

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**SEÑALIZACIÓN NO GENÓMICA DE
TESTOSTERONA EN CÉLULAS ESTROMALES
PROSTÁTICAS: Efectos sobre la proliferación,
diferenciación y respuesta inflamatoria.**

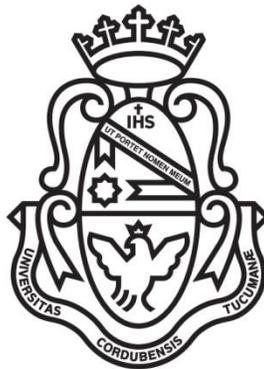
Biol. Nahuel Peinetti

Directora: Dra. Cristina Alicia Maldonado

Director Asociado: Dr. Amado Alfredo Quintar

**Centro de Microscopia Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas,
Universidad Nacional de Córdoba**

Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA-CONICET)



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2018

COMISIÓN ASESORA

Dra. Laura Cecilia Giojalas, Centro de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT-CONICET).

Dra. Claudia Lee Malvina Lanari, Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), Buenos Aires, Argentina.

Dra. Cristina Alicia Maldonado, Centro de Microscopia Electrónica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA-CONICET).

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

LISTADO DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

- The Response of Prostate Smooth Muscle Cells to Testosterone is Determined by the Subcellular Distribution of the Androgen Receptor. Peinetti N, Scalerandi MV, Cuello Rubio MM, Leimgruber C, Nicola JP, Torres AI, Quintar AA, Maldonado CA. *Endocrinology*. 2018 Feb;159(2):945–956.

ÍNDICE

INDICE DE TABLAS.....	1
INDICE DE FIGURAS	1
ABREVIATURAS	4
RESUMEN	6
SUMMARY	7
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.....	8
I. GLÁNDULA PROSTÁTICA	9
1. Anatomía, Fisiología e Histología.....	9
2. Rol de los andrógenos en la próstata.....	12
3. El compartimiento estromal de la próstata.....	13
4. Patologías de la glándula prostática.	15
A. Prostatitis	15
B. Hiperplasia Prostática Benigna (BPH).....	16
C. Estudios experimentales en modelos de prostatitis bacteriana y BPH.	18
II. TESTOSTERONA: Generalidades y efectos en la próstata	20
1. Síntesis y Función	20
2. El receptor clásico de andrógenos (AR).....	22
3. Vías no genómicas de señalización de testosterona.....	27
A. Definición y primeras evidencias.	27
B. Tipos de receptores que median vías no genómicas.	29
C. Vías de señalización y factores de transcripción	31
D. Vías no genómicas en células prostáticas.....	32
III. EFECTOS REGULADORES DE LA TESTOSTERONA.	33
IV. PLANTEO DEL PROBLEMA	36
HIPÓTESIS	37
OBJETIVO GENERAL	37
CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	38
1. Animales	39
2. Cultivos primarios de células musculares lisas prostáticas (CMLp)	39

3. Cultivos de células estromales prostáticas humanas (CEPH).....	40
4. Tratamientos	40
5. Inmunofluorescencia.....	41
6. Análisis de proteínas de superficie celular mediante biotilación.....	42
7. Citometría de flujo	43
8. Western blot.....	43
9. Ensayo de proliferación	44
10. Extracción de ARNm, RT-PCR y qPCR.	45
11. ELISA	46
12. Microscopia electrónica de transmisión	46
13. Análisis estadístico	47
CAPITULO III. RESULTADOS	48
1. El receptor clásico de andrógenos se localiza en la superficie de las CMLp de rata....	49
2. El AR de membrana induce proliferación celular a través de la señalización por MAPK.....	53
3. La señalización no genómica de testosterona incrementa la expresión de marcadores de musculo liso en CMLp.....	58
4. La señalización iniciada por testosterona desde la membrana plasmática no participa de la regulación sobre la expresión del propio AR.	60
5. La estimulación de las vías no genómicas de testosterona afecta la transcripción de genes para factores de crecimiento en CMLp.....	62
6. La modulación de los andrógenos sobre la respuesta de las CMLp a LPS requiere de la activación del AR intracelular	64
7. El estímulo de testosterona iniciado por receptores presentes en la superficie celular induce un incremento en la proliferación de CEPH.	67
8. La señalización por AR de membrana induce un descenso en la expresión de ARNm TGFβ1 en CEPH.....	70

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN	72
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	87
Bibliografía.....	91

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos celulares de la próstata.	10
Tabla 2. Principales receptores involucrados en las vías no genómicas de testosterona.	31
Tabla 3. Secuencia de nucleótidos de los <i>primers</i> utilizados en esta tesis doctoral.	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema y microfotografía de la próstata humana	11
Figura 2. Esquema de la próstata de rata y microfotografía de la próstata ventral de rata... ..	19
Figura 3. Esquema de la biosíntesis de testosterona a partir de colesterol	22
Figura 4. Representación del gen y de la proteína de AR humana.....	24
Figura 5. Vías genómicas y vías no genómicas de testosterona.....	28
Figura 6. Localización del AR en la superficie celular de CMLp.....	50
Figura 7. Presencia del AR en la fracción de proteínas correspondiente a la superficie celular.	51
Figura 8. Determinación del porcentaje de células positivas para AR en la membrana plasmática mediante citometría de flujo	52
Figura 9. Determinación del porcentaje de células positivas para AR en la membrana plasmática por inmunofluorescencia	53
Figura 10. La estimulación de receptores de testosterona de superficie induce la fosforilación de ERK1/2 en CMLp	54
Figura 11. La inhibición de la palmitoilación impide la fosforilación de ERK1/2 luego del estímulo con testosterona desde la superficie celular en CMLp	55
Figura 12. La estimulación de receptores de superficie induce la fosforilación de Akt en CMLp.	55
Figura 13. La estimulación de receptores de testosterona de superficie induce un incremento en la proliferación de CMLp.	57

Figura 14. La estimulación de receptores de testosterona de membrana plasmática induce un incremento en el número total de CMLp.....	57
Figura 15. Las vías no genómica de testosterona favorece el fenotipo muscular de CMLp (qPCR).....	58
Figura 16. La estimulación de las vías no genómica de testosterona favorece el fenotipo muscular de CMLp (western blot).....	59
Figura 17. La estimulación de las vías no genómica de testosterona favorece el fenotipo muscular de CMLp (inmunofluorescencia).....	60
Figura 18. El aumento en la expresión de AR en respuesta a testosterona depende de receptores intracelulares de testosterona	61
Figura 19. El aumento en la expresión del ARNm para AR depende de receptores intracelulares de testosterona.....	62
Figura 20. La estimulación de receptores de testosterona de membrana plasmática actúa sobre la expresión de ARNm para distintos factores de crecimiento.....	63
Figura 21. La estimulación de receptores de testosterona de membrana no modula la secreción de IL-6 inducida por LPS en CMLp.....	65
Figura 22. La estimulación de receptores de testosterona de membrana aumenta la secreción de TNF α inducida por LPS en CMLp.	66
Figura 23. La regulación ejercida por testosterona sobre la translocación de NF- κ B al núcleo, no depende de receptores de membrana para testosterona	66
Figura 24. CEPH cultivadas <i>in vitro</i> visualizas por microscopía óptica	68
Figura 25. CEPH cultivadas <i>in vitro</i> visualizas al microscopio electrónico.	68
Figura 26. Las CEPH expresan marcadores de fenotipo muscular y mesenquimal, determinado por western blot.	69
Figura 27. Las CEPH expresan marcadores de fenotipo muscular y mesenquimal, determinado por inmunofluorescencia.	69
Figura 28. La estimulación de las vías no genómicas de testosterona induce un aumento en la proliferación de CEPH.....	70

Figura 29. La estimulación de receptores de testosterona presentes en la superficie celular de CEPH induce disminución en la expresión de ARNm para TGF β 1..... 71

ABREVIATURAS

- 17 β -HSD: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase
2BP: 2-bromopalmitato
3 β -HSD: 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase,
5ARI: inhibidores de la enzima 5-alfa reductasa
AD: androstenediona
AR: receptor clásico de andrógenos
ARE: elemento de respuesta a andrógenos
BPH: hiperplasia benigna prostática
BSA: albumina sérica bovina
CEPH: células estromales prostáticas humanas
CMLp: células musculares lisas prostáticas
Con A: concanavalina A
CPSS: Síndrome doloroso pélvico crónico
DAB: diaminobencidina
DBD: dominio de unión al DNA (aminoácidos 559–624 del AR)
DHEA: dehidroepiandrosterona
DHT: dihidrotestosterona
DMSO: dimetilsulfóxido
DU145: línea celular inmortalizada de cáncer de próstata.
EGFR: receptor del factor de crecimiento epitelial
ER α : receptor alfa de estrógenos
ER β : receptor beta de estrógenos
FGF2: factor de crecimiento fibroblástico 2
FGF7: factor de crecimiento fibroblástico 7
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas
GPCR: receptor acoplado a proteína G
GPRC6A: receptor acoplado a proteína G de tipo 6A
GR: receptor de glucocorticoides
HATs: histonas aciltransferasas

HF: hidroxiflutamida
HSP27: heat shock protein 27
IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1
KLK3: calicreina 3
LBD: dominio de unión al ligando (aminoácidos 677–919 del AR)
LH: hormona luteinizante
LHRH: hormona liberadora de hormona luteinizante
LNCaP: línea celular inmortalizada de cáncer de próstata
LUTS: síntomas del tracto urinario bajo
MISS: Señalización esteroidea iniciada en membrana.
MR: receptor de mineralocorticoides
MYOCD/SRF: miocardina/factor de respuesta al suero
NTD: dominio NH₂ terminal (aminoácidos 1–558 del AR)
PAP: fosfatasa acida prostática
PBS: buffer fosfato salino
PC3: línea celular inmortalizada de cáncer de próstata.
PDE5-I: inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 5
PR: receptor de progesterona
PSA: antígeno prostático específico
RTU o TURP: resección transuretral de la próstata
SFB: suero fetal bovino
SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales
SHBGR: receptor de la globulina fijadora de hormonas sexuales
TGFβ1: factor de crecimiento tumoral β1
TLR4: receptor de tipo toll 4
UGE: seno urogenital epitelial
UGM: seno urogenital mesenquimal
VNG: vías no genómicas
ZIP9: canal transmembrana de zinc 9

RESUMEN

La próstata es un órgano perteneciente al aparato reproductor masculino, tiene como función aportar el líquido prostático al semen para contribuir a la viabilidad de los espermatozoides. Estudios de nuestro laboratorio demostraron que la testosterona, además de su capacidad para inducir sobrevida celular, presenta un rol homeostático en situaciones de injuria de la próstata como es el caso de la inflamación bacteriana. Los mecanismos mediante los cuales testosterona es capaz de activar esta serie de procesos homeostáticos son hasta la actualidad desconocidos. Se ha descrito que la señalización de testosterona puede dividirse en dos grandes grupos: las vías genómicas y las vías no genómicas (VNG) de señalización. El rol de las VNG y sus mecanismos han sido menos estudiados y hasta esta tesis doctoral, su presencia en células musculares lisas prostáticas (CMLp) no había sido investigada. Las células estromales, entre ellas las CMLp, son indispensables para el desarrollo de la próstata y cumplen un rol primordial durante las patologías de la glándula. Por esta razón en esta tesis doctoral nos planteamos el objetivo de determinar el rol de las VNG de testosterona en células estromales prostáticas. Los resultados de esta tesis demostraron que las CMLp de rata *in vitro* presentan receptores clásicos de andrógenos (AR) en la superficie celular. La estimulación de estos receptores por testosterona indujo la activación de VNG provocando un incremento de la proliferación que fue acompañado por una disminución en la expresión del ARNm para TGF β , efectos que no se reprodujeron al estimular ambas vías de señalización en simultáneo. A su vez la estimulación de las VNG también indujo un incremento en la expresión de ARNm para IGF-1 y FGF7, al mismo tiempo que un aumento en la expresión de proteínas contráctiles. En concordancia, en ensayos llevados a cabo en células estromales prostáticas humanas *in vitro*, se demostró que las VNG de testosterona son capaces de inducir un aumento en la proliferación celular hasta niveles mayores a los inducidos por la propia testosterona. En contraparte, la estimulación de receptores de superficie para testosterona en CMLp, no reprodujo el efecto regulador sobre la respuesta inflamatoria anteriormente demostrado en nuestro laboratorio. En conclusión, nuestros resultados proponen efectos diferenciales frente a la estimulación con testosterona dependiendo de la vía estimulada y demuestran la importancia de las VNG de testosterona en células estromales de la próstata, aportando evidencias importantes al campo de la señalización inducida por andrógenos.

SUMMARY

The prostate is an organ belonging to the male reproductive system; its function is to provide prostatic fluid to the semen to contribute to the viability of sperm. Studies from our laboratory showed that testosterone, in addition to its ability to induce cell survival, has a homeostatic role in situations of injury in the prostate, such as bacterial inflammation. The mechanisms by which testosterone is able to activate these series of homeostatic processes are still unknown. It has been described that testosterone signaling can be divided into two major groups: genomic pathways and non-genomic pathways (NGP). The role of NGP and its mechanisms have been less studied and until this doctoral thesis its presence in prostatic smooth muscle cells (pSMC) had not been investigated. Stromal cells, including pSMC, are essential for the development of the prostate and play a key role during the pathologies of the gland. For this reason in this doctoral thesis we aimed to determine the role of NGP induced by testosterone in prostatic stromal cells. The results from this thesis showed that rat pSMC *in vitro* present classic androgen receptors (AR) on the cell surface. The stimulation of these receptors by testosterone induced the activation of NGP causing an increase in proliferation that was accompanied by a decrease in mRNA expression for TGF β , effects that were not reproduced by stimulating both signaling pathways simultaneously. In turn, the stimulation of the NGP also induced an increase in the expression of mRNA for IGF-1 and FGF7 at the same time as an increase in the expression of contractile proteins. In agreement, in experiments carried out on human prostatic stromal cells *in vitro*, it was demonstrated that testosterone NGP are able to induce an increase in cell proliferation reaching higher levels than those induced by testosterone itself. In contrast, the stimulation of surface receptors for testosterone in pSMC did not reproduce the regulatory effect on the inflammatory response previously demonstrated in our laboratory. In conclusion, our results propose differential effects of testosterone response depending on the pathway stimulated and demonstrate the importance of testosterone NGP in stromal cells of the prostate, providing important evidence in the field of androgen-induced signaling.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

La glándula prostática es el órgano del sistema reproductor masculino más propenso a sufrir patologías, por esta razón un gran esfuerzo se ha realizado para comprender los mecanismos que subyacen a estos procesos. Los aportes de nuestro laboratorio demostraron un rol modulador de la testosterona sobre la respuesta inflamatoria que ocurre en la próstata, y la participación de las células musculares lisas prostáticas (CMLp) de la estroma glandular en este proceso. Este trabajo de tesis doctoral se centró en el estudio de los mecanismos no genómicos de señalización iniciados por testosterona en células estromales de la próstata, y su relación con los procesos de proliferación, diferenciación, y modulación de la respuesta inflamatoria.

I. GLÁNDULA PROSTÁTICA

1. Anatomía, Fisiología e Histología.

La próstata es una glándula túbulo-alveolar compuesta que pertenece al aparato reproductor masculino y tiene como función la síntesis y secreción del líquido prostático (1). En condiciones normales, tiene un volumen de 25 cm³ (2) y un peso aproximado de 20 gramos (3,4). Se ubica por debajo de la vejiga urinaria, anterior al recto, al cual está conectado por la fascia de Denonvillier, y posterior al pubis, al cual se conecta mediante los ligamentos puboprostáticos (1,5-7). La próstata es atravesada por la uretra, hacia la cual se vierten los componentes del líquido prostático, y por los conductos eyaculatorios provenientes de los testículos, los cuales desembocan en la uretra prostática a la altura del verumontanum (1). A diferencia de otras especies, en el humano la glándula prostática se encuentra rodeada por una capa de tejido conectivo que forma la cápsula (8).

A nivel histológico, la próstata humana se encuentra dividida en glándulas formadas por un componente epitelial simple a cilíndrico pseudoestratificado, el cual puede aparecer como cilíndrico bajo o cuboidal. El epitelio consiste en células secretorias, células basales y células neuroendocrinas que se encuentran rodeando cada acino, mientras que el componente estromal está compuesto por CMLp adyacentes a las células epiteliales, fibroblastos dispersos en el espacio interacinar y otros tipos celulares como células endoteliales de los capilares y células del sistema inmune (9,10). Las células epiteliales

cumplen una función esencial, ya que son las encargadas de sintetizar y secretar los componentes del líquido prostático al lumen acinar, mientras que las CMLp, al contraerse, median la expulsión del líquido durante la eyaculación (10). En la tabla 1 se sintetizan las funciones principales de los distintos tipos celulares que componen la próstata.

Tabla 1. Tipos celulares de la próstata.

Célula	Tipo de célula	Ubicación	Función	Dependencia por testosterona	Biomarcadores	Diferencia entre rata y humano
Secretoria	Células epiteliales columnares o cuboidales.	En la región luminal.	Exocrina	Presentan altas concentraciones de AR. Alta dependencia por testosterona.	Positivo: PSA, PAP, AR, Nkx3.1, CK8, CK18. Negativo: CK5, CK15.	Humanas secretan PSA. Ratas secretan PBP.
Neuroendocrina	De origen neural, presentan prolongaciones tipo dendritas que contactan con células vecinas.	En la región luminal entre las células secretorias.	Desconocida. Se cree que podrían inducir la proliferación de células adyacentes.	AR negativas.	Positivo: cromogranina A, calcitonina. Negativo: PSA, AR.	
Basal	Células epiteliales que varían entre chicas y achatada a cuboidales.	Forman una capa continua sobre la membrana basal.	Comunicaciones epitelio-estromales. Se sugiere que podrían formar una barrera hemato-prostática.	Andrógeno independientes pero con capacidad para responder a andrógenos. Expresión de AR baja.	Positivo: CK5, CK14, p63. Negativo: PSA, PAP.	Relación con células secretorias: humanos 1:1, ratas 1:7.
Fibroblasto	Mesenquimal	Dispersas entre los acinos.	Producción de factores de crecimiento.	bajos niveles de AR.	Vimentina, tenacina C	
Muscular lisa	Muscular	Rodeando los acinos.	Contracción durante la eyaculación para expulsar el líquido prostático. Producción de factores de crecimiento.	Presentan AR. En respuesta a testosterona aumentan los marcadores de fenotipo muscular.	Actina de músculo liso, calponina, desmina, miosina de cadena pesada.	Mayor cantidad en humanos.

En la década de 1930, los estudios de Leduc permitieron postular un criterio de subdivisión anatómico de la glándula separándola en tres lóbulos, los cuales se encuentran rodeando la uretra prostática: dos laterales y uno medio (11). Posteriormente, en una serie de artículos publicados a fines de la década del 60 y a lo largo de la década del 70, McNeal propuso una división con base en la histología de la glándula, según la cual la próstata se divide en cuatro zonas: periférica, central, de transición y anterior fibro-muscular (figura 1). La zona periférica que compone la mayor parte de la glándula, es la región más susceptible al cáncer de próstata y a las prostatitis. Rodeando los conductos eyaculatorios se encuentra la zona central la cual representa un 30% del total de la glándula. La zona de transición, se encuentra rodeando la uretra prostática y es donde se desarrolla frecuentemente la hiperplasia nodular o hiperplasia prostática benigna (BPH). La cuarta zona, o fibro-muscular, es puramente estromal y carente de elementos acinares (11). Ambos criterios de subdivisión de la glándula prostática son usados aún en la actualidad.

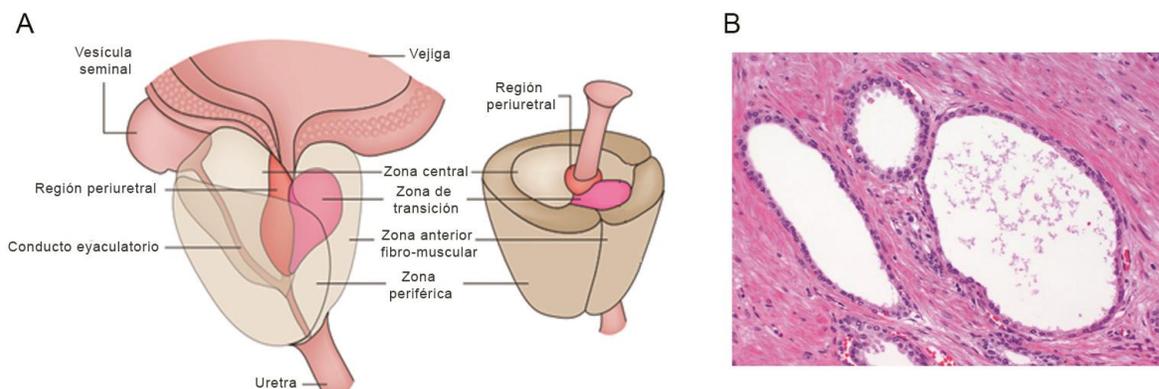


Figura 1. Esquema y microfotografía de la próstata humana. A. Esquema de la próstata humana en donde se pueden apreciar su ubicación con respecto a la vejiga urinaria, la uretra y los conductos eyaculatorios así como las 4 zonas propuestas por McNeal (12). B. Microfotografía de la zona de transición de la próstata humana teñida con hematoxilina/eosina, en donde se observan los acinos tapizados por células epiteliales cuboidales y un estroma densamente empaquetado (13).

Desde el punto de vista de la fisiología, la próstata se encarga, por medio de sus células epiteliales secretoras, de sintetizar y secretar el líquido prostático, que junto con los espermatozoides y las secreciones provenientes de las demás glándulas accesorias y de los testículos, forman el líquido seminal (14). Si bien se sabe que el líquido prostático es importante para la viabilidad de los espermatozoides y la funcionalidad del semen, el

conocimiento en cuanto a su composición y función es limitado y surge principalmente de estudios que se llevaron a cabo en las últimas décadas del siglo XX (15), ya que posteriormente las investigaciones científicas dedicadas a la glándula prostática se concentraron en el estudio de las patologías que la afectan (10). Las moléculas predominantes en el líquido prostático son la fosfatasa ácida prostática (PAP), el antígeno prostático específico (PSA) o calicreína 3 (KLK3) y la β -microseminoproteína (β -MSP) (15). El PSA pertenece a la familia de las calicreínas, la cual está compuesta por proteasas séricas que participan en el licuado del semen y permiten que los espermatozoides viajen por las trompas de Falopio (16,17). La PAP presente en el líquido prostático, ha sido utilizada como biomarcador para el diagnóstico del cáncer de próstata, sin embargo actualmente se considera al PSA como un marcador más fidedigno. Otros componentes como el zinc (18), la lactoferrina (19) y la β -defensina (20) representan una importante contribución como moléculas antimicrobianas. La próstata es el órgano blando con mayor concentración de zinc, el cual además de actuar como antimicrobiano, tiene un rol significativo al inhibir el ciclo de Krebs en células epiteliales, de esta manera favorece un aumento de citrato, el cual es excretado para formar parte del líquido prostático (17). El citrato es un importante sustrato energético para los espermatozoides, aumentando su producción de ATP (17). Interesantemente, al inhibir el ciclo de Krebs, las células epiteliales prostáticas son las únicas células del cuerpo que en condiciones homeostáticas obtienen la mayor parte de su energía mediante glicólisis (17). Además de su papel como glándula exocrina, la región proximal de la uretra prostática en conjunto con la uretra preprostática, forman un cilindro de músculo liso que conforma el esfínter preprostático. Este esfínter tiene un rol crítico, ya que participa en el control de la micción y evita la eyaculación retrograda (1). Adicionalmente se ha propuesto a la glándula prostática como un órgano endocrino, ya que es el sitio en donde se produce la mayor conversión de testosterona a dihidrotestosterona (DHT) (21).

2. Rol de los andrógenos en la próstata

La próstata es uno de los órganos con mayor dependencia de andrógenos; estas hormonas son críticas tanto para el desarrollo de la glándula durante su embriogénesis, para su crecimiento durante la pubertad y para el mantenimiento de la homeostasis a lo largo de la vida adulta. Durante la embriogénesis, el desarrollo de la próstata ocurre a partir del seno

urogenital endodérmico, aproximadamente en la semana 10 de gestación en el humano y en el día 19 de gestación en la rata (1). Este proceso ocurre en respuesta al aumento de testosterona secretada por los testículos fetales, ya que en ausencia de esta hormona los órganos masculinos no se desarrollan y el fenotipo se corresponde con el de una hembra (1,22). Por otro lado, la dependencia por estas hormonas durante la edad adulta, fue evidenciada en la década de 1930 por Huggins y colaboradores quienes demostraron que la castración induce una fuerte involución de la próstata de perros, llegando a un cese en la secreción de líquido prostático luego de 7 a 23 días, mientras que la restitución androgénica permitió recuperar los valores normales de secreción (23). Estudios con próstatas humanas normales de voluntarios a los cuales se les administraron inhibidores del AR nilutamida o acetato de ciproterona, develaron que el volumen neto de la próstata no presentó cambios significativos; sin embargo, se observó atrofia acinar con aumento del componente estromal (24). Pacientes con hipogonadismo primario demostraron tener un menor volumen prostático y menor valor de PSA que pacientes normales, mientras que la terapia de reemplazo con testosterona induce un aumento en el volumen prostático así como en los niveles de PSA, los cuales incrementan hasta alcanzar los valores de un individuo normal (25). Interesantemente, los pacientes con hipogonadismo, hipopituitarismo, déficit congénito de 5α -reductasa o con déficit en la señalización o producción de andrógenos, no desarrollan patologías relacionadas al crecimiento anómalo de la próstata como BPH o el cáncer de próstata (26,27). El rol de los andrógenos sobre las patologías proliferativas de la próstata quedó demostrado a fines del siglo XIX y principios del XX, en un estudio que involucró a 111 pacientes, se observaron mejoras significativas en los síntomas de obstrucción de la uretra luego de la castración quirúrgica (28). De manera coincidente, estudios en pacientes con cáncer de próstata metastásico demostraron la eficiencia de la castración como terapia frente a esta patología (29-31). Actualmente, los inhibidores de la señalización de testosterona representan una de las opciones más eficaces frente a la BPH y al cáncer de próstata.

3. El compartimiento estromal de la próstata

Históricamente las células estromales de la próstata se consideraron como células de sostén, las cuales aportarían solamente la función contráctil de las CMLp durante la eyaculación. Sin embargo, este componente estromal representa un compartimiento

dinámico que cumple un importante rol en el mantenimiento de la homeostasis glandular a través de complejas interacciones con las células epiteliales (32,33). Durante la década de 1970 los trabajos del laboratorio de Gerald Cunha demostraron que las células estromales tienen un importante papel en el desarrollo de la próstata, mediado a través de la secreción de moléculas de señalización paracrina. Estos estudios evidenciaron que en respuesta a las concentraciones circulantes de andrógenos, son las células estromales diferenciadas a partir del seno urogenital mesenquimal (UGM), las que estimulan la diferenciación del epitelio desde el seno urogenital epitelial (UGE) (32). Diversos estudios sugieren que durante la embriogénesis, la señalización de los andrógenos a través de las células estromales sería la responsable también de la formación de los acinos epiteliales, el crecimiento prostático, la ramificación de los conductos, la diferenciación del epitelio y la determinación de la expresión de las proteínas de secreción (32). Experimentos con ratones KO para el AR y técnicas de recombinación de tejidos, han demostrado la importancia del AR en células estromales para inducir la secreción de factores de crecimiento como IGF-1, KGF, FGFs, TGFs, entre otros, que regulan la proliferación de células epiteliales durante el desarrollo (32,34,35). Las interacciones epitelio-estromales se mantienen durante toda la vida a través de una comunicación paracrina mediada por diversos tipos de moléculas y son esenciales para el correcto funcionamiento del órgano.

Las células estromales son sensibles a cambios en el microambiente, como la inflamación o el desbalance hormonal, procesos que alteran los patrones de secreción, afectando de esta manera las señales que envían a las células epiteliales (36). La alta plasticidad de las células que componen la estroma prostática, hacen de este componente un elemento activo tanto en condiciones de homeostasis como en las patologías que afectan a la próstata. En el transcurso de las patologías hiperplásicas de la próstata, las células estromales son capaces de diferenciarse a células activas conocidas como miofibroblastos, los cuales se caracterizan por la expresión conjunta de marcadores mesenquimales como vimentina y marcadores musculares como alfa-actina de músculo liso. Los miofibroblastos secretan citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento y participan en la remodelación de la matriz extracelular, siendo un soporte indispensable para las células epiteliales que proliferan durante estas patologías (37,38).

4. Patologías de la glándula prostática.

Las patologías más frecuentes que afectan la próstata son: las prostatitis, la BPH y el cáncer de próstata. Los objetivos planteados para esta tesis doctoral sólo abordan las dos primeras.

A. Prostatitis

Según “*The International Prostatitis Collaborative Network*” del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH), la prostatitis se define como un conjunto de síntomas resultado de la inflamación de la glándula prostática, la cual puede subdividirse en las siguientes 4 categorías: Tipo I: Prostatitis bacteriana aguda, Tipo II: Prostatitis bacteriana crónica, Tipo III Síndrome doloroso pélvico crónico (CPSS), que a su vez se subdivide en Tipo IIIA: inflamatorio y Tipo IIIB: no inflamatorio, y Tipo IV: Prostatitis inflamatoria asintomática (39,40). Se considera que entre el 3 y 16% de los hombres sufren de prostatitis en algún momento de sus vidas, y se considera que esta condición es la causa más frecuente de visitas al urólogo en pacientes menores a los 50 años (17,41). A su vez, la prostatitis es la patología prostática con mayor potencial para afectar la fertilidad del individuo y estudios recientes sostienen que la inflamación prostática es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades como BPH y cáncer de próstata (17). Las inflamaciones bacterianas son responsables del 5 al 40% de las prostatitis (41), entre ellas las más comunes son las resultantes de infección con *Escherichia coli*, sin embargo no son raras las infecciones con *Neisseria gonorrhoeae* o *Chlamydia trachomatis* y con los géneros *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Enterococcus* (42,43). Las prostatitis incluyen síntomas urinarios irritantes (polaquiuria, urgencia miccional, disuria) y síntomas urinarios obstructivos (vaciado incompleto, dificultad de inicio miccional, esfuerzo para orinar); también puede existir dolor en la región suprapúbica, perineal o genitales externos y síntomas sistémicos como fiebre, náuseas, malestar, vómito y signos de sepsis como taquicardia e hipotensión (42). El tratamiento clásico consiste en el suministro de antibióticos con buena penetrancia tisular, tales como las fluoroquinolonas y en el caso de la prostatitis tipo I también se pueden usar derivados de la penicilina (42). A diferencia de la prostatitis aguda, la prostatitis crónica es un proceso persistente que dura más de 3 meses. Algunos estudios sugieren que las *E. coli* encontradas en la prostatitis crónica, tienen mayor capacidad de formación de *biofilms* lo cual las hace más resistentes a los

antibióticos (42). Aún hasta la actualidad las prostatitis bacterianas presentan una patología difícil de tratar, con frecuente recidiva y graves efectos sobre el estilo de vida de los pacientes.

