



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**
Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**“Esteroidogénesis en líneas celulares de glioblastoma y el efecto
de inhibidores enzimáticos”**

TESIS

Que presenta:

M. en C. Luis Manuel Pinacho García

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En la especialidad de

Fisiología Celular y Molecular

Directora de tesis:

Dra. Marta Catalina Romano Pardo

Ciudad de México

Marzo 2023

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 43 del Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Durante este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con la beca de Doctorado número: 419762

Agradecimientos:

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Al Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias.

Al Dr. José Víctor Segovia Vila, la Dra. Marisa Cabeza, la Dra. María Eugenia Mendoza Garrido y al Dr. Ismael Jiménez, por la revisión a esta tesis y por ser parte del comité.

Al Dr. Mario Figueroa por la importante participación y apoyo en la parte experimental.

A mi Madre, a mis hermanas y sobrinos, a personas que más que amigos son una familia extendida, Ma. Carmen Ortiz, Alma García, Luis Muñoz, Eugenia del Moral.

Al auxiliar de investigación Ricardo Valdéz y la auxiliar de investigación Araceli Navarrete por el apoyo en el trabajo experimental. A la Psic. Luz María Buendía y la auxiliar de investigación Carolina Miranda.

A mis compañeros, Laura Texco, Gabriela Toribio, Gabriel Vargas, Orlando Casados.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo con la beca de doctorado.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el apoyo otorgado para la escritura de este trabajo.

ÍNDICE

Abreviaturas	XI
Resumen	XIII
<i>Abstract</i>	XV
 Capítulo 1. Generalidades sobre los Glioblastomas	
1.1 Los gliomas	1
1.2 Células del sistema nervioso central	1
1.3 Los Astrocitomas	3
1.4 El Glioblastoma (GB)	3
1.5 Biomarcadores en Glioblastomas	4
1.6 Tratamiento para los Glioblastomas	4
1.7 Epidemiología de los Glioblastomas	5
 Capítulo 2. Glioblastoma y su relación con las hormonas esteroideas	
2.1 Diferencias entre hombres y mujeres respecto al glioblastoma	6
2.2 Receptores a hormonas, enzimas esteroidogénicas y Glioblastoma	6
2.3 Hormonas esteroideas y su efecto en Glioblastomas	7

Capítulo 3. Neuroesteroides

3.1	Descubrimiento de la síntesis de esteroides en el cerebro	8
3.2	Concepto de Neuroesteroide	8
3.3	Las Hormonas Esteroideas	9
3.4	Diferencias en la síntesis de Neuroesteroides	9
3.5	Estructuras químicas del colesterol y de hormonas esteroideas	10

Capítulo 4 Síntesis de Neuroesteroides

4.1	Inicio de la neurosteroidogénesis	11
4.2	Síntesis de derivados de la progesterona, corticoesteroides, glucocorticoides y mineralocorticoides	12
4.3	Síntesis esteroides sexuales estrógenos y andrógenos	13
4.4	La puerta trasera de la testosterona o “back door testosterone”	14
4.5	Vía general de síntesis de los neuroesteroides	15
4.6	Vía de síntesis de esteroides sexuales: Andrógenos y estrógenos	16
4.7	Vía de síntesis de derivados de la progesterona, corticoesteroides, glucocorticoides y mineralocorticoides	17

Capítulo 5. La 5 α -reductasa y la farmacología de sus inhibidores

5.1	La 5 α - reductasa	18
5.2	La Finasterida y la Dutasterida	18
5.3	Efectos adversos de la Finasterida y la Dutasterida	19

Capítulo 6. Funciones de los Neuroesteroides

6.1	Efecto de los neuroesteroides	20
6.2	Función de los Esteroides sexuales	20
6.3	Participación de los derivados de la progesterona en diferentes patologías	21

Capítulo 7. Justificación y objetivos del proyecto

7.1	Justificación	21
7.2	Hipótesis	21
7.3	Objetivo general	22
7.4	Objetivos específicos	22

Capítulo 8. Materiales y métodos

8.1	Diseño experimental	23
8.2	Cultivo de la línea celular C6 (rata) y U87 (humano)	24

8.3	Incubación de las líneas celulares con precursores tritiados: síntesis de neuroesteroides	24
8.4	Extracción de metabolitos del medio de cultivo	24
8.5	Identificación de neuroesteroides por TLC, siembra de muestra y estándares en placa de sílica	25
8.6	Corrida de la placa en una cámara de TLC	25
8.7	Determinación de los metabolitos formados a partir de precursores radiomarcados	26
8.8	Estadística	26
8.9	Cultivo de la línea celular U87 (humano) para la UPLC MS ²	26
8.10	Identificación de neuroesteroides en la línea celular U87 por cromatografía líquida de ultra resolución, acoplada a un espectrómetro de masas (UPLC/MS ²)	27
8.11	Proceso para determinar la biotransformación de metabolitos mediante la técnica UPLC/MS ²	27
8.12	Identificación de neuroesteroides por UPLC/MS ² , estándares y muestras	28

Capítulo 9. Resultados TLC y UPLC/MS²

9.1	Síntesis de neuroesteroides radiomarcados en las líneas celulares C6 y U87, cromatografía en capa fina (TLC)	29
9.1.1	Síntesis de esteroides sexuales por la línea celular C6, con los precursores colesterol y DHEA	30
9.1.2	Síntesis de esteroides sexuales por la línea celular C6, con precursores androstenediona o testosterona.	31
9.1.3	Síntesis de los derivados de la progesterona y corticoesteroides por la línea celular C6 con el precursor progesterona	32
9.1.3	Síntesis de esteroides sexuales por la línea celular U87, con los precursores Colesterol o Androstenediona	33
9.1.4	Síntesis de esteroides sexuales por la línea celular U87, con precursor testosterona o corticoesteroides con precursor progesterona	34
9.1.5	La Finasterida inhibe la síntesis de esteroides sexuales a partir del precursor androstenediona	35
9.1.6	La Dutasterida inhibe la síntesis de esteroides sexuales con androstenediona como precursor	36

9.1.7	La Dutasterida inhibe la síntesis de esteroides sexuales con la progesterona como precursor	37
9.1.8	La Dutasterida inhibe la síntesis de los derivados de la progesterona y corticoesteroides con precursor progesterona	38
9.2	Resultados UPLC/MS ² , Síntesis de Neuroesteroides por la línea celular U87	39
9.2.1	Batería de estándares internos en UPLC/MS ²	40
9.2.2	Cromatograma de la batería de estándares internos en UPLC/MS ²	41
9.2.3	Cromatogramas individuales y su espectro de masas de estándares internos en UPLC/MS ²	42
9.2.4	Cromatograma UPLC/MS ² de síntesis de neuroesteroides de manera constitutiva (sin precursor) por la línea celular U87	48
9.2.5	Cromatograma UPLC/MS ² de la síntesis de neuroesteroides por la línea celular U87 con precursor androstenediona	49
9.2.6	Cromatograma UPLC/MS ² de la síntesis de neuroesteroides por la línea celular U87 con precursor progesterona	50

Capítulo 10. Discusión	
10.1	General 51
10.2	Síntesis de esteroides sexuales por la línea celular C6 (TLC) 51
10.3	Síntesis de esteroides sexuales por la línea celular U87 (TLC) 52
10.4	Inhibición de esteroides sexuales por finasterida y dutasterida en células U87 (TLC) 53
10.5	Síntesis de corticoesteroides por células C6 y U87 (TLC) 54
10.6	Inhibición de corticoesteroides y derivados de la progesterona por dutasterida en células U87 (TLC) 55
10.7	Síntesis de neuroesteroides de manera constitutiva por línea celular U87 (UPLC/MS ²) 56
10.8	Síntesis de neuroesteroides por línea celular U87 con precursores A ₄ o P ₄ (UPLC/MS ²) 56
Capítulo 11. Conclusión	58
Apéndice: Artículo publicado	

Lista de figuras

Figura	Nombre	Página
1	Células del sistema nervioso central	2
2	Tasa de incidencia de glioblastoma por edad y sexo en los Estados Unidos de Norteamérica	5
3	Estructura química del colesterol y hormonas esteroideas	10
4	Inicio de la síntesis de neuroesteroides	11
5	Vía general de síntesis de los neuroesteroides	15
6	Vías de síntesis de esteroides sexuales	16
7	Vías de síntesis de derivados de progesterona, corticoesteroides	17
8	Biotransformación de precursores tritiados a esteroides sexuales por células C6	30
9	Biotransformación de precursores tritiados a esteroides sexuales por células C6	31
10	Biotransformación de un precursor tritiado a corticoesteroides por células C6	32
11	Biotransformación de precursores tritiados a esteroides sexuales por células U87	33
12	Biotransformación de precursores tritiados a esteroides sexuales y corticoesteroides por células U87	34
13	Finasterida inhibe la síntesis de esteroides sexuales en células U87	35
14	Dutasterida inhibe la síntesis de esteroides sexuales en células U87	36
15	Dutasterida inhibe la síntesis de esteroides sexuales en células U87	37
16	Dutasterida inhibe la síntesis de corticoesteroides en células U87	38
17	Cromatograma UPLC de 26 estándares internos	41
18	Cromatogramas y espectros de masas de metabolitos individuales	42
19	Cromatograma UPLC células U87 sin precursor, síntesis de manera constitutiva	48
20	Cromatograma UPLC síntesis células U87 con precursor androstenediona	49
21	Cromatograma UPLC síntesis células U87 con precursor Progesterona	50

Tabla 1. Batería completa de 26 estándares internos

40

Abreviaturas

3β-HSD	3beta- hidroxisteroide deshidrogenasa
3α-HSD	3alfa-hidroxisteroide deshidrogenasa
3α-DHP	5alfa–dihidroprogesterona
7β-HSD	17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa
A4	Androstenediona
AcetilCoA	Acetato y coenzima A
ALDO	Aldosterona
AN	Androsterona
ASN	Androstanadiona
CNA	Corticosterona
CYP17	17alfa-hidroxilasa/C17–20 liasa
CYP17	17 alfa-hidroxilasa 1
CYP19A1	P450-Aromatasa
CYP21A2	21-hidroxilasa P450
D-CLS	Desoxicortisol
DHAN	Dihidro androsterona
DHCNA	Dihidrocorticosterona
DHDOC	Dihidrodesoxicorticosterona
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHP	Dihidroprogesterona
DHT	Dihidrotestosterona
DOC	11-desoxicorticosterona

E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
GB	Glioblastoma
GFAP	Proteína fibrilar acídica de la glía
IDH	Isotratodeshidrogenasa
MBR	Receptor mitocondrial a benzodiacepinas
MGMT	O6- metil guanina metil transferasa
OH-T	Hidroxitestosterona
Olig2	Factor de transcripción de oligodendrocitos
OMS	Organización Mundial para la Salud
P4	Progesterona
P5	Pregnenolona
SNC	Sistema nervioso central
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
T	Testosterona
THDOC	Alotetrahidrodesoxicorticosterona
THP	Alopregnanolona
TLC	Cromatografía en capa fina
TMZ	Temozolamida
UPLC/MS²	Cromatografía líquida de ultra resolución, acoplada a un espectrómetro de masas
VIM	Vimentina

Resumen

El Glioblastoma (GB) es el tumor primario cerebral más agresivo. Su incidencia es mayor en hombres que en mujeres, lo que sugiere que las hormonas esteroides sexuales podrían estar involucradas en su desarrollo. Sin embargo, la información sobre el GB como tejido esteroideogénico no es abundante. El objetivo de este estudio fue investigar la capacidad de las líneas celulares de GB, C6 (rata) y U87 (humano) para sintetizar neuroesteroides y el efecto de los inhibidores de la 5 α -reductasa en la esteroideogénesis en células U87. Las líneas celulares de GB se incubaron con los precursores tritados: ³H-Colesterol, ³H-Progesterona, ³H-Dehidro-epiandrosterona, ³H- Androstenediona o ³H-Testosterona por 24 y 48 horas. Se incubaron células U87 con tres diferentes concentraciones de finasterida o dutasterida por 48 horas. Los neuroesteroides producidos se separaron por cromatografía en capa fina (TLC), la que posteriormente se analizó en un contador de radioactividad. Células U87 fueron incubados en presencia de o ausencia de progesterona o androstenediona por 48 horas, los productos fueron analizados en cromatografía líquida de ultra resolución, acoplada a un espectrómetro de masas (UPLC/MS²). Los resultados mostraron que las células C6 incubadas con ³H-Colesterol sintetizaron principalmente: dihidroandrosterona, hidroxitestosterona, androstendiol y androstenediona. Células U87 incubadas con ³H-progesterona sintetizaron; hidroxitestosterona, androstanediona y androstenediona. La incubación con, ³H- androstenediona o ³H-testosterona produjo los mismos metabolitos en estas células que en las C6, como dihidrotestosterona, androsterona, dihidroandrosterona y androstanediona. Finasterida y dutasterida redujeron significativamente la síntesis de andrógenos y estrógenos en células U87. Además las células U87 mostraron la capacidad de sintetizar corticoesteroides. La Dutasterida disminuyó la síntesis de aldosterona, dihidrocorticosterona y alotetradehidroxideoxicorticosterona a partir de ³H-progesterona, mientras que la desoxicorticosterona se acumuló significativamente. Los resultados de la UPLC/MS² mostraron una producción constitutiva de neuroesteroides, es decir; sin la necesidad de un precursor y con precursores se observó la síntesis de la mayoría de los andrógenos, estrógenos, corticoesteroides y derivados de progesterona, principalmente cuando se incubaron con progesterona.

En resumen, ambas líneas celulares de de GB tienen la capacidad de sintetizar neuroesteroides, incluidos los productos de la 5α -reductasa y 3α -HSD, que fueron inhibidos significativamente por la Finasterida y la Dutasterida. La administración de estos inhibidores puede ser una herramienta para controlar las vías metabólicas importantes para la supervivencia de las células GB.

Abstract

Glioblastoma (GB) is the most aggressive local brain tumor. Its incidence is 50% higher in men than in women, which suggest sexual steroid hormones might be involved in their development. However, information on GBs as steroidogenic tissues is scarce. The aim of this study was to investigate the capacity of GB cell lines C6 (rat) and U87 (human) to synthesize neurosteroid hormones and metabolites, and the effect of 5 α -reductase inhibitors on U87 steroidogenesis. GB cells were cultured with tritiated steroid precursors: cholesterol, dehydroepiandrosterone, androstenedione, or progesterone. Different concentrations of the enzyme inhibitors finasteride and dutasteride were added to U87 culture media collected after 24 and 48 h. Yielded steroids were separated by thin layer chromatography, later analyzed in a radioactivity counter. U87 cells were incubated without any precursor or with Progesterone or Androstenedione precursors at times of 48 hours, the products were analyzed in ultra performance liquid chromatography in coupled to mass spectrometer (UPLC / MS²). Results showed that C6 cells incubated with cholesterol mainly synthesized: dihydroandrosterone, hydroxytestosterone, androstendiol and androstenedione. U87 cells incubated with ³H-cholesterol synthesized progesterone, hydroxytestosterone, androstenedione and androstenedione. Incubation with ³H-androstenedione or ³H-testosterone yielded the same metabolites as C6, such as dihydrotestosterone androsterone, dihydroandrosterone and androstenedione. Addition of finasteride or dutasteride to U87 cells significantly reduced androgen and estrogen synthesis. We also show that U87 cells have the ability to synthesize corticosteroids. Dutasteride decreased the synthesis of aldosterone, dihydrocorticosterone and allotetrahydrodesoxycorticosterone from ³H-progesterone, while deoxycorticosterone was significantly accumulated. The results UPLC showed a production *per se* of neurosteroids, without the need for a precursor, with precursors it showed the synthesis of androgens, estrogens, corticosteroids and progesterone derivatives, mainly incubated with progesterone.

In summary, both GB cell lines have the capacity to synthesize neurosteroids, including products of the 5- α reductase and 3 α -HSD pathways that were significantly inhibited by finasteride and dutasteride. The administration of these inhibitors may be a tool to control metabolic pathways important for the survival of GB cells.

Capítulo 1. Generalidades sobre los gliomas

1.1 Los gliomas

Los gliomas son los tumores primarios más frecuentes del cerebro en humanos, representan aproximadamente un 70% de los tumores intracraneales. La Organización Mundial para la Salud (OMS) clasifica a los gliomas con base en criterios morfológicos y moleculares que determinan el linaje celular, su grado de agresividad y pronóstico a largo plazo, los grados de malignidad van del grado 1 al 4, siendo el grado cuatro el de mayor peligro y peor pronóstico. De acuerdo con la estirpe celular de origen es cómo adquieren su nombre, es decir; astrocitoma deriva de un astrocito, oligodendroglioma de oligodendrocito y si la estirpe celular es ependimal se nombrará: ependimoma (Louis et al., 2007-2016).

1.2 Células del sistema nervioso central

El sistema nervioso central (SNC) incluye al encéfalo y la médula espinal, lo integran el tejido nervioso el cual incluye a las neuronas y la neuroglia: Las neuronas son células eléctricamente activas y altamente especializadas en la comunicación intercelular, a través de impulsos a otras neuronas. Las neuronas están rodeadas y apoyadas por un grupo de células que comprenden: 1. Astrocitos 2. Oligodendrocitos, 3. Microglía y 4. Células ependimarias que en conjunto conforman la neuroglia. Estas células se encargan de brindar soporte, aislamiento, nutrición y defensa a las neuronas, manteniendo la homeostasis del microambiente del Sistema Nervioso (Tortora & Derrickson, 2013).

Los astrocitos son llamados así por tener una forma de estrella, están estrechamente relacionados con las neuronas y son las células mayoritarias en el SNC, sus principales funciones son, dar soporte y límite estructural a las neuronas, formar parte de la barrera hematoencefálica, participar en la regulación de iones y neurotransmisores en el espacio extracelular, además intervienen en la sinapsis y la neurogénesis. También secretando factores y formando una cicatriz cuando hay daño en el cerebro, fenómeno que se denomina gliosis (Fiels & Stevens 2002).

Los oligodendrocitos son los encargados de producir las vainas de mielina de los axones en el encéfalo (Chittajallu et al., 2002).

La microglía es la encargada de fagocitar restos celulares y activar respuestas inflamatorias, las células endoteliales con apariencia cilíndrica revisten los ventrículos en el cerebro, las funciones primordiales son contribuir a la formación de líquido cefalorraquídeo, además de facilitar el movimiento e intercambio de dicho líquido (Barrett et al., 2010).

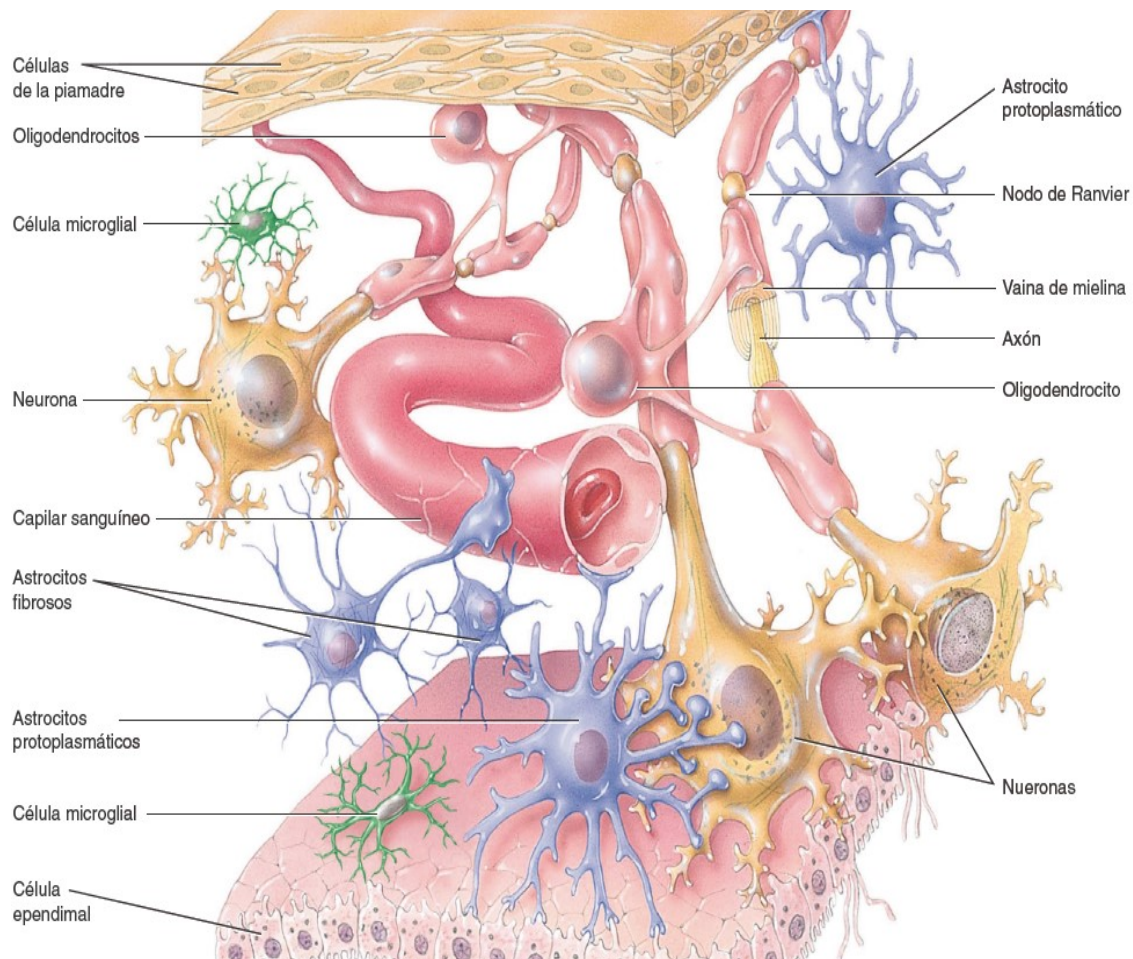


Figura 1. Células del sistema nervioso central. Se muestran: Neurona, astrocyto, oligodendrocito, microglía y célula endotelial. Extraído de Tortora & Derrickson, 2013.

1.3 Los Astrocitomas

Los astrocitomas son los tumores que con mayor frecuencia se diagnostican, se clasifican dependiendo del grado de malignidad y pronóstico, en grados del I al IV: I. Astrocitoma pilocítico, II. Astrocitoma difuso, III Astrocitoma anaplásico y IV Glioblastoma (GB). El grado IV se caracteriza por presentar una alta tasa de proliferación celular, inducir neovascularización, alta capacidad de infiltración y presentar áreas necróticas, el pronóstico generalmente es malo ya que se presentan constantes recidivas y resistencia a los tratamientos (Ricard et al., 2012).

1.4 El Glioblastoma (GB)

Los glioblastomas son astrocitomas con mayor grado de malignidad y se presentan con más frecuencia. Sus características histopatológicas incluyen: polimorfismo celular, atipia nuclear, actividad mitótica, capacidad para generar angiogénesis y necrosis. Las características principales para la identificación histológica de este tumor es la presencia de proliferación microvascular y signos de necrosis (Ricard et al., 2012).

Dentro de la clasificación de un glioblastoma podemos encontrar el concepto de glioblastoma primario y secundario, en el primer caso es cuando el tumor se presenta *de novo* es decir; sin indicios de una lesión previa, en cambio cuando es secundario se propone que evolucionó de grados menores hasta convertirse en grado IV (Louis et al., 2016).

1.5 Biomarcadores en los Glioblastomas

Los avances en biología molecular permiten complementar la clasificación basada en la histología de los glioblastomas, con biomarcadores que hacen posible distinguir su estirpe celular, cómo la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), factor de transcripción de oligodendrocitos (Olig2) (Huang et al., 2010) o su pronóstico de malignidad: antígeno de proliferación Ki-67, Vimentina (VIM), los antígenos asociados a tumores CD-133 y CD-15, el antígeno A2B5 para la transformación de células precursoras de astrocitos (Amhed et al., 2013), además de las mutaciones en la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) y O6- metil guanina metil transferasa (MGMT) ambas importantes en el pronóstico del tumor (Weller et al., 2015).

La OMS ha agregado a la IDH como marcador para las características de los GB, esta enzima se encuentra en su forma nativa (wild type) en 90 % en los llamados tumores primarios de *novο*, en individuos mayores de 55 años, en su forma mutada aparece en 10% de los casos en los tumores llamados GB secundarios en individuos más jóvenes (Louis et al., 2016).

1.6 Tratamiento para los Glioblastomas

Los tratamientos para este tipo de neoplasias consisten principalmente en: la cirugía para extirpar el tumor, la resección del tumor por lo regular a un 90 %, la radioterapia y la quimioterapia; siendo la Temozolamida (TMZ) el tratamiento farmacológico que se ha utilizado principalmente. El Glioblastoma presenta frecuentemente resistencia al fármaco TMZ y desafortunadamente el pronóstico de supervivencia de los pacientes es poco favorable, pues presentan constantes recidivas (Ricard et al., 2012).

1.7 Epidemiología de los Glioblastomas

Datos correspondientes a Estados Unidos de América muestran que la población más afectada son adultos de entre los 45 a 85 años de edad, donde el 85 % se encuentra en las edades de 55-85 años (Daga et al., 2011). El sexo masculino es el que se ve más afectado, con una mayor prevalencia, en una relación 2:1. En cuanto a la incidencia en los Estados Unidos de América, esta es de 2.93 casos por cada 100 000 habitantes (Thakkar et al., 2014; Ostrom et al., 2014).

En México la información es escasa, sin embargo, la Secretaría de Salud Nacional reportó un 13 % de nuevos casos en el 2011, de los cuales 56 % fueron hombres y 44 % mujeres.

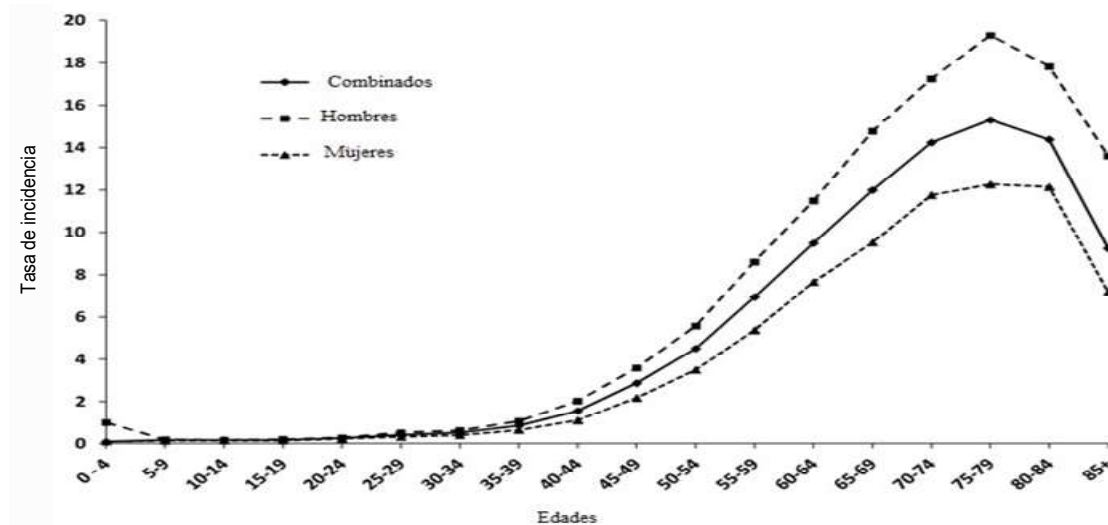


Figura 2. Tasa de incidencia de glioblastoma por edad y sexo en los Estados Unidos de Norteamérica, 2000-2006. Tomada y modificada de Thakkar et al., 2014, con información de Ostrom et al., 2014.

Capítulo 2. Glioblastoma y su relación con las hormonas esteroideas

2.1 Diferencias entre hombres y mujeres respecto al glioblastoma

En la literatura encontramos información que pone en perspectiva la relación, desarrollo y/o evolución de los gliomas con las hormonas sexuales (Kabat et al., 2010), la frecuencia de incidencia respecto al sexo indica una evidencia importante, pues en el caso de los GBs presentes en la población adulta en Estados Unidos de Norteamérica, es un 50% más alta en hombres que en mujeres (McKinley et al., 2000).

