



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neuroendocrinología



Tesis

Efecto del haloperidol sobre la capacidad migratoria de las células
U-87 derivadas de glioblastoma humano

Para obtener el grado de:

Licenciada en Biomedicina

Presenta

Carmen Julieta Hernández Sierra

Director de Tesis

Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán

Eduardo Monjaraz G.

Asesores

Dr. Jose Everardo Avelino Cruz

Dra. Elena Hernández Caballero

Puebla de Zaragoza, septiembre 2024

INDICE

RESUMEN	4
ANTECEDENTES	5
ANTECEDENTES GENERALES	5
Cáncer	5
Gliomas	6
Glioblastoma Multiforme (GMB)	8
A) Epidemiología	9
B) Factores de riesgo.....	9
C) Diagnóstico.....	10
D) Tratamiento	11
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	11
Sistema neuronal	11
Astrocitos	12
Ambiente tumoral de glioblastoma	14
Invasión tumoral	14
Crecimiento tumoral	14
Hipoxia	15
Perivascular	15
Dopamina (DA)	16
Receptores de Dopamina	17
Receptor tipo D2.....	18
Haloperidol	20
JUSTIFICACION	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
Cultivo celular	25
Ensayo de migración.....	25

Ensayo de expresión génica	26
a) Extracción de Ácido Ribonucleico Total.....	26
b) Síntesis de Ácido Desoxirribonucleico complementario (RT).....	27
c) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	28
d) Separación electroforética a partir de los productos de PCR.....	30
e) Densitometría.....	30
Análisis de datos	31
RESULTADOS	32
1. Las células U87-MG expresan el ARNm que codifica para DRD2.....	32
2. La presencia de haloperidol no modifica la capacidad proliferativa de las células U87-MG.....	33
3. El haloperidol disminuye la capacidad migratoria de las células U87-MG.....	34
4. La presencia de haloperidol favorece el fenotipo epitelial de las células U87-MG.....	35
5. Haloperidol no reduce de manera significativa la expresión del ligando para el factor estimulante de colonias-1.....	37
CONCLUSIONES	45
CONCLUSIÓN GENERAL	45
BIBLIOGRAFÍA	45

RESUMEN

El cáncer es un conjunto de enfermedades donde se presenta una desregulación en la división celular, debido a la presencia de mutaciones que, por un lado, favorecen la capacidad proliferativa, y por otro lado, reducen la capacidad apoptótica. El glioblastoma es el tipo de cáncer más común en el sistema nervioso, su tasa de incidencia es baja, comparada con los tumores de tipo epitelial, tales como cáncer de glándula mamaria, próstata y pulmón, pero su tasa de mortalidad es muy alta, falleciendo más del 50% de los pacientes en menos de 18 meses, una vez que fue diagnosticado. Actualmente, se cuenta con varias estrategias terapéuticas para su tratamiento, tales como cirugía, radio, quimio (temozolamida) e inmunoterapia, desafortunadamente ninguna de ellas, es completamente efectiva, de ahí el interés de buscar y proponer nuevas opciones de tratamiento. El microambiente tumoral se caracteriza por la presencia de una gran cantidad de mensajeros químicos que muy probablemente inciden en la progresión tumoral. Recientemente, ha llamado poderosamente la atención la presencia de receptores de membrana a neurotransmisores en células tumorales, específicamente de dopamina, sin conocerse a detalle la relevancia funcional que pudieran llegar a tener. Por lo que el propósito del presente trabajo de tesis fue investigar si el bloqueo del receptor a dopamina por haloperidol, incide sobre la capacidad proliferativa y migratoria en células U87 derivadas de glioblastoma humano. Los resultados obtenidos muestran que las células U87 expresan el ARNm que codifica DRD2, y que la presencia de haloperidol ejerce un efecto diferencial, por un lado, reduce la capacidad migratoria de las células U87 y, por otro lado, no afecta su capacidad proliferativa. De manera adicional, se observó que la presencia de haloperidol reduce los niveles de expresión del ARNm que codifica para el Factor Estimulante de Colonias tipo 1 (CSF-1), el cual está asociado a promover el desarrollo de glioblastoma. Estos resultados revelan la significancia funcional de los receptores a dopamina sobre la progresión tumoral, por lo que pudieran ser considerados potencialmente, como blancos farmacológicos para un tratamiento más efectivo.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES GENERALES

Cáncer

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades, caracterizándose por una división desregulada de las células afectadas, modificando sus características morfológicas, y, en consecuencia, sus propiedades funcionales, debido a las mutaciones que van surgiendo durante la transformación maligna. La incidencia del cáncer en la población a nivel mundial sigue aumentando año con año, convirtiéndose en uno de los principales problemas de salud pública, relacionado con las enfermedades no transmisibles. La Organización Mundial de la Salud (OMS), reportó en el año 2020, más de 19 millones de nuevos casos de cáncer y la muerte de casi 10 millones de personas por causa de esta enfermedad (Globocan, 2020).

Al día de hoy, no se conocen con certeza las causas específicas que originan el cáncer, pero si se conocen los factores de riesgo asociados con su aparición, entre los que podemos mencionar está el estilo de vida, la obesidad, el tabaquismo, consumo excesivo de alcohol, exposición a radiaciones ionizantes, entre otros (Figura 1). El aumento en la esperanza de vida de las personas ha ocasionado que se incremente la incidencia de esta enfermedad, considerándose que 1 de cada 4 personas tiene riesgo de padecer cáncer en algún momento de su vida. La modificación del estilo de vida pudiera llegar a prevenir o reducir la incidencia de cáncer (Roy et al., 2016).

El impacto que tiene el cáncer en el aspecto socioeconómico de todos los países, lo convierte en uno de los principales temas de investigación, relacionados con su origen, desarrollo y progresión, lo cual permitirá establecer estrategias de prevención, cuidado y tratamiento eficientes (Instituto Nacional de Cáncer., 2021).

Cánceres prevenibles

Más del 40% de casos que hay de cáncer son prevenibles, según reportó la Academia Americana de Cáncer. Aquí hay una lista de las causas que las personas pueden modificar y sus porcentajes como detonantes en casos de cáncer.

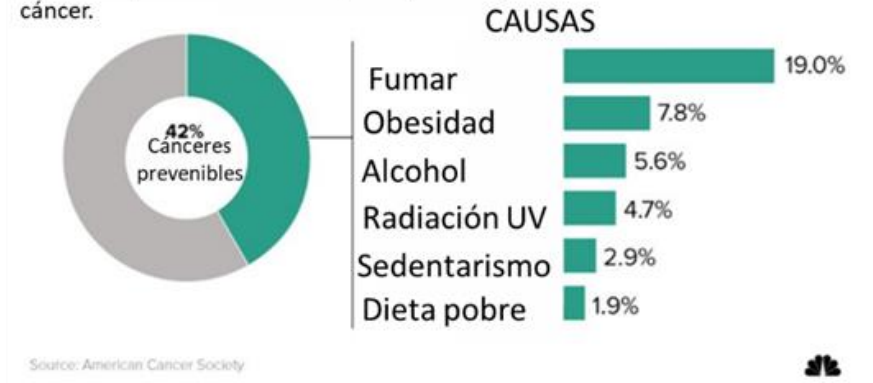


Figura 1. Factores de riesgo de cáncer (Modificada de The American Cancer Society, 2017).

Entre los diversos tipos de tumores, el glioblastoma ha llamado poderosamente la atención, no por su incidencia, que es menor al 1% de todos los tipos de cáncer, sino por su agresividad y letalidad, los pacientes una vez diagnosticados con este tipo de tumor, tienen un periodo de sobrevivencia no mayor de los 18 meses. De ahí, que se haya considerado como objeto de estudio en el presente protocolo (Instituto Nacional de Cáncer., 2021).

Gliomas

Los gliomas son el tipo de tumor más frecuente que se desarrolla en el sistema nervioso central, alrededor del 80% de todos los casos diagnosticados, se caracterizan por ser de los más agresivos y se presentan en las células gliales. Este tipo de tumor puede llegar a desarrollarse en personas de cualquier edad, pero normalmente se presentan en edad adulta, con una mayor incidencia en hombres que en mujeres (Jones et al., 2019).

Los gliomas pueden llegar a afectar la función cerebral, ser extremadamente letales dependiendo de su ubicación y velocidad de crecimiento. La OMS ha clasificado a los gliomas como de alto grado (HGG) y de bajo grado (LGG), a partir de criterios histológicos y morfológicos (Jones et al., 2019).

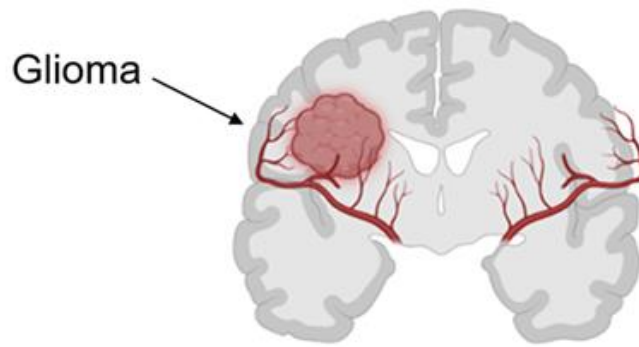


Figura 2. Imagen representativa de un glioma en tejido cerebral (Tomada de BioRender, 2023).

La identificación del tipo celular que da origen al tumor ayuda para nombrarlo, teniendo por ejemplo tumores astrocíticos, oligodendrogliales, oligoastrocíticos, ependimarios, neuronales y mixtos neuronal-glial (Chen et al., 2017).

La progresión del glioma se clasifica desde grado I hasta grado IV, tomando en cuenta como indicadores, la atipia nuclear, proliferación celular, necrosis y angiogénesis. Los tumores de grado I son astrocitomas de células gigantes subependimales, astrocitomas pilocíticos, xantoastrocitomas pleomórficos; para el grado II, son gliomas infiltrantes como oligodendrogliomas y astrocitomas; grado III son oligodendrogliomas anaplásicos; y para el grado IV, el más agresivo, tenemos como representantes, oligoastrocitomas anaplásicos, ependimomas anaplásicos, astrocitomas anaplásicos, y glioblastomas multiformes (Chen et al., 2017; Jones et al., 2019).

Los gliomas grado IV tienen un mal pronóstico, son debilitantes ya que los pacientes llegan a presentar discapacidad física, trastorno convulsivo, deterioro cognitivo, cambio de personalidad, depresión, por lo que requiere una atención multidisciplinaria compleja (Sim et al., 2019).

Los tumores intracraneales tienen una tasa de incidencia global estandarizada por grupo de edad, en el grupo menor de 20 años, la incidencia es de 3 casos por cada 1000,000 habitantes, mientras que, para el grupo mayor de 65 años, la incidencia es de 15 casos por la misma cantidad de habitantes (Grobewska et al., 2020).

Los pacientes sometidos a cirugías para eliminar el tumor, son tratados de manera post-operatoria con radioterapia y/o quimioterapia, ya que se recomienda maximizar de manera segura la eliminación de los tumores para reducir el riesgo de recurrencia (Xie et al., 2019).

Glioblastoma Multiforme (GMB)

El glioblastoma multiforme (GMB) es un glioma grado IV, actualmente representan aproximadamente un 15 % de todos los tumores cerebrales primarios. Este tumor puede presentarse a cualquier edad, sin embargo, se observa una mayor frecuencia de incidencia en los adultos mayores, y más particularmente en los hombres (Ohgaki et al., 2012).

Los glioblastomas pueden clasificarse como primarios o secundarios, dependiendo de su origen, los primarios se transforman directamente, sin necesidad de evolucionar a partir de grados menores, mientras que los secundarios, requieren transitar desde grado I hasta grado III-IV. El glioblastoma primario es típicamente maligno, agresivo, crece con gran rapidez y puede esparcirse a lo largo del cerebro, dando el aspecto de multiforme (Xie et al., 2019).

Conforme se ha hecho investigación en el tema de glioblastomas se han presentado avances importantes para poder entender la fisiopatología de estos, en 1996, en cuanto a las mutaciones genéticas que se han presentado para poderlos diferenciarlos entre glioblastomas primarios y secundarios. A continuación, se presenta una tabla con las principales mutaciones en ambos tipos de glioblastomas:

Mutaciones	
Glioblastomas Primarios	Glioblastomas secundarios
Amplificación de EGFR	Afectación principal en TP53
PTEN	Perdida de 19q
Pérdida total del cromosoma 10	IDH1
Aumento de expresión de VEFG	

Principales mutaciones que se presentan en glioblastomas primarios y secundarios (Ohgaki et al., 2012).