B. Hiperplasia Prostática Benigna (BPH)

La BPH es una patología que resulta de un proceso proliferativo exacerbado que ocurre en la zona de transición de la próstata. Como consecuencia, se produce un estrechamiento de la uretra prostática e irritabilidad del músculo detrusor de la vejiga, dando lugar a los síntomas del tracto urinario bajo (LUTS). Ellos incluyen principalmente dificultades para orinar y, en menor medida, irritabilidad al orinar (frecuencia, urgencia, incontinencia) (2,30). La alta incidencia y la falta de tratamientos no invasivos eficaces, sitúan a esta patología dentro de las problemáticas del siglo XXI. Se estima que el 50% de los hombres mayores a 50 años padece síntomas correspondientes a la BPH y esta frecuencia aumenta un 10% por cada década de vida. A pesar de que el tratamiento farmacológico ha demostrado importantes mejoras y una disminución significativa en la necesidad de terapias invasivas, existe un número significativo de pacientes que termina siendo tratado mediante cirugía (44,45).

Histológicamente, los 3 fenotipos más comunes de BPH son glandular, estromal y de células basales, según el tipo celular predominante, siendo el de células basales el menos frecuente, representando solamente entre el 8 y 10% de las hiperplasias. Si bien las hiperplasias glandulares puras son más comunes que las estromales puras, la mayoría de las hiperplasias son consideradas mixtas, presentando células de ambos compartimientos. A su vez, existe una relación entre el tamaño glandular y el tipo celular que prolifera, siendo las hiperplasias de mayor tamaño generalmente las de origen epitelial (2). Si bien desde hace tiempo se le atribuyó a los andrógenos un rol central en la etiopatogenia de la BPH, hoy se reconoce la existencia de diversos factores incluyendo factores hormonales, metabólicos e inflamatorios los cuales podrían participar activamente (46). Entre los factores hormonales, se sostiene que la testosterona promueve un incremento en la proliferación; sin embargo, el hecho de que la mayor incidencia de esta patología ocurra en la etapa adulta coincidente con un descenso en los niveles de testosterona genera cierta controversia. Se ha propuesto que la disminución en la relación andrógenos/estrógenos que ocurre en la vejez podría jugar un papel preponderante en el desarrollo de la hiperplasia (12). En cuanto a los factores

metabólicos, se ha demostrado un vínculo entre dislipemias y factores de riesgo cardiovascular con la BPH; en particular, se ha sugerido un fuerte protagonismo de la enfermedad vascular pélvica en la BPH (30). Por su parte, análisis histológicos de próstatas con BPH han demostrado gran cantidad de infiltrado inflamatorio, sugiriendo que el proceso inflamatorio sería responsable de mantener un estado proliferativo en la glándula (30). De hecho, en nuestro laboratorio hemos demostrado aumento en la tasa proliferativa de CMLp *in vitro* en respuesta a la inflamación (47). Probablemente todos estos factores estén sosteniendo la proliferación descontrolada, sin que todavía se demuestre fehacientemente cuál es el factor más preponderante.

Actualmente las terapias farmacológicas más eficaces para tratar la BPH son los inhibidores de receptores alfa adrenérgicos (alfa bloqueantes) y los inhibidores de la enzima 5-alfa reductasa (5ARI). Los inhibidores de los receptores alfa adrenérgicos actúan relajando las CMLp y por ende se han demostrado mejores resultados en hiperplasias estromales (48). Los 5ARI, introducidos al mercado en 1993, son capaces de inhibir en un 97% la síntesis del andrógeno DHT; este andrógeno es entre 5 y 10 veces más potente que la testosterona según el tipo celular. Los 5ARI inducen la apoptosis de células epiteliales por lo que los pacientes que mejor responden a estos fármacos son aquellos que presentan próstatas mayores a los 40cm³, las cuales generalmente presentan hiperplasia por crecimiento glandular. Terapias menos frecuentes para la BPH incluyen el recientemente aprobado inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5-I) (30) y los medicamentos fitoterapéuticos que han mostrado mejoras importantes en pacientes con esta patología (49). El descubrimiento de biomarcadores y nuevas terapias farmacológicas para esta patología han sido los dos objetivos principales propuestos en el plan estratégico de próstata en la reunión del NIDDK del 2008, y hasta la fecha siguen siendo las metas primordiales (2).

A pesar de los avances en el campo de la farmacología, hasta la fecha el tratamiento por excelencia es la resección transuretral de la próstata (RTU o TURP). El éxito de esta cirugía es en general muy alto, con una necesidad de repetición menor al 1% por año (30). Entre las posibles complicaciones de esta cirugía se encuentra la incapacidad para orinar luego de la operación (necesidad de catéter), hemorragia e infección del tracto urinario. Debido a que la resección también abarca partes del cuello de la vejiga y el esfínter preprostático, el paciente tendrá eyaculación retrograda posterior a este procedimiento.

Complicaciones raras incluyen disfunción eréctil e incontinencia debida a resección inadvertida del esfínter externo (1,30).

C. Estudios experimentales en modelos de prostatitis bacteriana y BPH.

Si bien la principal especie utilizada en la actualidad para modelar patologías humanas son las ratas y los ratones, el estudio de las patologías prostáticas a través de modelos en estos animales presenta ciertas dificultades inherentes a las diferencias entre las especies. En primer lugar, a diferencia de la próstata humana que es una estructura compacta, estos roedores poseen una glándula multilobulada que consiste en 2 lóbulos ventrales, 2 laterales, 2 anteriores y 2 dorsales (Figura 2), las cuales presentan ciertas diferencias en cuanto a sus orígenes embriológicos comparadas con la glándula humana; en particular la próstata ventral de rata no presenta una correlación directa con la próstata humana (10,50). Por otro lado, la glándula humana está rodeada por una cápsula fibromuscular, ausente en los roedores, la cual se cree que tiene un papel principal en los LUTS que ocurren durante la BPH. Otras dificultades incluyen la falta de expresión de PSA, el cual ha sido un importante biomarcador de crecimiento prostático humano, y la carencia de andrógenos adrenales como el dehidroepiandrosterona (DHEA) (27).

A pesar de estas diferencias, las ratas y ratones son muy similares a nivel celular y en cuanto a la función de la glándula prostática, debido a ello representan una herramienta para modelar las prostatitis bacterianas humanas. La inoculación bacteriana con *E. coli* en diversos lóbulos de la próstata de ratas Wistar es una metodología importante, capaz de reproducir la secreción de citoquinas inflamatorias y el infiltrado de células del sistema inmune, principalmente macrófagos y neutrófilos, que invaden la estroma glandular e incluso la luz de los acinos. A nivel histológico, luego de la infección bacteriana, se observa una disminución en el lumen acinar, atrofia de células epiteliales y engrosamiento de la capa muscular que rodea al acino (41,51). Alternativamente, la inoculación intraprostática con el lipopolisacárido LPS, molécula presente en las paredes de las bacterias Gram negativas, es capaz de reproducir los efectos celulares estimulados por las propias bacterias en un ambiente estéril (52). El estímulo con LPS sobre células prostáticas *in vitro* es un buen modelo para estudiar los mecanismos celulares que subyacen a la inflamación bacteriana (47).

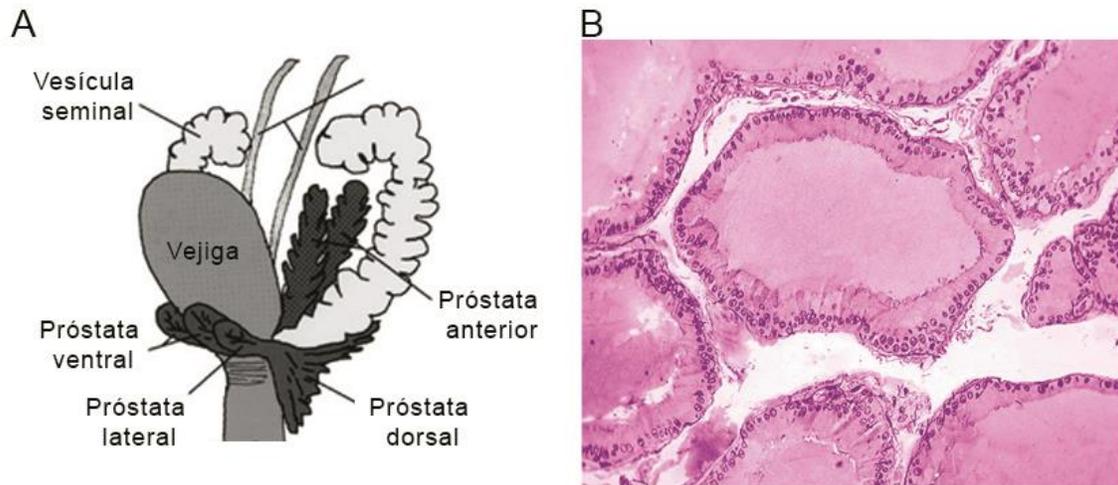


Figura 2. Esquema de la próstata de rata y microfotografía de la próstata ventral de rata. A. Esquema de la próstata de rata en donde se observan los cuatro pares de lóbulos que la conforman y su ubicación en cuanto a la vejiga urinaria (10). **B.** Microfotografía del lóbulo ventral de la próstata de rata teñido con hematoxilina/eosina en donde se observan células epiteliales columnares rodeando los acinos y un escaso estroma en los espacios interacinares.

Al igual que para la prostatitis, los roedores también han sido utilizados para modelos de BPH, sin embargo para esta patología existen importantes estudios realizados en distintas razas de perros. Los perros al igual que los humanos y los primates no humanos, desarrollan BPH de manera espontánea con la edad; tanto en perros como en ratas, esta patología puede inducirse mediante administración hormonal de andrógenos, solos o en combinación con estrógenos, o de compuestos cancerígenos (50). Existen a su vez, estudios con xenoinjertos y con varios modelos de animales transgénicos que simulan la proliferación celular presente en esta patología (27). Los estudios *in vitro* de células epiteliales y estromales provenientes de estos animales también representan una importante fuente de conocimiento. Además, debido a que muchos pacientes son tratados quirúrgicamente, la posibilidad de obtener muestras de tejido y de cultivar células provenientes de próstatas hiperplásicas humanas, se presenta como una herramienta muy eficaz para entender los mecanismos celulares que gobiernan esta patología (50).

II. TESTOSTERONA: Generalidades y efectos en la próstata

1. Síntesis y Función

Dentro del grupo de las hormonas esteroideas, los andrógenos son el conjunto de hormonas compuestas por un esqueleto de 19 átomos de carbono, y al igual que las demás hormonas esteroideas, su estructura química de 4 anillos se basa en el hidrocarburo policíclico ciclopentanoperhidrofenantreno (53). Los andrógenos son hormonas sexuales; como tal, su principal función es inducir el correcto desarrollo de los órganos reproductores internos y externos del sexo masculino y estimular el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios así como el comportamiento sexual masculino (54). A finales de la década de 1920 y durante la década de 1930 se logró por primera vez purificar testosterona en laboratorio; a partir de este avance, las investigaciones científicas en el área de la endocrinología y andrología llevaron a entender ampliamente sus funciones fisiológicas, mecanismos de acción y su importancia para la medicina (55). La testosterona es el andrógeno más común en la sangre humana, encontrándose en concentraciones 10 veces mayores a las de la DHT (56). Los niveles circulantes de testosterona están estrictamente regulados por el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal de la siguiente manera: la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) producida en el hipotálamo, viaja hasta la hipófisis donde estimula la liberación de la hormona luteinizante (LH) por las células gonadotropas; esta hormona liberada al torrente sanguíneo llega a los testículos para inducir la síntesis y secreción de testosterona por las células de Leydig (57). La testosterona a su vez ejerce una fuerte retroalimentación negativa sobre el núcleo paraventricular del hipotálamo así como sobre la hipofisarias ejerciendo una autorregulación del eje (57,58).

A lo largo de la vida del macho, la secreción de testosterona ocurre en picos discretos, el primer pico ocurre durante la embriogénesis poco después de la diferenciación de las células de Leydig (59), lo que en humanos sucede a partir de la semana 8-9 de gestación (60). Posteriormente los niveles hormonales disminuyen gradualmente hasta las horas posteriores al nacimiento, momento en el cual ocurre el segundo pico de secreción y luego los niveles de testosterona bajan rápidamente. El tercer pico ocurre en la pubertad y posteriormente los niveles se mantienen elevados a lo largo de la vida adulta con una disminución en la vejez (61). En un hombre adulto, la concentración de testosterona en plasma se encuentra en el orden de 1×10^{-6} M, sin embargo debido a que la mayor parte viaja

unida a albumina y a la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), la fracción de testosterona que viaja libre y biodisponible está en el orden de $1 \times 10^{-8} \text{M}$ (62).

La síntesis de andrógenos tanto en el humano como en la rata se produce en un 95% por las células de Leydig en los testículos, las cuales producen aproximadamente entre 5 y 10 mg por día (63-65). El porcentaje restante se sintetiza en la corteza adrenal y en menor medida en células de distintos órganos periféricos. A nivel celular, la síntesis de los andrógenos incluye varios pasos discretos (Figura 3); el primero de ellos es la entrada del colesterol a la membrana interna de la mitocondria mediante la enzima transportadora StAR. Dentro de la mitocondria la enzima P450_{scc} (20,22 desmolasa) transforma el colesterol en pregnenolona la cual una vez fuera de la mitocondria se convierte en 17α -hidroxipregnenolona por acción de la enzima 17α -hidroxilasa. Este progestágeno luego se convierte en DHEA, el mayor andrógeno producido por la corteza adrenal, y este último en androstenediona (AD), ambos procesos mediados por enzimas de la familia de P450 (66). Finalmente la AD se convierten en testosterona en el retículo endoplasmático liso principalmente de las células de Leydig (67). La testosterona puede a su vez convertirse en la forma más activa DHT mediante las enzimas 5α -reductasas en el interior de la célula blanco (68,69). La enzima 5α -reductasa tipo II se encuentra mayormente en la próstata, órgano en el cual las concentraciones de DHT son incluso mayores a las de testosterona; particularmente las células estromales prostáticas son las encargadas de la producción de DHT, siendo capaces de producir 10 veces más DHT que las células epiteliales (56). Por otro lado la enzima aromatasa es capaz de producir 17β -estradiol a partir de testosterona (70). La alta producción de andrógenos se contrarresta con una alta eliminación de estas hormonas; la excreción de testosterona y sus derivados fue demostrada mediante ensayos con testosterona radiactiva, en los que se comprobó que el 90% de la hormona exógena inyectada fue liberada luego de 24 horas (63). A su vez ensayos en individuos castrados demostraron que en humanos, la vida media de la testosterona en plasma es de aproximadamente 8 horas (71).

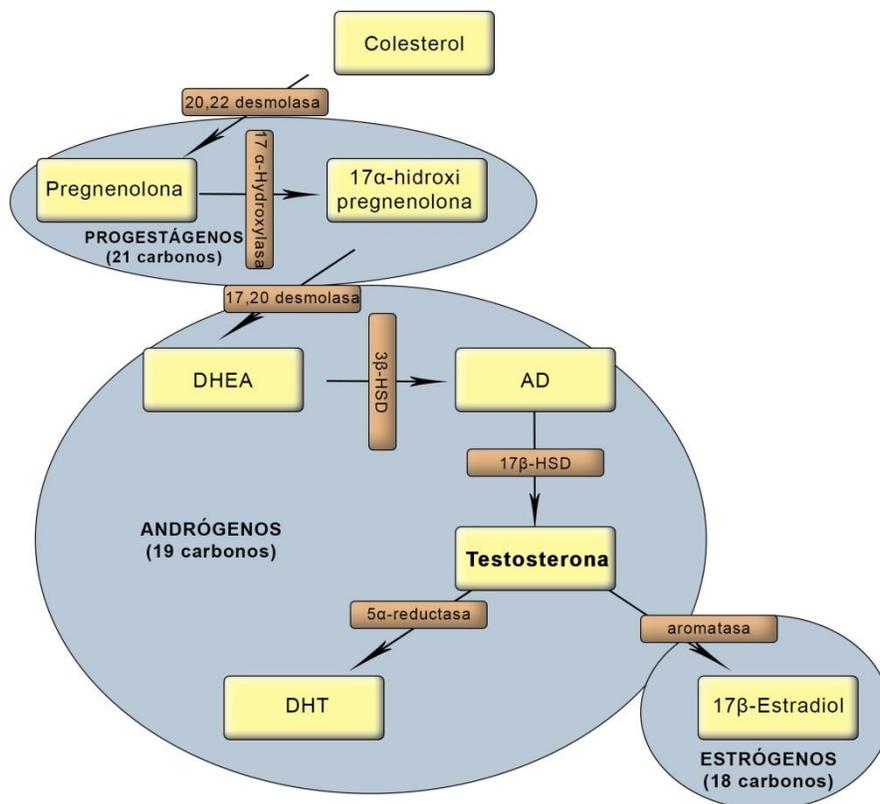


Figura 3. Esquema de la biosíntesis de testosterona a partir de colesterol. Existen cuatro vías reconocidas para la síntesis de testosterona, en este esquema se representa la vía celular preferencial. Los recuadros amarillos representan las hormonas o productos intermediarios de la síntesis, mientras que los recuadros marrones se representan las enzimas involucradas en cada paso. DHEA: dehidroepiandrosterona, AD: androstenediona, 3β-HSD: 3β-hydroxysteroid dehydrogenase, 17β-HSD: 17β-hydroxysteroid dehydrogenase DHT: dihidrotestosterona. Adaptado de Boron y Boulpaep 2012 (70).

2. El receptor clásico de andrógenos (AR)

El AR, también conocido como NR3C4, en conjunto con otros receptores de hormonas esteroideas, como el receptor alfa de estrógenos (ER α) y beta (ER β), el de glucocorticoides (GR), el de mineralocorticoides (MR) y el de progesterona (PR) conforman la subfamilia 3 dentro de la súper familia de receptores nucleares (72,73). El gen codificante para el AR fue descubierto en 1988 mediante el uso de una sonda de DNA homóloga para otros receptores de hormonas esteroideas, a partir de este fragmento codificante se llevó a cabo una transcripción y traducción mediante sistemas libre de

células para obtener la primer fracción purificada de AR (74,75). El AR es una proteína de 919 aminoácidos, tiene un peso aproximado de 110kDa y está codificada en el cromosoma X (q11-q12) por los 8 exones que comprenden el gen del receptor de andrógenos (60) (Figura 4). La función del AR es la detección de andrógenos y la posterior inducción de respuestas celulares tejido específico. Si bien se encuentra presente en la mayoría de las células del organismo, su expresión es mayor en los órganos reproductores (72). Presenta un papel primordial en el desarrollo del fenotipo masculino, tanto de sus órganos sexuales como en el posterior comportamiento sexual y desarrollo de caracteres sexuales secundarios. Esto se ha comprobado en ratones machos *knock out* para AR (AR^{-/-}), los cuales muestran un fenotipo femenino incluyendo órganos genitales externos femeninos y carencia de vesícula seminal, vas deferens, epidídimo y próstata, mientras que los testículos se encuentran en el abdomen con la espermatogénesis arrestada en el paquiteno de la profase I. A su vez, estos ratones AR^{-/-} presentan pérdida total del comportamiento sexual y una disminución en el comportamiento agresivo (72).

Estructuralmente, el AR está compuesto por cuatro dominios funcionales (Figura 4): El **dominio N-terminal (NTD)** (dominios A y B) (aa 1–558) (60) es una región variable cuya longitud depende entre otras cosas de la longitud de los fragmentos de poliglutamina y de poliglicina. El fragmento de poliglutamina varía entre 8-31 aminoácidos y es responsable de la enfermedad de Kennedy cuando excede los 40 aminoácidos de longitud (60). A su vez ciertos trabajos han relacionado la longitud del fragmento de poliglutamina con mayor riesgo a BPH cuando es menor o igual a 19 aminoácidos, mayor riesgo de cáncer de próstata si es menor a los 18 aminoácidos y defectos en la espermatogénesis cuando supera los 28 aminoácidos (60). A su vez, en este dominio se encuentra la región de activación AF-1 que actúa como sitio de unión a correguladores transcripcionales. AF-1 puede funcionar independiente de la unión al ligando (72); dentro de la región AF-1 se encuentran las regiones TAU1 y TAU5 las cuales son necesarias y suficientes para inducir la transcripción y hacen que el dominio N-terminal sea un potente activador transcripcional (76). Este dominio comprende la región más activa como superficie de interacción con correguladores (77) en particular en las secuencias anfifálicas de aminoácidos ²³FQNLF²⁷ y ⁴³³WHTLF⁴³⁷ (60). A continuación del dominio N-terminal se encuentra el **dominio de unión al DNA (DBD)** (domino C) (aa 559–624) (60), este dominio presenta dos dedos de

zinc, el primero de ellos coordina la unión específica con sitios del ADN, mientras que el segundo participa en la formación del homodímero de AR mediante contacto entre los DBD (60). El **dominio bisagra** (dominio D) (aa 625–676) (60) es importante para la migración del receptor al núcleo posterior a la unión al ligando ya que contiene secuencias de localización nuclear (NLS). Finalmente, en el extremo C-terminal se encuentra el **dominio de unión al ligando (LBD)** (dominio E) (aa 677–919) (60,72), consiste en 12 hélices alfa que forman el bolsillo hidrofóbico para la unión del ligando (72,78). A su vez, presenta una señal de exportación nuclear entre los aminoácidos 742 y 817, la cual en ausencia del ligando funciona con mayor fuerza que las señalizaciones de localización nuclear para mantener al receptor en el citoplasma (60). En esta región también se encuentra el AF-2 que es un sitio clave para unión de cofactores y a diferencia de AF-1, actúa de manera dependiente de ligando (60) . Un estudio interesante realizado mediante transfecciones de distintos dominios del AR, ha demostrado el comportamiento de cada uno de ellos en cuanto a su localización subcelular en presencia o ausencia de testosterona (79).

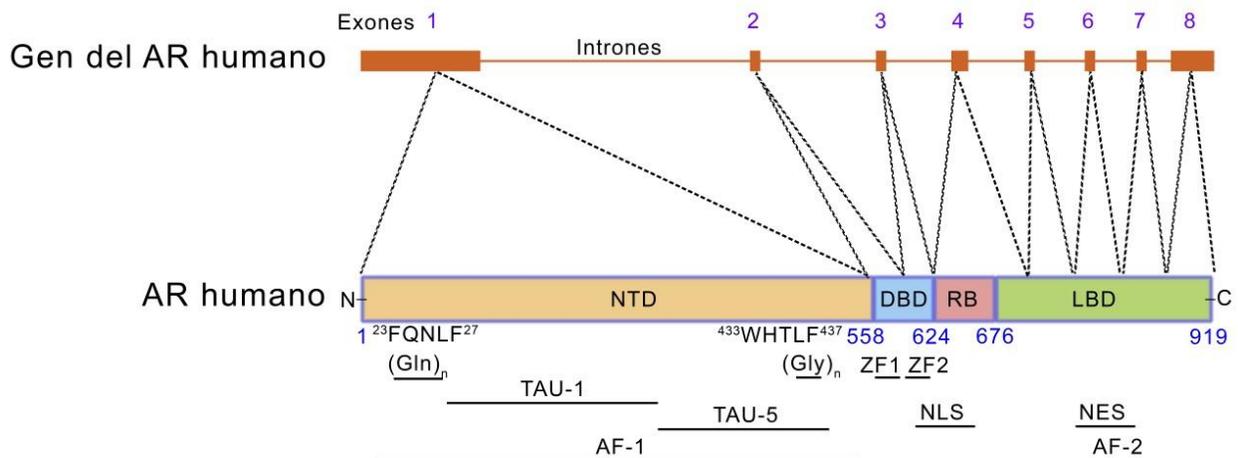


Figura 4. Representación del gen y de la proteína de AR humana. Se muestra la ubicación de los siguientes dominios en la estructura tanto del gen como de la proteína: NTD: dominio N terminal, DBD: dominio de unión al ADN, RB: región bisagra, LBD: dominio de unión al ligando, $(Gln)_n$: secuencia poliglutamina, $(Gly)_n$: secuencia poliglicina, NLS: secuencia de localización nuclear, NES: secuencia de exportación nuclear, ZF1: dedo de zinc 1, ZF2: dedo de zinc 2, AF-1: factor de activación 1, AF-2: factor de activación 2. Adaptado de Bennett y colaboradores 2010 (60); Haile & Sadar 2011 (80); Lonergan & Tindall 2011 (81); Gao (2011) (82)

En ausencia de testosterona, el AR se encuentra distribuido principalmente en el citosol unido a chaperonas como HSP90, HSP70 o p23, y a los microtúbulos del citoesqueleto (83,84). La unión de la testosterona induce cambios conformacionales en el receptor que son críticos para la translocación nuclear, la fosforilación, la homodimerización y la interacción con el ADN (77,85). Cambios en las hélices 3, 4 y 12 del LBD permiten la unión a regiones específicas del dominio N-terminal, lo que lleva a la liberación de HSP y a la unión de coactivadores en las secuencias de localización nuclear (60). Además del LBD, los dominios DBD y el dominio bisagra presentan afinidad por la proteína de citoesqueleto filamina A (FlnA), la cual participa activamente en la migración del AR al núcleo, como fue demostrado en células negativas para FlnA las cuales son incapaces de la translocación nuclear del receptor (60). Las modificaciones que sufre el LBD y por ende el tipo de coactivadores que se unen al AR así como su unión al ADN, dependen de la estructura del ligando (72). La migración del AR concluye cuando se une a regiones específicas de ADN con la consiguiente activación génica (60).

Los AR son factores de transcripción activados por unión a su ligando, capaces de modular la expresión génica de manera tejida específica mediante la unión a elementos de respuesta a andrógenos (ARE) ubicados en el ADN (72) (Figura 5). Los ARE son regiones reguladoras ubicadas en elementos promotores o *enhancers* de los genes *target*, compuestas por secuencias palíndromas con el siguiente orden 5'-AGGTCA NNN TGACCT-3' (72). Algunos de los genes *target* más conocidos son PSA, TMPRSS2, KLK2 y hK2 (76). En el núcleo, el AR se encuentra formando homodímeros, aunque se han reportado casos de heterodimerización con proteínas como el ER α (60), el receptor testicular 4 (60) o el ER β (86). Una vez unido a los ARE, se facilita el reclutamiento de histonas aciltransferasas (HATs), demetilasas, quinasas y otros correguladores así como la maquinaria de transcripción, los cuales permiten modular la expresión génica (60,87). Se ha demostrado que la actividad genómica del AR depende de la fosforilación de las serinas 213, 506 y 650 (60,88). Finalmente la liberación del ligando permite que se vuelvan a exponer los sitios de exportación nuclear y que el receptor sea reciclado al citosol para unirse al citoesqueleto y prepararse para la unión con el siguiente ligando (60). Alternativamente, si el AR no es reciclado después de la señalización, puede ser marcado para ser degradado en proteosomas, para lo cual requiere de la fosforilación de residuos específicos (60). La unión

del ligando induce fosforilación en los residuos de serina (Ser80, Ser93, y Ser641) las cuales protegen al receptor de la degradación proteolítica (60).

Entre los principales correguladores del AR se encuentran las enzimas que modifican histonas induciendo modificaciones epigenéticas como la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, glicosilación y ribosilación del ADP. Dentro de estos, los correguladores más caracterizados para el AR son la histona acetil transferasa (HAT) p300/CBP y los miembros de la familia p160/SRC (60). También ha sido reportado el importante efecto de las enzimas demetilasa KMD1A al encargarse de la demetilación de la lisina 9 en la histona 3 (K9H3) para inducir la activación de la transcripción (89). Además de las modificaciones sobre las histonas, este grupo de coactivadores es capaz de producir efectos post-traduccionales sobre el mismo receptor; la acetilación del receptor ha sido vinculada con la agregación y con la neurotoxicidad presentes en la enfermedad de Kennedy (90). Otros tipos de correguladores del AR son proteínas involucradas en el *splicing* y degradación del ARN, componentes de vías de sumoilación, chaperonas, reguladores del ciclo celular y la apoptosis, proteínas quinasas y fosfatasa, supresores tumorales, oncogenes entre otras (72).

Al igual que otros receptores de hormonas esteroideas, el gen del AR genera una gran cantidad de variantes, con distinto grado de importancia para el mantenimiento de la homeostasis glandular. En 1994 se describieron las dos isoformas del AR que se expresan a la par en células normales, estas son AR-A y AR-B. AR-B es la proteína de 919 aminoácidos traducida a partir del gen completo de AR, mientras que AR-A es una isoforma de 87KDa carente en una porción de 187 aminoácidos del dominio N-terminal, se expresan en una proporción aproximada de 8:1, siendo AR-B la mayoritaria en todos los tejidos (91). Se cree que el AR-A se genera por una iniciación de la transcripción génica en un codón alternativo, la metionina 188 (91). Por otro lado, existen muchas variantes provenientes de *splicing* alternativo de ARNm, entre ellas la variante ARV7 ha sido una de las más vinculadas con la resistencia del cáncer de próstata a la castración (92). La mayoría de estas variantes son resultado de porciones faltantes en el extremo C-terminal, siendo muy crítica la ausencia del dominio LBD ya que las hace reactivas sin necesidad de unión al ligando (92). Existen variantes, entre ellas AR45 y ARV8, las cuales presentan alteraciones en el extremo N-terminal o en el dominio DBD y que podrían estar

involucradas en la señalización mediante vías no genómicas (93,94). Además, se han descrito numerosas mutaciones del AR, las cuales en muchos casos se han relacionado con patologías prostáticas (95).

