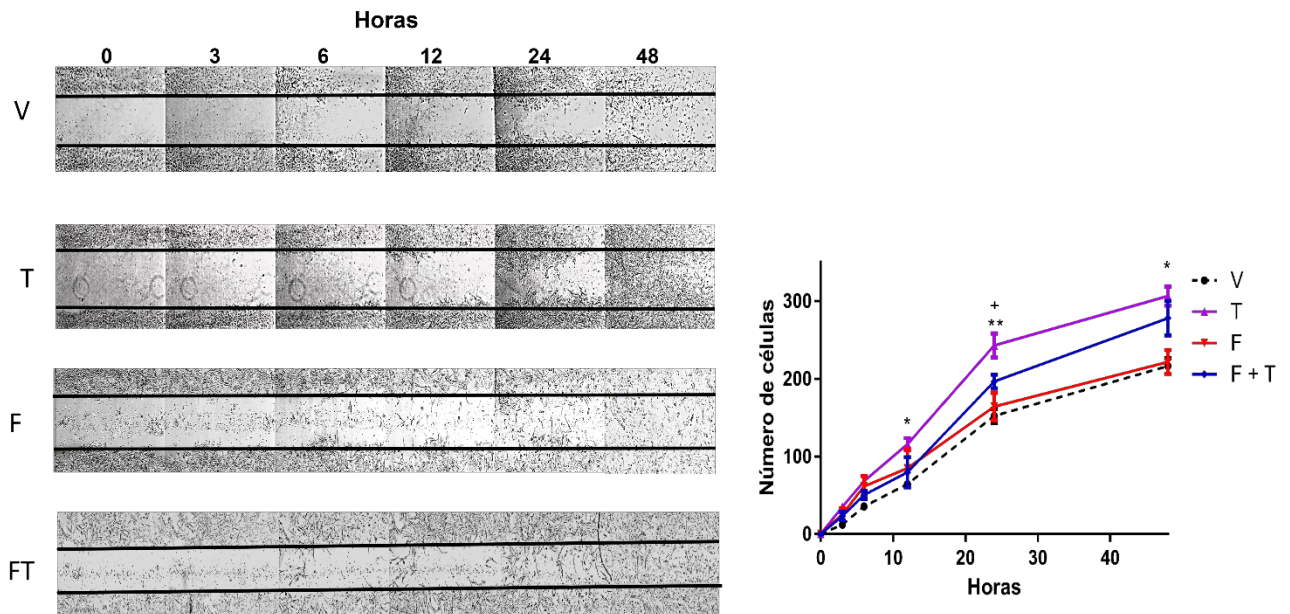


Figura 14. Efecto de la testosterona en la migración de células D54. En el panel de la izquierda se pueden observar las fotografías representativas a los distintos tiempos de ensayo de “Cierre de herida”. En el panel de la derecha se muestra la gráfica representativa del ensayo con del número de células que migraron a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas con tratamiento: vehículo (V), testosterona (T 100 nM), flutamida (F 10 μ M) y el tratamiento conjunto (F + T). Cada punto representa la media \pm E.S., n=4 ensayos independientes. *p < 0.05, **p < 0.01 T vs V o F;+ p < 0.05 T vs FT.

9.6. Papel de la testosterona en la invasión de la línea celular D54.

A continuación, se evaluó el efecto de la T en la invasión celular mediante el ensayo en las cámaras de Boyden y se encontró que la T (100 nM) aumentó el número de células invasivas en comparación con el vehículo y la F a las 24 horas. A diferencia de lo que se observó en el ensayo de migración, la F (10 μ M) no bloqueó el efecto invasivo producido por la T en las células D54 (**Figura 15**).

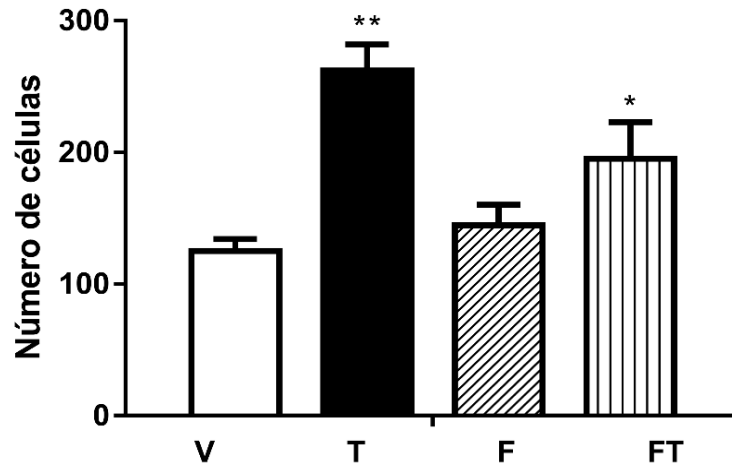
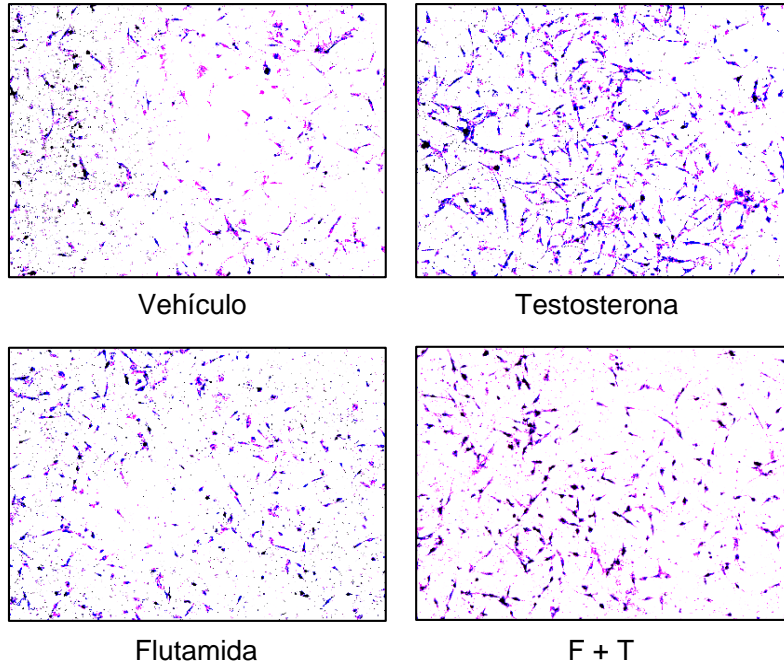


Figura 15. Efecto de la T en la invasión de células D54. En el panel superior se observan fotografías representativas del ensayo invasión en cámaras de Boyden tomadas a las 24 horas con los diferentes tratamientos. La gráfica representa el número de células que invaden a las 24 horas con Vehículo (V), testosterona (T 100 nM), flutamida (F 10 μ M) y tratamiento conjunto (FT). Cada punto representa la media \pm E.S., n=3 ensayos independientes. **p < 0.01 T vs V o F; *p < 0.05, FT vs V.

9. 7. Efectos de la Dihidrotestosterona sobre el crecimiento y viabilidad de la línea celular D54.

Debido a que la DHT es el principal metabolito de la testosterona se decidió evaluar su papel en el crecimiento celular para conocer si el metabolismo de la T podría estar mediando sus efectos. Las células D54 fueron tratadas con DHT a diferentes concentraciones (0.1 nM, 10 nM y 100 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 16** se observa un aumento significativo en el número de células D54, tratadas con DHT con las tres concentraciones evaluadas. La concentración de 10 nM tuvo un efecto inductor a partir del día 3 de tratamiento con respecto al vehículo.

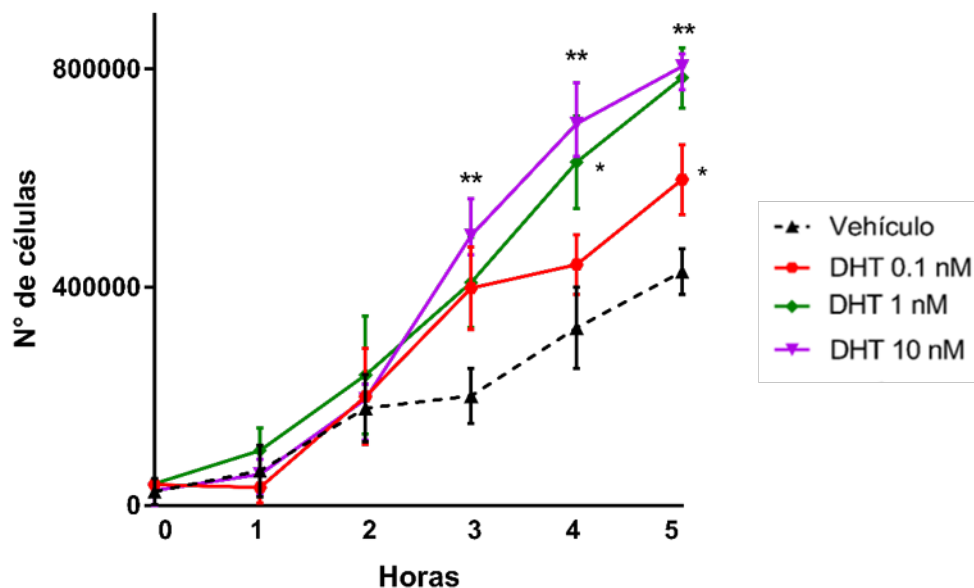


Figura 16. Efecto de la DHT sobre el crecimiento de células D54. Resultados del conteo de células D54 durante 5 días con vehículo (V) y dihidrotestosterona (DHT 0.1 nM-10 nM). Cada punto representa la media \pm E.S, n=4 ensayos independientes. *p < 0.05; **p < 0.01 DHT vs V.

En la **Figura 17** se observa que la viabilidad de las células D54 se mantuvo constante en todas las concentraciones a lo largo de los 5 días de tratamiento con respecto al control.

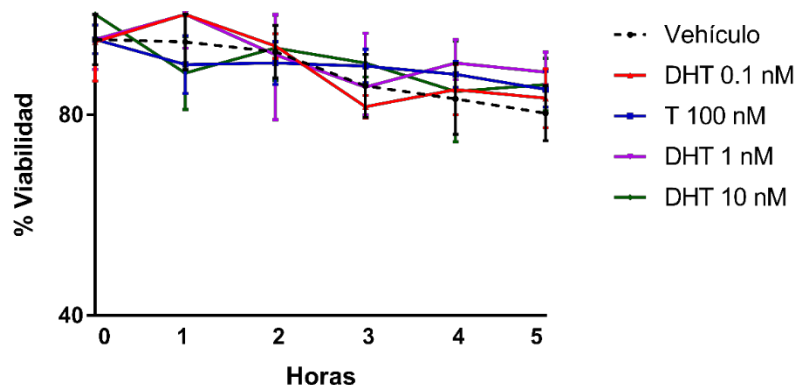


Figura 17. Efecto de la DHT sobre la viabilidad de la línea D54. Cada punto representa la media \pm E.S., n=4 ensayos independientes.

9. 8. Efectos de la finasterida y la dutasterida sobre el crecimiento y viabilidad de la línea celular D54.

A partir de los resultados anteriores se seleccionó la dosis de 1 nM de DHT para determinar si el efecto de ésta puede inhibirse al bloquear la formación de DHT a partir de la T. Así, se emplearon tratamientos de T 100 nM, y dos inhibidores de la 5 α -reductasa: finasterida (Fin, 5 μ M) y dutasterida (D 2.5 μ M). La Fin inhibe selectivamente a la 5 α -reductasa tipo II, mientras que la D puede inhibir con mayor potencia a las dos isoenzimas 5 α -reductasa I y II (Clark, 2004). En la **Figura 18** se puede observar que la DHT tiene un mayor efecto inductor del crecimiento de células que la T a partir del día 3 de tratamiento. La Fin por sí sola no tuvo efecto en el crecimiento celular, sin embargo, la D disminuyó el número de células con respecto al vehículo (día 3). Los dos inhibidores de la 5 α -reductasa bloquearon el efecto de la T, como se observa en los tratamientos conjuntos (Fin + T; D + T) cuyos efectos son similares al vehículo.

