



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE  
POLISACÁRIDOS Y DE LA EXPRESIÓN DE VEGF  
COMO ELEMENTOS DE PATOGÉNESIS EN LA  
HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA EN LA RATA**

Autor:

Lina María Trujillo Rojas

Director y Tutor:

Juan Enrique Rodríguez Gil

Codirectora:

Maria Montserrat Rivera del Alamo

Programa de Doctorado en Medicina y Sanidad Animales

Departamento de Medicina y Cirugía Animales

Facultad de Medicina Veterinaria

Universidad Autónoma de Barcelona







**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

El Dr **Juan Enrique Rodríguez Gil**, catedrático del Departamento de Medicina y Cirugía Animales.

La Dra. **Maria Montserrat Rivera del Alamo**, Profesora Asociada del Departamento de Medicina y Cirugía Animales.

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada *“Estudio de la acumulación de polisacáridos y de la expresión de VEGF como elementos de patogénesis en la hiperplasia prostática benigna en la rata”* presentada por Lina María Trujillo Rojas para optar por el grado de Doctor en Medicina y Sanidad Animal por la Universidad Autònoma de Barcelona, se ha realizado bajo su dirección y, considerándola terminada, autorizan su presentación para ser juzgada por la Comisión correspondiente.

Y para que conste a efectos oportunos, firman el presente documento en Bellaterra, a 21 de julio de 2020.

Juan Enrique Rodríguez Gil

Maria Montserrat Rivera del Alamo



# ÍNDICE

Agradecimientos	7
Listado de Abreviaturas	11
Listado de tablas	15
Listado de figuras	17
Resumen	19
Resum	21
Abstract	23
Introducción	25
Anatomía de la próstata	25
Histología de la Próstata	26
Fisiología de la próstata	28
Alteraciones de la próstata	30
Hiperplasia Prostática Benigna	30
Prostatitis	32
Quistes y abscesos prostáticos	34
Neoplasias prostáticas	35
Técnicas inmunológicas de diagnóstico precoz de las neoplasias prostáticas	36
Antígeno Específico de Próstata	36
Diagnóstico en animales	37
Papel de las citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento en el desarrollo de patologías prostáticas	38
Papel de las alteraciones secretoras y metabólicas en las patologías prostáticas	41
Objetivos	45
Material y métodos	47
Capítulo 1.	47
1.- Animales	47
2.- Preparación de la muestras para tinciones histológicas	48

## Índice

3.- Tinciones histológicas.	48
4.- Técnicas de Inmunodetección	50
5. Análisis Bioquímicos	53
Capítulo 2	55
1. Otras técnicas inmunológicas	55
Análisis estadístico de los resultados	59
Resultados	61
Detección histopatológica de hiperplasia prostática benigna en próstatas de ratas de diferentes edades	61
Variaciones de los niveles de testosterona sérica en grupos de ratas de diferentes edades	63
Detección de contenido polisacárido extraductal en próstatas de ratas de diferentes edades mediante tinción de PAS	63
Liberación de glucosa por parte de extractos prostáticos incubados en presencia de $\alpha$ -amilasa, amiloglucosidasa o N-glucosidasa	66
Expresión intracelular de glucógeno sintasa en tejido prostático de ratas de diferentes edades	67
Cambios relacionados con la edad en la expresión relativa de citoquinas en tejido prostático	68
Diferencias entre ratas púberes y adultas expresión relativa de citoquinas en suero sanguíneo	71
Expresión y localización de VEGF en tejido prostático de ratas de diferentes edades	74
Expresión del receptor de VEGF en tejido prostático de ratas de diferentes edades	75
Discusión	79
Conclusiones	87
Bibliografía	89

## AGRADECIMIENTOS

Además de ser uno de los más leídos, es muy probable que los agradecimientos sean el apartado menos corregido y seguramente la parte más divertida de escribir en una tesis doctoral. Espero recordar y nombrar a todos los que han estado apoyándome aquí o allá.

Quiero empezar por agradecer a mi familia, especialmente a mis papás, a mi hermana y a mis sobrinas, ellos han sido desde la distancia un gran apoyo durante este proceso y por supuesto a lo largo de mi vida. Para poder describir con palabras todo lo que les debo, seguramente necesitaría unas cuantas hojas más y mucho tiempo, pero lo resumiré diciendo que siempre he dado gracias a Dios porque ellos son lo mejor que me ha, de ellos he aprendido muchos valores y la importancia de perseverar y salir adelante con mi trabajo, pues me han enseñado no solo con palabras sino con el ejemplo. Quiero agradecerle a mis papás porque ambos me han enseñado a ser una persona recursiva, a no quedarme quieta esperando que las cosas se solucionen solas, a buscar alternativas, también quiero agradecer puntualmente a mi papá por todas las correcciones que me ha hecho desde que tengo uso de razón, y a mi mamá porque desde pequeña me motivó a desarrollar la motricidad fina haciendo manualidades, porque el trabajo de laboratorio si algo necesita es eso, mimo y curia (como decimos en Colombia), por supuesto, algo de recursividad, a mi hermana por resolver las dudas de inglés y seguir ahí cuando la necesito o cuando no, gracias “sis” y a mi hermano por aparecer de vez en cuando. Aunque sé que mis papás se emocionarán al leer los agradecimientos, estoy segura que encontrarán algún error de gramática o de ortografía que se me pase, aun sabiendo esto, no les pediré que me corrijan nada porque quiero que sea sorpresa.

Para continuar, sabiendo que este proceso habría sido imposible sin mis formadores académicos, creo necesario que sepan que estoy y siempre estaré muy agradecida con ellos, porque cada día de una u otra forma me enseñaron algo, también son un excelente ejemplo de lo que implica ser un buen profesional, profesor, investigador y persona. Gracias Juan Enrique Rodríguez Gil, María Montserrat Rivera del Alamo y Josep María Fernández Novell, espero poder inspirar a otros como ustedes me han inspirado a mí en el camino de la investigación y enseñar, ojalá todo, lo que he podido aprender. Igual que con mis padres, tendría que usar más tiempo y espacio para poder agradecerles todo lo que han hecho por mí y lo que me han enseñado, porque aprender que los resultados no



son los que se espera pero aun así son aprovechables, no es fácil, aprender que un experimento puede salir a la primera pero no a la segunda, tampoco, y que aunque en apariencia algo sea igual, puede ser diferente, en fin, pequeñas cosas de los experimentos que lleva tiempo aprender. Gracias por toda la paciencia, la dedicación, y el cariño que han puesto al enseñarme, a Juan Enrique por enseñarme a tener la mente abierta, aunque me cueste, a Montse por cada especificación y corrección y a Josep María porque además de ayudarme a entender temas de ciencia, me ha enseñado probablemente sin darse cuenta, muchas formas de enseñar.

También quiero darles las gracias a todos los que en algún momento se cruzaron por el laboratorio y me aportaron, ya fuera conocimiento o un momento de risa, intentaré hacerlo en orden cronológico para no dejar a nadie por fuera. Gracias a Olga Blanco Prieto por el apoyo moral, la ayuda en algún experimento en el que nos pudimos cruzar y por muchas cosas más, en muy resumidas cuentas por todo y por más. Gracias también a todos los que hacen parte de la unidad de reproducción, a Alex, Teresa Rigau, Teresa Mogas, Jordi Miró, María Jesús Palomo, y a los becarios que en algún momento me he cruzado, a Linda, Jaime, Sabrina, Sebastián, Tania, Iris, Alina e Ivan, aunque solo pudiéramos compartir poco tiempo, para mí ha sido muy grato conocerlos a todos.

Igualmente quiero agradecer a todos los de la UB que en algún momento se cruzaron por mi camino, a Jessica Hernández, porque aprender a hacer las inmunos habría sido muy aburrido estando sola, a Manel Bosch porque a pesar de tener muy poco tiempo, se le da bien explicar, a Jordi Fernández y a Carmen Zaragoza, porque pasando por la UB sin ser del laboratorio, me animó muchos días pesados. Gracias por su puesto a María Martín porque además de resolver algunas de mis “dudas bioquímicas” ¿Qué sería de mí sin su compañía y ayuda para medir proteína y glucosas? A mi vecino de laboratorio, Alejandro Delgado, por ser el mejor vecino de todos, a Marcos, a Laura Salomó, a Marta Montori, porque aunque fue muy poco tiempo (por culpa de la COVID-19 fue menos), pude aprender algún truco más para hacer Western Blotting. Aunque probablemente no leerán esto, quiero agradecer a Tony por los cafés, por su ayuda desinteresada y uno que otro rato de charla que iba muy bien para desestresarme y liberar tensiones acumuladas, a Marc y a Jessica por todas las risas. También quiero agradecer muy especialmente a Raquel, por tener siempre tan buena disposición para solucionar cualquier inconveniente, ya fuera con un pedido, un atasco de la máquina de revelado o buscarme cosas en el laboratorio en plena pandemia.

A pesar de que no estaban en el laboratorio, quiero agradecer a esos personajes “externos” que por su implicación personal me han ayudado a culminar esta etapa académica, aportando cada uno algo, Ángel Luis por ejemplo, además de compartir buenos momentos, me ha aguantado tristezas, frustraciones, estrés y demás sentimientos que afloran cuando se hace una tesis, y por supuesto me ha apoyado mucho, así que por todo eso y por más, gracias!, a Maria Jesús, Jose, Marcos, Puri, Angel, Tania, las Anas y Bastián. A Edison de Jesús Molina Díaz, por poner la nota de humor y mantenerme conectada con la clínica, porque a pesar de estar al otro lado del charco, gracias al whatsapp sigue estando a mi lado, y a Don José Gregorio Hernández porque estoy segura que me ha ayudado en todo lo que ha podido. A Carmen L. Manuelian que además de escucharme, hacerme reír y ser una más de “la familia escogida”, me ha dado consejos muy útiles, a Carmen, Azar, Asaduhí, Ximena y Eugenia, por todo el cariño y los buenos momentos, y claro, a Tina y a Bakunin que aunque no puedan leer, seguro que saben que les agradezco cada tristeza que me han quitado con los besitos que me han dado. También quiero agradecerles a todos mis amigos y a todos los que en algún momento me apoyaron o ayudaron para iniciar este doctorado o durante su curso, así que a los Diegos, Ricardo, Mirian y Fabián, Fernando y Rocío, José António, Cesar y Laura, José Florez, Diego Toro, Josep María Marimon, Julián Ruiz, Marlen, Harvey Lozano, Vladimir Galindo, Elena Jaramillo, Nelly, Ana María, Leidy, Eduardo Rozo y Pedro Pablo. Espero no haber dejado de nombrar a nadie, en todo caso y por si acaso, gracias a todos mis amigos y a los que en algún momento han sido mis profesores, compañeros de trabajo, estudio o laboratorio, en esta frase, seguro entran todos.

Y aunque lo dejé de último, es el más importante. Gracias a Dios por haber puesto a todas estas personas en mi camino, por haberme dado la familia que me dio, con la que nací y la que he adquirido durante estos años, porque los amigos, son la familia que escogemos.

Gracias a todos!!!



## LISTADO DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	Adenosina Difosfato
AEP/PSA	Antígeno Especifico de Próstata
ATP	Adenosín Trifosfato
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CC	Quimioquinas β
CD	Cúmulo de Diferenciación
CGRP	Péptido Relacionado con la Calcitonina
CINC	Molécula Quimioatrayente de Neutrófilos Inducida por Citoquina 1
CINC/CXCL	Ligando de Quimioquina
CNTF	Factor Neurotrófico Ciliar
COVID-19	Enfermedad por Coronavirus 2019
CPSE	Esterasa de Arginina Específica de Próstata Canina
CXC	Quimioquinas α
CX	Quimioquinas δ
DAB	3-3' diaminobenzidina
DPX	Resina Acrílica con base de Xileno
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N' tetraacético
ELISA	Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas
<i>Enterococci spp</i>	Varias especies de <i>Enterococcus</i>
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
G6PDH	Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa
GM – CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
GM130	Proteína de la Matriz de Golgi de 130 kDa
h	Horas
H&E	Hematoxilina/Eosina
H+	Ion Hidrogeno
HCl	Ácido Clorhídrico
HK	Hexoquinasa
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna

## Listado de Abreviaturas

HRP	Peroxidasa de Rábano Picante
ICAM	Molécula de Adhesión Intracelular
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IGF	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina
IL	Interleuquina
kDa	KiloDalton
KPV	Kilogramos de Peso Vivo
LIX	Quimioquina Inducible por Lipopolisacarido
M	Molar
MCP	Proteína Quimioatrayente de Monocitos
mg	Miligramo
MIP	Proteína Inflamatoria de Macrófagos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteasa de Matriz
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensajero
N <sub>2</sub>	Nitrógeno
NAD/NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
Ng	Nanogramo
NIH	Instituto Nacional de Salud
NPY	Neuropéptido Y
NRP	Neurofilina
OCT	Temperatura Óptima de Corte
PA	Próstata Anterior
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PAP	Fosfatasa Ácida Prostática
PAS	Ácido Periódico/Schiff
PBS	Tampón Fosfato Salino
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
pH	Potencial de Hidrogeniones
PL	Próstata Lateral
PIGF	Factor de Crecimiento Placentario
PMSF	Fluoruro de Fenilmetil Sulfonilo
Prolactin R	Receptor de Prolactina
PV	Próstata Ventral
r.p.m.	Revoluciones por Minuto
RA/AR	Receptores de Andrógenos
RAGE	Receptor de Productos Terminales de Glucosilación Avanzada

RIPA	Tampón de Radioinmunoprecipitado
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SDS	Dodecilsulfato Sódico
SEM	Error Estándar de la Media
SP	Sustancia P
SV-F	Factor de Veneno de Serpiente
TA	Temperatura Ambiente
TCK	Quimioquina de Timo
TG	Transportadores de Glucosa
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante beta
TIMP	Inhibidor Tisular de Metaloproteinasa
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
U	Uretra
UAB	Universidad Autónoma de Barcelona
UI	Unidades Internacionales
V	Voltios
v:v	Ratio volumen: volumen
VEGF	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
VEGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Vascular endotelial
VIP	Polipéptido Intestinal Vasoactivo
VPF	Factor de Permeabilidad Vascular
VS	Vesícula Seminal
VU	Vejiga Urinaria
w:v	Ratio peso: volumen
WGA	Aglutinina de germen de trigo



## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las prostatitis según los NIH	32
Tabla 2. Niveles representativos en la próstata de citrato y zinc	41
Tabla 3. Secuencia de deshidratación de muestras prostáticas para su uso en histología	47
Tabla 4. Secuencia de incubación de los tejidos utilizados para la tinción de Hematoxilina/Eosina	48
Tabla 5. Secuencia de incubación de los tejidos utilizados para la tinción de PAS	49
Tabla 6. Expresión relativa de un panel de citoquinas determinado mediante mini-arrays en tejido prostático de rata	69
Tabla 7. Expresión relativa de un panel de citoquinas determinado mediante mini-arrays en suero de rata.	72





## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Próstata de Rata de 6 meses	23
Figura 2. Esquema de la próstata en vista ventral, dorsal y lateral	24
Figura 3. Esquema de la membrana y descripción de las proteínas específicas detectables en el mini-array	54
Figura 4. Tejido prostático de ratas de 1 mes, 6 meses y 12 meses teñidos con la técnica H&E	60
Figura 5. Niveles de testosterona sérica en ratas de 1 mes, 3 meses, 6 meses y 12 meses de vida	61
Figura 6. Tejidos prostáticos de ratas de diferentes edades teñidos con la técnica de PAS	62
Figura 7. Tejidos prostáticos de ratas de 3 meses de edad preincubados con $\alpha$ -amilasa o amiloglucosidasa en presencia o ausencia de proteinasa K y posteriormente teñidos con la técnica de PAS	63
Figura 8. Liberación de glucosa por parte de extractos prostáticos incubados con $\alpha$ -amilasa, amiloglucosidasa o N-glucosidasa	64
Figura 9. Inmunolocalización de glucógeno sintasa en ductos prostáticos de ratas de 1 mes, 6 meses y 12 meses de vida	65
Figura 10. Expresión relativa de agrina, PDGF-AA, TIMP-1 y VEGF-A determinado mediante mini-arrays en tejido prostático de rata	66
Figura 11. Mini arrays representativos de extractos de tejido prostático de ratas de 1 mes, 3 meses, 6 meses y doce meses de vida	67
Figura 12. Expresión relativa de agrina, PDGF-AA, TIMP-1 y VEGF-A determinado mediante mini-arrays en suero de rata	69
Figura 13. Mini arrays representativos de sueros sanguíneos de ratas de 3 meses (3 meses) y doce meses de vida (12 meses)	70
Figura 14. Expresión de VEGF-A en Tejidos prostáticos de ratas de diferentes edades	72
Figura 15. Expresión del receptor de VEGF en tejidos prostáticos de ratas de diferentes edades	73
Figura 16. Inmunohistoquímica para el VEGF en tejido prostático de rata prepúber y de 12 meses de edad	75
Figura 17. Colocalización de VEGF con la red de actina y el aparato de Golgi en ratas de 12 meses	76



## RESUMEN

Esta Tesis Doctoral se centró en el estudio de alteraciones ligadas a cambios en el contenido intraluminal y en la expresión y localización de citoquinas y quimoquinas en la próstata de ratas sanas y afectadas por hiperplasia prostática benigna asociada con la edad (HPB). Los resultados mostraron que la aparición de la HPB era paralela a un incremento en un contenido intraductal PAS+. Este contenido estaba formado mayoritariamente por polisacáridos poco ramificados, con presencia mayoritaria de enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos. Por otra parte, también se observó un incremento en la expresión intracelular del enzima glucógeno sintasa en algunas células ductales, lo que sugiere una alteración global en el metabolismo del glucógeno ductal. El estudio de expresión de citoquinas y quimoquinas mediante mini-arrays mostró que la instauración de la pubertad está cronológicamente relacionada con una disminución generalizada en la expresión prostática de un gran número de estos factores, si bien algunas de estas proteínas vuelven a incrementar sus niveles a partir de los 6 meses de vida. Por otra parte, la aparición de HPB fue paralela a un incremento en la expresión prostática de un grupo reducido de citoquinas y quimoquinas, entre las que destacan el PDGF, el TIMP-1 y el VEGF. Al comparar el panel de expresión prostático y sérico de citoquinas y quimoquinas en ratas de diferentes grupos de edad apenas se observaron proteínas que sufrieran variaciones equivalentes, siendo la única excepción el VEGF. Finalmente, centrándonos en el VEGF, se pudo determinar que el incremento observado en su expresión tanto mediante miniarrays como por Western blotting se relacionaba con la aparición de niveles significativos citoplásmicos de VEGF en las células prostáticas, apareciendo asimismo un incremento en el procesamiento post-traducciona l de la proteína a través de su paso por el aparato de Golgi. Estas alteraciones fueron concomitantes con un incremento significativo en la expresión del receptor de VEGF. Así pues, como conclusión de estos resultados se podría inferir que el inicio de la HPB está más relacionado con cambios en los procesos de angiogénesis prostática que en mecanismos inmunitarios “per se”. Además, los resultados también sugirieron la posibilidad de estudiar el patrón de expresión sérica de VEGF como un posible marcador de HPB en rata.



## RESUM

Aquesta Tesi Doctoral es va centrar en l'estudi de les alteracions lligades a canvis en el contingut intraluminal i en l'expressió i localització de citoquines i quimoquines a la pròstata de rates sanes i afectades per hiperplàsia prostàtica benigna associada amb l'edat (HPB). Els resultats van mostrar que l'aparició de la HPB era paral·lela a un increment en un contingut intraductal PAS+. Aquest contingut estava format majoritàriament per polisacàrids poc ramificats, amb presència majoritària d'enllaços  $\alpha$ -1,4 glucosídics. D'altra banda, també es va observar un increment en l'expressió intracel·lular de l'enzima glicogen sintasa en algunes cèl·lules ductals, el que suggereix una alteració global en el metabolisme del glicogen ductal. L'estudi d'expressió de citoquines i quimoquines mitjançant mini-arrays va mostrar que la instauració de la pubertat està cronològicament relacionada amb una disminució generalitzada de l'expressió prostàtica d'un gran nombre d'aquests factors, malgrat que alguns d'ells tornen a incrementar els seus nivells a partir dels 6 mesos de vida. A més a més, l'aparició de HPB fou paral·lela a un increment de l'expressió prostàtica d'un grup reduït de citoquines y quimoquines, entre las que destaquen el PDGF, el TIMP-1 i el VEGF. Quan es van comparar el panell de expressió prostàtic i sèric de citoquines i quimoquines en rates de diferents grups d'edat pràcticament no es van observar proteïnes que patissin variacions equivalents, essent-ne l'única excepció el VEGF. Finalment, centrànt-se en el VEGF, es va poder determinar que l'incremento observat en la seva expressió tant mitjançant miniarrays como per Western blotting es relacionava amb l'aparició de nivells significatius citoplàsmics de VEGF en les cèl·lules prostàtiques, apareixent també un increment en el processament post-traducciona de la proteïna a través del seu pas per l'aparell de Golgi. Aquestes alteracions van ser simultànies amb un increment significatiu en l'expressió del receptor de VEGF. Per tant,, como a conclusió d'aquests resultats es podria inferir que l'inici de la HPB està més relacionat amb canvis en els processos de angiogènesi prostàtica que en mecanismes immunitaris "per se". Endemés, els resultats també van suggerir la possibilitat d'estudiar el patró d'expressió sèrica de VEGF com un possible marcador de HPB en rata.



## ABSTRACT

This PhD dissertation was centred on the study of the alterations in both the intra-luminal content and the cytokines and chemokines expression in prostates from healthy rats and also from individuals affected by age-related benign prostatic hyperplasia (BPH). Our results showed that the onset of BPH was concomitant with an increase in the PAS+ intraductal prostatic content. This content was mainly composed by low branched polysaccharides, which showed high levels of  $\alpha$ -1,4 glycosidic bonds. Otherwise an increase in the intracellular glycogen synthase expression was also observed in some ductal cells. This would suggest a putative alteration of the whole glycogen metabolism in prostate ducts associated with the appearance of the BPH. The analysis of the expression of prostate cytokines and chemokines through a miniarray system showed that the onset of puberty was parallel to an overall decrease in the expression of the analyzed factors, although there was a partial recovery from age 6-months old onwards. The appearance of BPH was also parallel to an increase of a low number cytokines/chemokines, namely PDGF, TIMP-1 and VEGF. When comparing the expression panel the analyzed cytokines and chemokines of prostate extracts against those from blood serum only the VEGF underwent parallel changes in both samples. Finally, the observed BPH-concomitant increase of prostate VEGF expression, which was confirmed through both miniarrays and Western blotting, was parallel with the appearance of significant intracytoplasmic levels of VEGF that were accompanied with an increase in the post-translational processing of this protein through the Golgi apparatus. These changes were concomitant with a significant increase in the expression of the ductal VEGF receptor. In this manner, as a conclusion, the obtained results would suggest that the BPH onset in rats would be more related with alterations in the regulation of prostate angiogenesis than in the launching of intrinsic immunitary reactions. Furthermore, results also suggest the possibility to utilize VEGF serum levels as an useful putative marker for BPH in rat.