3. Vías no genómicas de señalización de testosterona

A. Definición y primeras evidencias.

A partir de la segunda mitad del siglo XX una gran cantidad de trabajos comenzaron a describir las vías no genómicas de señalización de testosterona, también conocidas como no clásicas o rápidas. Mientras que la señalización genómica es la que ocurre cuando el AR reconoce a su ligando y migra al núcleo para actuar como factor de transcripción (explicada en el apartado anterior), las vías no genómicas de señalización de testosterona son un grupo de vías que actúan de manera independiente de la transcripción génica o dependiente de ella mediante factores de transcripción distintos al AR, o en caso de ser a través del AR esto ocurre por transactivación del receptor y no por unión directa con el ligando (Figura 5) (96-101). En el caso de ser mediado por transcripción génica la señalización no genómica puede actuar mediante activación de segundos mensajeros y transducción de señales, las cuales culminan activando factores de transcripción. Cuando estas vías actúan completamente independiente de la transcripción génica, se ha reportado que lo pueden hacer mediante la apertura de canales iónicos a nivel de la membrana plasmática (102), modificando el citoesqueleto (103), activando eNOS (104), o en el caso del ovocito de *Xenopus laevis*, este tipo de señalización promueve la meiosis permitiendo la maduración de estas células germinales (105). A diferencia de los receptores mediadores de las vías genómicas que migran entre el citosol y el núcleo, existe una gran cantidad de evidencia que indica que los receptores que median las vías no genómicas, se encuentran en la superficie celular en cercanías o atravesando la membrana plasmática (106).

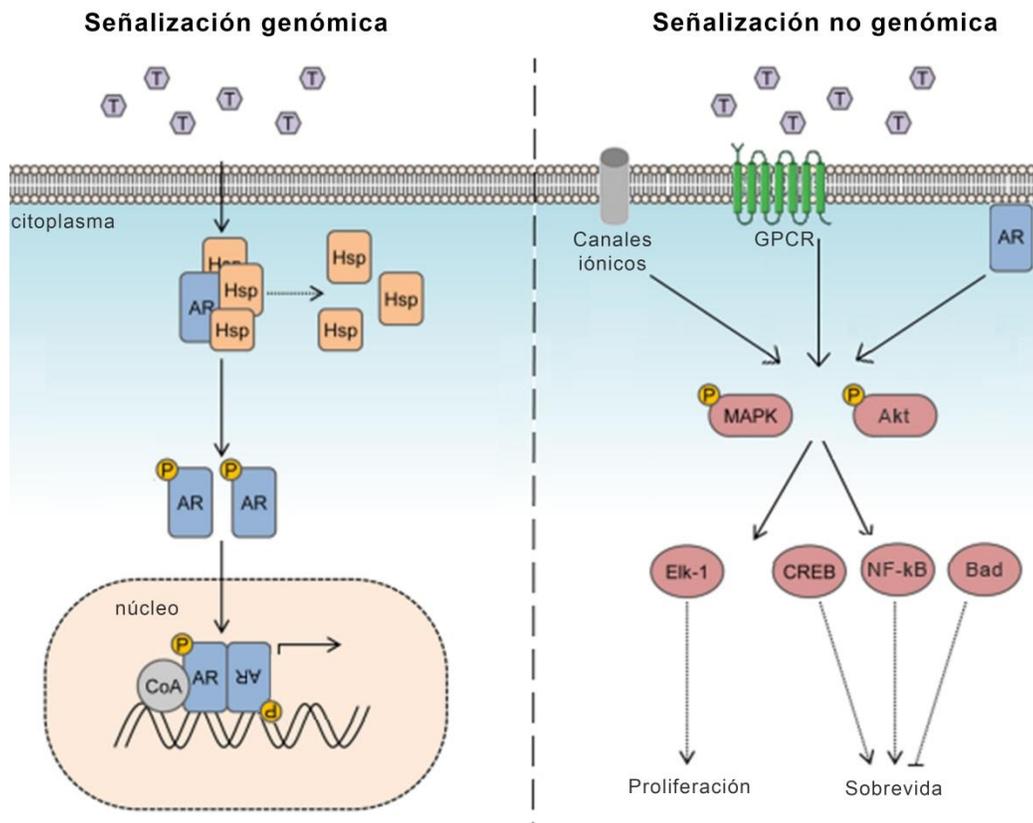


Figura 5. Vías genómicas y vías no genómicas de testosterona. Esquema representativo de las vías genómicas y no genómicas de testosterona, sus receptores y mediadores. T: testosterona; AR; receptor clásico de andrógenos; Hsp: *heat shock proteins*; CoA: co-activadores; P: grupo fosfato. Adaptado de Leung y Sadar 2017 (107).

Las primeras evidencias de señalización no genómica de hormonas esteroideas surgieron en la década de 1960. Los trabajos de Szego y Davis describieron que la inyección de 17β -estradiol induce un incremento en los niveles de AMPc en útero de ratas ovariectomizadas luego de 15 segundos (108). En la misma época Means y Hamilton demostraron que inyecciones de 17β -estradiol incrementaban la síntesis de ARN luego de un periodo de entre 2 y 30 minutos (109). En la misma década, los trabajos de Klein y Henk demostraron efectos cardiovasculares a los 5 segundos de administración de aldosterona, y estudios *in vitro* en eritrocitos demostraron que esta hormona era capaz de modular el intercambio de sodio (101). Diez años más tarde, Pietras y Szego publicaron resultados indicando la presencia de sitios de reconocimiento a estrógeno en la superficie de células de endometrio (110), al mismo tiempo que Suyemitsu y Tarayama demostraron unión de

glucocorticoides en la membrana plasmática de células de hígado (111). A mediados de la década de 1970 Liang y Liao vincularon a los andrógenos con efectos celulares rápidos; mediante inyecciones de 15µg de DHT demostraron que luego de 10 minutos ocurre una activación de la maquinaria de síntesis proteica en la próstata ventral de rata (112). En los años siguientes y hasta la actualidad, se ha profundizado en el conocimiento de estas vías de señalización, la identificación de sus receptores y su función en la fisiología.

B. Tipos de receptores que median vías no genómicas.

A partir de los últimos años de la década de 1990 surgieron varios estudios demostrando la presencia de receptores para testosterona en la superficie de diversos tipos celulares utilizando el conjugado testosterona-albumina sérica bovina-FITC (102,113-116). La identidad de dichos receptores comenzó a resolverse en la década siguiente y es aún un tópico en discusión (117). El AR (descrito en la sección II.2) es hasta la fecha uno de los receptores más estudiados como mediador de las vías no genómicas de testosterona, el cual además de su participación en las vías genómicas, se ubicaría en cercanías de la membrana plasmática y podría desencadenar señalización intracelular independientemente de su función como factor de transcripción. Este mecanismo fue descrito por primera vez utilizando un agonista y un antagonistas para el AR en células prostáticas LNCaP, las cuales respondían a testosterona con un incremento en la concentración de calcio (118). Si bien en algunos casos los antagonistas específicos del AR han demostrado comportarse como agonistas de las vías no genómicas (119), se han reportado situaciones en donde estas moléculas son capaces de ejercer su rol inhibitorio, como es el caso de la inhibición de Src por nilutamida (104) o la inhibición de la fosforilación de Akt, ERK1/2 y MEK por hidroxiflutamida (105,120). Por otro lado, técnicas de inmunomarcación han afirmado la presencia del AR en la membrana plasmática de diversos tipos celulares (104,121,122). A su vez, el uso de ARN de interferencia dirigido específicamente contra el AR corroboró su participación en la activación de vías no genómicas, inhibiendo la fosforilación de Src (104). Además, estudios en células musculares lisas de intestino demostraron que la testosterona induce actividad contráctil mediante mecanismos no genómicos, los cuales son inhibidos por los bloqueantes de AR flutamida y acetato de ciproterona, pero no por los inhibidores de síntesis proteica cicloheximida y actinomicina D (123). Se ha postulado que

el AR presente en la superficie celular se encuentra unido a caveolina-1 en los *rafts* lipídicos, esta unión dependiente de modificaciones post-traduccionales como la palmitoilación y la miristoilación podría ser la responsable de mantener al receptor en la superficie y facilitar su comunicación con moléculas que participan en la cascada de señalización como Akt y Src (121,124). Estudios de los grupos de Marino y Levin demostraron que para que el receptor llegue hasta la superficie celular, es necesario que sufra un proceso de palmitoilación (agregado de ácido palmítico) en la cisteína 807 (121,125). De esta manera el receptor aumenta la hidrofobicidad y podría migrar hasta la superficie celular para ubicarse en los *raft* lipídicos de la membrana plasmática (126). Aún en la actualidad existen objeciones sobre la posibilidad de que el AR se encuentre inserto en la membrana, basadas principalmente en que los receptores esteroideos no poseen un sitio transmembrana. Sin embargo, un modelo computacional demostró posibles sitios hidrofóbicos del AR que le permitirían atravesar la bicapa lipídica (127), faltando aún una corroboración de este modelo en un sistema biológico. Además de la membrana plasmática, el AR se encuentra en varias organelas como mitocondrias y retículo endoplasmático (128). Interesantemente, se demostró que dosis fisiológicas de testosterona ejercen una retroalimentación positiva, aumentando la cantidad de receptores en la superficie celular en células de Sertoli (120), hallazgos similares demostraron aumento de receptores unidos a caveolina luego de la estimulación androgénica (124).

Existen otros tipos de receptores vinculados con la señalización no genómica de testosterona además del AR que merecen ser mencionados (tabla 2). Varios trabajos vinculan al gran grupo de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) con la señalización no genómica por parte de los andrógenos (129,130); en particular el grupo de Quarles describió la señalización no genómica de testosterona mediada por GPRC6A, demostrado mediante ratones KO y ARN de interferencia (131). Recientemente Thomas y Berg describieron la participación del transportador de zinc ZIP9 como receptor capaz de mediar la señalización de testosterona iniciada en la membrana plasmática (132,133). Otros receptores descritos como posibles intermediarios de esta señalización son: el canal iónico TRPM8 (134) y el receptor de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBGR) (135).

Tabla 2. Principales receptores involucrados en las vías no genómicas de testosterona.

Receptores	Tipo de molécula	Tipo Célula	Función	Metodología experimental disponible	Primer evidencia como receptor de MISS
AR	Familia de receptores nuclear	Próstata, testículo. LNCaP	Inducción de proliferación celular en células epiteliales de la próstata.	Anticuerpos específicos. Animales KO ^{-/-} para DBD del AR	
GPRC6A	Receptor transmembrana de 7 dominios	líneas celulares de cáncer de próstata	Promueve la progresión del cáncer en modelos de xenoinjertos.	Anticuerpos específicos, Animales KO ^{-/-} . Agonista específico	Darryl L. Quarles
ZIP9	Canal de zinc	Mayor expresión en páncreas, testículo, glándula pituitaria. En línea celular LNCaP, MDA-MB-231 y T47D.	Inducción de apoptosis en LNCaP. Migración celular.	siARN, anticuerpos específicos	Peter Thomas
TRPM8	Canal de calcio	Células epiteliales de próstata, neuronas hipotalámicas neuronas del ganglio de la raíz dorsal, LNCaP.	Regula la homeostasis del calcio en próstata. Induce apoptosis.	Anticuerpos específicos. Transfecciones para sobreexpresar o con siARN.	Eleonora G. Zakharian
SHBGR	GPCR	Próstata	Promueve la proliferación celular.	Anticuerpos específicos	

C. Vías de señalización y factores de transcripción

La transducción de señales representa el principal mecanismo usado por las vías no genómicas con el fin de modificar la expresión génica, siendo la activación de cada una de estas vías dependiente del tipo celular. Una vez activados los receptores de membrana, se produce un incremento en la concentración de calcio (102,136) y/o activación de moléculas próximas a la membrana plasmática como Src (137,138), PI3K (129,139) o distintos tipos de proteínas G (129,140). La señalización cascada abajo continúa activando distintas vías, entre ellas las vías de las MAPK (137,141), PI3K/Akt (139,142) y rho/ROCK (143). Finalmente estas vías culminan en la activación de factores de transcripción como Elk-1

(144), NF- κ B (139) y CREB (145), los cuales se encargan de regular la transcripción génica. Se ha observado que para inducir la activación de distintas vías de señalización, el AR necesita asociarse con otros receptores a nivel de membrana como el EGFR para activar la vía de las MAPK (120,146) o los receptores de estrógenos para activar a Src (86).

D. Vías no genómicas en células prostáticas

La gran cantidad de estudios sobre vías no genómicas de testosterona publicados en los últimos 30 años ha generado un aporte considerable al conocimiento sobre este tipo de señalización; sin embargo, los efectos contrapuestos reportados sugieren que aún falta mucho trabajo para poder comprenderlas en su totalidad. Una gran parte de estos estudios han sido desarrollados en cultivos de líneas celulares prostáticas debido a su conocida dependencia por los andrógenos. Para tal fin se han utilizado principalmente las líneas tumorales epiteliales LNCaP (121,143), DU145 (139) y PC3 (134), mientras que muy pocos estudios se han desarrollado en cultivos celulares primarios de células normales o de células estromales prostáticas (144,146). Los resultados obtenidos en estas líneas celulares han sido contradictorios, si bien un gran grupo de investigadores ha relacionado a estas vías no genómicas con un incremento en la proliferación celular (86,147,148), existen otros que las vinculan a la activación de caspasas, vías apoptóticas y muerte celular (133,143,149). Por otro lado, se ha demostrado la capacidad de actuar sobre la migración celular, en un proceso dependiente de la concentración hormonal (150,151). Ciertas modificaciones del citoesqueleto han sido vinculadas con efectos directos de la testosterona sin interacción a nivel génico, en este caso las vías no genómicas de testosterona favorecen la polimerización del citoesqueleto de actina (116).

Los estudios *in vivo* son muy escasos por su dificultad, sin embargo existen algunos antecedentes, uno de ellos publicado por el grupo de Castanas, el cual reporto que la testosterona-BSA induce una disminución del tamaño tumoral en modelos de xenoinjertos con células LNCaP (149). Por otro lado, otra herramienta ha sido el uso de animales KO, un estudio con un ratón KO para el dominio DBD del AR demostró ausencia de señalización nuclear mientras que conservaba la capacidad de responder a DHT aumentando la fosforilación de ERK (152). A su vez se han desarrollado animales KO para GPRC6A, los cuales demostraron la importancia de este receptor en la secreción de insulina

en el páncreas y la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de testosterona en células de Leydig, ambos efectos inducidos por testosterona (153).

III. EFECTOS REGULADORES DE LA TESTOSTERONA.

Los andrógenos cumplen funciones claves en el desarrollo y fisiología de los órganos genitales en estrecha relación con su rol en la reproducción y el mantenimiento de caracteres sexuales masculinos secundarios. Además, los efectos endocrinos de los andrógenos incluyen el trofismo del músculo esquelético, la distribución de la grasa corporal y la regulación de masa ósea (53). Por otro lado, estas hormonas, y en particular testosterona, tienen acciones homeostáticas con fuertes repercusiones en la fisiología y fisiopatología no sólo en órganos andrógeno-dependientes sino en sitios considerados andrógeno-independientes. Resultados de nuestro laboratorio han puesto en evidencia este tipo de efectos, con un rol modulador de la respuesta inmune e inflamatoria.

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que el rol regulador de testosterona sobre la respuesta inflamatoria en la próstata, ocurre sobre la señalización de la vía de TLR4, receptor transmembrana para bacterias Gram negativas. Tanto en condiciones normales como en modelos de prostatitis bacteriana en ratas Wistar, se demostró que la castración produce un incremento en los niveles del receptor TLR4 (154,155) y de los componentes de sus vías de señalización, como las moléculas CD14 y MyD88 como así también de la translocación de NF- κ B al núcleo y de la expresión de péptidos antibacterianos como β -defensina y surfactante D (155). Esta regulación que ejerce testosterona sobre la inmunidad innata, indica una forma de controlar la inflamación a modo de protección del semen contra los efectos nocivos de la misma pero que disminuye la capacidad de defenderse contra patógenos. Como era de esperar, se demostró que el animal castrado resuelve de manera más eficiente la infección con *E. coli*, confirmando el rol modulador de la testosterona sobre la inmunidad innata (155,156); un efecto similar se corroboró mediante la administración de anti-andrógenos como finasteride a ratas inoculadas con *E. coli*, que reprodujo la disminución de la infección y del proceso inflamatorio por castración (156). Modelos *in vitro* en CMLp de rata corroboraron el rol modulador de la testosterona sobre la inflamación, mostrando una reducción significativa

tanto de las vías de señalización estimuladas por LPS como de la secreción de citoquinas inflamatorias y de la proliferación que este microambiente induce (47,157).

Estos hallazgos son coincidentes con los de otros autores. En un modelo de BPH, se demostró que las alteraciones histológicas, la inflamación y la hipoxia podían ser contrarrestadas mediante administración de testosterona (46). Varios estudios preclínicos demostraron también que el hipogonadismo por castración exagera la inflamación prostática y que esta puede ser regulada por administración de testosterona exógena (46). Estudios retrospectivos indicaron que la inflamación intraprostática es 5 veces más frecuente en pacientes hipogonádicos que en eugonádicos y a su vez resulta más severa (46). La administración de DHT demostró ser capaz de suprimir la respuesta inflamatoria y secreción de factores de crecimiento en células estromales provenientes de BPH *in vitro* (46). Animales KO en los que se suprime específicamente el AR de las células estromales mostraron el desarrollo de hiperplasia prostática caracterizada por infiltración leucocitaria (158).

Además del efecto anti-inflamatorio, los andrógenos manifestaron un rol modificador de las células estromales que se evidenció tanto en células en condiciones basales como frente a un desafío inflamatorio. En este sentido, en nuestro laboratorio se demostró, que el eje modificador de células musculares Miocardina/Factor de respuesta al suero (MYOCD/SRF) (159), se expresa en CMLp y que su expresión aumenta en respuesta a testosterona de manera dosis dependiente, así como ocurre con los marcadores musculares actina, calponina y leiomodina. Además, este efecto diferenciador de la testosterona evitó la dediferenciación de CMLp a miofibroblastos en respuesta a LPS (47). El efecto diferenciador no solamente previene la respuesta inflamatoria inducida por LPS sino que también la revierte (157).

Otro aspecto del rol modulador de testosterona que va de la mano del control de la respuesta inflamatoria se manifiesta actuando sobre la proliferación inducida por un entorno inflamatorio (157). Contrastando con el clásico y conocido efecto proliferativo del andrógeno, en condiciones inflamatorias, testosterona se comporta regulando la proliferación por algún mecanismo aún no dilucidado. En experimentos *in vitro*, testosterona evitó el aumento de la proliferación de CMLp de rata inducido por LPS, demostrando un claro rol modulador de la proliferación cuando es inducida por estímulos

inflamatorios (47). Por otro lado, en condiciones sin estímulo inflamatorio, resultados del laboratorio verificaron el efecto proliferador de testosterona sobre este tipo celular (160), reportado por otros autores (161-164). Este efecto, estaría afectado por la síntesis y secreción de un amplio abanico de factores de crecimiento autocrinos, entre ellos factores proliferativos como FGF-2 e IGF-1 y antiproliferativos como TGF β 1.

Estas dos diferentes capacidades de la testosterona en relación a la proliferación, podrían vincularse con resultados contradictorios sobre los efectos del andrógeno en la BPH y que ponen en duda la hipótesis de la hormono-dependencia en su desarrollo (165). Esa hipótesis se basa en observaciones en pacientes con hipogonadismo primario, en los que la restitución de testosterona permite el desarrollo de la BPH (166), y en el conocido efecto de los inhibidores de DHT capaces de revertir la hiperplasia (165,167). Por lo contrario, distintos estudios sostienen que no existe una correlación entre los niveles circulantes de testosterona y la agresividad de la BPH; a ello se suma una fuerte evidencia en contra del rol de los andrógenos en la etiopatogenia del BPH ya que la mayor incidencia de la misma se da en hombres mayores a los 50 años a pesar del descenso hormonal que ocurre en esta etapa de la vida (168). Por otra parte, si bien en hombres hipogonádicos jóvenes el tratamiento con testosterona puede llevar a un crecimiento significativo de la próstata (166), en hipogonádicos de inicio tardío el tratamiento no produce cambios en el volumen prostático ni en los niveles de PSA (169,170). Actualmente una hipótesis alternativa en cuanto al rol de la testosterona en la BPH indica que los andrógenos son permisivos pero insuficientes para inducir el desarrollo de esta patología. Considerando las evidencias aportadas por nuestro grupo de trabajo, es probable que la inflamación generada por el déficit de testosterona en hombres de edad avanzada, pueda ser mayor inductor de la proliferación que la generada por la propia hormona, por lo que es esencial avanzar con futuros estudios para comprender este rol dual de la testosterona. El efecto diferencial de testosterona sobre la proliferación prostática podría depender de la participación de las distintas vías (genómicas vs. no genómicas) activadas por los andrógenos.

IV. PLANTEO DEL PROBLEMA

La testosterona tiene un rol activo tanto en condiciones homeostáticas como patológicas de la glándula prostática. Además de sus efectos clásicos con protagonismos en la reproducción, tiene efectos que se pueden definir como reguladores, que podrían ser claves frente a injurias que conducen a patologías. Sin embargo, ese rol en particular y sus alcances en distintos tejidos no ha sido estudiado en profundidad. La línea de trabajo que viene desarrollándose en nuestro laboratorio, da cuenta de su rol modulador de la inflamación, con importancia en pacientes con prostatitis, y de la proliferación que en pacientes con BPH podría estar faltando. Sin embargo, la terapia de reemplazo hormonal, que podría pensarse como una alternativa reguladora del proceso patológico, genera gran inseguridad por el efecto más conocido del andrógeno, el inductor de la proliferación. Por lo tanto, toda información que aporte a esclarecer los mecanismos reguladores de testosterona implica una importante contribución a este mecanismo menos conocido de esta hormona y al conocimiento global de los alcances de este andrógeno.

Los mecanismos moleculares inducidos por testosterona han sido ampliamente dilucidados en este último siglo, sin embargo el descubrimiento de vías no genómicas de señalización abrió un nuevo campo de estudio importante para comprender más a fondo la función de esta hormona. Durante los últimos 20 años muchos trabajos han demostrado la presencia de receptores androgénicos en la membrana plasmática y sus mecanismos de acción en líneas celulares epiteliales provenientes de cáncer de próstata, sin embargo son escasos los trabajos involucrando células normales y menos aún en células estromales de la próstata. La importancia de la señalización por andrógenos en el compartimiento estromal, tanto para el desarrollo como para la funcionalidad de la próstata, ha sido demostrada en animales KO tejido específico y mediante técnicas de recombinación de tejido (171). Debido a estas evidencias y al rol fundamental de testosterona sobre las células estromales resulta de gran importancia profundizar en los mecanismos por los cuales testosterona ejerce sus acciones sobre estas células. Por lo tanto nos planteamos el siguiente objetivo general y los siguientes objetivos específicos:

HIPÓTESIS

Las células musculares lisas de la próstata son capaces de responder a testosterona a través de mecanismos no genómicos de señalización iniciados por receptores presentes en la superficie celular. A su vez estos mecanismos participan activamente en la funcionalidad de las células estromales prostáticas tanto en condiciones homeostáticas como patológicas, actuando a través de efectos exclusivos de vías no genómicas y a su vez mediante una interacción con las vías genómicas de señalización.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el rol de la señalización no genómica de testosterona en células estromales prostáticas.

Objetivo específico 1: Esclarecer la presencia de AR en la superficie celular de CMLp.

Objetivo específico 2: Evaluar el aporte de las vías no genómicas de testosterona sobre la proliferación, diferenciación y modulación de la respuesta inflamatoria de CMLp *in vitro*.

Objetivo específico 3: Determinar la participación de las vías no genómicas de testosterona sobre la proliferación de células estromales humanas provenientes de pacientes con BPH *in vitro*.

CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Ratas machos de la cepa Wistar, adultas de doce semanas de edad con un peso de 250-350g, se alojaron en las instalaciones de la Universidad Nacional de Córdoba en cuartos con aire acondicionado, bajo un fotoperiodo controlado (14h luz / 10h oscuridad) con acceso a alimento y agua *ad libitum*. El cuidado de los animales y los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de las Guías de NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los procedimientos con animales fueron a su vez aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

2. Cultivos primarios de células musculares lisas prostáticas (CMLp)

Para cada cultivo celular se utilizaron los lóbulos ventrales de 6 glándulas prostáticas de rata, los protocolos de cultivo celular se realizaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente por Leimgruber y colaboradores 2011 (4). Los tejidos se trituraron en pequeños fragmentos utilizando hojas de afeitar y se trataron durante 40 minutos con una solución de digestión con 200U/ml de colagenasa tipo IA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en medio de cultivo MCDB131 (Sigma-Aldrich). Posteriormente se realizó una disgregación mecánica usando pipetas de Pasteur de distintos calibres. Las células dispersas se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos (cat. TCP011006. Guangzhou Jet Bio-Filtration Co. China) y se cultivaron en medio de cultivo MCDB131 suplementado con 15% de suero fetal bovino (SFB) (Internegocios S.A., Buenos Aires, Argentina) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. El medio de cultivo se reemplazó cada 2 días hasta alcanzar la confluencia; después de lo cual las células se levantaron con TrypLE express (Thermo Fisher Scientific Inc. Massachusetts, EEUU) y resembraron duplicando el número de placas. Con el fin de diferenciar las células estromales a CMLp, el medio se reemplazó por MCDB131 libre de suero suplementado con 2ng/ml de TGFβ₁ (Cat. MAN0003443. Gibco), 5mg/ml de insulina, 5mg/ml de transferrina y 5ng/ml de selenio durante 72 horas con reemplazo cada 24 horas.

3. Cultivos de células estromales prostáticas humanas (CEPH)

Los protocolos para el trabajo con muestras humanas fueron aprobados por el Comité de Bioética del Sanatorio Allende. Las CEPH se obtuvieron a partir de un paciente con BPH sometido a TURP en el Sanatorio Allende de Córdoba con consentimiento informado del paciente. Una vez obtenida la muestra, esta se transportó al laboratorio en medio MCDB en hielo. A partir de este momento se trabajó bajo campana de flujo laminar vertical clase II tipo A2 (SterilGARD Hood, The Baker Company inc. EEUU). Los trozos de tejido se cortaron con tijera hasta obtener porciones de aproximadamente 1mm³ y se disgregaron químicamente con 200 U/ml de colagenasa tipo IA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 3 horas. Posteriormente se realizó una disgregación mecánica usando pipetas de Pasteur de distintos calibres. Las células dispersas se sembraron en placas de cultivo y se cultivaron en MCDB131 suplementado con 15% de SFB a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. El medio de cultivo se reemplazó cada 2 días hasta alcanzar la confluencia; después de lo cual las células se levantaron con TrypLE express (Thermo Fisher Scientific Inc. Massachusetts, EEUU) y se replicaron un mínimo de 6 veces para asegurar la homogeneidad del cultivo eliminando las células epiteliales. Previo a los estímulos, las células se incubaron por 24 horas en MCDB131 libre de suero y suplementado con 5mg/ml de insulina, 5mg/ml de transferrina y 5ng/ml de selenio. Para generar un stock de esta línea celular, las células se levantaron con TrypLE express, se lavaron para remover la enzima y se congelaron en freezer de -80°C en medio MCDB131 con 10% DMSO y 30% SFB.

4. Tratamientos

Cumplidas las 72 horas con TGFβ1 para las CMLp o las 24 horas de medio sin suero para las CEPH, las células se trataron con los siguientes estímulos: testosterona (1x10⁻⁷M), testosterona 3-(O-carboximetil)oxime conjugada a albumina sérica bovina (testosterona-BSA) (Sigma) (1x10⁻⁷M) impermeable a la membrana plasmática o sus vehículos. Para los estudios de inmunomodulación, las células se estimularon con LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 (Cat. L2630. Sigma-Aldrich) 10µg/ml, LPS con testosterona o LPS con testosterona-BSA. Para los ensayos con inhibidores, utilizamos U0126 (Sigma)

($1 \times 10^{-5} \text{M}$), hidroxiflutamida (Sigma) ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) o 2-bromopalmitato ($1 \times 10^{-8} \text{M}$) durante 20 minutos antes de la estimulación. La testosterona-BSA se la sometió a un tratamiento con una solución de 0,05mg/ml de dextrano y 50mg/ml de carbón durante 30 minutos para eliminar cualquier posible contaminación con testosterona libre. Posteriormente se centrifugó a 3000g durante 10 minutos y se filtró usando un filtro de $0.22 \mu\text{m}$ (millipore) (31). Para cada experimento se utilizó una nueva alícuota de T-BSA.

5. Inmunofluorescencia

Los anticuerpos primarios utilizados para esta técnica fueron dirigidos contra las siguientes proteínas: AR (dilución 1/100. cat. ab74272. Abcam), calponina (dilución 1/100. MA5-11620. Invitroge), vimentina (dilución 1/100. NCL-L-VIM-V9. Novo Castra), α -actina de musculo liso (dilución 1/100. NCL-SMA. Novo Castra), NF- κ B (dilución 1/100. AB7970. Abcam). Los anticuerpos secundarios utilizados para esta técnica fueron los siguientes: Anti-conejo acoplado a Alexa 594 (dilución 1/1000 Invitrogen) y Anti-ratón acoplado a Alexa 594 (dilución 1:1000. Invitrogen).

Después de los estímulos, las CMLp se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 4%. La permeabilización celular se realizó usando 0,25% de tritón X-100 por 15 minutos posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y se bloqueó con PBS 5% BSA durante 30 minutos a 37°C . Las células se incubaron durante toda la noche en una cámara húmeda con el anticuerpo primario en PBS 1% de BSA a 4°C . Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a fluorescente en PBS 1% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. La incubación con DAPI (Sigma) 1:50 durante 10 minutos se usó para teñir los núcleos celulares, y posteriormente los cubreobjetos se montaron usando fluoromount (Sigma). Para validar la especificidad de la inmunomarcación, los controles se realizaron aplicando el mismo protocolo pero reemplazando el anticuerpo primario por PBS al 1% de BSA.