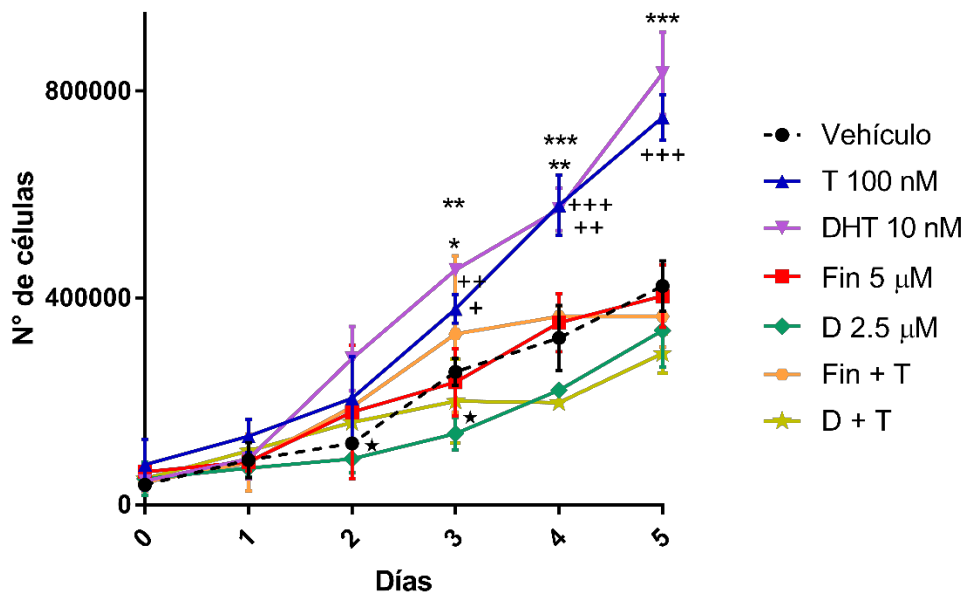


Figura 18. Efecto de la Fin y D sobre el crecimiento de las células D54. Resultado del conteo durante 5 días en los que se mantuvieron los tratamientos. Cada punto representa la media \pm E.S, n=5 ensayos independientes. * $p < 0.05$; V vs D; ** $p < 0.01$ DHT vs Fin y Fin + T; *** $p < 0.001$ DHT vs V, D y D+T. + $p < 0.05$; T vs D y DHT; ++ $p < 0.01$ T vs V, Fin y Fin + T. +++ $p < 0.001$ T vs D y D + T.

En la **Figura 19** se muestra que la viabilidad celular no se modificó de forma significativa con ninguno de los tratamientos a lo largo del tiempo en el que se mantuvieron los experimentos.

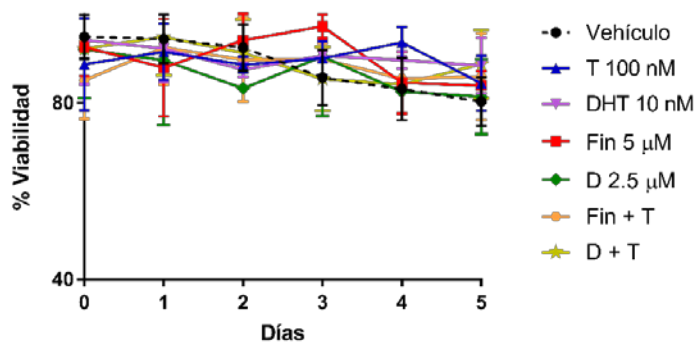


Figura 19. Efecto de la DHT sobre la viabilidad de la línea D54. Cada punto representa la media \pm E.S., n=4 ensayos independientes.

9.9. Papel de la DHT en la proliferación de células derivadas de glioblastoma humano.

Para determinar el efecto de la DHT sobre la proliferación de las células D54 se empleó la técnica de incorporación de BrdU el día 3 de tratamiento. Los resultados demostraron que la DHT tuvo un efecto inductor de la proliferación mayor al de la T. Mientras la Fin y D inhibieron el efecto de la T. Por otra parte, el tratamiento con Fin no tuvo ningún efecto significativo en la proliferación mientras que la D disminuyó la proliferación celular con respecto al vehículo (**Figura 20**).

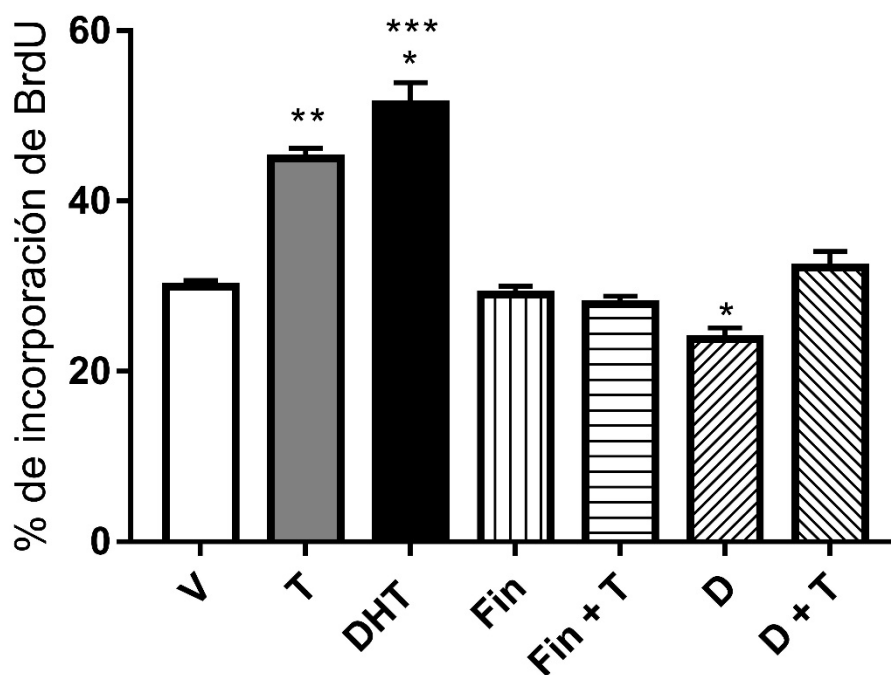


Figura 20. Efecto de la DHT sobre la proliferación de células D54. Porcentaje de incorporación de BrdU en células derivadas de un GBM tratadas con vehículo (V), testosterona (T 100 nM), DHT (10 nM), finasterida (Fin 5 μ M), Fin + T, dutasterida (D 2 μ M) y D + T. Cada barra señala la media \pm E.S, n=3 ensayos independientes. * $p < 0.05$ D vs V y DHT vs T. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ T o DHT vs V, Fin, D, Fin + T y D + T.

10. DISCUSIÓN

Se ha descrito ampliamente que los andrógenos son hormonas que participan en varios procesos fisiológicos y patológicos en el SNC. (Diate, et al., 2018). Se sabe también que éstos están implicados en la regulación del crecimiento tumoral, por ejemplo de CaP, cáncer de colón y de pulmón (Hyde, et. al., 2012; Solarzano, et. al., 2018; Liu et al., 2014). Por lo tanto, en este trabajo se decidió evaluar el papel de la T en la fisiopatología de los GBM, cuya incidencia es mayor en varones que en mujeres en una relación de 3:2.

De acuerdo con nuestros resultados, la T con una concentración de 100 nM, puede inducir el crecimiento de las líneas celulares utilizadas en este estudio: U87, U251 y D54, todas derivadas de GBMs humanos, sin modificar el porcentaje de viabilidad. Para corroborar que el crecimiento celular fue debido a un incremento en la proliferación, se realizó un ensayo de BrdU con la línea U87 debido a que el efecto inductor de la T se observó en las tres líneas. Se encontró que la T genera un incremento en la proliferación celular desde las 48 horas que se refleja en el número de células a partir del cuarto día. Los datos anteriores concuerdan con lo reportado por Merritt & Foran (2007), quienes observaron un incremento en la viabilidad celular con T (1000 nM) en células T98G derivada de GBM al día 5 mediante el ensayo de MTT (T 1000 nM). A pesar de que el efecto inductor observado en el presente estudio, se dio con concentraciones de T mayores a las fisiológicas, se ha demostrado que los niveles de T de pacientes con algún tipo de glioma son mayores a las de los pacientes con algún otro tumor benigno o lesión cerebral (Bao, et. al., 2017).

Los efectos de la T pueden ser mediados por el RA, un factor de transcripción nuclear miembro de una familia de receptores esteroideos. Estudios anteriores han reportado que la expresión del RA es mayor en pacientes con GBM en comparación con el tejido cerebral normal de los mismos pacientes (Yu et al., 2015); y que la expresión del RA aumenta conforme progresa el grado de malignidad de los astrocitomas, siendo los de grado IV los que presentan mayor expresión a nivel

proteína (Bao, 2017). También se ha descrito la sobreexpresión del RA en 8 líneas celulares derivadas de GBM entre ellas la U87 y U251 (Yu et al., 2015; Bao 2017). Dichos datos se replicaron en este estudio mediante western blot. Con base en lo anterior, se evaluó si el efecto inductor de la T puede ser mediado por el RA, por lo tanto se administró F, un antiandrógeno no esteroideo que no muestra propiedades androgénicas, lo que lo hace adecuada para su uso en el tratamiento del cáncer de prostata (Tan, et. al., 2015; Singh, 2000). Se observó que el tratamiento con F bloquea el efecto de la T sobre el crecimiento de las tres líneas celulares utilizadas en este estudio, así como también bloqueó el incremento de la proliferación celular de la línea D54 generado por T al tercer día de tratamiento. Por otro lado, recientemente se demostró que el silenciamiento del RA en líneas celulares y la inhibición farmacológica del mismo, induce la muerte celular GBM *in vivo* e *in vitro* y una disminución del crecimiento tumoral en un modelo murino (Bao, et. al., 2017; Zalcman, et al., 2018). Estos resultados resaltan la posibilidad de que la señalización del RA activada por T puede desempeñar un papel importante en el crecimiento de GBM.

Al analizar los niveles de proteína del RA mediante Western blot, se observó que el tratamiento con T disminuyó los valores del receptor. Lo anterior puede deberse a una degradación del RA activada por su ligando, que es característico de los receptores nucleares (Tan, et. al., 2015). Dado que la F no permite la translocación al núcleo y por lo tanto la posterior degradación del RA por ubiquitinación, el tratamiento conjunto no modificó los valores del RA ni tampoco la adición única de F. Es importante resaltar que a pesar de la disminución en los niveles de RA por T, es posible que lo que quede del receptor en las células de GBMs sea suficiente para inducir proliferación celular por T. Para corroborar lo anterior se debe evaluar los niveles de transcripción de genes que contengan ERAs.

El principal metabolito de la T es la DHT, el cual se genera por una reacción catalizada por la 5 α -reductasa expresada en diferentes regiones del SNC. En nuestro equipo de trabajo se ha descrito la expresión de las dos isoenzimas 5 α -

reductasa tipo I y tipo II en líneas celulares derivadas de GBM (Zamora-Sanchez, et. al. 2017). Por lo tanto, se decidió evaluar el papel de la DHT con la finalidad de conocer si el metabolismo de la T podría estar mediando sus efectos. Los resultados indican que la DHT indujo el crecimiento de células D54 con las tres concentraciones probadas (0.1 nM, 1 nM y 10 nM), pero solo hubo diferencia significativa a partir del tercer día con la concentración 10 nM. Así mismo, se demostró que la DHT tuvo un mayor efecto inductor que la T. La DHT difiere de la T por la ausencia de un solo doble enlace en el anillo A, lo que aumenta su afinidad para el RA dos veces y disminuye la tasa de disociación cinco veces en comparación a la T, este efecto se ve compensado por una mayor concentración de T en el cuerpo (Grino, Griffin y Wilson 1990). Para evaluar la participación del metabolismo de la T a DHT se utilizaron dos inhibidores de la 5 α -reductasa: Fin y D. La Fin puede inhibir selectivamente a la 5 α -reductasa tipo II, mientras que la D puede inhibir con mayor potencia a las dos isoenzimas 5 α -reductasa I y II (Clark, 2004). Los datos demuestran que ambos inhibidores bloquearon el efecto inductor de la T. Sin embargo, al comparar el tratamiento de alguno de estos inhibidores y el grupo control, se observa que la D disminuye el crecimiento y proliferación de las células D54 derivadas de GBM. Por lo tanto, se puede concluir que las dos isoenzimas participan en el metabolismo de la T y pueden mediar sus efectos.