A) Epidemiología

En los países desarrollados, la incidencia anual de glioblastoma suele oscilar entre 3 y 4 casos por cada 100,000 personas, siendo el más frecuente el tipo primario (Ohgaki et al., 2012).

La edad media para desarrollar glioblastoma, varía dependiendo si es primario o secundario, ya que la mayoría de pacientes diagnosticados clínicamente con glioblastoma primario fue de 62 años, a diferencia de los que desarrollaron el tipo secundario, cuya media fue de 45 años. En cuanto al sexo, predominantemente afecta a los hombres, teniendo una relación que va de 1.28 a 1.32 (Ohgaki et al., 2012).

Igualmente, la tasa de supervivencia varía entre el glioblastoma primario y secundario, en el primer tipo, es de 6.3 meses, y para el tipo secundario es de 16.8 meses, todo esto a partir del diagnóstico (Ohgaki et al., 2012).

B) Factores de riesgo

Hasta el momento no se han identificado las causas directas que inducen la formación de un glioblastoma, por lo que solamente se mencionan los principales factores de riesgo asociados al desarrollo del glioblastoma (American Society of Clinical Oncology., 2021):

- Exposición continua a pesticidas, cloruro de vinilo, disolventes, productos derivados del petróleo, caucho sintético.

- Antecedentes familiares: Un pequeño porcentaje de los tumores cerebrales pueden derivarse a través de haber padecido ciertas enfermedades o factores genéticos hereditarios, como lo son el síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Turcot, esclerosis tuberosa, neurofibromatosis, y enfermedad de von Hippel-Lindau.
- Exposición a ciertos virus: como sería el caso del virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, etc.
- Exposición continua a radiación ionizante.
- Lesiones en la cabeza y convulsiones.

C) Diagnóstico

La OMS establece los siguientes pasos para el diagnóstico del glioblastoma (Figura 3):

- Examen neurológico
- Resonancia magnética
- Toma de biopsia
- Estudio histológico
- Detección de marcadores moleculares específicos



Figura 3. Pasos para el diagnóstico del glioblastoma (Modificada del Hospital Ruber Internacional, 2023).

Los síntomas clínicos que llegan a presentar los pacientes con glioblastoma son: náuseas, vómitos, dolores de cabeza severos que, por lo general, son peores en la mañana. Además, los pacientes también pueden presentar síntomas neurológicos, tales como: debilidad o cambios sensoriales en rostro, brazos o piernas; cambios repentinos en visión, olfato o audición sin pérdida de la conciencia, pérdida de equilibrio, problemas de memoria, cambios de la personalidad, problemas para dormir, dificultad para hablar, convulsiones, fatiga, aletargamiento, entre otros (American Society of Clinical Oncology., 2019).

D) Tratamiento

Una vez confirmado el diagnóstico, se evalúa el tratamiento más idóneo según el crecimiento y desarrollo del glioblastoma, el cual puede ser resección quirúrgica, radioterapia y/o quimioterapia (temozolomida) (Figura 4) (Sim et al., 2019; Witteler et al., 2021).

Igualmente, se da un tratamiento sintomático con la finalidad de disminuir los síntomas de los pacientes como dolor de cabeza, náuseas, mareo, convulsiones, entre otros. Finalmente, hoy en día se están haciendo avances en la terapia dirigida, la cual consiste en actuar sobre las proteínas que están implicadas en la multiplicación, diseminación de las células cancerosas (Figura 4) (Witteler et al., 2021).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Sistema neuronal

El glioblastoma es un tipo de tumor que se desarrolla en el sistema neuronal, donde este sistema se basa en recibir estímulos procedentes del ambiente interno y externo, para después analizarlos e integrarlos con la finalidad de producir respuestas adecuadas y coordinadas en varios órganos efectores (Galliano et al., 2014).

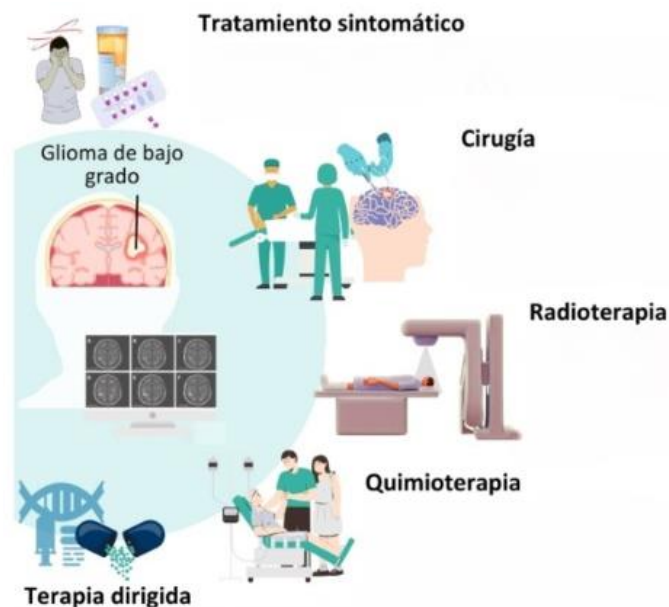


Figura 4. Representación de los diferentes tipos de tratamiento disponibles contra glioblastoma (Modificada del Hospital Ruber Internacional, 2023).

Las neuronas están inmersas en una red de células gliales, que además de ofrecerles soporte estructural, modulan la transmisión nerviosa (Verkhatsky et al., 2007).

Astroцитos

Los astrocitos fueron descritos por primera vez por Santiago Ramón y Cajal, en 1913, y son de mayor tamaño que las neuronas (Verkhatsky et al., 2007). Estas células provienen del neuroepitelio, y entre las diversas funciones en que participan, está la creación de contactos sinápticos, su mantenimiento, maduración, y eliminación (Pyka et al., 2011). Los astrocitos son un tipo de célula glial que se caracteriza por su aspecto estrellado, y que participan en muchas funciones del sistema nervioso central, por lo que un malfuncionamiento en ellas, favorece el

desarrollo de alguna patología, como sería el caso de glioblastoma (Figura 5) (Ransohoff et al., 2016).

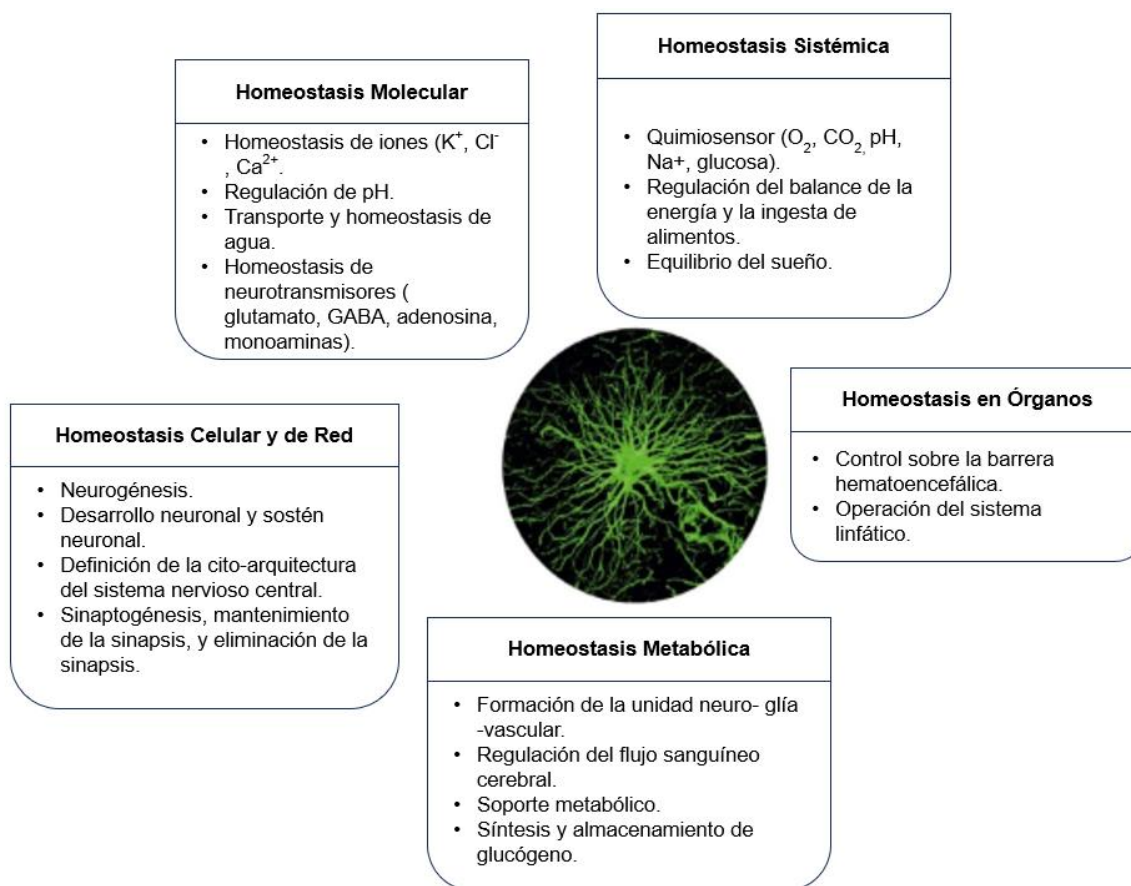


Figura 5. Principales funciones de la astroglia (Modificada de Sofroniew, 2014)

En la actualidad, se sigue desconociendo a detalle las causas que inducen el desarrollo del glioblastoma y su posterior progresión. El estudio se ha centrado más en las alteraciones cromosómicas o alélicas (Ohgaki et al., 2012). En cuanto al crecimiento tumoral, se han evidenciado ciertas mutaciones que promueven el crecimiento tumoral como lo son las mutaciones en el gen BRAF (Behling et al., 2019; Chen et al., 2019), p53 (Warfel et al., 2013) y ciclina D1 (Ciznadija et al., 2011). Recientemente, se ha considerado la participación de los neurotransmisores y la expresión de sus receptores específicos, en el desarrollo y progresión de

diferentes tumores, por lo que resulta interesante investigar, el papel de estas moléculas de señalización y de membrana en el glioblastoma (Venkataramani et al., 2022), particularmente analizaremos la dopamina y su receptor D2.

Ambiente tumoral de glioblastoma

En la actualidad se sabe que para lograr el desarrollo tumoral independientemente del tipo de cáncer que sea, existe un reclutamiento de diversas células que pertenecen a otros sistemas como lo es el sanguíneo y el inmunológico así como algunos factores secretados por estas como factor de crecimiento transformante β (TGF β), IL-6, Notch, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), en este caso también interactúa el sistema nervioso por lo que a continuación se mostraran algunas de estas relaciones y por ultimo como el aspecto de neurotransmisores se ha destacado en algunos tipos de cáncer como es el de glioblastoma (Broekman et al., 2018).

Invasión tumoral

Los tumores de este tipo son ayudados por diversos componentes que se encuentran a su alcance como lo son la matriz extracelular, vasos sanguíneos, tractos nerviosos, astrocitos con la finalidad de presentar un mayor nivel de invasión a nivel cerebral por ejemplo aquellos tumores de glioblastoma que presentan una mayor asociación entre sus células por medio de uniones gap y microtúbulos tumorales dentro de cada célula presentando eventos de calcio coactivos, es decir que existe una conectividad sincronizada en todo el tumor junto con somas somatocinéticos invasivos por medio de 3 mecanismos: de migración ramificada, translocación y locomoción siendo el de migración ramificada que se presenta de manera predominante proponiendo que la rotación que ocurre con los microtúbulos tumorales podrían provocar un cambio en la direccionalidad de la invasión (Venkataramani et al., 2022)

Crecimiento tumoral

En cuanto al crecimiento tumoral se han evidenciado ciertas mutaciones que promueven el crecimiento tumoral como lo son las mutaciones BRAF, las cuales se

encuentran en el cromosoma 7 (7q34) que da a la codificación de la principal proteína en controlar las señales de crecimiento celular como la vía de la MAP quinasa así que muchas de estas mutaciones están implicadas en provocar un aumento en el crecimiento tumoral, en la actualidad ya se han identificado ciertas mutaciones de este tipo en gliomas como la mutación BRAF V600E común y la fusión KIAA1549-BRAF, donde la última crea un ambiente tumoral pro cancerígeno que se encuentra mediado por NF- κ B y el reclutamiento de la microglía (Behling et al., 2019; Chen et al., 2019).