Para la tinción de AR en la superficie celular, las CMLp vivas no permeabilizadas se lavaron con PBS y se incubaron con anti-AR (1:100) en PBS 1% de BSA durante toda la noche a 4°C . Con el fin de controlar la integridad de la membrana plasmática durante el protocolo, el anticuerpo anti-AR fue reemplazado por anti-p65 (NF- κ B) (proteína

intracelular). Posteriormente las células fueron fijadas con formol 4% y marcadas con el anticuerpo secundario y DAPI tal como en las inmunofluorescencias descritas en el párrafo anterior. Concanavalina A (Con A) es una lectina que se une específicamente a los residuos de α -manosil sacáridos expresados en las estructuras centrales de las glicoproteínas de las membranas celulares. Con A acoplada a FITC (Con A-FITC) (Sigma) se utilizó a una dilución de 1/30 en PBS por 20 minutos como marcador de membranas.

Las imágenes fueron obtenidas a través de microscopía de epifluorescencia (Zeiss Axioplan) o microscopía confocal (Olympus FV-1000, Tokio, Japón). Las imágenes se procesaron con el software FV10-ASW 1.6 Viewer (Olympus) o Image J 1.46r (NIH, EE. UU.). Para determinar el número de células positivas para AR de membrana, se contaron un total de 3000 CMLp por tratamiento de tres cultivos independientes.

6. Análisis de proteínas de superficie celular mediante biotilación.

Las proteínas de la superficie celular se aislaron usando el kit de aislamiento de proteínas de superficie celular (Cat.89881. Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, CMLp provenientes de 8 placas de 6 pocillos, se lavaron tres veces con PBS a 4°C y luego se incubaron con sulfo-NHS-biotina a 4°C durante 20 minutos. Después de la biotilación de proteínas de superficie, los cultivos se lavaron tres veces con PBS frío y se recolectaron con buffer de lisis (Igepal CA-630 al 1,25%, PMSF 2mM, leupeptina 10 μ g/ml y aprotinina 10 μ g/ml). Los extractos celulares fueron sonicados e incubados con perlas de avidina conjugada a agarosa durante 2 horas a 4°C. Los extractos fueron centrifugados a 500g durante 10 minutos en frío, el sobrenadante se separó y el precipitado se lavó tres veces con 1 ml de tampón de lisis. Las células provenientes de 8 placas de cultivo se concentraron y se sembraron en una única calle de un gel de acrilamida al 12%. Tanto la fracción de proteína de superficie como el homogeneizado total se analizaron mediante western usando anti-AR. Se usó p65 (proteína citosólica/nuclear) como control de la pureza de la fracción de proteína de superficie.

7. Citometría de flujo

Las células de cada cultivo se dividieron en dos grupos para la detección de AR intracelular o AR de membrana. Para el AR intracelular, las células se desprendieron de las placas mediante la aplicación de TripLE express (Thermo Fisher Scientific) y se fijaron con Cytifix (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) durante 20 minutos a 4°C, se permeabilizaron con Perm/Wash (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) e incubaron con anti-AR durante toda la noche a 4°C. Posteriormente las CMLp se lavaron con Perm/Wash seguido de incubación con anticuerpo secundario conjugado a Alexa 647 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces por centrifugación y se suspendieron en PBS filtrado para ser analizadas por citómetro de flujo (FACSCanto II; Becton Dickinson, San Jose, CA). En el caso de la detección del AR de superficie celular, una vez levantadas, las células vivas se lavaron con PBS 2% SFB y se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpo anti-AR. Después del lavado, las células se incubaron con anticuerpo secundario durante 1 hora a 37°C y se fijaron con Cytifix. Previo a la lectura se dispersaron en PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. Con el fin de controlar la integridad de la membrana plasmática durante el protocolo, se utilizó el anticuerpo primario para la proteína intracelular p65 en lugar de anti-AR. En ambos casos, como control negativo, las células se incubaron con en ausencia del anticuerpo primario. El análisis de los datos se realizó con el software Flowjob (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

8. Western blot

Los anticuerpos primarios utilizados para esta técnica fueron dirigidos contra las siguientes proteínas: AR (dilución 1/1000. cat. ab74272. Abcam), pERK1/2 (dilución 1/1000 cat.4337. Cell signaling), ERK1/2 (dilución 1/1000. Sigma-Aldrich), β -actina (dilución 1/5000. Sigma-Aldrich), NF- κ B (dilución 1/1000. AB7970. Abcam) pARK (dilución 1/200. Cell Signaling) AKT (dilución 1/1000. AB7970. Sigma-Aldrich). Los anticuerpos secundarios utilizados para esta técnica fueron los siguientes: Anti-conejo acoplado a peroxidasa (dilución 1/5000 Invitrogen) y Anti-ratón acoplado a biotina (dilución 1:2500. Invitrogen).

Cumplido el tiempo de tratamiento, las CMLp fueron lavadas con PBS frío y lisadas mediante la aplicación de 120µl de buffer de lisis (1,25% de Igepal CA- 630, EDTA 1mM, PMSF 2mM, leupeptina 10µg/µl, aprotinina 10µg/µl, NaF40µg/µl, pirofosfato de sodio 100µg/µl) por pocillo. El lisado se centrifugó a 14.000g durante 20 minutos a 4°C para sedimentar el material insoluble en Igepal CA-630. Las muestras se incubaron con buffer de muestra (tampón Tris, 0,5% de glicerol, 0,1% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 0,002% azul de bromofenol) y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Las proteínas se corrieron en geles de SDS-poliacrilamida al 12% y se transfirieron a membranas Hybond-C (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, Reino Unido). Las membranas se bloquearon durante 30 minutos con TBS 0.1% Tween 20, 5% de BSA. Las membranas se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario específico diluido en PBS 0.1% Tween 20, 1% BSA y posteriormente se lavaron 3 veces con PBS 0.1% Tween 20. Posteriormente las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa diluidos en TBS 0.1% Tween 20, 1% BSA y reveladas con un sistema detección de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido). La luz emitida se capturó en placas radiográficas (Amersham Pharmacia) o mediante escáner C-Digit de LI-COR, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los análisis de densitometría se realizaron aplicando el software Image J. La expresión relativa se calculó comparando la intensidad de la banda específica con la del control de carga.

9. Ensayo de proliferación

Las CMLp cultivados en vidrios tratados se estimularon con testosterona ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) o testosterona-BSA ($1 \times 10^{-7} \text{M}$), en presencia o ausencia de los inhibidores hidroxiflutamida o U0126 durante 24 horas a las concentraciones detalladas en los resultados. Las células se fijaron con 4% formaldehído y se permeabilizaron con 0,5% Triton X-100 durante 10 minutos. Las marcas inespecíficas se bloquearon con PBS 5% BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente y las células se incubaron durante toda la noche con un anticuerpo monoclonal contra Ki67 (Cat. 550609. BD Pharmingen) (1/30) a 4°C en una cámara húmeda. Después de lavar con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado. Los cubreobjetos se lavaron nuevamente con PBS, y las CMLp se incubaron

con el complejo de avidina-biotina peroxidasa (ABC) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La inmunoreactividad para Ki67 se visualizó con 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloreuro (DAB) como cromógeno. Se examinaron un total de 1.000 células mediante microscopía óptica en campos elegidos al azar de cada portaobjetos de vidrio, con el fin de establecer el porcentaje de células inmunorreactivas para Ki67. Se analizaron dos vidrios para cada tratamiento, derivados de las mismas preparaciones celulares para cada repetición.

Para determinar el número total de células, utilizamos un sistema de hematología ADVIA 2120i (Siemens). Después de 48 horas de estímulos, las células se separaron de las placas usando TrypLE express (Thermo Fisher) y se resuspendieron en 100µl de PBS, posteriormente se determinó el número total de células en la suspensión, el cual se extrapolo al área de la placa.

10. Extracción de ARNm, RT-PCR y qPCR.

El ARN total se purificó usando un kit de purificación (Direct-zol RNA miniprep, Zymo Research, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Se utilizó nanodrop ND2000 (Thermo Fisher) para determinar la concentración de ARN. A partir de entonces, se usó 1µg de ARN total como muestra para la RT-PCR usando transcriptasa inversa EpiScript™ (Epicentre, Madison, WI) y *primers* aleatorios (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA EE. UU.). El cADN obtenido se sometió a qPCR realizado en un sistema de detección ABI Prism 7500 (Thermo Fisher Scientific) utilizando la SYBR Green PCR Mastermix (Thermo Fisher Scientific). Los cambios relativos en la expresión génica se calcularon usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ normalizado frente al gen control GAPDH o β -actina. Para cada par de *primers*, un gráfico de disociación dio como resultado un único pico, lo que indica que solo se amplificó una especie de cADN, la eficiencia de amplificación para cada par de *primers* se calculó utilizando las curvas de calibración generadas por diluciones seriadas de cDNA obtenidos a partir de CMLp no estimuladas (33). La lista de *primers* utilizados con sus secuencias se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de nucleótidos de los *primers* utilizados en esta tesis doctoral.

Target Genes	Forward Primers (5'-3')	Reverse Primers (5'-3')
<i>Vim</i> (rata)	ACTTCTCAGCACCACGATGA	CTTTTGGGGGTGTCAGTTGT
<i>Acta2</i> (rata)	CCAGTCGCCATCAGGAAC	GCATCATCACCAGCAAAGC
<i>Cnn1</i> (rata)	ACACTTTAACCGAGGTCCTGCCTA	CTTGAGGCCATCCATGAAGTTGCT
<i>Gapdh</i> (rata)	GCAAGTTCAACGGCACAGTCAAG	ACATACTCAGCACCAGCATCACC
<i>Tgfb1</i> (rata)	TGAACCAAGGAGACGGAATACAGG	GCCATGAGGAGCAGGAAGGG
<i>Ar</i> (rata)	CCATCCACGTGGTCCCTACT	TGCTGCCTTCGGATATTACC
<i>Kgf7</i> (rata)	TCCACCTCGTCTGTCTGGTG	TCACTTTGCCTCGTTTGTC
<i>Igf1</i> (rata)	GCTGAAGCCGTTCAATTTAGC	CCACCCAAGTTGCTATTGCTT
<i>Il6</i> (rata)	CCAGAGTCATTCAGAGCAATAC	GATGGTCTTGGTCCTTAGCC
<i>TGFB1</i> (humano)	GGGACTATCCACCTGCAAGA	CCTCCTTGGCGTAGTAGTCG
<i>B-ACTINA</i> (humano)	ACTCTTCCAGCCTTCTTCC	GTTGGCGTACAGGTCTTTGC

11. ELISA

Con el fin de cuantificar la secreción de IL-6 y de TNF α , las células fueron cultivadas durante 24-72 horas en 1 ml de MCDB131 en una de las siguientes condiciones: LPS 1 μ g/ml, LPS + testosterona 1x10⁻⁷M, LPS + testosterona-BSA 1x10⁻⁷M o sus vehículos. Los medios se recogieron, se centrifugaron a 4°C a 15000 g durante 15 minutos y se almacenaron a -20°C. Las citocinas se midieron mediante kits de ELISA tipo sándwich comercialmente disponibles (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

12. Microscopia electrónica de transmisión

Las CEPH fueron fijadas con solución de Karnovsky (2% glutaraldehído, 4% formol, 14% sacarosa, 0,1M buffer cacodilato, pH 7,3) durante 15 minutos. Luego, las monocapas celulares fueron raspadas de los pocillos, lavadas y centrifugadas a 1000g durante 3 minutos. Los pellets celulares se mantuvieron en la mezcla de Karnovsky por 2 h adicionales, luego se trataron con 1% tetróxido de osmio durante 1 h, se deshidrataron en acetona 100% por 3 veces y se incluyeron en Araldita (Electron Microscopy Science). Para estudios ultraestructurales, se cortaron secciones finas de 60nm con una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo PorterBlum MT2 y se tiñeron con acetato de uranilo y

citrato de plomo. Las células fueron examinadas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss LEO 906E y fotografiado con una cámara Megaview III. (Olympus, Center Valley, PA).

13. Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces con cultivos celulares independientes. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con Tukey como prueba posterior. Las diferencias entre dos medias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa estadístico InfoStat (Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba).

CAPITULO III. RESULTADOS

1. El receptor clásico de andrógenos se localiza en la superficie de las CMLp de rata.

Con el fin de determinar la presencia del AR en la membrana plasmática de CMLp diferenciadas a partir de células estromales de rata, realizamos en primera instancia una inmunofluorescencia contra el AR en células no permeabilizadas; de esta manera utilizamos a la membrana plasmática intacta como barrera para impedir el ingreso directo del anticuerpo al citosol y núcleo. Estas células se visualizaron por microscopia confocal (CLSM) a través de la cual se observó marca positiva para AR delineando la célula (Fig. 6). En regiones próximas a la membrana plasmática, se demostró co-localización de AR con el marcador de membranas celulares concanavalina A, confirmando la localización de AR en la superficie celular. A su vez, además de la marca de superficie, se puede observar una marca intracelular para el AR, suponemos que esta marca se debe a un proceso de endocitosis específico del complejo anticuerpo-AR, ya que esta marca se encuentra compacta en estructuras similares a vesículas en lugar de dispersas en el citosol, su localización subcelular es dependiente del tiempo y es específica para dicho anticuerpo. Procesos de endocitosis de receptores de membrana han sido descritos en otros trabajos, en los cuales se demuestra un reciclado de receptores o una migración hacia el núcleo celular.

El análisis de la co-localización entre AR y Con-A se llevó a cabo mediante el software Image J, que permitió corroborar la co-localización de ambas moléculas (Fig. 6). Con el fin de controlar que la membrana plasmática se haya mantenido impermeable a lo largo de todo el protocolo, se realizó una inmunocitoquímica para la proteína intracelular p65 (parte del complejo NF- κ B) en las mismas condiciones utilizadas para el AR. Como era de esperar, no se registró marca positiva para p65 ya que el anticuerpo no pudo ingresar al citosol en células no permeabilizadas, validando nuestro protocolo.

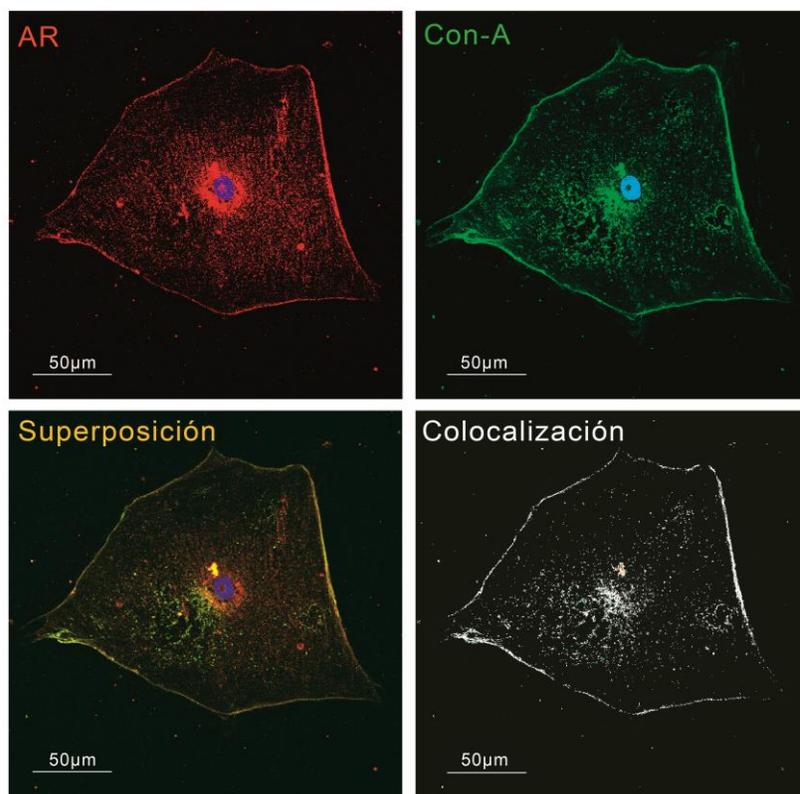


Figura 6. Localización del AR en la superficie celular de CMLp. (a) CMLp fueron analizadas mediante microscopía confocal utilizando un anticuerpo para AR (rojo), mostrando marca específica en la superficie celular. Con-A se usó como un marcador de membrana (verde). Los sitios de colocalización entre AR y la membrana plasmática se observan como píxeles amarillos (superposición) y dicha colocalización se corroboró usando el plugin “colocalization” de imagen J (píxeles blancos).

Otra estrategia para verificar la localización del AR en la membrana plasmática se basó en el uso del kit comercial “Cell Surface Protein Isolation Kit” de Thermo Fisher para el aislamiento de proteínas de superficie celular. Luego de realizar el fraccionamiento celular, se determinó mediante western blot la presencia del AR en la fracción proteica perteneciente a las proteínas de superficie (Fig. 7), en coincidencia con los resultados obtenidos por microscopía confocal. A fin de controlar la pureza de la fracción de proteínas de superficie, se corroboró la ausencia de la proteína citosólica/nuclear p65 (NF- κ B) en esta fracción (Fig. 7). Debido a que la banda específica para AR que se observa en el carril correspondiente al homogenato total se obtuvo a partir de menor cantidad de células que la banda correspondiente a la fracción de membrana (1/3 de un pocillo de 9cm² vs 48 pocillos

de 9cm^2), podemos afirmar que la cantidad de AR en la superficie celular representa a una fracción muy inferior del AR total.

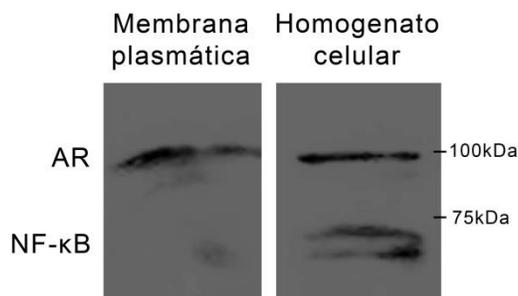


Figura 7. Presencia del AR en la fracción de proteínas correspondiente a la superficie celular. Proteínas de superficie celular aisladas por unión al complejo biotina-avidina-sefarosa fueron analizadas por western blot, a través del cual se demostró la presencia de una banda específica para AR. La proteína intracelular p65 se encontró en el carril correspondiente al homogenato total pero ausente en la fracción de proteínas de superficie, descartando contaminación con proteínas citosólicas en esta fracción.

El porcentaje de células positivas para AR en la membrana plasmática se determinó mediante citometría de flujo en CMLp sin permeabilizar. Los análisis demostraron la existencia de una población de $18,87 \pm 2,43\%$ de células positivas para AR en la membrana plasmática (Fig. 8). Los controles para la citometría de flujo incluyeron un control negativo, evitando la incubación con el anticuerpo primario, y un control positivo del anticuerpo anti-AR, que se llevó a cabo en células permeabilizadas a fin de detectar el receptor intracelular, resultando en un 100% de células positivas como era de esperar (Fig. 8). Se realizó además un control de la integridad de la membrana plasmática de las células no permeabilizadas usando un anticuerpo para la proteína citoplasmática p65, resultando en un 100% de células negativas (Fig. 8). En concordancia con este resultado obtenido por citometría de flujo, el recuento de células positivas para AR en la membrana plasmática por inmunofluorescencia arrojó un valor de $17,88 \pm 5,34\%$ de células positivas (Fig. 9).

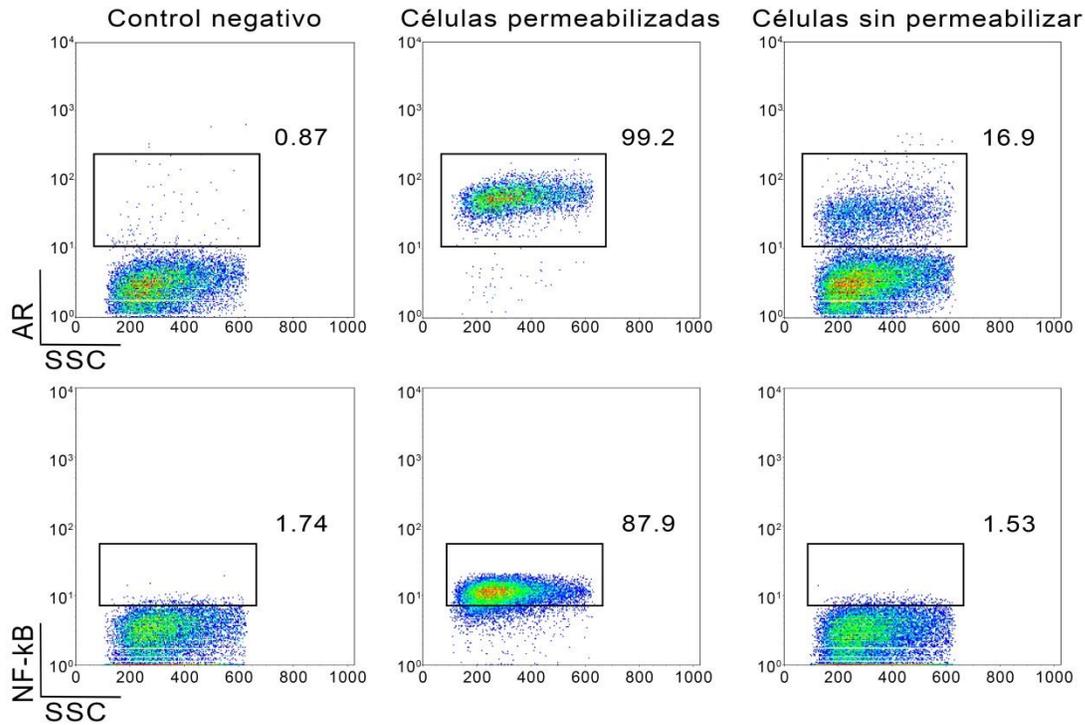


Figura 8. Determinación del porcentaje de células positivas para AR en la membrana plasmática mediante citometría de flujo. CMLp permeabilizadas y no permeabilizadas fueron analizadas por citometría de flujo usando un anticuerpo contra AR. Estos resultados representativos muestran una población de 16,9% de células positivas para AR en la superficie celular. El promedio de tres resultados independientes demostró que el porcentaje de células positivas para AR en la superficie es de $18.87\% \pm 2.43\%$. Controles con NF- κ B demostraron ausencia de células positivas en el grupo no permeabilizado. Mientras que células permeabilizadas mostraron una población cercana al 100% de células positivas para AR y una población del 87,9% de células positivas para NF- κ B . SSC: *side scatter*.

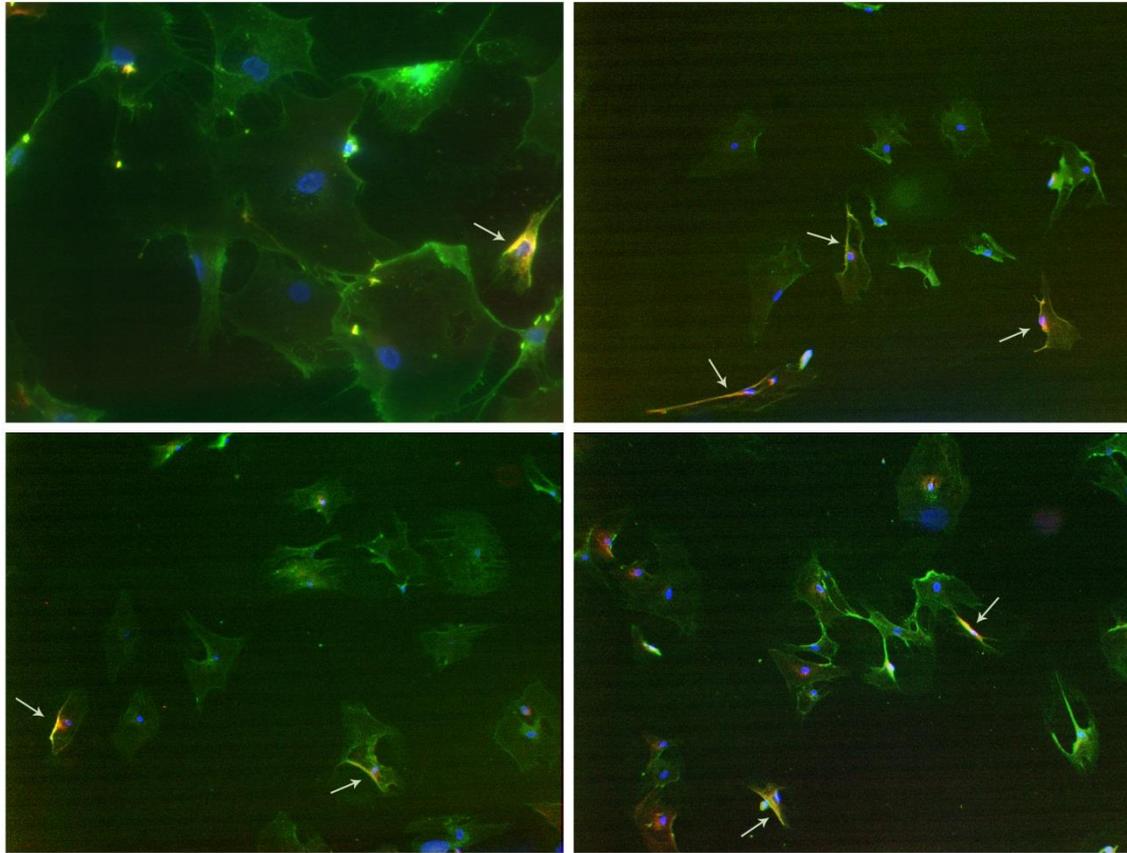


Figura 9. Determinación del porcentaje de células positivas para AR en la membrana plasmática por inmunofluorescencia. CMLp no permeabilizadas fueron sometidas a inmunofluorescencia con anticuerpo contra AR (rojo) y a marcación de membranas con concanavalina A (verde). Las flechas indican colocalización entre la marca del receptor y la marca de membrana plasmática. Un total de 3000 células fueron contadas, obteniendo un valor del $17,88 \pm 5,34\%$ de células positivas para AR en la superficie celular.

2. El AR de membrana induce proliferación celular a través de la señalización por MAPK.

Con el fin de analizar la señalización no genómica estimulada por testosterona desde receptores de membrana, las CMLp fueron estimuladas con testosterona, o con testosterona-BSA (conjugado no permeable a la membrana plasmática), durante periodos cortos de tiempo (menores a los 30 minutos), los cuales son insuficientes para una respuesta genómica. Investigamos la activación de la vía de las MAPK por estar involucrada en la activación de la proliferación y demostramos que ambas moléculas (testosterona y testosterona-BSA) son capaces de inducir un aumento significativo de la fosforilación de

ERK1/2 ($p < 0,05$) (Fig. 10). La incubación previa con el inhibidor de la palmitoilación 2-bromopalmitato (2BP), modificación post-traduccional que permite la unión de proteínas a *rafts* lipídicos en la membrana plasmática, impidió el incremento en la fosforilación de ERK1/2 luego de la estimulación con testosterona-BSA o testosterona ($p < 0,05$) (Fig. 11), demostrando de esta manera que la palmitoilación del AR es necesaria para su localización en la superficie celular y la inducción de la señalización iniciada desde la membrana plasmática de CMLp. A su vez, debido a que la vía de PI3K/Akt ha sido vinculada con la sobrevivencia celular (107) y a que en muchas ocasiones se activa en paralelo a las MAPK, medimos la fosforilación de esta quinasa luego de la estimulación con testosterona y testosterona-BSA; pudimos observar que ambas moléculas indujeron también un incremento en la fosforilación de Akt ($p < 0,05$) (Fig. 12). Estos resultados demostraron la implicancia de la señalización no genómica de testosterona, iniciada desde la superficie celular, en la activación de diferentes vías de transducción.

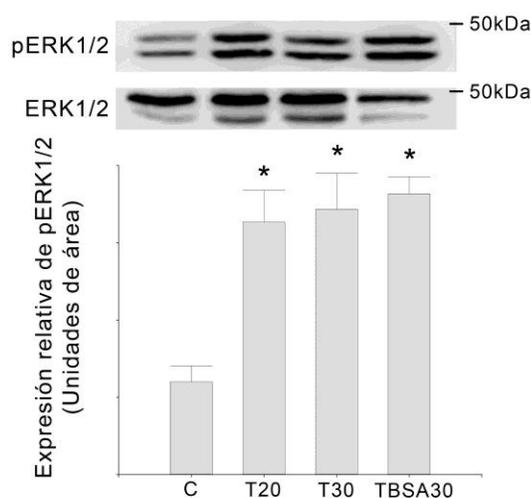


Figura 10. La estimulación de receptores de testosterona de superficie induce la fosforilación de ERK1/2 en CMLp. CMLp fueron estimuladas por 20 o 30 minutos con testosterona o por 30 minutos con testosterona-BSA o con sus vehículos y analizadas por western blot utilizando un anticuerpo específico para pERK1/2, ERK1/2 total se usó como control de carga. Un aumento significativo en la fosforilación de ERK1/2 fue observado luego de todos los tratamientos. C: vehículo; T20: estímulo con testosterona por 20 minutos; T30: estímulo con testosterona por 30 minutos; TBSA 30: estímulo con testosterona-BSA por 30 minutos. (* $p < 0,05$ vs C).

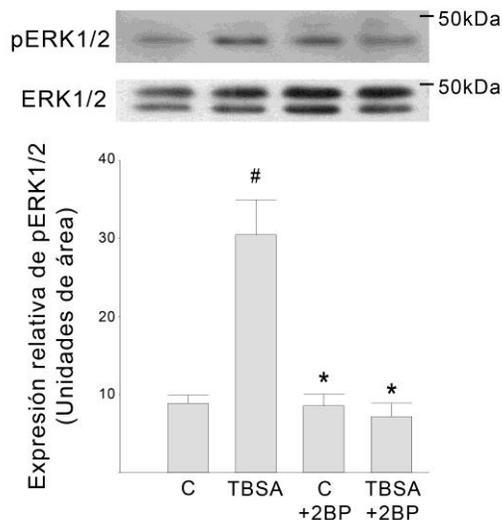


Figura 11. La inhibición de la palmitoilación impide la fosforilación de ERK1/2 luego del estímulo con testosterona desde la superficie celular en CMLp. CMLp pre-incubadas con 2-BP durante 20 minutos fueron analizadas por western blot utilizando un anticuerpo específico para pERK1/2, ERK1/2 total se usó como control de carga. Se observa una significativa inhibición de la fosforilación de ERK1/2 en células preincubadas con 2BP y estimuladas con TBSA. C: vehículo; TBSA: estímulo con testosterona-BSA por 30 minutos; 2BP: células tratadas con 2BP por 20 minutos previo al estímulo. ([#]p< 0,05 vs C; ^{*}p< 0,05 vs TBSA).