Por otro lado, en el desarrollo de este estudio se consideró que este tipo de tumores presentan una alta capacidad de infiltración que conlleva procesos de migración e invasión a los tejidos circundantes del SNC, por lo tanto, se decidió evaluar por primera vez la motilidad de células derivadas de GBM en respuesta a la T. Es relevante evaluar el papel de los andrógenos sobre la capacidad de infiltración, ya que esta los vuelve más resistentes a la remoción quirúrgica y por ende se desarrolla una reincidencia tumoral y una disminución en la sobrevida del paciente (Yilmaz y Christofori, 2009). La migración celular es un proceso común que efectúan las células para trasladarse de un lugar a otro en respuesta a diferentes situaciones como la necesidad de obtener alimento, la presencia de factores quimioatrayentes, o la necesidad de conformar nuevos tejidos (Horowitz y Webb, 2003). Sin embargo,

en condiciones patológicas, la producción anormal de señales migratorias puede generar efectos perjudiciales en la homeostasis de los tejidos o en la salud del individuo como sucede en enfermedades causadas por alteraciones inmunológicas como la esclerosis múltiple o por metástasis (Luster, 2005). A diferencia de la migración, la invasión celular también implica la adhesión celular y la degradación de la MEC, lo que permite a las células la penetración a través de las barreras de los tejidos como la membrana basal o el estroma (Yilmaz y Christofori, 2009; Friedl y Wolf, 2003).

Los resultados indican que la T incrementó la migración de las células D54 a las 12, 24 y 48 horas. Se resalta que el aumento en el número de células que migraron con el tratamiento de T se debió solo a una mayor motilidad y no al aumento en la proliferación celular debido al uso de Ara-C. La incorporación de este al ADN funciona como un potente inhibidor de las ADN polimeras (α , β y δ), lo que interfiere con la elongación de las cadenas durante la replicación y reparación (Grant, 1998). Es importante mencionar que la administración del antagonista del RA: la F, abatió parcialmente el efecto de la T sobre la migración celular, lo que pone de manifiesto la participación de otros mecanismos que regulan la actividad de la T, como puede ser el receptor a andrógenos de membrana (RAm), cuya acción mediante el mecanismo no clásico se ha descrito recientemente en CaP y en las células de Sertolli (Thomas, et. al., 2018).

De manera similar, la T incrementó la invasión de células derivadas de GBM en un modelo *in vitro*. Como se mencionó, la infiltración de los GBM a zonas del tejido cerebral sano no solo involucra migración, sino también involucra la acción de proteínas como las metaloproteinasas (MMP), por lo tanto, es posible que la T tenga un efecto sobre alguna de las MMP descritas en GBM. Se ha observado que las MMP-1 pertenecientes a las gelatinasas y las MMP 2 y 9 del grupo de las colagenasas están sobreexpresadas en GBM. También se ha descrito la participación de la MMP 14 en la motilidad de células derivadas de GBM, así como una expresión diferenciada de las MMP entre las líneas celulares (Hagemann, et.

al., 2010). Finalmente, se observó que el efecto inductor de la T sobre la invasión de células derivadas de GBM se bloquea parcialmente por la F, reduciendo el número de células que invaden, lo que indica que también en la invasión participa el RA, no obstante, no se descarta la participación de un mecanismo no nuclear de la T o de sus metabolitos que pudieran estar mediando su efecto sobre la migración e invasión de las células derivadas de GBM. Por ejemplo, estudios previos han reportado que la enzima que sintetiza E₂ a partir de la T, la aromatasa se encuentra sobreexpresada en biopsias de astrocitomas, además de que ésta se ha correlacionado negativamente con la supervivencia de los pacientes; y positivamente con la concentración de E₂ (Dueñas Jiménez et al., 2014). Nuestro equipo de trabajo demostró previamente que el E₂ incrementa el crecimiento celular de líneas derivadas de GBM por la activación del ER α (González-Arenas, et. al., 2012). Estos datos nos indican, que no solo es importante el metabolismo de la T a DHT y la activación del RA en la fisiopatología de los GBM, sino que también podría participar el E₂ como metabolito de T en la modulación de sus efectos por lo que deberían ampliarse los estudios al respecto.

11. CONCLUSIÓN

La T incrementa el crecimiento celular, proliferación, migración e invasión de células derivadas de GMB mediante la activación del RA.

El metabolismo de la T a DHT podría ser un factor determinante en el crecimiento de los GBMs humanos.

12. PERSPECTIVAS

Para continuar con el estudio de los andrógenos sobre la fisiopatología de los GBMs es necesario determinar el papel de la DHT sobre la migración e invasión en líneas celulares de GBM y en un modelo *in vivo*. Asimismo, nos gustaría evaluar la participación del E₂ en los procesos de motilidad celular para valorar la hipótesis de

que la progresión de los GBMs podría ser modulada por andrógenos a través de su metabolismo a estrógenos. Finalmente, se sugiere la evaluación del RAm activado por T para determinar si su participación puede explicar el bloqueo parcial de los efectos de la T sobre la migración e invasión observados en este estudio con el uso del antagonista del RA.

13. REFERENCIAS

- Almeida, O. P., Waterreus, A., Spry, N., Flicker, L., & Martins, R. N. (2004). One year follow-up study of the association between chemical castration, sex hormones, beta-amyloid, memory and depression in men. *Psychoneuroendocrinology*, 29(8), 1071–1081.
- Arko, L., Katsyv, I., Park, G. E., Luan, W. P., & John, K. (2011). Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. *Pharmacol Ther*, 128(1), 1–36.
- Arrondo, L. (2004). Fisiología hormonal masculina, 1–12. Retrieved from <http://www.aeu.es/userfiles/muestramaterialdocentecfsh.pdf>
- Arumugam, A., Lissner, E. A., & 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 Endocrinology*, 12(1), 66.
- Bai, Ren Yuan, Verena Staedtke, and Gregory J. Riggins. 2011. Molecular Targeting of Glioblastoma: Drug Discovery and Therapies. *Trends in Molecular Medicine* 17 (6).
- Bao, D., Cheng, C., Lan, X., Xing, R., Cheen, Z., Zhao, H., Sun, J., Wang, Y., Niu, C., Zhang, Bo., & Fang, S. (2017). Regulation of p53 glioma cell proliferation by androgen receptor-mediated inhibition of small VCP/p97-interacting protein expression. *Oncotarget*, 8 (14), 23142-2354.
- Bennett, N. C., Gardiner, R. A., Hooper, J. D., Johnson, D. W., & Gobe, G. C. (2010). Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(6), 813–827.
- Bigner SH, Mark J, Bigner DD (1983) Chromosomal composition of four permanent cultured cell lines derived from human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet*: 335-349
- Brandes, A. A., Tosoni, A., Franceschi, E., Reni, M., Gatta, G., & Vecht, C. (2008). Glioblastoma in adults. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 67(2), 139–52.

- Bristol, R. E. (2009). Low-grade glial tumors: are they all the same? *Seminars in Pediatric Neurology*, 16(1), 23–6.
- Burnet, N. G., Jefferies, S. J., Benson, R. J., Hunt, D. P., & Treasure, F. P. (2005). Years of life lost (YLL) from cancer is an important measure of population burden--and should be considered when allocating research funds. *British Journal of Cancer*, 92(2), 241–245.
- Carlsson, K., Shaun, B., & Claes, W. (2014). Emerging Treatment Strategies for Glioblastoma Multiforme. *EMBO Molecular Medicine* 6 (11): 1359–70.
- Chen, H. (2005). Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol.* 294:15-22.
- Chen, Y.H., & Gutmann, D. H. (2014). The molecular and cell biology of pediatric low-grade gliomas. *Oncogene*, 33(16), 2019–26.
- Davis, M. (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing* 20 (5).
- Diotel, N., Charlier, T., Lefebvre, C., Couret, D., Trudeau, V., Nicolau, J., et. al. (2018). Steroid transport, local synthesis, and signaling within the brain: Roles in Neurogenesis, Neuroprotection, and Sexual Behaviors. *Front in Neurosci.* 84(12).
- Dueñas Jiménez, J. M., Candanedo Arellano, A., Santerre, A., Orozco Suárez, S., Sandoval Sánchez, H., Feria Romero, I., Dueñas Jiménez, S. H. (2014). Aromatase and estrogen receptor alpha mRNA expression as prognostic biomarkers in patients with astrocytomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 119(2), 275–284.
- Fix, C., Jordan, C., Cano, P., & Walker, W. H. (2004). Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30), 10919–24.
- Franco-Hernández, C., Martínez-Glez, V., & Rey, J. A. (2007). [Biology molecular of glioblastomas]. *Neurocirugía (Asturias, Spain)*, 18(5), 373–82. Retrieved from
- Friedl, P. & Wolf, F. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanism. *Nature Review Cancer*. 3(5): 362-374.
- Friedmann-Morvinski, D., Bushong, E. A., Ke, E., Soda, Y., Marumoto, T., Singer, O., & Verma, I. M. (2012). Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6110), 1080–4.
- Frei, K., Dorothee, G., Isabel, T., Judith, J., Larisa, E., Rushing, E., et. al. (2015). Transforming Growth Factor- β Pathway Activity in Glioblastoma. *Oncotarget*. 6 (8).

- Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., ... Cavenee, W. K. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development*, 21(21), 2683–710.
- García, R. (2018). Unidad de Neurocirugía de la Universidad de Madrid. Consultado en: [neurorgs.net/informacion-al-paciente/patologia craneoencefalica/que-es-un-glioma/](http://neurorgs.net/informacion-al-paciente/patologia_craneoencefalica/que-es-un-glioma/)
- Gelmann, E. P. (2002). Molecular Biology of the Androgen Receptor. *Journal of Clinical Oncology*, 20(13), 3001–3015.
- Germán-Castelán, L., Manjarrez-Marmolejo, J., González-Arenas, A., González-Morán, M. G., & Camacho-Arroyo, I. (2014). Progesterone Induces the Growth and Infiltration of Human Astrocytoma Cells Implanted in the Cerebral Cortex of the Rat. *BioMed Research International*, 2014, 1–8.
- González- Arenas, A., Hansberg-Pastor, V., Hernández-Hernández, O., González-García, T., Henderson-Villalpando, J., Lemus-Hernández, D., et. al. (2010). Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ER α activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators. *Biochem Biophys Acta*. 1823(2): 379-386.
- Grant, S. (1998). Ara-C: cellular and molecular pharmacology. *Advances in Cancer Research*. 72: 197-223.
- Hagemann, C., Vince G., Haas S., Riesner, D., Schöming, B., Ernestus, R., et. al. (2010). Comparative expression pattern of Matrix Metalloproteinases in human glioblastomas cell lines and primary cultures. *BMC Res Notes*. 3: 293-303.
- Hanahan, D., & Robert, W. (2011). Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144 (5).
- Heemers, H. V, & Tindall, D. J. (2007). Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocrine Reviews*, 28(7), 778–808.
- Hernández-Hernández, O. T., Rodríguez-Dorantes, M., González-Arenas, A., & Camacho-Arroyo, I. (2010). Progesterone and estradiol effects on SRC-1 and SRC-3 expression in human astrocytoma cell lines. *Endocrine*, 37(1), 194–200.
- Horwitz, R., & Webb, D. (2003). Cell migration. *Curr Biol*. 3(19): 56-59.
- Hyde, Z., Flicker, L., McCaul, K. a, Almeida, O. P., Hankey, G. J., Chubb, S. a P., & Yeap, B. B. (2012). Associations between testosterone levels and incident prostate, lung, and colorectal cancer. A population-based study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 21(8), 1319–29.
- Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger,