En el mismo sentido encontramos un estudio que describe, como mujeres con glioblastoma tienen mejor pronóstico de sobrevivencia en comparación con los hombres, sin embargo, este mejor pronóstico se ve reducido cuando las mujeres entran a la etapa de menopausia (Tian et al., 2018).

2.2 Receptores a hormonas, enzimas esteroidogénicas y Glioblastoma

Existe literatura que alude a la expresión de receptores a hormonas esteroideas y de enzimas de esteroidogénesis en gliomas por ejemplo: se ha reportado la expresión de receptores a estrógenos (Gandhari et al., 2010), progesterona y andrógenos en líneas celulares de gliomas y biopsias de tumores (González-Agüero et al., 2001; Chang et al., 2014), además de receptores a glucocorticoides en líneas celulares (Yin et al., 2013).

La expresión de la enzima esteroidogénica, P450- aromatasas (P450 arom) en líneas celulares de gliomas y de biopsias de tumores, apoya la idea de la posible participación de las hormonas esteroideas en esta patología (Yague et al., 2004; Dueñas Jiménez et al., 2014). Además se ha reportado la expresión de la enzima 5 α -reductasa en la línea celular U87 de glioblastoma, enzima clave en la reducción de andrógenos (Zamora-Sánchez et al., 2017).

2.3 Hormonas esteroideas y su efecto en Glioblastomas

Se ha informado acerca de la participación de las hormonas esteroideas como estrógenos, progestágenos y andrógenos aumentando la proliferación celular tanto en líneas celulares de astrocitomas, como en la implantación de este tipo de tumor en modelos animales; por ejemplo, se demostró en un estudio *in vitro*, que el estradiol incrementaba el número de células por medio del receptor a estrógenos (González-Arenas et al., 2011), Por otro lado, Germán-Castelán et al (2014) describen cómo la progesterona induce proliferación celular e infiltración en un astrocitoma implantado en ratas.

Otro interesante trabajo muestra inhibición de una vía apoptótica en la línea de glioblastoma U87 cuando se agrega dihidrotestosterona, el andrógeno con mayor afinidad al receptor de andrógenos, también esta línea celular presenta alta expresión de receptores de andrógenos (Yu et al., 2014). Además Rodríguez-Lozano et al (2019, 2000) mostraron cómo la testosterona y la dihidrotestosterona inducen proliferación, migración e invasión en líneas celulares de glioblastoma.

Capítulo 3. Neuroesteroides

3.1 Descubrimiento de la síntesis de esteroides en el cerebro

Baulieu (1994) fue el primero en proponer el término neuroesteroide, él describe al sistema nervioso central como un tejido esteroidogénico y demostró que esteroides como la pregnenolona (P_5), dehidroepiandrosterona (DHEA) y sus formas sulfatadas P_5S y DHEAS se encuentran en mayores concentraciones en el cerebro que en la circulación periférica de roedores, al proceder primero a medir la concentración sistémica y después de extirpar las gónadas y glándulas adrenales medirlos en el cerebro (Robel & Baulieu, 1999).

Se ha demostrado que el SNC expresa la mayoría de las enzimas para la síntesis y biotransformación de los esteroides. En particular se ha documentado la presencia de todas las enzimas que participan en la síntesis de neuroesteroides, en el cerebro de rata y en regiones del cerebro humano (Mellon & Deschepper, 1993; Gómez-Sánchez et al., 2005; Yu et al., 2002).

3.2 Concepto de Neuroesteroide

Es así como encontramos el concepto de neuroesteroide, siendo aquel esteroide que se sintetiza en células nerviosas (producción *in situ*), a su vez un neuroesteroide neuroactivo es el que tiene la capacidad de inducir efectos en el sistema nervioso y un neuroesteroide no activo no ejerce ningún efecto, las funciones de los neuroesteroides se mencionarán en párrafos posteriores (Baulieu, 1998).

3.3 Las Hormonas Esteroideas

Las hormonas esteroideas son mensajeros químicos derivados del colesterol, liposolubles, viajan a través del torrente sanguíneo para llegar a sus órganos diana. Para su transporte se asocian a proteínas plasmáticas como las globulinas transportadoras de hormonas y en menor medida a la albúmina, de esta manera se facilitan su llegada y se mantiene su estabilidad en el espacio extracelular. Una vez en sus sitios de acción pueden ejercer sus efectos principalmente de dos maneras, la primera es la vía clásica o genómica, donde el ligando (la hormona) se une al receptor intracelular, los receptores se dimerizan y traslocan al núcleo para activar factores de transcripción. La segunda es la vía membranal o no clásica, donde el complejo hormona-receptor puede activar a segundos mensajeros. Los receptores intracelulares y membranales son proteínas con características que les confieren afinidad a las hormonas (Barrett et al., 2010).

Si bien las hormonas pueden viajar lejos de la glándula excretora que las sintetiza a su órgano diana, también puede producir efectos *in situ*; de manera paracrina, cuando los efectos son en las células vecinas, autocrina cuando es en la misma célula e intracrina cuando la molécula no sale de la célula y ejerce efectos intracelulares.

3.4 Diferencias en la síntesis de Neuroesteroides

Los productos finales de la esteroidogénesis en cada tejido dependen de la existencia de un conjunto de enzimas capaces de metabolizar diferentes tipos de hormonas esteroideas, es decir; citocromos P450, deshidrogenasas de esteroides y reductasas (Sanderson, 2006). Por ejemplo, existe una diferencia en la capacidad de los oligodendrocitos, astrocitos y neuronas para sintetizar neuroesteroides, la diferencia es precisamente por la presencia y actividad de estas enzimas, siendo los astrocitos los que cuentan con la mayor diversidad de enzimas y la capacidad de generar la mayor variedad de neuroesteroides, sin embargo al estar en tan estrecha relación con los otros tipos celulares, la síntesis podría ser complementaria, es decir; los productos precursores podrían ser proporcionados a las otras células (Zwain & Yhen, 1999).

3.5 Estructura química del colesterol y de hormonas esteroideas

El colesterol es el precursor de las hormonas esteroideas, este puede ser adquirido de la dieta o sintetizado por las células a partir del acetato en forma de acetilcoenzima A (acetilCoA). Las hormonas esteroideas comparten una estructura química, la molécula ciclopentano perhidrofenantreno, y dependiendo de los carbonos estas serán: si tienen 21 carbonos (C21) serán pregnanos, corticoesteroides y glucocorticoides, 19 carbonos (C19) androstanos y si tienen 18 carbonos (C18) serán estranos (Arlt & Stewart, 2003).

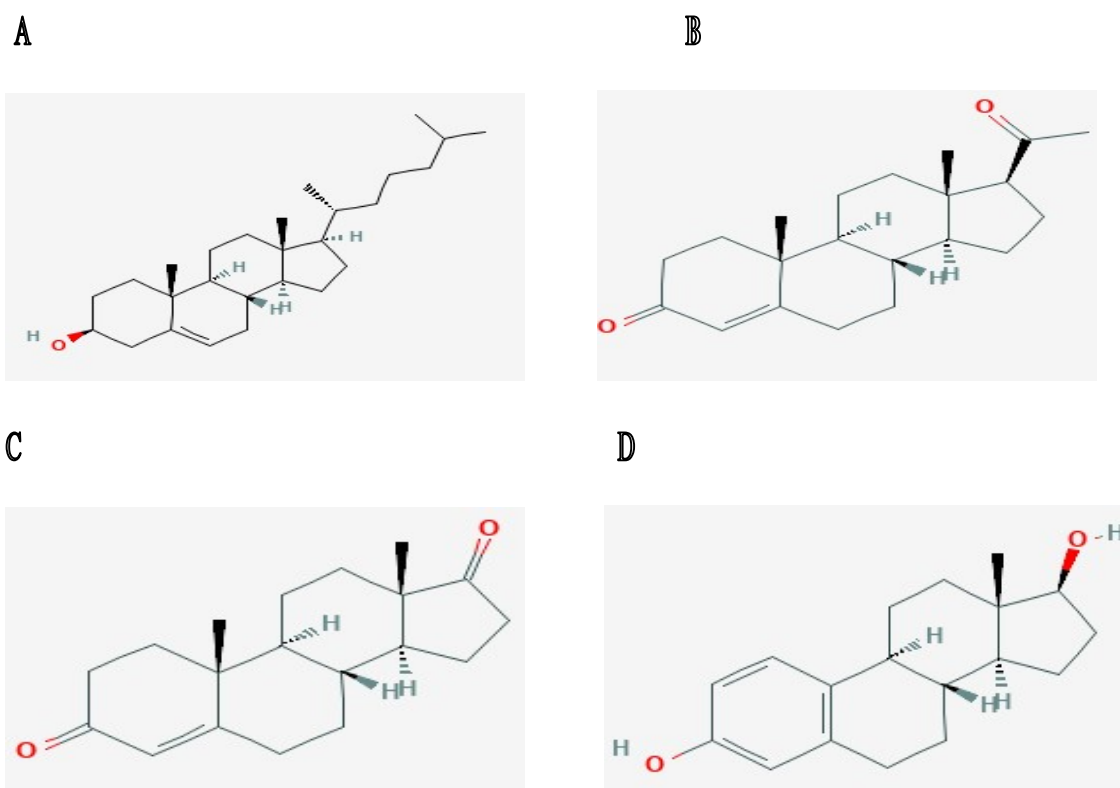


Figura 3. Estructura química del colesterol y hormonas esteroideas. A, colesterol, B, progestágenos, C, andrógenos y D, estrógenos.

Capítulo 4. Síntesis de Neuroesteroides

Como se mencionó, los productos de la esteroidogénesis dependen de la presencia y funcionalidad de determinadas enzimas en cada tejido. En el cerebro se localizan: citocromos P450, deshidrogenasas de esteroides y reductasas, las vías metabólicas se describen a continuación y se resumen en la figura número 5.

4.1 Inicio de la neuroesteroidogénesis

La neuroesteroidogénesis inicia con el ingreso del colesterol a la mitocondria, que está regulado por la proteína **StAR** (por sus siglas en inglés, steroidogenic acute regulatory protein), la cual capta el colesterol en la membrana mitocondrial externa, ahí es transferido al receptor mitocondrial a benzodiazepinas (**MBR**, mitochondrial-type benzodiazepine receptor, Papadopoulos & Shane, 1995). Formándose un canal que conduce el colesterol a la membrana mitocondrial interna, lugar donde se ubica la primera enzima convertidora de esteroides, la colesterol desmolasa, citocromo **P450_{scc}** (side chain cleavage) la cual sintetiza pregnenolona (P₅).

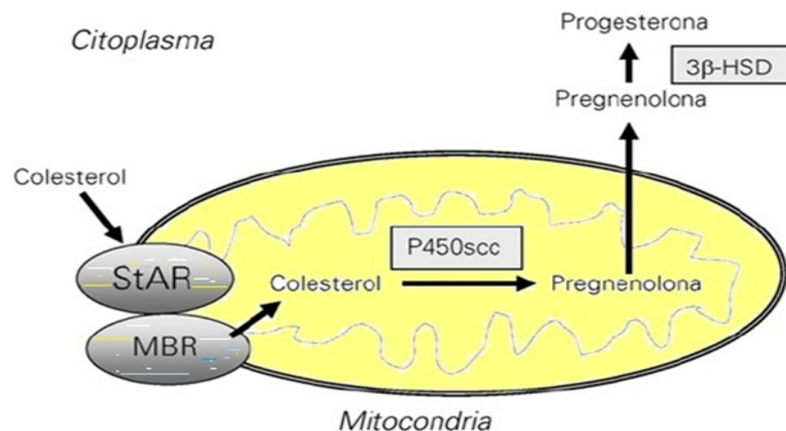


Figura 4. Inicio de la síntesis de neuroesteroides. Imagen extraída y modificada de Martín-Segura et al., 2007.

4.2 Síntesis de derivados de la progesterona, corticoesteroides, glucocorticoides y mineralocorticoides

En el retículo endoplásmico la P₅ puede tomar dos caminos: 1. por la acción de la **17 α -hidroxilasa** (CYP17) a 17-OH pregnanolona, y 2. Por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (**3 β -HSD**) a progesterona (P₄, Sanderson, 2006). La P₄ por la acción de la **5 α -reductasa** se metaboliza a 5 α -dihidroprogesterona (DHP) y ésta a alopregnanolona (THP) por acción de la 3 α - hidroxesteroide deshidrogenasa (**3 α -HSD**), La P₄ se puede transformar por medio de la **5 β -reductasa** a 5 β dihidroprogesterona (3 β -DHP) y esta a pregnanolona por medio de la **3 α -HSD** (Mellon & Vaudri , 2001; Radmunson et al., 2017).

La enzima **21-hidroxilasa P450 (CYP21A2)**, presente en el retículo endoplásmico convierte P₄ a 11-desoxicorticosterona (DOC). La DOC tiene dos rutas, la primera, por acción de la **5 α -reductasa** se convierte a la dihidrodeoxicorticosterona (DHDOC) y esta última es transformada a alotetrahydrodesoxicorticosterona (THDOC), la segunda, la corticosterona (CNA) por una **5 α -reductasa** es convertida en dihidrocorticosterona (DHCNA).

La enzima **21-hidroxilasa P450 (CYP21A2)** transforma a la 17 α -hidroxiprogesterona en 11-desoxicortisol (D-CLS) y este es biotransformado a cortisol por la **11 β -hidroxilasa**, La corticosterona se convierte en 18-OH-corticosterona (OH CNA), por la acción de la **18-hidroxilasa**, y finalmente pasa a aldosterona (ALDO) por medio de una 18-oxidasa o **aldosterona sintasa P450c11aldosintetasa** (Sanderson, 2006).

4.3 Síntesis de esteroides sexuales; estrógenos y andrógenos

La enzima **CYP17 (17 α -hidroxilasa/C₁₇₋₂₀ liasa)** presenta una actividad dual: una como 17-beta- hidroxilasa; convirtiendo P₅ a la 17 α -hidroxipregnenolona y P₄ a la 17 α -progesterona, y otra como **17,20-liasa** convirtiendo a la 17 α -hidroxipregnenolona en dehidroepiandrosterona (DHEA) y de la 17 α -hidroxiprogesterona a la delta 4-androstenediona, **CYP17 17, 20 liasa** es importante en la biosíntesis de esteroides sexuales. La DHEA es sustrato de dos enzimas, la primera 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa (**17 β -HSD**) la cual sintetiza androstenediol (adiol), la segunda; la **3 β -HSD** transforma a A₄ (Miller, 2007).

El andrógeno A₄ puede tomar tres caminos, por la acción de la **17 β -HSD** convertirse en testosterona (T), por la acción de la **P450-Aromatasa** (CYP19A1) convertirse a estrona (E₁) o bien por acción de la **5 α -reductasa** convertirse a androstanediona (ASN), este último sustrato de la **3 α -HSD** para metabolizar a la androsterona (AN, Labrie et al., 2001).

La testosterona puede reducirse a su metabolito más potente, la dihidrotestosterona (DHT) por acción de la **5 α - reductasa**, la DHT a su vez se metaboliza a 17-dihidro androsterona (DHAN) por la enzima **3 α -HSD**. La T puede convertirse a 11 β -hidroxitestosterona (OH-T) por acción de la **11 β -hidroxilasa**, también a estradiol (17beta-estradiol o E₂) por medio de la **aromatasa**. La **17 β -HSD** convierte E₁ a E₂ en una acción reversible. Finalmente el estriol (E₃) es sintetizado por una **16 α -hidroxilasa** a partir de E₁ y E₂ (Labrie et al., 2001, Do rego et al., 2009, Ramusson et al., 2017).

4.4 La puerta trasera de la testosterona o “back door testosterone”

La ruta metabólica descrita corresponde a la vía clásica, sin embargo recientemente se ha propuesto una vía complementaria capaz de metabolizar andrógenos y estrógenos independientes de testosterona o bien a través de derivados de la progesterona, a través de un juego enzimático que es llamado la puerta trasera o en inglés “back door pathway”.

Las vías alternas que se sugieren en esta propuesta son, la síntesis de andrógenos a través de los derivados de la progesterona; la alopregnanolona a 17-OH-alopregnanolona y esta a androsterona. Además de un par de interesantes reacciones inversas, por ejemplo la conversión de androsterona a androstanediona y de androsterona a dihidroandrosterona (Kamrath et al., 2012)

4.5 Vía general de síntesis de los Neuroesteroides

Se presenta una ruta de síntesis general de los neuroesteroides (fig. 5), con los nombres comunes de los esteroides y las enzimas que los sintetizan.

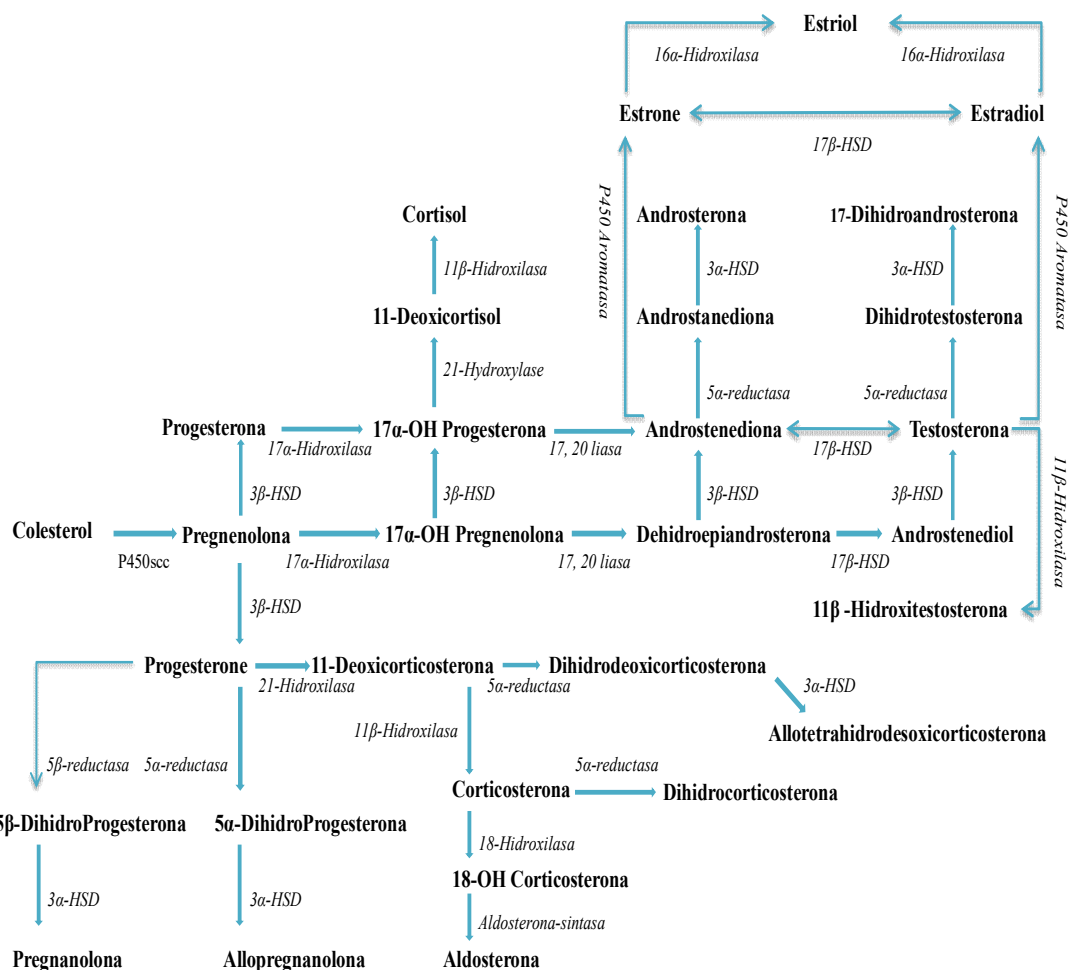


Figura 5. Vía de síntesis de los neuroesteroides. Adaptada de Pinacho-García et al., 2020. La ruta comienza cuando el citocromo P450_{scc} corta la cadena de colesterol de 6 carbonos y se sintetiza la pregnenolona. Las enzimas implicadas en la síntesis son: 17 α -hidroxilasa; 17-20 liasa, 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 α -HSD), 11 β -hidroxilasa, 16 α -hidroxilasa, 18-hidroxilasa, 21-hidroxilasa, P450-Aromatasa, 5 α -reductasa y aldosterona-sintasa. Inhibidores de 5 α -reductasa finasterida y dutasterida (Do Rego et al., 2009; Rasmusson et al., 2017; Storbeck et al., 2013. McInnes et al., 2004).

4.6 Vía de síntesis de esteroides sexuales: Andrógenos y estrógenos

Se muestra la síntesis general de los esteroides sexuales, se presentan los nombres comunes de los esteroides, sus abreviaturas y las enzimas que los sintetizan.

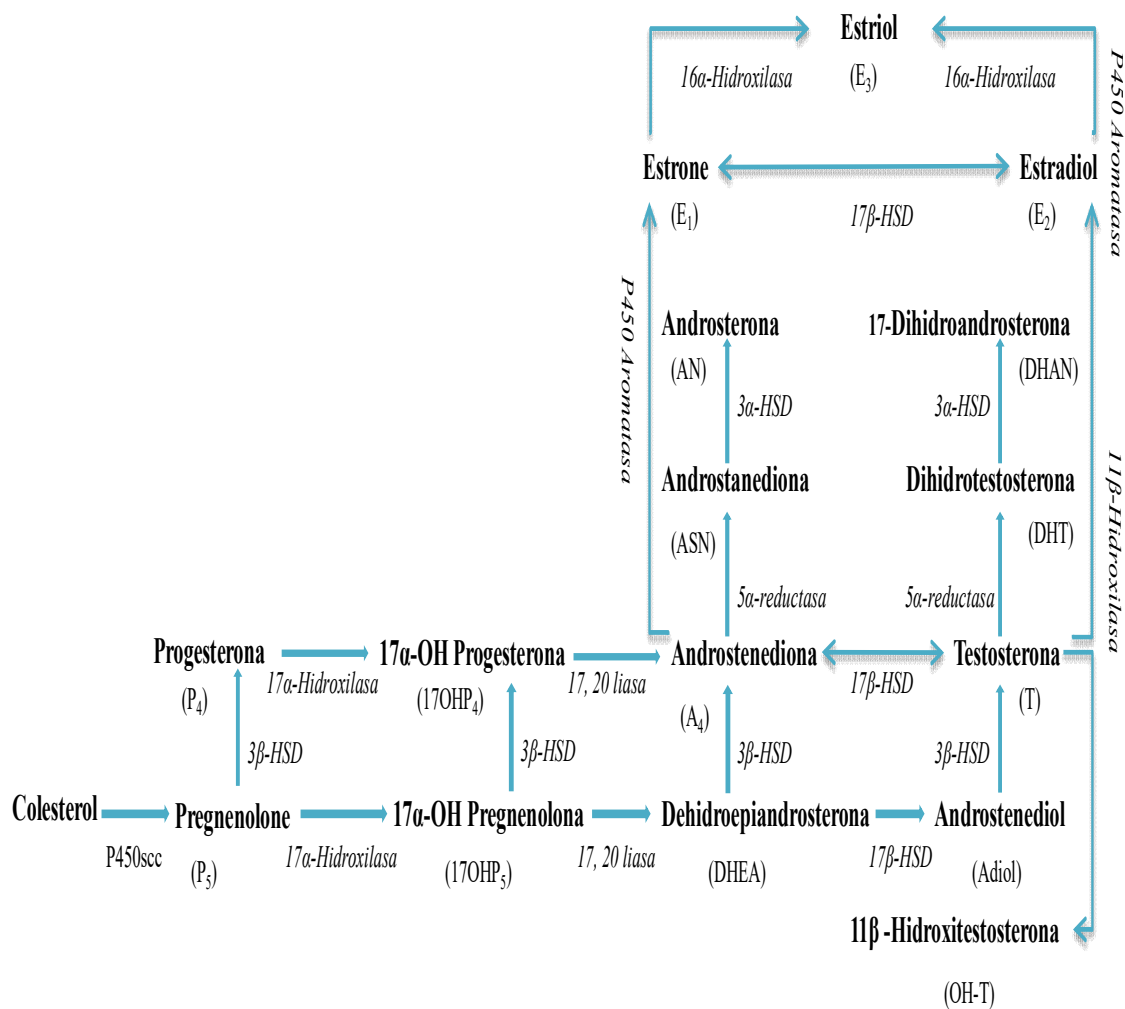


Figura 6. Vía de síntesis de esteroides sexuales. Adaptada de Pinacho-García et al., 2020. Las enzimas implicadas en la síntesis son: 17α-hidroxilasa; 17-20 liasa, 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD), 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3α-HSD), 11β-hidroxilasa, 16α-hidroxilasa, P450-Aromatasa, 5α-reductasa.

4.7 Vía de síntesis de derivados de la progesterona, corticoesteroides, glucocorticoides y mineralocorticoides

Se muestra la síntesis general de los esteroides sexuales, se presentan los nombres comunes de los esteroides, sus abreviaturas y las enzimas que los sintetizan (fig. 7)

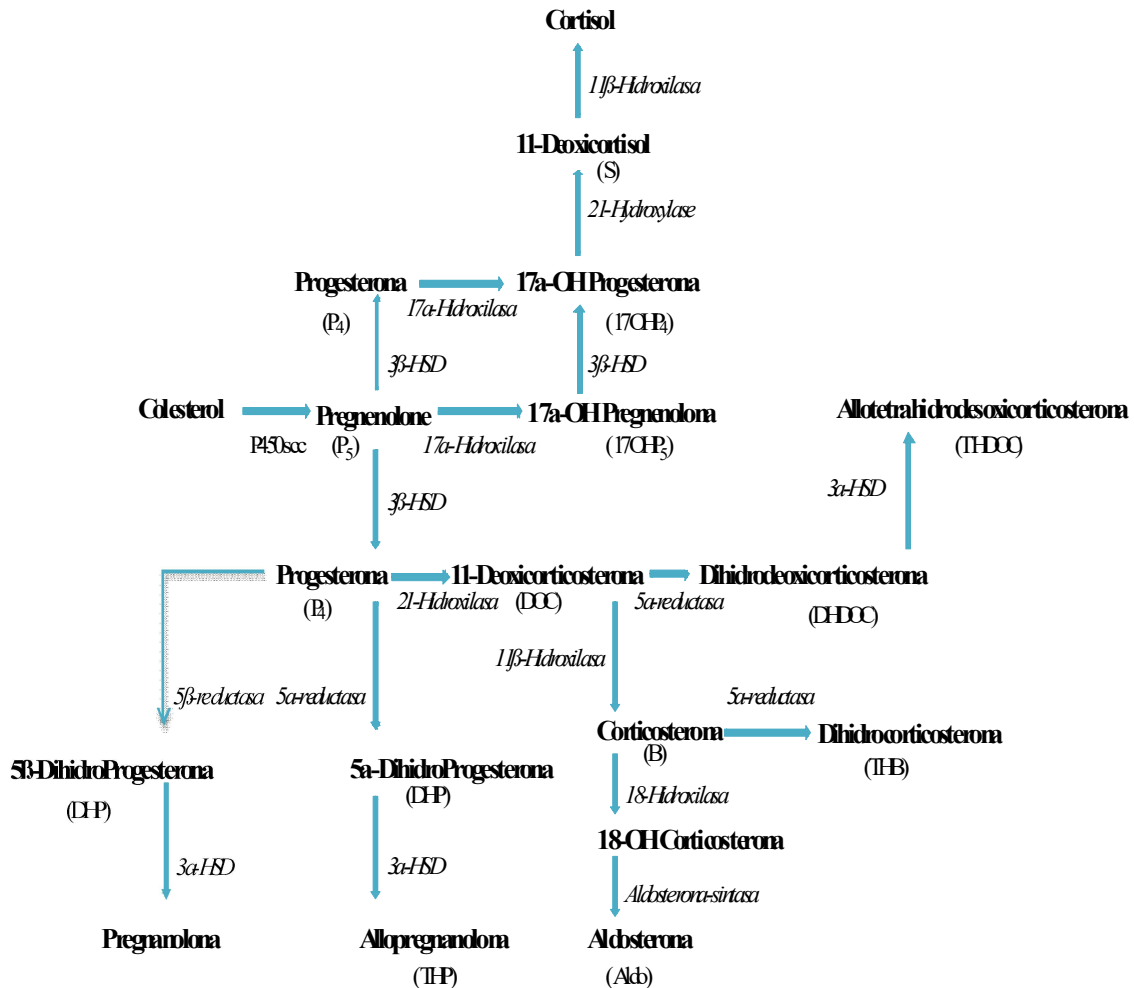


Figura 7. Vías de síntesis de derivados de progesterona, corticoesteroides, glucocorticoides y mineralocorticoides. Adaptada de Pinacho-García et al., 2020. Las enzimas implicadas en la síntesis son: 17α-hidroxiilasa, 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3α-HSD), 11β-hidroxiilasa, 16α-hidroxiilasa, 18-hidroxiilasa, 21-hidroxiilasa y aldosterona-sintasa.