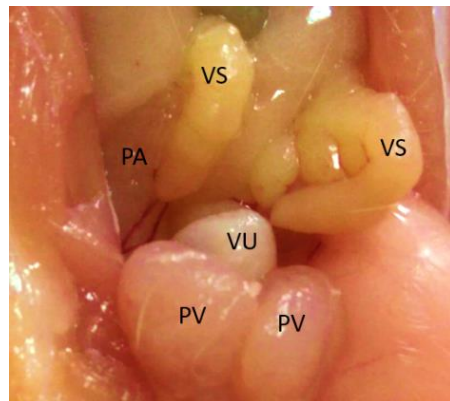


## INTRODUCCIÓN

La próstata es, en muchas especies de mamíferos, la principal glándula accesoria del sistema reproductivo de los machos (1-3), aunque no es exclusiva de estos, pues se ha descrito su presencia en algunas hembras de roedores como la rata y el ratón, así como en mujeres (4,5). La próstata es una glándula altamente especializada cuya función principal es la secreción de fluido prostático. Este fluido constituye un componente importante del plasma seminal (6), aportando también iones y proteínas al líquido seminal (7). En las ratas, también actúa como tapón vaginal, evitando el desplazamiento retrógrado del semen cuando el cérvix de la hembra se relaja, gracias a la presencia de las proteínas provenientes de la vesícula seminal, que una vez eyaculadas, son coaguladas por las transglutaminasas que secreta el lóbulo anterior de la glándula prostática o glándula coagulante (8).

### Anatomía de la próstata

Si bien la anatomía de la próstata varía con cada especie, por lo general se encuentra en una posición ventral o dorsal a la vejiga, frente al recto (9-11). A pesar de las analogías en cuanto a la morfogénesis en diferentes especies, la variabilidad de su anatomía entre los mamíferos es notable. Así, en primates, perros y caballos entre otros, es una glándula compacta y bilobulada (1-3,12), mientras en la rata (Figura 1), en la que inicialmente se describieron tres lóbulos (13), actualmente se describen cuatro lóbulos al igual que en el ratón y en otros roedores (1).



*Figura 1. Próstata de Rata de 6 meses. VS: Vesícula Seminal, PA: Próstata Anterior, VU: Vejiga Urinaria, PV: Próstata Ventral.*

Es importante describir detalladamente la anatomía prostática de la rata, ya que es un poco más compleja que la de otros mamíferos. Como ya se ha mencionado, la próstata de los roedores está compuesta por cuatro lóbulos pares (cada uno de los cuatro lóbulos

consta de una parte derecha e izquierda): lóbulos ventrales, lóbulos laterales, lóbulos dorsales y lóbulos anteriores, todos originados en el seno urogenital (9). Los lóbulos que se encuentran en posición dorsal y lateral, comúnmente conocidos como próstata dorsolateral (Figura 2, C), se ubican a lo largo de la uretra formando una sola masa macroscópica (10). La próstata anterior consta de (Figura 2, A y C) dos lóbulos delgados y tubulares que están adheridos a las vesículas seminales (13). Por último, la próstata ventral (Figura 2, A, B, C) surge del aspecto ventral de la uretra, inmediatamente debajo de la vejiga. Son los lóbulos de mayor tamaño, constituyendo aproximadamente la mitad de la masa de todo el tejido prostático, y son los que se separan más fácilmente del resto de la próstata (11).

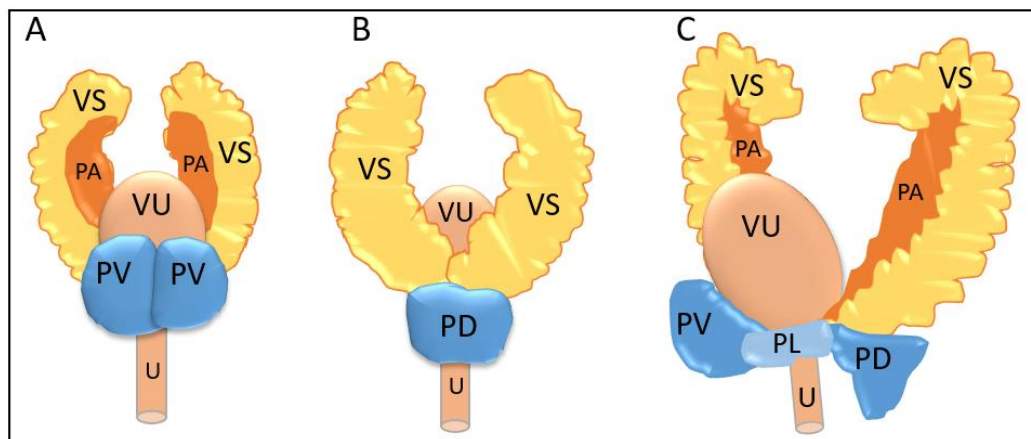


Figura 2. Esquema de la próstata en vista ventral (A), dorsal (B) y lateral (C). VS = Vesícula Seminal, PA = Próstata Anterior, VU = Vejiga Urinaria, PV = Próstata Ventral, PL= Próstata Lateral U= Uretra.

## Histología de la Próstata

En términos histológicos, la próstata consta de una serie de unidades túbulo-alveolares rodeadas por una capa de músculo liso o mioepitelio conocidas como acinos o alveolos (10). Estos acinos contienen células estromales, células de músculo liso, vasos, nervios, macrófagos y mastocitos. El estroma acinal, a su vez, está formado por células secretoras luminales, células basales no secretoras (correspondientes al 2% de las células acinares) y un bajo número de células neuroendocrinas (11). Sin embargo, cada par de lóbulos tiene unas características diferenciales que vale la pena describir (10).

La próstata ventral se subdivide en dos lóbulos compuestos principalmente de epitelio cuboidal con una serie de conductos que drenan hacia la uretra. Los acinos de la próstata ventral tienen una gran cantidad de los denominados en inglés “infoldings”, proliferaciones digitiformes o papilares particularmente abundantes en los acinos periféricos, que son más pequeños y complejos que los centrales. El epitelio de estos acinos periféricos es basófilo y en su mayoría columnar, con algunas células cuboidales cuyo núcleo tiene una localización basal y el área clara ubicada en posición supranuclear correspondiente al aparato de Golgi. La secreción de los acinos de los lóbulos ventrales es pálida y ligeramente eosinófila (6,13).

Los lóbulos laterales también están unidos a la uretra por tejido conectivo y una serie de ductos. Los acinos son generalmente más grandes y de tamaño variable. Estos lóbulos están dispuestos libremente dentro del estroma de soporte. Las células del epitelio cuboidal o columnar de los acinos contienen un núcleo ubicado en una localización central y también un área clara supranuclear. Las secreciones que se encuentran en la luz de estos acinos se tiñen más intensamente con eosina (6,10,13).

Los lóbulos dorsales se ubican ventral y caudalmente a la unión de la vesícula seminal y la glándula coagulante, rodeando la uretra dorsalmente. Están adheridos a la uretra por tejido conectivo y conductos. Los acinos de los lóbulos dorsales son más grandes y menos complejos que los ventrales o que los laterales, se distribuyen laxamente en el tejido estromal y están revestidos principalmente con células cuboidales cuyos núcleos están ubicados centralmente. Las células acinares tienen un área supranuclear clara, tal como ocurre en el epitelio de los lóbulos laterales y ventrales. Las secreciones acinares de los lóbulos dorsales toman una coloración de intensidad intermedia entre la de los lóbulos laterales y ventrales (6,13).

Los lóbulos anteriores (o glándulas coagulantes) son estructuras tubulares delgadas que se encuentran a lo largo de los márgenes laterales de las vesículas seminales, a las que están estrechamente unidas (10). Histológicamente, se puede observar un revestimiento epitelial, con una secreción menos eosinofílica que la observada en las vesículas seminales. Las secreciones de los conductos al ser teñidas con hematoxilina eosina presentan una apariencia agrietada. Las paredes presentan una gran cantidad de pliegues enrevesados (13).

El estroma de todos los lóbulos prostáticos consiste en una variedad de elementos tisulares que incluyen material extracelular, pequeñas terminaciones nerviosas, vasos sanguíneos, material fibromuscular y fibroblastos (6,11,13).

## Fisiología de la próstata

La próstata tiene como función principal la producción de sustancias importantes para el mantenimiento y desarrollo de la funcionalidad espermática, con el fin de que los espermatozoides puedan llegar a su estado de plena capacitación en el momento de la fecundación en el tracto reproductivo femenino. Para poder desempeñar esta tarea, la función prostática está regulada por mecanismos neuronales y hormonales (14).

En cuanto a los mecanismos neuronales, se sabe que la próstata alberga una cantidad importante de células neuroendocrinas cuyo origen y papel funcional aún necesitan ser esclarecidos. Se sabe que estas células sintetizan y liberan sustancias neurosecretoras (serotonina, neuropéptidos), teniendo actividad reguladora sobre el crecimiento, la diferenciación celular y la secreción (15). De estos factores neuroendocrinos, el más abundante es la serotonina, que en estudios recientes ha demostrado ser un potente inhibidor del crecimiento prostático a través de la regulación por disminución de los receptores de andrógenos (16). Por otra parte, el sistema nervioso autónomo también parece ser relevante en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la próstata. De hecho, la transducción de la señal neurotransmisora podría modular el crecimiento y la fisiología de la glándula prostática, y se ha observado que la denervación experimental causa la pérdida de la función prostática y su atrofia (15).

Además de la innervación catecolaminérgica y colinérgica, se ha descrito una amplia variedad de fibras peptidérgicas en la glándula prostática, como las neuronas secretoras de neuropéptido Y (NPY), de polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) o de sustancia P (SP), así como nervios sensibles al péptido relacionado con la calcitonina, CGRP. Aunque todo parece indicar que los neuropéptidos pueden estar implicados en la fisiología de la próstata, el papel de la innervación peptidérgica en la función de la próstata aún no está bien descrito (15). Los hallazgos de receptores colinérgicos y adrenérgicos en próstata de humanos, y la presencia de terminaciones nerviosas autonómicas, sugieren un papel de la

inervación en la homeostasis, crecimiento y función de la próstata (15). En este sentido, algunos neuropéptidos como el VIP, podrían estar implicados en la proliferación epitelial de acinos prostáticos y varias investigaciones están relacionando la inervación peptidérgica y las interacciones neuroepiteliales con patologías prostáticas como el cáncer o la hiperplasia prostática benigna. En cuanto a la regulación hormonal de la próstata, su desarrollo y función están reguladas por andrógenos. De hecho, la muerte de las células del epitelio prostático después de la castración es un ejemplo clásico de apoptosis y se considera como una respuesta directa de la caída de los niveles de andrógenos (17). En el hombre, se ha demostrado que dentro del control endocrino de la próstata, la liberación de prolactina (PRL) es importante para el desarrollo y crecimiento normal de la próstata, así como la producción de citrato por parte de las células epiteliales de la próstata (18). Por otro lado, los esteroides se han considerado una parte esencial de la endocrinología de la próstata (7) y tienen un papel clave en el hombre adulto en el mantenimiento de funciones necesarias para el comportamiento sexual y la reproducción (19).

Las respuestas prostáticas a los andrógenos están mediadas por la amplia distribución de receptores de andrógenos (RA) en células epiteliales, músculo liso y células estromales (20). En este sentido, se ha demostrado que el complejo andrógeno-receptor se transloca al núcleo para regular la transcripción génica y que los andrógenos producen un aumento tanto en el nivel como en la vida media de los RAs. Sin embargo, la modulación de los niveles de andrógenos y sus receptores en la próstata en sujetos sanos con una vida sexual constante sigue siendo desconocida (14).

El comportamiento sexual de las ratas macho sigue un patrón estereotipado bien conocido en el que los machos realizan varias montas y penetraciones antes de la eyaculación. Todos estos eventos ocurren de manera recurrente, de tal manera que el macho puede lograr varias eyaculaciones en un solo encuentro sexual. Se ha observado que después de 4 eyaculaciones consecutivas hay efectos fisiológicos importantes en la próstata ventral. Dichos efectos fisiológicos se dividen en dos tipos dependiendo de la rapidez de respuesta a las eyaculaciones: cambios de respuesta rápida y cambios de respuesta progresiva. Los cambios de respuesta rápida fueron inducidos como resultado del comportamiento, que involucra un incremento y disminución de los receptores de andrógenos después de 1 y 4 eyaculados respectivamente. Por otro lado, la respuesta progresiva aparece en forma de elevación de los niveles de mRNA prostático para receptores de andrógenos que también

mostraron un rápido descenso después de 4 eyaculados. Todos estos cambios en la próstata ocurren en presencia de incrementos sostenidos de los niveles séricos de testosterona que se inician después de dos eyaculados. En su conjunto, estos cambios sugieren nuevamente que los mecanismos nerviosos tienen un papel clave en la fisiología prostática durante el comportamiento sexual en machos (14).

## Alteraciones de la próstata

Las alteraciones más importantes de la próstata aparecen ligadas al envejecimiento. Las más destacadas entre ellas son la hiperplasia prostática benigna, la prostatitis, los abscesos prostáticos y las neoplasias. Todas estas patologías afectan a diferentes especies estando ampliamente descritas en el perro, el hombre y la rata (10,21,22). Este hecho ha llevado a diferentes grupos de investigación a realizar estudios comparativos entre especies con la intención de encontrar un modelo animal idóneo para el estudio de cada una de las alteraciones prostáticas.

## Hiperplasia Prostática Benigna

La hiperplasia prostática benigna (HPB) es una enfermedad progresiva compleja que en hombres se acompaña de diversas alteraciones clínicas relacionadas con patologías de las vías urinarias bajas (23). El desarrollo natural de esta patología ha sido descrito también en ratas, chimpancés, perros y ratones (24,25). En las ratas, cuando se desarrolla de manera espontánea, afecta a la próstata ventral, mientras que cuando se induce con agentes químicos afecta a la próstata dorsolateral (6,10). Los conductos prostáticos pueden afectarse ocasionalmente. La lesión consiste en proliferaciones epiteliales que no obliteran la luz alveolar. Estas proliferaciones pueden presentarse en uno, dos o tres alveolos sin afectar a los adyacentes. Se pueden encontrar además formaciones hiperplásicas papilares. Las transiciones graduales ocurren desde el epitelio completamente normal a través de células epiteliales columnares cada vez más altas, a las áreas hiperplásicas focales con atipia celular y crecimiento cribiforme. También se pueden encontrar cambios abruptos del epitelio normal al hiperplásico y por lo general no hay células inflamatorias en o alrededor de la lesión, no hay formación de cápsula o compresión y la arquitectura de los lobulillos no se altera (6,26).

Las lesiones típicas de la HPB suelen ser multifocales y no ocurren en una localización específica en el lóbulo ventral. En áreas de transición de epitelio normal a hiperplásico, se encuentra un epitelio columnar anormalmente alto con citoplasma hipereosinófilico, mientras que el ubicado en la zona basal presenta a menudo núcleos hipercromáticos. También se pueden encontrar zonas de dos capas de núcleo en las zonas de transición. En zonas de hiperplasia se pueden encontrar epitelios de un grosor de 3 a 5 capas de células. La tendencia de estas células hiperplásicas a formar patrones cribiformes es característica de estas lesiones (6). Las células presentan a menudo pérdida de la polaridad celular (6,26). Su citoplasma suele estar algo hipocromático con núcleos hipercromáticos y ocasionalmente tienen nucléolos prominentes. Las células tienen una relación citoplasma/núcleo a menudo aumentada en comparación con el epitelio normal. En la mayoría de los casos hay un mínimo de pleomorfismo celular y nuclear. También aparecen figuras mitóticas ocasionales. Finalmente, se han descrito al mismo tiempo displasia focal y metaplasia escamosa en áreas hiperplásicas (6).

La hiperplasia de la próstata dorsolateral a diferencia de la hiperplasia de la próstata ventral, no está bien definida como entidad y no se ha documentado que ocurra de manera espontánea. Este tipo de hiperplasia se presenta tras realizar tratamientos con carcinógenos químicos y las lesiones se han clasificado como hiperplasia focal o atípica (6). Aunque la HPB histológicamente corresponde a una proliferación no maligna y no regulada de células tanto estromales como epiteliales de la próstata (27), suele presentarse en machos de mediana o avanzada edad como es el caso del perro, el humano y las ratas, siendo destacable que tanto en la rata como en el humano se ha demostrado la presencia de HPB como lesión preneoplásica, a diferencia del perro en el que la HPB no parece preceder la presentación de cáncer (21).

La HPB se ha descrito desde hace muchos años como una enfermedad multifactorial en la que se han planteado varias teorías sobre las posibles causas. Entre estas, se encuentran los andrógenos, estrógenos, interacciones epitelio-estroma, factores de crecimiento, neurotransmisores, oxidoreductasa, procesos inflamatorios y obesidad entre otros (28-30), ya sea como causa única o como parte de la etiología del proceso hiperplásico. Sin embargo, la inflamación prostática como factor desencadenante de la hiperplasia prostática benigna ha cobrado importancia desde hace algunos años (28,31,32), y esta



## Introducción

hiperplasia también se ha descrito como un posible factor predecesor al desarrollo de cáncer de próstata tanto en la rata como en el humano (21).

En cuanto a los andrógenos, hasta ahora los datos indican que estos son necesarios pero insuficientes por ellos mismos para inducir HPB (29). Sin embargo, la inflamación, un hallazgo comúnmente reportado en la HPB (33), se está considerando no sólo un evento ocasional o concomitante que acompaña la HPB, sino como un factor importante en el desarrollo de la etiología (28,32).

Aunque aún no se entienden por completo las vías de la inflamación prostática, la evidencia acumulada sugiere que los procesos inflamatorios que afectan tanto a la próstata como a la vejiga parecen desempeñar funciones esenciales en el desarrollo y mantenimiento del crecimiento de la próstata y las patologías del tracto urinario bajo. Los procesos inmunológicos y la inflamación tienen un papel en la patogénesis como posibles desencadenantes de la progresión de la enfermedad prostática. En ese sentido, la actividad de las células T en los infiltrados inflamatorios provocaría la estimulación de la proliferación de células estromales y epiteliales a través de un mecanismo autoinmune. El daño tisular y el posterior proceso crónico de curación repetitiva de heridas inducida por la inflamación terminan en el desarrollo de nódulos de HPB (31).

## Prostatitis

La prostatitis se define como la inflamación de la próstata (34). Se da de manera espontánea en el hombre y en la rata. En las dos especies presenta una gran similitud histopatológica, estando su presentación relacionada con la edad (35,36).

En el hombre, la prostatitis se clasifica en cuatro grandes categorías, prostatitis aguda de origen bacteriano (I), prostatitis crónica de origen bacteriano (II), síndrome de dolor crónico pélvico (III) y prostatitis inflamatoria asintomática (IV). A continuación se describen las diferentes categorías de acuerdo al baremo establecido por los "National Institutes of Health" (NIH; ver Tabla 1) (37,38).

Tabla 1. Clasificación de las prostatitis según los NIH (37)

Categoría	Nombre	Características
I	Prostatitis bacteriana aguda	Infección bacteriana aguda Infección aguda del tracto urinario
II	Prostatitis bacteriana crónica	Infección bacteriana persistente Infecciones recurrentes del tracto urinario
III	Síndrome crónico de dolor pélvico	Dolores pélvicos característicos Disfunción sexual Ausencia de otros desórdenes urológicos
III Subtipo a	Subtipo inflamatorio	Leucocitos en fluido prostático, fluido prostático post-masaje prostático o fluido seminal
III Subtipo b	Subtipo no inflamatorio	No se expresa inflamación en el fluido prostático, fluido prostático post-masaje prostático o fluido seminal
IV	Inflamatorio asintomático	Pacientes asintomáticos con infiltrados inflamatorios en tejido prostático o fluido seminal de especímenes evaluados para otras indicaciones.

En el hombre, uno de los factores etiológicos más importantes para la presentación de prostatitis es el reflujo de orina hacia la próstata, pues se ha observado que este reflujo puede tanto iniciar como perpetuar el proceso inflamatorio crónico, sea cual sea el origen (39). En hombres, hasta el 80% de los casos de prostatitis bacteriana son causadas por bacterias Gram negativas, principalmente *Escherichia coli* uropatogénica, si bien otras Gram positivas como *Enterococci* spp, y en particular *E. faecalis* también tienen una incidencia alta, siendo frecuente en ambos casos la cronificación del proceso (40). Las prostatitis infecciosas suelen deberse, como ya se ha dicho, a infecciones retrógradas de la vejiga, gracias al reflujo intraprostático proveniente de la uretra posterior o de la vejiga urinaria (35,37). La infección también puede darse por vía linfohemática a partir de focos infecciosos distantes (38). Esta forma de prostatitis tiene una evolución altamente variable que puede cursar con episodios de mejoría alternados con exacerbación de los signos (37,39). Esta exacerbación está a menudo asociada con alteraciones psicológicas como el estrés y la tensión emocional (37).

En las ratas, se ha observado que la incidencia de prostatitis varía con factores como la raza y la edad, sugiriendo así que tanto los factores genéticos como la edad tienen un

papel importante en el desarrollo de la patología. La edad más común de aparición de este proceso en las ratas es entre 10 y 13 meses de edad (36). En hombres, se ha descrito que la prostatitis está asociada con muchos factores, entre ellos genéticos, antecedentes culturales, niveles educativos, estado psicológico, estilos de vida, hábitos alimenticios, estado de salud, relaciones familiares y otras condiciones socioeconómicas (41).

### Quistes y abscesos prostáticos

Los quistes prostáticos, en su mayoría benignos, son comunes en adultos y muchos corresponden a hallazgos incidentales durante la realización de una ecografía abdominal. La patogénesis de los quistes glandulares, causados por la dilatación de los ductos prostáticos, aún no se conoce por completo (42). En hombres se ha descrito que los quistes prostáticos pueden ser congénitos o adquiridos. Los congénitos se asocian con anomalías en el ducto paramesonefrico (o conducto de Müller) o mesonefrico (o conducto de Wolff), mientras que los adquiridos son usualmente benignos y pueden incluir la presencia de líquido o de un absceso prostático (43).

Las mejoras recientes en la clasificación patológica de la enfermedad prostática y en particular, de la atrofia focal otorgan nueva relevancia a los quistes de próstata. En 2006, un grupo de trabajo de patólogos estableció una nueva clasificación de lesiones focales de atrofia prostática que incluye la atrofia simple con formación de quistes como uno de los cuatro patrones de atrofia prostática. Por lo tanto, los quistes también pueden estar relacionados con la atrofia de la próstata y con otros factores bien conocidos, como la enfermedad inflamatoria, la HPB, la obstrucción del ducto eyaculatorio e incluso las neoplasias (42).

En cuanto a los abscesos, pueden verse en la ecografía transrectal como una masa discreta hipoecoica o anecoica con aumento de las señales de flujo a su alrededor en la ecografía Doppler color. Cuando el absceso se produce en un quiste preexistente, se detecta con un contenido heterogéneo (42).