- P. C., & Cavenee, W. K. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61(3), 215-225-229.
- Li, J. & Al-Azzawi, F. (2009). Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas*. 63(2): 142-148.
- Liu, C., Zhang, Y., Zhang, K., Bian, C., Zhao, Y. & Zhang, J. (2014). Expression of estrogen receptors, androgen receptor and steroid receptor coactivator-3 is negatively correlated to the differentiation of astrocytic tumors. *Cancer Epidemiol.* 38(3): 291–297.
- Llaguno, S. A., Chen, J., Kwon, C., Jackson, E., Li, Y., Burns, D., & Parada, L. (2010). NIH Public Access. *Cancer*, 15(1), 45–56.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W., et.al. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820.
- McEwan, I. J. (2004). Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: Structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocrine-Related Cancer*, 11(2), 281–293.
- McKinley, B. P., Michalek, A. M., Fenstermaker, R. A., & Plunkett, R. J. (2000). The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995. *Journal of Neurosurgery*, 93(6), 932–9.
- McLendon, R., Allan, F., Darrell, B., Erwin, G., Van M., Daniel, J. et. al. (2008). Comprehensive Genomic Characterization Defines Human Glioblastoma Genes and Core Pathways. *Nature*. 455 (7216): 1061–68.
- Merritt, R. L., & Foran, C. M. (2007). Influence of persistent contaminants and steroid hormones on glioblastoma cell growth. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 70(1), 19–27.
- Nachbichler, S., Schupp, G., Ballhausen, H., Niyazi, M. & Belka, C. (2017). Temozolomide during radiotherapy of glioblastoma multiforme. *Strahlenther. Onkol.* 193(11): 890–896.
- Nguyen, T.-V. V, Yao, M., & Pike, C. J. (2007). Flutamide and cyproterone acetate exert agonist effects: induction of androgen receptor-dependent neuroprotection. *Endocrinology*, 148(6), 2936–43.
- Ohgaki, H., & Paul, K. (2013). The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research* 19 (4): 764–72.
- Olar, A., & Kenneth D. (2014). Using the Molecular Classification of Glioblastoma to Inform Personalized Treatment. *Journal of Pathology* 232 (2): 165–77.

- OMS.(2018). Cáncer. Nota descriptiva 297. Centro de prensa. Consultado en:
- Piña, A., Hansberg, V., González, A., Cerbón, M. & Camacho-Arroyo (2016). Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells. *Steroids*, 105,19-25.
- Sarkar, C., Jain, A., & Suri, V. (2009). Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian Journal of Cancer*, 46(2), 108–119.
- Sauvageot, C. M., Kesari, S., & Stiles, C. D. (2007). Molecular pathogenesis of adult brain tumors and the role of stem cells. *Neurologic Clinics*, 25(4), 891–924.
- Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D., & Wrensch, M. (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature Clinical Practice. Neurology*, 2(9), 494–503.
- Sharifi, N. (2013). Mechanisms of androgen receptor activation in castration-resistant prostate cancer. *Endocrinology*.
- Sharma, S., Theresa, K., & Peter, J. (2009). Epigenetics in Cancer. *Carcinogenesis* 31 (1): 27–36.
- Siegfried, J. M. (2014). Smoking out reproductive hormone actions in lung cancer. *Molecular Cancer Research : MCR*, 12(January), 24–31.
- Singh, S., Gauthier, S. & Labrie, F. (2000). Androgen receptor antagonists (antiandrogens): structure-activity relationships. *Curr Med Chem*. 7(2): 211-247.
- Smith, L. & Walker, W. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol*. 30: 2–13.
- Solarzano, S., Imaz-Rosshandler, I., Camacho-Arroyo, I., Garcia-Tobilla, P., Morales-Montor, G., Salazar, P., et. al. (2018). GABA promotes gastrin-releasing peptide secretion in NE/NE like cells: Contribution to prostate cancer progression. *Sci Rep*. 8(1).
- SSA. (2017). ¿Cómo estamos en materia de cáncer? Elaboración de un registro de salud. En prensa. Consultado en: <https://www.gob.mx/salud/articulos/como-estamos-en-materia-de-cancer?idiom=es>
- Tabassum, P., & Kornelia, P. (2015). Tumorigenesis: It Takes a Village. *Nature 51 Reviews Cancer* 15 (8). Nature Publishing Group: 473–83.
- Tan, M., Li, J., Xu, E., Melcher, K. & Yong, E. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*. 36(3): 1-23.
- Tavares, C., Gomes-Braga, F., Costa-Silva, D., Escórcio-Dourado, C., Borges, U., Conde-Junior, A., et.al. (2016). Expression of estrogen and progesterone receptors in astrocytomas: a literature review. *Clinics (Sao Paulo)*. 71(8): 481–486.

- Tihan, T., & Bloomer, M. M. (2010). Astrocytic neoplasms of the central nervous system and orbit: a morphologic perspective. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 27(2), 114–21.
- Valadez-Cosmes, P., Germán-Castelán, L., González-Arenas, A., Velasco-Velázquez, M. A., Hansberg-Pastor, V., & Camacho-Arroyo, I. (2015). Expression and hormonal regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 154, 176–185.
- Villamar C., Manjarrez, J., Alvarado, R., & Camacho-Arroyo, I. (2006) Regulation of the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors SRC1 and SMRT by the 26S proteasome in the rat brain during the estrous cycle. *Brain Research*: 276-281.
- Thomas, P., Converse, A. & Berg, H. (2018). ZIP9, a novel membrane androgen receptor and zinc transporter protein. *Gen Comp Endocrinol*. 257(1): 130-136.
- Weigel, N., & Moore, L. (2007). Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Molecular Endocrinology*, 21:2311-2319.
- Welk, B., McArthur, E., Ordon, M., Morrow, S., Hayward, J. y Dixon, S., (2017). The risk of dementia with the use of 5 alpha reductase inhibitors. *Journal of the Neurological Sciences*. 379, 109-111.
- Weller, M., Wolfgang, W., Ken, A., Michael, B., Stefan, M., Ryo, N., et.al., (2015). "Glioma" *Nature Reviews Disease Primers*, 15017.
- Yilmaz, M. & Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 28(1-2): 15-33.
- Yu, X., Jiang, Y., Wei, W., Cong, P., Ding, Y., Xiang, L., et. al. (2015). Androgen receptor signaling regulates growth of glioblastoma multiforme in men. *Tumour Biol*, 36(2): 967–972.
- Wilson, C. M., & McPhaul, M. J. (1994). A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(4), 1234–8.
- Yu, X., Jiang, Y., Wei, W., Cong, P., Ding, Y., Xiang, L., & Wu, K. (2015). Androgen receptor signaling regulates growth of glioblastoma multiforme in men. *Tumour Biol*, 36(2), 967–972.
- Zalcman, N., Canello, T., Ovadia, H., Charbit, H., Zelikovitch, B., Mordechai, A., et. al., (2018). Androgen receptor: a potential therapeutic target for glioblastoma. *Oncotarget*. 9(28): 19980-19993.
- Zamora-Sánchez, C., Hansberg-Pastor, V., Salido-Guadarrama, I., Rodríguez-Dorantes, M. & Camacho-Arroyo, I. (2017). Allopregnanolone promotes proliferation and differential gene expression in human glioblastoma cells. *Steroids*. 119: 36-42.

- Zhang, A., Ostrom, Q., Kruchko, C., Rogers, L., Peereboom, D. & Barnholtz-Sloan, J. (2017). Complete prevalence of malignant primary brain tumors registry data in the United States compared with other common cancers, 2010. *Neuro Oncol.* 19(5): 726–735.
- Zhu, M.-L., & Kyprianou, N. (2008). Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*, 15, 841–849.

14. ANEXO

TESTOSTERONE PROMOTES GLIOBLASTOMA CELL PROLIFERATION, MIGRATION AND INVASION THROUGH ANDROGEN RECEPTOR ACTIVATION

Dulce Carolina Rodríguez-Lozano¹, Ana Gabriela Piña-Medina², Valeria Hansberg-Pastor²,
Ignacio Camacho-Arroyo^{1*}

*¹Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de
México, México.*

²Facultad de Química, Departamento de Biología, UNAM, Ciudad de México, México.

*Corresponding author:

Dr. Ignacio Camacho-Arroyo,
Unidad de Investigación en Reproducción Humana,
Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Ciudad de México, México;
Tel.: (+52) 55 5520 9900/5622 3732;
Fax: (+52) 55 5616 2010;
E-mail address: camachoarroyo@gmail.com

ABSTRACT

Glioblastomas (GBM) are the most frequent and aggressive primary tumors of the Central Nervous System (CNS) in humans due to their high capacity to migrate and invade normal brain tissue. Epidemiological data report that GBM occur in a greater proportion in men than in women (3:2), suggesting the participation of sex hormones in the development of these tumors. It has been reported a significant increase in testosterone (T) levels of patients with GBM. In addition, androgen receptor (AR) is overexpressed in human GBM, and genetic silencing of AR, and its pharmacological inhibition, induce GBM cell death *in vivo* and *in vitro*. However, the role of T in proliferation, migration and invasion in human GBM cell lines has not been evaluated. Results showed that T increased the number of U87, U251 and D54 cells derived from human GBM due to an increase in cell proliferation. This induction was blocked with flutamide, an antagonist of AR. T also induced migration and invasion of D54 cells, and flutamide partially blocked T effects. T negatively regulates AR expression at 24 hours, which suggests receptor degradation induced by its ligand. These data suggest that T through AR contributes to progression of GBM by promoting proliferation, migration and invasion.

Keywords: Glioblastomas, testosterone, androgen receptor, cell proliferation, cell migration, cell invasion.

INTRODUCTION

Glioblastomas (GBM) or grade IV astrocytomas are the most aggressive and frequent tumors in the Central Nervous System (CNS), generally, they arise from uncontrolled proliferation of astrocytes and precursor glial cells in brain cortex, basal ganglia and thalamus (Louis et al., 2016). GBM have a peak incidence between 45 and 70 years and average survival time after diagnosis in a patient is around 12 to 16 months (Zhang, et. al., 2017). Treatment mainly consists of surgical resection, as well as radio and / or chemotherapy, however, due to its infiltration capacity, it is practically impossible to completely extract the tumor, and it relapses (Furnari, et. al., 2007; Nachbichler, et. al., 2017).

The CNS is an important target for sexual steroids such as androgens (Diotel, et. al., 2018), which are involved in regulation of pathological processes such as tumor growth (Li & Al-Azzawi, 2009; Liu, et al., 2014) Androgens can exert their multiple effects through the interaction with its intracellular receptor (AR), a transcription factor that once active, binds to specific DNA sequences called androgen response elements located in gene promoter regions, thus regulating their expression (Fix, et. al., 2004; Smith & Walker, 2014).

In a study that aimed to investigate the role of AR in the pathogenesis of GBM it was found that AR expression was higher in biopsies of GBM patients compared to their normal brain tissue (Yu, et. al., 2015). Bao et. al. (2017) observed that AR expression increases according to astrocytomas grade, therefore, GBM presented the highest expression. Overexpression of AR has also been observed by Western blot in several cell lines derived from human GBM (Yu, et. al. 2015). In addition, in recent works it was found that genetic silencing AR and pharmacological inhibition of AR induce GBM cell death *in vivo* and *in vitro*, and decreases the growth of U87 cells (Bao, et. al., 2017; Zalcman, et. al., 2018).