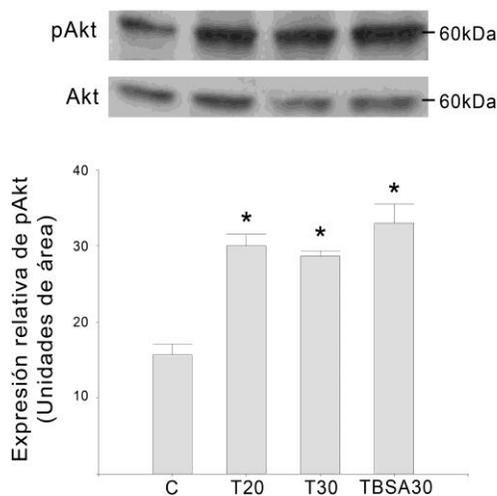


Figura 12. La estimulación de receptores de superficie induce la fosforilación de Akt en CMLp. CMLp fueron estimuladas por 20 o 30 minutos con testosterona o por 30 minutos con testosterona-BSA o sus vehículos y analizadas por western blot utilizando un anticuerpo específico para pAkt, Akt total se usó como control de carga. Un aumento significativo en la fosforilación de Akt fue observada luego de todos los tratamientos. C: vehículo; T20: estímulo con testosterona por 20 minutos; T30: estímulo con testosterona por 30 minutos; TBSA 30: estímulo con testosterona-BSA por 30 minutos. (^{*}p< 0,05 vs C).

Teniendo en cuenta que la vía de las MAPK activa factores de transcripción que inducen proliferación, la misma se evaluó luego de la estimulación con testosterona o testosterona-BSA, mediante el recuento de núcleos positivos para Ki67 y por conteo de células totales. Como se demostró previamente (13), la testosterona indujo un aumento significativo en la proliferación celular en comparación con las células controles ($p < 0,05$); sin embargo, el mayor aumento en el número de células Ki67 positivas se observó cuando la estimulación se llevó a cabo específicamente a través de receptores de superficie usando testosterona-BSA ($p < 0,05$) (Fig. 13a). Tanto hidroxiflutamida, inhibidor del AR, y U0126, inhibidor de la fosforilación de ERK1/2, impidieron la proliferación estimulada por testosterona-BSA ($p < 0,05$) (Fig. 13a), vinculando tanto al AR como a ERK1/2 en la señalización iniciada desde membrana capaz de inducir proliferación celular. La capacidad de U0126 para inhibir la fosforilación de ERK1/2 en estas células, se determinó por western blot luego de estímulos de 30 minutos con testosterona-BSA (Fig. 13b).

Por otro lado, se realizó el recuento total de células luego de 48 horas de estímulo, ya que este dato refleja el balance entre la proliferación y muerte celular. En concordancia con los resultados obtenidos por inmunodetección de Ki67, los estímulos exclusivamente a nivel del receptor de testosterona de membrana resultaron en un aumento significativo del número total de células ($p < 0,05$) (Fig. 14). Interesantemente, la testosterona fisiológica no fue capaz de aumentar significativamente el número de células a pesar de haber producido aumento de la proliferación; este resultado podría deberse a la puesta en marcha de vías reguladoras que contrarrestan el efecto proliferativo inducido desde receptores de membrana (Fig. 14). En conclusión, estos resultados revelan una respuesta proliferativa diferencial según se activen AR de membrana o citosólicos.

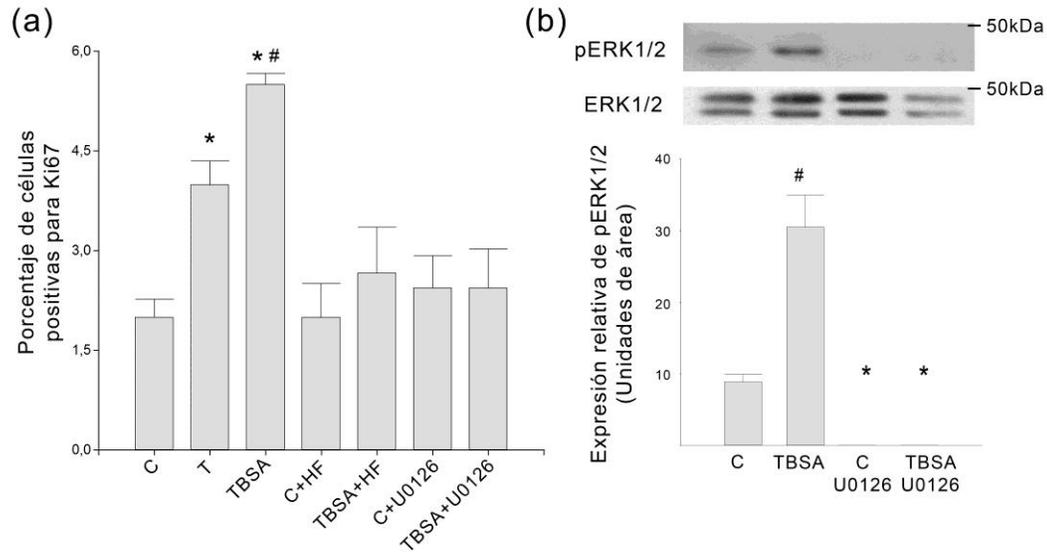


Figura 13. La estimulación de receptores de testosterona de superficie induce un incremento en la proliferación de CMLp. A. Ensayos de inmunocitoquímica para Ki67 fueron realizados para determinar la proliferación celular luego de 24 horas de estimulación con testosterona (T), testosterona-BSA (TBSA), TBSA + hidroxiflutamida (HF), TBSA + U0126 o sus vehículos (C). 3000 células por tratamiento fueron contadas distinguiendo entre núcleos positivos y negativos. Un aumento significativo en el número de núcleos positivos fue observado luego del tratamiento con T vs C, mientras que la estimulación con TBSA indujo un aumento significativo vs T y vs C; a su vez el pretratamiento tanto con HF o U0126 impidió el aumento en la proliferación inducido por receptores de testosterona de superficie. B. CMLp estimuladas con TBSA, TBSA+U0126 o sus controles (C o C+U0126) fueron analizadas por western blot utilizando un anticuerpo específico para pERK1/2, ERK1/2 total se usó como control de carga. Como se puede observar U0126 impide la fosforilación por debajo de los límites de detección de western blot (* $p < 0.05$ vs C; # $p < 0.05$ vs T).

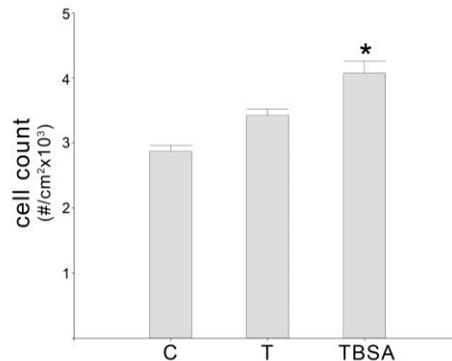


Figura 14. La estimulación de receptores de testosterona de membrana plasmática induce un incremento en el número total de CMLp. CMLp fueron estimuladas por 48 horas con testosterona (T), testosterona-BSA (TBSA) o sus vehículo (C) y luego fueron contadas usando un hemocitómetro. Se observa un aumento significativo en el número total de células en aquellas tratadas con T-BSA. (* $p < 0.05$ vs C).

3. La señalización no genómica de testosterona incrementa la expresión de marcadores de musculo liso en CMLp.

Estudios previos de nuestro laboratorio determinaron la capacidad diferenciadora de los andrógenos favoreciendo el aumento de marcadores de fenotipo muscular en CMLp (12, 13). Considerando estos antecedentes, nos propusimos determinar la participación de las vías iniciadas desde la membrana plasmática en este proceso. Para este propósito, evaluamos la expresión de marcadores de células del músculo liso: alfa actina de músculo liso (ACTA2) y calponina (CNN1), y el marcador mesenquimal vimentina (VIM). Se pudo determinar que luego de 6 horas de estimulación con testosterona o testosterona-BSA existe un aumento significativo en los niveles de ARNm para ambos marcadores musculares al mismo tiempo que una disminución de la expresión de ARNm de vimentina ($p < 0.05$) (Fig. 15). La expresión proteica de los marcadores de fenotipo analizados por western blot y por inmunofluorescencia demostró el mismo patrón observado para el ARNm ($p < 0.05$) (Fig. 16 y 17 respectivamente). Estos hallazgos indican que la señalización de andrógenos iniciada desde la membrana plasmática en CMLp es capaz de inducir un incremento en el fenotipo muscular. Interessantemente, la estimulación con testosterona produjo los mismos efectos que los observados luego de la estimulación con testosterona-BSA lo que podría sugerir que este efecto sea regulado sólo a nivel de receptores de membrana.

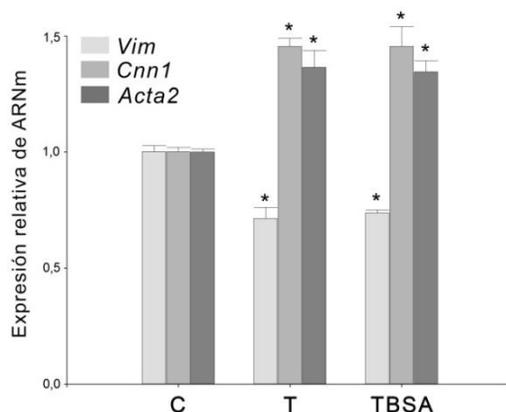


Figura 15. Las vías no genómica de testosterona favorece el fenotipo muscular de CMLp (qPCR). CMLp fueron estimuladas con testosterona (T), testosterona-BSA (TBSA) o vehículo (C) durante 6 horas, posteriormente se midió la expresión de ARNm para actina de musculo liso (Acta2), calponina (Cnn) y vimentina (Vim) por qPCR. Se pudo determinar un aumento significativo en los niveles de los transcritos para los marcadores de musculo liso, Acta2 y Cnn luego de la estimulación tanto con T como con TBSA, mientras que el marcador mesenquimal Vim sufrió una significativa disminución. (* $p < 0.05$ vs C).

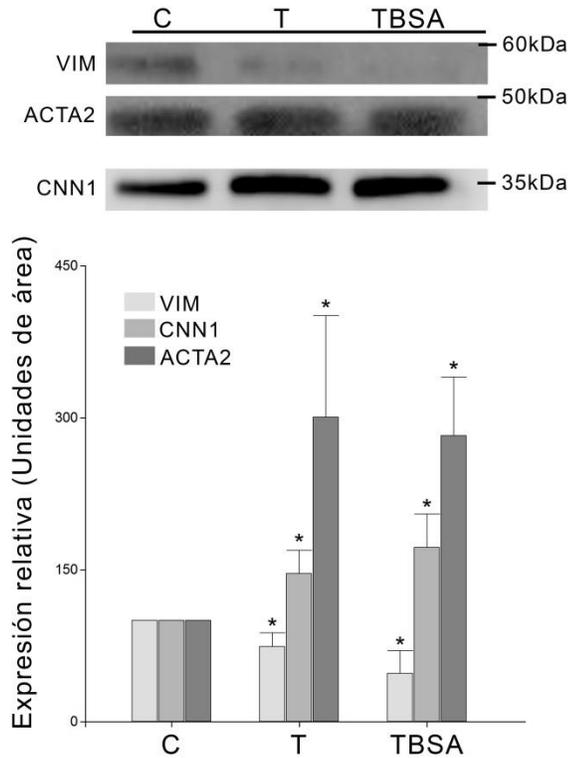


Figura 16. La estimulación de las vías no genómica de testosterona favorece el fenotipo muscular de CMLp (western blot). CMLp fueron estimuladas con testosterona (T), testosterona-BSA (TBSA) o vehículo (C) durante 24 horas. La expresión de las proteínas actina de musculo liso (Acta2), calponina (Cnn) y vimentina (Vim) se midió por western blot. Luego de la estimulación tanto con T como con TBSA, se observó un incremento significativo en la expresión de los marcadores de musculo liso Acta2 y Cnn, al mismo tiempo que una disminución en la expresión del marcador mesenquimal Vim. (*p<0.05 vs C).

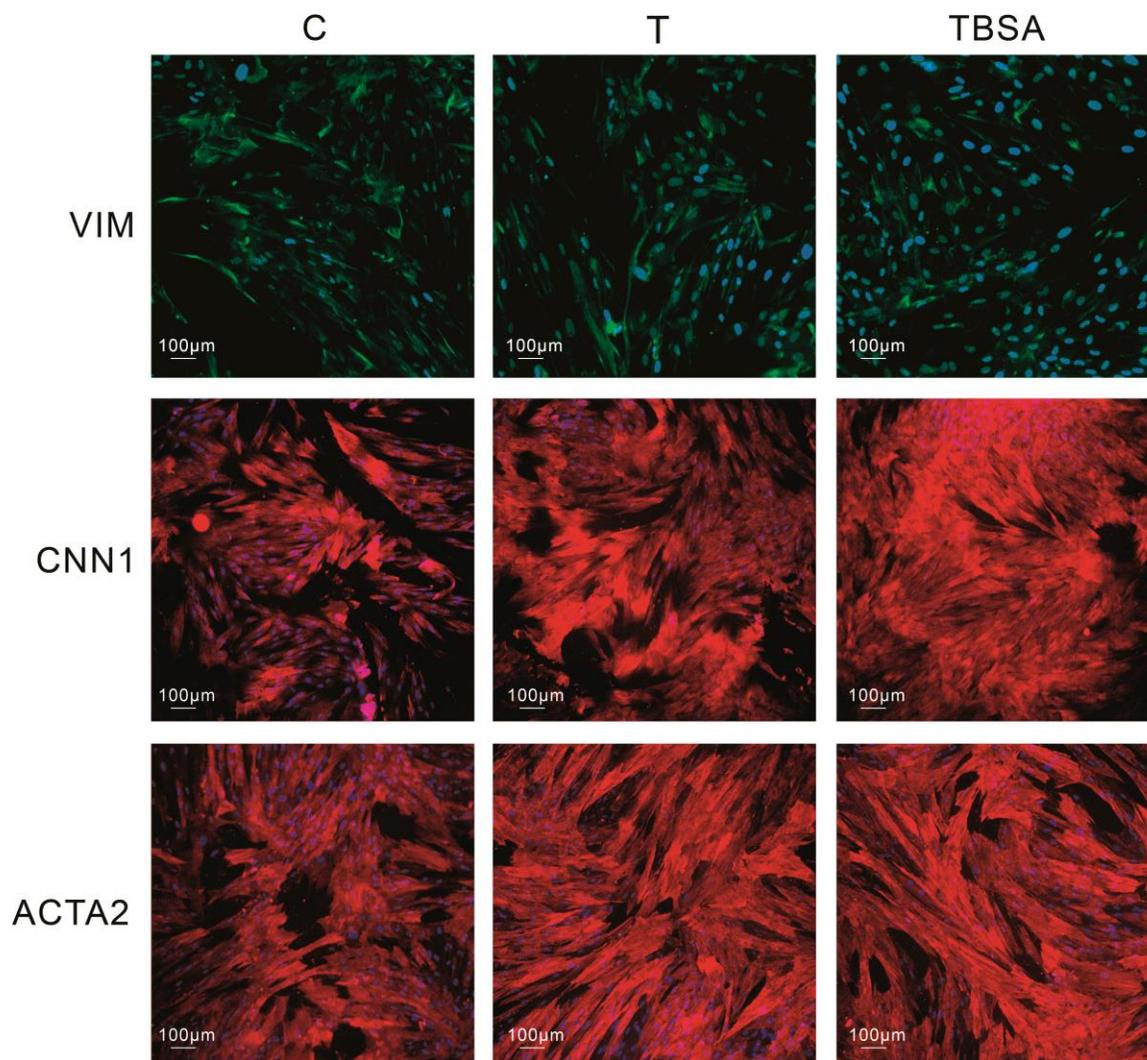


Figura 17. La estimulación de las vías no genómica de testosterona favorece el fenotipo muscular de CMLp (inmunofluorescencia). CMLp fueron estimuladas con testosterona (T), testosterona-BSA (TBSA) o vehículo (C) durante 24 horas y luego se midió la expresión de las proteínas actina de musculo liso (Acta2), calponina (Cnn) y vimentina (Vim) por inmunofluorescencia. Luego de la estimulación tanto con T como con TBSA, se observa un incremento en la expresión de los marcadores de musculo liso Acta2 y Cnn, al mismo tiempo que disminuye la expresión del marcador mesenquimal Vim. Azul: DAPI.

4. La señalización iniciada por testosterona desde la membrana plasmática no participa de la regulación sobre la expresión del propio AR.

Teniendo en cuenta que la testosterona es capaz de regular la expresión de AR (172) y que las CMLp son capaces de responder a testosterona-BSA, nos preguntamos si la

señalización no genómica iniciada desde la superficie celular podría inducir cambios en la cantidad de AR. Para ello, CMLp fueron estimuladas durante 24 horas con testosterona o testosterona-BSA y analizadas mediante western blot; se observó un aumento significativo en la expresión de AR solamente en células estimuladas con testosterona, mientras que las tratadas con testosterona-BSA mostraron valores similares a los del control ($p < 0.05$) (Fig. 18).

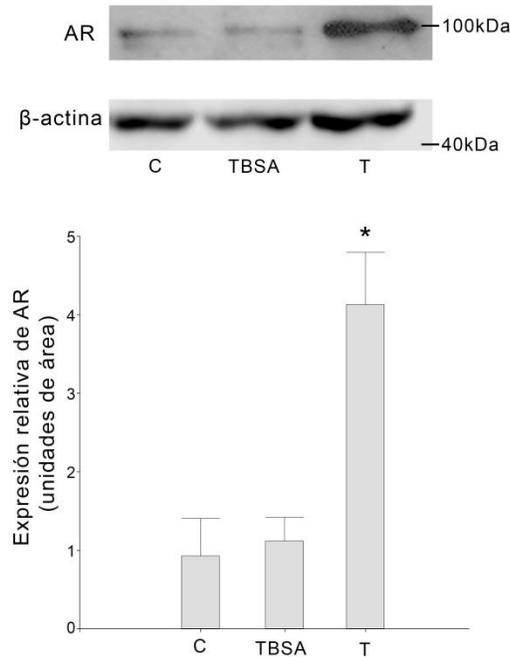


Figura 18. El aumento en la expresión de AR en respuesta a testosterona depende de receptores intracelulares de testosterona. CMLp fueron estimuladas durante 24 horas con testosterona (T), testosterona-BSA (TBSA) o vehículo (C) y la expresión de AR se determinó mediante western blot, β-actina se usó como control de carga. Se observa un incremento significativo en la expresión de AR en células estimuladas con T, mientras que en células estimuladas con TBSA no aumenta la cantidad de receptor. (* $p < 0.05$ vs C).

Al igual que en el análisis de la expresión proteica, el análisis del ARNm para AR por qPCR denotó un incremento del transcripto luego de 6 horas de estímulo con testosterona ($p < 0.05$), mientras que en células estimuladas con testosterona-BSA los niveles fueron similares a los del control (Fig. 19). Estos resultados indican que la hormona debe ingresar a la célula para modificar los niveles de su propio receptor, los cuales se

regulan a nivel transcripcional, mientras que la señalización no genómicas de andrógenos estimulada por membrana no participa en este mecanismo.

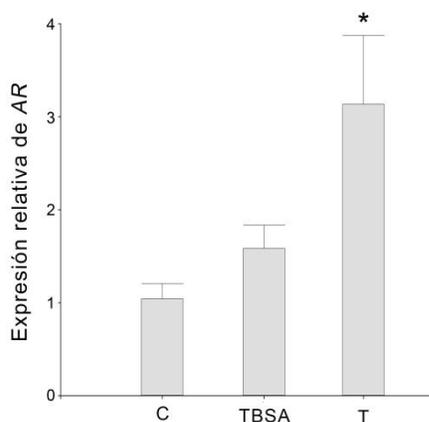


Figura 19. El aumento en la expresión del ARNm para AR depende de receptores intracelulares de testosterona. CMLp fueron estimuladas durante 6 horas con testosterona (T), testosterona-BSA (TBSA) o vehículo (C) y la expresión de AR se determinó mediante qPCR. Se observa un incremento significativo en la expresión de ARNm en células estimuladas con T, mientras que células estimuladas con TBSA no aumentan la cantidad de transcripto. (* $p < 0.05$ vs C).

5. La estimulación de las vías no genómicas de testosterona afecta la transcripción de genes para factores de crecimiento en CMLp

Debido a que la testosterona es capaz de controlar la expresión de factores de crecimiento en células del compartimento estromal, nos propusimos analizar la participación de los receptores para testosterona de superficie en este proceso. El ARNm para los factores de crecimiento, IGF-1, FGF7, IL-6 y TGFB1 expresados por CMLp, fueron analizados por qPCR luego de 6 horas de estimulación con testosterona o testosterona-BSA. Los resultados indicaron que ambas formas de testosterona inducen una disminución en los niveles del ARNm para IL-6, esta molécula con función de citoquina proinflamatoria y factor de crecimiento ha sido también asociada a la proliferación celular, siendo promotora de la proliferación en la mayoría de las células pero con evidencias que la vinculan con la anti-proliferación en otros tipos celulares. Por otro lado ocurre un aumento en los niveles de los transcritos para Igf-1 y Fgf7, ambos factores implicados en la

proliferación celular, luego de estimulación con ambas formas de testosterona. Llamativamente el ARNm para $Tg\beta 1$, un factor de crecimiento asociado a inhibición de la proliferación, aumentó solamente luego de la estimulación con testosterona y no por estimulación con testosterona-BSA (Fig. 20).

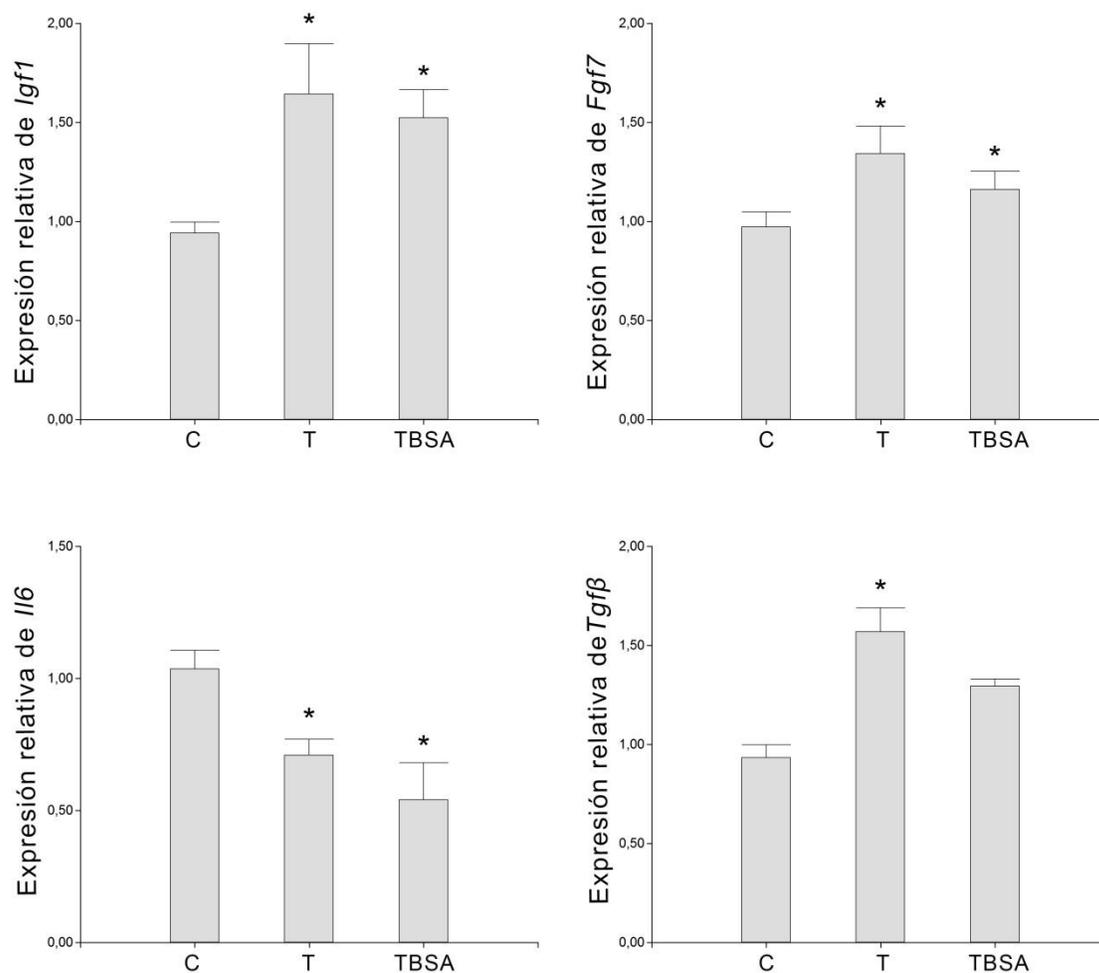


Figura 20. La estimulación de receptores de testosterona de membrana plasmática actúa sobre la expresión de ARNm para distintos factores de crecimiento. CMLp fueron estimuladas durante 6 horas con testosterona (T), testosterona-BSA (TBSA) o vehículo (C) y la expresión de *Igf-1*, *Fgf7*, *Il6* y *Tgfbeta* se determinó mediante qPCR. Se observó un incremento significativo en la expresión de *Igf-1* y *Fgf7*, mientras que una disminución para la expresión de ARNm de *Il6* en células estimuladas con testosterona o testosterona-BSA. Por otro lado la expresión de ARNm para *Tgfbeta* incrementó en células estimuladas con testosterona mientras que no se modificó en células tratadas con testosterona-BSA. (*p<0.05 vs control).

En síntesis, las vías no genómicas estimularon la transcripción de ARNm para los factores que promueven proliferación como IGF-1 y FGF7, en concordancia con el marcado aumento de la expresión de ki67 antes descrita. Por otro lado, ambos receptores regularon negativamente a IL-6, una citoquina proinflamatoria, reforzando el potencial de testosterona de modular moléculas proinflamatorias como fuera demostrado anteriormente por nuestro grupo en relación a la vía de TLR4 (155). Con respecto a TGF β 1, dado a que este último factor de crecimiento está implicado en una inhibición de la proliferación celular, estos resultados estarían evidenciando un posible mecanismo mediador del control de las vías proliferativas en células estimuladas con testosterona el cual no estaría presente en células estimuladas con testosterona-BSA, como se describió en la sección 3.2.

6. La modulación de los andrógenos sobre la respuesta de las CMLp a LPS requiere de la activación del AR intracelular

Trabajos previos del laboratorio demostraron la capacidad de testosterona para modular la respuesta inducida por LPS (13). Considerando este antecedente, decidimos determinar la implicancia de la activación de los receptores de testosterona de superficie sobre este efecto regulador, lo que se llevó a cabo mediante co-estimulación con LPS y testosterona-BSA. Como se observó previamente, el estímulo con LPS indujo secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF α , mientras que la co-incubación con testosterona reguló negativamente su expresión. Por el contrario, la co-incubación de testosterona-BSA con LPS no fue capaz de evitar el aumento de la secreción de IL-6 en comparación al estímulo con LPS ($p < 0.05$) (Fig. 21); más aún, en el caso de la citoquina TNF α la co-incubación de LPS con testosterona-BSA incrementó la cantidad secretada de citoquina con respecto a LPS ($p < 0.05$) (Fig. 22). En concordancia con los resultados previos de nuestro laboratorio (13), el estímulo de LPS también indujo la rápida translocación de NF- κ B al núcleo ($p < 0.05$), factor activador de la respuesta inflamatoria, mientras que su co-incubación con testosterona impidió esta respuesta (Fig. 23). En esta tesis demostramos que a diferencia de lo que ocurre con testosterona, la co-incubación de

LPS con testosterona-BSA no modificó significativamente el número de núcleos positivos para NF- κ B (Fig. 23). Estos resultados indican que la señalización inducida por

receptores de testosterona de superficie no participa del rol anti-inflamatorio de la testosterona, el cual dependería de la activación de receptores intracelulares.

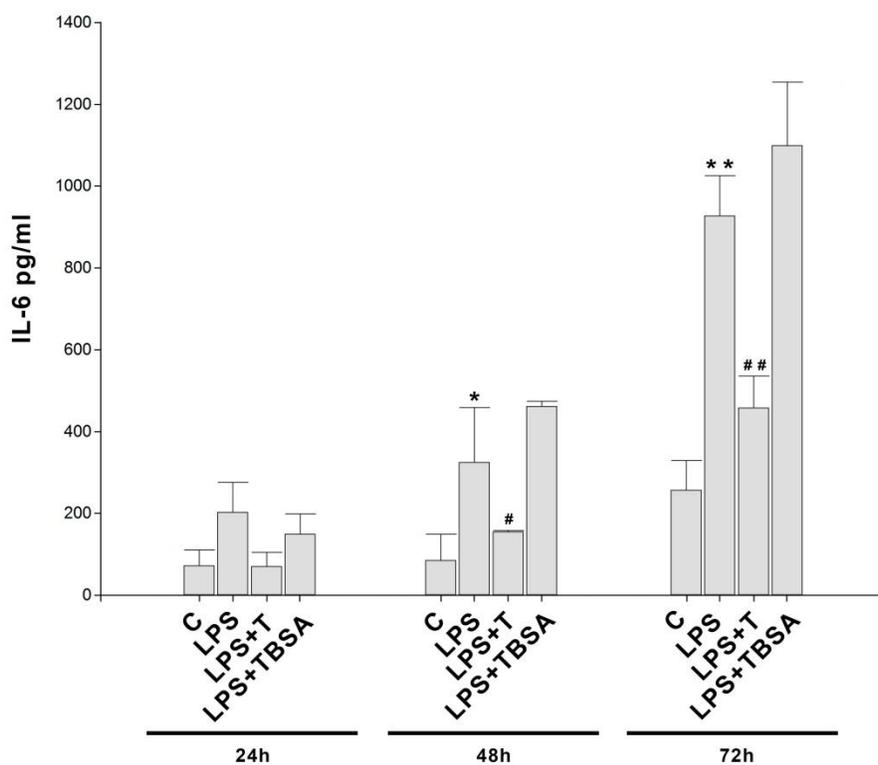


Figura 21. La estimulación de receptores de testosterona de membrana no modula la secreción de IL-6 inducida por LPS en CMLp. CMLp fueron estimuladas por 24, 48 o 72 horas con LPS, LPS + testosterona (T), LPS + testosterona-BSA (TBSA) o vehículo (C) y se midió la secreción de IL-6 al medio de cultivo por la técnica de ELISA. Se puede observar que la estimulación con LPS produce un incremento significativo en la secreción de IL-6 tanto a las 48 como a las 72 horas posteriores a la estimulación. La co-incubación con testosterona modula negativamente el incremento en la secreción de citoquina mientras que la incubación con testosterona-BSA es incapaz de reproducir este efecto. (* $p < 0.05$ vs C; # $p < 0.05$ vs LPS y vs T-BSA; ** $p < 0.01$ vs C; ## $p < 0.01$ vs LPS y vs T-BSA).