## Neoplasias prostáticas

Dentro de las patologías que afectan la próstata se encuentran las neoplasias, variando su clasificación histológica y presentación entre especies. Así, en la rata se ha descrito la aparición espontánea de carcinomas en animales de edad avanzada. Sin embargo, la incidencia es variable dependiendo de la línea genética, con lo que la rata no suele usarse como modelo de estudio para cáncer de origen espontáneo (10). En cambio, sí que se utiliza la rata como modelo en neoplasias inducidas, para lo que se utilizan distintas técnicas que incluyen la inyección intra-prostática de sustancias carcinogénicas u hormonas, la implantación de líneas celulares de cáncer de próstata o las líneas transgénicas que desarrollan tumores prostáticos pocas semanas después de nacidas (10).

Por lo que se refiere al hombre, en Estados Unidos, el cáncer de próstata suele diagnosticarse con mayor frecuencia en hombres de entre 65 y 74 años de edad, representando el 9,9% de todos los casos nuevos de cáncer en ese país (44). Además, se estima que en 2019 murieron 31,620 personas (5,2% todas las muertes producidas por cáncer en Estados Unidos), haciendo que, en comparación con otros tipos de neoplasia, la de próstata sea una de las más frecuentes (44). En el hombre, más del 95% de los tumores primarios de próstata son adenocarcinomas. Estos son frecuentemente multifocales y con patrones de diferenciación heterogéneos (45). Unas formas menos frecuentes y más benignas son las neoplasias prostáticas intraepiteliales (NPI). Las NPI están formadas por células epiteliales atípicas no invasivas dentro de acinos de apariencia benigna. Las NPI se subdividen en grado bajo y alto, teniendo en cuenta que las NPI de grado alto pueden ser precursoras de adenocarcinomas (45). El bajo porcentaje de neoplasias restante incluye tumores raros como el tumor de células pequeñas, carcinomas acinares intralobulares, carcinomas ductales, carcinomas de células claras y carcinomas mucinosos (45).

En el hombre, el tratamiento de las neoplasias prostáticas a base de productos antiandrogénicos que causan una castración hormonal más o menos reversible es habitual (46-48). Sin embargo, la castración total como tratamiento de las neoplasias prostáticas está en discusión en otras especies. Así, en perros existen resultados contradictorios sobre este punto. En este sentido, se han realizado estudios que respaldan dos teorías: una, que la castración puede favorecer el desarrollo de neoplasias prostáticas (49-51). La segunda,

que la castración no tiene impacto en el desarrollo de estas neoplasias (52,53). La discusión se mantiene, por lo que algunos autores sugieren nuevas investigaciones que incluyan factores como la edad a la que se castró el animal, la edad a la que se desarrolló la neoplasia, el tiempo que transcurre entre la castración o la presentación de la neoplasia, entre otros, para poder establecer conclusiones definitivas (54).

## Técnicas inmunológicas de diagnóstico precoz de las neoplasias prostáticas

Aún queda mucho por descubrir en cuanto a los factores desencadenantes de los procesos patológicos que afectan a la próstata. Sin embargo, en referencia al pronóstico de las neoplasias prostáticas sí existe la certeza que cuanto más temprano se realiza el diagnóstico, mejor es el pronóstico para el paciente (55-57). Por lo tanto, el desarrollo de técnicas de diagnóstico precoz es un aspecto básico para mejorar el pronóstico de estos procesos. Seguidamente, se describen las técnicas de diagnóstico más importantes utilizadas en estos momentos.

### Antígeno Específico de Próstata

En el hombre, antes de la aparición del Antígeno Específico de Próstata (AEP), el cáncer de próstata generalmente se diagnosticaba mediante un examen rectal digital, que a menudo detectaba el cáncer después de que la enfermedad se hubiera diseminado (58). Si un examen rectal digital era anormal, generalmente se realizaba una biopsia de próstata con guía digital, a menudo con cuatro o menos muestras de biopsia y para mediados de la década de 1980, el uso de biopsias guiadas por ultrasonido con una pistola automática de biopsia calibre 18G aumentó la seguridad y la velocidad de la técnica (58).

El AEP, también conocido con las siglas PSA por su abreviatura en inglés de "Prostate-Specific Antigen", es el marcador de cáncer más solicitado en el mundo en la especie humana (59). Esta proteína de 33 kDa se purificó hasta la homogeneidad a partir del plasma seminal humano y se identificó como una serina proteasa similar a la kalicleína y expresada principalmente en la próstata humana (60). Su función es la proteólisis de proteínas formadoras de gel en el semen humano para disolver el coágulo post-yaculación (61). De esta manera, el AEP/PSA se encuentra presente tanto en el epitelio

prostático normal como en el neoplásico, pudiendo detectarse en el suero de hombres con próstata (62).

A pesar de su identificación a inicios de los años 1970, no se identificó en el plasma seminal (63) hasta 1979, cuando se publicó que el antígeno prostático específico estaba presente tanto en tejido prostático normal e hiperplásico como en el maligno, siendo totalmente específico del tejido prostático (64). Estos datos llevaron a hacer patente su gran utilidad como marcador de alteraciones prostáticas a finales de los años 80 e inicios de los 90 (62). Aunque el AEP/PSA es producido por las células epiteliales, en presencia de una patología prostática se produce una fuga de éste al torrente sanguíneo, aumentando los niveles plasmáticos (65), haciéndolo así extremadamente útil como marcador. En 1991 se consideraba que la medición del PSA en suero era el marcador disponible más sensible para controlar la progresión del cáncer de próstata y la respuesta al tratamiento pues se observó que las concentraciones se elevaban en el 30 al 50% de pacientes con HPB y en el 25 al 92% de los pacientes con cáncer de próstata (66).

Según la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos, la recomendación fue realizar una biopsia de próstata cuando la medición de PSA excediera los 4.0 ng/mL. Sin embargo, debido a que varios estudios mostraron que algunos pacientes con cáncer de próstata podían presentar niveles inferiores a este valor, se empezaron a sugerir puntos de corte más bajos para mejorar la detección precoz del cáncer de próstata (67-70). Posteriormente, el “National Comprehensive Cancer Network” de Estados Unidos, estableció un nuevo límite recomendado de 2.5 ng/mL (71).

Todo esto ha llevado a que, desde que se ha generalizado la medición del AEP, se haya visto un aumento en el diagnóstico de cáncer de próstata de bajo grado localizado, teniendo como resultado una disminución significativa en el número de hombres que presentan enfermedad metastásica y disminución de más del 30% de las tasas de mortalidad específicas por cáncer de próstata (72).

### Diagnóstico en animales

En perros, el diagnóstico de patologías prostáticas se realiza a través de examen físico, examen de fluido prostático, radiografías y ecografías (73). En cuanto a marcadores de alteraciones prostáticas, se ha descrito la arginina esterasa prostática específica, abreviada

por sus siglas en inglés como CPSE (Canine Prostate-Specific Arginine Esterase), que es liberada por las células epiteliales prostáticas, con un aparente valor diagnóstico para HPB (74). Sin embargo, algunos autores han descrito que su validación parece limitada ya que no se han encontrado diferencias significativas al comparar los niveles séricos de perros con HBP, inflamación o neoplasia (73).

En el caso de las ratas como modelo animal de estudio, el monitoreo de patologías prostáticas se llevaba a cabo principalmente mediante imágenes diagnósticas como la ultrasonografía, la tomografía computarizada y la imagen por resonancia magnética (10,11).

### **Papel de las citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento en el desarrollo de patologías prostáticas**

Desde hace varios años, se ha sugerido la existencia de una estrecha relación entre las patologías prostáticas no neoplásicas y el desarrollo de tumores prostáticos, y varios estudios han confirmado esta relación (28,31,32,75,76). Partiendo de esta base, también se ha establecido que los procesos inflamatorios tanto en la rata como en el hombre tienen un papel importante en el desarrollo de procesos de hiperplasia prostática (28,31,32,75,76) y que esta hiperplasia, a su vez, puede desencadenar cáncer de próstata (76-80). Sin embargo, no se ha podido determinar cuánto tiempo pasa entre el desarrollo de un suceso y otro (76). A pesar de que estos sucesos están claramente establecidos en la rata y el humano, no ocurre lo mismo en el perro, por lo que a pesar de haberse sugerido también como modelo animal para el estudio de patologías prostáticas, debería considerarse si a pesar de esta diferencia puede ser adecuado como tal (21).

Como ya se ha mencionado con anterioridad, los procesos inflamatorios prostáticos pueden tener un origen infeccioso o no infeccioso. Dentro de los posibles orígenes infecciosos de inflamación prostática se encuentran las prostatitis bacterianas crónicas y agudas, así como aquellas debidas a hongos, micobacterias o virus (81-83). Dentro de las causas no infecciosas, las hormonales, son de gran importancia. Básicamente, este tipo de inflamación es debida a la exposición a estrógenos en un momento crucial del desarrollo, lo que puede conllevar a alteraciones arquitectónicas en la próstata que produzcan una respuesta inflamatoria (36,82). Otra causa puede ser un trauma físico

a nivel microscópico que puede ocasionar la presencia de cuerpos amiláceos dentro de los acinos prostáticos en los que sus bordes parecen estar erosionando el epitelio (82). También el reflujo urinario, que va de manera retrógrada desde la vejiga y que puede llegar a los ductos y los acinos, puede activar directamente las células inflamatorias (39,82). Por último, la dieta, principalmente la ingestión de sustancias carcinógenas que pueden llegar a la próstata ya sea por el flujo sanguíneo o por el reflujo urinario. Estas sustancias pueden ocasionar daños en el ADN y mutaciones, y tener como resultado una afluencia de células inflamatorias (84).

Se ha descrito que el estímulo inflamatorio crónico puede inducir la liberación de varias citoquinas y quimioquinas por parte de las células inflamatorias (83). Estas sustancias proporcionan un microambiente favorable para el crecimiento del tumor facilitando la angiogénesis e incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que puede llevar a daño oxidativo del ADN y reducir su reparación (75). Varios autores también han reportado la presencia de estas citoquinas y quimioquinas tanto en procesos inflamatorios como en la HPB, de manera que a lo largo de estos procesos se expresan tanto factores de crecimiento como interleuquinas, como la IL-2, el IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-15, IL-17, IL-23, el TNF- $\alpha$  y el TGF- $\beta$  (83,85,86).

Las citoquinas, quimioquinas y los factores de crecimiento son importantes para el desarrollo de los tumores, ya que este depende de la capacidad de un tumor para generar nueva vascularización. Precisamente, es durante este proceso conocido como angiogénesis en el que las células endoteliales tienen una respuesta inicial a esos cambios en el entorno y migran para terminar formando una nueva red vascular que facilita el crecimiento y la metástasis tumoral (87,88). Varios estudios han demostrado que la base de esa vascularización tumoral se da gracias a una gran cantidad de factores autocrinos y paracrinos que activan y facilitan este proceso. Entre estos se incluyen los factores de crecimiento angiogénico como el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), los Factores de Crecimiento de Fibroblastos 1 y 2 (FGF 1 y FGF 2), así como diferentes Metaloproteinasas, el factor de Crecimiento Similar a la Insulina I (IGF-I) y la Angiopoyetina (87,89).

El VEGF, también conocido como Factor de Permeabilidad Vascular (VPF), se describió originalmente como un mitógeno específico de células endoteliales. El VEGF es un potente factor angiogénico que es producido por muchos tipos de células, incluyendo



macrófagos, plaquetas, queratinocitos, células renales mesangiales y diversos tipos de células tumorales (88,90,91). Contrariamente a lo que se pensó inicialmente, el VEGF tiene un papel importante en muchas funciones fisiológicas no relacionadas con el sistema vascular, entre las que se encuentran, por ejemplo, la formación de hueso, la curación de heridas y la hematopoyesis (88,92).

La familia del VEGF es la mayor reguladora del desarrollo y crecimiento de vasos sanguíneos y linfáticos. Los principales miembros de esta familia son el VEGF-A, que fue el primero en describirse, el -B, -C, -D y -E, el factor de crecimiento placentario (PlGF) y el SV-F (SV por "Snake Venom" en su acepción original en inglés; ver 83,84). Estos factores de crecimiento son secretados como glicoproteínas diméricas de aproximadamente 40 kDa y funcionan de forma paracrina mediante la señalización a tres receptores tirosina quinasa correspondientes, estructuralmente homólogos, expresados en células endoteliales y llamados VEGFR-1, -2 y -3 (92-94). Por otra parte, tanto el VEGF-A, como el VEGF-B y el PlGF se unen a la neurofilina (NRP) 1 y 2 siendo estos sus receptores específicos (92).

Si bien cada día se conoce más sobre las distintas funciones de los diferentes tipos de VEGF, en cuanto a sus funciones fisiológicas se ha establecido que tiene un papel vital en el sistema cardiovascular, el sistema nervioso central, el hueso, las células hematopoyéticas (88), el páncreas (95) y el transporte de lípidos, además de evitar la muerte celular bajo condiciones patológicas (92). Por otro lado, también se sabe que hay una sobreexpresión de VEGF en distintos tipos de cáncer, entre ellos las leucemias, tres tipos de linfoma Non Hodgkin's, al menos tres tipos de carcinomas de glándula mamaria, los carcinomas pulmonar y ovárico, un tipo de melanoma, el cáncer de páncreas, el mesotelioma (88), el cáncer de próstata (96) y el cáncer colorectal (97), entre otros, compartiendo en su mayoría la gran malignidad con la que se comportan.

Centrándonos en la relación entre el VEGF y la próstata, recientemente se ha descrito que, la inducción de la síntesis de andrógenos por parte del VEGF parece estar regulada a través de la formación de complejos Andrógeno-Receptor con la proteína específica 1 (Sp1) en la región del promotor central en las células tumorales y no a través de los puntos de unión de los elementos de reconocimiento del complejo AR en el promotor distal de VEGF (96). Este hecho indicaría la existencia de un sistema alternativo de angiogénesis

tumoral no ligado a los receptores canónicos de la VEGF, es decir, los de la familia VEGFR. Sin embargo, a pesar del gran conocimiento que se tiene actualmente sobre las distintas alteraciones prostáticas con sus posibles causas, poco se conoce de las fases previas a estas alteraciones y poco se ha investigado sobre las posibilidades diagnósticas de fases iniciales y asintomáticas de dichas patologías. En este sentido, mientras algunos autores encontraron diferencias en la expresión prostática de VEGF en HPB y en carcinoma prostático de alto grado (87,89), otros observaron que estas diferencias dependían de la muestra evaluada e incluso de la técnica utilizada para su evaluación (87-90). Por lo tanto, si bien sí se conoce la existencia de una relación entre la expresión del VEGF y el inicio de problemas prostáticos, empezando por la HPB que eventualmente acabará desarrollándose en carcinoma prostático, aún existen muchas lagunas y puntos oscuros en el conocimiento del papel de la VEGF en la patogénesis de los problemas prostáticos.

## Papel de las alteraciones secretoras y metabólicas en las patologías prostáticas

Desde la década de los 80, se han realizado algunos estudios enfocados en los problemas debidos a disfunción secretora prostática. En ese sentido, se ha descrito que dichos problemas pueden deberse a la inflamación de la próstata (98). Sin embargo, si bien se han estudiado las posibles consecuencias que las disfunciones en las secreciones prostáticas tienen sobre la fertilidad (98), no se acaban de aclarar todos los aspectos relacionados con estas alteraciones. Abundando sobre este tema, se sabe que el metabolismo de la próstata, que está en la base de la actividad secretora de la glándula, es único. Así, las células epiteliales prostáticas tienen un metabolismo energético peculiar que se podría calificar de ineficiente, ya que utilizan glucosa para sintetizar citrato, el cual se secreta como parte del líquido seminal (99). Por otro lado, también se ha descrito que las unidades secretoras básicas de la glándula prostática, los gránulos secretores prostáticos, son orgánulos citoplasmáticos eosinófilos brillantes que miden 1  $\mu$ m de diámetro. Estos están densamente concentrados en el tercio apical de la célula, y actúan como reservorios de enzimas secretoras prostáticas, incluyendo la fosfatasa ácida prostática (PAP) y el PSA (100).

A medida que las investigaciones avanzan, se hace cada vez más evidente la existencia de una profunda reprogramación metabólica en las células de cáncer de próstata. La mayoría de los mecanismos moleculares involucrados en este proceso, sin embargo, aún no se ha dilucidado. Este hecho se debe a su gran complejidad, que abarca cambios dentro de las células epiteliales de la próstata y la diafonía con otros tipos de células presentes en el microambiente (99). Hasta ahora, los transportadores de glucosa (TG) no se habían considerado relevantes en la progresión del cáncer de próstata. Sin embargo, los TG cobran importancia en el cáncer por su capacidad de aumentar la absorción de nutrientes, incluida la glucosa, por lo que el estudio del metabolismo de la glucosa debe considerarse como esencial para caracterizar el cáncer de próstata (101).

Durante años se pensó que las alteraciones del metabolismo de las células cancerosas eran un efecto secundario en el complejo cuadro de la biología tumoral, a pesar de la evidencia de que los cambios en la función celular requieren cambios en el metabolismo celular. Recientemente, diversos estudios se centraron en las vías celulares responsables de la producción de energía y la síntesis de moléculas necesarias para mantener la replicación de células con crecimiento descontrolado (99). En cuanto a las alteraciones de las secreciones prostáticas, se han detectado algunas asociaciones con el cáncer como la presencia de altas concentraciones de azufre en los cuerpos amiloides luminales (102), de cristaloides que se forman en la luz de los acinos prostáticos (103) y la disminución de las concentraciones de zinc y citrato, como se puede observar en la tabla 2 (104).

*Tabla 2. Niveles representativos en la próstata de citrato y zinc (104)*

(nmol/g de tejido)	citrato	zinc
Tejido prostático sano (zona periférica)	12000 – 14000	3000 – 4500
Tejido prostático maligno	200 – 2000	400 – 800
Tejidos no prostáticos	250 – 450	200 – 400
Fluido prostático	40000 – 150000	8000 – 10000
Plasma Sanguíneo	100 – 200	15

El nexo de unión más evidente entre las alteraciones de las secreciones prostáticas ligadas a procesos como el HPB o las neoplasias y los cambios concomitantes en el metabolismo glucídico prostático es el incremento significativo en la presencia de cuerpos amiláceos como componente importante de la secreción prostática (103,105). En este sentido, se ha

descrito que el reflujo de orina hacia la próstata (106) y los procesos inflamatorios, entre otros (105), pueden actuar como factores predisponentes para la formación de los cuerpos amiláceos. Sin embargo, hasta el momento se desconoce el mecanismo por el cual se forman, así como la composición completa de estos. La conformación exacta de dichos cuerpos amiláceos continúa siendo un enigma, pues a pesar de haber sido descritos hace más de 60 años (107), sólo se han estudiado y descrito algunos de sus componentes (105). Como se mencionó previamente, se ha detectado la presencia de altas concentraciones de azufre en los cuerpos amiláceos, y aunque aún no se conoce la composición de estos compuestos sulfatados, su análisis cristalográfico y químico ha demostrado que contienen glucosamina, galactosa y azufre (11). Todo ello sugiere la presencia de glicosaminoglicanos, más específicamente de sulfato de queratán (108). Por otra parte, la acumulación de cuerpos amiláceos insolubles exclusivamente en glándulas benignas, mientras que la mucina y los cristaloides se encuentran casi exclusivamente en lúmenes de glándulas malignas, sugiere que la transformación maligna puede incluir alteraciones aún no definidas en los mecanismos secretores (103). También se han reportado alteraciones en el tejido prostático, encontrando que la expresión del proteoglicano condroitín sulfato aumenta en la HPB. Su expresión aumenta en las membranas basales del epitelio acinar y de las células de músculo liso periacinares. Esta expresión aumentada es específica para estos proteoglicanos, ya que otros componentes de la membrana basal no se ven afectados, y se cree que puede deberse a los efectos reguladores de factores locales que son activos en la HPB (108). Sin embargo, a pesar de todos estos avances, el conocimiento actual sobre los mecanismos secretores prostáticos normales es escaso y fragmentario, por lo que aún es necesario estudiarlos a fondo para mejorar la comprensión de las alteraciones patológicas que se puedan presentar.



## OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el de profundizar en el conocimiento de la patogénesis de la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) como paso previo al desarrollo de neoplasias, ya que si bien se han descrito una serie de sucesos anteriores, hay muchos que siguen siendo una incógnita. Para ello, se ha optado por utilizar la rata como modelo experimental, puesto que, de los modelos animales utilizados hasta ahora, es el que más se asimila a la presentación de patologías prostáticas en humanos.

Teniendo en cuenta el objetivo principal, esta tesis Doctoral se centró en dos objetivos derivados:

1.- El conocimiento de las alteraciones ligadas a la expresión de citoquinas inflamatorias en tejido y suero de ratas de diferentes edades, profundizando en el VEGF y su receptor. Consideramos importante este objetivo, puesto que estudios previos han establecido que éste y otros factores de crecimiento se han visto involucrados en el crecimiento de diversas neoplasias. Sin embargo, aún se conoce de manera fragmentaria su papel en las patologías prostáticas por lo que queda mucho por saber sobre su papel en la patogénesis de las alteraciones prostáticas en las diferentes etapas de madurez sexual.

2.- Contribuir al esclarecimiento de la composición bioquímica de la secreción prostática, haciendo énfasis en su componente polisacárido, puesto que, aunque en la literatura aparecen algunas investigaciones al respecto, todavía queda mucho por establecer respecto al papel de este componente de secreción en las patogénesis de las alteraciones prostáticas ligadas a la edad.



# MATERIAL Y MÉTODOS

## Capítulo 1.

### 1.- Animales

Para este trabajo se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de 1 (n=20), 3 (n=20), 6 (n=5) y 12 (n=9) meses. Los animales eran suministrados por el proveedor con las edades referidas. Una vez en el laboratorio, las ratas se dejaron descansar durante 24 h en condiciones estables de estabulario con agua y comida "ad libitum", tras lo cual se eutanasiaron mediante una inyección letal de un compuesto comercial formado por una solución de 566,67 mg/mL de dimetilformamida conteniendo 200 mg/mL de embutramida, 50 mg/mL de ioduro de mebezonio y 5 mg/mL clorhidrato de tetracaína (T-61<sup>®</sup>; Intervet International B.V.; Salamanca, España), administrado por vía intraperitoneal a dosis de 5 mL/KPV. Los animales se monitorizaron, y cuando se determinó que entraron en fase de coma profundo y colapso, se procedió a la extracción de sangre completa mediante punción intracardíaca y a la posterior disección para la obtención de la glándula próstata. La sangre así recogida se dejó coagular al aire a Temperatura Ambiente (TA) durante 5-10 minutos. Tras ello, las muestras se centrifugaron a una velocidad de 1600 xg a 4°C durante 10 minutos, recogándose el suero. Dicho suero se congeló de inmediato por inmersión en N<sub>2</sub> líquido, conservándose después a -80°C hasta su uso. En cuanto a la próstata, para este estudio se utilizó únicamente la próstata ventral, la cual, una vez extraída del animal, se dividió en dos mitades. Una mitad se congeló inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se conservó a -80°C hasta su procesamiento. La otra mitad se sumergió en una solución de formaldehído al 4% (v:v) en solución tampón salina fosfatada (PBS, pH:7,4) a TA, utilizando para ello un volumen 10 veces superior al de la muestra. El período mínimo que se conservaron las muestras en la solución de formaldehído fue de 48 horas. De esta manera, al conservar una parte de la próstata en N<sub>2</sub> líquido y otra en formaldehído se pudieron realizar en un mismo individuo varias de las pruebas analíticas utilizadas en este estudio. Las muestras fijadas en formol se utilizaron para los estudios histológicos e inmunohistoquímicos mientras que para los análisis bioquímicos y las otras técnicas inmunológicas (mini-arrays y Western blotting) se utilizaron las congeladas a -80°C. El proceso de eutanasia y de



recogida de muestras no requería aprobación de la Comisión Ética Experimental de la UAB al no llevarse a cabo ningún protocolo experimental con los animales.