Besides, it has been reported an increase in testosterone (T) levels in patients with some type of glioma compared with patients with a benign tumor or brain injury (Bao, et al., 2017). These data suggest the possibility that T-activated AR signaling should play a role in the physiopathology of GBM. This theory is reinforced by the fact that astrocytomas are more

frequent in men than in women in a 3:2 ratio (Schwartzbaum et al., 2006). In the present study, we investigated the participation of T and AR activation in GBM cell proliferation, migration and invasion.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

U87, U251 and D54 cell lines derived from human GBM were used for the experimental procedure. Cell lines were cultured with Dulbecco's Modified Eagle Medium with phenol red (DMEM, Biowest, FRA) and supplemented with fetal bovine serum 10% (FBS, Biowest, FRA), pyruvate (1 mM; InVitro SA, MEX), non-essential amino acids (0.1 mM; InVitro SA, MEX) and a mix of antibiotics (1 mM; InVitro SA, MEX). Cells were incubated with CO₂ at 5% and at 37 °C. Cells were grown until reaching a 70-80% confluence.

Treatments

24 hours before treatments cells were grown in phenol red-free DMEM medium (In Vitro S.A., MEX) supplement with FBS (10%) without hormones. Cells were treated with testosterone (T, 1 nM, 10 nM, 100 nM and 1 μM in 0.01% ethanol; Sigma, NLD) to determine T concentration that significantly modified number of cells, and vehicle (V, 0.01% ethanol). T (100 nM), competitive antagonist of AR: flutamide (F 5 μM; Sigma, USA), F plus T, and vehicle were used to evaluate proliferation and protein levels. T (100 nM), F (10 μM), F plus T, and vehicle were used in migration and invasion experiments. F was added one hour before T.

Cell counting

1 x 10⁴ U87 cells, and 7 x 10³ U251 and D54 cells were seeded in 24-well plate and grown for 24 hours. Cells were treated on day 0 of each experiment as described in “Treatments” section. Cells were quantified with a hemocytometer (Neubauer chamber on Olympus BX41, JPN microscope) for 5 consecutive days using trypan blue dye exclusion assay to test the effect of T and AR activation on cell growth and viability.

Cell proliferation assay

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation assay was used to test the proliferative effect of T. 6×10^3 U87 cells and 4×10^3 D54 cells were seeded per well in 4-well chamber slide and maintained as described in "Cell culture" section. U87 cells were treated with T 100 nM at day 0 of each experiment, and on day 5, BrdU detection and labeling kit (Roche, DE) was used according to manufacturer's instructions. Fluorescent dye Hoechst 33342 was used to stain DNA. Fluorescence signal was observed at 486 and 515-565 nm with the aid of an Olympus Bx43F fluorescence microscope (Olympus, JPN). Subsequently, F (5 μ M) was used to test the role of AR in U87 and D54 cells proliferation at 72 hours. Number of cells that incorporated BrdU was quantified with Image J program (NIH, USA), and percentage of cells positive for BrdU was calculated considering the total number of cells stained with Hoechst.

Migration assay

To determine the effect of T on migration of D54 cells, the "Scratch" test was used to study collective and directional movement of cell populations. 4×10^5 D54 cells were seeded in 6-well plates in DMEM medium and allowed to grow until reaching a confluence of 60-70%, then medium was changed by phenol red-free DMEM, supplemented with FBS (10%) without hormones. 24 hours later (when monolayer was absolutely confluent), cells were washed with PBS, then 500 μ L of PBS-EDTA (1 mM) were added to each well, and immediately two parallel scratches by well were made with a 200 μ L pipette tip. Detached cells were removed by aspiration. 1 mL medium phenol free-red DMEM and without hormones was placed; Cytosine hydrochloride β -D-arabinofuranoside (Ara-C, inhibitor of DNA synthesis, 10 μ M; Sigma, USA) was added to rule out that changes in the number of migrating cells were due to an increase in proliferation, and incubated at 37 °C for 1 hour. Without removing the medium, hormonal treatments were added and two photographs per well were taken with an Infinity12C camera coupled to an inverted Olympus CKX41 microscope at 100X magnification of the "Scratch" zone at 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours. At

24 hours the medium and treatments were refreshed. The number of cells that migrated into the wound was counted using the ImageJ software.

Invasion assay

To evaluate the effects of T on D54 cells invasion, Boyden chambers assay were performed. 1 mL of Matrigel (Sigma-Aldrich, USA) was diluted in FBS and phenol red-free DMEM at 2 mg/mL final concentration; it was added to transwell inserts (8.0 μ m membrane; Corning, USA) placed on six-well plates and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 2 hours to allow gelation. 5×10^5 cells were seeded in the insert with 1.5 mL in FBS and phenol red-free DMEM that included treatments and Ara-C 10 μ M. In the well, medium was placed with FBS (10%) like chemoattractant (Chen, 2005). Cells were incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 24 hours. Matrigel was removed, and cells were washed with PBS, fixed with paraformaldehyde (4%) and stained with crystal violet (1%). Finally, insert was allowed to dry and observed under a microscope, five random photographs were taken per insert with an Infinity1-2C camera coupled to an inverted Olympus CKX41 microscope at a 100X magnification. Number of invading cells was quantified in the fields taken at random and the corresponding statistical tests were performed.

Western Blotting

To determine the effects of T and F on AR protein content in human GBM cells, 5×10^5 cells were seeded in 6-well plates and treated for 24 hours as described in “Treatments” section. Cells were lysed with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton, 0.01% SDS and ethylene diamine tetra acetic acid (0.5 M EDTA, 1 mL) with a mixture of protease inhibitors (p8340, Sigma-Aldrich, USA) at 4 °C, and incubated for 1 hour under agitation, centrifuged at 14,000 rpm at 4 °C for 5 minutes, and supernatant was separated for storage at 4 °C. Lysates were quantified with the Pierce Protein Assay reagent (Thermo Scientific, IL) in the NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) at 660 nm. 30 μ g of total protein were mixed with Laemmli 2X buffer (100 mM Tris-base pH 6.8, 0.1% bromophenol blue, 20% glycerol, 4% SDS, 10% β -mercaptoethanol), and boiled for 5 min. Proteins were separated by electrophoresis in denaturing 7.5% polyacrylamide gels. Samples were separated at 80 volts for 2 hours. Proteins were

transferred to nitrocellulose membranes (Millipore, USA) in a semi-humid chamber at 20 mA for 1 hour. Membranes were blocked with a solution of Bovine Serum Albumin (2% BSA, InVitro SA., MEX) and 3% milk in TBS-0.1% Tween at 37 ° C for 2 h or overnight at 4 ° C. Membranes were incubated with a primary anti-AR antibody at a 1:300 dilution (0.7 µg/mL, rabbit anti-AR polyclonal antibody sc-815, Santa Cruz, USA) at 4 ° C overnight. They were then washed with 0.1% TBS-Tween 3 times for 5 minutes, and incubated at room temperature for 45 minutes with a peroxidase-conjugated anti-rabbit mouse antibody (IgG-HRP, Santa Cruz sc-2357) in a dilution of 1:7500 (0.05 µg/mL). To remove the antibody, the membranes were washed with stripping buffer (glycine 0.1 M and SDS 0.5%, pH = 2.5) for 10 minutes at room temperature and blocked at 37 ° C for 2 hours. Subsequently, they were incubated with primary anti- α -tubulin antibody in a 1:1000 dilution (0.2 µg/mL) (mouse anti- α tubulin monoclonal antibody, Santa Cruz sc-5286) as loading control. Finally, membranes were washed with TBS-Tween 3 times for 5 minutes and incubated at room temperature for 45 minutes with a secondary antibody "goat anti-mouse" conjugated to peroxidase (IgG-HRP, Santa Cruz sc-2005) in a dilution of 1:5000 (0.08 µg / mL). Chemiluminescence signals were detected exposing membranes to Kodak Biomax Light Films (Sigma-Aldrich, MO, USA) using peroxidase substrate SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (Thermo Scientific, MA, USA). Blot images were captured using a Canon digital camera and bands were quantified with the ImageJ software (National Institute of Health, WA, USA).

Statistical analysis

A one-way ANOVA followed by a Tukey test were performed, GraphPad Prism 7 (GraphPad Software 7, Inc., USA) was used to calculate probability values. A value $p < 0.05$ was considered statistically significant as stated in figure legends.

RESULTS

T increases the number of GBM cells.

To determine whether human GBM cell number is modified by T, we evaluated U87, U251 and D54 cells growth rate through a time course experiment with T at different concentrations (1 nM, 10 nM, 100 nM and 1 µM). We observed a significant increase in the number of cells

treated with T 100 nM in the three GBM cell lines from day 3 (D54) and 4 (U87 and U51) of treatment with respect to vehicle. At 10 nM concentration, T increased number of U87 cells on fifth day of treatment. No significant difference was observed with T 1 nM and 1 μ M (Figure 1). Viability of all cell lines remained constant with all concentrations throughout the 5 days of treatment with respect to control (Supplementary 1).

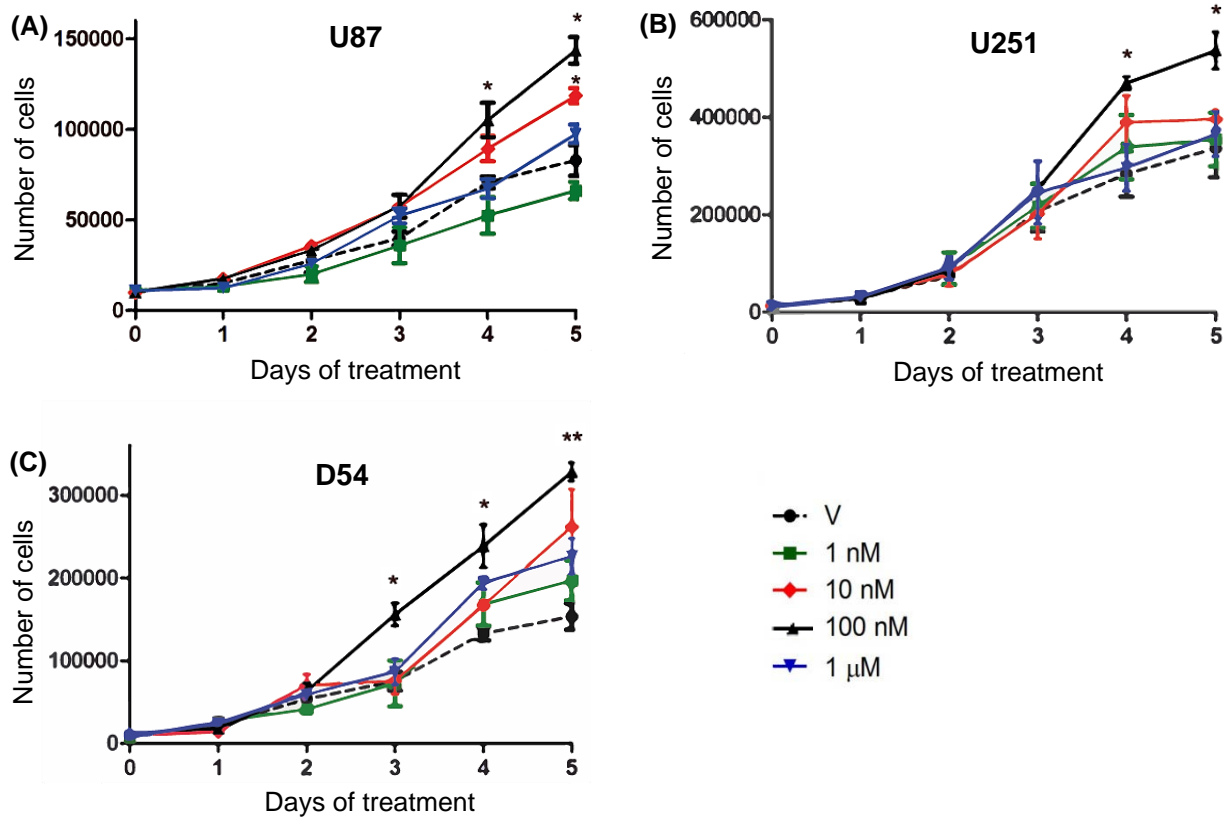


Figure 1. T increases the number of cells derived from human GBM. Number of U87 (A), U251 (B), and D54 (C) cells for 5 days of treatment. Testosterone (T 10 nM and T 100 nM) increased significantly number of cells with respect to their vehicle (V). Each point represents the mean \pm S.E.M. n = 5. *p \leq 0.05, **p \leq 0.01 T vs V.