Capítulo 5. La 5 α -reductasa y la farmacología de sus inhibidores

5.1 La 5 α -reductasa

La 5 α -reductasa es una enzima esteroideogénica encargada de la reducción de metabolitos, posee tres isoformas: 5 α -reductasa I, II y III. Se encuentra en el tejido prostático, vesículas seminales, epidídimo, folículo piloso e hígado y está ampliamente distribuida en el cerebro de roedores y humanos (Yamaha et al., 2010), además se detecta en la línea celular U87 de glioblastoma (Zamora et al., 2017). Entre los productos que reduce se encuentran los andrógenos, corticoesteroides, mineralocorticoides y derivados de la progesterona (McInnes et al., 2004). La inhibición de esta enzima ha sido una de las estrategias para controlar diversas patologías, por ejemplo la hiperplasia prostática (Azzouni et al., 2012).

5.2 La Finasterida y la Dutasterida

La finasterida y la dutasterida son inhibidores competitivos de la enzima 5 α -reductasa (5 α R) y tienen una estructura esteroidea. La finasterida es un análogo sintético de la testosterona, actúa como inhibidor con mayor afinidad por la isoforma II de la 5 α -reductasa, dicha isoforma metaboliza dos tercios de los valores de DHT circulante, la vida media de finasterida oscila entre las 6 y 7 horas. La finasterida tiene un valor de constante de afinidad o pK_i , de 6.44 para el tipo I y 7.16 para el tipo II de la 5 α -reductasa (Kenny et al., 1997).

La finasterida fue el primer fármaco autorizado para tratar la hiperplasia prostática, por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos de América (FDA). La dutasterida es un inhibidor de las isoformas I, II y III de la 5 α -reductasa, con un pK_i de 8.22 por el tipo I y 8.15 para el tipo II. Estudios *in vitro* han demostrado que la dutasterida es más potente que la finasterida, para la inhibición de producción de DHT a dosis equivalentes. La vida media de la dutasterida es superior a la de la finasterida. Ambos fármacos además de ser usados en la patología de la próstata, también son auxiliares en el tratamiento de alopecia androgénica, pero a dosis menores (Cabeza et al., 2016; Füllhase & Schneider, 2016).

5.3 Efectos adversos de la Finasterida y la Dutasterida

Entre los principales efectos adversos de estos fármacos encontramos los referentes a los temas sexuales, la disfunción eréctil en hombres, la pérdida de la libido en ambos sexos y alteraciones en la menstruación en mujeres. También se han reportado casos de ansiedad, depresión y variaciones en el estado de ánimo. El porcentaje de individuos que presentan estos efectos fluctúa entre el 3 y 15 %, los efectos pueden persistir aún después de meses de haber dejado el tratamiento (Hirshburg et al., 2016).

Capítulo 6. Funciones de los Neuroesteroides

6.1 Efecto de los Neuroesteroides

Los neuroesteroides pueden ejercer sus efectos de diversas maneras, ya sea a través de sus receptores nucleares y ejercer efectos genómicos, por ejemplo en el caso de los esteroides sexuales y glucocorticoides inducir la síntesis y/o inhibición de proteínas. O bien reconocer a los receptores de membrana activando segundos mensajeros, también activan efectos rápidos, por ejemplo modulando la actividad del receptor GABA_A (Hosie et al., 2006; Guennoum 2015), el de glutamato tipo N metil-D-aspartato (NMDA), entre otros (Schüle et al., 2014).

6.2 Función de los esteroides sexuales

El efecto de los esteroides sexuales es principalmente de carácter genómico, sin embargo en el cerebro muchos de los efectos se llevan a cabo desde la membrana celular. En el SNC los estrógenos participan en eventos de plasticidad neuronal y como neuroprotectores, también en conjunto con la glía activan los fenómenos de reparación de zonas dañadas (Raghava et al., 2017).

Los esteroides neuroactivos participan en una amplia serie de eventos, en la literatura encontramos que la testosterona en el cerebro influye en procesos de memoria, ansiedad, depresión, habilidades espacio temporales y en la conducta agresiva (Rosell & Siever, 2015).

6.3 Participación de los derivados de la progesterona en diferentes patologías

Varios estudios han evidenciado la participación que tiene la progesterona y sus derivados, principalmente sintetizados por la 5 α -reductasa, en varias patologías como, la epilepsia, la esquizofrenia, el dolor, la depresión y la ansiedad. Un ejemplo es la alopregnanolona la cual modula al receptor GABA_A, coadyuvando en aminorar los procesos de ansiedad, además de otras muchas interacciones (Callachan et al 1987; Schüle et al., 2014).

Capítulo 7. Justificación y objetivos del proyecto

7.1 Justificación

Los glioblastomas son los tumores primarios más agresivos en el SNC, los tratamientos usados hasta ahora no detienen las recidivas, por lo que es importante conocer más sobre el micro ambiente de estas células. Aportando información sobre la producción de hormonas esteroideas por estas células, se permitirá diseñar diferentes estrategias para la contención del desarrollo de esta patología. Por otro lado, el uso de fármacos ya usados en clínica que inhiben a enzimas clave en la producción de hormonas relacionadas con este tumor, proporciona una herramienta útil para investigar la participación de las hormonas y la actividad de las enzimas en este tema.

7.2 Hipótesis

- I.- Las células obtenidas de líneas celulares derivadas de glioblastoma sintetizan y metabolizan neuroesteroides.
- II.- Es posible interrumpir la esteroidogénesis de células derivadas de glioblastoma con fármacos inhibidores de enzimas esteroidogénicas.

7.3 Objetivo general

Identificar la producción de neuroesteroides en líneas celulares de GBs C6 y U87 e inhibir la síntesis de neuroesteroides en células U87.

7.4 Objetivos específicos

1. Identificar la producción de neuroesteroides en las líneas celulares C6 y U87 de GB por medio de cromatografía en capa fina (TLC).
2. Identificar la producción de neuroesteroides en las líneas celulares U87 de GB y cromatografía líquida de ultra resolución, acoplada a un espectrómetro de masas (UPLC/MS²).
3. Investigar el efecto de inhibidores de enzimas esteroideogénicas sobre la síntesis de neuroesteroides en la línea U87 celulares de GB.

Capítulo 8. Materiales y métodos

8.1 Diseño experimental

El diseño consistió en dos fases, en la primera identificamos la producción e inhibición de síntesis de neuroesteroides en las líneas celulares de glioblastoma C6 (rata) y U87 (humano), incubadas 24 y 48 horas, con precursores marcados con tritio: colesterol, progesterona, androstenediona, dehidroepiandrosterona y testosterona, mediante la técnica de cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés, Thin layer chromatography) en tres etapas.

- En la primera se evaluó la síntesis de neuroesteroides de las vías de los esteroides sexuales, corticoesteroides y derivados de la progesterona en las líneas celulares C6 y U87.
- En la segunda etapa se detectó la síntesis de neuroesteroides de las vías de los esteroides sexuales, corticoesteroides y derivados de la progesterona en la línea celular U87.
- En la tercera se indagó la inhibición producida por los fármacos finasterida y dutasterida, sobre la síntesis de neuroesteroides, de la línea celular U87 en las vías de los esteroides sexuales, los corticoesteroides y los derivados de la progesterona.

En la segunda fase se identificó la síntesis de neuroesteroides en líneas celulares U87, incubadas sin precursor o con precursores fríos: progesterona o androstenediona, por medio de la cromatografía líquida de ultra resolución, acoplada a un espectrómetro de masas (UPLC/MS²)

8.2 Cultivo de la línea celular C6 (rata) y U87 (humano)

Se utilizaron líneas celulares de glioblastoma de rata C6 y de humano U87. Se sembraron $5-10^4$ células en multipozos de 24 pozos en medio de cultivo DMEM/F12 o DMEM alto en glucosa (GIBCO BRL) respectivamente, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, GIBCO BRL), 2 mM glutamina (Sigma) y 100 unidades μg penicilina-estreptomicina (GIBCO BRL), incubadas a 37 °C en 95% aire, 5% CO_2 .

8.3 Incubación de las líneas celulares con precursores tritiados: síntesis de neuroesteroides

A una confluencia de 70 % las células C6 y U87 se lavaron con medio sin suero, se incubaron 24 y 48 horas con un ml de medio de cultivo sin suero fetal y con alguno de los siguientes precursores esteroideos marcados con tritio: 0.1 a 0.2 μCi (curio, unidad de actividad radioactiva), 1.8 nM/ml (cantidad de hormona por mililitro), Colesterol (^3H -Colesterol), Progesterona (^3H - P_4), adquiridos de Amersham Pharmacia Biotech, Androstenediona (^3H - A_4) Perkin Elmer, Boston, MA, USA. Testosterona (^3H -T) o Dehidroepiandrosterona (^3H -DHEA) MS, Dupont Boston, MA, USA. Durante 24 y 48 horas de acuerdo a Valdez et al. (2012). La células U87 se incubaron 48 horas con Androstenediona (^3H - A_4) o Progesterona (^3H - P_4) más los inhibidores enzimáticos como finasterida y dutasterida adquiridos de Sigma Aldrich, a las concentraciones de 5 μM , 1 μM y 0.5 μM durante 48 horas (Pinacho-García et al., 2020; Valdez et al., 2012).

8.4 Extracción de metabolitos del medio de cultivo

Pasado el tiempo de incubación se recolectó el medio de cultivo y se almacenó en viales. A los viales con un ml de medio se le agregó éter etílico 5 ml/ml de medio, la solución se agitó por 10 minutos y se congeló en una solución con acetona industrial y hielo seco para congelar la fase acuosa y separarla de la fase etérea. Pasados 15 minutos la fase etérea se vertió en nuevos viales los cuales se colocaron a baño maría para evaporar el éter y obtener los metabolitos. El éter etílico fue adquirido de la marca de J. B. Baker.

8.5 Identificación de neuroesteroides por TLC, siembra de muestra y estándares en una placa de sílica

En una placa recubierta de sílica gel (20 x 20 kiesel gel 60 F₂₅₄), rayada de manera vertical con una separación de 1.5 cm, se sembraron los neuroesteroides (muestras) y los estándares (hormona fría). Los neuroesteroides extraídos se disolvieron en 60 µl etanol para su separación por cromatografía en capa fina, se sembró la muestra de 20 µl (con marca radioactiva) utilizando nitrógeno gaseoso para secar el lugar de aplicación y los estándares auténticos (hormona sin radioactividad) 3 µl disueltos en acetona, sembrados en las primeras columnas de la placa: colesterol, pregnenolona (P₅), 17-hidroxi-pregnenolona (17-OHP₅) progesterona, 17α-hidroxi-progesterona (17-OHP₄), 11-deoxicortisol (D-Cls), deoxicorticosterona (DOC), cortisol, corticosterona (CNA), dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediol (Adiol), androstenediona (A₄), testosterona (T), hidroxitestosterona (OH-T) estradiol (E₂), androstanediona (ASN), estrona (E₁), androsterona (AN), dihidroandrosterona (DHAN), dihidrocorticosterona (DHCNA), aldosterona (Aldo), dihidrottestosterona (DHT), dihidroprogesterona (DHP), alotetrahidrodesoxicorticosterona (THDOC), estriol (E₃) pregnanolona (Steraloids, Wilton, NH) y alopregnanolona (THP, Sigma Aldrich).

8.6 Corrida de la placa en una cámara de TLC

Las placas se introdujeron en una cámara cromatográfica, se agregaron los correspondientes sistemas de solventes. Para corticoesteroides y glucocorticoides: tolueno: acetona: metanol (78/20/2 v/v) y/o benceno: acetona (50/50 v/v). Y para los esteroides sexuales, benceno: metanol (90/10) o diclorometano: acetato de etilo (80/20) y una variación (75/25). Los siguientes solventes: Metanol (MeOH) acetona, diclorometano, tolueno y acetato de etilo grado HPLC se adquirieron de las marcas; Merck, Darmstadt, y Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, USA).

Después de la corrida, se procedió a revelar la placa, primero mediante el uso de luz ultravioleta de onda corta sobre la placa de silica, posteriormente se recortó la sección de la placa donde se sembraron los estándares y se cubrió con ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 10 % mediante el uso de una pipeta y se procedió a aplicar calor a 120 °C, esto con el fin de detectar en qué posición corrieron los estándares (Valdéz et al., 2012).

8.7 Determinación de los metabolitos formados a partir de precursores radiomarcados

La placa de silica gel fue cuadrículada según los estándares que se hayan encontrado a lo largo de la corrida y esos cuadros fueron recortados para ingresados de manera independiente en viales, a estos se les agregaron 5 ml de líquido de centelleo y se colocan en orden en gradillas en un contador de radioactividad. Posteriormente se calculó el porcentaje de transformación del precursor a los metabolitos.

8.8 Estadística

Los datos se presentan como medias \pm SEM. Los valores de probabilidad de $p < 0.05$ se consideraron significativos. La normalidad se investigó mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov. Para investigar las diferencias estadísticas entre control y grupos se utilizó la prueba ANOVA, seguida de la prueba *post-hoc* de Dunn. Los experimentos se repitieron al menos tres veces. El análisis estadístico se realizó con el programa Prisma versión 5. 2010 (GraphPad Software Inc.).

8.9 Incubación de la línea celular U87 (humano) para la UPLC/MS²

Las células U87 fueron sembradas en multipozos de 24 pozos, a una confluencia de 70 % las células U87 se lavaron con medio sin suero, se incubaron en un ml de medio sin suero fetal 48 horas sin precursores y con precursores hormonales fríos (sin tritio) 2 nM/ml, de la siguiente manera: 1.-Células en medio sin precursor, 2.- Células en medio de cultivo más uno de los dos precursores progesterona (P₄) o androstenediona (A₄). Pasadas las 48 horas el medio de cultivo se recuperó y se procedió a la extracción de los metabolitos como se describe en el punto 8.4.

8.10 Identificación de neuroesteroides en la línea celular U87 por cromatografía líquida de ultra resolución, acoplada a espectrómetro de masas (UPLC/MS²)

La identificación de neuroesteroides sintetizados por las células U87 mediante UPLC/MS² fue en colaboración con el Dr. Mario Figueroa, en Laboratorio 25 del Instituto de Química de la UNAM. Las muestras (neuroesteroides extraídos) y 26 estándares internos (hormonas frías) se reconstituyeron en 5 µl de metanol para su separación por cromatografía líquida de ultra resolución. La batería de estándares internos se usó para conocer los tiempos de retención y su peso molecular ionizado, con estos datos se logró tener parámetros de identificación de los productos de síntesis de las muestras. Los estándares internos fueron los siguientes: 17-hidroxipregnenolona (17-OHP₅), progesterona, 17α-hidroxiprogesterona (17-OHP₄), 11-deoxicortisol (D-CIs), deoxicorticosterona (DOC), cortisol, corticosterona (CNA), dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediol (Adiol), androstenediona (A₄), testosterona (T), hidroxitestosterona (OH-T) estradiol (E₂), androstanediona (ASN), estrona (E₁), androsterona (AN), dihidroandrosterona (DHAN), dihidrocorticosterona (DHCNA), aldosterona (Aldo), dihidrotestosterona (DHT), dihidroprogesterona (DHP), alotetrahidrodesoxicorticosterona (THDOC), estriol (E₃), pregnanolona (Steraloids, Wilton, NH) y alopregnanolona (THP, Sigma Aldrich).

8.11 Proceso para determinar la biotransformación de metabolitos mediante la técnica UPLC/MS²

Se colocaron los viales en una gradilla y se introdujeron para su análisis en un equipo de cromatografía líquida de ultra resolución, acoplada a espectrómetro de masas (UPLC/MS²). Se utilizó un equipo Waters Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) el equipo cuenta con un inyector automático vinculado a un detector de fosfodiodos (PDA). El aparato de UPLC se programó para tomar de cada vial la cantidad de 3 µl de muestra o estándares internos, en un tiempo de corrida de 10 minutos a un flujo de 0.6 ml/min para separar los metabolitos.

Usando un sistema de disolventes: un gradiente de agua y acetonitrilo, a estos disolventes se les adicionó 0.1% de ácido fórmico. Los metabolitos fueron separados mediante una columna Acquity BEH C18 de 50 x 2,1 mm, con tamaño de partícula de 1,7 μm , marca Waters (Milford, MA, USA).

Las moléculas separadas se fragmentaron e ionizaron mediante una fuente de ionización por electro-spray (HESI) en modo positivo, a una velocidad del flujo del gas nitrógeno de 35.00 arb. Con temperatura del vaporizador de 300 °C y 275 °C del capilar. Por último, un detector de masas acoplado al equipo, sistema de espectrometría de masas LTQ Orbitrap XL (Thermo Finnigan, San José, CA, EE. UU.), detectó las características propias de cada metabolito, lo que permitió su identificación.

8.12 Identificación de neuroesteroides por UPLC/MS², estándares y muestras

Los datos obtenidos se presentaron de dos formas, los tiempos de retención (momento de la corrida en el que aparece el metabolito en forma de un cromatograma y las características de las moléculas fragmentadas e ionizadas, por medio de un espectro de masas.

Capítulo 9. Resultados TLC y UPLC/MS²

Se muestran los resultados en dos secciones:

- La primera, 9.1. Para los resultados de cromatografía en capa fina.
- La segunda, 9.2. Para los resultados de cromatografía líquida de ultra resolución.

9.1 Síntesis de neuroesteroides radiomarcados en las líneas celulares C6 y U87, cromatografía en capa fina (TLC)

Se presentan los resultados de la síntesis de neuroesteroides utilizando la TLC, los tiempos de incubación de células C6 y U87 con precursores fueron 24 y 48 horas.

1. Células C6 con precursores tritiados.
2. Células U87 con precursores tritiados.
3. Células U87 con precursores tritiados más inhibidores enzimáticos.

9.1.1 Síntesis de esteroides sexuales por la línea celular C6, con los precursores colesterol y DHEA

Los datos de la figura 8A muestran la biotransformación del precursor colesterol por células C6 a metabolitos después de 24 y 48 h de incubación. Se encontraron como principales metabolitos: andrógenos; la hidroxitestosterona (OH-T), dihidroandrosterona (DHAN), Adiol, androstenediona, y el estrógeno estriol, en menor proporción; testosterona, 17 hidroxiprogesterona (17-OHP₅) y androstanediona. (ASN). En la figura 8B se examinaron metabolitos sintetizados por las células C6 cuando se exponen al precursor ³H-DHEA después de 24 y 48 h de incubación. Después de 24 h en cultivo, las células sintetizaron principalmente los andrógenos A₄, T y estradiol E₂, porcentaje de transformación: 15.3 ± 1.2, 5.2 ± 0.6, 7.8 ± 1.3 respectivamente. La síntesis de T se duplicó en 48 h (12.2 ± 1.1). Otros metabolitos como Androsterona, DHAN y ASN también se sintetizaron, aunque en menor cantidad (2% en promedio).

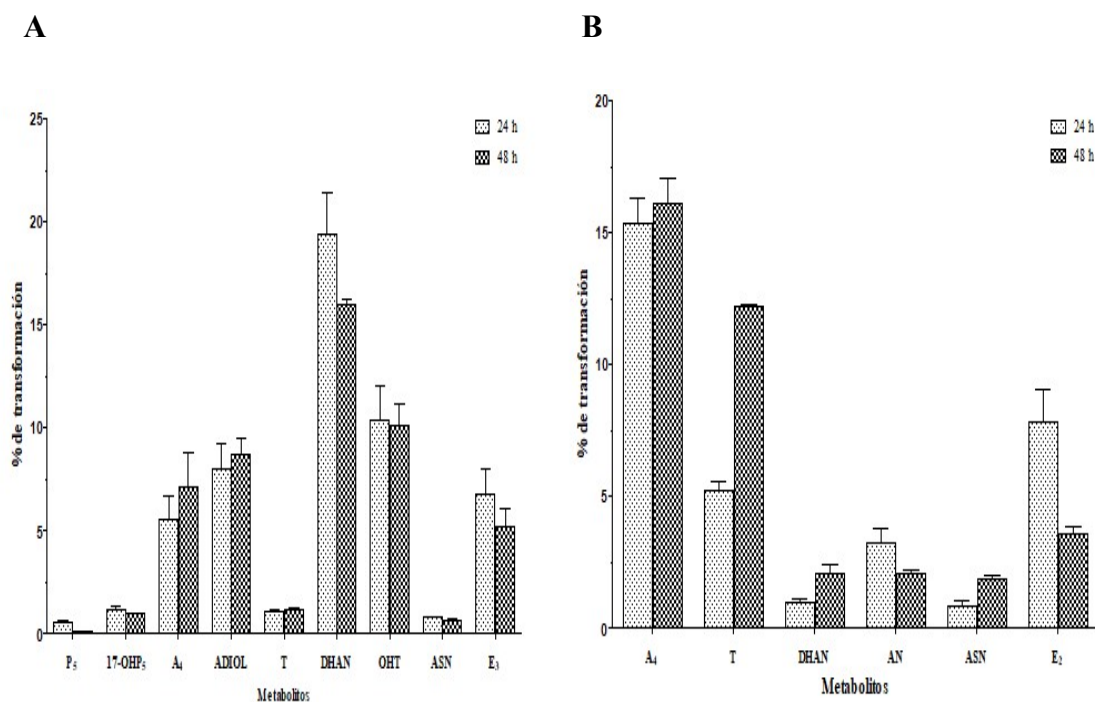


Figura 8. Biotransformación de precursores ³H-colesterol 8A y ³H-DHEA 8B a esteroides sexuales por células C6 incubadas 24 y 48 h. El eje Y muestra el porcentaje de transformación y el eje X los metabolitos encontrados. Media ± SEM. Sistema de solventes: diclorometano: acetato de etilo (75:25 and 80:20) v: v.

9.1.2 Síntesis de esteroides sexuales por la línea celular C6, con precursores androstenediona o testosterona

La incubación de células C6 con $^3\text{H-A}_4$ (Fig. 9A) produjo varios andrógenos como T, DHT, DHAN, ASN, AN, OH-T, y también el estrógeno más potente, E_2 . Cabe señalar que, en el caso de testosterona, DHAN, OH-T y de E_2 la síntesis aumentó después de 48 horas de cultivo. La dihidrotestosterona fue el metabolito más abundante junto con OH-T, cuando las células C6 se incubaron en presencia de ^3H -testosterona (Fig. 9B). La síntesis de este potente andrógeno aumentó en función del tiempo. Las células también produjeron pequeñas cantidades de A_4 y DHAN y estradiol este último aumenta al segundo tiempo.

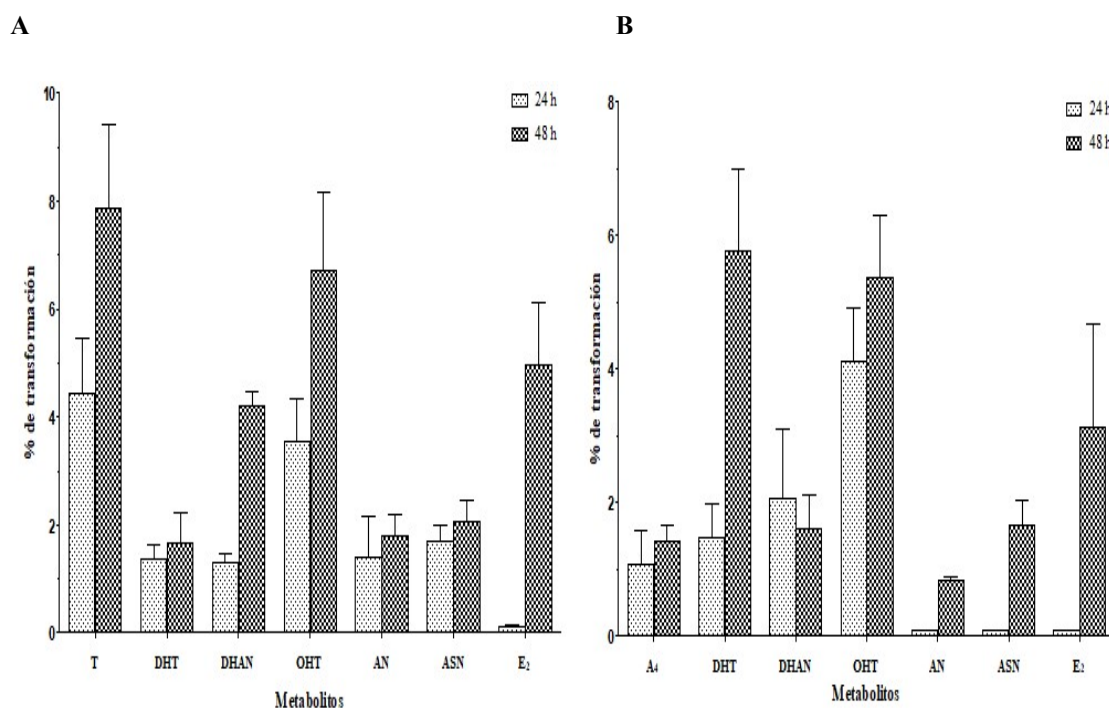


Figura 9. Biotransformación de precursores ^3H -androstenediona 9B y ^3H -testosterona 9A a esteroides sexuales por células C6 incubadas 24 y 48 h. El eje Y muestra el porcentaje de transformación y el eje X los metabolitos encontrados. Media \pm SEM. Sistema de solventes: diclorometano: acetato de etilo (75:25 y 80:20) v: v.

9.1.3 Síntesis de derivados de la progesterona y corticoesteroides por la línea celular C6, con el precursor progesterona

La biotransformación de la P₄ tritiada sintetizo como resultado los siguientes metabolitos: 17-OHP₄, deoxicortisol, corticosterona. Además se detectó DHCNA y DOC, la síntesis de estos metabolitos aumentó después de 48 h de cultivo (Figura 10). Aldo, THP, DHP fueron también sintetizados durante las 24 h, sin embargo, no se observaron cambios a las 48 h. No se detectó síntesis de cortisol.

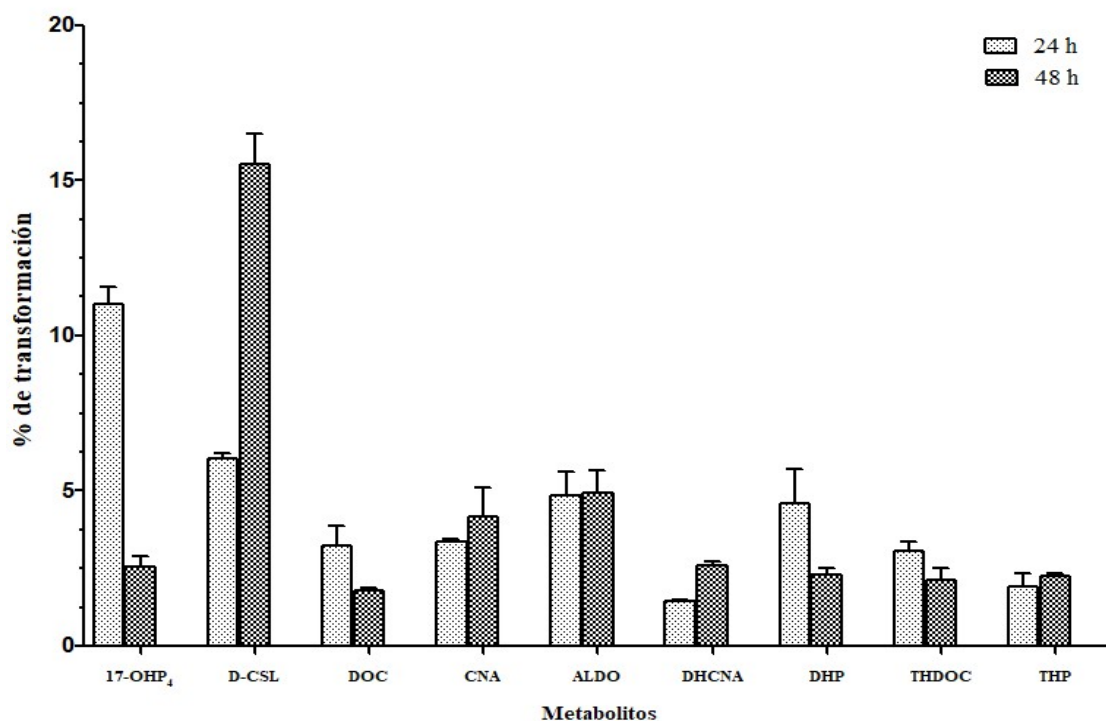


Figura 10. Biotransformación del precursor ³H-progesterona a corticoesteroides por células C6 incubadas 24 y 48 h. El eje Y muestra el porcentaje de biotransformación y el eje X los metabolitos encontrados. Media ± SEM. Sistema de solventes: tolueno: acetona: metanol (78:20:2) v: v.