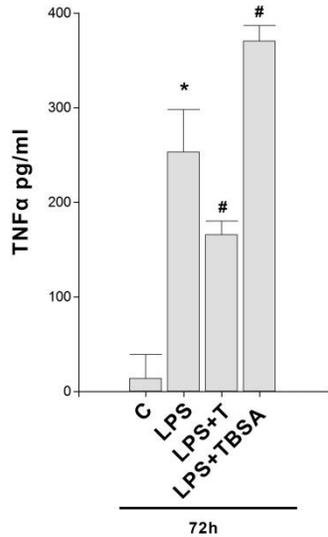


Figura 22. La estimulación de receptores de testosterona de membrana aumenta la secreción de TNF α inducida por LPS en CMLp. CMLp fueron estimuladas por 72 horas con LPS, LPS + testosterona (T), LPS + testosterona-BSA (TBSA) o vehículo (C), la secreción de TNF α se midió por ELISA. Se puede observar que la estimulación con LPS produce un incremento en la secreción de TNF α . La co-incubación con testosterona modula negativamente el incremento en la secreción de citoquina mientras que la incubación con testosterona-BSA incremento la secreción con respecto a LPS. (*p<0.05 vs C; # p<0.05 vs LPS).

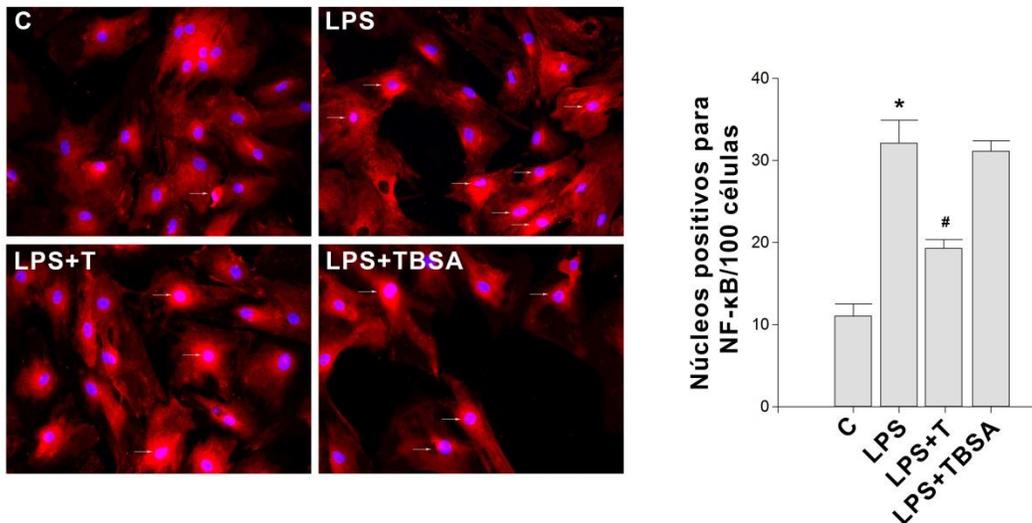


Figura 23. La regulación ejercida por testosterona sobre la translocación de NF-κB al núcleo, no depende de receptores de membrana para testosterona. CMLp fueron estimuladas con LPS, LPS + testosterona (T), LPS + testosterona-BSA (TBSA) o vehículo (C) durante 30 minutos, se midió la translocación de NF-κB al núcleo por inmunofluorescencia. Las flechas blancas indican expresión de NF-κB en el núcleo. Se observa como el estímulo de LPS induce translocación de NF-κB al núcleo, la co-incubación de LPS con T produjo una regulación negativa sobre dicha translocación, mientras que la co- incubación con T-BSA fue incapaz de reproducir este efecto. (*p<0.05 vs C; # p<0.05 vs LPS).

7. El estímulo de testosterona iniciado por receptores presentes en la superficie celular induce un incremento en la proliferación de CEPH.

La BPH transcurre con un aumento de los compartimientos epitelial y estromal, en este último, las células sufren diferenciaciones que las convierten en miofibroblastos conformando la estroma reactiva. Se ha descrito que esta patología ocurre en presencia de un ambiente inflamatorio con altos niveles de citoquinas proinflamatorias e infiltrado de células del sistema inmune. Antecedentes del laboratorio demostraron que la respuesta celular a testosterona es dependiente del microambiente, comportándose como homeostática cuando las células se encuentran en un microambiente inflamatorio (47,157). En vista de los efectos diferenciales observados entre los receptores de superficie y los intracelulares sobre la proliferación de CMLp en condiciones normales y en la modulación de la inflamación, que evidencian el rol homeostático de la forma libre de testosterona, nos propusimos evaluar si estas diferencias se mantienen en células estromales provenientes de una condición patológica como la BPH.

A lo largo de esta tesis doctoral se determinaron los parámetros para realizar un cultivo primario de CEPH, cuyas condiciones se detallaron en la sección 2.3. Para confirmar la identidad de estas células, estas fueron visualizadas mediante microscopía óptica (Fig. 24) a través de la cual se observó una morfología fusiforme. A su vez mediante microscopía electrónica de transmisión (Fig. 25), se pudieron observar células con un aparato de Golgi predominante, abundante retículo endoplasmático, núcleos con abundantes nucléolos y un citoesqueleto de actina organizado en fibras en la superficie celular. El fenotipo de estas células se determinó mediante las técnicas de western blot e inmunofluorescencia, las cuales demostraron expresión simultánea de tres marcadores estromales, actina de musculo liso, calponina y vimentina (Fig. 26 y 27 respectivamente). Todos estos resultados indican un fenotipo de miofibroblasto, que aparece en los estromas reactivos característicos de BPH y cáncer, e indican que durante el cultivo celular estas células no pierden su fenotipo. Si bien no se utilizó un marcador de células epiteliales con el fin de descartar la presencia de este tipo celular, el medio selectivo y los sucesivos repliques generan un cultivo que por microscopía óptica muestra estar conformado en su totalidad por células estromales.

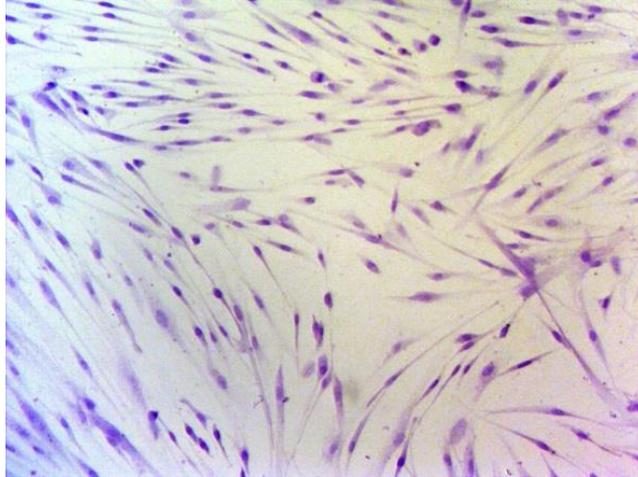


Figura 24. CEPH cultivadas *in vitro* visualizas por microscopía óptica. CEPH *in vitro* fueron fijadas y teñidas con hematoxilina para ser visualizadas por microscopia óptica, Se observa la forma ahusada de estas células en concordancia con células del estirpe estromal.

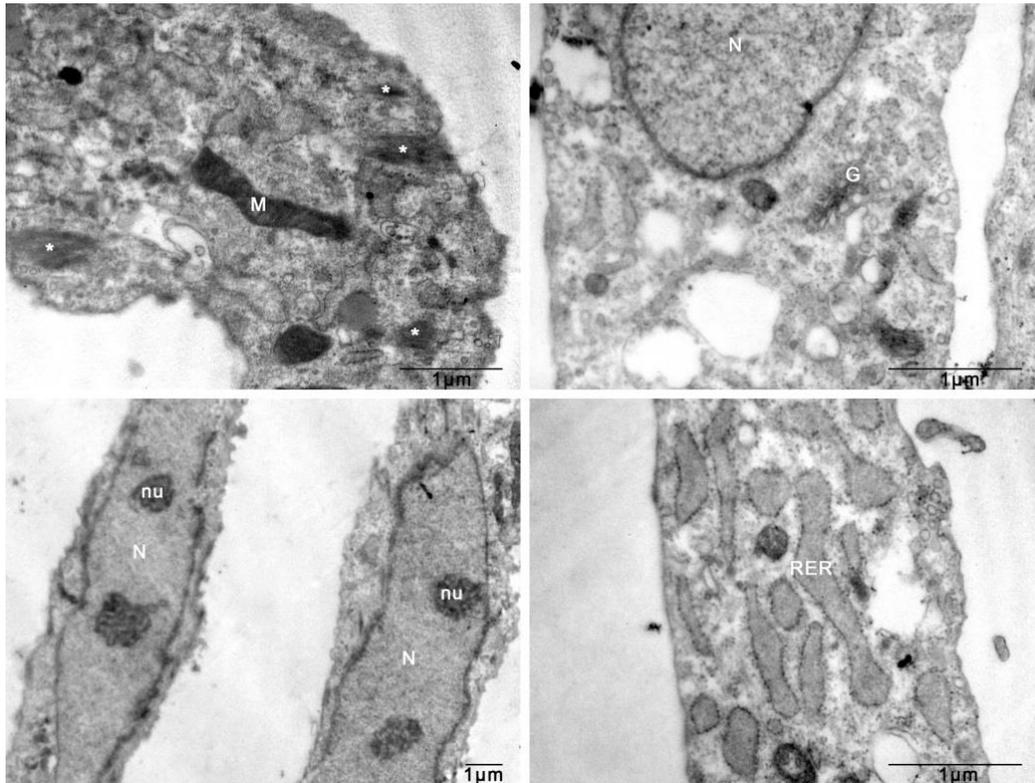


Figura 25. CEPH cultivadas *in vitro* visualizas al microscopio electrónico. CEPH *in vitro* fueron fijadas y procesadas para microscopia electrónica y sus características ultraestructurales fueron analizadas por TEM. Se observan núcleos con abundantes nucléolos, retículo endoplasmático rugoso dilatado y paquetes de filamentos de actina. N: núcleo, nu: nucléolo, M: mitocondria, RER: retículo endoplasmático rugoso, G: aparato de Golgi, *: filamentos de actina.

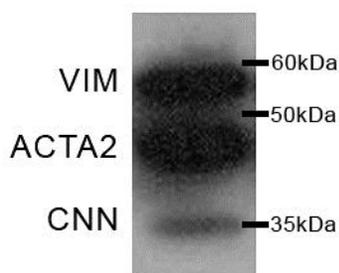


Figura 26. Las CEPH expresan marcadores de fenotipo muscular y mesenquimal, determinado por western blot. CEPH *in vitro* fueron sometidas a western blot de los marcadores de musculo liso: actina de musculo liso y calponina, y del marcador mesenquimal: vimentina. Se observa expresión basal de los tres marcadores, indicando un fenotipo correspondiente al de células del compartimiento estromal.

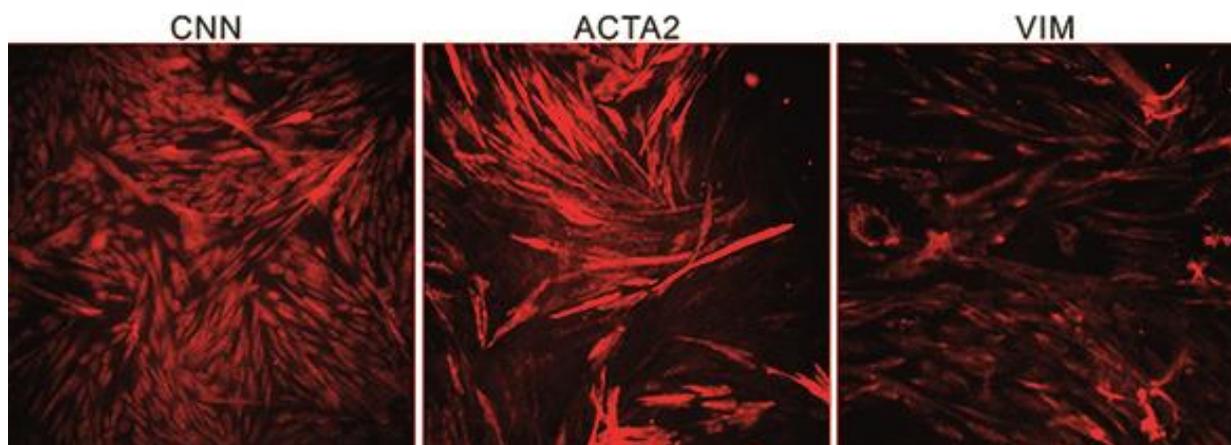


Figura 27. Las CEPH expresan marcadores de fenotipo muscular y mesenquimal, determinado por inmunofluorescencia. CEPH *in vitro* fueron sometidas a inmunofluorescencia de los marcadores de musculo liso: actina de musculo liso (Acta2) y calponina (Cnn), y del marcador mesenquimal: vimentina (Vim). Se observa expresión basal de los tres marcadores, indicando un fenotipo correspondiente al de células del compartimiento estromal.

Sobre estos cultivos primarios se evaluó el efecto de las vías no genómicas de testosterona en la proliferación celular. Para ello, CEPH fueron estimulados con testosterona o con testosterona-BSA durante 24 horas, posteriormente la proliferación fue analizada por inmunocitoquímica de Ki67. Pudimos observar que las células estimuladas con testosterona-BSA presentan mayor proliferación que el control y que las células estimuladas con testosterona, las cuales no se diferenciaron del control ($p < 0.05$) (Fig. 28).

Estos resultados reproducen lo observado para las CMLp, confirmando el rol proliferador de las vías no genómicas iniciadas por receptores de testosterona presentes en la superficie celular. En tanto que la estimulación con testosterona libre no tuvo efecto sobre la proliferación.

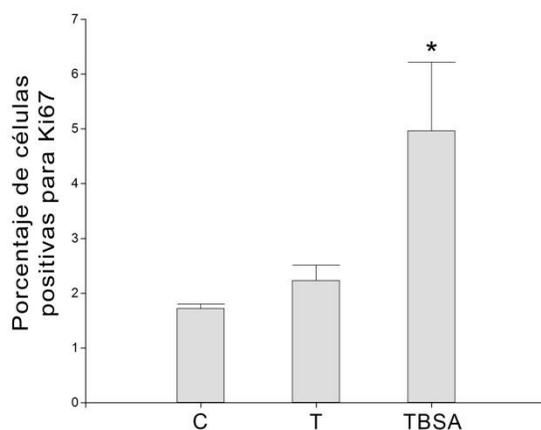


Figura 28. La estimulación de las vías no genómicas de testosterona induce un aumento en la proliferación de CEPH. CEPH fueron estimuladas con testosterona (T) o testosterona-BSA (TBSA) durante 24 horas, y analizadas por inmunofluorescencia de Ki67 mediante conteo de núcleos positivos vs núcleos totales. Se puede observar que las células estimuladas con TBSA sufren un incremento en la tasa de proliferación con respecto tanto a las células controles como a las estimuladas con testosterona. C: control; T: testosterona; TBSA: testosterona-BSA (* $p < 0.05$ vs control).

8. La señalización por AR de membrana induce un descenso en la expresión de ARNm *TGFβ1* en CEPH.

Debido al posible rol mediador de $TGF\beta 1$ en el efecto regulador de la proliferación inducido por testosterona en CMLp, intentamos determinar si de este factor de crecimiento anti-proliferativo tiene el mismo comportamiento en CEPH, células con perfil de miofibroblastos según la caracterización de marcadores realizada. De esta manera, analizamos la expresión del ARNm para este factor de crecimiento luego de 6 horas de estimulación, tanto con testosterona como con testosterona-BSA. Interesantemente, pudimos observar que ambos estímulos producen un descenso en la expresión de $TGF\beta 1$, sin embargo la estimulación con testosterona-BSA genera una mayor disminución del

transcripto ($p < 0.05$) (Fig.29). La disminución observada luego de estimulación con ambas moléculas es probable que se deba a que, a diferencia de lo que ocurre en las CMLp, este factor de crecimiento ya se encuentre elevado en los miofibroblastos, ya que es el factor que produce su diferenciación a partir de fibroblastos en la BPH. Estos resultados sugieren que en este tipo celular, uno de los mecanismos que podría estar determinando la diferencia en la proliferación entre las células estimuladas con testosterona y testosterona-BSA radica en la fuerte disminución que inducen los receptores de membrana sobre la expresión de *TGFβ1*.

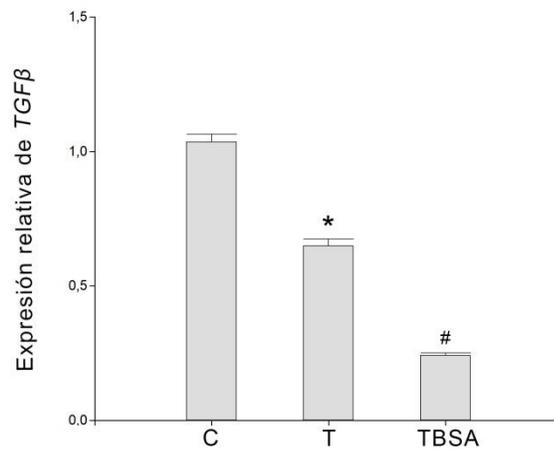


Figura 29. La estimulación de receptores de testosterona presentes en la superficie celular de CEPH induce disminución en la expresión de ARNm para *TGFβ1*. CEPH fueron estimuladas con testosterona o testosterona-BSA por 6 horas y luego mediante qPCR se determinaron los niveles de *TGFβ1*. Se puede observar una marcada disminución del ARNm para el factor de transcripción luego de ambos estímulos sin embargo, en células estimuladas con testosterona-BSA la expresión en *TGFβ1* es significativamente menor. C: control; T: testosterona; TBSA: testosterona-BSA (* $p < 0.05$ vs C; # $p < 0.05$ vs T).

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

La testosterona es la principal hormona reguladora del desarrollo y mantenimiento de la glándula prostática; durante la embriogénesis la ausencia de esta hormona impide el desarrollo de la glándula (32), mientras que la castración durante la edad adulta produce una marcada regresión (28,29). A partir de comienzos del siglo XX se le adjudicó a la testosterona y a sus derivados un fuerte rol patológico relacionado con el crecimiento desregulado de la próstata adulta (28,29), idea que se mantuvo durante casi un siglo y hasta la actualidad (96). En contraste con este marcado efecto patogénico, resultados de nuestro laboratorio y de otros han demostrado un rol homeostático de la testosterona que ocurre en relación a procesos inflamatorios de la próstata (46,154). En este sentido, se ha descrito que esta hormona es capaz de modular la proliferación, dediferenciación y expresión de citoquinas producidas por células estromales de la próstata en respuesta a procesos inflamatorios que ocurren durante la prostatitis o BPH (46,47). Las vías por las cuales la testosterona puede mediar esta gran diversidad de efectos son aún desconocidas; de la misma manera queda por dilucidar los mecanismos por los cuales testosterona es capaz de modular la respuesta inflamatoria de las células estromales. Los objetivos de esta tesis doctoral abordaron esta temática, intentando aclarar la participación de las vías iniciadas por andrógenos desde la membrana plasmática en comparación con las iniciadas desde receptores intracelulares.

En las últimas tres décadas, el conocimiento respecto a los mecanismos de señalización de testosterona a nivel celular incrementó considerablemente, en relación con un aumento en el número de trabajos abocados a describir vías de señalización no genómicas estimuladas por andrógenos y sus implicancias en diversas respuestas celulares. A pesar de ello, en comparación con otras hormonas esteroideas tales como los estrógenos o los glucocorticoides, la señalización no genómica mediada por andrógenos ha sido mucho menos estudiada. Si bien se ha reportado que diversos tipos celulares poseen la capacidad para responder a testosterona mediante vías no genómicas de señalización, sus mecanismos y funciones aún no están enteramente esclarecidos, existiendo incluso fuertes controversias entre algunos hallazgos. Debido a la importancia de la testosterona en las patologías de la glándula prostática, la mayoría de los estudios han sido llevados a cabo en líneas celulares provenientes de cáncer de próstata y en particular en células epiteliales, siendo en contraparte muy limitados los trabajos dedicados a células normales o del compartimiento

estromal de la próstata. Con el objetivo de aportar a este área de conocimiento tan poco desarrollada, en esta tesis doctoral utilizamos cultivos primarios de CMLp de rata las cuales expresan marcadores musculares como actina de músculo liso y calponina, y cultivos primarios de CEPH provenientes de pacientes con BPH, las cuales demostraron expresar vimentina, actina de músculo liso y calponina, concordando con un perfil de miofibroblastos. La importancia de estudiar la respuesta no genómica de testosterona en células de la estroma en esta tesis doctoral, radica en el complejo papel que cumplen estas células en el mantenimiento de la homeostasis glandular, mediando importantes comunicaciones paracrinas con las células del compartimiento epitelial.

En vista de estos antecedentes, los objetivos de esta tesis se centraron en investigar los efectos no genómicos estimulados por testosterona sobre la proliferación celular, la diferenciación muscular y los efectos inmunomoduladores en CMLp *in vitro*. Por primera vez se reveló la presencia de una población de AR en la superficie de estos tipos celulares. A su vez, se demostró que mediante mecanismos no genómicos de señalización, la testosterona puede aumentar la proliferación celular a través de cascadas de señalización, logrando niveles mayores de proliferación que los inducidos por la forma libre de testosterona. Otros parámetros de las CMLp que aumentaron por activación de vías no genómicas fueron la diferenciación celular mediado por aumento de marcadores de fenotipo muscular y la expresión del ARNm para los factores de crecimiento IGF-1 y FGF7. Por otra parte, se comprobó que la señalización de testosterona iniciada desde receptores presentes en la superficie celular no participa en la modulación de las vías proinflamatorias inducidas por un agente bacteriano, permitiendo especular que dicha regulación depende de receptores intracelulares de testosterona. Reforzando el rol antiinflamatorio, el estímulo de receptores intracelulares a su vez, indujo aumento de la expresión de ARNm para TGF β , un factor antiproliferativo y antiinflamatorio. En el mismo sentido, sólo el estímulo de receptores intracelulares fue capaz de aumentar la expresión del AR total. En CEPH, la testosterona confirmó su fuerte efecto proliferador mediante mecanismos no genómicos, lo cual coincidió con una significativa disminución de la expresión de TGF β , mientras que desde receptores intracelulares la hormona mantuvo su tendencia homeostática al no modificar la proliferación. Estos resultados evidenciaron respuestas diferenciales frente a la estimulación con testosterona, las cuales son

dependientes de la localización subcelular de su receptor y podrían explicar efectos contrapuestos de esta hormona en relación al contexto celular, promoviendo la homeostasis o induciendo proliferación celular.

Se considera que las vías no genómicas de las hormonas esteroideas son activadas por receptores que se encuentran en la superficie celular (106,173). Sitios en la membrana plasmática con capacidad para unirse a testosterona fueron descubiertos poco tiempo después de evidenciarse la existencia de las vías no genómicas, mediante el uso de testosterona conjugada a BSA y a FITC (114). A pesar de esto, la posterior identificación de estos receptores para testosterona no fue fácil de dilucidar, y aun hasta la fecha existe cierta controversia. A pesar de que los AR carecen de regiones hidrofílicas típicas de receptores transmembrana, actualmente la mayoría de los estudios proponen al AR como el mediador de las vías no genómicas iniciadas desde la superficie celular. Si bien se desconoce la posición del AR en cuanto a la membrana plasmática, un estudio reciente realizado mediante modelos computacionales, propuso la existencia de una secuencia del AR que sería capaz de comportarse como región transmembrana (127); sin embargo, esta hipótesis aún no ha sido corroborada en modelos biológicos. En concordancia, ensayos de inmunocitoquímica usando anticuerpos específicos contra el AR han demostrado la presencia de este receptor en la superficie de distintos tipos celulares (104,121,122); además, estudios con inhibidores contra el AR como hidroxiflutamida o nilutamida han sido capaces de inhibir efectos no genómicos, indicando la participación de dicho receptor (104,105,120). Interesantemente, también se demostró la participación de AR en la señalización no genómica mediante transfecciones de AR y Src conjugados, cada uno, a partes complementarias de una molécula fluorescente, observándose fluorescencia luego de que el receptor se uniera a esta proteína quinasa (174). Estos autores demostraron que tanto DHT como testosterona son capaces de inducir la unión entre AR y Src luego de 10 minutos de estímulo y que esta unión era inhibida por los inhibidores de AR, acetato de ciproterona y flutamida. Los aportes de esta tesis doctoral permitieron demostrar la presencia del AR en la superficie de CMLp mediante inmunomarcaciones con anticuerpos específicos. Es importante destacar a su vez, que a diferencia de los trabajos publicados hasta la fecha, los ensayos de inmunocitoquímica y citometría de flujo llevados a cabo en esta tesis, se desarrollaron en células vivas, manteniendo la integridad de la membrana

plasmática y de esta manera garantizando la detección exclusiva de receptores de membrana. Además, en comparación con los estudios anteriores, nuestros estudios se centraron en CMLp en condiciones normales, e indican que en condiciones basales estas células ya presentan una población de receptores en la superficie celular. Mediante inmunomarcación y análisis por citometría de flujo pudimos determinar que la población celular que presenta AR en superficie en un momento determinado es de aproximadamente 18%. Otros estudios en donde se cuantificó la cantidad de células que expresan receptores esteroideos en la superficie celular en un determinado momento, demostraron que el porcentaje es en general inferior al 20% y que este porcentaje depende del tipo celular (175). La técnica de precipitación de proteínas de membrana por biotina/avidina, también ha sido utilizada por distintos grupos de investigación con el fin de demostrar la presencia y cantidad de receptores esteroideos en la membrana plasmática (175,176). El análisis del precipitado de proteínas de superficie por western blot realizado en esta tesis, demostró contener AR, y como era de esperar en cantidades muy inferiores en comparación con el total de receptores celulares. Estos resultados también concuerdan con otros estudios en donde se demuestra que la cantidad de AR en membrana representa aproximadamente un 5% del total (126).

La activación de cascadas de señalización es la principal vía a través de la cual los estímulos iniciados por los receptores de membrana plasmática llegan al núcleo y modifican la expresión génica. Diversos estudios han demostrado la activación de la vía de las MAPK y PI3K/Akt en líneas celulares y cultivos primarios como respuesta a la estimulación de las vías no genómicas de testosterona (121,136,137,139,141). Estas vías culminan con la activación de factores de transcripción como Elk-1 (144), NF- κ B (139) y CREB (145), entre otros, los cuales son capaces de regular distintas respuestas celulares como la proliferación y la sobrevivencia celular. Otras vías activadas por testosterona en líneas celulares epiteliales prostáticas involucran a moléculas como BAD, FasL y caspasas y han sido vinculadas con la apoptosis (139,143). En células estromales prostáticas, los únicos registros de señalización no genómica estimulada por andrógenos provienen de dos estudios llevados a cabo en células de pacientes con BPH (144,146). Estos estudios reportaron un incremento en la concentración de calcio y en la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a estimulación con DHT; sin embargo, no se investigaron los procesos celulares

consecuentes desencadenados por estas respuestas. La activación de ERK1/2 y Akt observada en CMLp en nuestros estudios, ocurre minutos después de la estimulación por testosterona, correspondiéndose con una respuesta rápida propia de la estimulación no genómica. La fosforilación de ERK ha sido vinculada con varios procesos celulares pero en particular con la proliferación celular. En este sentido, mediante ensayos con un inhibidor de ERK, pudimos determinar que la activación de esta vía de señalización es necesaria para el incremento de la proliferación celular inducida por testosterona desde la membrana plasmática. Esto mismo se observó en otros tipos de células como en la línea LNCaP, en donde la proliferación inducida por testosterona fue dependiente de la activación de MAPK entre otras vías de señalización (107).