T effects on the number of GBM cells are mediated by AR.

To determine if AR is involved in the increase in the number of cells induced by T, U87, U251 and D54 cell lines were treated with T (100 nM), competitive antagonist of AR: flutamide (F, 5 μ M), F plus T (FT), and vehicle for 5 days. Cell count was carried out for 5 consecutive days by trypan blue dye. As shown in Figure 1 a significant increase in the number of U87, U251 and D54 cells treated with T (100 nM) was observed. This effect was

blocked by F. The single administration of the antagonist did not significantly modify the number of cells (Figure 2). Viability of U87, U251 and D54 cells was not significantly modified with any of the treatments (Supplementary 2).

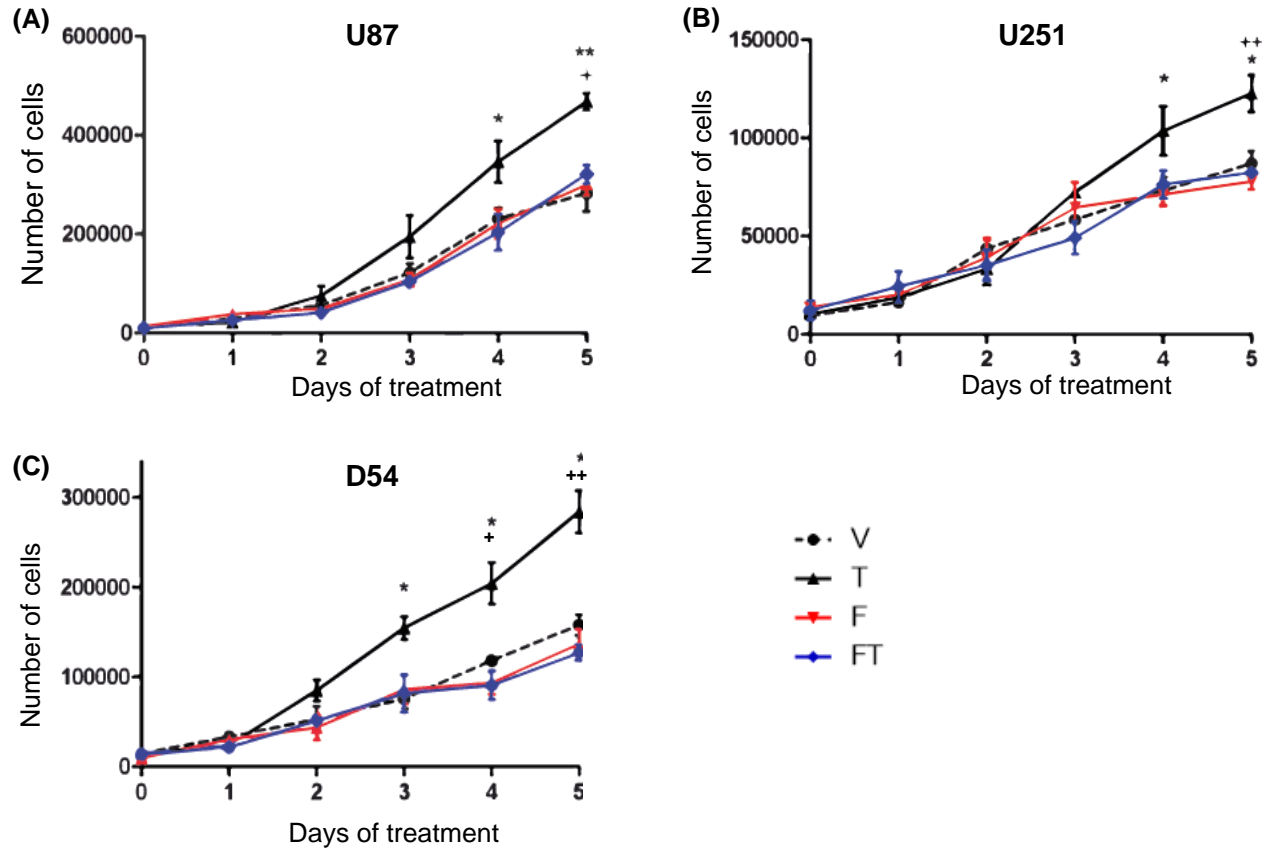


Figure 2. T increases the number of GBM cells through AR. Number of U87 (A), U251 (B) and D54 (C) cells for 5 days with vehicle (V), testosterone (T 100 nM), flutamide (F 5 μ M) and F plus T (FT). Each point represents the mean \pm S.E.M. n = 5. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$: T vs V; + $p \leq 0.05$, ++ $p \leq 0.01$ T vs F and FT.

Role of AR in U87 and D54 cell proliferation.

In order to know if the increase in GBM cell number induced by T is caused by changes in cell proliferation, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) assay was performed at 24, 48, 72, 96 and 120 hours in U87 cells. Figure 3 (A, B) shows that T increased percentage of cells that incorporated BrdU from 48 hours to 120 hours, suggesting that the increase in number of cells is due to proliferation. To determine if T effects on proliferation are mediated by AR, U87 and D54 cells were treated with AR antagonist F, and F plus T. Data showed that F

blocked the proliferative effect of T, while the single administration of F did not modify cell proliferation (Figures 3C, and 3D).

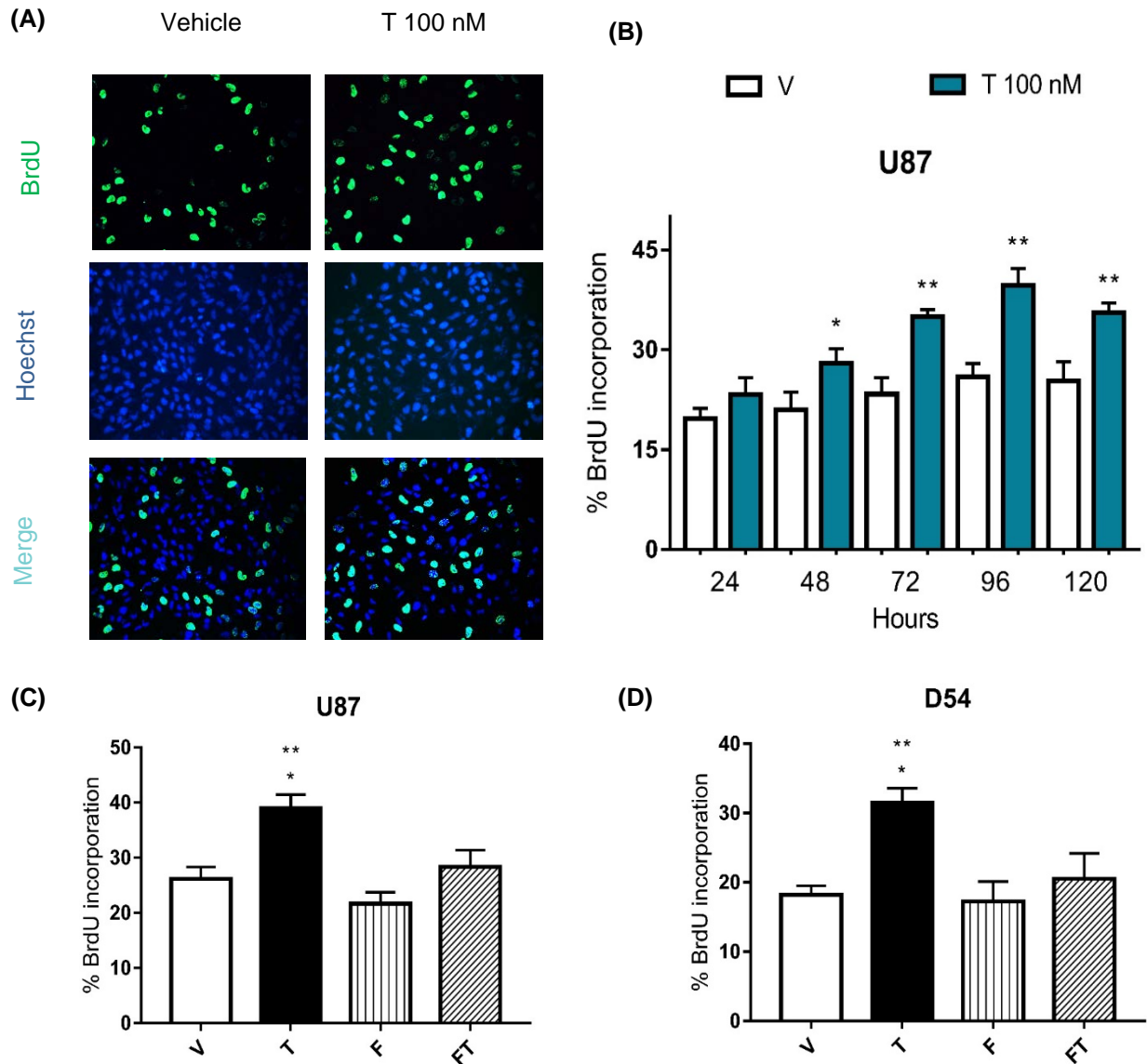


Figure 3. Effects of testosterone and AR activation on proliferation of U87 and D54 cells. (A, B) Cell proliferation was measured after the treatment of testosterone (T 100 nM) during 24, 48, 72, 96 and 120 hours in U87 cells by the BrdU incorporation assay. (A) Representative immunofluorescence images (400X magnification) of BrdU-positive cells (upper panel), cell nuclei (Hoechst stain, middle panel), and merge (lower panel) are shown. (B) Graph represents percentage of cells incorporating BrdU. Each bar indicates the mean \pm S.E.M $n = 3$. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ T vs vehicle (V). (C, D) AR antagonist flutamide (F 5 μ M) blocks the increase in cell proliferation induced by T. Graphs show cell proliferation of U87 (C) and D54 (D) cells treated 78 hours with V, T, F and F plus T (FT). Each bar indicates the mean \pm S.E.M., $n = 4$. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$: T vs V, F and FT.

Role of T in cell migration.

In order to evaluate the effects of T on GBM cell migration, Scratch assays were performed. It was observed that T increased number of migrating cells with respect to vehicle from 12 to 48 hours. Treatment with flutamide (F 10 μ M) and F plus T had no effect on migration of D54 cells at the times evaluated compared to vehicle. F partially blocked the effect of T at 24 hours (Figure 4).