9.1.3 Síntesis de esteroides sexuales por la línea celular U87, con los precursores colesterol o androstenediona

Los datos de la Figura 11A muestran la biotransformación del precursor colesterol ^3H a metabolitos tritados, por células U87 después de 24 y 48 h de incubación. La progesterona fue el metabolito más abundante, también se detectaron en pequeñas cantidades de P_5 , 17-OHP $_4$, 17-OHP $_5$ y OH-T. Además de testosterona, ASN y DHAN igual en pequeñas cantidades.

La incubación de las células U87 con ^3H -A $_4$ produjo testosterona y androsterona como los metabolitos más abundantes (Fig. 11B). Se encontraron menores cantidades de otros metabolitos se encontraron como DHAN, DHT y O-HT, así como de E $_2$ y ASN.

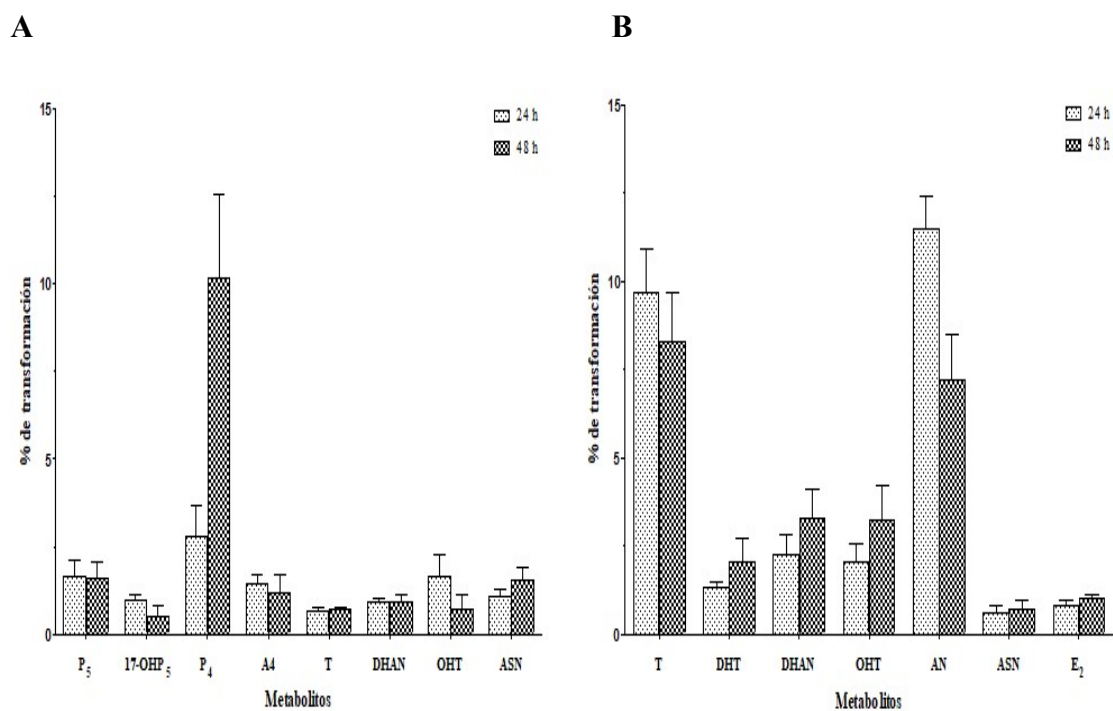


Figura 11. Biotransformación de precursores ^3H -colesterol 11A y ^3H -androstenediona 11B a esteroides sexuales por células U87 incubadas 24 y 48 h. El eje Y muestra el porcentaje de biotransformación y el eje X los metabolitos encontrados. Media \pm SEM. Sistema de solventes: diclorometano: acetato de etilo (75:25 and 80:20) v: v.

9.1.4 Síntesis de esteroides sexuales por la línea celular U87, con el precursor testosterona o corticoesteroides con el precursor progesterona

Las células U87 incubadas con testosterona tritjada produjeron pequeñas cantidades de androstenediona, DHT, DHAN y AN siendo la hidroxitestosterona el metabolito producido en mayor cantidad (Fig. 12A).

Para investigar si las células U87 tienen la capacidad de sintetizar corticoesteroides y derivados de la progesterona, se incubaron las células con progesterona tritjada. La figura 12B muestra la biotransformación de la progesterona a metabolitos como aldosterona y THDOC que fueron los más abundantes, además también fueron encontrados, 17OH-P₄, DOC, THP, DHB, corticosterona y cortisol.

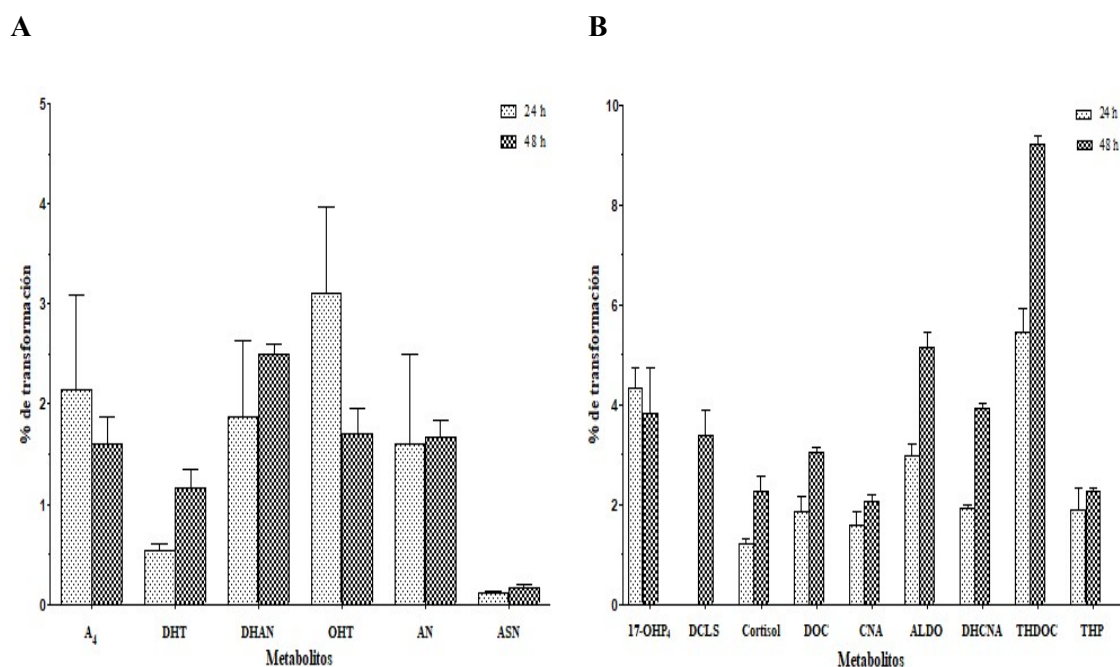


Figura 12. Biotransformación de los precursores ³H-testosterona 12A a esteroides sexuales y ³H-progesterone 12B a corticoesteroides por células U87 incubadas 24 y 48 h. El eje Y muestra el porcentaje de biotransformación y el eje X los metabolitos encontrados. Media ± SEM. Sistema de solventes: diclorometano: acetato de etilo (75:25 y 80:20) v: v.

9.1.5 La Finasterida inhibe la síntesis de esteroides sexuales a partir del precursor androstenediona

Las células U87 se incubaron durante 48 h con $^3\text{H-A}_4$ y con tres diferentes concentraciones del inhibidor de la 5α -reductasa, finasterida. La concentración de la testosterona se modificó estadísticamente por el tratamiento con el fármaco sin embargo, se observó una tendencia hacia la acumulación de este esteroide. La finasterida a concentraciones de 0.5 a 5 μM redujo significativamente la síntesis de varios esteroides derivados de la androstenediona como DHT, DHAN, AN, ASN, OH-T e incluso E_2 . El efecto del inhibidor estuvo relacionado con la concentración del fármaco (Fig. 13).

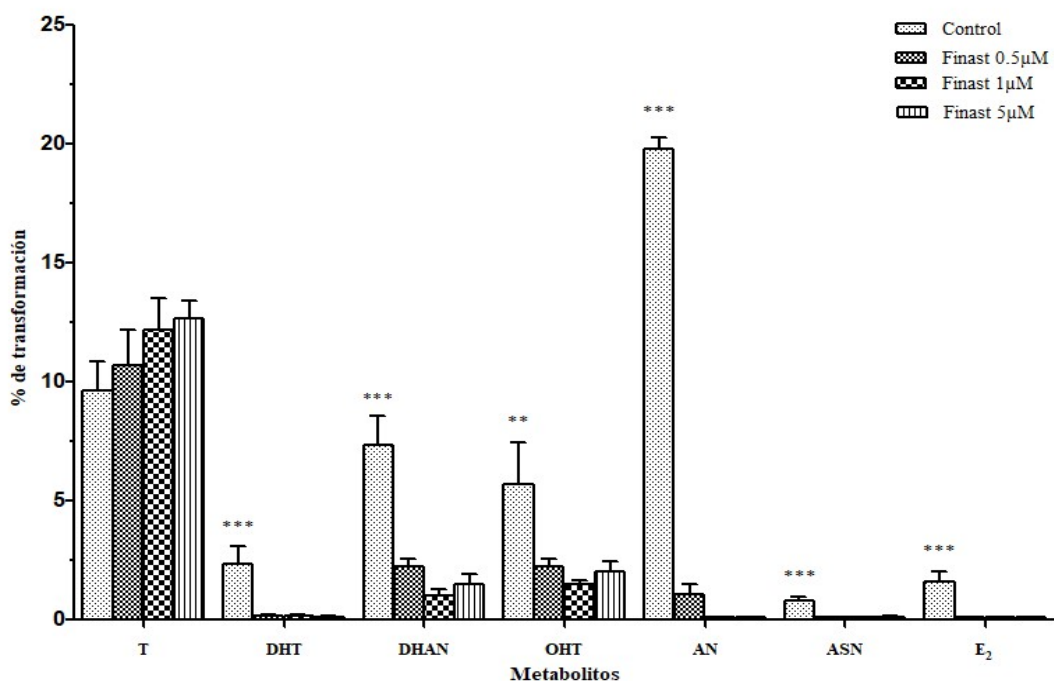


Figura 13. La finasterida inhibe la síntesis de esteroides sexuales en células U87. Las células fueron incubadas durante 48 h con ^3H -androstenediona como precursor, en presencia o ausencia de diferentes concentraciones finasterida. El eje Y muestra el porcentaje de transformación, y el eje X Los metabolitos encontrados. Media \pm SEM * * * P < 0.01, * * * P < 0.001 control vs finasterida 0.5, 1 y 5 μM . Sistema de solventes: diclorometano, acetato de etilo. (80:20) v: v.

9.1.6 La Dutasterida inhibe la síntesis de esteroides sexuales con precursor androstenediona

La presencia de la dutasterida durante 48 horas en los medios de cultivo de U87, disminuyó significativamente la síntesis de andrógenos y estrógenos (Fig. 14). La testosterona tritiada mostró una tendencia a acumularse cuando las células fueron incubadas con dutasterida. La síntesis de DHT, DHAN y Androsterona fueron inhibidos de manera significativa, así como ASN, OH-T y estradiol, incluso con la menor concentración del fármaco; el efecto del inhibidor fue directamente proporcional a su concentración. La androsterona fue nuevamente el metabolito más abundante de la biotransformación de androstenediona y la dutasterida disminuyó notablemente su síntesis.

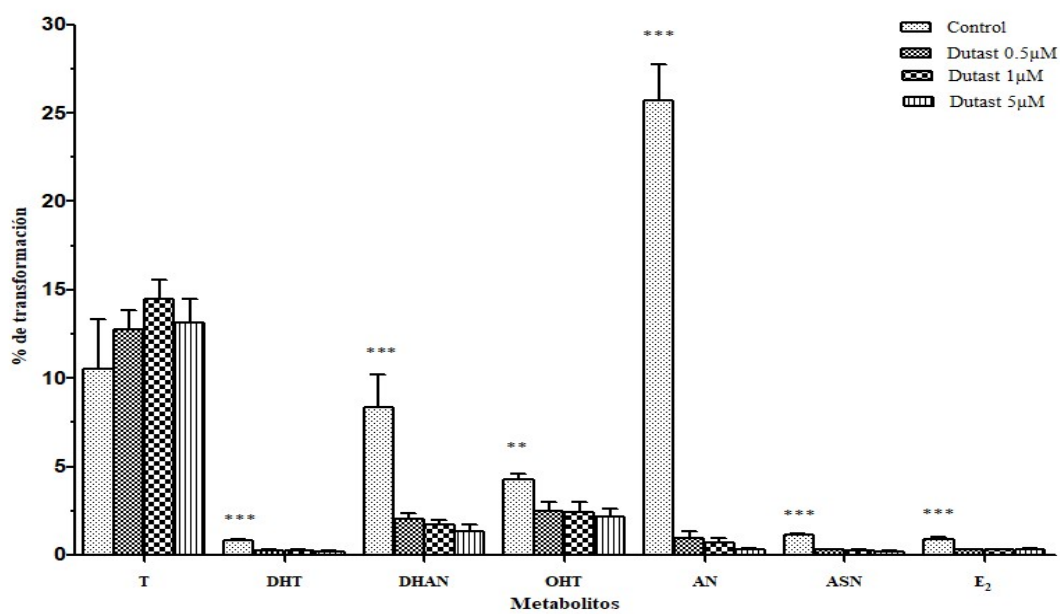


Figura 14. La dutasterida inhibe la síntesis de esteroides sexuales en células U87. Las células fueron incubadas durante 48 h con ³H-androstenediona como precursor, en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de dutasterida. El eje Y muestra el porcentaje de transformación, y el eje X Los metabolitos encontrados. Media ± SEM * * P <0.01, * * * P <0.001 control vs dutasterida 0.5, 1 y 5 μM. Sistema de solventes: diclorometano, acetato de etilo (80:20) v: v.

9.1.7 La Dutasterida inhibe la síntesis de esteroides sexuales con la progesterona como precursor

Dado que el espectro de inhibición de la dutasterida sobre las isoformas de la 5α -reductasa es más amplio que el de finasterida, decidimos usarla para indagar la inhibición de síntesis de andrógenos a partir de la progesterona, puesto que tiene un mayor pKi comparado con la finasterida. La figura 15 muestra los esteroides androgénicos derivados de 3H -P₄.

Lo que encontramos en los medios de cultivo de células U87 después de 48 horas en presencia o ausencia de dutasterida, fue que la testosterona mostró una tendencia a acumularse significativamente en todas las concentraciones de dutasterida. La síntesis de O-HT, DHT, DHAN, AN y estriol, fue inhibida significativamente, desde la menor concentración del fármaco y se observó claramente que, el efecto del inhibidor es directamente proporcional a la concentración.

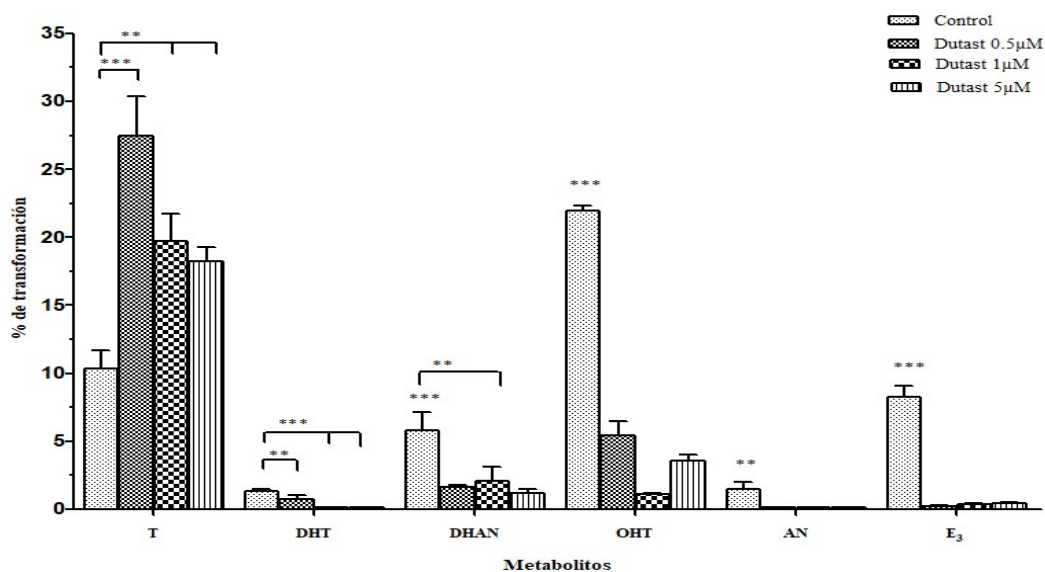


Figura 15. La dutasterida inhibe la síntesis de esteroides sexuales en células U87, incubadas durante 48 h con 3H -progesterona como precursor, en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de dutasterida. El eje Y muestra el porcentaje de transformación y el eje X los metabolitos encontrados. Media \pm SEM * * P <0.01, * * * P <0.001 control vs dutasterida 0.5, 1 y 5 μ M. Sistema de solventes: diclorometano, acetato de etilo (80:20) v: v.

9.1.8 La Dutasterida inhibe la síntesis de derivados de la progesterona y corticoesteroides con precursor progesterona

La dutasterida inhibe la síntesis de corticoesteroides por las células U87 incubadas con ^3H -progesterona. Las concentraciones de dutasterida de 0.5 a 5 μM redujeron significativamente Aldo, THDOC y síntesis de DHCNA (Fig. 16). La desoxicorticosterona fue notablemente acumulada después de la incubación con dutasterida; a pesar de que su síntesis fue mucho menor, la acumulación de corticosterona también se pudo observar.

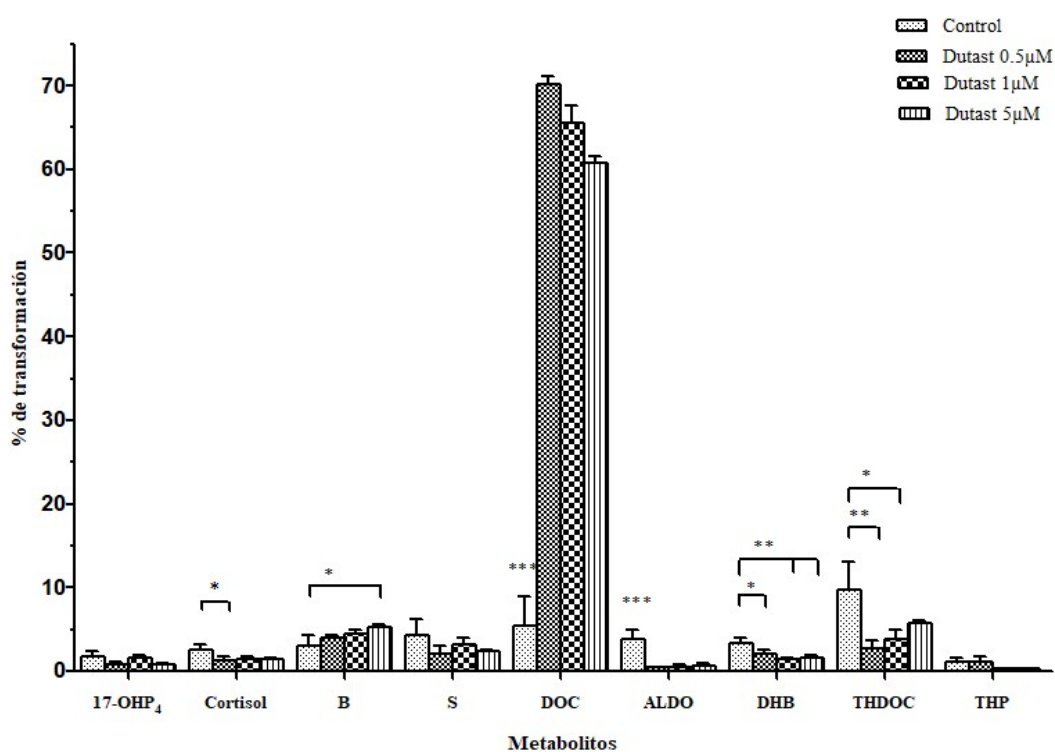


Figura 16. La Dutasterida inhibe la síntesis de corticoesteroides en células U87. Las células se incubaron durante 48 h con ^3H -progesterona como precursor, en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de dutasterida. El eje Y muestra el porcentaje de transformación, y el eje X los metabolitos encontrados. Media \pm SEM * P < 0.05 ** P < 0.01, *** P < 0.001 control frente a dutasterida 0.5, 1 y 5 μM . Sistema de solventes: tolueno, acetona, metanol (78: 20: 2) v: v.

9.2 Resultados UPLC/MS², Síntesis de Neuroesteroides por la línea celular U87

- Primero se realizó una corrida con una batería de 26 estándares internos (hormonas esteroideas) en UPLC/MS², para conocer el tiempo de retención y las cualidades únicas de cada metabolito, después se procedió al análisis de las muestras:
- Con UPLC se analizó la síntesis de neuroesteroides de manera constitutiva, es decir; sin agregar ningún precursor hormonal, observando la síntesis de esteroides sexuales, corticoesteroides y derivados de progesterona.
- También agregando precursores como androstenediona o progesterona se analizaron las mismas vías de síntesis de neuroesteroides; esteroides sexuales, corticoesteroides y derivados de progesterona.

9.2.1 Batería de estándares internos en UPLC/MS²

Con el desarrollo de la cromatografía líquida de los estándares internos se obtuvieron, los tiempos de retención (*t*/ret), espectro UV, unidades de absorbancia, el tiempo de retención con la molécula protonada (*m/z*), además de la ionización y la relación carga masa del ión molecular protonado (*m/z* [M+H]⁺) en el caso de nuestros compuestos, fueron ionizados de manera positiva. Estos datos en conjunto permitieron la construcción de la siguiente tabla 1. Con los datos agrupados en la tabla pudimos identificar y ubicar los neuroesteroides sintetizados por las células U87.

#	Nombre	Abreviatura	<i>t</i> /ret	abs UV	Peso molecular	Peso ionizado	Estructura
1	Estriol	E ₃	2.91	2.82	288.38	289.1803	
2	Aldosterona	Aldo	2.97	2.92	360.44	361.2014	
3	Cortisol	CLS	3.28	3.22	362.42	363.2159	
4	Hidroxitestosterona	OH-T	3.54	3.47	304.42	305.2111	
5	Dihidrocorticosterona	DHCNA	3.69	3.64	344.44	345.2054	
6	Corticosterona	CNA	3.80	3.74	346.46	347.2216	
7	Deoxicortisol	D-CLS	3.87	3.82	346.46	347.2216	
9	Androstenediol	Adiol	4.16	4.13	290.44	291.2314	
8	Hidroxiprogesterona	OH-P ₄	4.16	4.04	330.46	331.2261	
10	Estradiol	E ₂	4.25	4.17	272.38	273.1848	
11	Testosterona	T	4.36	4.29	288.42	289.2162	
12	17-Hidroxiprogesterona	17-OHP ₄	4.46	4.42	330.46	331.2267	
13	Deoxicorticosterona	DOC	4.48	4.42	330.46	331.2263	
14	Estrona	E ₁	4.59	4.54	270.37	271.1692	
15	Dehidroepiandrosterona	DHEA	4.62	4.56	288.42	289.2154	
16	Androstenediona	A ₄	4.66	4.57	288.42	287.2005	
17	Dihidroandrosterona	DHAN	4.86	4.78	292.46	293.2464	
18	Dihidrotestosterona	DHT	4.92	4.84	290.44	291.231	
20	Dihidrodeoxcoticosterona	DHDOC	5.01	4.97	332.48	333.2425	
19	Alotetradexicorticosterona	THDOC	5.04	4.95	334.50	335.2576-317.2471	
21	Dihidroprogesterona	DHP	5.11	5.04	312.45	313.2154	
22	Androstanediona	ASN	5.15	5.14	288.42	289.2159	
23	Androsterona	AN	5.30	5.21	290.44	291.2311	
24	Pregnanolona	PA	5.32	5.27	316.4	317.2471	
25	Progesterona	P ₄	5.56	5.49	314.46	315.2313	
26	Alopregnanolona	THP	6.03	5.97	318.5	319.2626	

Tabla 1. Batería completa de 26 estándares internos. Con su nombre común, su abreviatura, tiempo de retención, uv, peso molecular, peso molecular ionizado y la estructura química.

9.2.2 Cromatograma de la batería de estándares internos en UPLC/MS²

La figura 17 presenta un cromatograma general los tiempos de retención de los 26 metabolitos, el primer esteroide en aparecer en la corrida es el estriol en el minuto 2.82, de los últimos metabolitos en correr es el neuroesteroide alopregnanolona con un tiempo de retención de 5.97 minutos. El tiempo total de corrida fue de 10 minutos, tanto para estándares como en las muestras para identificar neuroesteroides; esteroides sexuales, derivados de progesterona, corticoesteroides, glucocorticoides y mineralocorticoides.

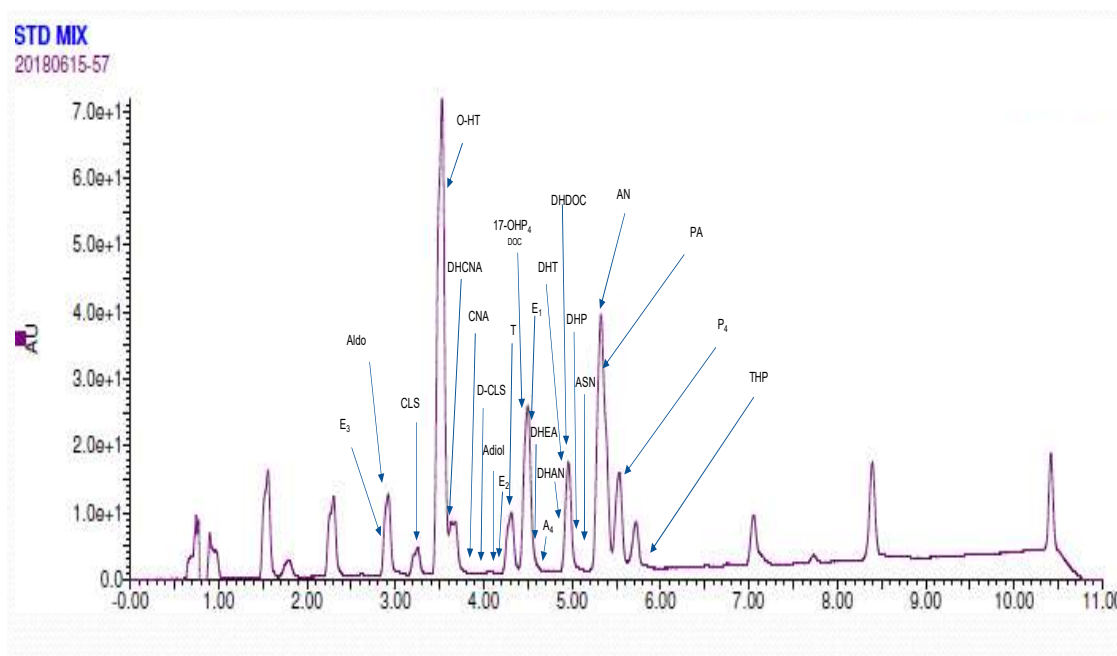
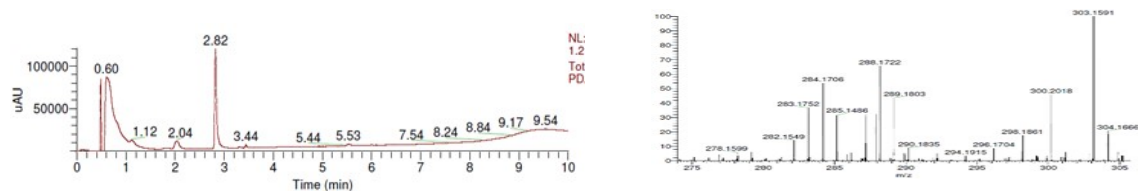


Figura 17. Cromatograma UPLC de 26 estándares internos, eje X muestra el tiempo de retención, el eje Y las unidades de absorbancia, las flechas indican el minuto de aparición de los metabolitos en una corrida de 10 minutos.