Los efectos no genómicos de las hormonas esteroideas activan diversas vías de señalización implicadas en el control de la viabilidad celular. Sin embargo la participación de los efectos no genómicos de testosterona frente a la proliferación celular ha sido controversial, quedando aún mucho por esclarecer. Diferentes grupos de investigación sostienen la hipótesis de que los efectos no genómicos de testosterona son capaces de inducir proliferación celular, actuando a través la transactivación de receptores de factores de crecimiento, en particular EGFR y una posterior activación de vías de señalización, principalmente MAPK para terminar activando factores de transcripción (126,141). En contraparte, otros grupos argumentan que la estimulación no genómica de testosterona induciría apoptosis mediante un aumento en la activación de moléculas pro-apoptóticas como BAD, e incremento en la expresión de caspasas. Estos resultados fundamentan la hipótesis sobre el posible uso de conjugados de testosterona con fines terapéuticos para el tratamiento del cáncer de próstata (149,177). Mientras que estos estudios han sido obtenidos a partir de líneas inmortalizadas de células epiteliales prostáticas, en este trabajo de tesis doctoral, en cambio, se evaluó el efecto no genómico de testosterona sobre la proliferación de células estromales normales, las cuales no habían recibido atención con anterioridad. Encontramos que la tasa de proliferación celular aumenta luego de estimular los receptores de testosterona de superficie, incluso a niveles mayores a los alcanzados luego de la estimulación con testosterona libre. Si bien el debate sobre los posibles mediadores de los efectos no genómicos de testosterona llevó al descubrimiento de distintos tipos de receptores de membrana plasmática, en este trabajo demostramos la participación

del AR en la activación de vías no genómicas que llevan a la proliferación celular, mediante el uso de un inhibidor específico para tal receptor. Por otra parte, mientras que muchos estudios se han concentrado en medir mecanismos estrictamente proliferativos o apoptóticos de manera individual, existen pocos trabajos que hayan medido el balance final de estos dos procesos a través de la medición del número total de células. En esta tesis doctoral analizamos el número total de CMLp luego de 48 horas de estimulación, demostrando un incremento significativo en la cantidad de células finales cuando se activaron exclusivamente las vías no genómicas de testosterona, mientras que el tratamiento con testosterona libre no indujo cambios significativos en relación al control. Este dato, sumado al incremento en la proliferación (Ki67), concuerda con el rol inductor de la proliferación antes descrito por otros autores, en respuesta a vías no genómicas de testosterona iniciadas a nivel de membrana plasmática. En cambio, luego de la estimulación con testosterona libre el incremento observado de Ki67 no se correlacionó con un aumento del número total de células, ello puede deberse en principio a que el ensayo utilizado para el conteo de células no sea lo suficientemente sensible, aunque también podría sugerir que los AR intracelulares podrían poner en marcha efectos reguladores de la proliferación con la finalidad de favorecer la homeostasis glandular.

Para comprender estos resultados logrados, es necesario recordar que las CMLp, al poseer AR tanto en la membrana plasmática como en el interior celular, inician respuestas genómicas y no genómicas en simultáneo al ser estimuladas con testosterona libre, resultando de esta manera imposible diferenciar los efectos específicos de los receptores intracelulares (de manera independiente de los de membrana) que permitan explicar la menor respuesta proliferativa inducida por testosterona en relación al estímulo exclusivo de membrana plasmática. Metodológicamente, existe actualmente la posibilidad de estimular las vías no genómicas iniciadas desde la membrana plasmática de manera independiente de las vías intracelulares usando formas impermeables de testosterona, pero hasta la fecha no existe una metodología que permita llevar a cabo la activación exclusiva de los mecanismos genómicos desde receptores intracelulares. Una aproximación posible para deducir la contribución de las vías iniciadas por receptores intracelulares, sería mediante la sustracción de los efectos producidos por las vías iniciadas desde la membrana a los efectos totales de la testosterona. Si bien este último enfoque puede acarrear errores al no

considerar las posibles interacciones entre ambas vías, es una de la aproximación más cercana actualmente para células con capacidad para responder mediante ambos mecanismos. Con estas consideraciones, nuestros estudios nos indican que la proliferación ejercida por testosterona sería debida en su mayoría a los efectos no genómicos iniciados a partir de la membrana plasmática, mientras que podemos suponer que las vías genómicas iniciadas por testosterona se comportarían como pro-homeostáticas modulando dicha proliferación. Otra interpretación nos permitirá concluir que las vías genómicas podrían tener efectos inhibitorios *per se* sobre la proliferación aún en ausencia del estímulo no genómico de testosterona. Un posible mecanismo regulador, sería el aumento en la expresión de TGF β 1 mediado por mecanismos genómicos como fue observado en esta tesis doctoral, el cual serviría como regulador del efecto proliferativo de las CMLp. El desarrollo de técnicas que permitan exclusivamente la inducción de la señalización de testosterona mediante mecanismos genómicos serán críticos para el entendimiento más acabado de la señalización de esta hormona.

Previamente demostramos que testosterona aumenta la diferenciación de CMLp al inducir aumento de la expresión de proteínas contráctiles como alfa actina de musculo liso y calponina, tanto en condiciones basales como en células dediferenciadas por LPS (47,157). Se demostró también que dicho efecto es mediado a través del eje miocardina/SRF (157). A su vez, el rol de los andrógenos sobre la diferenciación celular, ha sido demostrado en otros tipos celulares, como en la línea celular de musculo esquelético C2C12 (178) o en células musculares satélites (179). El papel que juegan las vías no genómicas de testosterona sobre la diferenciación de CMLp no había sido estudiado hasta el momento. Los resultados de esta tesis no solamente confirmaron el rol diferenciador de testosterona sino que evidenciaron la participación de los receptores de testosterona localizados en superficie celular, los que al activarse inducen un incremento en la expresión de marcadores musculares y una disminución en la expresión de los marcadores mesenquimales. Un fenómeno similar se observó en la línea celular L6 de músculo esquelético, esta línea carente de AR respondió a testosterona a través de receptores de membrana aumentando la expresión de marcadores musculares (130).

El rol diferenciador de los andrógenos contribuye al mantenimiento del fenotipo muscular en la glándula, permitiendo de esta manera conservar las interacciones

epitelio/estromales. En modelos de prostatitis bacteriana así como en condiciones patológicas de la próstata que se acompañan de inflamación, el microambiente induce cambios en las CMLp que se dediferencian hacia un fenotipo de miofibroblastos, los cuales presentan un grado de diferenciación intermedia entre células musculares y fibroblastos (38). Estas células exhiben una alta tasa proliferativa y producen mayor cantidad de factores de crecimiento y elementos de matriz extracelular, induciendo una remodelación estromal. Si bien el mantenimiento de un fenotipo diferenciado de CMLp se considera pro homeostático evitando el fenotipo de miofibroblasto (180-183), en BPH el efecto diferenciador podría aumentar la contracción de los nódulos de células musculares y constreñir la uretra prostática agravando los LUTS.

Se ha señalado la importancias de las células estromales en las interacciones entre el compartimiento estromal y el epitelial, necesarias tanto para el desarrollo como para la funcionalidad de la próstata (32). Estas interacciones son indispensables para mantener la homeostasis glandular al afectar directamente las tasas de proliferación y apoptosis de cada tipo celular. En respuesta a andrógenos, las células estromales son capaces de secretar una gran cantidad de factores como EGF, FGF2, IGF-1, TGF β 1, IL-6, entre otros, que actúan directamente sobre el compartimiento epitelial o sobre otras células estromales (184). Resultados de esta tesis doctoral en CMLp, demostraron que la testosterona es capaz de incrementar los niveles de ARNm para el factor anti-proliferativo TGF β 1 mediante activación de receptores intracelulares, efectos que no se reproducen mediante la estimulación de receptores de superficie. Interesantemente, este mecanismo podría dar una explicación a la mayor tasa proliferativa observada al estimular vías no genómicas exclusivamente. Por otro lado, resultados de esta tesis demostraron que tanto testosterona como testosterona-BSA son capaces de regular los niveles de IL-6, IGF-1 y FGF7 a nivel de ARNm. Se ha reportado que IL-6 puede comportarse como un factor de crecimiento, favoreciendo la proliferación celular; sin embargo, la disminución de IL-6 observada respondería posiblemente al rol homeostático de la testosterona; si tenemos en cuenta que IL-6 además del rol como factor de crecimiento, es una potente citoquina pro-inflamatoria, este efecto podría ser propio de un mecanismo anti-inflamatorio descrito anteriormente para testosterona (155). Este resultado se correlaciona con trabajos realizados en células epiteliales de próstata ventral de rata, en donde la estimulación con testosterona regula

negativamente la expresión de distintas citoquinas, entre ellas IL-6 (185). Por otro lado, tanto IGF-1 como FGF7 han sido descritos como importantes factores proliferativos para células estromales, existiendo evidencia de una regulación por testosterona (184). Nuestros resultados indicaron que la expresión de los dos factores de crecimiento aumenta mediante estímulos con ambas formas de testosterona, necesitando el desarrollo de herramientas más precisas para determinar los mecanismos que subyacen a esta regulación. Se han reportado casos en los cuales los niveles de proteína no coinciden con los niveles de ARNm, quedando aún por estudiar que ocurre con estos factores de crecimiento a nivel proteico.

La glándula prostática es un órgano con una alta susceptibilidad a la inflamación, proceso que ha sido vinculado con la prostatitis y la BPH (186). Si bien la respuesta inflamatoria es necesaria en casos de infección, una respuesta exacerbada del sistema inmunológico en los órganos reproductores puede acarrear efectos nocivos sobre las células germinales. En este sentido, se ha demostrado que los andrógenos son capaces de inducir un dimorfismo sexual sobre el sistema inmune; de esta manera la testosterona ejerce propiedades inmunomoduladoras que previenen respuestas exacerbadas por parte del componente inmunológico. Diversos estudios han demostrado que los machos de distintas especies resultan ser más vulnerables a enfermedades infecciosas mientras que las hembras lo son a enfermedades autoinmunes (187). En concordancia, en un modelo de inflamación prostática asociada a síndrome metabólico, se demostró que la testosterona es capaz de reducir la infiltración de leucocitos y disminuir la producción de moléculas proinflamatorias (188). La modulación de la respuesta inmune por testosterona ha sido ampliamente estudiada en el sistema inmune adquirido, aunque es muy poco lo que se sabe acerca de los efectos sobre el sistema inmune innato. En nuestro laboratorio demostramos que testosterona mantiene un tono supresor sobre moléculas de inmunidad innata e inflamatoria (receptor TLR4, moléculas de su vía de señalización, surfactante D y β -defensina) que también se manifestó en la respuesta a infecciones bacterianas (154,155); en efecto, en modelos de prostatitis se observó mayor reclutamiento de neutrófilos y una ineficiente resolución de la infección en comparación con animales castrados (52,155). Además, el efecto regulador de la inflamación se observó claramente en ensayos *in vitro* llevados a cabo en nuestro laboratorio, en los que se caracterizó ampliamente la respuesta de las CMLp a la inflamación por LPS, la cual mediada por la señalización de TLR4

conduce a la secreción de citoquinas, quemoquinas, factores de crecimiento y otros mediadores inmunes. Nuevamente, testosterona demostró tener efectos moduladores y anti-inflamatorio, siendo capaz no sólo de modular la activación de la vía de TLR4 sino también la translocación nuclear de NF- κ B, la secreción de citoquinas inflamatorias y la proliferación inducidas por LPS (47). Trabajos de otros laboratorios han aportado a este campo de investigación, en donde se demostró que la testosterona cumple un rol modulador de la respuesta inmune iniciada por TLR4, así como efectos reguladores de esta hormona sobre la secreción de citoquinas en macrófagos (189).

Los mecanismos celulares que participan en este efecto inmunomodulador de los andrógenos, son aún desconocidos; en este trabajo se demostró que la testosterona debe ingresar al citosol para poder modular la respuesta inflamatoria ya que ese efecto no se reprodujo al estimular con la forma impermeable de testosterona. De esta manera se descarta la posibilidad de que el proceso inmunomodulador sea mediado por un receptor androgénico presente en la superficie celular y que se deba a una interacción entre el AR de membrana y el receptor TLR4 que también se encuentra en la membrana plasmática. Si bien los resultados de esta tesis permiten comprender el rol individual que cumple cada uno de estos dos grandes mecanismos de señalización inducidos por testosterona en cuanto a la regulación de la inmunidad innata, quedan aún por esclarecer cuáles son las interacciones que ocurren entre la señalización iniciada por LPS y la iniciada por testosterona que llevan al efecto inmunomodulador de esta hormona. Resultados similares en cuanto al rol modulador de la inmunidad innata por hormonas esteroideas han sido reportados previamente, en particular para corticoides. En el caso de glucocorticoides, se ha observado que el mecanismo se basa en una interacción directa entre el GR y la subunidad p65 de NF- κ B, reduciendo la capacidad transcripcional de este factor relacionado a la síntesis de citocinas. Estudios similares han demostrado reducción de la actividad del factor AP-1, el cual se ha demostrado que aumenta luego de la estimulación de TLR4 por LPS (190). Estudios similares serían necesarios para dilucidar si este mismo mecanismo es compartido también por el AR.

Hasta el presente, el mayor aporte a la relación entre las vías no genómicas de testosterona y la respuesta inflamatoria corresponde a los trabajos de Frank Wunderlich. A diferencia de nuestros resultados, en estudios realizados con macrófagos, este grupo

describió que existe una participación de las vías no genómicas de testosterona para modular procesos pro-inflamatorios; estos trabajos describieron la presencia de sitios de unión de testosterona en la membrana plasmática de macrófagos carentes de AR. A su vez demostraron que en estas células la presencia de testosterona era capaz de regular negativamente la activación de c-fos y la concentración de óxido nítrico inducido por estimulación con LPS (102,191). Al ser células carentes de AR, estos mecanismos no genómicos fueron posiblemente mediados por receptores de testosterona alternativos situados en la superficie celular, el esclarecimiento de la identidad de estos receptores no fue abordado en estos trabajos.

La señalización no genómica de testosterona podría tener un rol fundamental en la BPH, patología que se desarrolla por un incremento de células epiteliales y estromales de la próstata. Esta patología cuya incidencia está relacionada con la edad, coincide con descenso de los valores de testosterona en suero que ocurre en hombres de edad avanzada, lo que se contrapone a la clásica hipótesis del andrógeno como desencadenante de la patología. En este sentido, varios estudios han demostrado que las vías no genómicas de señalización son capaces de responder a concentraciones menores de testosterona que las vías clásicas (192), indicando la necesidad de considerar esta vía a la hora de analizar la respuesta de la próstata a concentraciones cambiantes de andrógenos. A pesar de ello, la señalización no genómica de testosterona en miofibroblastos provenientes de BPH ha sido muy escasamente considerada. Para analizar el impacto de las vías no genómicas en BPH en esta tesis se trabajó con una línea de CEPH proveniente de un paciente con BPH; los resultados obtenidos confirmaron el efecto proliferador de las vías no genómicas de testosterona iniciadas desde receptores de superficie, que concuerda con una disminución significativa de la expresión del ARNm de $TGF\beta 1$, factor antiproliferativo y antiinflamatorio. En contraparte, al estimular con testosterona libre, si bien se produjo disminución de $TGF\beta 1$, fue menor y no se asoció a cambios en la proliferación. En estas células al igual que en las CMLp se puede concluir que a mayor expresión de $TGF\beta 1$ menor proliferación celular. Estos resultados brindan un posible mecanismo por el cual los receptores de superficie podrían estar estimulando la proliferación y a su vez demuestran que el comportamiento de las células provenientes de patologías es diferente a de células normales, siendo necesario más estudios para comprender estas diferencias. Nuestros resultados concuerdan con la

utilidad de los inhibidores de la síntesis de testosterona para el tratamiento de BPH, aunque manifiestan la necesidad de desarrollar moduladores específicos de cada vía de testosterona para un mejor tratamiento de esta patología, aprovechando los efectos homeostáticos del andrógeno.

Los mecanismos genómicos y no genómicos pueden en ciertas ocasiones actuar de manera independiente pero también pueden interactuar generando respuestas más complejas. Una vía de interacción entre estos dos mecanismos fue demostrada previamente en un modelo propuesto por el laboratorio de Stephen R. Hammes, en el cual la molécula paxillina participa de la vía no genómica que estimula la proliferación celular inducida por testosterona, al ser fosforilada por Src y por ERK y actuando a su vez en la vía genómica como cofactor del AR (141). Otras evidencias que sustentan esta hipótesis demuestran una interacción entre la activación de la vía Ras-MEK-ERK por factores de crecimiento y la actividad de genes regulados por ARE en ensayos de gen reportero en líneas celulares de cáncer de próstata (193). La activación de MAPK mediada por vías no genómicas de testosterona a través de una interacción con receptores de factores de crecimiento ha sido previamente reportada (141). Además, se ha demostrado que receptores para testosterona presentes en las caveolas de la membrana plasmática inducen la translocación nuclear del AR en un proceso dependiente de PI3K y de HSP27 (106). Evidencias indicando la capacidad de las vías no genómicas de testosterona para actuar en ausencia de interacción con las vías genómicas también han sido demostradas en distintos trabajos en los cuales se utilizaron células carentes de AR o carentes de actividad génica (102,105). Considerando que los resultados de esta tesis indican que la proliferación inducida por testosterona desde la membrana plasmática es mayor a la inducida por testosterona libre, se puede hipotetizar que existe una interacción entre ambas vías, actuando la intracelular como reguladora de la iniciada desde membrana. En relación a otros efectos de testosterona, nuestros resultados indicarían que estas vías funcionarían de manera independiente, como es el caso de la diferenciación hacia el fenotipo muscular, la modulación de la inflamación y el aumento en la expresión del AR.

Considerando los efectos celulares diferenciales inducidos por testosterona en relación a la ubicación de sus receptores, se puede especular que el redireccionamiento deliberado de receptores a distintas regiones subcelulares podría ser útil para favorecer

ciertos efectos sobre otros. En la bibliografía existen algunos antecedentes sobre leves aumentos de la población de receptores esteroideos de superficie celular en respuesta a estímulos con sus ligandos *in vitro* (175), por otra parte, se ha demostrado la capacidad de direccionar al AR transfectado a distintos sitios subcelulares mediante eliminación de ciertas regiones (79). Otro aporte interesante en esta temática fueron las distintas estrategias utilizadas por el laboratorio de Ellis Levin para impedir la palmitoilación del AR y por ende su localización en la superficie celular (121,194). Nuestros resultados en CMLp fueron capaces de reproducir los previamente descritos, demostrando la importancia de esta modificación post-traducciona en la señalización no genómica de testosterona. El desarrollo o descubrimiento de nuevas drogas capaces de inducir cambios en la relación entre receptores de superficie y receptores de membrana tendría gran impacto a nivel del direccionamiento deliberado de las respuestas celulares.

Al incrementar las evidencias a favor de la existencia de más de una vía celular en respuesta a hormonas esteroideas, surge el interrogante sobre la razón por la cual la célula presentaría más de un mecanismo para responder a la misma hormona. Aunque hasta la actualidad no existe una explicación definitiva a esta pregunta, intentaremos desarrollar brevemente algunas posibles hipótesis frente a esta temática. Una interpretación podría basarse en la localización diferencial de los receptores, en este sentido la ubicación superficial de los receptores que median las vías no genómicas les permitiría acceder de manera más rápida al ligando, permitiendo una respuesta menos dilatada en el tiempo que la mediada por las vías genómicas. En el mismo sentido, el hecho de poder responder sin necesidad de la transcripción génica sería otra ventaja para respuestas que necesitan de una reacción rápida. Por otro lado, la capacidad de un sitio de unión orientado hacia el espacio extracelular, le permite a estos receptores acceder a un grupo de moléculas que no estarían disponibles en el medio intracelular, entre ellas la testosterona conjugada a sus transportadores más conocidos, la albumina y la SHBG (195). Una hipótesis postulada por otros investigadores propone que las vías no genómicas de testosterona serían sensibles a concentraciones más bajas de testosterona que las vías genómicas, pudiendo de esta manera ser activadas diferencialmente según la cantidad de hormona en plasma (107,192). Otra explicación podría estar relacionada con el proceso evolutivo que sufrieron estos receptores; por ejemplo, el receptor BRII es un receptor transmembrana presente en plantas

del género *Arabidopsis* capaz de reconocer brasinoesteroides en el reino vegetal (196). Debido a que aparentemente el genoma de los organismos del reino vegetal no codifica para miembros de la superfamilia de receptores nucleares tales como el AR (196), se ha postulado que los receptores de membrana, como el BRI1 que reconocen esteroides aparecieron más tempranamente en la evolución. Una interpretación que se puede desprender de estos hallazgos, indicaría que la aparición de receptores nucleares está vinculada con el control de genes que aparecieron, o cuya regulación cobró importancia, en tiempos más recientes de la evolución. En este sentido, es coherente que un proceso tan conservado como la proliferación celular sea controlado por vías que se encuentran ubicuamente distribuidas en los seres vivos, como es el caso de las vías iniciadas a partir de receptores de superficie. Mientras que por lo contrario un sistema evolutivamente más reciente como es el caso del sistema inmune, se haya desarrollado a la par del sistema de control también más reciente como es el de los receptores nucleares. Todas estas hipótesis aún necesitan ser estudiadas para poder comprender la razón detrás de los distintos mecanismos de señalización de testosterona a nivel celular.

Los aportes de esta tesis doctoral demuestran la importancia de las vías de señalización no genómica de testosterona en células estromales de la próstata y su capacidad para regular respuestas celulares complejas. Si bien estudios previos demostraron este tipo de señalización en células provenientes de la próstata, la participación en CMLp normales no había sido analizada hasta el momento, al igual que los efectos sobre la proliferación en CEPH. Por otro lado, estos resultados proponen distintos grados de interacción entre las distintas vías activadas por testosterona, abarcando mecanismos regulados por una sola vía y mecanismos regulados de manera conjunta entre receptores de superficie y receptores intracelulares. Interesantemente, nuestros estudios permiten plantear la posibilidad de un rol homeostático de testosterona, el cual sería mediado por receptores intracelulares, mientras que un rol proliferativo y relacionado a una situación patogénica sería regulado por mecanismos iniciados en la superficie celular, abriendo la posibilidad de buscar mecanismos de estimulación selectiva sobre una u otra localización del AR según los efectos deseados. Nuestros resultados muestran la importancia de estudiar la diversidad de vías de señalización en respuesta a andrógenos y la necesidad de ahondar aún más en este conocimiento, tanto con objetivos científicos como médicos.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

- ❖ Las CMLp presentan AR en la superficie celular, a través los cuales estas células son capaces de responder a testosterona mediante vías no genómicas de señalización.
- ❖ La estimulación de AR de superficie induce fosforilación de quinasas como Akt y ERK, indicando activación de vías de transducción de señales que finalmente afectan procesos como la proliferación celular.
- ❖ La activación de los AR presentes en la membrana plasmática induce un incremento en la proliferación celular a niveles mayores a los producidos al activar el total de receptores de testosterona.
- ❖ Los factores de crecimiento involucrados en la proliferación IGF-1 y FGF-7 aumentan la expresión de sus mensajeros cuando se estimulan vías no genómicas de testosterona.
- ❖ El ARNm para factor de crecimiento antiproliferativo TGF β 1 aumentó su expresión solamente al activar receptores intracelulares de testosterona, en correlación con la menor proliferación activada por esa vía en CMLp.
- ❖ Las vías no genómicas de testosterona participan en la diferenciación de las CMLp, aumentando la expresión de proteínas contráctiles.
- ❖ El efecto modulador de la respuesta inflamatoria mediado por testosterona, necesita de la estimulación de receptores intracelulares de testosterona, siendo los receptores de superficie incapaces de reproducir este efecto.
- ❖ El AR total aumento su expresión en respuesta a la activación de los receptores intracelulares de testosterona.

- ❖ Las CEPH provenientes de pacientes con BPH presentan un fenotipo de miofibroblasto propio de microambientes inflamatorios.

- ❖ En respuesta al tratamiento con testosterona impermeable a la membrana plasmática, las CEPH experimentan un marcado aumento de la proliferación concordante con una disminución del ARNm para TGF β .

- ❖ En CEPH la activación de receptores intracelulares para testosterona indujo una disminución en el ARNm para TGF β sin alterar la tasa de proliferación.

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de esta tesis doctoral demuestran respuestas diferenciales de testosterona en células estromales de la próstata, dependiendo de la localización subcelular del receptor que interviene en dicha respuesta. Este hallazgo tiene la importancia de evidenciar que las vías genómicas promueven diversos efectos que pueden ser considerados homeostáticos, reguladores o antiinflamatorios, no solo en células musculares lisas modificadas por la inflamación, sino también en miofibroblastos provenientes de hiperplasias prostáticas en los cuales disminuye el factor que las diferencia.

Mientras que algunas respuestas parecieran ser mediadas exclusivamente por una vía de señalización genómica como es el caso del efecto antiinflamatorio, otras parecieran suceder a través de vías no genómica como es el incremento en la proliferación, y otras supondrían ser el resultado de una compleja interacción entre vías. Estos resultados incentivan al estudio y desarrollo de moduladores específicos para los distintos mecanismos de señalización inducidas por testosterona con la finalidad de favorecer ciertas respuestas celulares sobre otras.

Bibliografía

1. Aaron L, Franco OE, Hayward SW. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *The Urologic clinics of North America* 2016; 43:279-288
2. Strand DW, Costa DN, Francis F, Ricke WA, Roehrborn CG. Targeting phenotypic heterogeneity in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation; research in biological diversity* 2017; 96:49-61
3. Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *The Journal of urology* 1984; 132:474-479
4. Leissner KH, Tisell LE. The weight of the human prostate. *Scandinavian journal of urology and nephrology* 1979; 13:137-142
5. Cornu JN, Phe V, Fournier G, Delmas V, Sebe P. Fascia surrounding the prostate: clinical and anatomical basis of the nerve-sparing radical prostatectomy. *Surgical and radiologic anatomy : SRA* 2010; 32:663-667
6. Walz J, Burnett AL, Costello AJ, Eastham JA, Graefen M, Guillonneau B, Menon M, Montorsi F, Myers RP, Rocco B, Villers A. A critical analysis of the current knowledge of surgical anatomy related to optimization of cancer control and preservation of continence and erection in candidates for radical prostatectomy. *European urology* 2010; 57:179-192
7. Steiner MS. The puboprostatic ligament and the male urethral suspensory mechanism: an anatomic study. *Urology* 1994; 44:530-534
8. Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS. Comparative anatomy and histology a mouse, rat, and human atlas. *academic Press - Elsevier* 2018;
9. Farnsworth WE. Prostate stroma: physiology. *Prostate* 1999; 38:60-72
10. Risbridger GP, Taylor RA. Physiology of the Male Accessory Sex Structures: The Prostate Gland, Seminal Vesicles, and Bulbourethral Glands. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 2006:1149-1166.
11. Selman SH. The McNeal prostate: a review. *Urology* 2011; 78:1224-1228
12. Chughtai B, Forde JC, Thomas DD, Laor L, Hossack T, Woo HH, Te AE, Kaplan SA. Benign prostatic hyperplasia. *Nature reviews Disease primers* 2016; 2:16031
13. MacLennan GT, Cheng L. *Atlas of Genitourinary Pathology*. Springer London Dordrecht Heidelberg New York. 2011
14. Duncan MW, Thompson HS. Proteomics of semen and its constituents. *Proteomics Clinical applications* 2007; 1:861-875
15. Lilja H, Abrahamsson PA. Three predominant proteins secreted by the human prostate gland. *Prostate* 1988; 12:29-38

16. Veveris-Lowe TL, Kruger SJ, Walsh T, Gardiner RA, Clements JA. Seminal fluid characterization for male fertility and prostate cancer: kallikrein-related serine proteases and whole proteome approaches. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2007; 33:87-99
17. Verze P, Cai T, Lorenzetti S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature reviews Urology* 2016; 13:379-386
18. Mardh PA, Colleen S. Antimicrobial activity of human seminal fluid. *Scandinavian journal of urology and nephrology* 1975; 9:17-23
19. Wichmann L, Vaalasti A, Vaalasti T, Tuohimaa P. Localization of lactoferrin in the male reproductive tract. *International journal of andrology* 1989; 12:179-186
20. Oberley RE, Goss KL, Quintar AA, Maldonado CA, Snyder JM. Regulation of surfactant protein D in the rodent prostate. *Reproductive biology and endocrinology* 2007; 5:42
21. Ekman P. The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. *The Prostate Supplement* 2000; 10:14-18
22. Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta anatomica* 1996; 155:94-103
23. Huggins C, Masina MH, Eichelberger L, Wharton JD. Quantitative Studies of Prostatic Secretion : I. Characteristics of the Normal Secretion; the Influence of Thyroid, Suprarenal, and Testis Extirpation and Androgen Substitution on the Prostatic Output. *The Journal of experimental medicine* 1939; 70:543-556
24. de Voogt HJ, Rao BR, Geldof AA, Gooren LJ, Bouman FG. Androgen action blockade does not result in reduction in size but changes histology of the normal human prostate. *Prostate* 1987; 11:305-311
25. Behre HM, Bohmeyer J, Nieschlag E. Prostate volume in testosterone-treated and untreated hypogonadal men in comparison to age-matched normal controls. *Clinical endocrinology* 1994; 40:341-349
26. Azzouni F, Mohler J. Role of 5 alpha-reductase inhibitors in benign prostatic diseases. *Prostate cancer and prostatic diseases* 2012; 15:222-230
27. Nicholson TM, Ricke WA. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. *Differentiation; research in biological diversity* 2011; 82:184-199
28. White JW. I. The Results of Double Castration in Hypertrophy of the Prostate. *Annals of surgery* 1895; 22:1-80
29. Huggins C, Hodges CV. Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer research* 1941; 1:293-297
30. Kim EH, Larson JA, Andriole GL. Management of Benign Prostatic Hyperplasia. *Annual review of medicine* 2016; 67:137-151