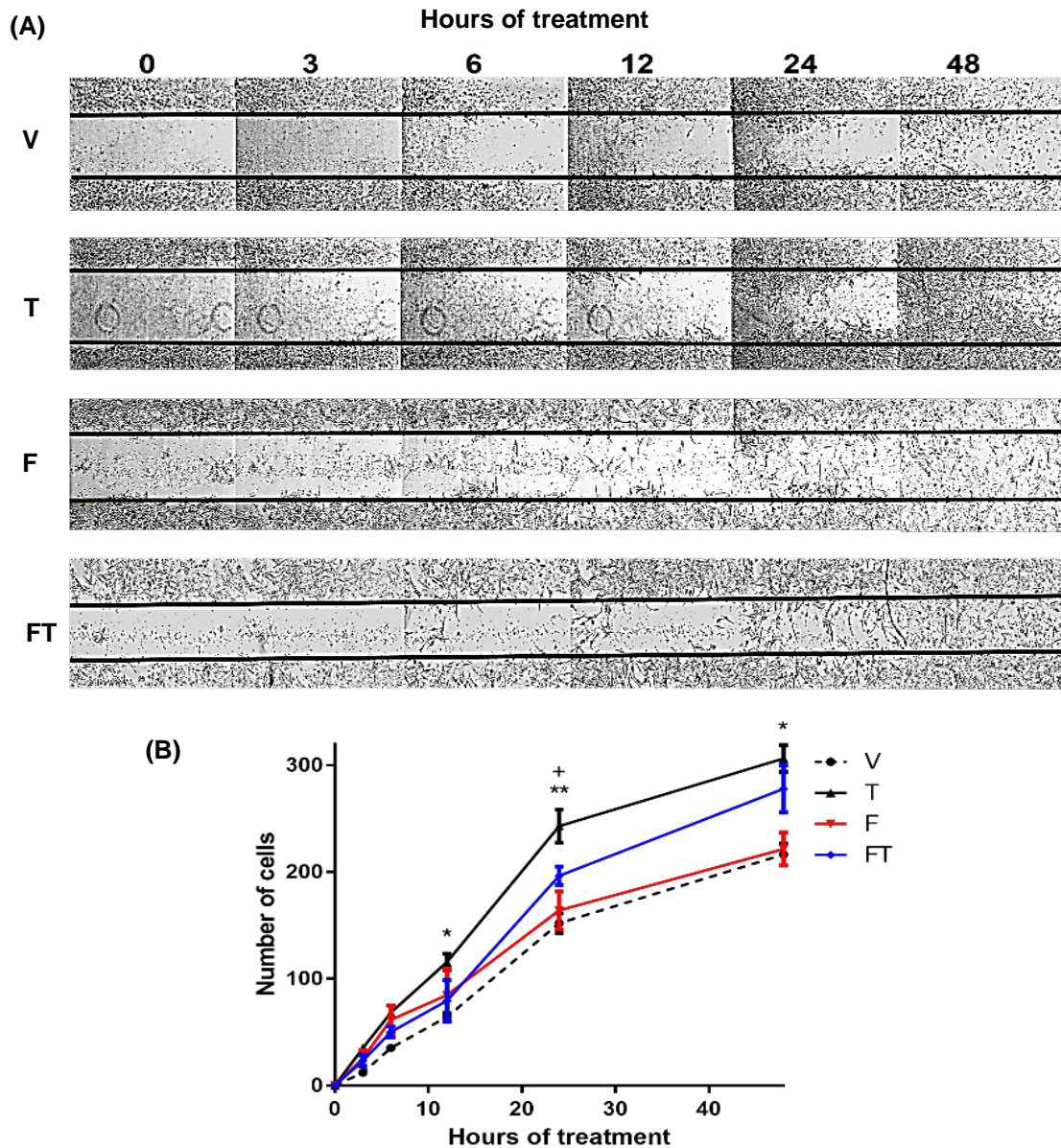


Figure 4. T increases D54 cells migration. (A) Representative photographs at different times of the Scratch. (B) Graph shows number of cells that migrate at 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours treated with vehicle (V), testosterone (T 100 nM), flutamide (F 10 μ M) and F plus T (FT), each point represents the mean \pm S.E.M., n = 4. *p < 0.05, **p < 0.01 T vs V or F; +p < 0.05 T vs FT.

Role of T in cell invasion.

The effect of T on cell invasion was evaluated by Boyden chambers assay. It was found that T (100 nM) increased number of invasive cells compared to vehicle and F at 24 hours. As observed in the migration assay, F (10 μ M) partially blocked the invasive effect of T in D54 cells (Figure 5).

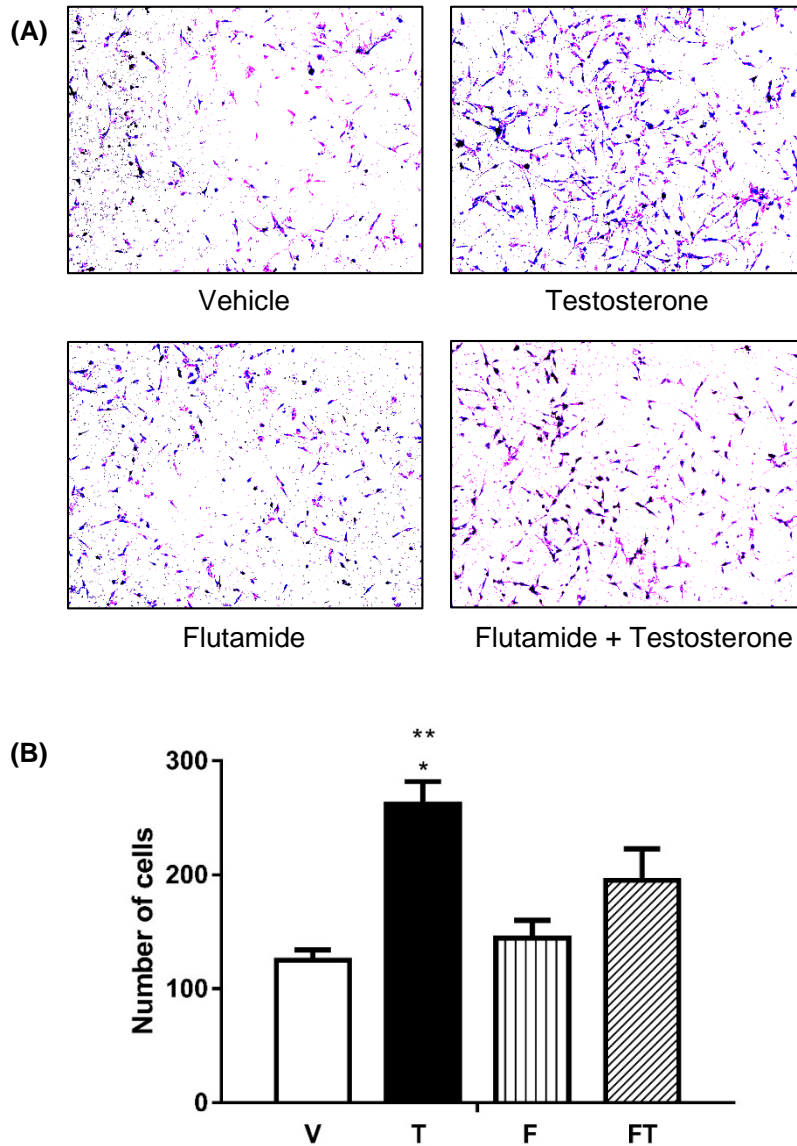


Figure 5. T increases D54 cells invasion. (A) In upper panel representative photographs are observed in Boyden chamber assay at 24 hours with different treatments. (B) Graph represents number of cells that invade at 24 hours with vehicle (V), testosterone (T 100 nM), flutamide (F 10 μ M) and F plus T (TF). Each point represents mean \pm S.E. M., n = 3. *p < 0.05, T vs F. **p < 0.01 T vs V.

T down-regulates AR expression in U87 cells.

To study the regulation of AR expression by T, Western blots were performed. The LnCaP and PC3 cells, both derived from prostate cancer, were used as positive and negative controls, respectively. Figure 6 shows that expression of AR is lower in cells treated with T (100 nM) during 24 hours with respect to vehicle. Treatments with F (5 μ M) and F plus T did not show significant differences compared to vehicle and T.

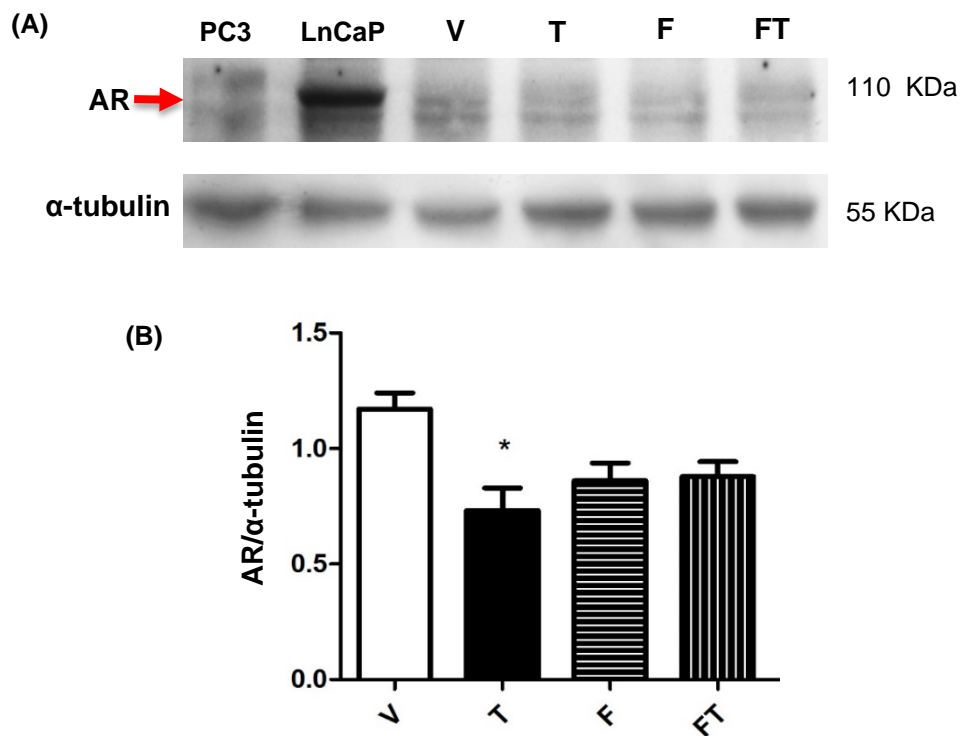


Figure 6. Expression of AR in U87 cells. (A) Results obtained from Western blot of PC3 (negative control), LnCap (positive control), and U87 cells treated with vehicle (V), testosterone (T 100 nM), flutamide (F 5 μ M) and F plus T (FT), during 24 hours. (B) Graph represents densitometry analysis of the experiments. Each bar indicates the mean \pm S.E.M., n = 3. *p < 0.05, T vs V.

DISCUSSION

Androgens participation in several physiological and pathological processes in the CNS has been widely described (Diote, et. al., 2018). Also it is known that they are involved in

prostate, colon and lung cancer growth (Zhu & Kyprianou, 2008; Hyde, et. al., 2012; Solarzano, et. al., 2018; Liu, et. al., 2014). Epidemiological data report that GBM occurs in a greater proportion in men than in women (3: 2), which suggests androgens participation in the progression of these tumors. Different evidences suggest that sex hormones can modulate the proliferation, migration and invasion of GBM (Tavares, et. al., 2016; Piña-Medina, et. al., 2016; Valadez-Cosmes, et. al., 2015; Germán-Castelán, et. al., 2014). Thus, in this work we evaluated the role of T in the pathophysiology of GBM.

According to our results, T (100 nM) induces the growth of human GBM cell lines used in this study (U87, U251 and D54), without modifying percentage of viability. To confirm that cell growth was due to an increase in proliferation, BrdU assay was only performed in U87 cells because the effect of T in cell number was similar in the three studied lines. It was found that T increased cell proliferation from 48 hours, although it was reflected in number of cells until the fourth day. This difference could be due to the fact that the replication rate of the U87 line is 36 hours. These data agree with those reported by Merritt & Foran (2007) who observed an increase in cell viability with T (1000 nM) in T98G on day 5 of treatment. These data suggest that T contributes to progression of GBM by promoting cell proliferation. Although the inductor effect of T on proliferation was observed at higher concentrations than physiological ones, it has been shown that T levels of patients with some type of astrocytoma are higher than those with some other benign tumor or brain injury (Bao, et. al., 2017).

Since GBM present a high infiltration capacity that involves processes of migration and invasion of surrounding tissues of the CNS (Horwitz & Webb, 2003), we evaluated for the first time motility of GBM cells in response to T. Unlike migration, cell invasion also involves cell adhesion and extracellular matrix degradation, allowing cells to penetrate through tissue barriers such as the basement membrane or stroma (Yilmaz & Christofori, 2009; Friedl & Wolf, 2003). Our results indicate that T (100 nM) increased the migration of D54 cells at 12, 24 and 48 hours. It is noteworthy that the increase in number of cells that migrated with T treatment was due only to greater motility and not to the increase in cell proliferation due to the use of Ara-C (Grant, 1998). It is important to mention that AR antagonist administration partially reduced the effect of T on cell migration, which reveals

the participation of other mechanisms that could regulate the activity of T, such as the membrane androgens receptor, whose action by the non-classical mechanism has recently been described in prostate cancer and Sertoli cells (Thomas, et. al., 2018).