Hipoxia

Cuando comienza a existir un ambiente hipóxico aumentan las posibilidades que se desencadenen actividades de vías procarcinógenas tales como la presencia de células madre que se ha visto presentan una gran adaptación al ambiente hipóxico y abundante lactato (Carnero et al., 2015).

El metabolismo que se favorece con un ambiente hipóxico, es el glucolítico provocando un aumento en los niveles de lactato y de iones H^+ , entonces más la acidosis causan daño a las mitocondrias debido a la alteración de la glucólisis (Corbet et al., 2017).

Perivascular

El aspecto perivascular ha demostrado que contribuye con el aumento de la angiogénesis y la proteína de señalización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es esencial para la alta vascularidad del glioma debido a que esta aumenta debido a una mutación en el gen PTEN en conjunto con EGFR (Pore et al., 2003).

Además, las células de glioblastoma de manera indirecta pueden aumentar la angiogénesis por medio de las células micro gliales ya que el CSF1 secretado por las células de glioblastoma in vitro podría inducir a las células de la microglía a liberar proteína 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP1), que puede inducir la angiogénesis (Broekman et al., 2018).

Finalmente, las células de glioma además del factor VEGF también pueden liberar enzimas proteolíticas, ribonucleasas (entre ellos activadores de plasminógeno y angiogenina) y una variedad de quimiocinas, la mayoría de estos factores se liberan en forma de factores solubles, complejos ribonucleares extravesiculares y vesículas extracelulares (Treps et al., 2017).

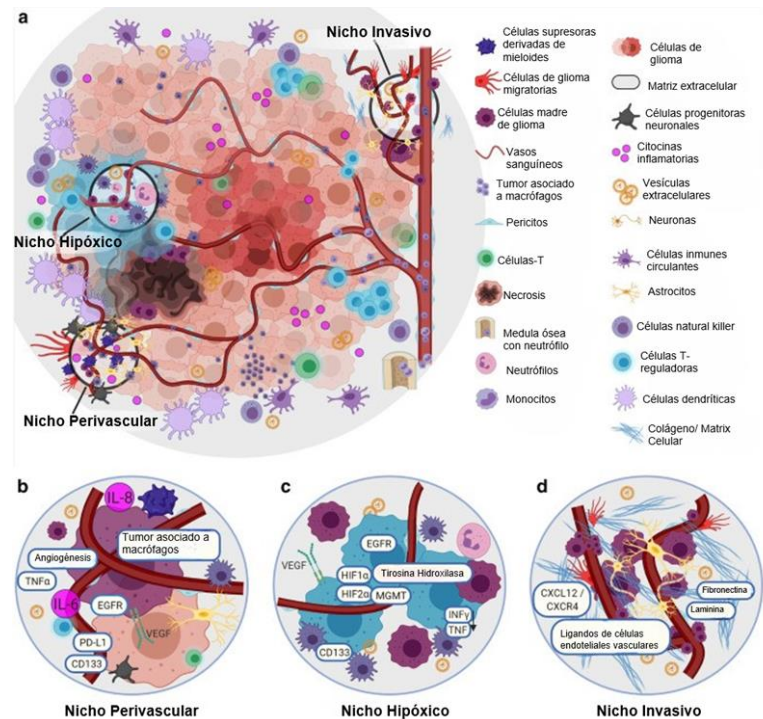


Figura 6. Resumen de las interacciones que hay en el ambiente micro tumoral (Modificada de Barthel, 2021).

Dopamina (DA)

La dopamina (DA) es una amina biogénica que funciona como un neurotransmisor en el sistema nervioso central, se clasifica como catecolamina ya que se encuentra formada por un núcleo catecol (Daubner et al., 2011). En cuanto a sus funciones, a nivel central, regula la actividad motora, afectiva, emotiva, sentido de supervivencia y el sistema de placer-recompensa; mientras que, a nivel periférico, modula la

función cardíaca, motilidad gastrointestinal y el tono vascular (Bao et al., 2001; Chen et al., 2003).

La DA es principalmente sintetizada en el sistema nervioso central y en menor porcentaje en la médula suprarrenal, para su síntesis se requiere del aminoácido L-tirosina y la enzima tirosina hidroxilasa, la cual convierte la L-tirosina en L-DOPA y posteriormente en DA (Figura 6), todo esto ocurre en el citosol de las terminales dopaminérgicas (Bahena et al., 2000).

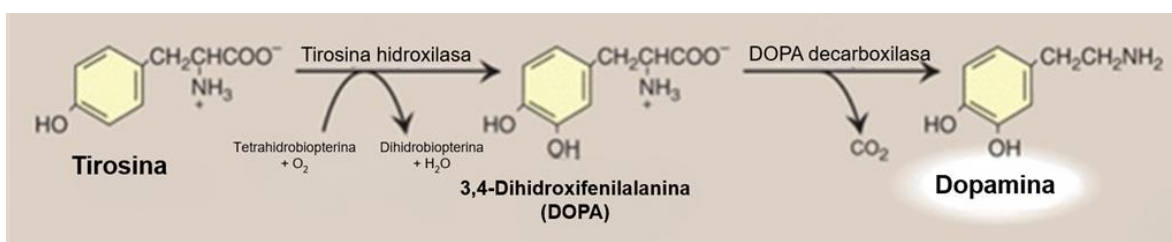


Figura 7. Reacciones metabólicas para la obtención de dopamina (Modificada de Harvey et al, 2011).

Posteriormente, la DA es liberada por exocitosis al espacio extracelular con la finalidad de activar su receptor específico, y una vez terminada su acción es recapturada por el transportador de DA localizado en las células gliales para degradación (Pérez et al., 2015).

Receptores de Dopamina

Es importante mencionar que para que la DA ejerza su efecto, necesita unirse a su receptor, conociéndose hasta el momento 5 tipos de receptores (D1 a D5), que se agrupan en dos familias: D1 y D2, en concordancia con la vía de señalización activada. La familia D1, integrada por los receptores D1 y D5, están asociados a una proteína $\text{G}\alpha_s$; mientras que la familia D2, constituida por los receptores D2, D3 y D4, están acoplados a proteínas $\text{G}\alpha_i$ y $\text{G}\alpha_o$ (Ávila et al., 2017).

Los receptores dopaminérgicos poseen 7 dominios transmembranales, de 20 a 25 residuos hidrofóbicos cada uno. Los 7 dominios intramembranales están conectados de forma alterna por asas citoplasmáticas (i1, i2, i3) y extracelulares (e1, e2, e3) y la región amino terminal corresponde a un dominio extracelular glicosilado. (Bahena-Trujillo et al., 2000). El tercer dominio citoplasmático exhibe diferencias entre los diferentes tipos de receptores, lo que está relacionado con el tipo de proteína al que están acoplados los receptores, entonces en conjunto el asa citoplasmática i3 y la región carboxilo terminal interaccionan con las proteínas G (Bahena-Trujillo et al., 2000). La región NH₂ terminal tiene varias similitudes entre los subtipos, pero varían los sitios N-glucosilados, tanto los receptores D5 y D1 poseen 2 sitios, el D2 posee 4 sitios glucosilados, D3 tiene 3 sitios y D4 solo tiene un sitio (Missale et al., 1998).

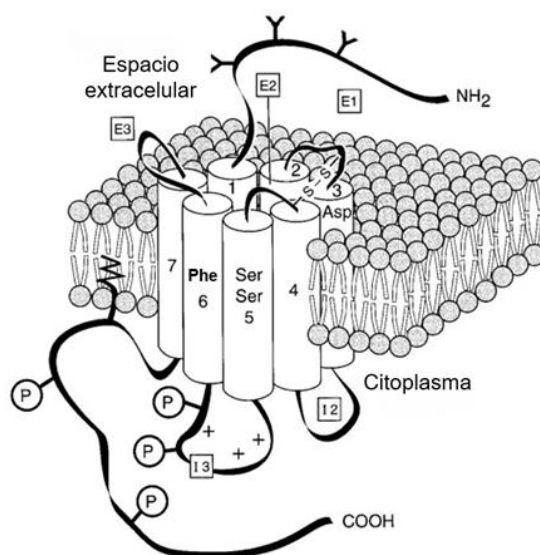


Figura 8. Estructura de los receptores de dopamina (Modificada de Missale, 1998).

Receptor tipo D2

El receptor tipo D2 presenta dos isoformas generadas por procesamiento alternativo del ARNm, la isoforma corta (D2S) y la isoforma larga (D2L) (Pérez-Neri et al., 2015). La idea de que los ligandos del receptor de DA podrían afectar la biología de las células neoplásicas independientemente de sus acciones sobre la

neurotransmisión es interesante y ofrece un mecanismo novedoso y la capacidad de utilizar la biblioteca de ligandos y fármacos dopaminérgicos que han resultado de la investigación de fármacos neurológicos (Olivetti et al., 2020).

Hasta el momento, se ha documentado la expresión del receptor D2 y su sobreexpresión en diferentes tipos de cáncer como en la leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, glioma, neuroblastoma, cáncer de ovario, entre otros (Weissenrieder et al., 2019). Cabe destacar que también se ha analizado si la activación de la señalización de DRD2 en células de glioblastoma multiforme promueve la proliferación y supervivencia celular por lo que se han tratado con agonistas del receptor como quinpirole y 7-OH-DPAT (Jeon et al., 2023). En un estudio reciente, se demostró que la expresión del receptor de dopamina D2 (DRD2) se correlaciona negativamente con la supervivencia en pacientes con cáncer gástrico y, por tanto, los antagonistas de DRD2 se consideraban una posible opción eficaz en el tratamiento del cáncer gástrico (Hsieh et al., 2019). El tratamiento con antagonistas dopaminérgicos, como es el uso del haloperidol, afecta varios procesos vitales en las células tumorales (Figura 9).

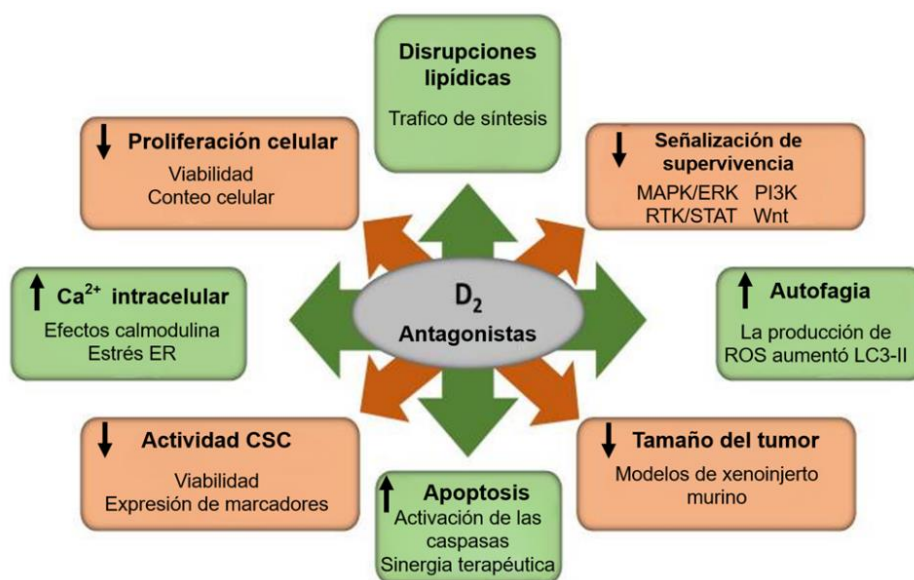


Figura 9. Efectos de antagonistas de DRD2 en células cancerosas (Modificada de Jeon, 2023).

Haloperidol

El haloperidol se desarrolló en la década de 1950 funcionando principalmente como fármaco antipsicótico de primera generación o “típicos”, su principal diana es el receptor D2 como antagonista de este ($K_i = 2 \text{ nM}$). Entre sus características químicas se puede mencionar que es una butirofenona, tiene un grupo hidroxilo actuando como aceptor y donante de enlaces de hidrógeno. Su peso molecular es de 375,14 y un cLogP de 3,49, por lo que posee una alta actividad biológica en humanos (Papadopoulos et al., 2020; Tyler et al., 2017).

Este fármaco se sintetizó por primera vez en febrero de 1958, igualmente en ese año se realizaron sus respectivos ensayos clínicos en la Universidad de Lieja con la finalidad de utilizarse como tratamiento para trastornos psiquiátricos, como la manía, esquizofrenia y psicosis paranoide. Cabe destacar que es altamente permeable al Sistema Nervioso Central contando con una biodisponibilidad moderada ($F = 0,6$) y su unión a proteínas es de 92% aproximadamente así que se mostraron resultados favorables contra estos trastornos (Tyler et al., 2017).