## 2.- Preparación de la muestras para tinciones histológicas

El estudio de la histología prostática se llevó a cabo en muestras ya fijadas. Para ello, dichas muestras se lavaron primero con el tampón de fijación (PBS en este caso) y se continuó con la deshidratación, para lo cual sumergió la muestra en etanol a diferentes concentraciones, tal como se indica a continuación en la Tabla 3:

*Tabla 3. Secuencia de deshidratación de muestras prostáticas para su uso en histología*

Producto o sustancia	Cantidad de inmersiones	Tiempo
Etanol al 70% (v:v)	1	1 hora
Etanol al 96% (v:v)	2	1 hora
Etanol al 100% (v:v)	2	1 hora
Xilol	2	1 hora
Parafina a 58-60°C	1	1 hora
Parafina a 58-60°C	1	toda la noche

Si no se indica lo contrario, las inmersiones se llevaron a cabo a TA.

Las muestras finalmente parafinadas se introdujeron en moldes metálicos, que se dejaron a 4° durante 1 hora hasta que se formó un bloque sólido. Tras ello, se despegó el bloque del molde y se realizaron los cortes con el micrótopo (HistoCore Biocat-Manual Rotatory Microtome; Leica Biosystems; Wetzlar, Alemania). Para este trabajo, se utilizaron cortes de 5 y de 7 µm de grosor.

## 3.- Tinciones histológicas.

En este estudio, se llevaron a cabo dos tinciones histológicas diferentes, la tinción de Hematoxilina/Eosina (H&E) y la tinción de Ácido Periódico/Schiff (PAS)

### 3.1.- Tinción Hematoxilina/Eosina

Esta tinción se utilizó para la evaluación de la arquitectura histológica de las próstatas (13). Para realizar las tinciones se utilizaban cortes histológicos de 7 µm de grosor. Estos

se sumergían secuencialmente en cada uno de los reactivos indicados en la Tabla 4 durante los tiempos allí indicados.

*Tabla 4. Secuencia de incubación de los tejidos utilizados para la tinción de Hematoxilina/Eosina*

Producto / reactivo	Número de inmersiones	Tiempo
Xilol	2	10 minutos
Etanol al 100% (v:v)	3	2 minutos
Etanol al 96% (v:v)	2	2 minutos
Etanol al 70% (v:v)	2	2 minutos
Formaldehído al 10% (v:v) en agua destilada	1	5 minutos
Agua destilada básica	1	5 minutos
Hematoxilina de Harris	1	2 minutos
Agua destilada básica	2	5 minutos
T.R.H. Eosina G	1	2 minutos
Etanol al 96% (v:v)	4	2 minutos
Etanol al 100% (v:v)	2	2 minutos
Xilol	2	3 minutos

Todas las inmersiones se llevaron a cabo a TA.

Una vez terminado el proceso de tinción, las muestras se cubrieron con un medio de montaje con base de Xilol, en este caso DPX (Fluka BioChemika, Buchs, Switzerland), sobre el que se emplazó la correspondiente lámina cubreobjetos.

### *3.2.- Tinción de Ácido Periódico/Schiff*

La tinción de PAS se utilizó para detectar la presencia de polisacáridos simples en cortes histológicos, como el glucógeno, o compuestos, como glucoproteínas, glucolípidos y mucinas (109). Se realizó con el kit Periodic Acid-Schiff Staining System (PAS) (Sigma-Aldrich; Madrid, España), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, siguiendo la secuencia descrita en la Tabla 5.

*Tabla 5. Secuencia de incubación de los tejidos utilizados para la tinción de PAS*

Reactivo	Número de inmersiones	Tiempo
Xilol	2	10 minutos
Etanol al 100% (v:v)	3	2 minutos
Etanol al 96% (v:v)	2	2 minutos
Etanol al 70% (v:v)	2	2 minutos
Agua destilada	2	2 minutos
Ácido periódico 1% (w:v)	1	5 minutos
Agua destilada	3	2 minutos
Reactivo de Schiff	1	15 minutos
Agua destilada	1	5 minutos
Hematoxilina Gill No.3	1	90 segundos
Agua destilada	3	2 minutos
Etanol al 96% (v:v)	4	2 minutos
Etanol al 100% (v:v)	2	2 minutos
Xilol	2	3 minutos

Una vez terminado el proceso de tinción se fijaba la lámina cubreobjetos con medio DPX.

#### 4.- Técnicas de Inmunodetección

##### 4.1.- Inmunohistoquímica

Como en el caso de la tinciones histológicas, las inmunohistoquímicas prostáticas se llevaron a cabo en muestras ya fijadas en formaldehído al 4% (v:v), si bien el procesado posterior de las muestras variaba en función de si el revelado de la inmunohistoquímica se llevaba a cabo mediante anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia o si estos anticuerpos se marcaban con peroxidasa de rábano picante (HRP), revelándose posteriormente con 3-3' diaminobenzidina (DAB).

##### 4.1.1.- Procesado de muestras y realización de inmunohistoquímica mediante inmunofluorescencia

Las muestras fijadas en formaldehído al 4% (v:v) se lavaron 2 veces con PBS durante 5 minutos, manteniéndolas a 4°C durante todo el proceso. Una vez lavadas dichas muestras, se iniciaron inmersiones consecutivas en PBS con sacarosa en agitación suave durante 5

minutos o hasta que el tejido se sumergía por sí solo en la solución. La concentración de sacarosa se aumentaba gradualmente, iniciando con una concentración al 5% (w:v), luego 10%, 15%, 20% y finalmente al 30%. Una vez pasado este tiempo, las muestras se incluyeron en medio de crioinclusión OCT Tissue-Tek® (Sakura Finetek; Tokio, Japón) a TA. Una vez las muestras estaban completamente embebidas en el medio, se introdujeron en el criostato, que en ese momento debía estar a -21°C, para que se pudiera solidificar el OCT®. Una vez formado el bloque sólido, con el criostato Leica CM3050 S (Leica Biosystems) a -20°C y la muestra a -21°C se realizaron cortes de 20µm y se pusieron en láminas portaobjetos adhesivas silanizadas Star Frost® (Knittel glass; Braunschweig, Alemania) que estaban a TA. Una vez las muestras se adherían a la lámina portaobjetos, se conservaron a -20°C hasta su uso.

Para la inmunofluorescencia se sacaron las láminas portaobjetos con las muestras del congelador y se dejaron atemperar a TA durante 5 minutos. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con solución de lavado constituida por PBS. Tras ello, se permeabilizó el tejido con una solución de PBS con Tritón X-100® al 0,3% (v:v) en agua destilada durante 30 minutos a TA. Posteriormente, se lavaron 2 veces durante 5 minutos y luego las muestras se bloquearon a TA con una solución de PBS con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% (w:v) y se lavó nuevamente dos veces durante 5 minutos con solución de lavado. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario, de acuerdo a las indicaciones del fabricante, ya fuera mouse monoclonal anti-VEGF, o en algunos casos para identificar la ubicación del aparato de Golgi se utilizó el mouse monoclonal Anti-GM130 (610822 de BD Biosciences; San José, USA) a una dilución 1:500. Todos los anticuerpos se diluyeron en solución de incubación (PBS, BSA 1% (w:v) + Tritón (Sigma Aldrich; Madrid, España) 0,3% (v:v)) toda la noche en cámara húmeda. Al día siguiente se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno con PBS, seguidos de la incubación con anticuerpo secundario cabra-anti ratón GAM – Alexa Fluor 488 (referencia A11029, Thermofisher Scientific; Waltham, USA) a una dilución 1:500. A esta solución se le añadió tinción de Hoechst 33342® 1:1000 (v:v) (Sigma Aldrich) y faloidina 1:500 (v:v) (Phalloidin-TRITC: P1951-50MG de Sigma Aldrich). A partir de este paso, las muestras permanecieron protegidas de la luz. En algunos casos se utilizó como marcador de membrana el WGA – Alexa Fluor 555 (Wheat Germ Agglutinin, W32464, Thermofisher Scientific) a una dilución 1:500. La incubación con WGA se realizó después de lavar el anticuerpo secundario, durante media hora. A continuación se

realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS y se realizó el montaje de las láminas con Mowiol™ (Sigma Aldrich). Una vez seco el medio de montaje, las muestras con marcaje fluorescente se analizaron en un microscopio confocal láser Zeiss 880 LSM (Carl Zeiss Microscopy GmbH; Jena, Alemania) con el objetivo 40X 1.3 de aceite de inmersión.

### *4.1.2.- Procesado de muestras y realización de inmunohistoquímica con revelado no fluorescente*

Para la inmunohistoquímica se utilizaron secciones de tejido de 5µm de grosor obtenidas de bloques de tejido embebido en parafina, tal como se indicó en la sección de preparación de las muestras para tinciones histológicas. El tejido se desparafinó con Xilol y se rehidrató con etanol en concentraciones decrecientes y posteriormente con agua tal como se indica en la tabla 4 del apartado de Tinción H&E. Para recuperar el antígeno, se incubó el tejido con tampón de citrato (10 mM, pH 6.0), para lo que se hirvió 2 minutos en el microondas. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó usando peróxido de hidrógeno al 1% en metanol durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para el bloqueo de las uniones no específicas el tejido se sumergió en PBS + 0,3% Tween 20 + 2% BSA. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario Anti-Glucógeno Sintasa (Sigma Aldrich) a una dilución 1:100 durante 3 horas a TA. Para visualizar la ubicación de la unión del anticuerpo a la proteína se incubó durante 30 minutos a 37°C con un anticuerpo secundario de inmunoglobulina G (IgG) marcado con HRP (cat. No. Sc69786; 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Dallas, U.S.A). Para la reacción cromógena se incubaron las secciones en una solución de 3,3'-diaminobencidina (DAB; Sigma Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, el montaje de las secciones se realizó con medio de montaje FluorSave Reagent (Sigma Aldrich). Una vez seco el medio de montaje, se captaban imágenes en formato TIFF usando el sistema Microscope Camera Moticam Series 3.0 (Microptic; Barcelona, España) que eran posteriormente evaluadas para su estudio.

## 5. Análisis Bioquímicos

### 5.1 Homogeneización de las muestras

Para la homogeneización de las muestras que se utilizarían posteriormente para la medición de glucosa y la detección de VEGF mediante Western Blotting, estas se pesaron y por cada  $\mu\text{g}$  de muestra se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de tampón de homogenización compuesto de una solución de Tris HCl 50 mM (pH 7,4), con la adición de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N' tetraacético (EGTA) 10 mM, ditioneitol (DTT) 25 mM, Tritón X-100<sup>®</sup> 1,5% (v:v), fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) 1 mM, leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ortovanadato 1 mM y benzamidina 1 mM, manteniéndolas siempre a 4°C.

Las muestras se homogenizaron utilizando el sistema Ultra-Turrax<sup>®</sup> T25 basic (IKA<sup>®</sup>-Werke; Staufen, Germany) a una velocidad de 13.500 r.p.m. hasta que las muestras quedaron completamente homogeneizadas. Tras este paso, las muestras se centrifugaron a 1200  $\times\text{g}$  durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante así obtenido se almacenó en alícuotas de 50  $\mu\text{L}$ , separándose una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  para la medición de proteínas mediante el método de Bradford (110), usando para ello el kit comercial Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad; Londres, Reino Unido). Todas las alícuotas se congelaron en N<sub>2</sub> y se conservaron a -80°C hasta su uso.

### 5.2 Medición de Glucosa

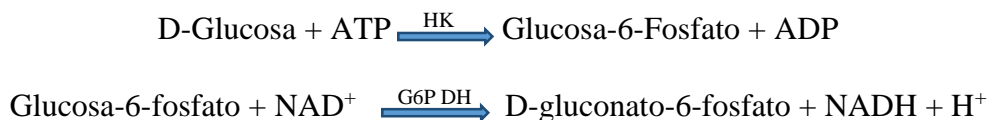
El estudio de la estructura de los componentes polisacáridos mayoritarios presentes en el tejido prostático se llevó a cabo mediante la hidrólisis selectiva de dichos polisacáridos con los enzimas  $\alpha$ -amilasa, amiloglucosidasa y N-glucosidasa (Sigma Aldrich) y el posterior análisis de la glucosa liberada tras dicha hidrólisis. Para ello, se utilizó parte de la próstata ventral obtenida y conservada a -80°C.

En el momento de realizar las incubaciones, se tomaron 30  $\mu\text{L}$  de muestra, que se diluyeron con tampón de homogenización para acabar teniendo en todas las muestras la misma concentración de proteína (2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), se tomaron 4 alícuotas de 30  $\mu\text{L}$ , mezclándose tres de ellas con 15  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilasa, amiloglucosidasa, o N-glucosidasa, dejándose la cuarta como control. La  $\alpha$ -amilasa y la amiloglucosidasa se diluyeron en

## Material y Métodos

tampón acético-acetato 0,07 M a pH 4,7 de manera que su concentración final fuera de 0,2 UI/ $\mu$ L. La N-glucosidasa no se diluyó, pues su presentación es líquida en PBS, siendo la actividad enzimática añadida final de 0,2 UI/mL. Las mediciones de control se realizaron en muestras diluidas en la misma proporción. Para la  $\alpha$ -amilasa y la amiloglucosidasa se diluyeron en tampón acético/acetato 0,07 M a pH 4,7, mientras que para la N-glucosidasa se diluyeron en PBS a pH 7,4. La incubación se realizó durante 2 horas a 37°C y las mediciones se hicieron en tres momentos: al inicio de la incubación (tiempo 0h), tras 1 hora de incubación y a las 2 horas. Para detener la reacción, las muestras se congelaron en N<sub>2</sub> líquido para poder medir posteriormente la concentración de glucosa. De esta manera, la glucosa liberada por los enzimas se calculaba restando el valor obtenido por los controles a aquellos obtenidos por cada enzima.

Para la medición de glucosa, se utilizó el kit Glucose HK CP ABX (Horiba; Montpellier, France). Es un método enzimático basado en las reacciones de la hexoquinasa (HK) y la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH):



Para la medición, se mezclaron los dos reactivos del kit, diluyendo posteriormente 10  $\mu$ L de muestra con 990  $\mu$ L de la mezcla de reactivos. El conjunto se incubó durante 5 minutos y se realizó entonces la lectura con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm (longitud a la que absorbe el NADH). Previamente, se comprobó la recta patrón con diferentes concentraciones conocidas de glucosa. La glucosa patrón se diluyó en tampón de homogeneizado y se mezcló con tampón acético/acetato 0,07 M para la recta patrón de la  $\alpha$ -amilasa y la amiloglucosidasa o en PBS para la recta patrón de las muestras incubadas con N-glucosidasa.

## Capítulo 2

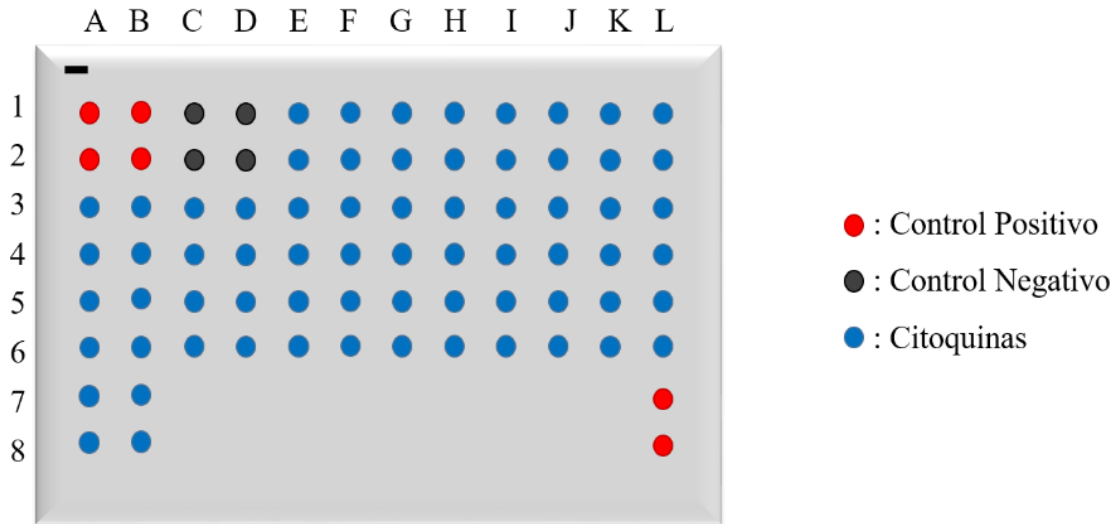
### 1. Otras técnicas inmunológicas

#### *1.2 Detección de proteínas mediante mini-arrays*

Para este trabajo se utilizaron kits comerciales de mini-arrays para la detección de 34 proteínas de rata (Figura 3), de la casa RayBio® C-Series Rat Cytokine Antibody Array C2 (RayBiotech Inc.; Norcross, USA). Para los mini-arrays se utilizó o bien suero o bien próstata ventral obtenida y conservada a -80°C. Para la preparación de las muestras de tejido, estas se homogeneizaron con el tampón de lisis proporcionado en el kit, manteniéndolas siempre a 4°C. Para esto se utilizó el politrón Ultra-Turrax® T25 basic (IKA® -Werke) a una velocidad de 13.500 r.p.m. hasta que la muestra quedó completamente homogenizada. Una vez procesadas, las muestras se mantuvieron a 4°C y se centrifugaron a 10.000 xg durante 10 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, se separaron los sobrenadantes, de los que se tomaron alícuotas de 5 µL para cuantificar la concentración de proteína mediante el método de Bradford (110) con un kit comercial (Bio-Rad). Todas las alícuotas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se conservaron a -80°C hasta su análisis posterior. Una vez cuantificada la proteína, el resto de la muestra se diluyó de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit. Así, en el caso del tejido homogeneizado se diluyó hasta llegar a una concentración de 500 µg/mL y en el caso del plasma se diluyó 5 veces (la indicación del fabricante era diluir de 2 a 10 veces las muestras de suero). Una vez se tuvo la muestra preparada y las membranas a TA, se colocó una membrana en los pocillos separados y se procedió a bloquear las membranas con el tampón de bloqueo suministrado en el kit, a TA en agitación suave durante 30 minutos. Posteriormente, se aspiró el tampón de bloqueo y se colocó la muestra previamente diluida, durante toda la noche a 4°C, tras lo que se aspiró la muestra y se procedió a realizar 3 lavados de 5 minutos a TA con 2 mL de tampón de lavado I y luego 2 lavados de 5 minutos con tampón de lavado II (ambos tampones estaban incluidos en el kit comercial). Una vez realizados los lavados, se incubaron las membranas con el cóctel de anticuerpo biotinizado suministrado en el kit durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se procedió a llevar a cabo una nueva serie de lavados iguales a los descritos en el paso anterior, tras los que se incubaron las membranas con la solución de HRP-estreptavidina proporcionada por el kit durante una noche a 4°C.



## Material y Métodos



A1-A2	Control Positivo	I3-I4	Interleuquina 2: IL – 2
B1-B2	Control Positivo	J3-J4	Interleuquina 4: IL – 4
C1-C2	Control Negativo	K3-K4	Interleuquina 6: IL – 6
D1-D2	Control Negativo	L3-L4	Interleuquina 10: IL – 10
E1-E2	Activina a	A5-A6	Interleuquina 13: IL – 13
F1-F2	Agrina	B5-B6	Leptina
G1-G2	Cúmulo de diferenciación 86 o proteína B 7.2: CD86 (B7 – 2)	C5-C6	Quimioquina inducible por Lipopolisacrido: LIX
H1-H2	Factor de Crecimiento Nervioso b: b – NGF	D5-D6	L – Selectina (CD 62L)
I1-I2	Molécula quimioatrayente de neutrófilos inducida por citoquina 1: CINC – 1 (CXCL1)	E5-E6	Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1: MCP – 1 (CCL2)
J1-J2	Molécula quimioatrayente de neutrófilos inducida por citoquina 2: CINC – 2	F5-F6	Proteína Inflamatoria de Macrófagos: MIP – 3 a (CCL20)
K1-K2	Molécula quimioatrayente de neutrófilos inducida por citoquina 3: CINC – 3	G5-G6	Metaloproteasa de Matriz 8: MMP – 8
L1-L2	Factor Neurotrófico Ciliar: CNTF	H5-H6	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas AA: PDGF – AA
A3-A4	Fas ligand (TNFSF6)	I5-I6	Receptor de Prolactina: Prolactina R
B3-B4	Fractalquina (CX3 CL1)	J5-J6	Receptor para productos finales de glicación avanzada: RAGE
C3-C4	Factor Estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos: GM – CSF	K5-K6	Quimioquina de Timo 1: TCK – 1 (CXCL7)
D3-D4	Molécula de Adhesión intracelular: ICAM – 1 (CD54)	L5-L6	Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas 1: TIMP – 1
E3-E4	Interferón g: IFN – g	A7-A8	Factor de Necrosis Tumoral a: TNF a
F3-F4	Interleuquina 1 a: IL – 1 a (IL – 1 F1)	B7-B8	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular A: VEGF – A
G3-G4	Interleuquina 1 b: IL – 1 b (IL – 1 F2)	C7-K8	Espacios en Blanco
H3-H4	Interleuquina 1 R6: IL – 1 R6 (IL – 1 Rrp2)	L7-L8	Control Positivo

Figura 3. Esquema de la membrana y descripción de las proteínas específicas detectables en el mini-array utilizado para la detección de citoquinas en tejido prostático y suero sanguíneo.

Tras esta última incubación, se procedió a lavar nuevamente las membranas igual que se indicó anteriormente, llevándose a cabo luego la detección de proteínas mediante quimioluminiscencia. En este último paso, las membranas se secaron pasándolas con la parte no impresa a una hoja de papel de cromatografía y se transferían posteriormente a una lámina de plástico. En este punto se mezclaron 250  $\mu$ L del tampón de detección C más 250  $\mu$ L del tampón de detección D por cada membrana y se incubó durante 2 minutos a TA (ambos tampones suministrados en el kit comercial). Transcurrido este tiempo, se puso otra lámina de plástico dejándola caer suavemente de un extremo a otro para evitar la formación de burbujas. El revelado se realizó con el sistema de imagen Imaging System Luminescent Image Analyzer (Fujifilm; Tokio, Japón), analizándose la intensidad de cada marcaje individualmente mediante el software de análisis de imágenes Image J/Fiji (111).