9.2.3 Cromatogramas individuales y su espectro de masas de estándares internos en UPLC/MS²

La figura 18 muestra cromatogramas y espectros de masas de metabolitos individuales, encontramos que la mayoría (24) tuvieron una buena separación, sin embargo dos de ellos; la 17-hidroxiprogesterona y la deoxicorticosterona tuvieron un mismo tiempo de retención 4.42 minutos para ambas hormonas, los tiempos de retención los observamos en los cromatogramas individuales de cada uno de los 26 estándares internos. Por otro lado, la información de la ionización y carga masa del metabolito (m/z $[M+H]^+$) se muestra en los espectros de masa, estos últimos constituyéndose como una huella única para cada molécula analizada. Tanto los tiempos de retención, como el peso molecular ionizado, representaron la herramienta para la identificación de los metabolitos en las muestras de la línea celular U87.

1.- Estriol



2.- Aldosterona

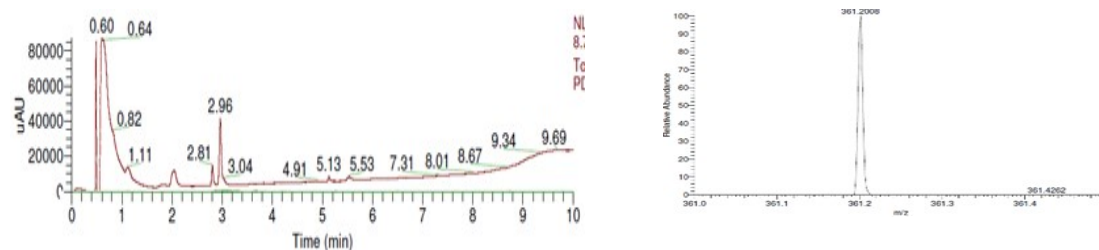
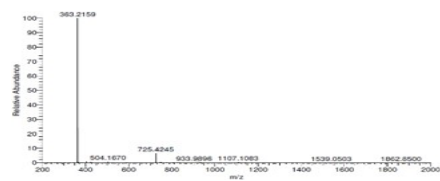
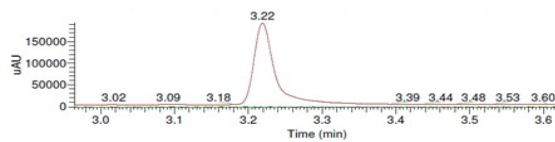
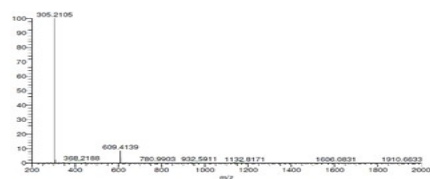
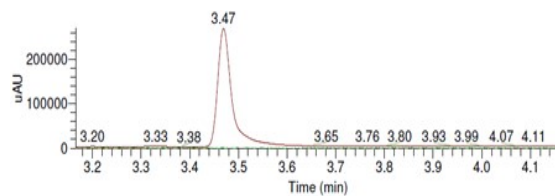


Figura 18.1. Estriol y aldosterona ordenados según su tiempo de aparición en una corrida de 10 minutos por UPLC-MS², izquierda: cromatogramas individuales analizados eje X tiempo de retención, eje Y unidades de absorbancia. Derecha espectros de masas (patrones de fragmentación) eje X abundancia relativa por HESI, eje Y ionización positiva (+) relación carga/masa (m/z).

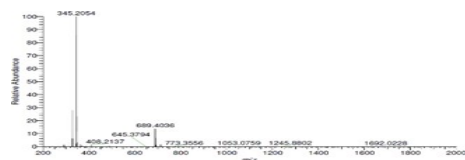
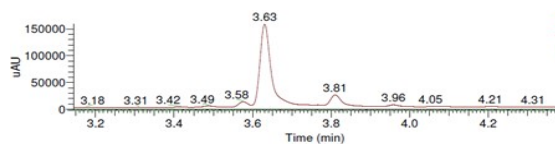
3.-Cortisol



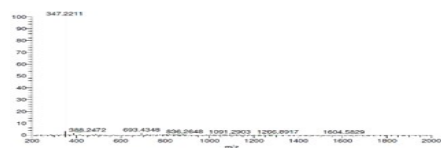
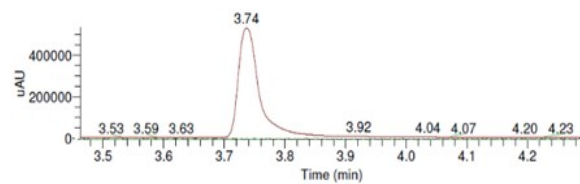
4.-Hidroxitestosterona



5.- Dihidrocorticosterona



6.- Corticosterona



7.- Deoxicortisol

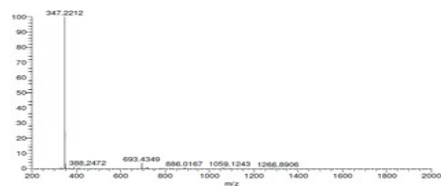
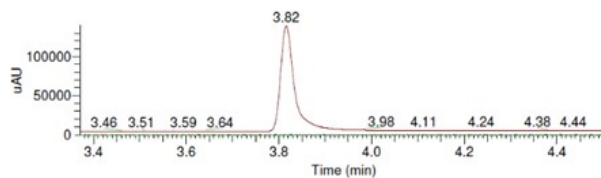
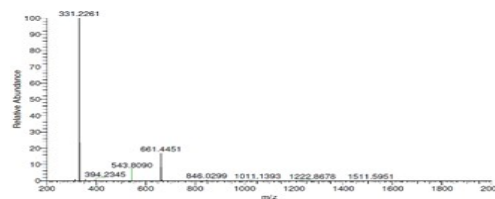
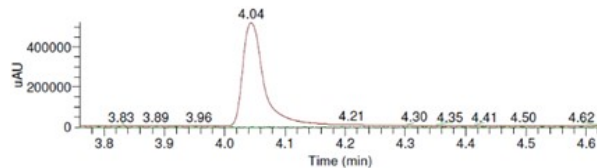
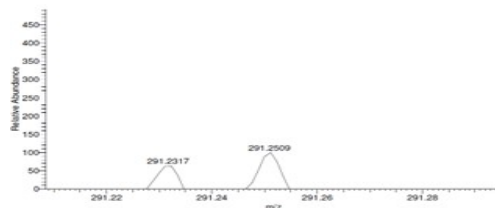
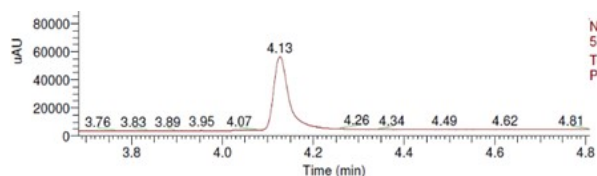


Figura 18.2. Cortisol, hidroxitestosterona, dihidrocorticosterona, corticosterona y deoxicortisol, ordenados según su tiempo de aparición en una corrida de 10 minutos por UPLC-MS², izquierda: cromatogramas individuales analizados eje X tiempo de retención, eje Y unidades de absorbancia. Derecha espectros de masas (patrones de fragmentación) eje X abundancia relativa por HESI, eje Y ionización positiva (+) Relación carga/masa (m/z).

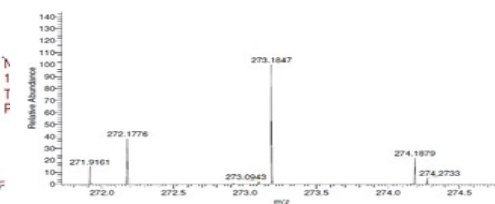
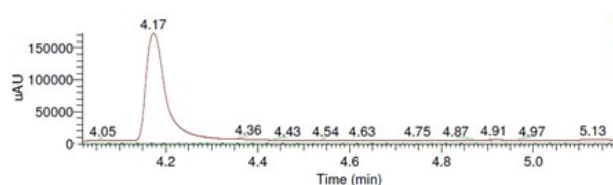
8.- Hidroxiprogesterona



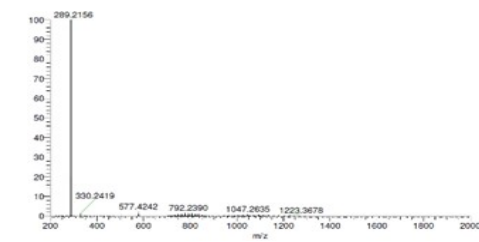
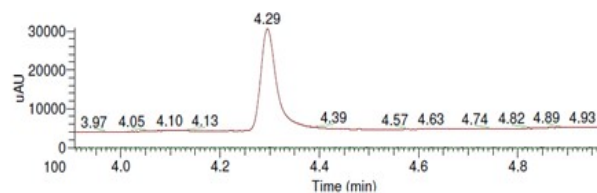
9.- Adiol



10.- Estradiol



11.- Testosterona



12.- 17-Hidroxiprogesterona

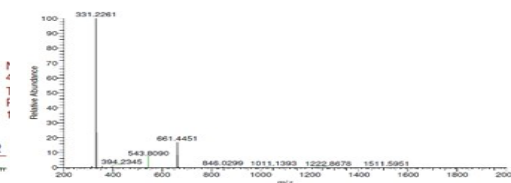
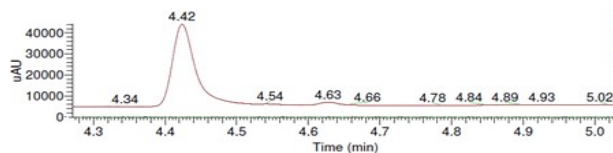
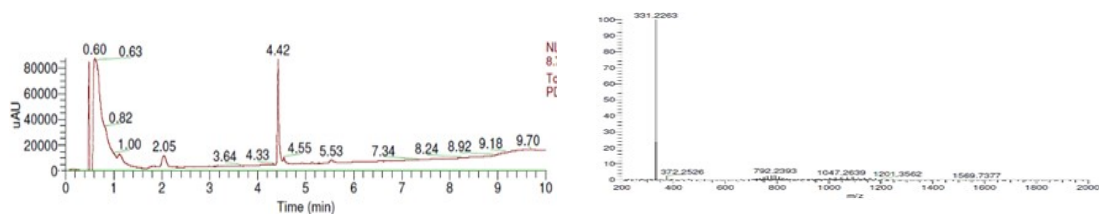
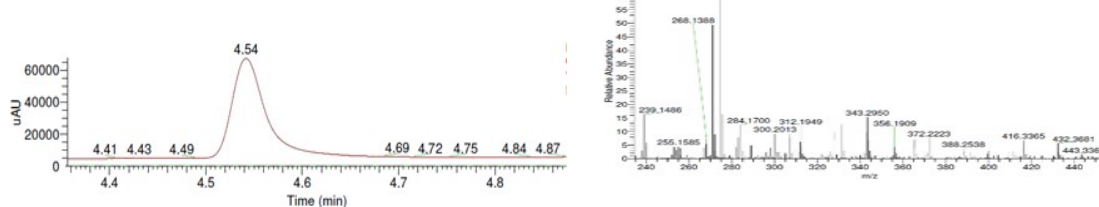


Figura 18.3. Hidroxiprogesterona, Adiol, estradiol, testosterona, 17-hidroxiprogesterona, ordenados según su tiempo de aparición en una corrida de 10 minutos por UPLC-MS², izquierda: cromatogramas individuales analizados eje X tiempo de retención, eje Y unidades de absorbancia. Derecha espectros de masas (patrones de fragmentación) eje X abundancia relativa por HESI eje Y ionización positiva (+) Relación carga/masa (m/z).

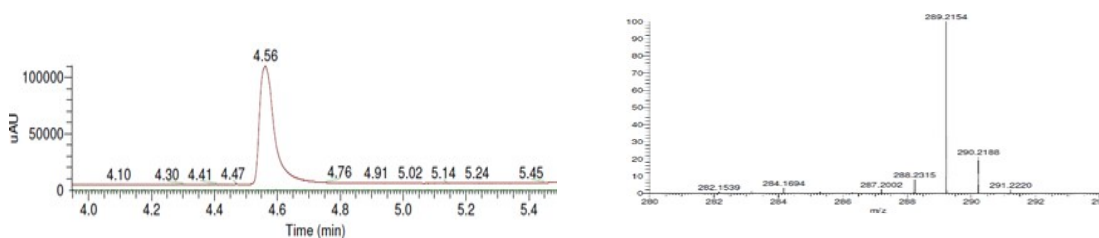
13.- Deoxicorticosterona



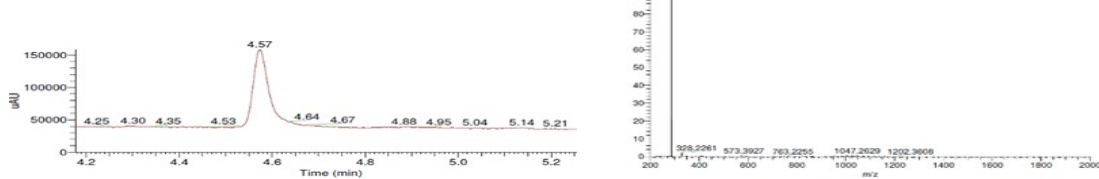
14.- Estrona



15.- DHEA



16.- Androstenediona



17.- Dihidroandrosterona

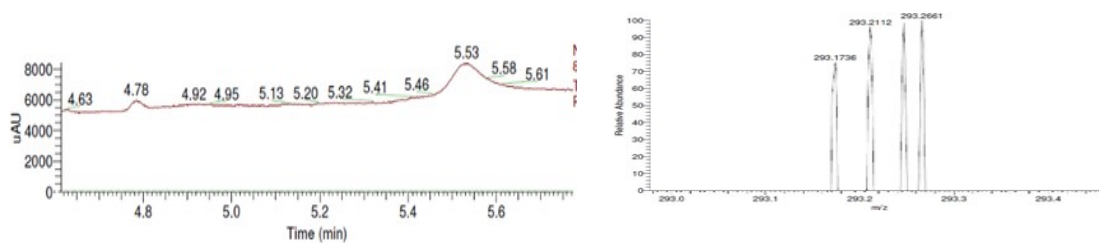
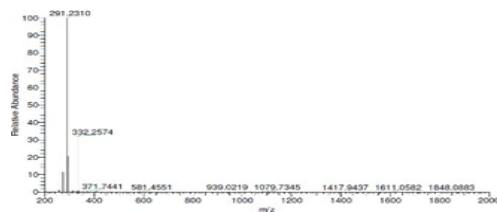
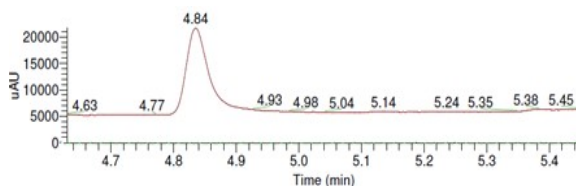
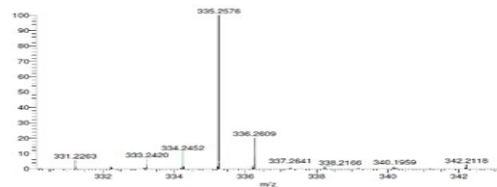
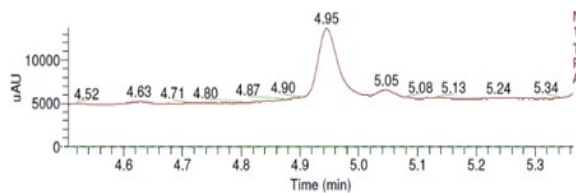


Figura 18.4. Deoxicorticosterona, estrona, DHEA, androstenediona y dihidroandrosterona, ordenados según su tiempo de aparición en una corrida de 10 minutos por UPLC-MS², izquierda: cromatogramas individuales analizados eje X tiempo de retención, eje Y unidades de absorbancia. Derecha espectros de masas (patrones de fragmentación) eje X abundancia relativa por HESI, eje Y ionización positiva (+) Relación carga/masa (m/z).

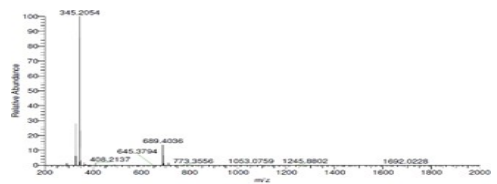
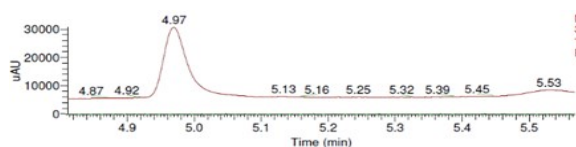
18.- Dihidrotestosterona



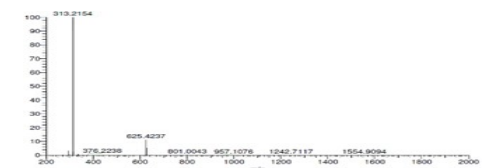
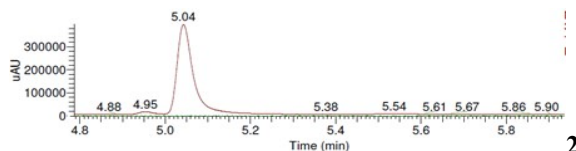
19.-THDOC



20.- DHDOC



21.- Dihidropogesterona



22.-

Androstanediona

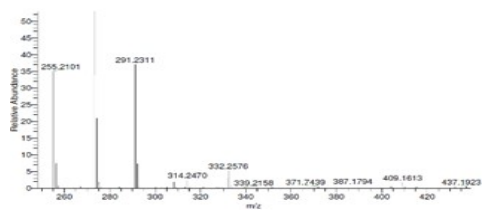
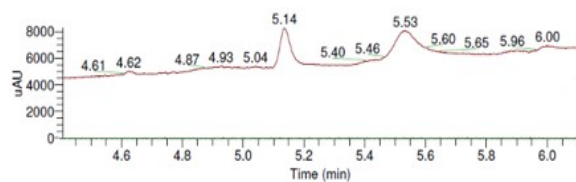
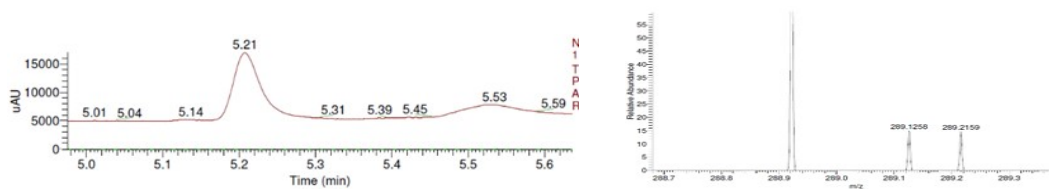
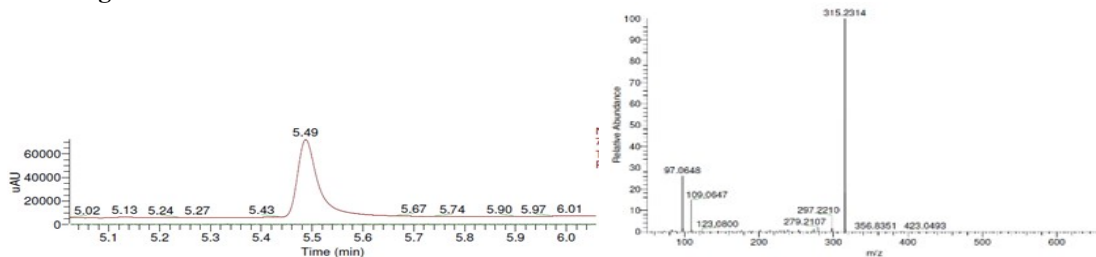


Figura 18.5. Dihidrotestosterona, THDOC, DHDOC, dihidropogesterona, androstanediona, ordenados según su tiempo de aparición en una corrida de 10 minutos por UPLC-MS², izquierda: cromatogramas individuales analizados eje X tiempo de retención, eje Y unidades de absorbancia. Derecha espectros de masas (patrones de fragmentación) eje X abundancia relativa por HESI, eje Y ionización positiva (+) Relación carga/masa (m/z).

23.- Androsterona



24.- Progesterona



25.- Alopregnanolona

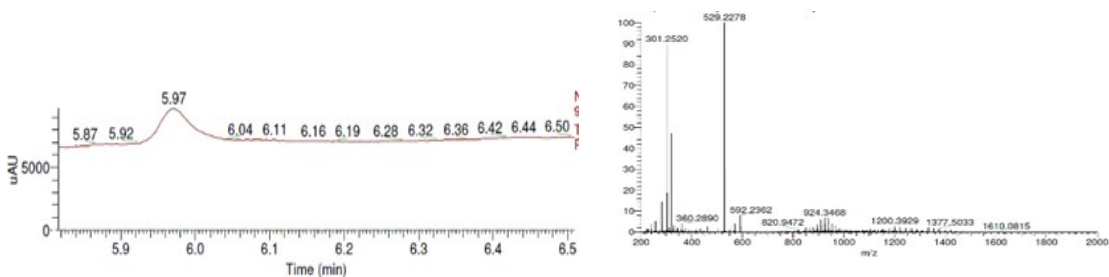


Figura 18.6. Androsterona, pregnanolona, progesterona, alopregnanolona ordenados según su tiempo de aparición en una corrida de 10 minutos por UPLC-MS², izquierda: cromatogramas individuales analizados eje X tiempo de retención, eje Y unidades de absorbancia. Derecha espectros de masas (patrones de fragmentación) eje X abundancia relativa por HESI, eje Y ionización positiva (+) Relación carga/masa (m/z).

9.2.4 Cromatograma UPLC/MS² de la síntesis de neuroesteroides de manera constitutiva (sin precursor) de la línea celular U87

La figura 19 muestra el cromatograma de síntesis de manera constitutiva de las células U87, se puede observar cómo se detectan una variedad de neuroesteroides como; andrógenos; OH-T, androsterona, productos de la vía delta 5 como DHEA y adiol, además de estrógenos, cortisol y THDOC. En los recuadros abajo del cromatograma se enlistan los metabolitos detectados.

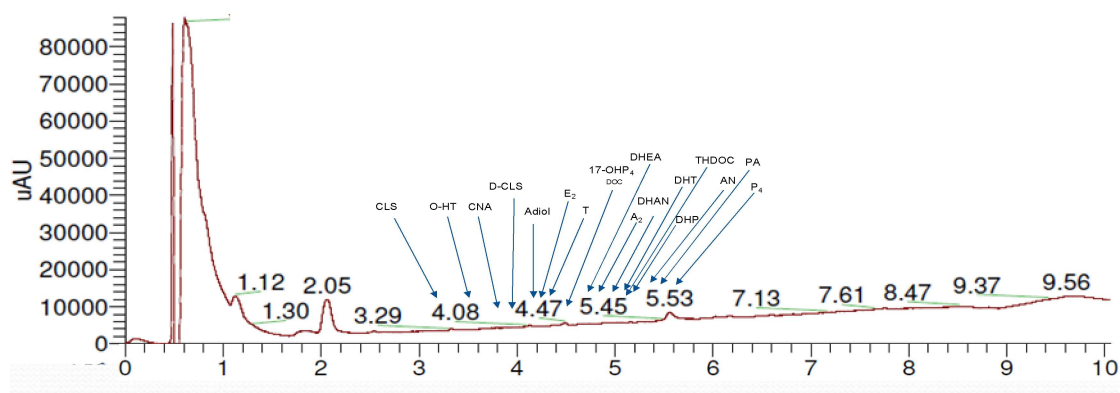


Figura 19. Cromatograma UPLC células U87 sin precursor, síntesis de manera constitutiva, eje x muestra el tiempo de retención, el eje y las unidades de absorbancia, las flechas indican el tiempo de aparición de los metabolitos en una corrida de 10 minutos.

Neuroesteroides detectados:

Esteroides sexuales

#	Nombre	Abreviatura	t/ret	UV	Peso ionizado
1	Hidroxitestosterona	OH-T	3.54	3.47	305.2111
2	Androstenediol	Adiol	4.16	4.13	291.2314
3	Estradiol	E ₂	4.25	4.17	273.1848
4	Testosterona	T	4.36	4.29	289.2162
5	Dehidroepiandrosterona	DHEA	4.59	4.56	289.2154
6	Androstenediona	A ₄	4.66	4.57	287.2005
7	Dihidroandrosterona	DHAN	4.82	4.78	293.2464
8	Dihidrotestosterona	DHT	4.86	4.84	291.231
9	Androsterona	AN	5.24	5.21	291.2311

Corticoesteroides y derivados de progesterona

#	Nombre	Abreviatura	t/ret	UV	Peso ionizado
10	Cortisol	CLS	3.25	3.22	363.2159
11	Corticosterona	CNA	3.79	3.74	347.2216
12	Deoxicortisol	D-CLS	3.87	3.82	347.2216
13	Hidroxiprogesterona	OH-P ₄	4.16	4.04	331.2261
14	17-Hidroxiprogesterona	17-OHP ₄	4.46	4.42	331.2267
15	Deoxicorticosterona	DOC	4.48	4.42	331.2263
16	Alotetra-deoxicorticosterona	THDOC	5.04	4.95	335.2576-317.2471
17	Dihidroprogesterona	DHP	5.05	5.04	313.2154
18	Pregnanolona	PA	5.32	5.27	317.2471
19	Progesterona	P ₄	5.51	5.49	315.2313

9.2.5 Cromatograma UPLC/MS² de la síntesis de neuroesteroides por la línea celular U87 con precursor androstenediona

La figura 20 muestra el cromatograma de la síntesis de neuroesteroides por las células U87, con el precursor androstenediona, se muestran la mayoría de los andrógenos como testosterona, DHT, OHT, androsterona, también estrógenos como estradiol, estrona y estriol. Además se encontró; progesterona, DHP, THDOC Y DOC. En los recuadros abajo del cromatograma se enlistan los metabolitos detectados.

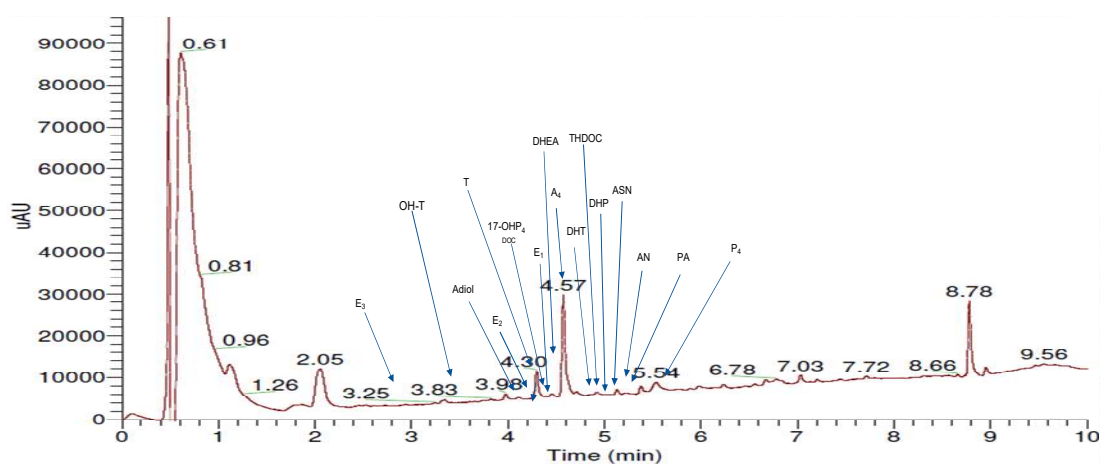


Figura 20. Cromatograma UPLC síntesis células U87 con precursor androstenediona, eje x muestra el tiempo de retención, el eje y las unidades de absorbancia, las flechas indican el tiempo de aparición de los metabolitos en una corrida de 10 minutos.