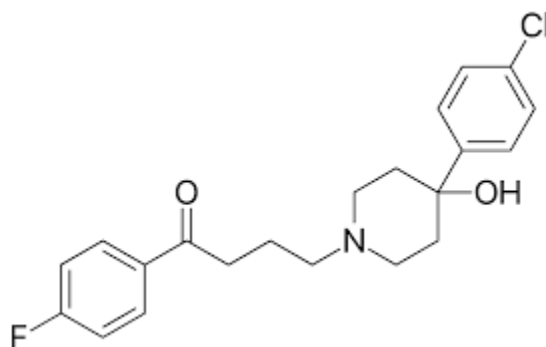


Figura 10. Estructura química del Haloperidol (Tomada de BioRender).

En cuanto a su metabolismo se procesa en el hígado de manera extensa y sólo el 1% de la dosis administrada es detectable en orina. Entre los componentes que juegan un papel son las oxidasas microsómicas hepáticas y procesos de conjugación como la N-desalquilación, la cual es la principal vía del metabolismo

del haloperidol, a partir de estos procesos originan un metabolito hidroxilado activo y una serie de metabolitos inactivos (Tyler et al., 2017; Guirao et al., 2016).

Algunos de sus metabolitos son piridinio y tetrahidropiridina, los cuales se ha observado pueden inhibir la recaptación presináptica tanto de serotonina como de dopamina en preparaciones de sinaptosomas de ratón (Tyler et al., 2017).

Hoy en día se hacen análisis respecto al papel del haloperidol contra el cáncer, respecto a los hallazgos que se han encontrado se puede mencionar que el uso de antipsicóticos conlleva a un menor riesgo de contraer cáncer de recto, colón, próstata identificada en una cohorte poblacional. Además, se ha comprobado que disminuyen el riesgo de desarrollar cáncer gástrico aislando ciertas variantes como enfermedades médicas, medicación, urbanización, ingresos, etc (Dalton et al., 2006; Hsieh et al., 2019).

También en conjunto con la temozolomida, los antagonistas del receptor de dopamina D2 funcionan sinérgicamente inhibiendo la proliferación de células de GBM U251 y T98, donde el valor IC50 de viabilidad reducida para haloperidol fue de 35 μ M en células T98 y 38 μ M en células U251 (Papadopoulos et al., 2020).

JUSTIFICACION

Con el paso del tiempo se ha podido apreciar cómo ha ido incrementando la incidencia de los casos en diferentes tipos de cáncer, solo en 2020 hubo 19,292,789 de casos nuevos en todo el mundo y en cuanto al índice de mortalidad fueron casi 10 millones. Además, que en un futuro estos casos seguirán en aumento por lo que es de vital importancia profundizar en los mecanismos que se desencadenan con el cáncer y poderlos limitar o erradicar (GLOBOCAN., 2020).

Cabe destacar que cada tipo de cáncer tiene sus diferencias respecto a los otros, en el caso de Glioblastoma grado IV, es preocupante su tasa media de supervivencia, la cual se encuentra entre los 6.3 y 16.8 meses a partir de su diagnóstico. La información que se conoce respecto a los factores que favorecen la progresión tumoral es todavía insuficiente para lograr diseñar y proponer un mejor tratamiento. Particularmente, se ha descrito que la expresión del receptor a dopamina D2 se correlaciona negativamente con la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer (Ohgaki et al., 2012; Hsieh et al., 2019), por lo que se decidió iniciar el estudio de la participación del receptor D2 en la progresión del glioblastoma grado IV, para lo cual se utilizará como modelo experimental, la línea celular U87, con el fin de identificar blancos farmacológicos para su tratamiento efectivo e incrementar la esperanza de vida de los pacientes que padezcan glioblastoma grado IV.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El glioblastoma multiforme humano es uno de los principales tumores que se presentan en el Sistema Nervioso Central, aunque su tasa de incidencia es baja, comparada a otros tipos de cáncer de origen epitelial (pulmón, próstata, glándula mamaria, colon-rectal), es un tumor muy agresivo, siendo su tasa de supervivencia menor a los 18 meses, una vez que ha sido diagnosticado. Las estrategias terapéuticas usadas para su tratamiento, como es la resección quirúrgica, quimioterapia (temozolomida) y radioterapia, son poco eficientes, de ahí la necesidad de buscar nuevos blancos farmacológicos para un tratamiento más eficaz. En este sentido, se han identificado la expresión de receptores a neurotransmisores en líneas celulares de glioblastoma multiforme humano, tales como a serotonina, glutamato, histamina y dopamina, sin conocerse a detalle la relevancia funcional de éstos sobre el potencial metastásico de las células tumorales. Para fines de este proyecto, se ha considerado iniciar el estudio del papel que pudiera estar jugando el receptor a dopamina, particularmente el tipo D2, sobre la capacidad migratoria y proliferativa en la línea celular U87. Para resolver este problema planteamos utilizar haloperidol, que es un antagonista específico para los receptores D2.

HIPÓTESIS

El fármaco haloperidol, disminuirá la capacidad proliferativa y migratoria en las células de U87 específicamente por medio del receptor D2 de dopamina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del haloperidol sobre la capacidad proliferativa y migratoria en las células de U87 a través del receptor D2 de dopamina por medio de la inhibición de este.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto del haloperidol ejercido a través del receptor D2 sobre la capacidad proliferativa de las células U87.
2. Analizar el efecto del haloperidol ejercido a través del receptor D2 sobre la capacidad migratoria de las células U87.
3. Determinar la expresión del ARNm que codifica para el receptor D2 en las células U87, tumorales de glioblastoma grado IV.
4. Investigar si el efecto del haloperidol sobre la capacidad migratoria y proliferativa inducido por el receptor D2 en las células U87 es dependiente de la concentración del fármaco.
5. Iniciar el estudio de la vía de señalización involucrada en el efecto que ejerce el haloperidol por medio del receptor D2 sobre la capacidad proliferativa y migratoria de las células U87.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular

Las células U87 MG fueron sembradas en matraces de cultivo de poliestireno de 25 cm² de superficie, con medio de cultivo Advanced DMEM (Gibco, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-Glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico (25µg/ml de anfotericina B, 10,000 µg/ml de estreptomicina y 10,000 unidades/ml de penicilina). Se mantuvieron dentro de una incubadora a 37°C con una atmosfera húmeda del 5% de CO₂ y 95% de aire. El medio de cultivo se renovó cada 48 horas y cada 3 días las células fueron tripsinizadas. La tripsinización consistió en los siguientes pasos: retirar el medio de cultivo y lavar 2 veces con 5 mL de PBS estéril a una concentración de 1X, adicionar 2 mL de tripsina y dejar reposar por 3 min. Se resuspendió el contenido celular con 4 mL de medio de cultivo, de la suspensión celular obtenida se transfirió a un tubo cónico y se centrifugó a 1500 rpm por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular que se quedó en el tubo y se resuspendió con medio de cultivo fresco, a partir del cual, se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre y sembrar las células que se utilizaron para experimentos posteriores. Esto en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

Ensayo de migración

Se comenzó retirando el medio del cultivo de las 4 placas petri, después se dio 2 lavados con PBS 1X de 2mL, posterior a esto se agregó 0.5mL de tripsina y se dejó reposar por 3 minutos. Luego se adicionó 750µL de medio de cultivo Advanced DMEM (Gibco, EUA), se pasó el contenido de cada caja petri a tubos de 2mL, después la suspensión celular se centrifugó a 3000rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1mL de medio de cultivo, luego se tomó una alícuota de 10µL de la suspensión de cada condición más 40µL de azul

de tripano con esto se pudo realizar el conteo celular con ayuda del microscopio invertido. A partir de esto se realizaron los cálculos necesarios para sembrar las células en los insertos de la cámara transwell, en estos mismos insertos se colocaron en la parte inferior 750µL de medio completo y en la parte superior se colocó 350µL compuestos por medio libre de suero fetal junto con el cálculo obtenido de la suspensión celular, posterior a esto se metió a la incubadora la cámara transwell y transcurrieron 18 horas para la posterior tinción de los insertos.

Pasadas esas horas, se continuó con la cámara transwell para proceder a la tinción de esta que consistió en los siguientes pasos, primero se limpió la parte superior del inserto con un cotonete, luego se preparó metanol/acetona en tubo de 50mL (5mL se agregó acetona y 5mL de metanol con una relación 1:1). A partir del mix creado con metanol/acetona se agregó 1mL por pozo y se dejó actuar por 20 minutos. Pasados los 20 minutos se removió el excedente de metanol/acetona con una pipeta, se transfirió a los pozos que contengan 1mL de cristal violeta y se dejó actuar por 8 minutos a temperatura ambiente. Después se agregó 1mL de agua desionizada a pozos limpios para hacer lavados. Se colocaron los insertos teñidos con cristal violeta a los que tienen el agua desionizada, a continuación, se dejó reposar por 2 minutos y después se movió lateralmente para lavarlos.

Ensayo de expresión génica

a) Extracción de Ácido Ribonucleico Total

Las células se sembraron en 4 placas petri, una vez que alcanzaron la confluencia esperada, se recambió el medio de cultivo, se dio inicio al tratamiento correspondiente, con recambio de medio cada 24 horas. Una vez que transcurrió el tiempo respectivo al tratamiento se procedió a realizar la extracción del RNA total por medio de un kit comercial FavorPrep TM, Tissue Total RNA Mini (Favorgene, Biotech Corp., China), siguiendo las instrucciones del fabricante: se retiró el medio de cultivo de las placas, se realizaron 2 lavados con PBS 1X, se preparó el buffer de lisis suplementado con 1% de β - mercapto-etanol y se agregaron 350 µL de buffer de lisis por placa, con ayuda de una micropipeta se resuspendió varias veces

y se transfirió el contenido homogéneo celular a la columna que tenía el filtro blanco, se centrifugó a 12000 rpm por 2 min, se retiró la columna blanca y el remanente que quedó en el tubo colector, se transfirió a un tubo eppendorf de 2 ml, se agregaron 350 µL de etanol al 70% en cada tubo. Se colocó en otra columna los filtros rojos y se les añadió lo del tubo eppendorf, se centrifugó a 12000 rpm por 2 min y se retiró el sobrenadante, se realizó 1 lavado con buffer de lavado uno y 2 lavados con buffer de lavado dos. Tras cada lavado, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 min. Por último, la columna fue transferida a un tubo de 1.5 mL estéril y se agregaron 30 µL de agua libre de RNasas. Se dejó reposar la muestra por 3 minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 12000 rpm por 3 minutos para obtener el RNA total. Posterior a la extracción, se cuantificó la concentración y la cantidad de ARN extraído mediante espectrofotometría. Para ello se empleó una dilución con 4 µL de la muestra de ARN y 196 µL de agua inyectable, para obtener un volumen final de 200 µL y un blanco de 200µL de agua inyectable; la concentración fue evaluada a una longitud de onda de 260nm y la integridad del ARN se evaluó como el cociente obtenido entre las longitudes de onda 260nm y 280nm (A260/A280). El valor del cociente obtenido se ubicó en un rango de 1.8-2.0 para que fuera considerado como una muestra de ARN de buena calidad y poder ser empleado en los ensayos de RT-PCR.

b) Síntesis de Ácido Desoxirribonucleico complementario (RT)

Para la síntesis de la primera cadena de Ácido Desoxirribonucleico complementario al ARN extraído (ADNc), se empleó el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem, EUA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se hizo un “master mix” (mezcla de componentes) como se muestra en la tabla de abajo del cual se añadieron 6 µL de forma común a todas las muestras.

Reactivo	Volumen
Buffer RT (thermoscientific)	4µl
dNTPs (Applied Biosistem)	1µl
Ramdoms (Applied Biosistem)	0.5µl
Mull, retrotranscriptasa	0.5µl

Para cada tubo de reacción se empleó un volumen final de 20 μL , por lo que el volumen restante (14 μL) fue complementado con la muestra de ARN más agua.

Se realizaron los cálculos para conocer el volumen final de la muestra de ARN que fue requerido por cada tubo de reacción mediante una “regla de tres” de forma que cada uno de ellos contuvo 4 μg de ARN por cada microlitro.