### *1.3 Western-blotting*

Para la obtención de homogeneizados de tejido prostático se utilizó el método descrito en el apartado 5.1 del capítulo 1. En el caso de las muestras procesadas para la identificación de VEGF se utilizó el mismo tampón descrito en ese apartado, mientras las muestras procesadas para la detección de Receptor de VEGF, se utilizó un tampón RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Nonidet P-40, 0.25% desoxicolato de sodio, 0.05% dodecilsulfato sódico (SDS), 150 mM NaCl, 1 mM, EDTA, suplementado con inhibidores de proteasas).

La concentración de proteínas extraídas de los tejidos prostáticos se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford (110) usando una recta patrón de BSA. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Los geles se constituyeron con acrilamida al 12,5% (w:v), practicándose la electroforesis a un voltaje constante de 180 V. Tras la electroforesis, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La transferencia de proteína se comprobó mediante la tinción de rojo Ponceau al 0,1% (w:v). A continuación, se lavó la tinción realizando 3 lavados de 10 minutos con PBS y se procedió al bloqueo de las uniones no específicas incubando la membrana en una solución de PBS, Tween 0,1% (v:v) y BSA 4% (w:v) con agitación suave a TA durante 1 hora. Después del bloqueo, las membranas se incubaron a 4°C toda la noche con el anticuerpo anti-VEGF de ratón (Novus Biologicals,) o anti-receptor VEGF de conejo (Novus Biologicals) a una dilución 1:1000 en la solución de bloqueo anteriormente descrita. Nuevamente se realizaron lavados y se incubaron con el

anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora. En el caso del VEGF, se incubó con anticuerpo secundario conejo anti-ratón (Dako; Glostrup, Dinamarca) y en el caso del VEGF-R se incubó con burro anti-conejo (Santacruz Biotechnology). La unión de los anticuerpos se visualizó por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial "Western blotting luminol reagent" (Santa Cruz Biotechnology) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, utilizando para ello un sistema de procesamiento de imágenes LAS-3000 Imaging System Luminescent Image Analyzer (Fujifilm) y en los casos en los que se utilizó el revelado manual, las membranas se incubaron con el luminol durante 1 minuto (siguiendo las instrucciones del fabricante) y posteriormente se ponían en un chasis de radiografía entre dos plásticos para evitar que el líquido quedara en contacto directo con las películas fotográficas (AGFA; Mortsel, Bélgica), se dejaban entre 5 y 15 minutos y tras la inmersión en el líquido de revelado y fijación, se dejaron secar. Una vez secas, las láminas se escanearon para ser posteriormente analizadas, midiendo la intensidad de la banda con el software imageJ/fiji (111). Una vez reveladas, las membranas se incubaron a TA con tampón de "stripping" (pH 2,2) compuesto de glicina 1,5% (w:v), dodecil sulfato sódico (SDS) 1% (w:v) y Tween 20 al 1% (v:v) durante 5 minutos. Una vez retirado el tampón de "stripping", se incubó nuevamente con más tampón de "stripping" limpio durante 5 minutos. Posteriormente se realizaron dos lavados de 10 minutos con PBS y dos lavados con PBS con Tween 20 al 0,01% (v:v). Una vez finalizado este procedimiento, se bloqueó nuevamente la membrana con solución de bloqueo durante 1 hora y se incubó nuevamente con anticuerpo primario. En este caso se utilizó anti- $\alpha$ -tubulina (Ig M Mouse, Thermo-Scientific; Waltham, USA) incubando toda la noche. A continuación se realizaron lavados como se indicó anteriormente y se incubó nuevamente con anticuerpo secundario conejo-anti ratón (Dako), procediendo después a revelar las membranas. Una vez obtenidas las imágenes, se realizaron las mediciones de la intensidad de cada banda utilizando el software image J/fiji (111) y la medición para calcular el peso de cada banda se realizó utilizando la herramienta online pixel ruler de RapidTables (<https://www.rapidtables.com/web/tools/pixel-ruler.html>).

### *1.4 Medición de Testosterona*

Para la medición de la testosterona se utilizó el kit Testosterone rat/mouse ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH; Kiel, Alemania) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se depositó en cada pozo un volumen de 10  $\mu$ L tanto de cada calibrador como

de muestra y de control. Posteriormente se agregó el tampón de incubación, 100  $\mu$ L en cada pocillo, y después 50  $\mu$ L de conjugado enzimático en cada pocillo. A continuación se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente en un mezclador de microplacas. Al terminar el tiempo de incubación se desechó el contenido de los pocillos y se lavó 4 veces con solución de lavado (300  $\mu$ L por pocillo). Se retiró la solución de lavado golpeando la microplaca sobre papel absorbente. Una vez retirada la solución de lavado, se agregó un volumen de 200  $\mu$ L de solución de sustrato a cada pocillo. Nuevamente se incubó durante 30 minutos en la oscuridad y sin agitar. Para detener la reacción se adicionaron 50  $\mu$ L de solución de parada a cada pocillo. La absorbancia se determinó a 450 nm con el lector iEMS reader mf v.2.9-0 (Labsystems; Oy, Finland) y el valor de cada muestra se estableció utilizando la curva de los valores de calibración.

## Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso del software SPSS<sup>®</sup> versión 25.0 para Windows (IBM Corp.; Armonk, USA). En primer lugar, se analizó la existencia o no de normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos mediante la aplicación del test Shapiro-Wilk para la normalidad y el Levene para la homogeneidad. No se apreciaron distribuciones no normales, por lo que no se requirió ninguna transformación previa de datos. En todos los casos, se analizó el efecto de la edad de los animales (1 mes, 3 meses, 6 meses y 12 meses) sobre los parámetros estudiados mediante la aplicación de un análisis de varianza de doble vía (ANOVA), seguido por un test post-hoc de Sidac. En todos los análisis, el nivel de significación se estableció con una  $P < 0,05$ , expresándose en todos los casos los datos en forma de medias  $\pm$  S.E.M.

## Reactivos

En los casos en los que no se haya mencionado en el texto, los reactivos utilizados provinieron de las casas comerciales Panreac Química, S.L.U. (Barcelona, España), Química Clínica Aplicada, S.L. (Barcelona; España) y MAIM, S.L. (Barcelona; España).



## RESULTADOS

### Detección histopatológica de hiperplasia prostática benigna en próstatas de ratas de diferentes edades

El estudio histológico del tejido prostático en ratas prepúberes mediante la tinción de H&E mostró la presencia ya conocida de un epitelio ductal tubular formado por una capa de células cuboides rodeada por un mesénquima con células conjuntivales y vasos sanguíneos, además de la presencia de un contenido tubular amorfo, acelular y reactivo a la tinción (Figura 4 A y B). Esta imagen se vio poco modificada en animales de 3 meses y 6 meses de edad, aunque el diámetro de los ductos en estos animales pareció sensiblemente mayor que el observado en ratas de 1 mes (Figura 4 C y D). De todas maneras, hay que destacar que algunos individuos de 6 meses de edad empezaron a mostrar signos de hiperplasia al detectarse la presencia, puntual y muy focalizada, de ductos con más de una capa acumulada de células epiteliales (Figura 4 C y D).

La presencia de hiperplasia se generalizó en los individuos de 12 meses de edad. En este caso, todos los animales analizados mostraron áreas más o menos grandes con presencia de ductos en los cuales aparecían de 2 a 4 capas superpuestas de células epiteliales ductales, signo evidente de hiperplasias localizadas (Figura 4 E y F). El tamaño y la cantidad de capas de estas zonas fueron muy variables, aunque los focos hiperplásicos aparecían en todos los animales estudiados, como ya se ha dicho. Por otra parte, el estudio de las zonas mesenquimales parecía mostrar un incremento de la vascularización con la presencia de numerosos capilares, especialmente alrededor y dentro de los focos de hiperplasia (Figura 4 E). Por lo tanto, estos resultados indicaron que algunos animales de 6 meses y todos los de 12 meses estudiados mostraban signos histopatológicos evidentes de HPB en diferentes estados de desarrollo.

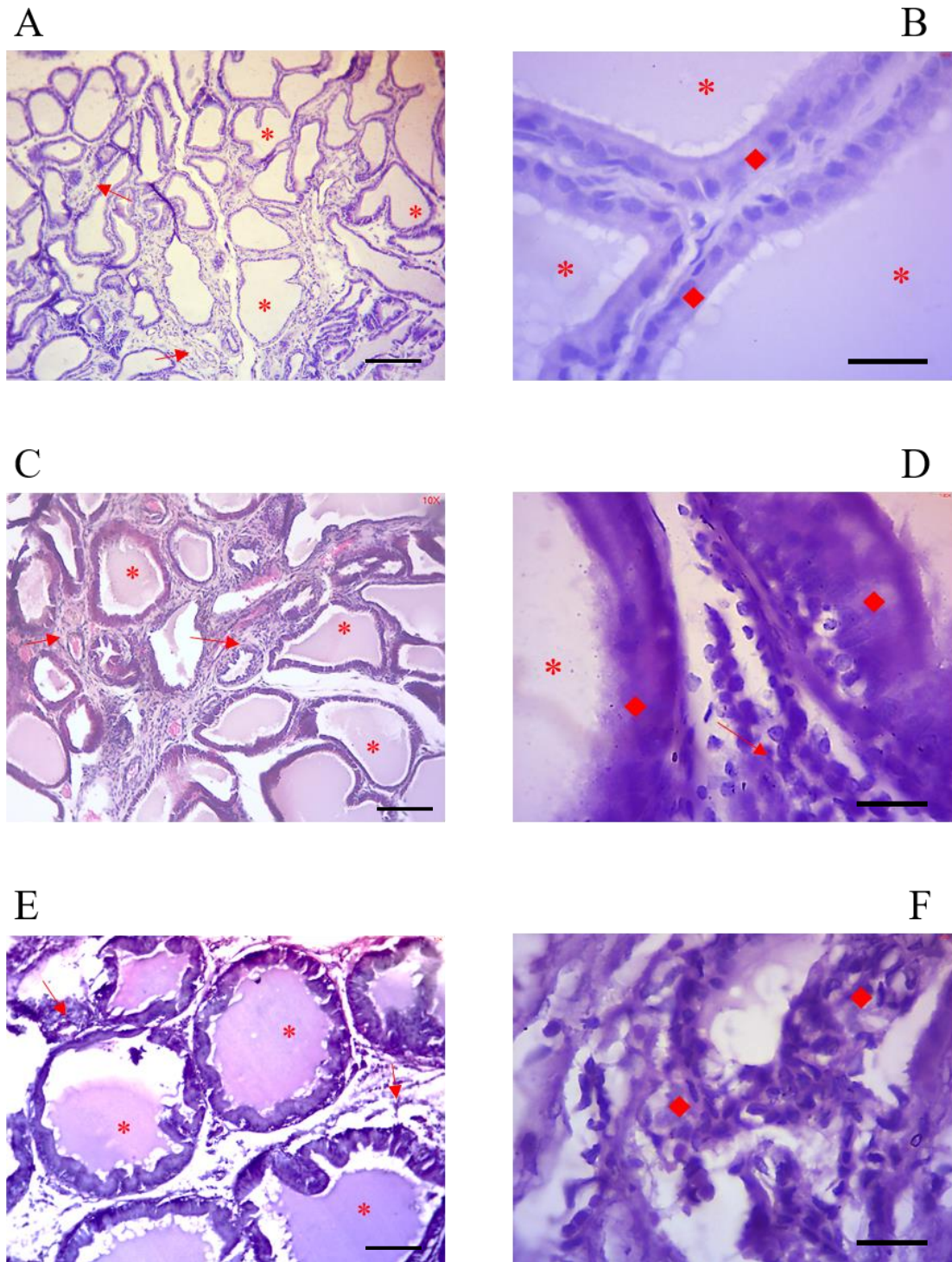


Figura 4. Tejido prostático de ratas de 1 mes, 6 meses y 12 meses teñidos con la técnica hematoxilina/eosina. Muestras de tejidos prostáticos de ratas de 1 mes (A,B), 6 meses (C,D) y 12 meses (E,F) fueron procesadas y teñidas con la técnica de hematoxilina/eosina tal y como se describe en el punto 3 del Capítulo 1 del apartado de Material y Métodos: A,C,E: imágenes a un aumento final de 100X. B,D,F: imágenes a un aumento final de 1000X. Asteriscos (\*): luz de los ductos prostáticos. Flechas (→): tejido intersticial. Rombos (◆): epitelio ductal. D: imagen de un punto focalizado con inicio de hiperplasia (no generalizado en ratas de 6 meses) Se muestran imágenes representativas de todos los animales estudiados en este trabajo con la edad reseñada. Las barras de las imágenes A, C y E representan 100  $\mu$ m de longitud, mientras las barras de las imágenes B, D y F equivale a 20  $\mu$ m de longitud.

## Variaciones de los niveles de testosterona sérica en grupos de ratas de diferentes edades

Tal y como se muestra en la Figura 5, las ratas de 1 mes de vida mostraron unos niveles bajos de testosterona sérica ( $0,77 \pm 0,12$  ng/mL). Estos niveles se incrementaron significativamente. ( $P < 0,05$ ) en ratas de 3 meses de edad, con unos valores medios de  $2,41 \pm 0,25$  ng/mL. Los valores determinados en animales de 3 meses se mantuvieron sin cambios significativos en los animales de 6 meses y de 12 meses de vida (Figura 5).

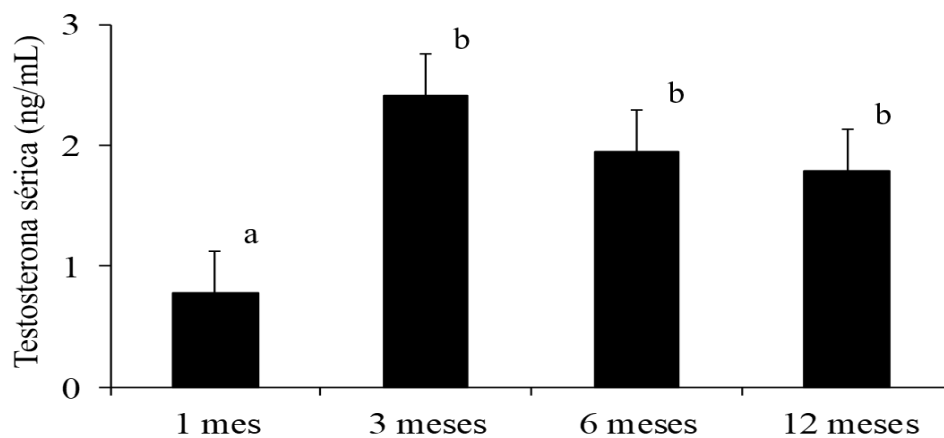


Figura 5. Niveles de testosterona sérica en ratas de 1 mes, 3 meses, 6 meses y 12 meses de vida. La técnica de determinación de testosterona se ha descrito en el punto 5.2 del capítulo 2 del apartado de Material y Métodos. Los resultados se muestran como medias  $\pm$  S.E.M. de 12 animales distintos. Diferentes letras en cada columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre grupos.

## Detección de contenido polisacárido extraductal en próstatas de ratas de diferentes edades mediante tinción de PAS

La tinción de PAS dio como resultado la presencia de un contenido intraductal fuertemente positivo en todos los grupos de edad estudiados (Figura 6). Asimismo, las células epiteliales de todos los grupos de edad también mostraron una tinción PAS+ (Figura 6). La incubación previa de tejidos prostáticos de ratas de 3 meses con  $\alpha$  amilasa antes de llevar a cabo la tinción de PAS provocó una pérdida importante, a menudo total, de la reacción PAS+ intraductal (Figura 6 B). Un resultado similar se observó con la incubación previa con amiloglucosidasa (Figura 7 D). Hay que destacar que en ambos



## Resultados

casos se apreció igualmente una pérdida evidente, aunque no total, de la señal PAS+ en la incubación con el medio de dilución de la amiloglucosidasa sin añadir el enzima (Figura 7 A y C). La incubación previa de las muestras con proteinasa K antes de incubar con  $\alpha$  amilasa o amiloglucosidasa no varió los resultados (Fig. E-H).

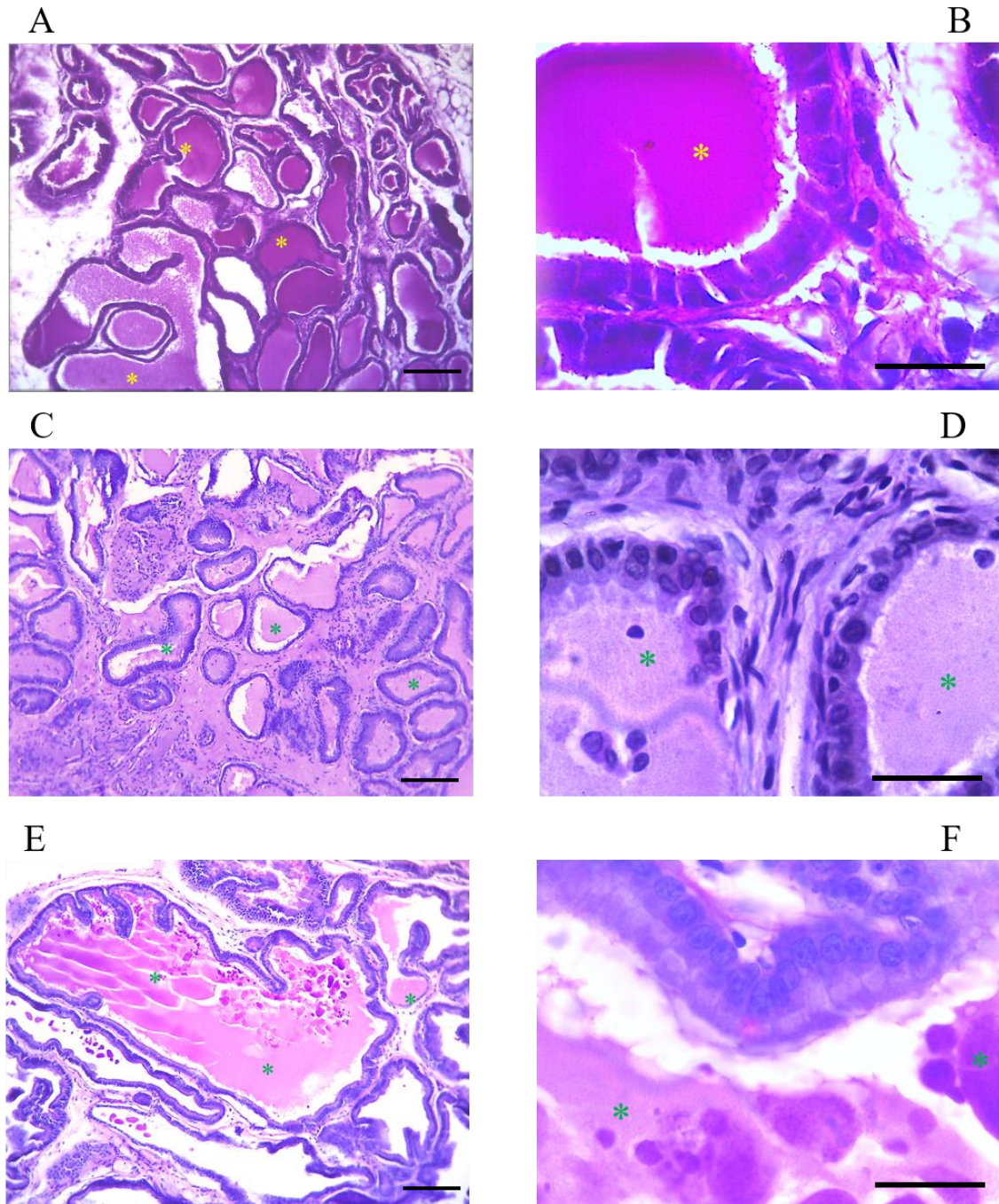


Figura 6. Tejidos prostáticos de ratas de diferentes edades teñidos con la técnica del PAS. La técnica ha sido descrita en el punto correspondiente dentro del apartado de Material y Métodos. La Figura muestra imágenes representativas de tejidos prostáticos de ratas de 1 mes (A,B), 3 meses (C,D) y 12 meses de vida (E,F), a los aumentos de 400X (A,C,E) y 1000X (B,D,F). Los asteriscos indican zonas intraductales con contenido PAS+. Las barras de las imágenes A, C y E representan 100  $\mu$ m de longitud, mientras las barras de las imágenes B, D y F equivale a 20  $\mu$ m de longitud.

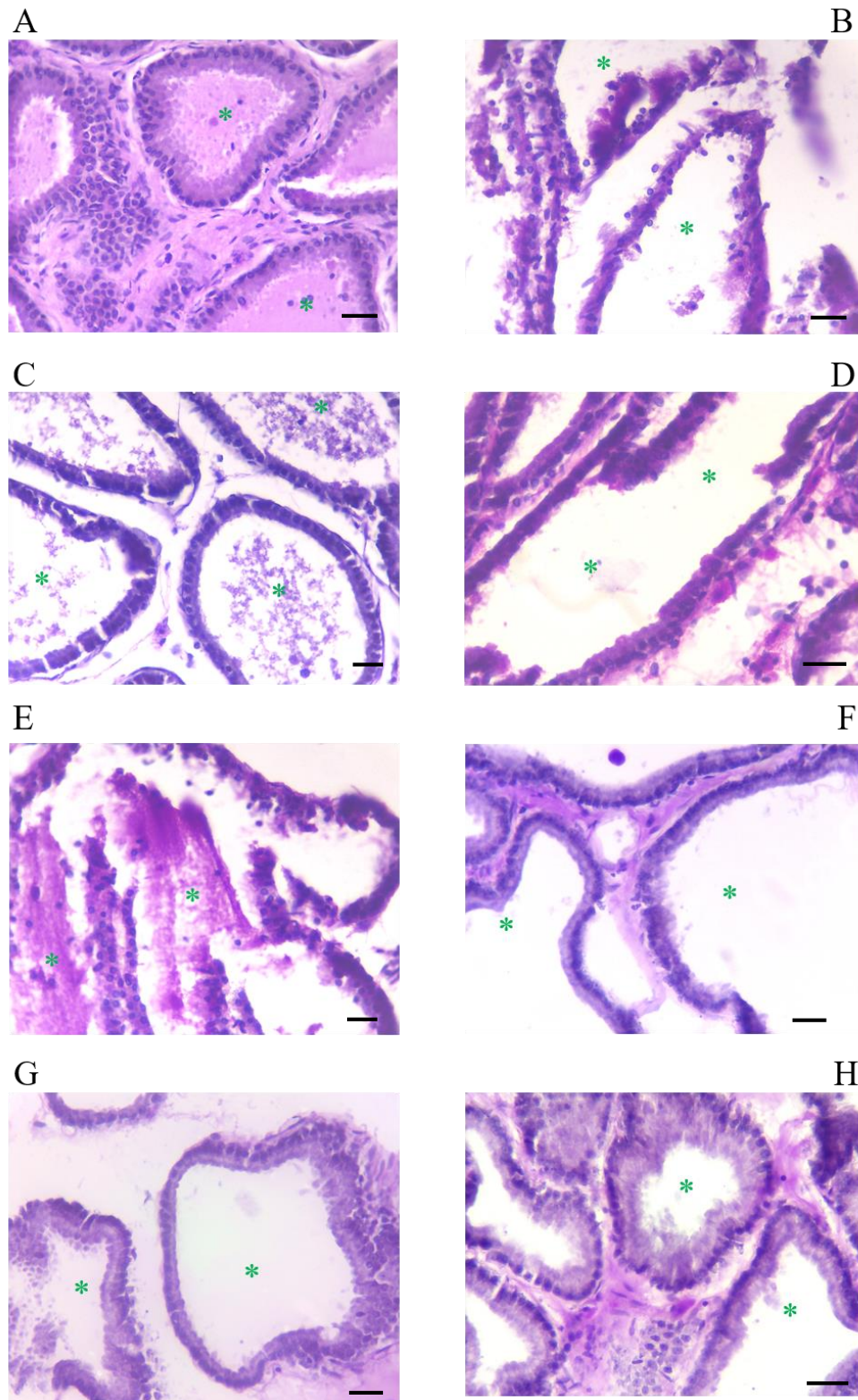


Figura 7. Tejidos prostáticos de ratas de 3 meses de edad preincubados con  $\alpha$  amilasa o amilglucosidasa en presencia o ausencia de proteinasa K y posteriormente teñidos con la técnica de PAS. La técnica ha sido descrita en el punto 3.2 del capítulo 1 del apartado de Material y Métodos. La Figura muestra imágenes representativas de tejidos prostáticos de ratas de 3 meses preincubados con  $\alpha$  amilasa (B,F) o amilglucosidasa (D,G) en ausencia (B,D) o presencia (F,G) de proteinasa K. A: control incubado con la solución de dilución de la  $\alpha$  amilasa pero sin el enzima. C: control incubado con la solución de dilución de la amilglucosidasa pero sin el enzima. E: Muestra tratada con proteinasa K en presencia de la solución de dilución de la  $\alpha$  amilasa. G: Muestra tratada con proteinasa K en presencia de la solución de dilución de la amilglucosidasa. Todas las imágenes se muestran a los aumentos de 400X. Los asteriscos indican zonas intraductales con contenido PAS+. La barra en la imagen equivale a 20  $\mu$ m de longitud.

