

TESTOSTERONA PROMUEVE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS PROSTÁTICAS VÍA RECEPTORES DE MEMBRANA PLASMÁTICA

PEINETTI Nahuel; LEIMGRUBER Carolina; SCALERANDI Maria Victoria; QUINTAR Amado Alfredo; MALDONADO Cristina Alicia  
INICSA-CONICET

La próstata está formada por un compartimiento epitelial y la estroma fibromuscular. Las células musculares lisas prostáticas (CMLp) son las principales células estromales, están en estrecha comunicación con fibroblastos y con células epiteliales, cumpliendo un rol clave en el mantenimiento de la homeostasis glandular [1]. Testosterona regula estrictamente estas interacciones en condiciones normales, siendo el desbalance entre señales estimuladoras e inhibitorias la fisiopatogenia del crecimiento anómalo en la glándula como el cáncer y la Hiperplasia Prostática Benigna [2].

Los efectos de testosterona son mediados por una vía canónica, la cual consiste en la difusión de la testosterona hacia el citosol donde se une al receptor clásico de andrógenos (AR), la consecuente migración del complejo hormona-receptor al núcleo celular y la unión a elementos de respuesta a andrógenos (ARE) donde regula la transcripción génica. En las últimas décadas se describieron vías no canónicas de señalización para las hormonas esteroideas en distintos tipos celulares, que incluyen la activación de receptores presentes en la superficie celular, desencadenando una serie de cascadas de señalización intracelular con diferentes acciones en las células [3]. En algunos casos, los efectos inducidos por vías no canónicas son diferentes a las canónicas, por lo que nuestro objetivo fue determinar la presencia de receptores para testosterona en la membrana plasmática de CMLp y su participación en la proliferación celular in vitro.

Para llevar a cabo este objetivo, se establecieron cultivos primarios de CMLp provenientes tanto de ratas Wistar normales como de pacientes con Hiperplasia Prostática Benigna (protocolos aprobados por el comité de ética del Sanatorio Allende, Córdoba). Las células fueron cultivadas en medio MCDB con 15% de SFB hasta que se obtuvo una confluencia del 80-90%. Luego, las células crecieron en un medio sin suero por próximas 72 hs., al cual se le agregó TGF $\beta$  (2ng/ml) para favorecer el fenotipo muscular. Cumplido este periodo se realizaron los estímulos con testosterona (T) o testosterona acoplada a albumina sérica bovina (T-BSA), la cual le brinda un carácter hidrofílico y un aumento de tamaño que la hace impermeable a la membrana plasmática. Ambas moléculas se aplicaron a una concentración de 10<sup>-7</sup>M; como controles se utilizaron los vehículos respectivos para cada droga. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA-Tukey.

Considerando la bibliografía reportada en otras células, se evaluó en primera instancia la presencia del AR clásico en la membrana plasmática de CMLp de rata mediante inmunofluorescencia y microscopia confocal, observándose marca positiva en la superficie celular, que co-localizó con el marcador de membranas concanavalina-A. Este ensayo se corroboró mediante citometría de flujo, que arrojó un 18,87 $\pm$ 2,43% de células positivas para el AR en la membrana celular. Asimismo, los resultados en CMLp humanas arrojaron datos similares. Para descartar falsos positivos, trabajamos con células vivas y realizamos además marcas para la proteína intracelular NF- $\kappa$ B (control negativo). Posteriormente, se verificó la capacidad de estos AR presentes en membrana (mAR) para reconocer a testosterona; para ello se incubaron las CMLp con T-BSA por 30 segundos y se realizó inmunofluorescencia usando un anticuerpo contra testosterona. Los resultados indican que T-BSA es reconocida por el mAR con el cual forma el complejo hormona-receptor.