31. Majumder K, Brandberg Y, Johansson H, Castellanos E, Ullen A, Lennernas B, Nilsson S. Effect on prostate volume following neoadjuvant treatment with an androgen receptor inhibitor monotherapy versus castration plus an androgen receptor inhibitor in prostate cancer patients intended for curative radiation therapy: A randomised study. *Molecular and clinical oncology* 2018; 8:141-146
32. Cunha GR. Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. *Differentiation; research in biological diversity* 2008; 76:578-586
33. Hayward SW, Haughney PC, Rosen MA, Greulich KM, Weier HU, Dahiya R, Cunha GR. Interactions between adult human prostatic epithelium and rat urogenital sinus mesenchyme in a tissue recombination model. *Differentiation; research in biological diversity* 1998; 63:131-140
34. Wen S, Chang HC, Tian J, Shang Z, Niu Y, Chang C. Stromal androgen receptor roles in the development of normal prostate, benign prostate hyperplasia, and prostate cancer. *The American journal of pathology* 2015; 185:293-301
35. Yu S, Yeh CR, Niu Y, Chang HC, Tsai YC, Moses HL, Shyr CR, Chang C, Yeh S. Altered prostate epithelial development in mice lacking the androgen receptor in stromal fibroblasts. *Prostate* 2012; 72:437-449
36. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *The Journal of urology* 2001; 166:2472-2483
37. Schauer IG, Rowley DR. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation; research in biological diversity* 2011; 82:200-210
38. Barron DA, Rowley DR. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocrine-related cancer* 2012; 19:R187-204
39. Krieger JN, Nyberg L, Jr., Nickel JC. NIH consensus definition and classification of prostatitis. *Jama* 1999; 282:236-237
40. Nickel JC, Nyberg LM, Hennenfent M. Research guidelines for chronic prostatitis: consensus report from the first National Institutes of Health International Prostatitis Collaborative Network. *Urology* 1999; 54:229-233
41. Vykhovanets EV, Resnick MI, MacLennan GT, Gupta S. Experimental rodent models of prostatitis: limitations and potential. *Prostate cancer and prostatic diseases* 2007; 10:15-29
42. Sharp VJ, Takacs EB, Powell CR. Prostatitis: diagnosis and treatment. *American family physician* 2010; 82:397-406
43. Schiller DS, Parikh A. Identification, pharmacologic considerations, and management of prostatitis. *The American journal of geriatric pharmacotherapy* 2011; 9:37-48
44. McConnell JD, Roehrborn CG, Bautista OM, Andriole GL, Jr., Dixon CM, Kusek JW, Lepor H, McVary KT, Nyberg LM, Jr., Clarke HS, Crawford ED, Diokno A, Foley JP, Foster HE, Jacobs SC, Kaplan SA, Kreder KJ, Lieber MM, Lucia MS, Miller GJ, Menon M, Milam DF, Ramsdell JW, Schenkman NS, Slawin KM, Smith JA, Medical Therapy of Prostatic Symptoms Research G. The long-term effect of

- doxazosin, finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia. *The New England journal of medicine* 2003; 349:2387-2398
45. Masumori N, Hashimoto J, Itoh N, Tsukamoto T, The Sapporo Medical University Naftopidil Study G. Short-term efficacy and long-term compliance/treatment failure of the alpha1 blocker naftopidil for patients with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia. *Scandinavian journal of urology and nephrology* 2007; 41:422-429
 46. Vignozzi L, Cellai I, Santi R, Lombardelli L, Morelli A, Comeglio P, Filippi S, Logiodice F, Carini M, Nesi G, Gacci M, Piccinni MP, Adorini L, Maggi M. Antiinflammatory effect of androgen receptor activation in human benign prostatic hyperplasia cells. *The Journal of endocrinology* 2012; 214:31-43
 47. Leimgruber C, Quintar AA, García LN, Petiti JP, De Paul AL, Maldonado CA. Testosterone abrogates TLR4 activation in prostate smooth muscle cells contributing to the preservation of a differentiated phenotype. *J Cell Physiol* 2013 228:1551-1560
 48. Isen K, Sinik Z, Alkibay T, Sezer C, Sozen S, Atilla S, Ataoglu O, Isik S. Magnetic resonance imaging and morphometric histologic analysis of prostate tissue composition in predicting the clinical outcome of terazosin therapy in benign prostatic hyperplasia. *International journal of urology. official journal of the Japanese Urological Association* 2001; 8:42-48
 49. Azimi H, Khakshur AA, Aghdasi I, Fallah-Tafti M, Abdollahi M. A review of animal and human studies for management of benign prostatic hyperplasia with natural products: perspective of new pharmacological agents. *Inflammation & allergy drug targets* 2012; 11:207-221
 50. Mahapokai W, Van Sluijs FJ, Schalken JA. Models for studying benign prostatic hyperplasia. *Prostate cancer and prostatic diseases* 2000; 3:28-33
 51. Quintar AA, Doll A, Leimgruber C, Palmeri CM, Roth FD, Maccioni M, Maldonado CA. Acute inflammation promotes early cellular stimulation of the epithelial and stromal compartments of the rat prostate. *Prostate* 2010; 70:1153-1165
 52. Scalerandi MV, Peinetti N, Leimgruber C, Cuello Rubio MM, Nicola JP, Menezes GB, Maldonado CA, Quintar AA. Inefficient N2-Like Neutrophils Are Promoted by Androgens During Infection. *Front Immunol* 2018; 9:1980
 53. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. *Testosterone: action, deficiency, substitution.* Cambridge University Press. 2012.
 54. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews* 2011; 32:81-151
 55. Freeman ER, Bloom DA, McGuire EJ. A brief history of testosterone. *The Journal of urology* 2001; 165:371-373

56. Pejcic T, Tosti T, Tesic Z, Milkovic B, Dragicevic D, Kozomara M, Cekerevac M, Dzamic Z. Testosterone and dihydrotestosterone levels in the transition zone correlate with prostate volume. *Prostate* 2017; 77:1082-1092
57. Kaprara A, Huhtaniemi IT. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism: clinical and experimental* 2018; 86:3-17
58. Handa RJ, Weiser MJ. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Frontiers in neuroendocrinology* 2014; 35:197-220
59. Clarkson J, Herbison AE. Hypothalamic control of the male neonatal testosterone surge. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 2016; 371:20150115
60. Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2010; 42:813-827
61. Decaroli MC, Rochira V. Aging and sex hormones in males. *Virulence* 2017; 8:545-570
62. Goldman AL, Bhasin S, Wu FCW, Krishna M, Matsumoto AM, Jasuja R. A Reappraisal of Testosterone's Binding in Circulation: Physiological and Clinical Implications. *Endocrine reviews* 2017; 38:302-324
63. Horton R, Shinsako J, Forsham PH. Testosterone Production and Metabolic Clearance Rates with Volumes of Distribution in Normal Adult Men and Women. *Acta endocrinologica* 1965; 48:446-458
64. Rivarola MA, Saez JM, Meyer WJ, Jenkins ME, Migeon CJ. Metabolic clearance rate and blood production rate of testosterone and androst-4-ene-3,17-dione under basal conditions, ACTH and HCG stimulation. Comparison with urinary production rate of testosterone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1966; 26:1208-1218
65. Wang C, Catlin DH, Starcevic B, Leung A, DiStefano E, Lucas G, Hull L, Swerdloff RS. Testosterone metabolic clearance and production rates determined by stable isotope dilution/tandem mass spectrometry in normal men: influence of ethnicity and age. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2004; 89:2936-2941
66. Miller WL. Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Molecular and cellular endocrinology* 2002; 198:7-14
67. Ferraldeschi R, Welti J, Luo J, Attard G, de Bono JS. Targeting the androgen receptor pathway in castration-resistant prostate cancer: progresses and prospects. *Oncogene* 2015; 34:1745-1757
68. Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ. Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Molecular and cellular endocrinology* 1992; 88:15-22

69. Randall VA. Role of 5 alpha-reductase in health and disease. *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism* 1994; 8:405-431
70. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach*. updated second edition. Elsevier 2012;
71. Lin BJ, Chen KK, Chen MT, Chang LS. The time for serum testosterone to reach castrate level after bilateral orchiectomy or oral estrogen in the management of metastatic prostatic cancer. *Urology* 1994; 43:834-837
72. Matsumoto T, Sakari M, Okada M, Yokoyama A, Takahashi S, Kouzmenko A, Kato S. The androgen receptor in health and disease. *Annual review of physiology* 2013; 75:201-224
73. Weikum ER, Liu X, Ortlund EA. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein science: a publication of the Protein Society* 2018;
74. Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 1988; 240:327-330
75. Chang CS, Kokontis J, Liao ST. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* 1988; 240:324-326
76. Dehm SM, Tindall DJ. Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocrine-related cancer* 2011; 18:R183-196
77. Li J, Al-Azzawi F. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas* 2009; 63:142-148
78. Lee DK, Chang C. Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2003; 88:4043-4054
79. Kaku N, Matsuda K, Tsujimura A, Kawata M. Characterization of nuclear import of the domain-specific androgen receptor in association with the importin alpha/beta and Ran-guanosine 5'-triphosphate systems. *Endocrinology* 2008; 149:3960-3969
80. Haile S, Sadar MD. Androgen receptor and its splice variants in prostate cancer. *Cellular and molecular life sciences* 2011; 68:3971-3981
81. Lonergan PE, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of carcinogenesis* 2011; 10:20
82. Gao W. Androgen receptor as a therapeutic target. *Advanced drug delivery reviews* 2010; 62:1277-1284
83. Echeverria PC, Picard D. Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochimica et biophysica acta* 2010; 1803:641-649
84. Brooke GN, Parker MG, Bevan CL. Mechanisms of androgen receptor activation in advanced prostate cancer: differential co-activator recruitment and gene expression. *Oncogene* 2008; 27:2941-2950

85. Centenera MM, Harris JM, Tilley WD, Butler LM. The contribution of different androgen receptor domains to receptor dimerization and signaling. *Molecular endocrinology* 2008; 22:2373-2382
86. Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *The EMBO journal* 2000; 19:5406-5417
87. Metzger E, Imhof A, Patel D, Kahl P, Hoffmeyer K, Friedrichs N, Muller JM, Greschik H, Kirfel J, Ji S, Kunowska N, Beisenherz-Huss C, Gunther T, Buettner R, Schule R. Phosphorylation of histone H3T6 by PKC β (I) controls demethylation at histone H3K4. *Nature* 2010; 464:792-796
88. Koryakina Y, Ta HQ, Gioeli D. Androgen receptor phosphorylation: biological context and functional consequences. *Endocrine-related cancer* 2014; 21:T131-145
89. Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner R, Schule R. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 2005; 437:436-439
90. Montie HL, Pestell RG, Merry DE. SIRT1 modulates aggregation and toxicity through deacetylation of the androgen receptor in cell models of SBMA. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2011; 31:17425-17436
91. Wilson CM, McPhaul MJ. A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91:1234-1238
92. Lu J, Van der Steen T, Tindall DJ. Are androgen receptor variants a substitute for the full-length receptor? *Nature reviews Urology* 2015; 12:137-144
93. Schreihof DA, Duong P, Cunningham RL. N-terminal truncations in sex steroid receptors and rapid steroid actions. *Steroids* 2018; 133:15-20
94. Yang X, Guo Z, Sun F, Li W, Alfano A, Shimelis H, Chen M, Brodie AM, Chen H, Xiao Z, Veenstra TD, Qiu Y. Novel membrane-associated androgen receptor splice variant potentiates proliferative and survival responses in prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286:36152-36160
95. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Human mutation* 2012; 33:887-894
96. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine reviews* 2004; 25:276-308
97. Michels G, Hoppe UC. Rapid actions of androgens. *Frontiers in neuroendocrinology* 2008; 29:182-198
98. Foradori CD, Weiser MJ, Handa RJ. Non-genomic actions of androgens. *Frontiers in neuroendocrinology* 2008; 29:169-181

99. Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Molecular endocrinology* 2002; 16:2181-2187
100. Rahman F, Christian HC. Non-classical actions of testosterone: an update. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2007; 18:371-378
101. Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, Wehling M. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiological reviews* 2003; 83:965-1016
102. Guo Z, Benten WP, Krucken J, Wunderlich F. Nongenomic testosterone calcium signaling. Genotropic actions in androgen receptor-free macrophages. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277:29600-29607
103. Stournaras C, Gravanis A, Margioris AN, Lang F. The actin cytoskeleton in rapid steroid hormone actions. *Cytoskeleton* 2014; 71:285-293
104. Yu J, Akishita M, Eto M, Koizumi H, Hashimoto R, Ogawa S, Tanaka K, Ouchi Y, Okabe T. Src kinase-mediates androgen receptor-dependent non-genomic activation of signaling cascade leading to endothelial nitric oxide synthase. *Biochemical and biophysical research communications* 2012; 424:538-543
105. Lutz LB, Cole LM, Gupta MK, Kwist KW, Auchus RJ, Hammes SR. Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98:13728-13733
106. Li J, Fu X, Cao S, Li J, Xing S, Li D, Dong Y, Cardin D, Park HW, Mauvais-Jarvis F, Zhang H. Membrane-associated androgen receptor (AR) potentiates its transcriptional activities by activating heat shock protein 27 (HSP27). *The Journal of biological chemistry* 2018; 293:12719-12729
107. Leung JK, Sadar MD. Non-Genomic Actions of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Frontiers in endocrinology* 2017; 8:2
108. Szego CM, Davis JS. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1967; 58:1711-1718
109. Means AR, Hamilton TH. Early estrogen action: concomitant stimulations within two minutes of nuclear RNA synthesis and uptake of RNA precursor by the uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1966; 56:1594-1598
110. Pietras RJ, Szego CM. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 1977; 265:69-72
111. Suyemitsu T, Terayama H. Specific binding sites for natural glucocorticoids in plasma membranes of rat liver. *Endocrinology* 1975; 96:1499-1508

112. Liang T, Liao S. A very rapid effect of androgen on initiation of protein synthesis in prostate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1975; 72:706-709
113. Benten WP, Stephan C, Wunderlich F. B cells express intracellular but not surface receptors for testosterone and estradiol. *Steroids* 2002; 67:647-654
114. Benten WP, Lieberherr M, Giese G, Wrehlke C, Stamm O, Sekeris CE, Mossmann H, Wunderlich F. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1999; 13:123-133
115. Stathopoulos EN, Dambaki C, Kampa M, Theodoropoulos PA, Anezinis P, Delakas D, Delides GS, Castanas E. Membrane androgen binding sites are preferentially expressed in human prostate carcinoma cells. *BMC clinical pathology* 2003; 3:1
116. Kampa M, Papakonstanti EA, Hatzoglou A, Stathopoulos EN, Stournaras C, Castanas E. The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors that increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2002; 16:1429-1431
117. Falkenstein E, Norman AW, Wehling M. Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2000; 85:2072-2075
118. Steinsapir J, Socci R, Reinach P. Effects of androgen on intracellular calcium of LNCaP cells. *Biochemical and biophysical research communications* 1991; 179:90-96
119. Bottino MC, Cerliani JP, Rojas P, Giulianelli S, Soldati R, Mondillo C, Gorostiaga MA, Pignataro OP, Calvo JC, Gutkind JS, Panomwat A, Molinolo AA, Luthy IA, Lanari C. Classical membrane progesterone receptors in murine mammary carcinomas: agonistic effects of progestins and RU-486 mediating rapid non-genomic effects. *Breast cancer research and treatment* 2011; 126:621-636
120. Deng Q, Zhang Z, Wu Y, Yu WY, Zhang J, Jiang ZM, Zhang Y, Liang H, Gui YT. Non-Genomic Action of Androgens is Mediated by Rapid Phosphorylation and Regulation of Androgen Receptor Trafficking. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2017; 43:223-236
121. Pedram A, Razandi M, Sainson RC, Kim JK, Hughes CC, Levin ER. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282:22278-22288
122. Lin DY, Fang HI, Ma AH, Huang YS, Pu YS, Jenster G, Kung HJ, Shih HM. Negative modulation of androgen receptor transcriptional activity by Daxx. *Molecular and cellular biology* 2004; 24:10529-10541
123. Gonzalez-Montelongo MC, Marin R, Gomez T, Diaz M. Androgens differentially potentiate mouse intestinal smooth muscle by nongenomic activation of polyamine synthesis and Rho kinase activation. *Endocrinology* 2006; 147:5715-5729

124. Cinar B, Mukhopadhyay NK, Meng G, Freeman MR. Phosphoinositide 3-kinase-independent non-genomic signals transit from the androgen receptor to Akt1 in membrane raft microdomains. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282:29584-29593
125. Acconcia F, Bocedi A, Ascenzi P, Marino M. Does palmitoylation target estrogen receptors to plasma membrane caveolae? *IUBMB life* 2003; 55:33-35
126. Levin ER, Hammes SR. Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nature reviews Molecular cell biology* 2016; 17:783-797
127. Morrill GA, Kostellow AB, Gupta RK. Transmembrane helices in "classical" nuclear reproductive steroid receptors: a perspective. *Nuclear receptor signaling* 2015; 13:e003
128. Hammes SR, Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocrine reviews* 2007; 28:726-741
129. Liu J, Youn H, Yang J, Du N, Liu J, Liu H, Li B. G-protein alpha-s and -12 subunits are involved in androgen-stimulated PI3K activation and androgen receptor transactivation in prostate cancer cells. *Prostate* 2011; 71:1276-1286
130. Fu R, Liu J, Fan J, Li R, Li D, Yin J, Cui S. Novel evidence that testosterone promotes cell proliferation and differentiation via G protein-coupled receptors in the rat L6 skeletal muscle myoblast cell line. *Journal of cellular physiology* 2012; 227:98-107
131. Pi M, Parrill AL, Quarles LD. GPRC6A mediates the non-genomic effects of steroids. *The Journal of biological chemistry* 2010; 285:39953-39964
132. Berg AH, Rice CD, Rahman MS, Dong J, Thomas P. Identification and characterization of membrane androgen receptors in the ZIP9 zinc transporter subfamily: I. Discovery in female atlantic croaker and evidence ZIP9 mediates testosterone-induced apoptosis of ovarian follicle cells. *Endocrinology* 2014; 155:4237-4249
133. Thomas P, Pang Y, Dong J, Berg AH. Identification and characterization of membrane androgen receptors in the ZIP9 zinc transporter subfamily: II. Role of human ZIP9 in testosterone-induced prostate and breast cancer cell apoptosis. *Endocrinology* 2014; 155:4250-4265
134. Asuthkar S, Demirkhanyan L, Sun X, Elustondo PA, Krishnan V, Baskaran P, Velpula KK, Thyagarajan B, Pavlov EV, Zakharian E. The TRPM8 protein is a testosterone receptor: II. Functional evidence for an ionotropic effect of testosterone on TRPM8. *The Journal of biological chemistry* 2015; 290:2670-2688
135. Rosner W, Hryb DJ, Kahn SM, Nakhla AM, Romas NA. Interactions of sex hormone-binding globulin with target cells. *Molecular and cellular endocrinology* 2010; 316:79-85

136. Estrada M, Espinosa A, Muller M, Jaimovich E. Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 2003; 144:3586-3597
137. Cheng J, Watkins SC, Walker WH. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase via Src kinase and the epidermal growth factor receptor in sertoli cells. *Endocrinology* 2007; 148:2066-2074
138. Zarif JC, Lamb LE, Schulz VV, Nollet EA, Miranti CK. Androgen receptor non-nuclear regulation of prostate cancer cell invasion mediated by Src and matriptase. *Oncotarget* 2015; 6:6862-6876
139. Papadopoulou N, Charalampopoulos I, Anagnostopoulou V, Konstantinidis G, Foller M, Gravanis A, Alevizopoulos K, Lang F, Stournaras C. Membrane androgen receptor activation triggers down-regulation of PI-3K/Akt/NF-kappaB activity and induces apoptotic responses via Bad, FasL and caspase-3 in DU145 prostate cancer cells. *Molecular cancer* 2008; 7:88
140. Converse A, Zhang C, Thomas P. Membrane Androgen Receptor ZIP9 Induces Croaker Ovarian Cell Apoptosis via Stimulatory G Protein Alpha Subunit and MAP Kinase Signaling. *Endocrinology* 2017; 158:3015-3029
141. Sen A, O'Malley K, Wang Z, Raj GV, Defranco DB, Hammes SR. Paxillin regulates androgen- and epidermal growth factor-induced MAPK signaling and cell proliferation in prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 2010; 285:28787-28795
142. Sun M, Yang L, Feldman RI, Sun XM, Bhalla KN, Jove R, Nicosia SV, Cheng JQ. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by androgen through interaction of p85alpha, androgen receptor, and Src. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278:42992-43000
143. Papadopoulou N, Charalampopoulos I, Alevizopoulos K, Gravanis A, Stournaras C. Rho/ROCK/actin signaling regulates membrane androgen receptor induced apoptosis in prostate cancer cells. *Experimental cell research* 2008; 314:3162-3174
144. Peterziel H, Mink S, Schonert A, Becker M, Klocker H, Cato AC. Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* 1999; 18:6322-6329
145. Buldan A, Malviya VN, Upmanyu N, Konrad L, Scheiner-Bobis G. Testosterone/bicalutamide antagonism at the predicted extracellular androgen binding site of ZIP9. *Biochimica et biophysica acta* 2017; 1864:2402-2414
146. Oliver VL, Poulos K, Ventura S, Haynes JM. A novel androgen signalling pathway uses dihydrotestosterone, but not testosterone, to activate the EGF receptor signalling cascade in prostate stromal cells. *British journal of pharmacology* 2013; 170:592-601
147. Hammes SR, Levin ER. Minireview: Recent advances in extranuclear steroid receptor actions. *Endocrinology* 2011; 152:4489-4495
148. Pi M, Quarles LD. GPRC6A regulates prostate cancer progression. *Prostate* 2012; 72:399-409

149. Hatzoglou A, Kampa M, Kogia C, Charalampopoulos I, Theodoropoulos PA, Anezinis P, Dambaki C, Papakonstanti EA, Stathopoulos EN, Stournaras C, Gravanis A, Castanas E. Membrane androgen receptor activation induces apoptotic regression of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2005; 90:893-903
150. Migliaccio A, Castoria G, Auricchio F. Analysis of androgen receptor rapid actions in cellular signaling pathways: receptor/Src association. *Methods in molecular biology* 2011; 776:361-370
151. Buldan A, Bartsch JW, Konrad L, Scheiner-Bobis G. ZIP9 but not the androgen receptor mediates testosterone-induced migratory activity of metastatic prostate cancer cells. *Biochimica et biophysica acta Molecular cell research* 2018; 1865:1857-1868
152. Notini AJ, Davey RA, McManus JF, Bate KL, Zajac JD. Genomic actions of the androgen receptor are required for normal male sexual differentiation in a mouse model. *Journal of molecular endocrinology* 2005; 35:547-555
153. Pi M, Kapoor K, Wu Y, Ye R, Senogles SE, Nishimoto SK, Hwang DJ, Miller DD, Narayanan R, Smith JC, Baudry J, Quarles LD. Structural and Functional Evidence for Testosterone Activation of GPRC6A in Peripheral Tissues. *Molecular endocrinology* 2015; 29:1759-1773
154. Quintar AA, Roth FD, De Paul AL, Aoki A, Maldonado CA. Toll-like receptor 4 in rat prostate: modulation by testosterone and acute bacterial infection in epithelial and stromal cells. *Biol Reprod* 2006 75:664-672
155. Quintar AA, Leimgruber C, Pessah OA, Doll A, Maldonado CA. Androgen depletion augments antibacterial prostate host defences in rats. *Int J Androl* 2012 35:845-859
156. Seo SI, Lee SJ, Kim JC, Choi YJ, Sw SW, Hwang TK, Cho YH. Effects of androgen deprivation on chronic bacterial prostatitis in a rat model. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 2003; 10:485-491
157. Leimgruber C, Quintar AA, Peinetti N, Scalerandi MV, Nicola JP, Miano JM, Maldonado CA. Testosterone Rescues the De-Differentiation of Smooth Muscle Cells Through Serum Response Factor/Myocardin. *Journal of cellular physiology* 2017; 232:2806-2817
158. Welsh M, Moffat L, McNeilly A, Brownstein D, Saunders PT, Sharpe RM, Smith LB. Smooth muscle cell-specific knockout of androgen receptor: a new model for prostatic disease. *Endocrinology* 2011; 152:3541-3551
159. Miano JM. Myocardin in biology and disease. *Journal of biomedical research* 2015; 29:3-19
160. Leimgruber C, Quintar AA, Sosa LD, García LN, Figueredo M, Maldonado CA. Dedifferentiation of prostate smooth muscle cells in response to bacterial LPS. *Prostate* 2011; 71:1097-1107

161. Planz B, Wang Q, Kirley SD, Lin CW, McDougal WS. Androgen responsiveness of stromal cells of the human prostate: regulation of cell proliferation and keratinocyte growth factor by androgen. *The Journal of urology* 1998; 160:1850-1855
162. Le H, Arnold JT, McFann KK, Blackman MR. DHT and testosterone, but not DHEA or E2, differentially modulate IGF-I, IGFBP-2, and IGFBP-3 in human prostatic stromal cells. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2006; 290:E952-960
163. Haynes JM, Frydenberg M, Majewski H. Testosterone- and phorbol ester-stimulated proliferation in human cultured prostatic stromal cells. *Cellular signalling* 2001; 13:703-709
164. Niu Y, Xu Y, Zhang J, Bai J, Yang H, Ma T. Proliferation and differentiation of prostatic stromal cells. *BJU international* 2001; 87:386-393
165. Izumi K, Mizokami A, Lin WJ, Lai KP, Chang C. Androgen receptor roles in the development of benign prostate hyperplasia. *The American journal of pathology* 2013; 182:1942-1949
166. Sasagawa I, Nakada T, Kazama T, Satomi S, Terada T, Katayama T. Volume change of the prostate and seminal vesicles in male hypogonadism after androgen replacement therapy. *International urology and nephrology* 1990; 22:279-284
167. Peters CA, Walsh PC. The effect of nafarelin acetate, a luteinizing-hormone-releasing hormone agonist, on benign prostatic hyperplasia. *The New England journal of medicine* 1987; 317:599-604
168. Liu CC, Huang SP, Li WM, Wang CJ, Chou YH, Li CC, Huang CH, Wu WJ. Relationship between serum testosterone and measures of benign prostatic hyperplasia in aging men. *Urology* 2007; 70:677-680
169. Raynaud JP, Gardette J, Rollet J, Legros JJ. Prostate-specific antigen (PSA) concentrations in hypogonadal men during 6 years of transdermal testosterone treatment. *BJU international* 2013; 111:880-890
170. Morales A. Androgen replacement therapy and prostate safety. *European urology* 2002; 41:113-120
171. Niu Y, Altuwaijri S, Yeh S, Lai KP, Yu S, Chuang KH, Huang SP, Lardy H, Chang C. Targeting the stromal androgen receptor in primary prostate tumors at earlier stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105:12188-12193
172. Grad JM, Dai JL, Wu S, Burnstein KL. Multiple androgen response elements and a Myc consensus site in the androgen receptor (AR) coding region are involved in androgen-mediated up-regulation of AR messenger RNA. *Molecular endocrinology* 1999; 13:1896-1911
173. Wilkenfeld SR, Lin C, Frigo DE. Communication between genomic and non-genomic signaling events coordinate steroid hormone actions. *Steroids* 2018; 133:2-7

174. Kim SB, Kanno A, Ozawa T, Tao H, Umezawa Y. Nongenomic activity of ligands in the association of androgen receptor with SRC. *ACS chemical biology* 2007; 2:484-492
175. Gutierrez S, Sosa L, Petiti JP, Mukdsi JH, Mascanfroni ID, Pellizas CG, De Paul AL, Cambiasso MJ, Torres AI. 17beta-Estradiol stimulates the translocation of endogenous estrogen receptor alpha at the plasma membrane of normal anterior pituitary cells. *Molecular and cellular endocrinology* 2012; 355:169-179
176. Gorosito SV, Lorenzo AG, Cambiasso MJ. Estrogen receptor alpha is expressed on the cell-surface of embryonic hypothalamic neurons. *Neuroscience* 2008; 154:1173-1177
177. Lang F, Alevizopoulos K, Stournaras C. Targeting membrane androgen receptors in tumors. *Expert opinion on therapeutic targets* 2013; 17:951-963
178. Lee DK. Androgen receptor enhances myogenin expression and accelerates differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* 2002; 294:408-413
179. Gorgey AS, Moore PD, Wade RC, Gill RS, Lavis T, Adler RA. Disruption in bone marrow fat may attenuate testosterone action on muscle size after spinal cord injury: a case report. *European journal of physical and rehabilitation medicine* 2017; 53:625-629
180. Denger S, Jahn L, Wende P, Watson L, Gerber SH, Kubler W, Kreuzer J. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 cDNA in vascular smooth muscle cells: induction of the synthetic phenotype: a possible clue to SMC differentiation in the process of atherogenesis. *Atherosclerosis* 1999; 144:15-23
181. Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. Modulation of smooth muscle cell proliferation and migration: role of smooth muscle cell heterogeneity. *Handbook of experimental pharmacology* 2005:645-663
182. Borger P, Tamm M, Black JL, Roth M. Asthma: is it due to an abnormal airway smooth muscle cell? *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006; 174:367-372
183. Wong YC, Tam NN. Dedifferentiation of stromal smooth muscle as a factor in prostate carcinogenesis. *Differentiation; research in biological diversity* 2002; 70:633-645
184. Berry PA, Maitland NJ, Collins AT. Androgen receptor signalling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Molecular and cellular endocrinology* 2008; 288:30-37
185. Asirvatham AJ, Schmidt M, Gao B, Chaudhary J. Androgens regulate the immune/inflammatory response and cell survival pathways in rat ventral prostate epithelial cells. *Endocrinology* 2006; 147:257-271
186. Kruslin B, Tomas D, Dzombeta T, Milkovic-Perisa M, Ulamec M. Inflammation in Prostatic Hyperplasia and Carcinoma-Basic Scientific Approach. *Frontiers in oncology* 2017; 7:77

187. Sakiani S, Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and humoral immunity. *Nature reviews Endocrinology* 2013; 9:56-62
188. Vignozzi L, Morelli A, Sarchielli E, Comeglio P, Filippi S, Cellai I, Maneschi E, Serni S, Gacci M, Carini M, Piccinni MP, Saad F, Adorini L, Vannelli GB, Maggi M. Testosterone protects from metabolic syndrome-associated prostate inflammation: an experimental study in rabbit. *The Journal of endocrinology* 2012; 212:71-84
189. Rettew JA, Huet-Hudson YM, Marriott I. Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biol Reprod* 2008; 78:432-437
190. Smoak KA, Cidlowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mechanisms of ageing and development* 2004; 125:697-706
191. Benten WP, Guo Z, Krucken J, Wunderlich F. Rapid effects of androgens in macrophages. *Steroids* 2004; 69:585-590
192. Castoria G, Auricchio F, Migliaccio A. Extranuclear partners of androgen receptor: at the crossroads of proliferation, migration, and neuritogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2017; 31:1289-1300
193. Carey AM, Pramanik R, Nicholson LJ, Dew TK, Martin FL, Muir GH, Morris JD. Ras-MEK-ERK signaling cascade regulates androgen receptor element-inducible gene transcription and DNA synthesis in prostate cancer cells. *International journal of cancer* 2007; 121:520-527
194. Pedram A, Razandi M, Lewis M, Hammes S, Levin ER. Membrane-localized estrogen receptor alpha is required for normal organ development and function. *Developmental cell* 2014; 29:482-490
195. Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA. Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 1999; 69:481-485
196. Wang ZY, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 2001; 410:380-383