## Liberación de glucosa por parte de extractos prostáticos incubados en presencia de $\alpha$ -amilasa, amiloglucosidasa o N-glucosidasa

La incubación durante 2 horas de extractos prostáticos con  $\alpha$ -amilasa o amiloglucosidasa se tradujo en una formación significativa de glucosa libre, que alcanzó valores de 1,44 nM/mg de proteína  $\pm 0,01$  en el caso de la  $\alpha$ -amilasa y de 1,16 nM/mg de proteína  $\pm 0,01$  en el de la amiloglucosidasa (Figura 8). En cambio, la incubación con N-glucosidasa durante 2 horas apenas se tradujo en la formación de glucosa libre, alcanzando valores de sólo 0,40 nM/mg de proteína  $\pm 0,01$  (Figura 8).

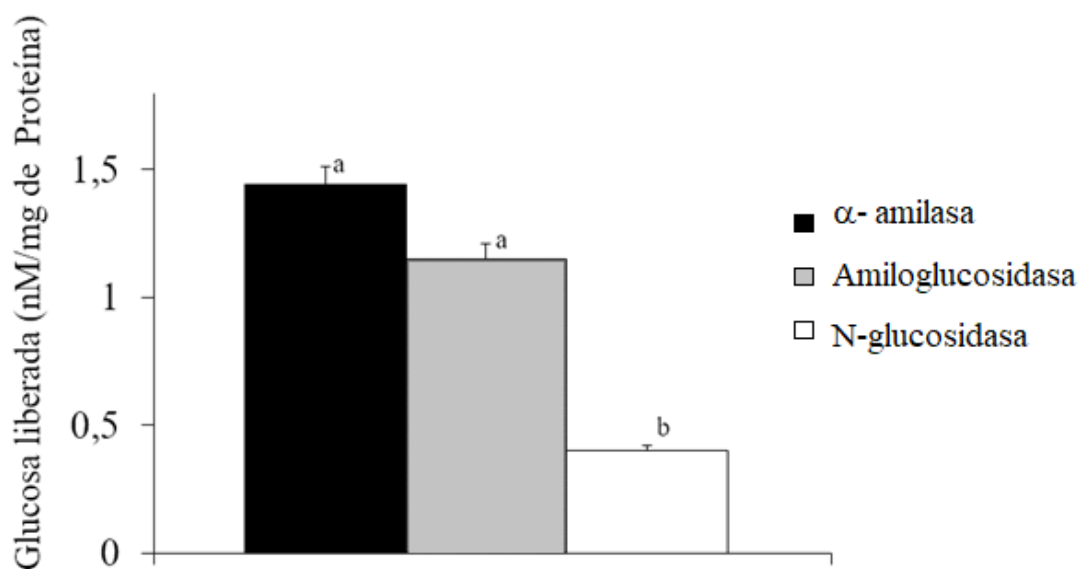


Figura 8. Liberación de glucosa por parte de extractos prostáticos incubados con  $\alpha$ -amilasa, amiloglucosidasa o N-glucosidasa. La preparación de los extractos y su posterior incubación con los enzimas glucosídicos se han descrito en el punto 5.1 y 5.2 del capítulo 1 del apartado de Material y Métodos. Barra negra: muestras incubadas con  $\alpha$ -amilasa. Barra gris muestras incubadas con amiloglucosidasa. Barra blanca: muestras incubadas con N-glucosidasa. Letras diferentes indican la existencia de diferencias significativa ( $P < 0,05$ ) entre los grupos experimentales. La Figura representa las medias  $\pm$  S.E.M. de cinco experimentos diferentes realizados con ratas de diversas edades.

## Expresión intracelular de glucógeno sintasa en tejido prostático de ratas de diferentes edades

Los tejidos prostáticos de ratas prepúberes mostraron una expresión muy baja o ausente de glucógeno sintasa en las células prostáticas ductales (Figura 9 A y B). En cambio, las ratas de 6 meses de edad mostraron algunas células epiteliales de los ductos con un marcaje nítido del enzima (Figura 9 C y D). Este marcaje puntual nítido aún fue más intenso y observado en un número mayor de células en animales de 12 meses de edad (Figura 9 E y F). No se apreció marcaje positivo para la glucógeno sintasa en la luz ductal en ninguno de los grupos de edad estudiados (Figura 9).

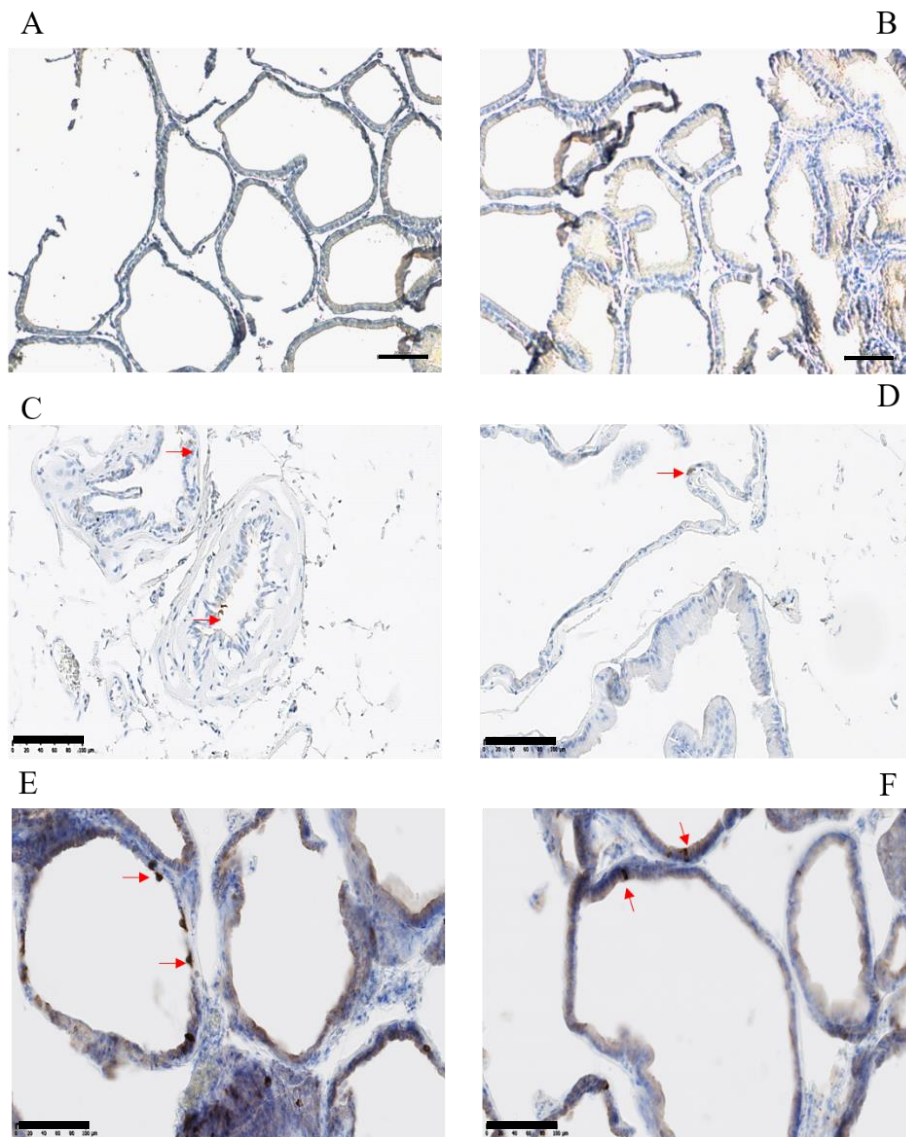


Figura 9. Inmunolocalización de glucógeno sintasa en ductos prostáticos de ratas de 1 mes, 6 meses y 12 meses de vida. La Figura muestra imágenes representativas de ratas de 1 mes (A,B), 6 meses (C,D) y 12 meses de vida (E,F). Todas las imágenes están tomadas a 200x aumentos. Flechas: presencia de células epiteliales con un fuerte marcaje positivo a glucógeno sintasa. La barra en la imagen, equivale a 100  $\mu\text{m}$  de longitud.

## Cambios relacionados con la edad en la expresión relativa de citoquinas en tejido prostático

La determinación de los valores relativos de expresión de diversas citoquinas en tejido prostático mediante mini-arrays en ratas de 1 mes de vida mostraron, en general, una expresión más o menos intensa de todas las proteínas analizadas en la muestras (Tabla 6) (Figuras 10 y 11).

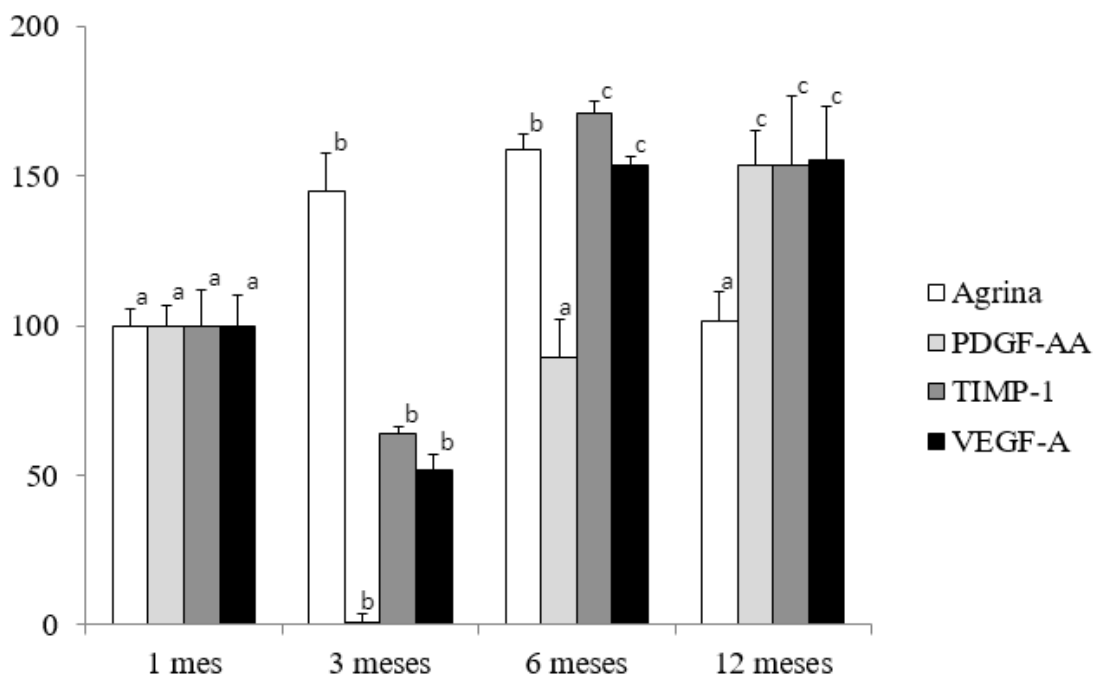


Figura 10. Expresión relativa de agrina, PDGF-AA, TIMP-1 y VEGF-A determinado mediante mini-arrays en tejido prostático de rata. El tratamiento de las muestras y la determinación mediante mini-arrays han sido descritos en el punto 1.2 del capítulo 2 de Material y Métodos. Los resultados se expresan en forma de medias  $\pm$  S.E.M. de 5 experimentos diferentes. Además, los datos se expresan en forma de unidades arbitrarias, tomando el valor estándar de 100 para las intensidades medias de las citoquinas de ratas de 1 mes de edad. La edad de los animales de cada grupo experimental se muestra en el encabezamiento de las columnas. Diferentes superíndices en una fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre cada uno de los grupos de edad en una citoquina específica. Barras blancas: agrina. Barras gris claro: PDGF-AA. Barras gris medio: TIMP-1. Barras negras: VEGF-A.

Cuando se compararon estos resultados con los obtenidos en ratas de 3 meses de vida se observó una disminución prácticamente generalizada en la expresión de la gran mayoría de citoquinas, llegando incluso a casi desaparecer algunas de ellas, como el FAS ligand, IFN- $\gamma$  o las interleuquinas IL-1  $\beta$ , IL-1 R6, IL-2, IL-4 e IL-13 (Tabla 6, Figuras 10 y 11). De hecho, solamente se observó un incremento significativo en la expresión de agrina en ratas de 3 meses cuando se compararon con las de 1 mes de vida (Figura 10). Al aumentar la edad de los animales analizados se mantuvo este descenso, con la excepción de la

agrina, el PDGF-AA, el TIMP-1 y el VEGF-A. Así, la agrina mantenía una expresión significativamente incrementada ( $P<0,05$ ) en ratas de 6 meses de edad cuando se comparaban con ratas de 1 mes ( $158,6\pm 9,7$  unidades arbitrarias en ratas de 6 meses vs.  $100,0\pm 5,5$  unidades arbitrarias en ratas de 1 mes, ver Figura 11), aunque este incremento desaparecía en ratas de 12 meses de vida. Por el contrario, el PDGF-AA solamente mostraba un incremento significativo ( $P<0,05$ ) de su intensidad relativa en animales de 12 meses de edad ( $153,6\pm 11,3$  unidades arbitrarias en ratas de 6 meses vs.  $100,0\pm 9,9$  unidades arbitrarias en ratas de 1 mes, ver Figura 10), mientras que tanto el TIMP-1 como el VEGF-A mostraban incrementos significativos ( $P<0,05$ ) de su expresión relativa respecto a los animales de 1 mes en ratas tanto de 6 meses como de 12 meses de vida (Figura 10).

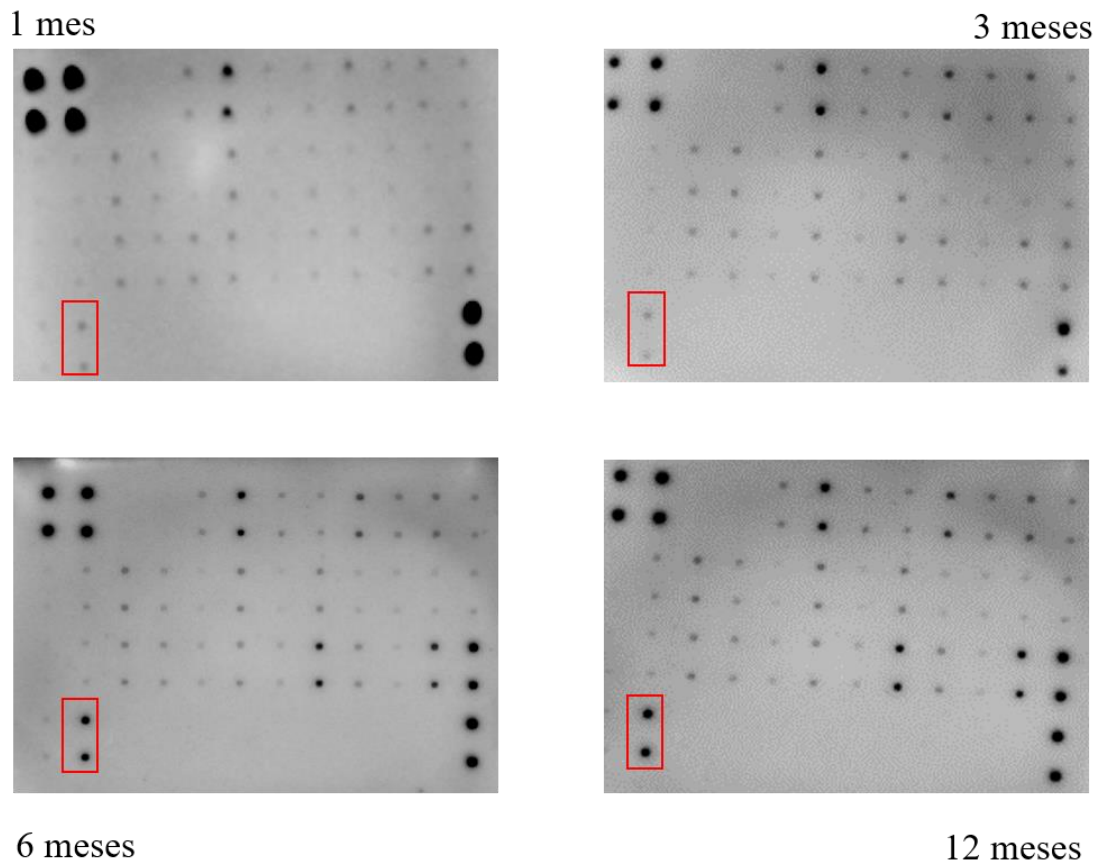


Figura 11. Mini arrays representativos de extractos de tejido prostático de ratas de 1 mes (1 mes), 3 meses (3 meses), 6 meses (6 meses) y doce meses de vida (12 meses). La Figura muestra un mini array representativo de cada grupo del total de los 5 animales analizados por cada grupo de edad. El recuadro rojo marca la posición de la VEGF-A.

Tabla 6. Expresión relativa de un panel de citoquinas determinado mediante mini-arrays en tejido prostático de rata (abreviaturas de las citoquinas definidas en el esquema de membrana, Figura 3).

	Ratas 1 mes	Ratas 3 meses	Ratas 6 meses	Ratas 12 meses
Activina A	100,0±5,5 <sup>a</sup>	46,3±3,6 <sup>b</sup>	48,7±3,4 <sup>b</sup>	38,4±6,2 <sup>b</sup>
CD86 (B7-2)	100±5,6 <sup>a</sup>	14,2±2,3 <sup>b</sup>	29,9±2,8 <sup>b</sup>	10,0±8,2 <sup>b</sup>
β-NGF	100±7,2 <sup>a</sup>	22,4±1,5 <sup>b</sup>	12,2±2,5 <sup>c</sup>	I.F.
CINC-1 (CXCL1)	100±1,4 <sup>a</sup>	71,5±2,8 <sup>b</sup>	77,4±2,9 <sup>b</sup>	54,1±5,5 <sup>c</sup>
CINC-2	100±6,1 <sup>a</sup>	49,9±2,1 <sup>b</sup>	49,3±2,3 <sup>b</sup>	26,6±7,4 <sup>c</sup>
CINC-3	100±7,4 <sup>a</sup>	79,7±3,1 <sup>b</sup>	64,0±5,4 <sup>c</sup>	46,4±9,1 <sup>d</sup>
CNTF	100±10,4 <sup>a</sup>	52,8±2,8 <sup>b</sup>	53,5±3,4 <sup>b</sup>	11,2±7,4 <sup>c</sup>
FAS ligand (TNFSF6)	100±10,1 <sup>a</sup>	I.F.	39,4±18,2 <sup>b</sup>	12,0±9,1 <sup>b</sup>
Fractalkina (CX3 CL1)	100±10,7 <sup>a</sup>	21,1±6,0 <sup>b</sup>	44,9±5,4 <sup>c</sup>	37,2±9,5 <sup>c</sup>
GM-CSF	100±7,5 <sup>a</sup>	62,8±4,2 <sup>b</sup>	75,4±4,7 <sup>c</sup>	62,1±7,8 <sup>b</sup>
ICAM-1 /CD54)	100±7,3 <sup>a</sup>	20,5±4,3 <sup>b</sup>	46,3±4,3 <sup>c</sup>	26,3±8,7 <sup>b</sup>
IFN-γ	100±10,7 <sup>a</sup>	I.F.	I.F.	I.F.
IL-1 α (IL-1 F1)	100±6,4 <sup>a</sup>	55,9±4,5 <sup>b</sup>	99,5±7,0 <sup>a</sup>	38,5±7,3 <sup>c</sup>
Il-1 β (IL-1 F2)	100±9,7 <sup>a</sup>	I.F.	I.F.	I.F.
Il-1 R6 (IL-1 Rrp2)	100±6,5 <sup>a</sup>	I.F.	35,4±5,5 <sup>b</sup>	I.F.
IL-2	100±8,7 <sup>a</sup>	I.F.	I.F.	I.F.
IL-4	100±9,1 <sup>a</sup>	I.F.	I.F.	I.F.
IL-6	100±10,9 <sup>a</sup>	13,6±3,3 <sup>b</sup>	I.F.	I.F.
IL-10	100±11,0 <sup>a</sup>	40,5±4,9 <sup>b</sup>	59,8±7,0 <sup>c</sup>	I.F.
IL-13	100±10,9 <sup>a</sup>	I.F.	I.F.	I.F.
Leptin	100±11,9 <sup>a</sup>	I.F.	I.F.	I.F.
LIX	100±10,8 <sup>a</sup>	44,9±7,2 <sup>b</sup>	78,1±4,1 <sup>c</sup>	41,1±9,7 <sup>b</sup>
L-selectin (CD 62L)	100±10,3 <sup>a</sup>	6,1±3,8 <sup>b</sup>	27,3±5,8 <sup>c</sup>	15,3±8,6 <sup>bc</sup>
MCP-1 (CCL2)	100±11,3 <sup>a</sup>	18,5±3,0 <sup>b</sup>	35,0±3,5 <sup>c</sup>	3,7±2,0 <sup>d</sup>
MIP-3α (CCL20)	100±7,7 <sup>a</sup>	23,3±2,7 <sup>b</sup>	57,3±3,6 <sup>c</sup>	21,6±8,2 <sup>b</sup>
MMP-8	100±9,7 <sup>a</sup>	I.F.	I.F.	I.F.
Receptor de prolactina	100±7,1 <sup>a</sup>	27,7±7,7 <sup>b</sup>	123,39±13,4 <sup>c</sup>	17,0±7,8 <sup>b</sup>
RAGE	100±11,5 <sup>a</sup>	I.F.	I.F.	I.F.
TCK-1 (CXCL1)	100±10,7 <sup>a</sup>	63,3±4,8 <sup>b</sup>	94,7±3,8 <sup>a</sup>	85,5±8,5 <sup>a</sup>
TNF α	100±11,2 <sup>a</sup>	I.F.	35,6±14,4 <sup>b</sup>	I.F.