Neuroesteroides detectados:

Esteroides sexuales

#	Nombre	Abreviatura	t/ret	UV	Peso ionizado
1	Estriol	E ₃	2.91	2.82	289.1803
2	Hidroxitestosterona	OH-T	3.54	3.47	305.2111
3	Androstenediol	Adiol	4.16	4.13	291.2314
4	Estradiol	E ₂	4.22	4.17	273.1848
5	Testosterona	T	4.36	4.29	289.2162
6	Estrona	E ₁	4.59	4.54	271.1692
7	Dehidroepiandrosterona	DHEA	4.59	4.56	289.2154
8	Androstenediona	A ₄	4.66	4.57	287.2005
9	Dihidroandrosterona	DHAN	4.82	4.78	293.2464
10	Dihidrottestosterona	DHT	4.86	4.84	291.231
11	Androstanediona	ASN	5.15	5.14	289.2159
12	Androsterona	AN	5.24	5.21	291.2311

Corticoesteroides y derivados de la progesterona

#	Nombre	Abreviatura	t/ret	UV	Peso ionizado
13	17-Hidroxiprogesterona	17-OHP ₄	4.46	4.42	331.2267
14	Deoxicorticosterona	DOC	4.48	4.42	331.2263
15	Alotetraoicorticosterona	THDOC	5.04	4.95	335.2576-317.2471
16	Dihidroprogesterona	DHP	5.05	5.04	313.2154
17	Pregnanolona	PA	5.32	5.27	317.2471
18	Progesterona	P ₄	5.51	5.49	315.2313

9.2.6 Cromatograma UPLC/MS² de la síntesis de neuroesteroides por la línea celular U87 con precursor progesterona

La figura 21 muestra el cromatograma de la síntesis de neuroesteroides por las células U87, con el precursor P₄, se detectaron la mayoría de los andrógenos como testosterona, DHT, OHT, androsterona etc., también tres estrógenos. Y la mayoría de los derivados de la progesterona y corticoesteroides. En los recuadros abajo del cromatograma se enlistan los metabolitos detectados.

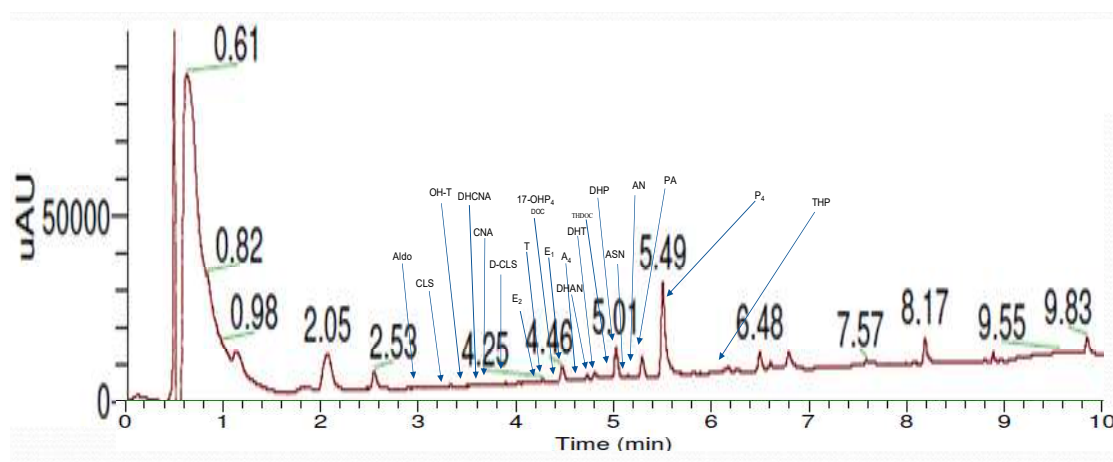


Figura 21. Cromatograma UPLC síntesis células U87 con precursor progesterona, eje x muestra el tiempo de retención, el eje y las unidades de absorbancia, las flechas indican el tiempo de aparición de los metabolitos en una corrida de 10 minutos.

Neuroesteroides detectados:

Esteroides sexuales

#	Nombre	Abreviatura	t/ret	UV	Peso ionizado
1	Estriol	E ₃	2.91	2.82	289.1803
2	Hidroxitestosterona	OH-T	3.54	3.47	305.2111
3	Estradiol	E ₂	4.22	4.17	273.1848
4	Testosterona	T	4.32	4.29	289.2162
5	Estrona	E ₁	4.59	4.54	271.1692
6	Androstenediona	A ₄	4.66	4.57	287.2005
7	Dihidroandrosterona	DHAN	4.82	4.78	293.2464
8	Dihidrotestosterona	DHT	4.86	4.84	291.231
9	Androstenediona	ASN	5.15	5.14	289.2159
10	Androsterona	AN	5.24	5.21	291.2311

Corticoesteroides y derivados de la progesterona

#	Nombre	Abreviatura	t/ret	UV	Peso ionizado
11	Aldosterona	Aldo	2.97	2.92	361.2014
12	Cortisol	CLS	3.28	3.22	363.2159
13	Corticosterona	CNA	3.79	3.74	347.2216
14	Deoxicortisol	D-CLS	3.87	3.82	347.2216
15	17-Hidroxiprogesterona	17-OHP ₄	4.46	4.42	331.2267
16	Deoxicorticosterona	DOC	4.48	4.42	331.2263
17	Dihidrodeoxicorticosterona	DHDOC	5.01	4.97	333.2425
18	Alotetra-deoxicorticosterona	THDOC	5.04	4.95	335.2576-317.2471
19	Dihidroprogesterona	DHP	5.05	5.04	313.2154
20	Pregnanolona	PA	5.32	5.27	317.2471
21	Progesterona	P ₄	5.51	5.49	315.2313
22	Alopregnanolona	THP	6.03	5.97	319.2626

Capítulo 10. Discusión

10.1 General

El presente trabajo tuvo como objetivo principal, identificar la capacidad de las líneas celulares C6 y U87 de sintetizar neuroesteroides, a partir de precursores hormonales radiomarcados. También fue de interés conocer si la línea celular U87 tenía la capacidad de síntesis de neuroesteroides sin precursores hormonales y por último, determinar el efecto de los inhibidores de la enzima 5α -reductasa, sobre la síntesis de neuroesteroides en células U87.

Se decidió utilizar los precursores hormonales a varios niveles de la ruta general de síntesis, por ejemplo, usamos colesterol para observar si estas células podían metabolizar desde el principio de la ruta de síntesis, seguimos con la progesterona para indagar la ruta de los esteroides sexuales, los corticoesteroides y derivados de la progesterona. Acortamos la vía de los esteroides sexuales con la ayuda de los precursores como, DHEA, androstenediona y testosterona. Conforme íbamos obteniendo resultados observamos los productos y la actividad de la 5α -reductasa, razón por la cual se usaron los fármacos finasterida y dutasterida.

10.2 Síntesis de esteroides sexuales por la línea celular C6 (TLC)

Cuando se incubaron las células C6 (rata) con colesterol, observamos la capacidad de estas células de metabolizar a partir del colesterol, corroborando por primera vez los pasos principales de la ruta metabólica de las hormonas esteroideas, los resultados mostraron la síntesis de la P_5 , conduciendo a la síntesis de andrógenos. Se resalta que la síntesis de adiol por estas células indicado que la vía delta 5 está activa.

Curiosamente, también encontramos la síntesis de otros derivados de andrógenos como DHAN y la androsterona productos de 3α -HSD, y otro como OH-T, sintetizado por 11β -hidroxilasa. La OH-T y la dihidrodesoxicorticosterona (DHDOC) con una importante participación en el desarrollo del cáncer de próstata (Uemura et al., 2010; Storbeck et al., 2013; Swart et al., 2013; Mostaghel et al., 2014).

Por otro lado, como era de esperar, cuando se acortó la ruta de síntesis utilizando el precursor A_4 o T, la biotransformación a DHT y OHT aumentó, sugiriendo una actividad significativa de 5α -reductasa y 11β -hidroxilasa. La síntesis del neuroesteroide androsterona por las células C6 y U87, no se había informado previamente y sugiere la actividad de la 3α -HSD. Aunque los metabolitos como DHT y estradiol se sintetizaron en porcentajes más bajos, en comparación con la testosterona o la androsterona, esto puede considerarse por la mayor afinidad que tienen estos esteroides por sus respectivos receptores. Cabe destacar que la producción de andrógenos con el precursor ^3H -DHEA encontrados en este estudio, indica que las células C6 también pueden sintetizar andrógenos por la vía esteroidogénica $\Delta 5$.

10.3 Síntesis de esteroides sexuales por la línea celular U87 (TLC)

La síntesis de neuroesteroides por las células U87 derivadas de GB es poco conocida. Descubrimos que estas células sintetizan esteroides sexuales de manera semejante a las células C6, la capacidad de la célula U87 para producir andrógenos a partir de colesterol, sugiere que tienen las enzimas P450-scc y 17α -hidroxilasa, necesarias para metabolizar dichos esteroides.

La producción de neuroesteroides como androsterona, androstenediona y androstanediona no se había investigado previamente en células C6 o U87. Estos andrógenos interactúan con el receptor de andrógenos y por lo tanto, podría tener un papel en el desarrollo de GB, como ha sucedido con la testosterona y la DHT (Rodríguez-Lozano et al., 2019, 2000).

Como se informó anteriormente, los andrógenos pueden transformarse en estrógenos en células gliales a través de la acción de la P450-aromatasa, una enzima que está presente en células U87 (Yague et al. 2004). Aquí mostramos que las células C6 pueden convertir andrógenos como A_4 en estrógenos, respaldando así los datos de Yague et al. 2004, que mostraban la expresión de esta enzima en la línea celular. También se ha demostrado que las líneas celulares de GB, de humanos T98G y U373MG expresan a la aromatasa y tiene actividad (González et al., 2010). Nuestros hallazgos en las células U87 indican que la enzima puede estar sintetizando activamente estrógenos, probablemente usando andrógenos de producción propia como precursores.

Varios estudios muestran cómo los andrógenos participan en el desarrollo del GB, usando la DHT para observar la proliferación celular (Yu et al., 2014; Rodríguez-lozano et al 2019-2020) por lo tanto; fue importante saber si los inhibidores de la 5α -reductasa utilizados para tratar el cáncer de próstata, lograrían bloquear la síntesis de andrógenos en estas células (Cabeza et al., 2016; Mostagel et al., 2013).

10.4 Inhibición de esteroides sexuales por la finasterida y la dutasterida en células U87 (TLC)

Las células U87 expresan la enzima 5α -reductasa por lo tanto se esperaba que respondieran a estos fármacos, disminuyendo la síntesis de andrógenos potentes. En efecto, la síntesis de DHT y otros derivados androgénicos producto de la 5α -reductasa disminuyeron significativamente tanto con la finasterida como con la dutasterida.

Cabe señalar que la adición de la dutasterida al medio de cultivo de las células U87, también inhibió la síntesis de AN, DHAN, el bloqueo de estas enzimas podría emplearse como tratamiento terapéutico, para controlar el desarrollo del GB. La síntesis de estradiol y de estriol también fue inhibida significativamente por la dutasterida, un hecho que podría ser explicado por trabajos anteriores, donde demostraron que la síntesis de estradiol podría ser independiente de la testosterona, utilizando los metabolitos que son productos de la 5α -reductasa (Ishikawa et al 2006).

Se ha demostrado que el estradiol participa en desarrollo del GB, tanto en proliferación celular como en procesos de infiltración (González-Arenas et al., 2011; Germán-Castelán et al 2014), Ahí el efecto inhibitorio de la dutasterida observado en las células U87, podría ser una ventaja en el tratamiento del tumor.

10.5 Síntesis de corticoesteroides por células C6 y U87 (TLC)

Este estudio muestra por primera vez que las células C6 y U87 pueden producir corticoesteroides. Los resultados son interesantes, principalmente por el conocimiento que los corticoesteroides disminuyen la respuesta inmune, por lo tanto; a través de la efecto paracrino de los corticoesteroides, las células de glioblastoma podrían estar evadiendo al sistema inmune. Los corticoesteroides se utilizan habitualmente para controlar el edema cerebral, producto de la presencia del tumor y como coadyuvante en radioterapia. Los efectos de corticoesteroides como la dexametasona, sobre el crecimiento de células de glioblastoma en los pacientes son controversiales. Al respecto, varios autores han demostrado que la administración sistémica del corticoesteroide sintético dexametasona, interfiere en el tratamiento de GB en humanos (Wong et al., 2015; Pitter 2016).

Mostramos aquí que las células C6 sintetizaron DOC y corticosterona, por lo tanto, las células de GB mantienen la capacidad de sintetizar corticoesteroides, como lo describieron Mellon et al. (1993), en las células gliales normales de rata. Estos investigadores habían demostrado que las células gliales en la rata, tienen enzimas para la síntesis de estos esteroides.

Las células C6 tienen un origen glial que se confirma por la expresión de marcadores específicos como la proteína GFP, por lo que mantendrían esa capacidad de sintetizar corticoesteroides. De igual manera, mostramos aquí por primera vez que la línea celular GB U87, también es capaz de sintetizar corticoesteroides, como lo haría la glía humana normal (Yu et al., 2002. Fig. 12B). Hemos encontrado que las células C6 no sintetizan cortisol, pero las células U87 sí, este hallazgo podría estar relacionado con el origen de la especie de las células.

Es interesante notar que encontramos que tanto las células C6 como las U87 sintetizan aldosterona. La síntesis de aldosterona se ha demostrado en cerebros de rata y humanos (Gómez-Sánchez et al., 1996; Gómez-Sánchez et al., 1996) que expresan las enzimas requeridas para la síntesis de aldosterona. Los resultados mostraron la producción de ³H-DOC, en ambas líneas celulares, la cual presenta actividad mineralocorticoide, además de poder biotransformarse a metabolitos posteriores a la DOC, que median la activación del receptor a andrógenos como se muestra en el cáncer de próstata (Uemura et al., 2010; Mostaghel, 2014).

La biotransformación de P₄ tritiada en corticosterona y aldosterona en las células C6 y U87 sugiere fuertemente la actividad de las enzimas P450 c21, P45011b, P450c11, en células derivadas de GB. Un hallazgo interesante del presente estudio es la capacidad de las células U87 para sintetizar alopregnanolona, este neuroesteroide es un potente modulador positivo del receptor GABA_A (Hosie et al., 2006; Guennoum 2015). La alopregnanolona también aumenta la expresión de genes implicados en la proliferación, protege contra la muerte celular y colabora en procesos de regeneración de células progenitoras neurales (Wang et al., 2005). Además, Zamora-Sánchez y col. (2017) han demostrado que la alopregnanolona estimula la proliferación de las células U87 promoviendo la expresión de varios genes involucrados en la proliferación celular.

La síntesis de la aldosterona encontrada en nuestro estudio también es interesante, ya que además de su papel en la hemodinámica, varios autores han informado la capacidad de este mineralocorticoide de promover la angiogénesis (Stier, 2010). Por lo tanto, la síntesis de aldosterona podría contribuir al crecimiento del tumor promoviendo indirectamente la neovascularización.

10.6 Inhibición de corticoesteroides y derivados de la progesterona por la dutasterida en células U87 (TLC)

Encontramos productos como la alotetrahidrodesoxicorticosterona, el metabolito producido a partir de la DOC por la actividad de la 5α -reductasa y la 3α -HSD. La síntesis de THDOC se redujo, de manera similar a como disminuyó el andrógeno androsterona, cuando se incubaron con dutasterida, esto sugiere la fuerte actividad de las enzimas mencionadas, en la síntesis de la línea celular de GB. La función de estos metabolitos en el cerebro aún no se comprende completamente. Estos hallazgos postulan que este inhibidor podría tener un papel en el control de GB. Por otro lado la dutasterida probablemente inhibió la actividad de otras enzimas involucradas en la síntesis de corticoesteroides, ya que la producción de aldosterona también disminuyó.

10.7 Síntesis de neuroesteroides de manera constitutiva por la línea celular U87 (UPLC/MS²)

Otro de los datos más interesantes que obtuvimos en este estudio, fue cuando incubamos células U87 sin ningún precursor, observamos que células biotransformaron neuroesteroides, tanto esteroides sexuales, como los derivados de la progesterona y corticoesteroides. Los resultados nos describen la capacidad de estas células de sintetizar neuroesteroides, a partir de su propio colesterol. También nos confirmaron lo que veníamos observando desde los resultados con TLC, en cuanto al metabolismo de los andrógenos, pues se detectó DHEA y adiol, productos de la vía 5 delta. Este dato nos ofrece una hipótesis de cómo estas células tienen vías de síntesis alternas y/o complementarias de esteroides para asegurar su abastecimiento, tal como ocurre en el cáncer de próstata, donde se abastecen de andrógenos aún bloqueando la vía preferente de andrógenos (Khera et al., 2014). Sin embargo, en lo que respecta a los corticoesteroides y derivados de progesterona, no alcanzamos a ver los productos finales de la ruta de síntesis, esto podría deberse al poco sustrato generado por la propia célula.

10.8 Síntesis de neuroesteroides por línea celular U87 con precursor A₄ o P₄ (UPLC/MS²)

Al agregar el precursor androstenediona al medio de cultivo de células U87, detectamos la síntesis de andrógenos y estrógenos que son producto de la ruta clásica, los que utilizan como sustrato a este esteroide, pero además encontramos hormonas de la ruta delta 5, como el adiol y DHEA, este evento lo habíamos encontrado pero sólo cuando el precursor fue colesterol. Además, se pudieron detectar tanto la progesterona como sus metabolitos. Es de notar que, si bien los derivados de progesterona no son los predominantes en estos resultados, no se puede soslayar que hayan sido detectados a partir de un precursor androgénico, sugiriendo que la célula utiliza una vía alterna conocida como la “puerta trasera”.

El descubrimiento de la llamada "puerta trasera" en la síntesis de esteroides (Kamrath et al., 2012), Una ruta alterna a la "clásica" sobre la síntesis de hormonas esteroides, da una perspectiva en relación con el hecho de que, desde la vía de los corticoesteroides y la de los esteroides sexuales, en especial los andrógenos, se podrían dar conversiones inversas (Pretorius et al., 2017). Esta información nos hace suponer que los productos de 5 α -reductasa, son posibles sustratos de andrógenos o estrógenos, ya sea a través de los derivados de la progesterona, o de la misma testosterona, un ejemplo de esto es la androstanediona (Ishikawa et al., 2006 et al; Kamrath et al., 2012). La línea celular U87 sintetiza metabolitos derivados de la actividad de la actividad 5 α -reductasa a partir de A₄, por ejemplo, primero se convierte en androstanediona y luego a androsterona por la actividad de 3 α -HSD. Este particular neuroesteroide la androsterona parece tener un papel importante en los procesos de estrés (Servatius et al., 2016).

Cuando el precursor fue progesterona, interesantemente detectamos esteroides sexuales pero sólo de la vía delta 4, la vía preferente de los andrógenos más potentes (Khera et al., 2014). Encontramos la mayoría de corticoesteroides y de los productos finales de la ruta de síntesis de derivados de la progesterona, tales como la alopregnanolona y la THDOC, neuroesteroides importantes en el desarrollo de tumores (Zamora-Sánchez et al., 2017; Uemura et al., 2010).

Capítulo 11. Conclusión

Este estudio muestra la amplia capacidad de líneas celulares C6 y U87 para sintetizar neuroesteroides; esteroides sexuales, corticoesteroides y derivados de progesterona con precursores tritiados para su detección, con una abundancia de andrógenos. Las células U87 pueden sintetizar neuroesteroides sin la necesidad de agregar un precursor esteroideo. Se evidenció la eficacia de los inhibidores de la 5α -reductasa finasterida y dutasterida para reducir significativamente la síntesis de metabolitos androgénicos y estrógenos, en la línea celular U87. Además, la dutasterida bloqueó la acción 5α -reductasa sobre la vía de los corticoesteroides y derivados de progesterona. En las vías de síntesis de andrógenos, corticoesteroides y derivados de progesterona la inhibición producida por la dutasterida afectó la síntesis de los metabolitos, dejando a la enzima 3α -HSD sin sustrato, lo cual redujo la síntesis de sus productos. Estos metabolitos pueden jugar un papel importante en el mantenimiento y la progresión de tumores, ya sea en su proliferación, diferenciación o en los procesos angiogénicos que acompañan a la mayoría de los tumores. Por lo tanto, el uso de estos inhibidores puede ser una herramienta potencial para controlar las importantes vías metabólicas, que utilizan las células derivadas de glioblastoma y privarlas así de hormonas importantes para su proliferación.

Referencias bibliográficas

1. Ahmed AU, Auffinger B, Lesniak MS. Understanding glioma stem cells: rationale, clinicalrelevance and therapeutic strategies. *Expert Rev Neurother.* 2013, 13(5):545-55.
2. Arlt W, Stewart PM. Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism, and action. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005, 34(2):293-313.
3. Azzouni F, Godoy A, Li Y, Mohler J. The 5 alpha-reductase isozymefamily: a review of basic biology and their role in human diseases. *AdvUrol.* 2012, 2012 530121.
4. Barrett KM, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. *Ganong Fisiología Médica.* 23^a ed. 2010, MéxicoMcGraw–Hill.
5. Baulieu EE. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology.* 1998, 23 963-987.
6. Cabeza M, Sánchez-Márquez A, Garrido M, Silva A, Bratoeff E. Recent Advances in Drug Design and Drug Discovery for Androgen- Dependent Diseases. *CurrMedChem.* 2016, 23 792-815
7. Callachan, H., Cottrell, G.A., Hather, N.Y., Lambert, J.J., Nooney, J.M. and Peters, J.A. Modulation of the GABAA receptor by progesterone metabolites.*Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1987, 231, 359–369
8. Chang Liu, Yanlei Zhang, Kaiyuan Zhang, Chen Bian, Yangang Zhao, Jiqiang Zhang. Expression of estrogen receptors, androgen receptor and steroid receptor coactivator-3 is negatively correlated to the differentiation of astrocytic tumors. *CancerEpidemiology.* 2014, 38 291-297.
9. Chittajallu R, Chen Y, Wang H Yuan X, Ghiani CA, Heckman T, McBain CJ, Gallo V. Regulation of Kv1 sub unit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G1/S phase progression of the cell cycle. *ProcNatl Acad.* 2002, 99, 2350-2355.

10. Daga A, Bottino C, Castriconi R, Gangemi R and Ferrini S: New perspectives in glioma immunotherapy. *CurrPharm Des.*2017, 2439-2467.
11. Do Rego JL, Seong JY, Burel D, Leprince J, Luu-The V, Tsutsui K, Tonon MC, Pelletier G, Vaudry H. Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol.* 2009, 30 259-301.
12. Dueñas Jiménez JM, Candanedo Arellano A, Santerre A, Orozco Suárez S, Sandoval Sánchez H, Feria Romero I, López-Elizalde R, Alonso Venegas M, Netel B, et al. Aromatase and estrogen receptor alpha mRNA expression as prognostic biomarkers in patients with astrocytomas. *Cancer Epidemiology.* 2014, 38 291 297.
13. Fields, B. Stevens .New insights into neuron-glia communication. *Science.* 2002, 298, 556-562
14. Füllhase C, Schneider MP.5-Alpha-Reductase Inhibitors and CombinationTherapy.*Urol Clin North Am.* 2016, 43(3):325-36.
15. Gandhari MK, Frazier CR, Hartenstein JS, Cloix JF, Bernier M, Wainer IW. Identification and characterization of estrogen receptor-related receptor alpha and gamma in human glioma and astrocytoma cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2010, 315 314-318.
16. Germán-Castelán L, Manjarrez-Marmolejo J, González-Arenas A, González-Morán MG, Camacho-Arroyo I. Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat. *Biomed Res Int.* 2014, 2014 393174.
17. Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Cozza EN, Morita H, Eddleman FC, Gomez-Sanchez EP. Corticosteroid synthesis in the central nervous system, *Endocr. Res.* 1996, 22 463–470.

18. Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Cozza EN, Morita H, Foecking MF, Gomez-Sanchez EP. Aldosterone biosynthesis in the rat brain, *Endocrinology*. 1997, 138 3369–3373
19. Gomez-Sanchez EP, Ahmad N, Romero DG, Gomez-Sanchez CE. Is aldosterone synthesized within the rat brain? *Am J PhysiolEndocrinolMetab*. 2005, 288 E342-E346.
20. González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C, Alvarez-García V, Sánchez-Barceló EJ, Cos S. Inhibitory effects of melatonin on sulfatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and expression in glioma cells. *Oncol. Rep*. 2010, 23 1173–1178
21. González-Agüero G, Ondarza R, Gamboa-Dominguez A, Cerbon MA, Camacho-Arroyo I. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull*. 2001, 56 43-48.
22. González-Arenas A, Hansberg-Pastor V, Hernández-Hernández OT, González-García TK, Henderson-Villalpando J, Lemus-Hernández D, Cruz-Barrios A, Rivas-Suárez M, Camacho-Arroyo I. Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ER α activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators. *BiochimBiophys Acta*. 2012, 1823 379-386.
23. Guenoum R, Labombarda F, Gonzalez Deniselle MC, Liere P, De Nicola AF, Scumacher R. Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: response to injury and implication for neuroprotection, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2015, 146 48–61.
24. Hirshburg JM, Kelsey PA, Therrien CA, Gavino AC, Reichenberg JS. Adverse Effects and Safety of 5-alpha Reductase Inhibitors (Finasteride, Dutasteride): A Systematic Review. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2016, 9(7):56-62.
25. Hosie AM, Wilkins ME, Da Silva HM, Smart TG. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites, *Nature*. 2006, 444 486–489.

26. Huang Z, Cheng L, Guryanova OA, Wu Q, Bao S. Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein Cell*. 2010, 38-55.
27. Huang Z, Cheng L, Guryanova OA, Wu Q, Bao S. Cancer stem cells in glioblastoma--molecularsignaling and therapeutic targeting. *Protein Cell*. 2010, 7:638-55.
28. Ishikawa T, Glidewell-Kenney C, Jameson JL. Aromatase-independent testosterone conversion into estrogenic steroids is inhibited by a 5 alpha-reductase inhibitor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2006, 98 133–138.
29. Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 19 (2010) 2421–2427
30. Kamrath C, Hochberg Z, Hartmann MF, Remer T, Wudy SA. Increased activation of the alternative "backdoor" pathway in patients with 21-hydroxylase deficiency: evidence from urinary steroid hormone analysis. *J Clin EndocrinolMetab*. 2012, 97 E3 67-75.
31. Kenny B, Ballard S, Blagg J, Fox D. Pharmacological options in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *J MedChem*. 1997, 25;40(9):1293-315.
32. Khera M, Crawford D, Morales A, Salonia A, Morgentaler A. A new era of testosterone and prostate cancer: from physiology to clinical implications. *Eur Urol*. 2014. 115-123
33. Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol*. 2001, 22 (3):185-212.
34. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007, 114 97-109.

35. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, vonDeimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016, 131 803-820.
36. Martin-Segura E, Dabra S, Pallarés M. Involvement of neurosteroids in normal and pathological behaviour. *Rev Neurol.* 2007, 44:661-676
37. McInnes KJ, Kenyon CJ, Chapman KE, Livingstone DE, Macdonald LJ, Walker BR, Andrew R. 5alpha-reduced glucocorticoids, novel endogenous activators of the glucocorticoid receptor. *J BiolChem.* 2004, 28;279(22):22908-12.
38. McKinley BP, Michalek AM, Fenstermaker RA, Plunkett RJ. The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York State from 1976 to 1995. *J Neurosurg.* 2000 93 932-939.
39. Mellon, SH, Deschepper, C.F. Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain Res.* 1993, 629 283-292.
40. Mellon SH, Vaudry H. Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis. *Int Rev Neurobiol.* 2001, 46:33-78.
41. Miller WL. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *BiochimBiophys Acta.* 2007, 1771(6):663-76.
42. Mostaghel EA. Beyond T and DHT – novel steroid derivatives capable of wild type androgen receptor activation, *Int. J. Biol. Sci.* 10 2014, 602–613.
43. Mostaghel EA. Steroid hormones synthetic pathways in prostate cancer, *Trans. Androl. Urol.* 2 2013, 212–227.

44. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *euro Oncol.* 2014, 896-913.
45. Papadopoulos V, Guarneri P, Kreuger KE, Guidotti A, Costa E. Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992, 89 5113-5117.
46. Pinacho-García LM, Valdéz RA, Navarrete A, Cabeza M, Segovia J, Romano MC. The effect of finasteride and dutasteride on the synthesis of neurosteroids by glioblastoma cells. *Steroids.* 2020, 155:108556.
47. Pitter KL, Tamagno I, Alikhanyan K, Hosni-Ahmed A, Pattwell SS, Donnola S, Dai C., et al. Corticosteroids compromise survival in glioblastoma, *Brain.* 2016, 139 1458–1471.
48. Pretorius E, Arlt W, Storbeck KH. A new dawn for androgens: novel lessons from 11-oxygenated C19 steroids, *Mol. Cell. Endocrinol. Rev.* 2017, 441 76–85.
49. R.J. Servatius, C.E. Marx, S. Sinha, P. Avcu, J.D. Kilts, J.C. Naylor, K.C. Pang, Brain and serum androsterone is elevated in response to stress in rats with mild traumatic brain injury, *Front. Neurosci.* 2016, 26 379.
50. Raghava N, Das BC, Ray SK. Neuroprotective effects of estrogen in CNS injuries: insights from animal models. *Neurosci Neuroecon.* 2017, 6:15-29.
51. Rasmusson AM, Marx CE, Pineles SL, Locci A, Scioli-Salter ER, Nillni YI, Liang JJ, Pinna G. Neuroactive steroids and PTSD treatment. *NeurosciLett.* 2017, 649 156-163.
52. Ricard D, Idhahane A, Ducray F, Lahutte M, Hoang-Xuan K, Delattre, JY. Primary brain tumours in adults. *Lancet.* 2012, 26-37.

53. Robel P, Baulieu EE. Neurosteroids: biosynthesis and function. *Trends. EndocrinolMetab.* 1994, 5 1-8.
54. Rodríguez-Lozano DC, Piña-Medina AG, Hansberg-Pastor V, Bello-Alvarez C, Camacho-Arroyo I. Testosterone Promotes Glioblastoma Cell Proliferation, Migration, and Invasion Through Androgen Receptor Activation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019, 4;10-16.
55. Rodríguez-Lozano DC, Velázquez-Vázquez DE, Del Moral-Morales A, Camacho-Arroyo I. Dihydrotestosterone Induces Proliferation, Migration, and Invasion of Human Glioblastoma Cell Lines. *Onco Targets Ther.* 2020, 13:8813-8823.
56. Rosell DR, Siever LJ. The neuro biology of aggression and violence. *CNS Spectr.* 2015, 20(3):254-79.
57. Sanderson, T. The Steroid Biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol. Sci.* 2006, 94, 3-21.
58. Schüle C, Nothdurfter C, Rupprecht R. The role of allopregnanolone in depression and anxiety. *ProgNeurobiol.* 2014, 113:79-87.
59. Secretaria de Salud. Dirección General de Epidemiología Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. 2011.
60. Stier CT. Aldosterone and angiogenesis, *Am. J. Hypertens.* 2010, 23 940.
61. Storbeck KH, Bloem LM, Africander D, Schloms L, Swart P, Swart AC. 11beta-Hydroxydihydrotestosterone and 11-ketodihydrotestosterone, novel C19 steroids with androgenic activity: a putative role in castration resistant prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2013, 377 135-146.
62. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014, 23 1985-1996.

63. Tian M, Ma W, Chen Y, Yu Y, Zhu D, Shi J, Zhang Y. Impact of gender on the survival of patients with glioblastoma. *Biosci Rep.* 2018, 7-38.
64. Tortora GJ and Derrickson. *Principios de anatomía y fisiología.* Editorial Panamericana. 2013.
65. Uemura M, Honma S, Chung S, Takata R, Furihata M, Nishimura K, Nonomura N, Nasu Y, Miki T, Shuin T, Fujioka T, Okuyama A, Nakamura Y, Nakagawa H. 5alphaDH-DOC (5alpha-dihydro-deoxycorticosterone) activates androgen receptor in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Sci.* 2010, 1897–1904.
66. Valdez RA, Hinojosa L, Gómez Y, Willms K, Romano MC. *Taenia crassiceps* WFU cysticerci synthesize corticosteroids in vitro: metyrapone regulates the production, *Gen. Comp. Endocrinol.* 2012, 176 409–414.
67. Wang M, Johnston PB, Ball BG, Brinton RD. The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell cycle gene and protein expression, *J. Neurosci.* 2005, 25 4706–4718.
68. Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM, Nishikawa R, Rosenthal M, Wen PY, Stupp R, Reifenberger G. Glioma. *Nat Rev Dis Primers.* 2015, 16,1:15017.
69. Wong ET, Lok E, Gautam S, Swanson K.D. Dexamethasone exerts profound immunologic interference on treatment efficacy for recurrent glioblastoma, *Br. J. Cancer.* 2015, 113 232–241.
70. Yague JG, Lavaque E, Carretero J, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Aromatase, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis, is expressed by human and rat glioblastomas. *Neurosci Lett.* 2004, 368 279-284.

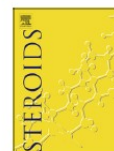
71. Yamana K, Labrie F, Luu-The V. Human type 3 5 α -reductase is expressed in peripheral tissues at higher levels than types 1 and 2 and its activity is potently inhibited by finasteride and dutasteride. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2010, 1;2(3):293.
72. Yin Y, Zhang X, Li Z, Deng L, Jiao G, Zhang B, Xie P, Mu H, Qiao W, Zou J. Glucocorticoid receptor β regulates injury-mediated astrocyte activation and contributes to glioma pathogenesis via modulation of β -catenin/TCF transcriptional activity. *NeurobiolDis.* 2013, 59 165-176.
73. Yu L, Romero DG, Gómez-Sánchez CE, Gómez-Sánchez EP. Steroidogenic enzyme gene expression in the human brain. *Mol Cell Endocrinol.* 2002, 190 9-17.
74. Yu X, Jiang Y, Wei W, Cong P, Ding Y, Xiang L, Wu K. Androgen receptor signaling regulates growth of glioblastoma multiforme in men. *Tumour Biol.* 2014, 36 967-972.
75. Zamora-Sánchez CJ, Hansberg-Pastor V, Salido-Guadarrama I, Rodríguez-Dorantes M, Camacho-Arroyo I. Allopregnanolone promotes proliferation and differential gene expression in human glioblastoma cells. *Steroids.* 2017, 119 36-42.
76. Zwain, I.H.; Yen, S.S. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology.* 1999 140 3843- 3852.



Contents lists available at ScienceDirect

Steroids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/steroids



The effect of finasteride and dutasteride on the synthesis of neurosteroids by glioblastoma cells



Pinacho-García Luis Manuel^a, Valdez Ricardo A.^a, Navarrete Araceli^a, Cabeza Marisa^b, José Segovia^a, Romano Marta C.^{a,*}

^a Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Avenida IPN # 2508, Ciudad de México 07360, México
^b Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Ciudad de México, México

ARTICLE INFO

Keywords:
 Glioblastoma
 Steroids synthesis
 Finasteride
 Dutasteride

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive local brain tumor and effective treatments are lacking. Many studies have proposed an important participation of steroid hormones in the development of gliomas. Evidence was provided by statistics analysis where the incidence in adult population is 50% higher in men than in women. Female patients have a better prognosis for survival compared to male patients with GBM. Also, the expression of receptors to estrogen, progesterone and androgens in glioma cell lines and tumor biopsies, and glucocorticoid receptors in GBM cell lines had been reported. Here we have investigated the effect of the pharmacological inhibition of 5- α reductases on the capacity of GBM derived cell lines C6 (rat) and U87 (human) to synthesize neurosteroids. As the knowledge of the pathways used to synthesize neurosteroids by GBM derived cells was incomplete, we have investigated the synthesis of these steroids by C6 and U87 cells using tritiated precursors and thin layer chromatography (TLC). Increasing concentrations of finasteride and dutasteride were added to U87 culture media that was collected after 24 and 48 h. The results of the study showed that C6 cells incubated with ³H-cholesterol yielded dihydroandrosterone, hydroxytestosterone, androstenediol, androstenedione and estriol, while U87 cells also synthesized progesterone, androstenedione. Incubation with ³H-androstenedione or ³H-testosterone mainly yielded dihydrotestosterone, androsterone, dihydroandrosterone, hydroxytestosterone, and estradiol in both lines. To note, we showed here for the first time that U87 cells synthesize corticosteroids. Addition of finasteride or dutasteride to U87 cells reduced androgen and estrogen synthesis. Dutasteride also decreased the synthesis of dihydrocorticosterone and alltetrahydrodesoxycorticosterone while deoxycorticosterone was accumulated. In summary, both GBM cell lines synthesize numerous neurosteroids, including 5- α reductase products and 3 α -HSD pathways that were inhibited by finasteride and dutasteride. These inhibitors may be considered as tools to control neurosteroid synthesis of potential relevance for GBM survival.

1. Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive local brain tumor. The World Health Organization (WHO) classified GBM grade IV based on morphological criteria that determine the cell lineage [1], based on molecular features: isocitrate dehydrogenase wild type (IDH about 90% of cases), that corresponds frequently with the clinically defined primary or *de novo* glioblastoma, and predominates in patients over 55 years of age; GBM IDH-mutant (about 10% of cases), corresponds to so called secondary glioblastoma with a history of prior lower grade diffuse glioma and preferentially arises in younger [2]. The treatments for those types of neoplasms consist in surgery for tumor ablation,

radiotherapy and chemotherapy, mainly with temozolamide (TMZ). Unfortunately, the prognosis of patient survival is unfavorable because of frequent recurrences.

Many studies have proposed an important participation of steroid hormones in the development of gliomas [3]. A first evidence was provided by statistics analysis from the United States of America, where the incidence in adult population is 50% higher in men than in women [4,5]. Female patients have a better prognosis for survival compared to male patients with GBM, but this prognosis is reduced in women after menopause [6]. Likewise, the expression of receptors to estrogen, progesterone and androgens in glioma cell lines and tumor biopsies, and glucocorticoid receptors in GBM cell lines had been reported [7–10].

* Corresponding author.

E-mail address: mromano@fisio.cinvestav.mx (M.C. Romano).

<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108556>

Received 21 September 2019; Accepted 8 December 2019

Available online 20 December 2019

0039-128X/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

It has been shown that the central nervous system (CNS) expresses most of the synthesizing enzymes or modifiers of steroids; the presence of most enzymes involved in the steroid synthesis has been documented in the rat brain and in regions of the human brain [11–13]. The enzymatic pathways involved in neurosteroids synthesis and regulation have been extensively studied [14]. Besides sex steroid synthesis, the rat brain cells can produce glucocorticoids and mineralocorticoids, as corticosterone, 11-dehydrocorticosterone and aldosterone [15,16]. Oligodendrocytes, astrocytes and neurons present steroidogenic capacity, but it is important to emphasize that the neurons and glial cells have a different expression and activity of these enzymes [17].

Baulieu [18] was a pioneer in describing the CNS as a steroidogenic tissue; he showed that steroids such as pregnenolone (P_5) and DHEA and their sulfated forms (P_5S and DHEAS), were found in higher concentrations in the brain than in the peripheral circulation of rodents [19]. The final products of steroidogenesis in each tissue depend on the existence of enzymes that synthesize them as P450-cytochromes, steroid dehydrogenases and reductases [20]. The steroids synthesized in the brain are called neurosteroids, and active neurosteroids if they have activity in the neural tissue [18]. Neurosteroids modulate the inhibition of neuronal apoptosis and neurogenesis [21].

To the best of our knowledge there is not much information on the capacity of glioblastoma cell lines to synthesize steroid hormones. A paper related to this issue showed pregnenolone synthesis from (22R)-22-hydroxycholesterol in C6 cell mitochondria by a mechanism blocked by aminoglutethimide [22]. The same authors confirmed the presence of cytochrome P-450 cholesterol side-chain-cleavage enzyme by immunoblotting in C6 cell mitochondria. Interestingly, Melcangi et al. [23] had reported that suspensions of rat glioma C6 cells and 1321 N1 human astrocytoma derived cells converted testosterone and progesterone into their corresponding 5 α -reduced DHT and DHP. However, to the best of our knowledge there is not information on the capacity of GBM cells to synthesize corticosteroids.

In GBM cell lines and tumor biopsies, the expression of the steroidogenic enzyme P450-aromatase (P450arom) also supports the possible participation of steroid hormones in this pathology [24,25]. The participation of steroidogenic hormones in GBM cell proliferation has been published. For example, an *in vitro* study showed that estradiol increased the number of tumor cells by means of the estrogen receptor [26]. On the other hand, Germán-Castelán et al. [27] described how progesterone induced cell proliferation and infiltration in rats implanted with GBM cells. Astrocytes express estrogen receptors and these hormones affect glial proliferation, and the production of neurotrophic factors by these cells [28]. Another study showed that the activation of the U87 cells androgen receptor (AR) by the ligand with the highest affinity for this receptor, dihydrotestosterone (DHT), decreased the signaling of the transforming growth factor β (TGF β) receptor that consequently caused inhibition of the growth of the tumor and an increment in apoptosis [29].

We like to call the attention on a particular enzyme, 5 α -reductase, with its three isoforms, I, II and III, which have the capacity to reduce androgens, progestagens, corticoids and mineralocorticoids [30–32], that together with 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD) take part of a relevant steroid pathway [33] (Fig. 1). This enzyme is widely expressed in the prostate, therefore its blockage continues being used to treat benign hyperplasia and prostatic cancer. Finasteride and dutasteride have affinity for 5 α -reductases; finasteride prefers type II, has a pK_i value of 6.44 for type I and 7.16 for type II and was the first one approved to treat prostatic hyperplasia by the US Food and Drug Administration (FDA). Dutasteride is a dual inhibitor; that has a pK_i of 8.22 for type I and 8.15 for type II α -reductase isozymes [34] and was also approved to treat prostatic hyperplasia, thereafter it is more potent than finasteride to inhibit α -reductase isozymes [35]. To this regard, 5 α -reductase isoforms, are also expressed in the brain, and are inhibited *in vitro* by both finasteride and dutasteride [36,37,32]. Interestingly, GBM cells express I and II 5 α -reductase isoforms [38], therefore it

would be important to investigate if these drugs can inhibit the androgen synthesis by this particular cells.

Having in mind the higher incidence of GBM in men (2:1, men vs women) we decided to investigate the steroid pathways used by GBM derived cells from rat C6 and human U87 to synthesize neurosteroids including androgen, estrogens and corticosteroids, a knowledge that allowed us to investigate the possibility of blocking that synthesis with enzyme inhibitors as finasteride and dutasteride.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Glioblastoma derived cells C6 (rat) or U87 (human) purchased from American Cell Culture Collection, ATCC, were seeded at 5×10^4 in 24 wells microplates and cultured in DMEM/F12 or DMEM high glucose respectively (GIBCO BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL), 2 mM glutamine (Sigma), and 100 units- μ g penicillin-streptomycin (GIBCO BRL), and maintained at 37 °C in 95% air, 5% CO₂ until reached a 70% confluence. For the experiments, complete medium was removed and the cells were washed with phosphate-buffered-saline solution, pH 7.2 (PBS). Thereafter, media without FBS was added and the cells cultured for different periods in the presence of 0.1 to 0.2 μ Ci, 1.8 nM/ml ³H-Progesterone (1, 2, 6, 7-³H progesterone 93.0 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech), or ³H-Cholesterol (1, 2-³H Cholesterol 47.9 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) or ³H-androstenedione (1, 2, 6, 7-³H androstenedione, 84.2 Ci/mmol, Perkin Elmer, Boston, MA, USA), or ³H-dehydroepiandrosterone (1, 2, 6, 7-³H DHEA, 94.5 Ci/mmol, New Products, MS, Dupont Boston, MA, USA) or ³H-Testosterone (1, 2, 6, 7-³H-Testosterone 95.1 Ci/mmol). Cell line U87 were cultured in the presence of different concentrations 0.5, 1 and 5 μ M of finasteride or dutasteride (Sigma Aldrich) dissolved in medium plus DMSO, or only the vehicles. Blanks containing the culture media plus the tritiated precursors were simultaneously incubated. At the end of the experiments, culture media were recovered, mixed with 5 ml of ethyl ether anhydrous and immediately frozen. The organic phase was transferred to new vials and evaporated to dryness. The samples were reconstituted in 60 μ l of absolute ethanol and analyzed by thin layer chromatography (TLC).

2.2. Thin layer chromatography

Thin layer chromatography (TLC) was carried out using Silica gel 60 F254 pre-coated sheet plates (Merck, Darmstadt, Germany) as described previously [39,40]. Aliquots of 20 μ l of the ethanolic samples were supplemented with authentic standard steroids: 5-pregnen-3 β -ol-20-one: pregnenolone (P_5), 5-pregnen-3 β , 17-diol-20-one: 17-hydroxypregnenolone (17-OHP₅), 4-pregnen-3, 20-dione: progesterone (P_4), 4-pregnen-17-ol-3, 20-dione: 17 α -hydroxypregesterone (17-OHP₄), 4-pregnen-17, 21-diol-3, 20-dione: 11-deoxycortisol (S), 4-pregnen-21-ol-3, 20-dione: deoxycorticosterone (DOC), 4-pregnen-11 β , 17, 21-triol-3, 20-dione: cortisol, 4-pregnen-11 β , 21-diol-3, 20-dione: corticosterone (B), 5-androsten-3 β -ol-17-one (DHEA), 5-androsten-3 β , 17 β -diol: androstenediol (Adiol), 4-androsten-3, 17-dione: androstenedione (A_4), 4-androsten-17 β -ol-3-one: testosterone (T), 4-androsten-11 β , 17 β -diol-3-one: hydroxytestosterone (OHT) 1, 3, 5(10)-estratrien-3, 16 α , 17 β -triol: estradiol (E_2), androstenedione (ASN), 1, 3, 5(10)-estratrien-3-ol-17-on, estrone (E_1), 5 α -androstan-3 α -ol-17-one: androsterone (AN), 5 α -androstan-3 α , 17 β -diol: dihydroandrosterone (DHAN), 5 α -androstan-3, 17-dione: androstenedione (ASN), 5 α -pregnan-11 β , 21-diol-3, 20-dione: dihydrocorticosterone (DHB), 4-pregnen-11 β , 21-diol-3, 18, 20-trione: aldosterone (Aldo), 5 α -androstan-17 β -ol-3-one: Dihydrotestosterone (DHT), 5 α -pregnan-3, 20-dione, Dihydroprogesterone (DHP), 5 α -pregnan-3 α , 21-diol-20-one: allotetrahydrodesoxy-corticosterone (THDOC), 1, 3, 5(10)-estratrien-3, 16 α , 17 β -triol: estriol (E_3) (Steraloids, Wilton, NH) and 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one:

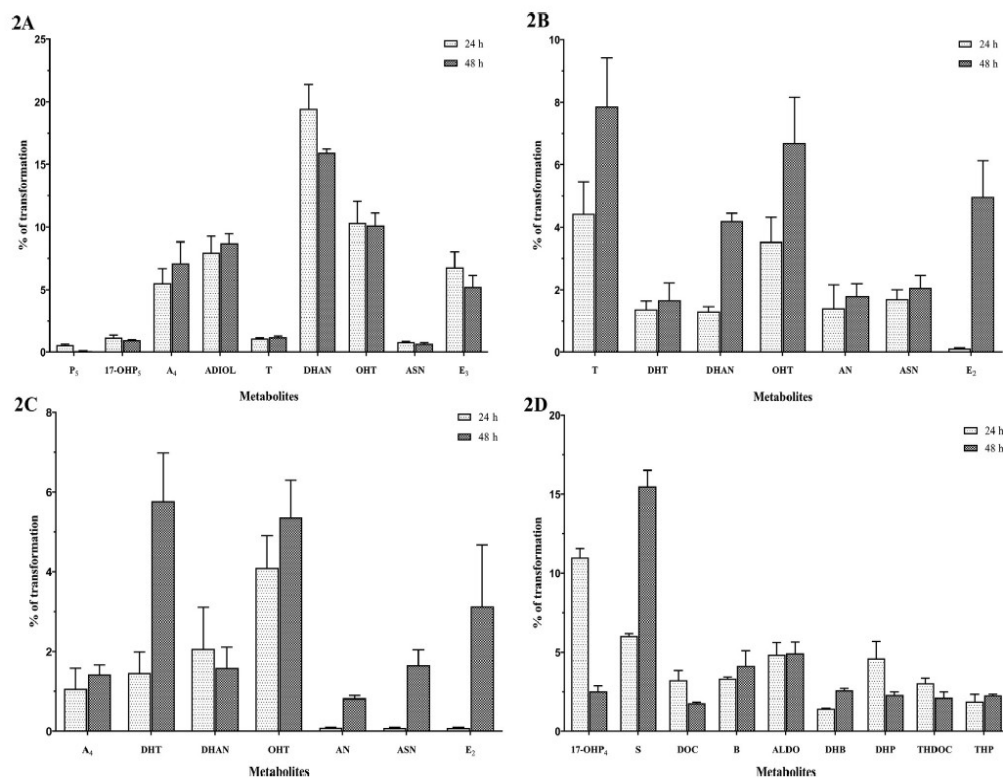


Fig. 2. C6 cells transform different tritiated precursors to sex steroids and corticosteroids metabolites. 2A, Cells incubated with ^3H -cholesterol. 2B, ^3H -A₄. 2C, ^3H -testosterone and 2D, ^3H -Progesterone. Y-axis shows percentage of transformation, and the X-axis the sex steroid or corticosteroid metabolites found. Mean \pm SEM. Solvent systems: Dichloromethane: ethyl acetate (75:25 and 80:20) v: v for A, B and C and toluene, acetone methanol (78:20:2) v:v for D.

After 24 h in culture the cells mainly synthesized the androgens A₄, T and E₂ (Percent of transformation: 15.3 ± 1.2 , 5.2 ± 0.6 , 7.8 ± 1.3 respectively). The synthesis of T was doubled by 48 h (12.2 ± 1.1). Other metabolites as AN, DHAN and ASN were also synthesized although in less quantity (2% on average).

3.2. Steroid metabolism by U87 cell line

Data in Fig. 3A shows the transformation of ^3H -Cholesterol precursor to tritiated metabolites by U87 cells after 24 and 48 h of incubation. Progesterone was the most abundant metabolite, but P₅, 17-OHP₄, small quantities of 17-OHP₅ and OHT were also detected. Moreover, testosterone, ASN and DHAN were synthesized in small quantities.

The incubation of U87 cells with ^3H -A₄ yielded testosterone and AN as the most abundant metabolites (Fig. 3B). Lower quantities of other metabolites as DHAN, DHT and OHT were found, likewise small quantities of E₂ and ASN. The incubation of U87 cells with tritiated testosterone yielded small quantities of A₄, DHT, DHAN and AN (Fig. 3C).

To investigate if U87 cells have the ability to synthesize corticosteroids and progesterone derivatives, we have incubated them with ^3H -P₄ as the steroid precursor. Fig. 3D shows the transformation of tritiated progesterone to corticosteroid metabolites. Aldo and THDOC were the most abundant metabolites, but also OH-P₄, DOC, THP, DHB, corticosterone and cortisol were found.

3.3. Finasteride inhibits the synthesis of 5 α -reductase androgenic derivatives from ^3H -Androstenedione

The U87 cells were incubated for 48 h with ^3H -A₄ and different concentrations of the 5 α -reductase inhibitor finasteride. Testosterone concentration was not statistically modified by the drug, although a trend towards accumulation of this steroid was observed. Finasteride concentrations at 0.5 to 5 μM significantly reduced several steroids derived from ^3H -A₄ as DHT, DHAN, AN, ASN, OHT and even E₂ (Fig. 4); the effect of the inhibitor was concentration-related.

3.4. Dutasteride inhibits the synthesis of 5 α -reductase androgenic derivatives from ^3H -Androstenedione

The presence of dutasteride for 48 h in the culture media of U87 cells significantly decreased the synthesis of androgenic and estrogenic metabolites (Fig. 5). Tritiated testosterone showed a trend to accumulate in cells that were incubated with dutasteride. Note that the synthesis of DHT, DHAN, and AN, ASN, OHT and E₂ was significantly inhibited even with the smaller concentration of the drug; the effect of the inhibitor was concentration-related. Androsterone was again the most abundant metabolite found and dutasteride outstandingly decreased its synthesis.

3.5. Dutasteride inhibits the synthesis of 5 α -reductase androgenic derivatives from ^3H -Progesterone

Since the inhibitory spectrum of dutasteride on 5 α -reductase

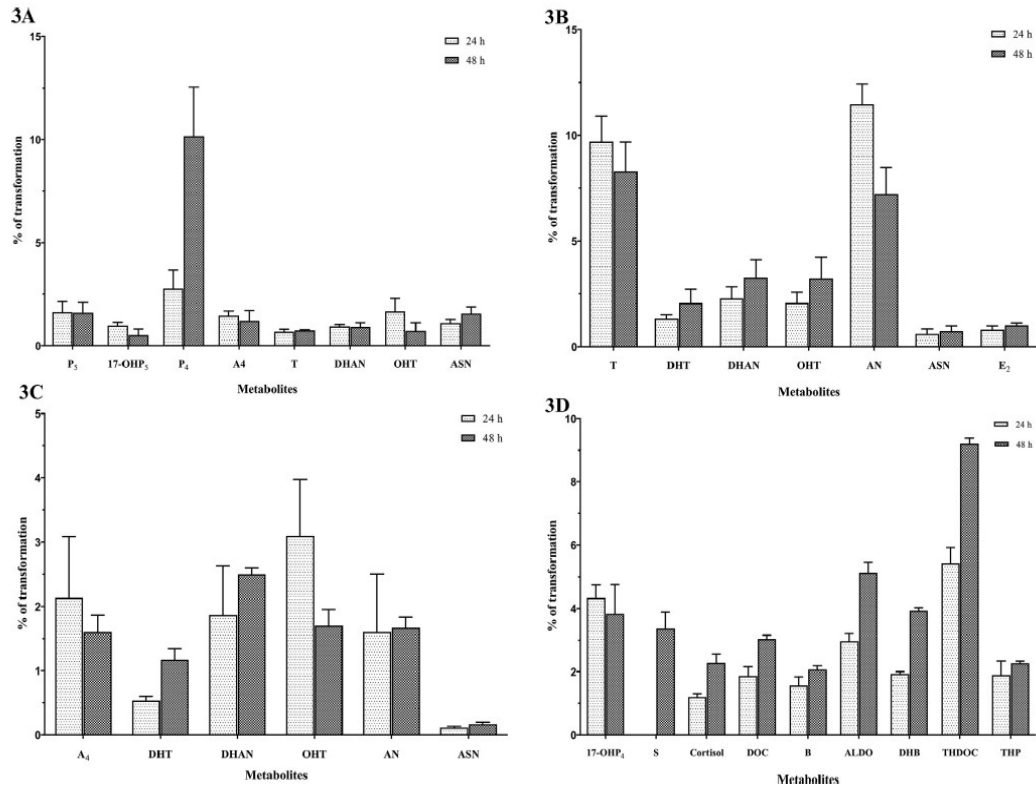


Fig. 3. U87 cells transform different tritiated precursors to sex steroids (A,B and C) and corticosteroids (D). 4A, ³H-Cholesterol. 4B, ³H-A₄. 4C, ³H-testosterone and 4D, ³H-Progesterone. The Y-axis shows percentage of transformation, and the X-axis the sex steroid or corticosteroid metabolites found. Mean ± SEM. Solvent system: Dichloromethane: ethyl acetate (75:25 and 80:20) v: v for A, B and C and Toluene, acetone, methanol (78:20:2) v: v. for D.

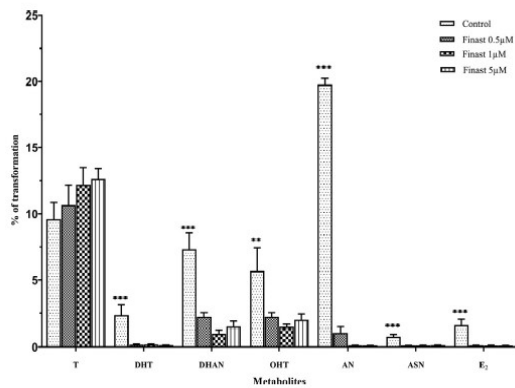


Fig. 4. Finasteride inhibits U87 cell steroidogenesis. The cells were incubated for 48 h with ³H-A₄ as the precursor, with or without different finasteride concentrations. The Y-axis shows percentage of transformation, and the X-axis the metabolites found. Mean ± SEM ** P < 0.01, *** P < 0.001 control vs finasteride 0.5, 1 and 5 µM. Solvent system: dichloromethane, ethyl acetate (80:20) v: v.