Con el fin de analizar la funcionalidad de los mAR y teniendo en cuenta que las vías no canónicas actúan a través de cascadas de señalización iniciadas en membrana, evaluamos las vías de MAPK y PI3K/Akt. Utilizando la técnica de western blot medimos la fosforilación de ERK y Akt luego de estímulos de 10, 20 y 30 minutos con T o T-BSA. Se observó un aumento en la fosforilación en todos los tiempos de estímulo, con un pico a los 30 minutos (p<0,05 vs control) para ambas proteínas, sin diferencias entre T y T-BSA, indicando que T es capaz de estimular mAR por vías no canónicas. En última instancia y considerando que dichas vías son proliferativas, investigamos la proliferación celular mediante inmunocitoquímica de Ki67. La proliferación celular aumentó significativamente luego de 24 hs de estímulo con T-BSA (p<0,05 vs control y T). Si bien se observó una tendencia a incrementar la proliferación luego de estimulación con T frente al control, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Este hallazgo fue verificado además mediante el conteo total de CMLp por hemocitómetro, que arrojó un mayor número de células sólo en los protocolos estimulados con T-BSA.

En conclusión, estos resultados evidencian por primera vez la presencia de AR en la membrana de CMLp tanto de rata como humanas; así como la capacidad de responder a estímulos hormonales mediante vías no canónicas. Por otro lado, podemos inferir que la proliferación de las CMLp inducida por testosterona se debe principalmente a la activación de vías proliferativas iniciadas por el mAR. Estrategias para inhibir específicamente las vías no canónicas de señalización de los andrógenos podrían brindar nuevos enfoques frente a la necesidad de controlar la proliferación típica de las hiperplasias prostáticas.

Bibliografía:

1. Cunha, G.R., Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. *Differentiation*. 2008. 76(6): 578-86
2. Tristan M. Nicholson a , William A. Ricke. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: Past, present and future. *Differentiation*. 2011. 82: 184-199.
3. Jelani C. Zarif a , Cindy K. Miranti. The importance of non-nuclear AR signaling in prostate cancer progression and therapeutic resistance. *Cellular Signalling*. 2016. 28: 348-356

Fig 1.Receptor de andrógenos de membrana

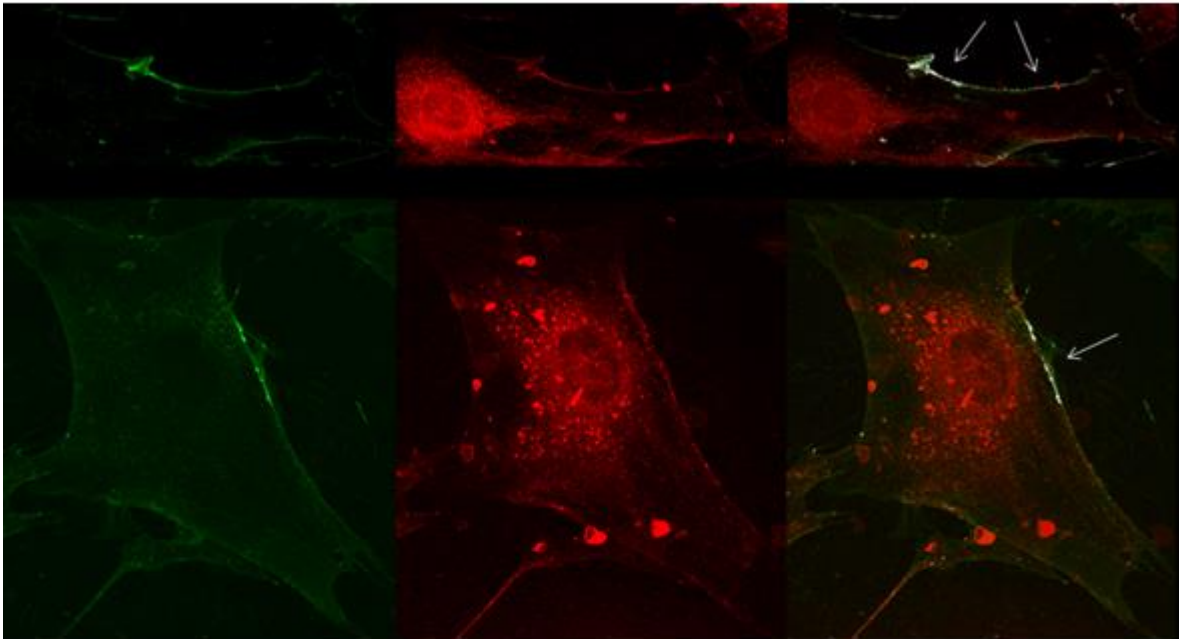


Fig 2.Proliferación celular