Condición	Concentración de ARN
X	$\begin{array}{rcl} X \mu\text{g} & \text{—————} & 1000 \mu\text{l} \\ 4 \mu\text{g} & \text{—————} & Y \\ & & \downarrow \\ & & \text{Volumen de muestra requerido} \end{array}$

Se empleó un termociclador *Mastercycler S50* (Eppendorf), el cual realizó el siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 5 minutos a 85°C y finalmente la temperatura de los tubos se llevó a 4°C, y fueron almacenados en congelación hasta su empleo.

c) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A partir del ADN complementario obtenido en la retro-transcripción se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el Kit comercial DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific, EUA), siguiendo las indicaciones del proveedor, con un volumen total de reacción mínimo de 20 μL . Los reactivos que se ocuparon en la reacción se muestran en la siguiente tabla.

Reactivo	Volumen
Green Dream Taq	10 μl
Primer Forward	1 μl
Primer Reverse	1 μl
Agua	6 μl
DNA complementario	2 μl

En la siguiente tabla se muestran los oligonucleótidos utilizados:

Oligonucleótidos	Dirección	Secuencia	Tamaño del amplificado pb	Temperatura media
DRD2A	Foward	CACTCCTCTTCGGACTCAATAAC	289pb	63.2°C
	Reverse	CACTGGGAAACTCCCATTAGAC		63.9°C
DRD2B	Foward	CTGGGAGACCCATGTAAATACC	431pb	63.5°C
	Reverse	GAGGAAAGGCCAGAAGGAATAG		64.3°C
CSF-1L	Foward	CATCCACTTCTCACCTTCTTT	688pb	63.6°C
	Reverse	CCAATGTCCTCTTGACTTCTC		63.4°C
CSF-1R	Foward	GTTCAATCAGAGCCAGGACTATC	573pb	63.2°C
	Reverse	GTGTCCTTGGTGGTAGCATTAG		62.7°C
E-cadherina	Foward	TGGAGGAATTCTTGCTTTGC	488pb	64.5°C
	Reverse	CGTACATGTCAGCCAGCTTC		63.9°C
α-SMA	Foward	CTCAGCAGTAGTAACGAAGGAATAG	421pb	62.3°C
	Reverse	GACCCTGAAGTACCCGATAGA		61.6°C
β-actina	Foward	CAAGAGATGGCCACGGCTGCT	275pb	73.1°C
	Reverse	TCCTTCTGCATCCTGTCGGCA		72.7°C

Se empleó un termociclador Mastercycler S50 (Eppendorf) para realizar el siguiente protocolo: 5 minutos a 94 °C, 30 segundos a 94°C, 30 segundos en la temperatura media del oligonucleótido a utilizar, 1 minuto a 72°C, 10 minutos a 72°C y finalmente la temperatura de los tubos se llevó a 4°C, para ser almacenados en congelación hasta su empleo.

d) Separación electroforética a partir de los productos de PCR

A partir de los productos de PCR se procedió a la separación electroforética, utilizando geles de agarosa al 1.2% teñidos con Bromuro de etidio (BrEt).

Para la preparación del gel se disolvieron 600 miligramos de agarosa en 50 mL de buffer TAE 1X, la solución fue calentada por 1:30 minutos, se añadió 4 µL de bromuro de etidio, asegurándose de disolverlo adecuadamente. Después todo el contenido se vertió en la cámara de electroforesis y se colocaron los peines correctamente dejando gelificar por 30 minutos a temperatura ambiente.

El gel se cargó con 9 µL de cada muestra en cada pozo y como marcador de peso molecular se empleó el patrón de ADN comercial Gene Ruler 100 pb DNA Laddery junto con el con buffer 6X DNA Loading Dye (ambos de Thermo Scientific, EUA).

La separación electroforética se llevó a cabo en buffer TAE 1X a 65 Voltios durante 80 minutos; finalmente, se obtuvieron tres micrografías de cada uno de los geles en el fotodocumentador de geles AXYGEN, empleando el programa.

e) Densitometría

Se realizó el análisis densitométrico de las bandas presentes en las imágenes obtenidas utilizando el software ImageJ que es proporcionado gratuitamente por el instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (De sus siglas en inglés, NIH).

Análisis de datos

Finalmente se realizó el análisis e interpretación de los resultados obtenidos mediante la utilización del programa SigmaPlot 11.0 (Jandel Corporation, EUA) se utilizó la prueba t de Student para evaluar la diferencia entre grupos, y así considerar la diferencia estadísticamente significativa, donde p debe ser menor a 0.05 ($p < 0.05$).

RESULTADOS

1. Las células U87-MG expresan el ARNm que codifica para DRD2.

El haloperidol, además de su amplio uso en diferentes trastornos psiquiátricos, se ha comenzado a emplear *in vitro*, como un fármaco con efectos antitumorales, desconociéndose hasta el momento, el mecanismo molecular involucrado. Este compuesto, es un antagonista específico de los receptores a dopamina tipo D2 (DRD2), por lo que se ha sugerido, la probable participación de estos receptores en el efecto antitumoral que ejerce el haloperidol. En este contexto, se decidió investigar de manera inicial, si las células U87-MG tienen la capacidad de expresar el ARNm que codifica para este receptor. Debido a que no hay evidencias concluyentes acerca de la presencia de este receptor en las células U-87 MG, se diseñaron dos juegos de oligonucleótidos, DRD2a y DRD2b, a partir de la secuencia completa del ARNm para DRD2. Al realizar el ensayo de expresión génica, se puede observar en la fotografía del gel de la Figura 11B, que los dos oligonucleótidos reconocen el ARNm para DRD2, pero el oligonucleótido DRD2b, lo hace con mayor eficiencia, ya que la banda es más intensa. Al realizar el análisis densitométrico, se puede ver en el gráfico de la Figura 11A, que el oligonucleótido DRD2b es casi 3 veces más intenso, que el oligonucleótido DRD2a. Con estos resultados queda claro, que nuestro modelo experimental, las células U87-MG tienen la capacidad de expresar el ARNm que codifica para DRD2.

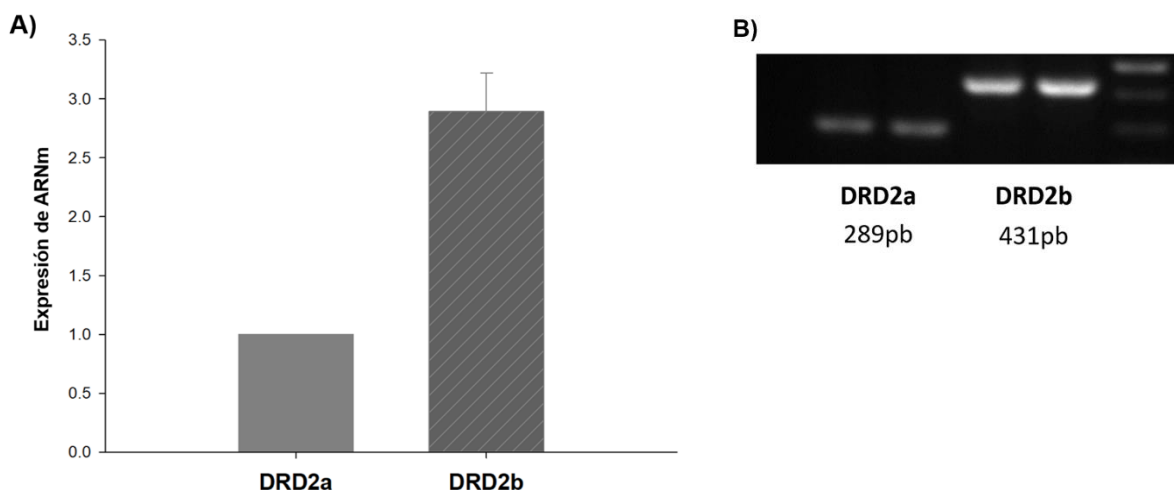


Figura 11. Las células U87-MG expresan el receptor DRD2 en condiciones de cultivo estándar. Las células U87-MG fueron mantenidas en condiciones de cultivo estándar. **A)** Los valores graficados se expresan normalizados respecto al valor determinado del oligonucleótido DRD2a, se grafica el valor promedio con su error estándar, de tres experimentos independientes. **B)** En el momento que las células alcanzaron una confluencia del 100% se realizó la extracción de ARN, total seguido de un RT-PCR y finalmente una electroforesis, mostrándose la imagen obtenida.

2. La presencia de haloperidol no modifica la capacidad proliferativa de las células U87-MG.

El potencial metastásico de las células tumorales incluye diferentes propiedades funcionales exacerbadas, tales como, su capacidad replicativa, migratoria, invasiva y de quimio-resistencia. Con el fin de evaluar si la presencia de haloperidol, influye sobre el potencial metastásico de las células U-87 MG, decimos investigar de manera preliminar, si es capaz de afectar su capacidad proliferativa y su capacidad migratoria. Existen evidencias contradictorias en el sentido de que el haloperidol influye o no influye, sobre la capacidad proliferativa de algunos tipos de células tumorales. Por lo que se decidió, investigar si la presencia de haloperidol influye sobre la capacidad proliferativa de las células U87-MG, empleando una concentración de haloperidol cinco veces mayor a la concentración de su IC50. Para resolver esta pregunta, realizamos un conteo celular en cámara de Neubauer con el colorante vital azul de tripano, tanto para células control como células tratadas con 1.5 mM de haloperidol por 48 horas. Los resultados obtenidos se presentan en

la gráfica de la Figura 12, mostrándose claramente, que la presencia de haloperidol no modifica la capacidad proliferativa de las células U87-MG.

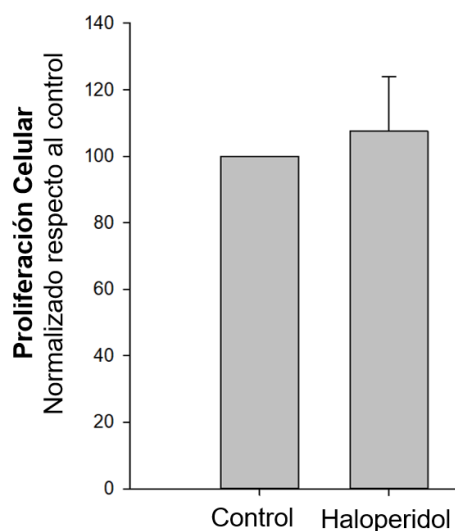


Figura 12. El haloperidol no modifica la capacidad proliferativa de las células U87-MG. Las células U87-MG fueron tratadas por 48 horas con 1.5 mM de haloperidol. Los valores graficados de la proliferación celular, son el promedio de tres experimentos independientes, normalizados respecto al valor del promedio control.

3. El haloperidol disminuye la capacidad migratoria de las células U87-MG

Al no haber detectado cambios en la capacidad proliferativa de las células U87-MG inducidos por la presencia de haloperidol, se decidió evaluar, si este compuesto era capaz de influir sobre la capacidad migratoria de las células U87-MG. Igualmente, el tratamiento fue por 48 horas con 1.5 mM de haloperidol, al finalizar el tratamiento, las células fueron cosechadas para realizar el ensayo de migración en cámaras transwell. La Figura 12 muestra que la presencia de haloperidol tiende a reducir la capacidad migratoria de las células U87-MG, aunque no hay una diferencia significativa con respecto al control, la tendencia es clara.