Similarly, T increased invasion of derived from GBM cells. As mentioned, infiltration of GBM to areas of healthy brain tissue not only involves migration, but also involves the action of proteins such as metalloproteinases (MMP), therefore, it is possible that T has an effect on some MMP described in GBM. It has been observed that MMP-1 (gelatinase) and MMP 2 and 9 (collagenase) are overexpressed in GBM. Participation of MMP 14 in motility of GBM cells has also been described, as well as a differentiated expression of MMPs between cell lines (Hagemann, et. al., 2010). As in the case of migration, we observed that the inductor effect of the T on cell invasion was partially blocked by F, reducing number of cells that invade. Thus, we cannot ruled out participation of a non-nuclear mechanism of T or its metabolites that could mediate its effect on migration and invasion of GBM cells. For example, previous studies have reported that aromatase (enzyme that synthesizes estradiol from T) is overexpressed in astrocytoma biopsies, besides it has been negatively correlated with the survival of patients, and positively with estradiol concentration. (Dueñas, et. al., 2014). Our group previously demonstrated that estradiol increases cellular growth of GBM cells by activation of ER α (González-Arenas, et. al., 2012). These data suggest that AR activation is partially involved in T effects on migration and invasion.

Effects of T can be mediated by AR, a nuclear transcription factor member of a family of steroid receptors. Previous studies have reported that AR expression is higher in patients with GBM compared to normal brain tissue from the same patients (Yu, et. al., 2015); and that expression of AR increases as the degree of malignancy of astrocytomas progresses, being grade IV (GBM) those that present higher expression at protein level (Bao, et. al., 2017). Overexpression of AR has also been described in 8 cell lines derived from GBM, including U87 and U251 (Yu, et. al., 2015; Bao, 2017). These data were replicated in our study by Western blot. We evaluated whether the effect of T can be mediated by the AR, using F, a non-steroidal antiandrogen which does not show androgenic properties so that it is suitable for use in treatment of prostate cancer (Tan, et. al., 2015; Singh, et. al., 2000). It was observed

that F treatment blocks the effect of T on growth of the three cell lines used in this study, as well as the increase in cell proliferation induced by T on the third day of treatment. Besides, recent studies have shown that genetic silencing of AR in cell lines and pharmacological inhibition of AR reduces GBM cell growth and induces GBM cell death *in vivo* and *in vitro* (Bao, et. al., 2017; Zalcman, et. al., 2018).

Then, we analyzed AR protein levels by Western blot, and it was observed that treatment with T decreases receptor levels. This could be due to a degradation of the AR activated by its ligand, which is characteristic of nuclear receptors (Tan, et. al., 2015). F plus T and the single addition of F did not modify levels of AR: It is possible that F does not allow AR translocation to the nucleus nor subsequent degradation of the AR by ubiquitination-proteasome pathway (Nguyen, et. al., 2007). It is important to mention that the main metabolite of T: DHT, is produced by a reaction catalyzed by 5 α -reductase; whose isoenzymes (isoenzymes 5 α -reductase type I and type II) have been characterized in GBM cells (Zamora-Sánchez, et. al., 2017). Therefore, it is possible that the effect of T can be mediated by DHT.

In conclusion, in this work we demonstrated that T induces proliferation, migration and invasion of human GBM cells through the interaction with AR.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHORS CONTRIBUTION

D. Carolina Rodríguez-Lozano and Ignacio Camacho-Arroyo conceived the study and wrote the paper. D. Carolina Rodríguez-Lozano performed and analyzed the experiments. A. Gabriela Piña-Medina and Valeria Hansberg-Pastor participated in the experimental design, provided technical assistance and contributed to the preparation of figures. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by PAIP, Facultad de Química, UNAM, México.

REFERENCES:

- Bao, D., Cheng, C., Lan, X., Xing, R., Cheen, Z., Zhao, H., et. al. (2017). Regulation of p53 glioma cell proliferation by androgen receptor-mediated inhibition of small VCP/p97-interacting protein expression. *Oncotarget*. 8(14): 23142-23154. DOI: 10.18632/oncotarget.15509.
- Chen, H. (2005). Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol*. 294:15-22.
- Diotel, N., Charlier, T., Lefebvre, C., Couret, D., Trudeau, V., Nicolau, J., et. al. (2018). Steroid transport, local synthesis, and signaling within the brain: Roles in Neurogenesis, Neuroprotection, and Sexual Behaviors. *Front in Neurosci*. 84(12). DOI: 10.3389/fnins.2018.00084.
- Dueñas, J., Candanedo, A., Santerre, A., Orozco, S., Sandoval, H., et. al. (2014). Aromatase and estrogen receptor alpha mRNA expression as prognostic biomarkers in patients with astrocytomas. *J Neurooncol*. 119(2): 275–284. DOI: 10.1007/s11060-014-1509-z.
- Fix, C., Jordan, C., Cano, P. & Walker, W. (2004). Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(30): 10919–10924. DOI: 10.1073/pnas.0404278101.
- Friedl, P. & Wolf, F. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanism. *Nature Review Cancer*. 3(5): 362-374. DOI: 10.1038/nrc1075.
- Furnari, F., Fenton, T., Bachoo, R., Mukasa, A., Stommel, J., Stegh, A., et. al. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*. 21(21): 2683–2710. DOI: 10.1101/gad.1586707.
- Germán-Castelán, L., Manjarrez-Marmolejo, J., González-Arenas, A., González-Morán, M. G. & Camacho-Arroyo, I. (2014). Progesterone Induces the Growth and Infiltration of Human Astrocytoma Cells Implanted in the Cerebral Cortex of the Rat. *Biomed Res Int*. DOI: 10.1155/2014/393174.
- González- Arenas, A., Hansberg-Pastor, V., Hernández-Hernández, O., González-García, T., Henderson-Villalpando, J., Lemus-Hernández, D., et. al. (2010). Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ER α activation and its interaction

- with SRC-1 and SRC-3 coactivators. *Biochem Biophys Acta*. 1823(2): 379-386. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.11.004.
- Grant, S. (1998). Ara-C: cellular and molecular pharmacology. *Advances in Cancer Research*. 72: 197-223. DOI: 10.1016/S0065-230X(08)60703-4.
- Hagemann, C., Vince G., Haas S., Riesner, D., Schöming, B., Ernestus, R., et. al. (2010). Comparative expression pattern of Matrix Metalloproteinases in human glioblastomas cell lines and primary cultures. *BMC Res Notes*. 3: 293-303. DOI: 10.1186/1756-0500-3-293.
- Horwitz, R., & Webb, D. (2003). Cell migration. *Curr Biol*. 3(19): 56-59. DOI: 10.1016/j.cub.2003.09.014.
- Hyde, Z., Flicker, L., McCaul, K., Almeida, O., Hankey, G., Chubb, S., et. al. (2012). Associations between testosterone levels and incident prostate, lung, and colorectal cancer. A population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 21(8): 1319–1329. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0129.
- Li, J. & Al-Azzawi, F. (2009). Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas*. 63(2): 142-148. DOI: 10.1016/j.maturitas.2009.03.008.
- Liu, C., Zhang, Y., Zhang, K., Bian, C., Zhao, Y. & Zhang, J. (2014). Expression of estrogen receptors, androgen receptor and steroid receptor coactivator-3 is negatively correlated to the differentiation of astrocytic tumors. *Cancer Epidemiol*. 38(3): 291–297. DOI: 10.1016/j.canep.2014.03.001.
- Louis, D., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W., et.al. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 131(6): 803–820. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- 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. DOI: 10.1080/15287390600748807.
- Nachbichler, S., Schupp, G., Ballhausen, H., Niyazi, M. & Belka, C. (2017). Temozolomide during radiotherapy of glioblastoma multiforme. *Strahlenther. Onkol*. 193(11): 890-896. DOI: 10.1007/s00066-017-1110-4.

- 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. DOI: 10.1210/en.2006-1469.
- Piña-Medina, A., Hansberg-Pastor, V., González-Arenas, A., Cerbón, M. & Camacho-Arroyo, I. (2016). Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells. *Steroids*. 105: 19-25. DOI: 10.1016/j.steroids.2015.11.008.
- Schwartzbaum, J., Fisher, J., Aldape, K. & Wrensch, M. (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol*. 2(9): 494–503. DOI: 10.1038/ncpneuro0289.
- Singh, S., Gauthier, S. & Labrie, F. (2000). Androgen receptor antagonists (antiandrogens): structure-activity relationships. *Curr Med Chem*. 7(2): 211-247. DOI: 10.2174/0929867003375371.
- Smith, L. & Walker, W. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol*. 30: 2–13. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.02.012.
- Solarzano, S., Imaz-Rosshandler, I., Camacho-Arroyo, I., Garcia-Tobilla, P., Morales-Montor, G., Salazar, P., et. al. (2018). GABA promotes gastrin-releasing peptide secretion in NE/NE like cells: Contribution to prostate cancer progression. *Sci Rep*. 8(1). DOI: 10.1038/s41598-018-28538-z.
- Tan, M., Li, J., Xu, E., Melcher, K. & Yong, E. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*. 36(3): 1-23. DOI: 10.1038/aps.2014.18.
- Tavares, C., Gomes-Braga, F., Costa-Silva, D., Escórcio-Dourado, C., Borges, U., Conde-Junior, A., et.al. (2016). Expression of estrogen and progesterone receptors in astrocytomas: a literature review. *Clinics (Sao Paulo)*. 71(8): 481–486. DOI: 10.6061/clinics/2016(08)12.
- Thomas, P., Converse, A. & Berg, H. (2018). ZIP9, a novel membrane androgen receptor and zinc transporter protein. *Gen Comp Endocrinol*. 257(1): 130-136. DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.04.016.
- Valadez-Cosmes, P., Germán-Castelán, L., González-Arenas, A., Velasco-Velázquez, M., Hansberg-Pastor, V. & Camacho-Arroyo, I. (2015). Expression and hormonal

- regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 154: 176–185. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2015.08.006.
- Yilmaz, M. & Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28(1-2): 15-33. DOI: 10.1007/s10555-008-9169-0.
- Yu, X., Jiang, Y., Wei, W., Cong, P., Ding, Y., Xiang, L., et. al. (2015). Androgen receptor signaling regulates growth of glioblastoma multiforme in men. *Tumour Biol*, 36(2): 967–972. DOI: 10.1007/s13277-014-2709-z.
- Zalcman, N., Canello, T., Ovadia, H., Charbit, H., Zelikovitch, B., Mordechai, A., et. al., (2018). Androgen receptor: a potential therapeutic target for glioblastoma. *Oncotarget.* 9(28): 19980-19993. DOI: 10.18632/oncotarget.25007.
- Zamora-Sánchez, C., Hansberg-Pastor, V., Salido-Guadarrama, I., Rodríguez-Dorantes, M. & Camacho-Arroyo, I. (2017). Allopregnanolone promotes proliferation and differential gene expression in human glioblastoma cells. *Steroids.* 119: 36-42. DOI: 10.1016/j.steroids.2017.01.004.
- Zhang, A., Ostrom, Q., Kruchko, C., Rogers, L., Peereboom, D. & Barnholtz-Sloan, J. (2017). Complete prevalence of malignant primary brain tumors registry data in the United States compared with other common cancers, 2010. *Neuro Oncol.* 19(5): 726–735. DOI: 10.1093/neuonc/now252.
- Zhu, M.-L. & Kyprianou, N. (2008). Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 15(4): 841–849. DOI: 10.1677/ERC-08-0084.