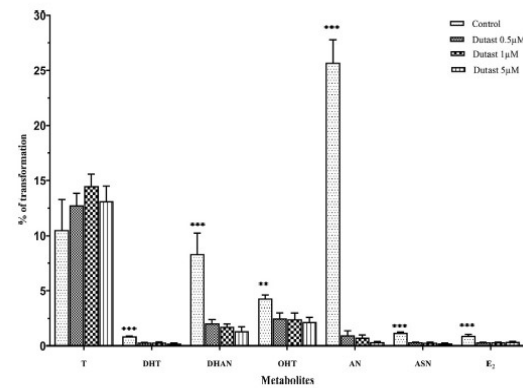


Fig. 5. Dutasteride inhibits U87 cell steroidogenesis. The cells were incubated for 48 h with ³H-A₄ as the precursor, with and without different dutasteride concentrations. The Y-axis shows the percentage of transformation, and the X-axis the metabolites found. Mean ± SEM ** P < 0.01, *** P < 0.001 control vs dutasteride 0.5, 1 and 5 µM. Solvent system: dichloromethane, ethyl acetate (80:20) v: v.

isoforms was broader than that of finasteride, we expanded our research to the former compound which also has a greater p*K*_i compared to finasteride. Fig. 6 shows the androgenic steroids derived from ³H-P₄ found in the culture media of U87 cells after 48 h in the presence or

absence of dutasteride. Tritiated testosterone showed a trend to accumulate significantly in all concentrations of dutasteride. It should be noted that the synthesis of OHT, DHT, DHAN, AN and estriol, was significantly inhibited even from the smaller concentration of the drug;

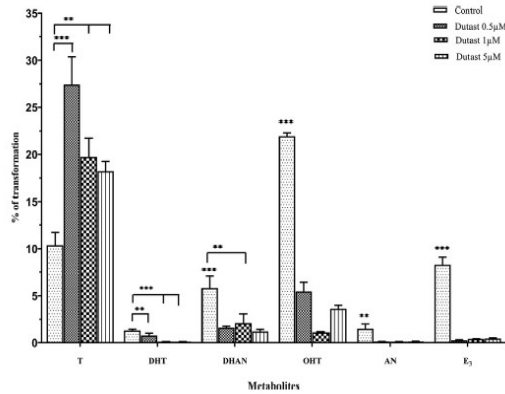


Fig. 6. Sex steroid synthesis by U87 cells incubated for 48 h with $^3\text{H-P}_4$ as the precursor, with or without different dutasteride concentration. The Y-axis shows percentage of transformation, and the X-axis the metabolites found. Mean \pm SEM * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ control vs dutasteride 0.5, 1 and 5 μM . Solvent system: dichloromethane, ethyl acetate (80:20) v: v.

the effect of the inhibitor was concentration-related.

3.6. Dutasteride inhibits the synthesis of corticosteroids by U87 cells incubated with $^3\text{H-Progesterone}$

Dutasteride concentrations of 0.5 to 5 μM significantly reduced Aldo, THDOC and DHB synthesis (Fig. 7). Deoxycorticosterone was remarkably accumulated after incubation with dutasteride; although its synthesis was much lower, corticosterone accumulation was also observed.

4. Discussion

The synthesis of steroids resulting from the incubation of rat derived C6 cells with $^3\text{H-cholesterol}$ found in our study confirmed that C6 cells synthesize P_5 , but in addition we show for the first time the main steps of the metabolic pathway that leads to androgen synthesis. To note, the Adiol synthesis by these cells indicate that the delta 5 pathway is active. Interestingly, we also found here the synthesis of other androgen

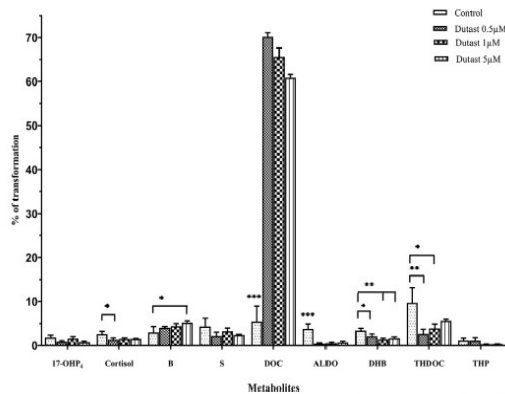


Fig. 7. Dutasteride inhibits U87 corticosteroid synthesis by U87 cells. Cells were incubated for 48 h with $^3\text{H-P}_4$ as the precursor, with and without different dutasteride concentrations. The Y-axis shows percentage of transformation, and the X-axis the metabolites found. Mean \pm SEM * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ control vs dutasteride 0.5, 1 and 5 μM . Solvent system: toluene, acetone, methanol (78:20:2) v: v.

derivatives as DHAN that is a product of 5α -reductase activity, AN product of 3α -HSD, and another as OHT, metabolized by 11β -hydroxylase. OHT and dihydrodeoxycorticosterone (DHDOC) may also be converted to downstream metabolites that mediate AR activation in prostate cancer [41–44].

On the other hand, as expected, when the route was shortened using tritiated A_4 or T as a precursor, the synthesis of DHT and OHT increased suggesting a significant 5α -reductase and 11β -hydroxylase activity. The synthesis of the neurosteroid androsterone by C6 and U87 cells had not been previously reported and suggest the activity of 3α -HSD. Although metabolites such as DHT and estradiol were synthesized in lower percentages compared to testosterone or androsterone, it should be considered that those steroids have a higher affinity for their respective receptors. It should be emphasized that the production of androgens from $^3\text{H-DHEA}$ found in this study indicates that C6 cells can also synthesize androgens by the $\Delta 5$ steroidogenic pathway.

The U87 GBM derived cell steroid synthesis capacity is less known. We found that they behaved similarly to C6 cells in relation to sex steroid synthesis. The U87 cell's capacity to produce androgens from cholesterol, suggests they have the enzymes P450-scc, and 17α -hydroxylase, necessary to synthesize these steroids. The production of neurosteroids like androsterone, androstenedione, and androstenedione had not been previously investigated in C6 or U87 cells. These molecules are also androgens and interact with the androgen receptor and therefore could have a role in GBM development.

As reported earlier androgens may be transformed to estrogens in activated glial cells through the action of P450-aromatase, an enzyme that is present in those cells [22]. We show here that C6 rat derived cells can convert androgens like A_4 to estrogens, thus indorsing previous data from Yague et al. [25] that showed the expression of this enzyme in the cell line, the same authors had shown that GBM cell lines, human T98G and U373MG also express aromatase and the activity of aromatase measured by the tritiated water release [45]. Our findings in U87 cells indicate that the enzyme may be actively synthesizing estrogens probably using self-produced androgens as precursors.

Androgens seem to facilitate GBM development [29] therefore, it was important to know if the 5α -reductase inhibitors used to treat prostate cancer (for a review see [46,35]) can block androgen synthesis by these cells. The significant decrease of DHT and other 5α -reductase androgenic derivative synthesis found after finasteride or dutasteride addition to the culture media, strongly suggests that U87 cells have 5α -reductases that respond to this compound decreasing the synthesis of potent androgens.

The blockade of these enzymes could be employed as a therapeutic tool to control GBM development. The estradiol and estril synthesis also was significantly inhibited by dutasteride, a fact that could be explained by previous works that demonstrated that the estradiol synthesis could be independent of testosterone, using 5α -reductase metabolites [47]. As estradiol have been shown to participate in GBM development, the effect of dutasteride on U87 cells could be a plus in the tumor treatment.

To note, our study show for the first time that C6 and U87 cells produce corticosteroids. This is interesting since it is well known that corticosteroids decrease the immune response, therefore, through the paracrine effect of corticosteroids, glioblastoma cells might evade the immune system. Corticosteroids are commonly used to control perioperative cerebral edema and as adjuvant in radiotherapy. The effects of corticosteroids such as dexamethasone on glioblastoma cell growth in patients remains controversial. To this regard, several authors had shown that the systemic administration of the synthetic corticosteroid dexamethasone, interferes on human GBM treatment [48,49]. We show here for the first time that C6 cells synthesized $^3\text{H-DOC}$ and corticosterone, therefore it looks like GBM cells maintain the capacity to synthesize corticosteroids described in normal glial cells by Mellon et al. [11] who had demonstrated that glial cells have enzymes for these steroid synthesis in the rat. C6 cells have a glial origin that is confirmed

by the expression of specific markers as GFP, therefore they could maintain the ability to synthesize corticosteroids. Likewise, we show here for the first time that GBM cell line U87 is also able to synthesize corticosteroids as the normal human glia does (Fig. 3D). We have found that C6 cells did not synthesize cortisol, but U87 cells did, this intriguing finding could be related to the species origin of the cells. It is interesting to note that we found that both C6 and U87 cells synthesize aldosterone. The synthesis of aldosterone has been demonstrated in both rat and human brains [15,16] where the enzymes required for aldosterone synthesis from cholesterol are expressed. To note, both cell lines synthesize ³H-DOC, which besides its mineralocorticoid activity, may also be converted to downstream metabolites that mediate AR activation as shown in prostate cancer [41,44].

The transformation of tritiated P₄ to corticosterone and aldosterone in C6 cells strongly suggest the activity of P450 c21, P45011b, P450c11 enzymes in the GBM derived cells. An interesting finding of the present study is the ability of U87 cells to synthesize allopregnanolone because this neurosteroid is a potent endogenous positive modulator of the GABA_A receptor [50,51]. Allopregnanolone also increases the expression of genes involved in proliferation, protection against cell death and regeneration in neural progenitor cells [52]. In addition, Zamora-Sanchez et al. [38] have shown that allopregnanolone increases U87 cell proliferation and promotes the expression of several genes involved in cell proliferation. The aldosterone synthesis found in our study is also interesting, since besides its role in hemodynamics, several authors reported that this mineralocorticoid enhances angiogenesis through the release of stimulating factors related to this function [53]. Therefore, aldosterone synthesis by the tumor might contribute to its growth.

The discovery of a so called “back door” in steroid synthesis [54], suggests that androgens could be also synthesized from corticosteroids, and add more pathways devoted to synthesize hormones ultimately important for the growth of GBM. The participation of an alternate route to the “classical” one on the synthesis of steroid hormones gives a perspective in relation to the fact that from the corticosteroid pathway, androgens can be synthesized [54,55], makes us understand the products of 5α-reductase as possible substrates of androgens or estrogens, either through the progesterone derivatives, or of the same testosterone, an example of this is androstenedione [47,54].

U87 human cell line synthesizes metabolites derived from the activity of 5α-reductase activity on A₄, that is first converted to androstenedione and therefore to androsterone by the activity of 3α-HSD. This particular neurosteroid seems to have an important role in stress [56]. We also found products such as allotetrahydrodesoxycorticosterone, the metabolite produced from DOC by the activity of 5α-reductase and 3α-HSD. The decreased synthesis of THDOC and androsterone caused by incubation with dutasteride found in our study strongly suggests that these enzymes are involved in their synthesis by the GBM cell line. The function of these metabolites in brain are not yet completely understood. To note, the addition of dutasteride to U87 cells inhibited the synthesis of AN, DHAN and THDOC, products of 3α-HSD. This data further remarks the important role this inhibitor could have in the control of GBM. Dutasteride probably inhibited other enzymes involved in corticosteroid synthesis because aldosterone production was also decreased.

In summary, this study indicates that C6 and U87 cell lines have the capacity to synthesize several key neurosteroids as sex steroids metabolites and corticosteroids, with a remarkable abundance of androgens, and that 5-α reductase inhibitors finasteride and dutasteride significantly reduced the synthesis of androgenic metabolites and derivatives of progesterone. In addition, dutasteride blocked the 5α-reductase action on the corticosteroid pathway, affecting the metabolite synthesis, leaving the enzyme 3α-HSD without substrate that reduced the synthesis of its products. These metabolites might play an important role in the maintenance and progression of the tumor, whether in its proliferation, differentiation, or in the angiogenic processes that accompanies most tumors. Therefore, the use of these inhibitors may be a

potential tool to control the metabolic pathways important for the survival of GBM cells.

Acknowledgments

This study was supported by a Conacyt Mexico grant Fronteras 2015-2, 1256. Luis Manuel Pinacho acknowledges Conacyt for a PhD student fellowship.

We declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108556>.

References

- [1] D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvet, B.W. Scheithauer, P. Kleihues, The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system, *Acta Neuropathol.* 114 (2007) 97–109, <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>.
- [2] D.N. Louis, A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W.K. Cavenee, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, P. Kleihues, D.W. Ellison, The 2016 World health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary, *Acta Neuropathol.* 131 (2016) 803–820, <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- [3] G.C. Kabat, A.M. Etgen, T.E. Rohan, Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19 (2010) 2421–2427, <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0658>.
- [4] B.P. McKinley, A.M. Michalek, R.A. Fenstermaker, R.J. Plunkett, The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York State from 1976 to 1995, *J. Neurosurg.* 93 (2000) 932–939, <https://doi.org/10.3171/jns.2000.93.6.932>.
- [5] J.P. Thakkar, T.A. Dolecek, C. Horbinski, Q.T. Ostrom, D.D. Lightner, J.S. Barnholtz-Sloan, J.L. Villano, Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23 (2014) 1985–1996, <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275>.
- [6] M. Tian, W. Ma, Y. Chen, Y. Yu, D. Zhu, J. Shi, Zhang Y Impact of gender on the survival of patients with glioblastoma, *Biosci. Rep.* 38 (2018) 6, <https://doi.org/10.1042/BSR20180752>.
- [7] M.K. Gandhari, C.R. Frazier, J.S. Hartenstein, J.F. Cloix, M. Bernier, Wainer IW Identification and characterization of estrogen receptor-related receptor alpha and gamma in human glioma and astrocytoma cells, *Mol. Cell. Endocrinol.* 315 (2010) 314–318, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.10.001>.
- [8] G. Gonzalez-Aguero, R. Ondarza, A. Gamboa-Dominguez, M.A. Cerbon, Camacho-Arroyo I Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas, *Brain Res. Bull.* 56 (2001) 43–48, [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00590-1](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00590-1).
- [9] Chang Liu, Yanlei Zhang, Kaiyuan Zhang, Chen Bian, Yangang Zhao, Jiqiang Zhan, Expression of estrogen receptors, androgen receptor and steroid receptor coactivator-3 is negatively correlated to the differentiation of astrocytic tumors, *Cancer Epidemiol.* 38 (2014) 291–297, <https://doi.org/10.1016/j.canep.2014.03.001>.
- [10] Y. Yin, X. Zhang, Z. Li, L. Deng, G. Jiao, B. Zhang, P. Xie, H. Mu, W. Qiao, J. Zou, Glucocorticoid receptor β regulates injury-mediated astrocyte activation and contributes to glioma pathogenesis via modulation of β-catenin/TCF transcriptional activity, *Neurobiol. Dis.* 59 (2013) 165–176, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.07.013>.
- [11] S.H. Mellon, C.F. Deschepper, Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain, *Brain Res.* 629 (1993) 283–292, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91332-M](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91332-M).
- [12] E.P. Gomez-Sanchez, N. Ahmad, D.G. Romero, C.E. Gomez-Sanchez, Is aldosterone synthesized within the rat brain? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288 (2005) E342–E346, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00355.2004>.
- [13] L. Yu, D.G. Romero, C.E. Gomez-Sanchez, E.P. Gomez-Sanchez, Steroidogenic enzyme gene expression in the human brain, *Mol. Cell. Endocrinol.* 190 (2002) 9–17, [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00041-2).
- [14] J.L. Do Rego, J.Y. Seong, D. Burel, J. Leprince, V. Luu-The, K. Tsutsui, M.C. Tonon, G. Pelletier, H. Vaudry, Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides, *Front. Neuroendocrinol.* 30 (2009) 259–301, <https://doi.org/10.1016/j.yfme.2009.05.006>.
- [15] C.E. Gomez-Sanchez, M.Y. Zhou, E.N. Cozza, H. Morita, F.C. Eddleman, E.P. Gomez-Sanchez, Corticosteroid synthesis in the central nervous system, *Endocr. Res.* 22 (1996) 463–470, <https://doi.org/10.1080/07435809609043732>.
- [16] C.E. Gomez-Sanchez, M.Y. Zhou, E.N. Cozza, H. Morita, M.F. Foelcking, E.P. Gomez-Sanchez, Aldosterone biosynthesis in the rat brain, *Endocrinology* 138 (1997) 3369–3373, <https://doi.org/10.1210/endo.138.8.5326>.
- [17] I.H. Zwain, S.S. Yen, Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain, *Endocrinology* 140 (1999) 3843–3852,

- <https://doi.org/10.1210/endo.140.8.690717>.
- [18] E.E. Baulieu, Neurosteroids: a novel function of the brain, *Psychoneuroendocrinology* 23 (1998) 963–987, [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(98\)00071-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(98)00071-7).
 - [19] P. Robel, E.E. Baulieu, Neurosteroids: biosynthesis and function, *Trends Endocrinol. Metab.* 1994 (5) (1994) 1–8, <https://doi.org/10.1006/fme.1999.0188>.
 - [20] T. Sanderson, The Steroid Biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals, *Toxicol. Sci.* 94 (2006) 3–21, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl051>.
 - [21] I. Charalampopoulos, E. Remboutsika, A.N. Margioris, A. Gravanis, Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival, *Trends Endocrinol. Metab.* 8 (2008) 300–307, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.07.004>.
 - [22] V. Papadopoulos, P. Guarnieri, K.E. Kreuger, A. Guidotti, E. Costa, Pregnenolone biosynthesis in C6–2B glioma cell mitochondria: regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 5113–5117, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.11.5113>.
 - [23] R.C. Melcangi, I. Cavarretta, V. Magnaghi, M. Ballabio, L. Martini, M. Motta, Crosstalk between normal and tumoral brain cells. Effect on sex steroid metabolism, *Endocrine* 8 (1998) 65–71, <https://doi.org/10.1385/ENDO.8:1:65>.
 - [24] J.G. Yague, E. Lavaque, J. Carretero, I. Azcoitia, L.M. Garcia-Segura, Aromatase, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis, is expressed by human and rat glioblastomas, *Neurosci. Lett.* 368 (2004) 279–284, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.07.010>.
 - [25] J.M. Dueñas Jiménez, A. Candanedo Arellano, A. Santerre, S. Orozco Suárez, H. Sandoval Sánchez, I. Feria Romero, R. López-Elizalde, M. Alonso Venegas, B. Netel, et al., Aromatase and estrogen receptor alpha mRNA expression as prognostic biomarkers in patients with astrocytomas, *Cancer Epidemiol.* 38 (2014) 291–297, <https://doi.org/10.1007/s11060-014-1509-z>.
 - [26] A. González-Arenas, V. Hansberg-Pastor, O.T. Hernández-Hernández, T.K. González-García, J. Henderson-Villalpando, D. Lemus-Hernández, A. Cruz-Barrios, M. Rivas-Suárez, I. Camacho-Arroyo, Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ERα activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators, *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (2012) 379–386, <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2011.11.004>.
 - [27] L. Germán-Castellán, J. Manjarez-Marmolejo, A. González-Arenas, M.G. González-Morán, I. Camacho-Arroyo, Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014) 393174, <https://doi.org/10.1155/2014/393174>.
 - [28] E. Acas-Fonseca, R. Sanchez-Gonzalez, I. Azcoitia, M.A. Arevalo, L.M. Garcia-Segura, Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17β-estradiol and selective estrogen receptor modulators, *Mol. Cell. Endocrinol.* 389 (1–2) (2014) 48–57, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.01.009>.
 - [29] X. Yu, Y. Jiang, W. Wei, P. Cong, Y. Ding, L. Xiang, K. Wu, Androgen receptor signaling regulates growth of glioblastoma multiforme in men, *Tumour Biol.* 36 (2014) 967–972, <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2709-z>.
 - [30] K. Yamana, F. Labrie, V. Luu-The, Human type 3 5α-reductase is expressed in peripheral tissues at higher levels than types 1 and 2 and its activity is potently inhibited by finasteride and dutasteride, *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 3 (2010) 293–299, <https://doi.org/10.1515/HMBCI.2010.035>.
 - [31] K.J. McInnes, C.J. Kenyon, K.E. Chapman, D.E. Livingstone, L.J. Macdonald, B.R. Walker, R. Andrew, 5α-reduced glucocorticoids, novel endogenous activators of the glucocorticoid receptor, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 22908–22912, <https://doi.org/10.1074/jbc.M402822200>.
 - [32] F. Azzouni, A. Godoy, Y. Li, J. Mohler, The 5 alpha-reductase isozyme family: a review of basic biology and their role in human diseases, *Adv. Urol.* 2012 (2012) 530121, <https://doi.org/10.1155/2012/530121>.
 - [33] S.H. Mellon, H. Vaudry, Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis, *Int. Rev. Neurobiol.* 46 (2001) 33–78, [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(01\)46058-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(01)46058-2).
 - [34] B. Kenny, S. Ballard, J. Blagg, D. Fox, Pharmacological options in the treatment of benign prostatic hyperplasia, *J. Med. Chem.* 40 (1997) 1293–1315, <https://doi.org/10.1021/jm960697s>.
 - [35] M. Cabeza, A. Sánchez-Márquez, M. Garrido, A. Silva, E. Bratoeff, Recent advances in drug design and drug discovery for androgen-dependent diseases, *Curr. Med. Chem.* 23 (2016) 792–815, <https://doi.org/10.2174/0929867323666160210125642>.
 - [36] B. Stoffel-Wagner, Neurosteroid metabolism in the human brain, *Eur. J. Endocrinol.* 145 (2001) 669–679, <https://doi.org/10.1530/eje.0.1450669>.
 - [37] A. Godoy, E. Kawinski, Y. Li, D. Oka, B. Alexiev, F. Azzouni, M.A. Titus, J.L. Mohler, 5α-reductase type 3 expression in human benign and malignant tissues: a comparative analysis during prostate cancer progression, *Prostate* 71 (2011) 1033–1046, <https://doi.org/10.1002/pros.21318>.
 - [38] C.J. Zamora-Sanchez, V. Hansberg-Pastor, I. Salido-Guadarrama, M. Rodriguez-Dorantes, I. Camacho-Arroyo, Allopregnanolone promotes proliferation and differential gene expression in human glioblastoma cells, *Steroids* 119 (2017) 36–42, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.01.004>.
 - [39] R.A. Valdez, L. Hinojosa, Y. Gómez, K. Willms, M.C. Romano, Taenia crassiceps WFU cysticerci synthesize corticosteroids in vitro: metyrapone regulates the production, *Gen. Comp. Endocrinol.* 176 (2012) 409–414, doi: 10.1016/j.ygcen.2012.01.015.
 - [40] A. Aceves-Ramos, P. de la Torre, L. Hinojosa, A. Ponce, R. García-Villegas, R.J. Bobes, M.C. Romano, Cloning, characterization and functional expression of Taenia solium 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Gen. Comp. Endocrinol.* 203 (2014) 186–192, doi: 10.1016/j.ygcen.2014.03.021.
 - [41] M. Uemura, S. Honma, S. Chung, R. Takata, M. Furihata, K. Nishimura, N. Nonomura, Y. Nasu, T. Miki, et al., 5α-DH-DHC (5α-dihydro-deoxy-corticosterone) activates androgen receptor in castration-resistant prostate cancer, *Cancer Sci.* 101 (2010) 1897–1904, <https://doi.org/10.1111/j.1349-7066.2010.01620.x>.
 - [42] K.H. Storbeck, L.M. Bloem, D. Africander, L. Schloms, P. Swart, A.C. Swart, 11β-Hydroxydihydrotestosterone and 11-ketodihydrotestosterone, novel C19 steroids with androgenic activity: a putative role in castration resistant prostate cancer, *Mol. Cell. Endocrinol.* 377 (2013) 135–146, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.07.006>.
 - [43] A.C. Swart, L. Schloms, K.H. Storbeck, L.M. Bloem, T. Toit, J.L. Quanson, et al., 11β-hydroxyandrostenedione, the product of androstenedione metabolism in the adrenal, is metabolized in LNCaP cells by 5α-reductase yielding 11β-hydroxy-5α-androstenedione, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 138 (2013) 132–142, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.04.010>.
 - [44] E.A. Mostaghel, Beyond T and DHT – novel steroid derivatives capable of wild type androgen receptor activation, *Int. J. Biol. Sci.* 10 (2014) 602–613, <https://doi.org/10.7150/ijbs.8844>.
 - [45] A. González, C. Martínez-Campa, M.D. Mediavilla, C. Alonso-González, V. Alvarez-García, E.J. Sánchez-Barceló, S. Cos, Inhibitory effects of melatonin on sulfatase and 17β-hydroxysteroid dehydrogenase activity and expression in glioma cells, *Oncol. Rep.* 23 (2010) 1173–1178, <https://doi.org/10.3892/or-00000748>.
 - [46] E.A. Mostaghel, Steroid hormones synthetic pathways in prostate cancer, *Trans. Androl. Urol.* 2 (2013) 212–227, <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.16>.
 - [47] T. Ishikawa, C. Glidewell-Kenney, J.L. Jameson, Aromatase-independent testosterone conversion into estrogenic steroids is inhibited by a 5 alpha-reductase inhibitor, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 98 (2006) 133–138, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.09.004>.
 - [48] E.T. Wong, E. Lok, S. Gautam, K.D. Swanson, Dexamethasone exerts profound immunologic interference on treatment efficacy for recurrent glioblastoma, *Br. J. Cancer* 113 (2015) 232–241, <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.238>.
 - [49] K.L. Pitter, I. Tamagno, K. Alikhanyan, A. Hosni-Ahmed, S.S. Pattwell, S. Donnola, C. Dai, et al., Corticosteroids compromise survival in glioblastoma, *Brain* 139 (2016) 1458–1471, <https://doi.org/10.1093/brain/aww046>.
 - [50] A.M. Hosie, M.E. Wilkins, H.M. da Silva, T.G. Smart, Endogenous neurosteroids regulate GABA_A receptors through two discrete transmembrane sites, *Nature* 444 (2006) 486–489, <https://doi.org/10.1038/nature05324>.
 - [51] R. Guenoum, F. Labombarda, M.C. Gonzalez Deniselle, P. Liere, A.F. De Nicola, R. Scumacher, Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: response to injury and implication for neuroprotection, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 146 (2015) 48–61, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.09.001>.
 - [52] M. Wang, P.B. Johnston, B.G. Ball, R.D. Brinton, The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell cycle gene and protein expression, *J. Neurosci.* 25 (2005) 4706–4718, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4520-04.2005>.
 - [53] C.T. Stier, Aldosterone and angiogenesis, *Am. J. Hypertens.* 23 (2010) 940, <https://doi.org/10.1038/ajh.2010.155>.
 - [54] C. Kamrath, Z. Hochberg, M.F. Hartmann, T. Remer, S.A. Wudy, Increased activation of the alternative “backdoor” pathway in patients with 21-hydroxylase deficiency: evidence from urinary steroid hormone analysis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 (E3) (2012) 67–75, <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1997>.
 - [55] E. Pretorius, W. Arlt, K.H. Storbeck, A new dawn for androgens: novel lessons from 11-oxygenated C19 steroids, *Mol. Cell. Endocrinol. Rev.* 441 (2017) 76–85, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.014>.
 - [56] R.J. Servatius, C.E. Marx, S. Sinha, P. Avcu, J.D. Kilts, J.C. Naylor, K.C. Pang, Brain and serum androsterone is elevated in response to stress in rats with mild traumatic brain injury, *Front. Neurosci.* 26 (2016) 379, <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00379>.
 - [57] A.M. Rasmusson, C.E. Marx, S.L. Pineles, A. Locci, E.R. Scioli-Salter, Y.I. Nillni, J.J. Liang, G. Pinna, Neuroactive steroids and PTSD treatment, *Neurosci. Lett.* 649 (2017) 156–163, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.054>.