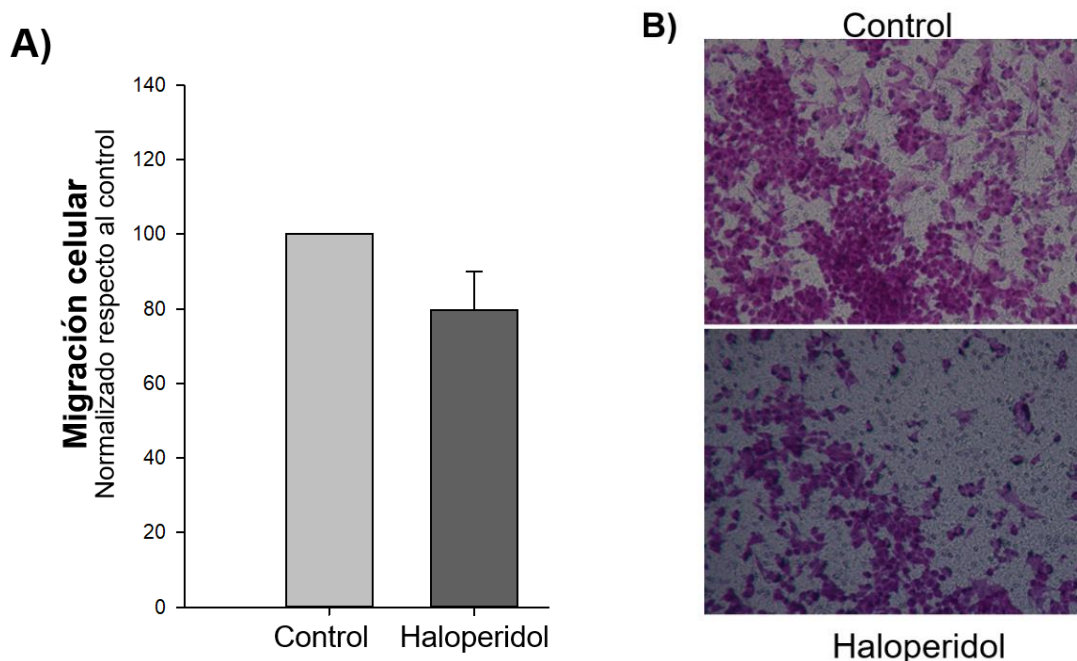


Figura 13. El haloperidol reduce la capacidad migratoria de las células U87-MG. Las células U87-MG fueron tratadas por 48 horas con 1.5 mM de haloperidol. **A)** Los valores graficados de la proliferación celular, son el promedio de tres experimentos independientes, normalizados respecto al valor del promedio control. **B)** Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de campo claro Leica DM1000 utilizando el objetivo 4X y con una cámara de la marca Jenolík Jena modelo ProgRes10 plus y el programa ProgRes CapturePro 2.1.

4. La presencia de haloperidol favorece el fenotipo epitelial de las células U87-MG.

Aunque no hubo un efecto significativo del haloperidol sobre la capacidad migratoria de las células U87-MG, se logró observar una clara tendencia inhibitoria del haloperidol, por lo que se decidió seguir investigando en esta propiedad de las células tumorales. La capacidad migratoria de las células tumorales depende de un proceso conocido como transición epitelio-mesénquima. Las células tumorales con alta capacidad migratoria, expresan predominantemente marcadores moleculares del fenotipo mesenquimal, tales como N-cadherina, vimentina, α -SMA, entre otros; mientras que las células tumorales con baja capacidad migratoria, expresan altos niveles de marcadores moleculares del fenotipo epitelial, como sería el caso de E-

cadherina. Debido a que la presencia de haloperidol reduce la capacidad migratoria de las células U87-MG, se propuso investigar si esta reducción se debe a un incremento de los marcadores de fenotipo epitelial, E-cadherina, o a una reducción en los marcadores del fenotipo mesenquimal, α -SMA. Ensayos de expresión génica, muestran que la presencia de haloperidol incrementa los niveles de expresión del ARNm que codifica para E-cadherina, 1.8 veces, con respecto a la condición control, mientras que la expresión de α -SMA no resulta afectada (Figura 14). Este resultado sugiere que el haloperidol favorece el fenotipo epitelial de las células U87-MG, provocando con ello, una reducción en su capacidad migratoria.

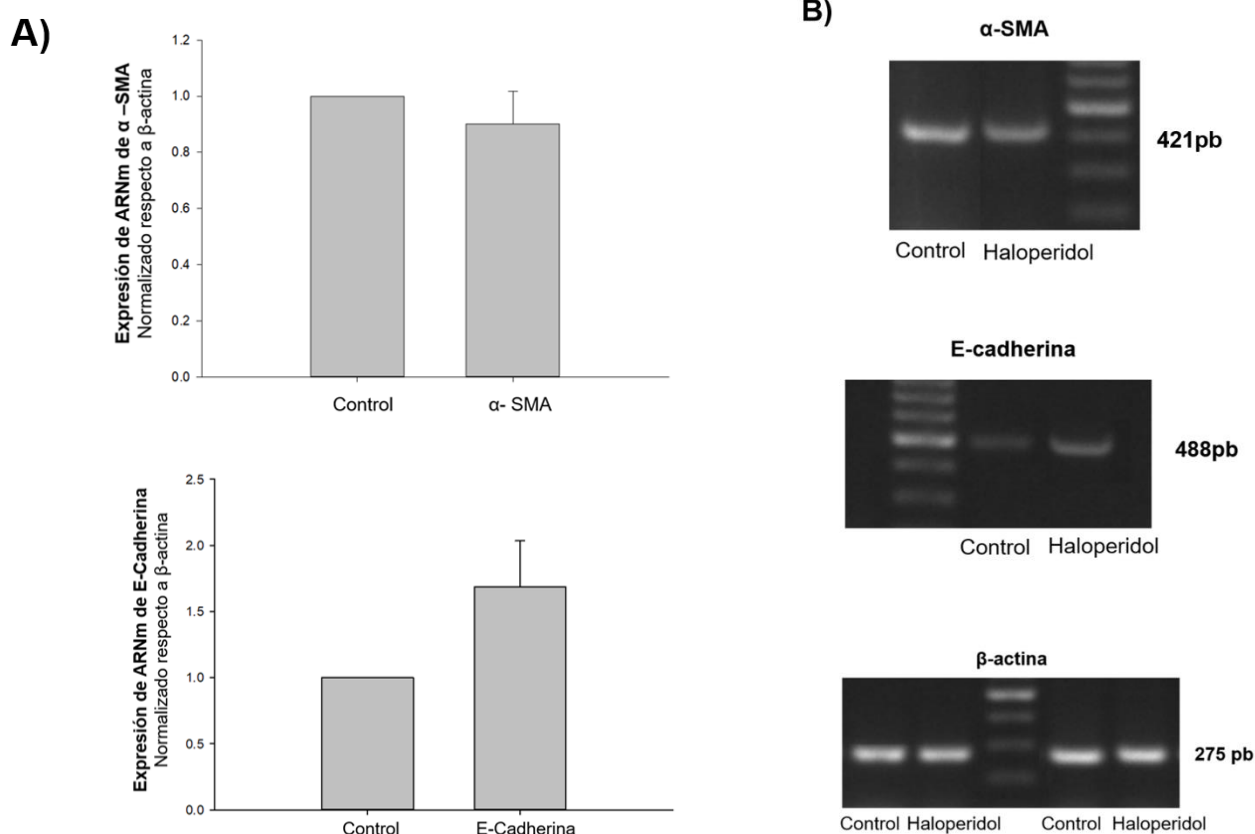


Figura 14. La presencia de haloperidol favorece el fenotipo epitelial de las células U87-MG. Las células U87-MG fueron tratadas por 48 horas con 1.5 mM de haloperidol. **A)** Los valores graficados son el promedio de tres experimentos independientes, normalizados respecto al valor promedio de la condición control, el cual a su vez fue normalizado con el valor de β -actina, considerado como control interno. **B)** Fotografía de los productos de PCR separados electroforéticamente.

5. Haloperidol no reduce de manera significativa la expresión del ligando para el factor estimulante de colonias-1.

Varios trabajos publicados, han mostrado que el efecto anti-tumoral del haloperidol en varios tipos de cáncer, se debe a la participación del complejo del Factor Estimulador de Colonias tipo 1 (CSF-1) y su ligando, por lo que se decidió investigar de manera preliminar, si hay un cambio en el nivel de expresión del ARNm que codifica para el ligando del CSF-1 en nuestro modelo experimental, cuando es mantenido en presencia de 1.5 mM de haloperidol por 48 horas. La Figura 15 muestra que los niveles de expresión del ligando de CSF-1 no son alterados de manera significativa por la presencia de haloperidol, aunque si observamos una tendencia hacia la baja.

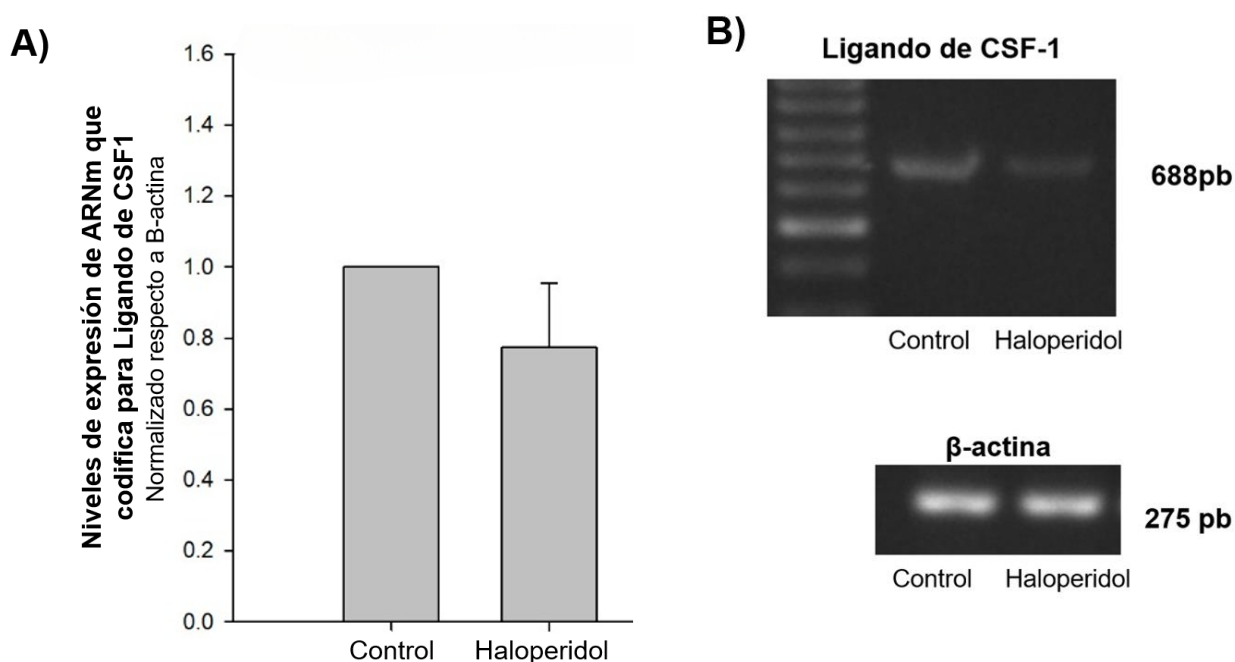


Figura 15. La expresión del ligando de CSF-1 no resulta afectada por la presencia de haloperidol. Las células U87-MG fueron tratadas por 48 horas con 1.5 mM de haloperidol. **A)** Los valores graficados son el promedio de tres experimentos independientes, normalizados respecto al valor promedio de la condición control, el cual a su vez fue normalizado con el valor de β -actina, considerado como control interno. **B)** Fotografía de los productos de PCR separados electroforéticamente.

DISCUSIÓN

En la investigación del cáncer uno de los objetivos principales ha sido buscar dianas terapéuticas, entre ellos se ha mencionado la posible participación de los receptores de dopamina, debido a los descubrimientos que se realizaron en los pacientes que tenían cáncer y que consumían al mismo tiempo fármacos antipsicóticos, junto con su tratamiento antineoplásico tendían a mostrar una mejor respuesta clínica en comparación con los que no se les administraba fármacos antipsicóticos. Cabe destacar que entre los 5 subtipos que existen se expresan de manera diferente dependiendo del tipo de cáncer del que estemos hablando, donde el DRD2 es uno de los subtipos como mayor abundancia en el cerebro, junto con esto muchos de los glioblastomas tienden a originarse en el campo de proyección de las neuronas dopaminérgicas, en consecuencia DRD2 se encuentra sobre expresado en GBM, por lo que se ha relacionado con el crecimiento tumoral, entonces una de las posibles estrategias que se han contemplado es que los antagonistas de DRD2 podrían inhibir eficazmente el crecimiento de células GBM *in vitro* e *in vivo* (Rosas-Cruz A et al.,2021; Chiang JY et al.,2022; Brambilla G et al.,2009).

En informes anteriores se ha determinado si DRD2 se encuentra sobre expresado en muestras de glioblastoma, y se ha encontrado un aumento de 4 a 17 veces en el ARNm de DRD2 en comparación con tejido cerebral fisiológicamente adecuado por lo que en primera instancia se decidió probar 2 oligos diferentes que codificaban para este mismo, como se muestra en la figura 11, la expresión es mucho mayor con DRD2b por lo que se decidió trabajar con este (Li J et al., 2014).