## Diferencias entre ratas púberes y adultas expresión relativa de citoquinas en suero sanguíneo

Los resultados observados en la expresión relativa de citoquinas y quimioquinas en suero de ratas de tres meses, comparadas con ratas de 12 meses, mostraron un patrón de expresión diferente al observado en el tejido prostático. Así, de todas las citoquinas/quimioquinas que no mostraban expresión significativa en tejido prostático de ratas de 3 meses, solamente la IL-1 $\beta$  y la IL-13 mantenían esta falta de expresión (Figura 13, Tabla 7). En cambio, proteínas que sí mostraban expresión en tejido prostático a los 3 meses, como la CNTF y la PDGF-AA, desaparecían prácticamente en muestras de suero de la misma edad (Figuras 12 y 13, Tabla 7).

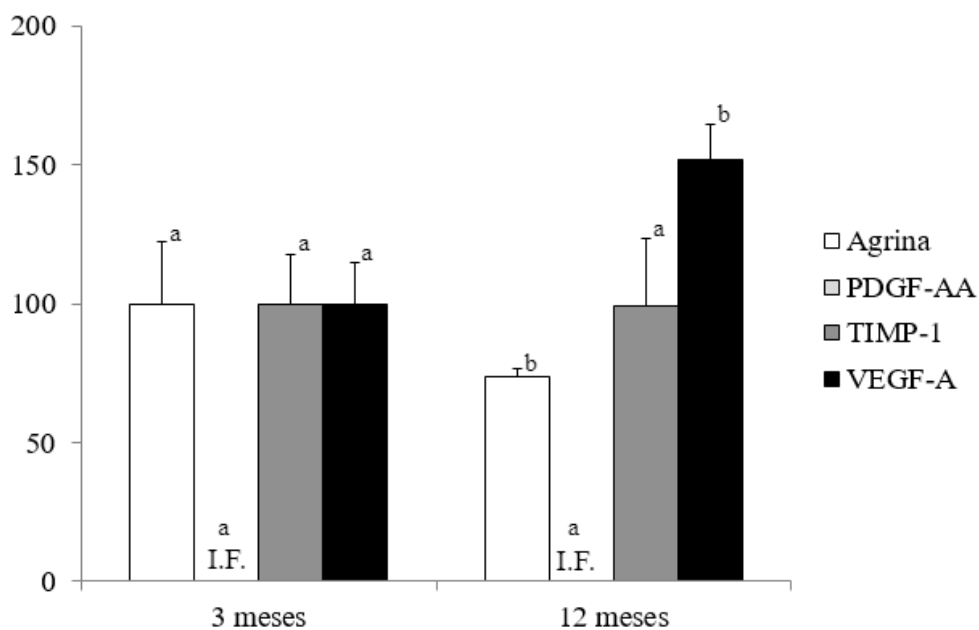


Figura 12. Expresión relativa de agrina, PDGF-AA, TIMP-1 y VEGF-A determinado mediante mini-arrays en suero de rata. El tratamiento de las muestras y la determinación mediante mini-arrays han sido descritos en el punto 1.2 del capítulo 2 de Material y Métodos. Los resultados se expresan en forma de medias $\pm$ S.E.M. de 5 experimentos diferentes. Además, los datos se expresan en forma de unidades arbitrarias, tomando el valor estándar de 100 para las intensidades medias de las citoquinas de ratas de 3 meses de edad. La edad de los animales de cada grupo experimental se muestra en el encabezamiento de las columnas. Diferentes superíndices en una fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre cada uno de los grupos de edad en una citoquina específica. Barras blancas: agrina. Barras gris claro: PDGF-AA. Barras gris medio: TIMP-1. Barras negras: VEGF-A. I.F. indica valores que, en media, no se diferenciaban de los valores de intensidad promedios del fondo.



## Resultados

Por otra parte, al comparar los resultados entre las expresiones séricas en ratas de 3 meses y de 12 meses, el comportamiento de la mayoría de citoquinas/quimioquinas también fue diferente al observado en tejido prostático. Así, por ejemplo mientras que elementos como el FAS ligand, la IL-2, la L-selectina o el TNF- $\alpha$  incrementaban en más de 10 veces su expresión en sueros de ratas de 3 meses, en tejido prostático o bien no aparecían de manera significativa ni a los 3 ni a los 12 meses, caso de la IL-2 y el TNF- $\alpha$ , o bien no aparecían a los 3 meses y sólo de manera modesta a los 12 meses, como el FAS ligand, o bien si aparecían con una expresión baja, que no fue mucho mayor a los 12 meses, caso de la L-selectina (Figura 12, Tabla 7).

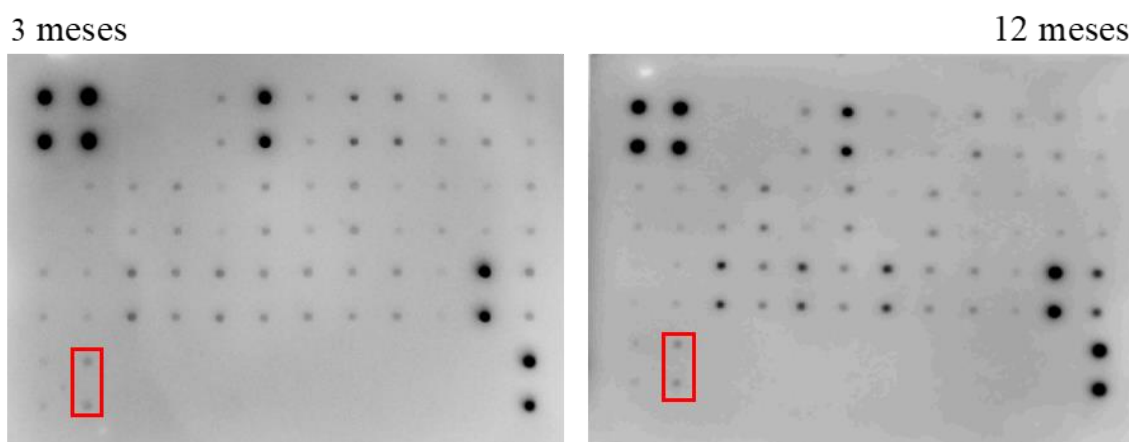


Figura 13. Mini arrays representativos de sueros sanguíneos de ratas de 3 meses (3 meses) y doce meses de vida (12 meses). La Figura muestra un mini array representativo de cada grupo del total de los 5 animales analizados por cada grupo de edad. El recuadro rojo marca la posición de la VEGF-A.

Esta disparidad entre los resultados en tejido prostático y en suero se mantenía en la mayoría de proteínas analizadas con excepciones como el caso de la activina y el VEGF-A. Así, centrándonos en la expresión sérica del VEGF-A, se pudo observar un incremento significativo ( $P < 0,05$ ), aunque modesto, en dicha expresión al comparar ambos grupos de animales ( $151,7 \pm 12,8$  Unidades Arbitrarias en ratas de 12 meses vs.  $100 \pm 14,8$  Unidades Arbitrarias en animales de 3 meses; ver Figura 12).

Tabla 7. Expresión relativa de un panel de citoquinas determinado mediante mini-arrays en suero de rata. (abreviaturas de las citoquinas definidas en el esquema de membrana, Figura 3).

	Ratas 3 meses	Ratas 12 meses
Activina A	100,0±16,3 <sup>a</sup>	71,7±12,9 <sup>a</sup>
CD86 (B7-2)	100±23,9 <sup>a</sup>	18,5±6,3 <sup>b</sup>
β-NGF	100±22,7 <sup>a</sup>	301,5±16,8 <sup>b</sup>
CINC-1 (CXCL1)	100±21,3 <sup>a</sup>	97,3±15,3 <sup>a</sup>
CINC-2	100±24,4 <sup>a</sup>	221,4±27,9 <sup>b</sup>
CINC-3	100±27,2 <sup>a</sup>	601,2±72,6 <sup>b</sup>
CNTF	I.F.	I.F.
FAS ligand (TNFSF6)	100±11,9 <sup>a</sup>	5096,4±105,9 <sup>b</sup>
Fractalkina (CX3 CL1)	100±9,0 <sup>a</sup>	I.F. <sup>b</sup>
GM-CSF	100±6,7 <sup>a</sup>	158,7±19,3 <sup>b</sup>
ICAM-1 /CD54)	100±18,0 <sup>a</sup>	118,5±19,6 <sup>a</sup>
IFN-γ	100±3,3 <sup>a</sup>	706,5±59,6 <sup>a</sup>
IL-1 α (IL-1 F1)	100±16,7 <sup>a</sup>	220,5±21,2 <sup>b</sup>
IL-1 β (IL-1 F2)	I.F.	I.F.
IL-1 R6 (IL-1 Rrp2)	100±22,7 <sup>a</sup>	567,4±29,7 <sup>b</sup>
IL-2	100±49,9 <sup>a</sup>	2998±31,1 <sup>b</sup>
IL-4	100±31,7 <sup>a</sup>	978,3±45,4 <sup>b</sup>
IL-6	100±38,3 <sup>a</sup>	856,9±45,4 <sup>b</sup>
IL-10	100±6,4 <sup>a</sup>	807,1±55,9 <sup>b</sup>
IL-13	I.F.	I.F.
Leptin	100±28,5 <sup>a</sup>	I.F.
LIX	100±17,3 <sup>a</sup>	154,7±14,7 <sup>b</sup>
L-selectin (CD 62L)	100±2,5 <sup>a</sup>	2924,0±25,0 <sup>b</sup>
MCP-1 (CCL2)	100±18,5 <sup>a</sup>	116,1±28,2 <sup>a</sup>
MIP-3α (CCL20)	100±21,8 <sup>a</sup>	341,6±11,5 <sup>b</sup>
MMP-8	100±24,2 <sup>a</sup>	186,0±8,7 <sup>b</sup>
Receptor de prolactina	100±30,1 <sup>a</sup>	695,0±37,1 <sup>b</sup>
RAGE	100±36,5 <sup>a</sup>	505,3±48,0 <sup>b</sup>
TCK-1 (CXCL1)	100±23,9 <sup>a</sup>	115,9±3,9 <sup>a</sup>
TNF α	100±7,4 <sup>a</sup>	3784,1±58,5 <sup>b</sup>

## Expresión y localización de VEGF en tejido prostático de ratas de diferentes edades

Los análisis mediante Western blotting determinaron la presencia específica de VEGF en tejido prostático de rata prepúber (Figura 14). El análisis de intensidad relativa de la banda específica de VEGF en relación al contenido de  $\alpha$ -tubulina indicó la ausencia de un incremento significativo en los niveles prostáticos de VEGF en ratas de 3 meses de edad al compararlas con las prepúberes (Figura 14). En cambio, sí se apreció un incremento significativo ( $P<0,05$ ) en los animales de 6 meses, que se hizo aún más manifiesto en los individuos de 12 meses de edad ( $199,6\pm 24,7$  unidades arbitrarias vs.  $100,0\pm 7,9$  unidades arbitrarias en ratas de 1 mes; ver Figura 14).

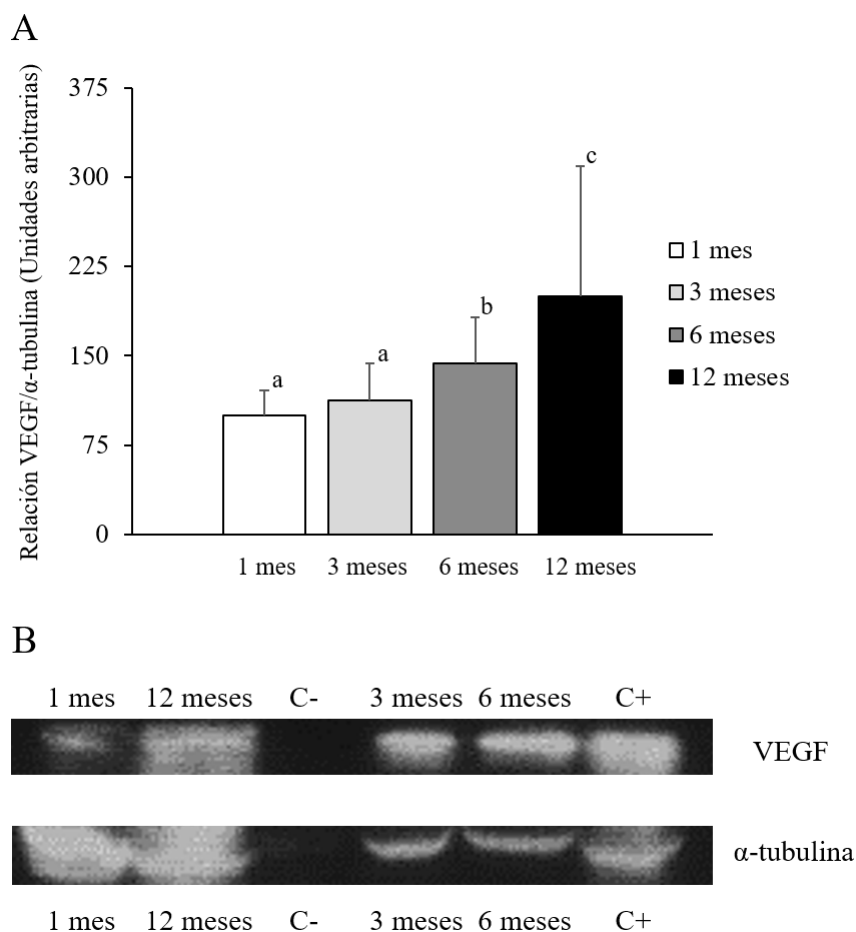


Figura 14. Expresión de VEGF-A en Tejidos prostáticos de ratas de diferentes edades. A): Cuantificación de la expresión relativa de VEGF-A en relación a la  $\alpha$ -tubulina en tejidos prostáticos de ratas de 1 mes (barra blanca), 3 meses (barra gris claro), 6 meses (barra gris oscuro) y 12 meses de edad (barra negra). La cuantificación se detalla en el punto 1.3 del capítulo 2 de Material y Métodos. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $P<0,05$ ) entre los grupos. Los resultados se expresan como medias $\pm$ S.E.M. de 7 animales en cada grupo experimental. B): Imágenes representativas en color invertido de las bandas específicas correspondientes a VEGF-A y  $\alpha$ -tubulina obtenidas de uno de los Western blotting realizados para el estudio. C- muestra de Control Negativo para VEGF-A (extracto entero de *E.coli*). C+: muestra de control positivo para VEGF-A (extracto de riñón de rata).

## Expresión del receptor de VEGF en tejido prostático de ratas de diferentes edades

El estudio de la expresión mediante Western blotting de la expresión del receptor de VEGF mostró su presencia específica en tejidos prostáticos de ratas de 1 mes de vida (Figura 15).

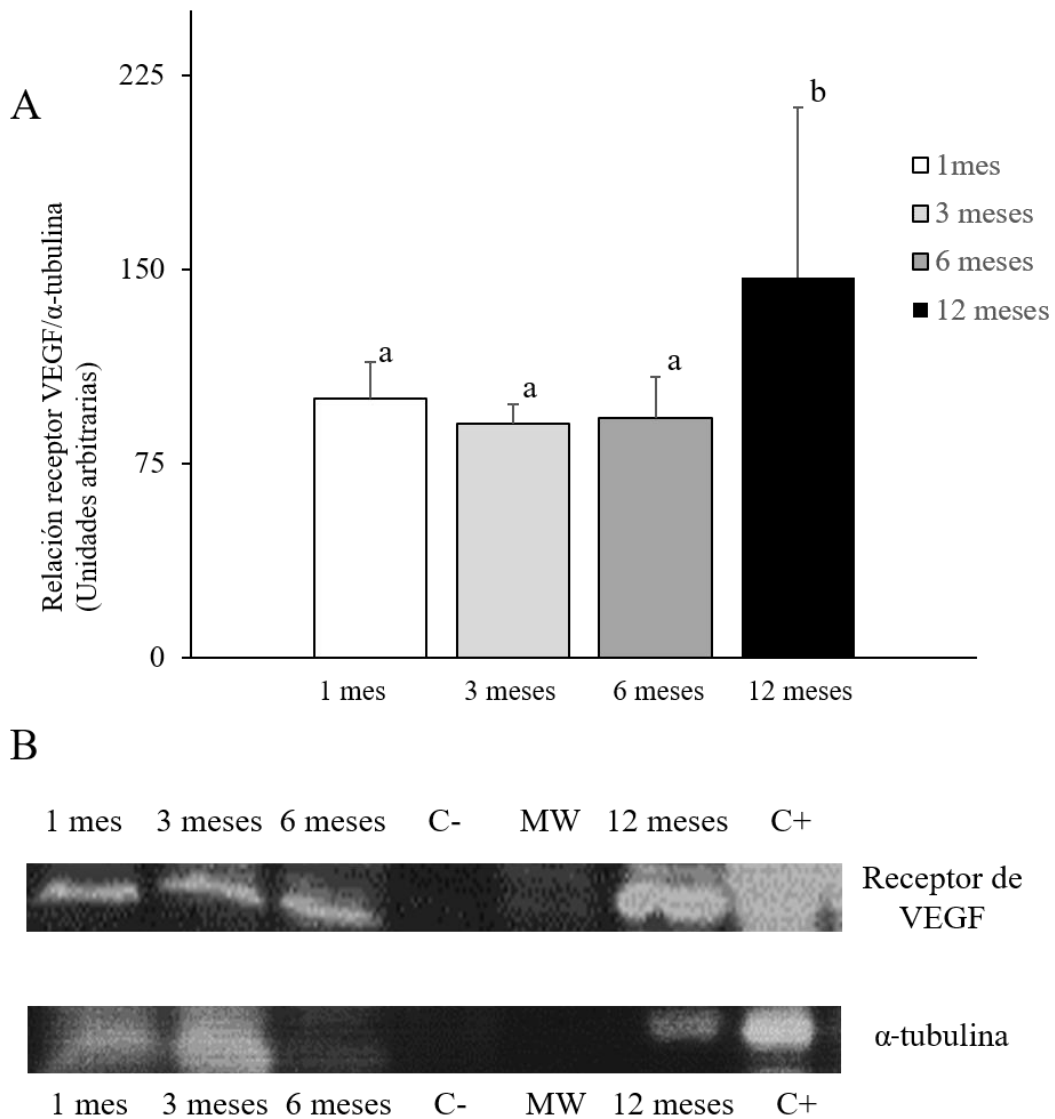


Figura 15. Expresión del receptor de VEGF en tejidos prostáticos de ratas de diferentes edades. A): Cuantificación de la expresión relativa del receptor de VEGF en relación a la  $\alpha$ -tubulina en tejidos prostáticos de ratas de 1 mes (barra blanca), 3 meses (barra gris claro), 6 meses (barra gris oscuro) y 12 meses de edad (barra negra). La cuantificación se detalla en el punto 1.3 del capítulo 2 de Material y Métodos. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre los grupos. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  S.E.M. de 7 animales en cada grupo experimental. B): Imágenes representativas en color invertido de las bandas específicas correspondientes al receptor de VEGF y  $\alpha$ -tubulina obtenidas de uno de los Western blotting realizados para el estudio. C- muestra de Control Negativo para VEGF (lágrima). C+: muestra de Control Positivo para receptor de VEGF (extracto de riñón de rata).

## Resultados

Al analizar la intensidad relativa de la banda específica de receptor de VEGF en relación al contenido de  $\alpha$ -tubulina no se observaron diferencias significativas entre los animales de 1 mes, 3 meses y 6 meses de edad (Figura 15). En cambio sí se observó un incremento significativo en la expresión relativa del receptor de VEGF en animales de 12 meses de edad al compararlos con los otros grupos experimentales ( $146,9 \pm 14,7$  unidades arbitrarias vs.  $100 \pm 11,2$  unidades arbitrarias en individuos de 1 mes de edad; ver Figura 15). Nuevamente, debido a la irrupción del COVID-19, no nos fue posible completar los estudios de inmunohistoquímica referentes al receptor de VEGF.

Por lo que hace referencia a la localización de VEGF mediante inmunohistoquímica, la irrupción del COVID-19 sólo nos permitió realizar a tiempo para el depósito de la Tesis Doctoral análisis en ratas de 1 mes y 12 meses de edad. Como se muestra en la Figura 16, los animales prepúberes mostraban una señal positiva a la VEGF a nivel perimembranoso, tal y como el co-marcaje con WGA indicaba.

Por otra parte, los individuos de 12 meses de edad mostraban presencia de VEGF no solamente a nivel perimembranoso, si no también citoplásmico. En estas ratas de 12 meses de edad, el VEGF apareció relacionado con la red intracelular de actina (Figura 17), así como apareció en algunas células un marcaje muy intenso de VEGF localizado en el aparato de Golgi (Figura 17).