Para analizar el papel del receptor DRD2 en cuanto a los aspectos de migración y proliferación se decidió utilizar un antagonista de DRD2, el cual fue haloperidol que tiene una constante de inhibición de 2nM, además de esto su principal función es ser utilizado como antipsicótico. Hasta el momento se han observado resultados consistentes antitumorales con diferentes antagonistas de DRD2 entre ellos ONC201, el cual ha demostrado cierta inhibición de la viabilidad celular en líneas celulares de meduloblastoma; la pimozida, provoca la detención del ciclo celular G1

y la apoptosis en células de cáncer de páncreas; la tioridazina, induce la autofagia en células de cáncer de ovario; el penfluridol desencadena la muerte celular autofágica en líneas celulares de carcinoma de células renales (CCR) por medio de la inducción de la respuesta de proteína desplegada desencadenada por estrés del retículo endoplasmático (Prabhu VV et al.,2020; Jandaghi P et al.,2016; Yong M et al.,2017; Tung MC et al.,2022).

El haloperidol se desarrolló en la década de 1950 funcionando prioritariamente como fármaco antipsicótico de primera generación o “típicos”, ya que una de sus características a favor es que puede atravesar la barrera hematoencefálica, donde muchos fármacos contra tumores cerebrales no se han podido implementar por el hecho de no poder cruzar la BHE. Además, su principal diana es el receptor D2 funcionando como antagonista, donde a lo largo de las investigaciones se ha estudiado que los fármacos antipsicóticos de primera generación, incluido el haloperidol, disminuyen la viabilidad de las células neuronales *in vitro*, llegando a iniciar procesos apoptóticos, necróticos y de estrés oxidativo (Gassó P et al., 2012; Brambilla G et al., 2009)

Para analizar los efectos antitumorales del haloperidol que puede tener en las células U-87, específicamente aspectos de proliferación y migración, en el resultado de la figura 12 se observa cómo no hay ningún cambio en las células que fueron tratados con haloperidol.

Cabe destacar sobre lo reportado hasta el momento que el haloperidol ha logrado reducir otros aspectos importantes como la viabilidad respecto a sus controles como en líneas de glioblastoma donde el haloperidol logra disminuir la viabilidad del 50% al 70%. Además, para comprobar que efectivamente el papel que tiene el DRD2 es afectar la proliferación, los autores (Li J et al., 2014) realizaron el silenciamiento de DRD2, lo cual en consecuencia disminuyó el crecimiento de U87-MG entre un 70%-90%. Más aún en otros estudios se ha probado con un agonista de DRD2 (Quinpirol) y efectivamente el efecto que ha tenido en las células es aumentar la proliferación celular (concentraciones de 40mM) (Chiang JY et al.,2022; Li J et al., 2014).

Aunque en los experimentos realizados no se vio ninguna modificación respecto al control, se ha observado que las propias células pueden estar produciendo dopamina por sí mismas provocando algún nivel de agonismo lo que podría haber modificado o alterado el retroceso de la proliferación con el haloperidol como se muestra en la figura 11 (Caragher SP et al.,2019).

Igualmente, en otros artículos para comprobar que los efectos que se producían por los antagonistas que realmente necesitarán de la presencia de DRD2, donde se silenció la expresión del receptor y posteriormente se agregaron antagonistas y agonistas, y como resultado no se observó ningún efecto en la formación de esferoides de las células por lo que esto sugería que es esencial la presencia de DRD2 en procesos proliferativos (Weissenrieder JS et al.,2020).

Otro aspecto que va de la mano es que el haloperidol potenciaría los efectos antitumorales de la temozolomida, la cual es el tratamiento predilecto para glioblastoma, ya que se ha visto que el haloperidol en combinación con TMZ tendría una inhibición más fuerte en cuanto a la proliferación que si solo se administra TMZ, igualmente esto se vio reflejado en el daño del ADN (Chiang JY et al.,2022).

Entonces, hasta el momento, la participación de DRD2 se ha ligado a aspectos tumorigénicos por la activación de ciertas vías de señalización como MAPK/ERK, lo cual podría contribuir a ciertas características tumorigénicas de MAPK de glioblastoma. También en cuanto a aspectos proliferativos se ha mencionado la activación de ERK ya que con antagonistas independientes de DRD2 lograron suprimir la acumulación de p-ERK en células U87-MG, al igual que se puede disminuir aún más su expresión cuando se combina haloperidol con TMZ. (Li J et al.,2014; Chiang JY et al.,2022).

En cuanto a los resultados de migración se observa una disminución de esta con la administración de haloperidol, esto se puede deber a la vía de señalización que sigue el haloperidol ya que al unirse y bloquear los receptores D2, el haloperidol impide la inhibición de la adenilato ciclasa mediada por la proteína Gi. Esto lleva a un aumento de los niveles de AMPc, lo que puede alterar diversas funciones celulares, incluyendo la migración (Ávila et al., 2017).

En cuanto a las vías de señalización relacionadas con la migración celular se encuentra la vía PI3K/AKT y una de sus dianas río abajo es p-GSK3 β , donde a 10 μ M en condiciones sin suero el haloperidol se ha visto en otros estudios que reduce la expresión de este marcador a un 62% respecto al control y eso podría explicar la disminución en la migración causada por el haloperidol (Kim NR et al., 2008).

La vía PI3/AKT comienza comúnmente en la membrana plasmática, donde se activan diversos receptores como tirosina cinasas (RTKs) y los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) son estimulados por factores de crecimiento, hormonas u otros ligandos extracelulares. Posteriormente PI3K es una cinasa que se activa cuando se une a los receptores activados. Una vez activada, la PI3K fosforila al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) para formar fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) (Glaviano A et al., 2023).

PIP3 actúa como un segundo mensajero que recluta proteínas con dominios PH (pleckstrina homóloga) a la membrana plasmática, donde pueden ser activadas. AKT es una serina/treonina cinasa que se activa mediante su reclutamiento a la membrana a través de su dominio PH que se une a PIP3. Una vez en la membrana, AKT es fosforilada y activada por otras cinasas, como PDK1 (fosfoinositida dependiente de la cinasa 1) y mTORC2 (complejo 2 de la diana de rapamicina en mamíferos), donde normalmente en procesos cancerígenos hay alteraciones genéticas en esta vía promoviendo desregulaciones en este caso un aumento en la migración celular (Glaviano A et al., 2023).

AKT también puede activar mTORC1, que regula la síntesis de proteínas y el crecimiento celular. Sin embargo, la señalización anormal a través de mTOR puede desestabilizar el citoesqueleto y reducir la capacidad de las células cancerosas para migrar (Glaviano A et al., 2023).

La señalización a través de los receptores D2 también puede influir en la vía MAPK/ERK. La activación de ERK (quinasa regulada por señales extracelulares) es crucial para la migración celular y la invasión. El bloqueo de los receptores D2 por el haloperidol puede reducir la activación de ERK, disminuyendo así la migración celular (Huang H et al., 2016).

En cuanto a la expresión genética, la inhibición de los receptores D2 puede alterar la transcripción de genes clave implicados en la migración celular. Por ejemplo, la disminución de la actividad de factores de transcripción como NF- κ B y HIF-1 α , que son conocidos por promover la migración y la invasión, puede contribuir a la reducción de la migración celular (Tan Y et al., 2021; Rashid M et al., 2021).

Otro de los procesos presente en el cáncer que se revisó en este trabajo fue el de la transición epitelial-mesenquimal (EMT) con algunos marcadores, en la actualidad la transición epitelial-mesenquimal es un proceso que normalmente se presenta en la diferenciación de células embrionarias, en la pluripotencia inducida, y finalmente en el proceso de células cancerosas (Lamouille S et al.,2014).

En general, las células epiteliales de manera gradual van perdiendo sus uniones intercelulares, así como su adherencia, además de su polaridad apical-basal, cambios en la forma celular, reorganización de la arquitectura del citoesqueleto en conjunto con alteraciones en las vías intracelulares que finalmente modifica la expresión de genes por lo regular provocando una inhibición de los genes que provocan un fenotipo epitelial y una mayor expresión de aquellos que promueven un fenotipo mesenquimal teniendo como consecuencia un aumento en la motilidad de las ahora células individuales, finalmente obteniendo características del propio cáncer como lo es la migración, y proliferación (Lamouille S et al.,2014).

Hay que mencionar que el proceso dentro del glioblastoma se clasificaría como transición proneural-mesénquima (PMT), donde podría estar relacionado con la agresividad del tumor glioblastoma, además que también podría corresponder a una mayor probabilidad de obtener un fenotipo de resistencia a la multiterapia debido a que se encuentra en el glioblastoma un alto grado de heterogeneidad fenotípica inter e intratumoral (Fedele M et al.,2019).

Cabe destacar que el proceso de transición epitelial-mesenquimal es reversible pasando a ser una transición mesenquimal-epitelial (MET) por lo que a partir de esto decidimos probar 2 marcadores: 1 de fenotipo epitelial que fue E-cadherina y el otro de fenotipo mesenquimal α -SMA (Guidalberto M et al.,2023).

En cuanto a la expresión de E-cadherina respecto al control se notó un aumento en su expresión, se relaciona esto directamente con los efectos del haloperidol provocando una regresión en el proceso de transición epitelial-mesénquima funcionando como un posible tratamiento ya que en el transcurso del EMT, cuando ocurre la desestabilización de las uniones adherentes, la cadherina epitelial se escinde en la membrana plasmática y posteriormente se degrada, en consecuencia se reduce la adhesión y aumenta la motilidad celular, además, hay afectaciones en ciertas proteínas como la catenina p120, que se acumula en el núcleo y llega a participar en la transcripción. Por otro lado, la disminución de E-cadherina puede conllevar a un aumento de N-cadherina facilitando la migración celular por lo que es favorable que el haloperidol provoque un aumento en la E-Cadherina (Lamouille S et al.,2014).

En cuanto al marcador α -SMA, se observó una disminución en comparación con el control por lo que ayudaría a promover el fenotipo epitelial aunque su disminución no fue significativa, cuando se desarrolla el cáncer se ha reportado que puede aumentar su expresión debido a factores de transcripción forkhead box (FOX), los cuales se caracterizan por un dominio forkhead de unión al ADN y se encuentra regulado por la vía de señalización TGF β -SMAD, por lo que el tratamiento de haloperidol podría estar teniendo efectos positivos en la regulación de regresión del proceso de transición epitelial-mesénquimal (Lamouille S et al.,2014).

Finalmente, como se mencionó en los resultados, en cierta medida el efecto que provoca el haloperidol puede deberse a la participación del complejo del Factor Estimulador de Colonias tipo 1 (CSF-1) y su ligando por lo que se decidió analizar el nivel de expresión del ARNm que codifica para el ligando del CSF-1 como se muestra en la figura 15, donde se observó una disminución de este respecto al control, pero no de manera significativa.

Hasta el momento se ha ligado a CSF-1 con el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, incluidos el glioblastoma, donde CSF-1 puede contribuir al crecimiento tumoral, ya que se ha observado que los glioblastomas pueden secretar CSF-1 lo que provocaría el reclutamiento y activación de fagocitos mononucleares como la

microglía, en consecuencia, esto puede promover la proliferación, invasión y crecimiento de las células tumorales. Además, la activación de CSF-1 también aumenta la producción de citocinas proinflamatorias (Neal ML et al.,2020).

En varios estudios realizados se ha observado que al inhibir ya sea CSF-1R, el ligando CSF-1 pueden provocar una reducción significativa en la densidad microglial en ratones lo cual igual ayudaría a disminuir las características antes mencionadas como invasión, proliferación, migración, etc ya que en la figura 15 se observa como la expresión de CSF-1 ligando disminuye con el tratamiento de Haloperidol, cabe destacar que CSF-1 está ligado a la vía de señalización NF- κ B por lo que la disminución de la expresión de este marcador podría deberse a la inhibición de NF- κ B (Neal ML et al.,2020; Chiang JY et al.,2022).

Al igual que en otros artículos en la línea celular U-87 de glioblastoma no se encontraron señales de CSF-1R, en los estudios realizados por los autores, mencionan que la inhibición de CSF-1R no tuvo ningún efecto directo en cuanto a la viabilidad de las células de glioma debido a que no lo han expresado (Quail DF et al., 2016).

Además, CSF-1 se encuentra sobre expresado en procesos inflamatorios como lo son las enfermedades neurodegenerativas y en el cáncer, en ciertos estudios se ha observado que la expresión genética de CSF-1 aumentó significativamente en un 26 % en pacientes con enfermedad de Parkinson en comparación con el control y al ser inhibido CSF-1 se logró una atenuación en la neurodegeneración dopaminérgica (Neal ML et al.,2020).

CONCLUSIONES

1. Las células U87-MG expresan el ARNm que codifica para el receptor a dopamina tipo 2 (DRD2).
2. La presencia de haloperidol no afecta la capacidad proliferativa de las células U-87MG.
3. La capacidad migratoria de las células U87-MG se ve afectada negativamente por la presencia de haloperidol.
4. La reducción en la capacidad migratoria de las células U87-MG inducida por haloperidol, probablemente se debe a un incremento en los niveles de expresión del ARNm que codifica para E-cadherina, marcador molecular del fenotipo epitelial.
5. El haloperidol tiende a disminuir los niveles de expresión del ARNm que codifica para el Factor Estimulante de Colonias tipo 1 (CSF-1).

CONCLUSIÓN GENERAL

La progresión tumoral de glioblastoma humano depende al menos parcialmente, de la activación del receptor a dopamina DRD2, ya que, al bloquearlo con haloperidol, se ve reducida de manera significativa la capacidad migratoria de las células U87.

BIBLIOGRAFÍA

American Society of Clinical oncology. Understanding Cancer Risk. 2019

Avila-Rojas H, Pérez-Neri I. Nota científica Dopamina para principiantes Dopamine for beginners. Arch Neurocién (Mex) INNN. 2017

Bahena-Trujillo, R., Flores, G., & Arias-Montaña, J. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. CINVESTAV. 2000. 11(1):39-60

Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB, et al. Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor. Cancer Research. 2006 Aug 15;66(16):7843–8

Barthel L, Hadamitzky M, Dammann P, Schedlowski M, Sure U, Thakur BK, et al. Glioma: molecular signature and crossroads with tumor microenvironment. Cancer and Metastasis Reviews. 2021 Oct 23; 75:41–53

Behling F, Schittenhelm J. Oncogenic BRAF Alterations and Their Role in Brain Tumors. Cancers. 2019 Jun 8;11(6):794.

Brambilla G, Mattioli F, Martelli A. Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotics and antidepressants. Toxicology. 2009 Jul;261(3):77–88.

Broekman ML, Maas SLN, Abels ER, Mempel TR, Krichevsky AM, Breakefield XO. Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. Nature Reviews Neurology. 2018 Aug 1;14(8):482–95

Caragher SP, Shireman JM, Huang M, Miska J, Atashi F, Baisiwala S, et al. Activation of Dopamine Receptor 2 Prompts Transcriptomic and Metabolic Plasticity in Glioblastoma. The Journal of Neuroscience. 2019 Jan 16;39(11):1982–93.

Carnero A, Leonart M. The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution. Inside the Cell. 2015 Dec 9;1(2):96–105

Chen R, Keoni C, Waker CA, Lober RM, Yi Hsien Chen, Gutmann DH. KIAA1549-BRAF Expression Establishes a Permissive Tumor Microenvironment Through NFκB-Mediated CCL2 Production. Neoplasia. 2019 Jan 1;21(1):52–60

Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. Neurotherapeutics. 2017 Mar 9;14(2):284–97

Chiang JY, Lei FJ, Chang HJ, Wei ST, Wang CC, Huang YC, et al. Haloperidol Instigates Endometrial Carcinogenesis and Cancer Progression by the NF-κB/CSF-1 Signaling Cascade. Cancers. 2022 Jun 23;14(13):3089–9.

Ciznadija D, Liu Y, Pyonteck SM, Holland EC, Koff A. Cyclin D1 and Cdk4 Mediate Development of Neurologically Destructive Oligodendroglioma. *Cancer Research*. 2011 Sep 29;71(19):6174–83

Corbet C, Feron O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. *Nature Reviews Cancer*. 2017 Sep 15;17(10):577–93

Dalton SO, Johansen C, Poulsen AH, Nørgaard M, Sørensen HT, McLaughlin JK, et al. Cancer risk among users of neuroleptic medication: a population-based cohort study. *British Journal of Cancer*. 2006 Aug 22;95(7):934–9

Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2011 Apr;508(1):1–12

Fedele M, Cerchia L, Pegoraro S, Sgarra R, Manfioletti G. Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019 Jun 4;20(11):2746.

Galliano D, Docente A, María A, Leone V. Histología y Embriología II Sistema nervioso Central. Instituto Universitario CEMIT. 2014;1-6

Gassó P, Mas S, Molina O, Bernardo M, Lafuente A, Parellada E. Neurotoxic/neuroprotective activity of haloperidol, risperidone and paliperidone in neuroblastoma cells. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2012 Jan 10;36(1):71–7.

Glaviano A, Song A, Julia Y, Kenneth Chun-Yong Yap, Jacot W, Jones RH, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Molecular Cancer*. 2023 Aug 18;22(1).

GLOBOCAN. *Cancer Today*. gco.iarc.who.int. 2020.

Guidalberto Manfioletti, Fedele M. Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT). *International Journal of Molecular Sciences*. 2023 Jul 13;24(14):11386–6.

Guirao O. Revisión acerca del haloperidol, el intervalo QT y efectos secundarios asociados. 2016 Oct.

Groblewska M, Ala Litman-Zawadzka, Mroczko B. The Role of Selected Chemokines and Their Receptors in the Development of Gliomas. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 May 24;21(10):3704–4.

Harvey RA, Ferrier DR. *Lippincott's illustrated reviews : biochemistry*. Baltimore, Md.; London: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

Hospital Ruber Internacional. Glioma de bajo grado: Un tumor cerebral de crecimiento lento que requiere una atención especializada. Quirónsalud. 2023

Huang H, Wu K, Ma J, Du Y, Cao C, Nie Y. Dopamine D2 receptor suppresses gastric cancer cell invasion and migration via inhibition of EGFR/AKT/MMP-13 pathway. *International immunopharmacology*. 2016 Oct 1;39:113–20.

Hsieh, Y. H., Chan, H. L., Lin, C. F., Liang, S. H., Lu, M. L., McIntyre, R. S., Lee, Y., Lin, T. C., Chiu, W. C., & Chen, V. C. (2019). Antipsychotic use is inversely associated with gastric cancer risk: A nationwide population-based nested case-control study. *Cancer medicine*, 8(9), 4484–4496

Jandaghi P, Najafabadi HS, Bauer AS, Papadakis AI, Fassan M, Hall A, et al. Expression of DRD2 Is Increased in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Inhibitors Slow Tumor Growth in Mice. *Gastroenterology*. 2016 Dec;151(6):1218–31.

Jeon HM, Oh YT, Shin YJ, Chang N, Kim D, Woo D, et al. Dopamine receptor D2 regulates glioblastoma survival and death through MET and death receptor 4/5. *Neoplasia*. 2023 May 1; 39:100894

Jones DTW, Bandopadhyay P, Jabado N. The Power of Human Cancer Genetics as Revealed by Low-Grade Gliomas. *Annual Review of Genetics*. 2019 Dec 3;53(1):483–503

Kim NR, Park SW, Lee JG, Kim YH. Protective effects of olanzapine and haloperidol on serum withdrawal-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2008 Apr;32(3):633–42.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [Internet]. 2014 Mar;15(3):178–96.

Li J, Zhu S, Kozono D, Ng K, Diahnn Futalan, Shen YH, et al. Genome-wide shRNA screen revealed integrated mitogenic signaling between dopamine receptor D2 (DRD2) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in glioblastoma. *Oncotarget*. 2014 Mar 2;5(4):882–93.

Missale C, Nash S, Robinson S, Jaber M, Caron M. Dopamine Receptors: from Structure to Function. *Physiological Reviews*. 1998 Jan 1;78(1):189–225

Neal ML, Fleming SM, Budge KM, Boyle AM, Kim C, Alam G, et al. Pharmacological inhibition of CSF1R by GW2580 reduces microglial proliferation and is protective against neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2020 Jan 1;34(1):1679–94.

Ohgaki H, Burger P, Kleihues P. Definition of Primary and Secondary Glioblastoma—Response. *Clinical Cancer Research*. 2014 Feb 20;20(7):2013–3

Olivetti PR, Balsam PD, Simpson EH, Kellendonk C. Emerging roles of striatal dopamine D2 receptors in motivated behaviour: Implications for psychiatric disorders. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2019 Jun 28;126(S6):47–55

Papadopoulos F, Isihou R, Alexiou GA, Tsalios T, Vartholomatos E, Markopoulos GS, et al. Haloperidol Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Glioblastoma Cells. *Biomedicines*. 2020 Dec 11;8(12):595

Pérez-Neri I, Chávez E, Soltero M. Efecto de la DHEA sobre el metabolismo cerebral de la dopamina: Hormonas, estado de ánimo y muerte neuronal. Saarbrücken: Editorial Académica Española; 2015

Pore N, Liu S, Haas-Kogan DA, O'Rourke DM, Amit Ranjan Maity. PTEN mutation and epidermal growth factor receptor activation regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human glioblastoma cells by transactivating the proximal VEGF promoter. *PubMed*. 2003 Jan 1;63(1):236–41

Prabhu VV, Morrow S, Rahman Kawakibi A, Zhou L, Ralff M, Ray J, et al. ONC201 and imipridones: Anti-cancer compounds with clinical efficacy. *Neoplasia*. 2020 Dec;22(12):725–44.

Pyka M, Busse C, Seidenbecher C, Gundelfinger ED, Faissner A. Astrocytes are crucial for survival and maturation of embryonic hippocampal neurons in a neuron-glia cell-insert coculture assay. *Synapse*. 2010 May 4;65(1):41–53

Quail DF, Bowman RL, Akkari L, Quick ML, Schuhmacher AJ, Huse JT, et al. The tumor microenvironment underlies acquired resistance to CSF-1R inhibition in gliomas. *Science*. 2016 May 19;352(6288):aad3018–8.

Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. 2016 Aug 18;353(6301):777–83.

Rashid M, Zadeh LR, Baradaran B, Molavi O, Ghesmati Z, Sabzichi M, et al. Up-down regulation of HIF-1 α in cancer progression. *Gene*. 2021 Sep;798:145796.

Rosas-Cruz A, Salinas-Jazmín N, Velázquez MAV -. Dopamine Receptors in Cancer: Are They Valid Therapeutic Targets? *Technology in Cancer Research & Treatment*. 2021 Jan 1;20:153303382110279.

Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian journal of cancer*. 2016;53(3):441–2

Sim HW, Morgan ER, Mason WP. Contemporary management of high-grade gliomas. *CNS Oncology*. 2018 Jan;7(1):51–65

Sofroniew MV. Astrogliosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014 Nov 7;7(2):a020420

Tan Y, Sun R, Liu L, Yang D, Xiang Q, Li L, et al. Tumor suppressor DRD2 facilitates M1 macrophages and restricts NF- κ B signaling to trigger pyroptosis in breast cancer. *Theranostics*. 2021;11(11):5214–31.

The American Cancer Society. *Cancer Risk and Prevention*. 2017.

Treps L, Perret R, Edmond S, Ricard D, Gavard J. Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2017 Aug 8;6(1):1359479

Tung MC, Lin YW, Lee WJ, Wen YC, Liu YC, Chen JQ, et al. Targeting DRD2 by the antipsychotic drug, penfluridol, retards growth of renal cell carcinoma via inducing stemness inhibition and autophagy-mediated apoptosis. *Cell Death and Disease*. 2022 Apr 23;13(4).

Tyler MW, Zaldivar-Diez J, Haggarty SJ. Classics in Chemical Neuroscience: Haloperidol. *ACS Chem Neurosci*. 2017;8(3):444-453

Venkataramani V, Yang Y, Schubert MC, Reyhan E, Tetzlaff SK, Wißmann N, et al. Glioblastoma hijacks neuronal mechanisms for brain invasion. *Cell*. 2022 Aug;185(16):2899-2917

Verkhatsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiological Reviews*. 2018 Jan 1;98(1):239–389

Warfel NA, El-Deiry WS. p21WAF1 and tumorigenesis. *Current Opinion in Oncology*. 2013 Jan 1 [cited 2021 Jan 10];25(1):52–8

Weissenrieder JS, Neighbors JD, Mailman RB, Hohl RJ. Cancer and the Dopamine D2 Receptor: A Pharmacological Perspective. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [Internet]. 2019 Jul 1;370(1):111–26

Witteler J, Schild SE, Rades D. Palliative Radiotherapy of Primary Glioblastoma. *In Vivo*. 2021;35(1):483–7.

Xie X, West, Xiong L, Wang F. Advanced treatment in high-grade gliomas. *JBUON*. 2019;24(2):424–30

Yong M, Yu T, Tian S, Liu S, Xu J, Hu J, et al. DR2 blocker thioridazine: A promising drug for ovarian cancer therapy. *Oncology Letters*. 2017 Oct 16.