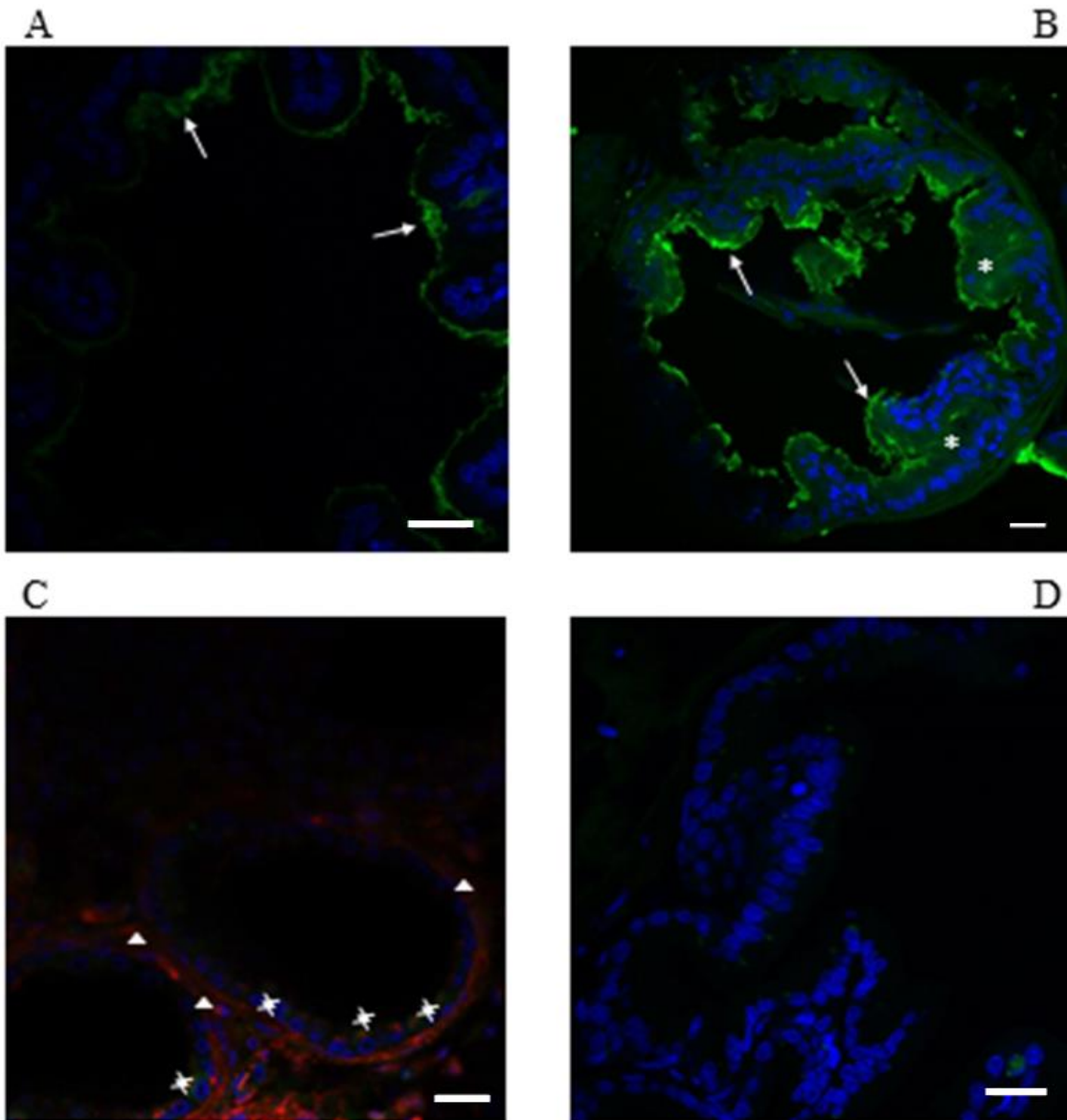


Figura 16. Inmunohistoquímica para el VEGF en tejido prostático de rata prepúber y de 12 meses de edad. Las muestras de tejido prostático fueron fijadas y tratadas para la inmunohistoquímica contra VEGF tal y como se describe en el punto 4.1.1 del capítulo 1 del apartado de Material y Métodos. La Figura C muestra además una muestra representativa de tejido prostático prepúber con co-marcaje para VEGF y con la lectina WGA (señal roja), que indica la situación de la membrana celular. La Figura muestra imágenes representativas de tejido prostático de animales de 1 mes (A,C) y de 12 meses de edad (B). D: Control negativo para el primario. Las flechas indican señales positivas para VEGF situadas a nivel perimembranoso mientras que los asteriscos muestran señales positivas citoplásmicas. Por otra parte, las cabezas de flecha en la imagen C indican el marcaje con WGA, mientras que las señales de doble cabeza de flecha muestran el marcaje de VEGF. Las barras representan 20  $\mu\text{m}$  de longitud.

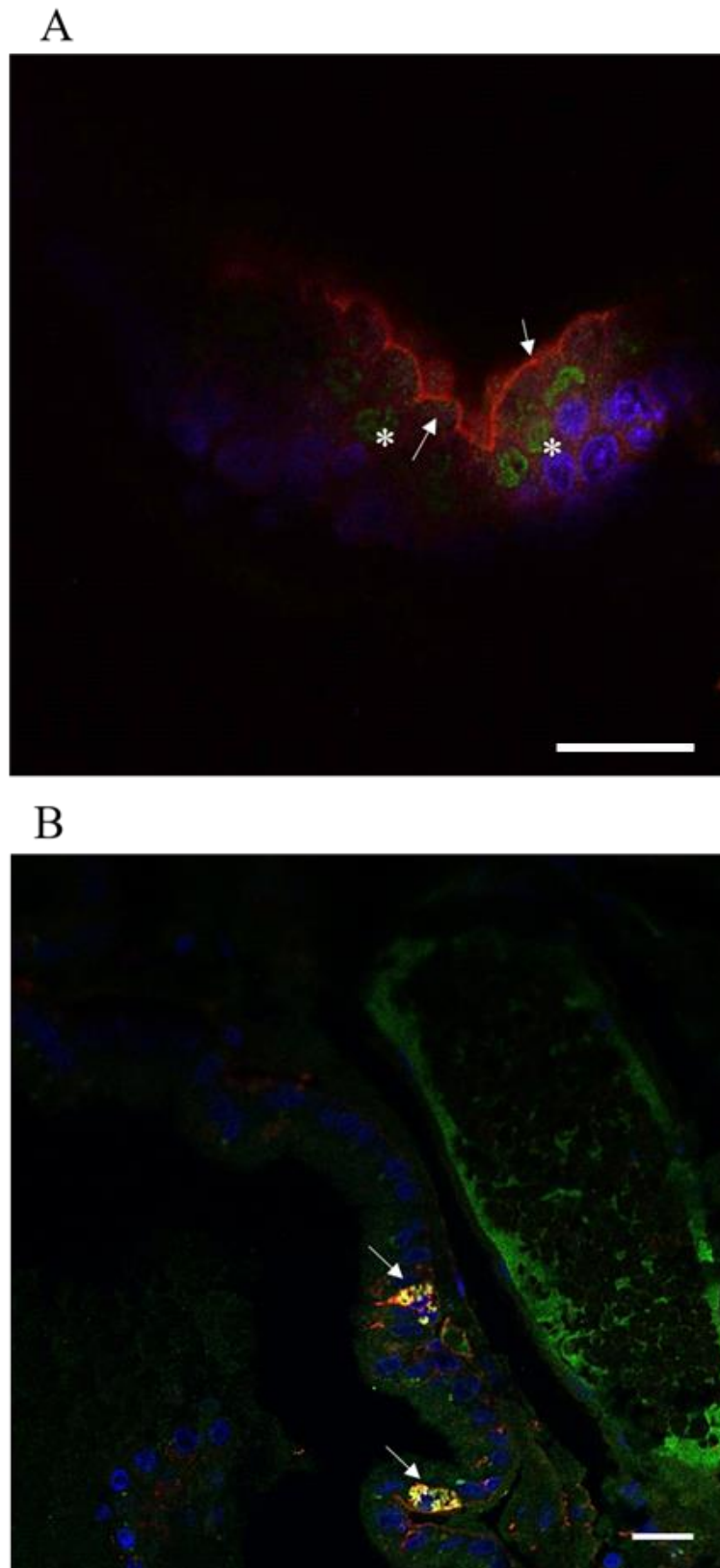


Figura 17. Colocalización de VEGF con la red de actina y el aparato de Golgi en ratas de 12 meses. Las muestras de tejido prostático fueron fijadas y tratadas con el co-marcaje para VEGF y faloidina (A) o VEGF y aparato de Golgi (B) tal y como se describe en el punto 4.1.1 del capítulo 1 de Material y Métodos. Las flechas indican señales positivas para el co-marcaje VEGF/faloidina (A) o VEGF/aparato de Golgi (B). Los asteriscos en (A) indican marcaje de VEGF en aparato de Golgi. Las barras representan 20  $\mu\text{m}$  de longitud.

## DISCUSIÓN

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral nos permiten sugerir dos aspectos que pueden ser de gran importancia para entender la patogénesis de los problemas prostáticos ligados a la edad. El primero es la concomitancia en la aparición de alteraciones en la producción de polisacáridos  $\alpha$ -glucosídicos poco ramificados y en el control del metabolismo del glucógeno de las células ductales prostáticas con la aparición de signos histopatológicos de HPB. El segundo es la preeminencia de las alteraciones en la vasculogénesis sobre los procesos inflamatorios locales ligados con la aparición de HPB. Por otra parte, estas alteraciones no parecen estar ligadas con cambios paralelos en los niveles séricos de testosterona. A este respecto, hay que recordar que los resultados obtenidos mostraron en primer lugar un incremento significativo de dichos valores en animales púberes de 3 meses cuando se compararon con los prepúberes de 1 mes. Este resultado es esperable, puesto que los niveles de testosterona se incrementarán significativamente tras la pubertad (112,113). Asimismo, el mantenimiento sin variaciones significativas de los niveles de testosterona a partir de los 3 meses de edad también puede considerarse como previsible, al mantenerse la producción de testosterona testicular estable con el tiempo (114). A este respecto, hay que señalar que si bien los primeros trabajos publicados al respecto mostraban una caída de testosteronemia en animales de más de 12 meses (115), trabajos más recientes coinciden con nuestros resultados (116). Esta discrepancia puede deberse tanto a diferencias metodológicas entre las técnicas clásicas de detección de testosterona cuando se comparan con las más modernas como a variaciones ligadas a la línea de los individuos utilizados o incluso a la hora del día en el que se toman las muestras (116-119). Sea como fuere, el mantenimiento observado por nosotros de los niveles de testosterona a unos niveles estables en edades en las que empiezan a aparecer los procesos que desembocarán en la HPB parece sugerir que el papel de la testosterona como inductor de alteraciones prostáticas ligadas a la edad no estará ligado a variaciones en los valores circulantes de dicha hormona. En este sentido, el efecto de la testosterona estaría más bien ligado a una acción prolongada en el tiempo con unos niveles séricos más o menos constantes.



Tal y como se ha comentado anteriormente, los resultados obtenidos confirman que la aparición de la HPB se acompaña con un incremento de la secreción polisacárida ductal prostática. A este respecto, hay que decir que, si bien la totalidad de los tejidos prostáticos contendrán más polisacáridos que los únicamente presentes en la luz de los ductos, el porcentaje de éstos últimos será ampliamente mayoritario, tal y como reflejan la tinción de PAS. Por lo tanto, se puede asumir razonablemente que los resultados obtenidos reflejan mayoritariamente la composición de la matriz polisacárida luminal. Teniendo en cuenta este punto, el hecho que las soluciones de dilución de la  $\alpha$ -amilasa y la amiloglucosidasa ya provocaran en sí mismas una cierta pérdida de la tinción de PAS en cortes de tejido prostático es una primera señal indicadora de una preponderancia de los enlaces  $\alpha$ -glucosídicos en el contenido intraductal. Esto es debido al hecho que estos enlaces son altamente sensibles a los pH ácidos (120) siendo el pH de las soluciones añadidas de 4,8. Además, la digestión observada de los polisacáridos prostáticos tras la incubación con  $\alpha$ -amilasa y con amiloglucosidasa, pero no con N-glucosidasa, no sólo confirman de manera clara la preponderancia de enlaces  $\alpha$ -glucosídicos, sino que también nos está indicando que dichos polisacáridos se componen mayoritariamente de cadenas poco ramificadas. La preponderancia de cadenas poco ramificadas se deduce a partir de la combinación de varios resultados. En primer lugar, tanto la  $\alpha$ -amilasa como la amiloglucosidasa degradan enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos, que son los que forman las cadenas lineales de los polisacáridos  $\alpha$ -glucosídicos (121,122). Esta degradación aparece confirmada en esta Tesis Doctoral a partir de los resultados obtenidos con la tinción PAS y con los ensayos de liberación de glucosa. En segundo lugar, los resultados obtenidos tras la incubación con  $\alpha$ -amilasa y con amiloglucosidasa no difirieron significativamente. Este hecho es importante, ya que si bien tanto la  $\alpha$ -amilasa como la glucosidasa hidrolizan enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos, sólo la amiloglucosidasa es capaz de hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -1,6 (121,122). Teniendo en cuenta que los enlaces  $\alpha$ -1,6 son los que estructuran las ramificaciones de los polisacáridos  $\alpha$ -glucídicos (123), se puede deducir que si los polisacáridos prostáticos hubieran contenido un alto grado de ramificación, la incubación con amiloglucosidasa hubiera liberado una cantidad de glucosa significativamente mayor que la liberada por la  $\alpha$ -amilasa, al dejar libres cadenas ramificadas que no son accesibles a este último enzima. Si a eso le sumamos la presencia de una cantidad de enlaces N-glucosídicos muy baja, tal y como indican los resultados obtenidos tras la incubación con N-glucosidasa, llegamos a la conclusión expresada anteriormente de que el polisacárido mayoritario presente en los extractos prostáticos está constituido por cadenas  $\alpha$ -

glucosídicas con baja ramificación. Esta conclusión concuerda con resultados publicados anteriormente (103,124-126), si bien dichos resultados no llegaron a una concreción tan marcada como la nuestra.

La siguiente cuestión, obviamente, sería la de la definición exacta del polisacárido. Con los datos obtenidos no podemos estar totalmente seguros de cuál es el polisacárido mayoritario. A pesar de ello, sí que se pueden deducir algunos puntos. Así, este polisacárido no será glucógeno, puesto que este glúcido está altamente ramificado, con un elevado número de enlaces  $\alpha$ -1,6 glucosídicos (127). La falta de marcaje ductal a la glucógeno sintasa confirmaría que el glucógeno no es un componente mayoritario de la matriz ductal, puesto que este enzima aparece siempre rodeado de una matriz de glucógeno (128). Así pues, los resultados apuntan a algún tipo de polisacárido amiláceo como el principal candidato a formar la matriz polisacárida extraductal en próstata, ya que estos compuestos se caracterizan por una baja ramificación y un bajo o nulo contenido en enlaces N-glucosídicos (129). Esta conclusión estaría por otra parte en consonancia con lo postulado anteriormente por otros investigadores (130,131). La presencia mayoritaria de un compuesto amiláceo, por supuesto, no contradice los resultados de la inmunohistoquímica contra la glucógeno sintasa, que indican un incremento muy notable de dicho enzima, y, por lo tanto, de la producción de glucógeno en células ductales prostáticas de ratas de 12 meses de edad, con un marcaje especialmente intenso en algunas de dichas células. Teniendo en cuenta que el contenido polisacárido extracelular no sería glucógeno, un hecho relevante sería la aparición de un metabolismo del glucógeno prostático exacerbado en animales con HPB, estando esta exacerbación aparentemente centrada en unas células epiteliales concretas de los ductos. Este hecho parece indicar la existencia de una especialización los ductos de animales con HPB, con células que presentan una capacidad muy alta de almacenamiento energético en forma de glucógeno y otras sin dicha capacidad. Por otra parte, el incremento en la actividad glucógeno sintasa ligado a la HPB podría tener relación con una alteración más generalizada en el metabolismo energético de las células ductales, que podría estar relacionado con el incremento en necesidades energéticas ligado a la exacerbación en la producción de matriz polisacárida extracelular. En este momento no sabemos cuál puede ser el significado biológico exacto de esta especialización, si bien la presencia de resultados similares en la determinación de la localización intracelular de VEGF y su receptor indica

que puede tener una gran relevancia en la comprensión de la función secretora de las células ductales prostáticas.

Los resultados concernientes a la expresión relativa del panel de citoquinas y quimioquinas revelan a su vez algunos resultados interesantes. Así, hay que destacar la caída generalizada en la expresión relativa de las proteínas analizadas en ratas con edad superior al mes de vida. Hay que indicar que los animales de 1 mes de vida son prepúberes, puesto que la rata alcanza la pubertad alrededor de las 6-7 semanas (45 días de vida) (132,133). Por lo tanto, podría deducirse que la caída en la expresión relativa generalizada observada a partir de los 3 meses de vida podría estar relacionada con la pubertad y el consiguiente inicio de la función hormonal del eje hipotalámico-hipofisario-testicular. En este sentido, se ha reportado la existencia de una relación entre las hormonas reproductivas y las citoquinas en varios casos. Por ejemplo, la interacción entre el músculo miometrial y los monocitos se da gracias a la progesterona y la secreción de IL-6, IL-8, a través de los receptores de progesterona. Estos receptores producen “in vitro” cambios en la capacidad de contracción de los miocitos (134). Asimismo, se ha descrito el papel de la interacción entre citoquinas y quimioquinas con las prostaglandinas como parte de la señalización dentro del miometrio, particularmente durante el parto (135). También se ha descrito la interacción de la hormona folículo estimulante (FSH) con las activinas en distintas funciones reproductivas (136), así como el papel regulador de la hormona luteinizante (LH) sobre los niveles de VEGF en el humor vítreo, actuando así en el mantenimiento de la homeostasis del ojo (137). Todos estos datos sugerirían la existencia de una relación similar entre hormonas reproductivas y algunas citoquinas o quimioquinas como el VEGF en la próstata.

Mención aparte merecen las proteínas analizadas que mostraron una recuperación de la expresión a partir de los 6 meses de edad, llegando a un claro incremento relativo en los animales de 12 meses de proteínas como el PDGF-AA, el TIMP y el VEGF. Hay que destacar que los tres efectores son reguladores de la angiogénesis en diversos tejidos, si bien su función exacta es diferente. Así, mientras que tanto el VEGF-A como el PDGF-AA actúan por lo general como activadores de la angiogénesis (88,90,91), el TIMP suele asociarse a una inhibición del proceso angiogénico (138-142), si bien existen estudios contradictorios al respecto (143-147). En cualquier caso, un incremento en la expresión de este panel de proteínas relacionadas con la angiogénesis en los animales de 12 meses

podría estar relacionado con los procesos de neovascularización observado durante la aparición de la HPB (148,149). Por lo tanto, el mantenimiento de una expresión baja de citoquinas locales combinado con una expresión relativa alta de factores reguladores de la angiogénesis sugieren que las alteraciones observadas en la aparición de la HPB en rata se asocian a modificaciones en la regulación de los procesos angiogénicos y no a cambios en la actividad inmunológica local mediada por citoquinas.

La comparación de los resultados obtenidos con la expresión sérica de citoquinas/quimioquinas en ratas de púberes y adultas con aquellos analizados en tejido prostático indica la falta de una correlación estrecha entre ambos factores, Así, sólo algunas de las proteínas seleccionadas siguen un comportamiento paralelo entre las muestras de suero y las prostáticas. Este no es un resultado inesperado, puesto que las citoquinas y quimioquinas séricas serán el reflejo del estado inmunitario local de todo el organismo, del cual la próstata sólo es una pequeña parte, por lo que lo que ocurra allá sólo contribuiría de manera modesta en el global orgánico de expresión. A pesar de ello, es destacable mencionar que la variación sérica del VEGF en suero entre ratas púberes y adultas fue similar a la observada en tejido prostático. Teniendo en cuenta la hipótesis descrita anteriormente relativa a la alteración local de procesos angiogénicos como uno de los factores contribuyentes al desencadenamiento de la HPB, la concomitancia de resultados entre suero y tejido prostático indicaría que la contribución del VEGF prostático al total de VEGF sérica sería prominente. Este resultado, por otra parte, abre la posibilidad de utilizar el VEGF como un posible marcador temprano de alteraciones prostáticas ligadas a la angiogénesis. De hecho, se ha establecido que la hiperplasia prostática benigna inducida por testosterona en un modelo animal incrementa los niveles de VEGF (148), aunque existen informes con valores muy variables al respecto (87,89). Esta variabilidad, por otra parte, parece estar ligada a factores como la especie evaluada o la técnica utilizada para su valoración (87-89). A este respecto, la comparación de la bibliografía existente con nuestros resultados parece indicar que si bien en algunas especies las alteraciones inmunológicas locales están como una de las bases primeras en la aparición de la HPB (31,75,150), en el caso de la rata los aspectos angiogénicos parecen tener más importancia. Eso es importante, puesto que en especies en las cuales la angiogénesis no sea el factor más importante de causalidad de la HPB, la expresión sérica de VEGF no tiene por qué estar en consonancia con la prostática. Otro factor importante de explicación de las discrepancias entre especies sería metodológico. En la gran mayoría

de estudios realizados hasta la fecha, el VEGF se detectaba mediante técnicas como el ELISA (151-153). La técnica ELISA, de hecho, tiene una sensibilidad mucho menor que la que presentan las técnicas realizadas en esta Tesis Doctoral, es decir, la detección por mini-arrays y mediante Western blotting. Esta diferencia de sensibilidad entre técnicas, junto a la utilización de anticuerpos anti-VEGF diferentes, con diferente sensibilidad incluso aunque estén diseñados para una misma especie, podría derivar en diferencias importantes entre los resultados obtenidos en una misma especie. En todo caso, quedaría mucho trabajo por hacer antes de poder llegar a una conclusión definitiva sobre la utilidad de los niveles de VEGF sérico como marcador precoz de patologías prostáticas.

Centrándonos en un posible papel del VEGF en la patogénesis de procesos protáticos, hay que indicar que, gracias a su amplia distribución, el VEGF puede aparecer simultáneamente en diferentes ubicaciones. Por ejemplo, en el pulmón se puede medir en el líquido de lavado bronquio-alveolar, esputo, células epiteliales bronquiales, células alveolares tipo II, macrófagos alveolares, neutrófilos, células endoteliales de capilares alveolares, entre otros (154). Además de su ubicación en diversos tejidos de un mismo órgano, se ha observado que la producción de VEGF puede modificarse de acuerdo a la patología y el tejido. Así, en pacientes con alteración pulmonar aguda/síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) se ha descrito un aumento importante de los niveles plasmáticos de VEGF (155). Asimismo, se ha descrito que los niveles crecientes de VEGF intrapulmonar se asocian con la resolución de la lesión pulmonar en el SDRA (156). Centrándonos en la relación entre el VEGF y las patologías prostáticas, hace más de 20 años que se describe la alteración en la expresión de VEGF en HPB y cáncer de próstata (90). Sin embargo, hay discrepancia en los hallazgos descritos por investigadores a lo largo de los años, ya que si bien algunos investigadores han evidenciado un aumento en la expresión de VEGF en pacientes con HPB y carcinoma prostático (157), otros solo han encontrado aumento en pacientes tumorales (90), al tiempo que algunos autores no han encontrado correlaciones importantes entre los niveles de VEGF y la presentación de patologías prostáticas (158). Además, existen estudios que reportan diferencias moleculares en el VEGF sérico de pacientes con cáncer de próstata, HPB y pacientes sanos (159). Es probable que parte de estas diferencias se deban a los métodos utilizados para medir el VEGF, el tipo de muestra utilizada y el tamaño de la población estudiada (158). Por otra parte, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral parecen indicar que

la aparición de la HPB en rata también estaría relacionada con cambios en la localización intracelular de VEGF. Así, hay que destacar la presencia predominantemente perimembranosa del factor en animales prepúberes, mientras que en ratas de 12 meses de edad la presencia citoplásmica se incrementa de manera mucho más notable. La presentación de depósitos perimembranosos de VEGF no ha sido descrita anteriormente en tejido prostático. En cambio, sí se ha descrito la existencia de dichos depósitos perimembranosos en pacientes humanos con carcinoma renal. Dichos pacientes presentaron una sobreexpresión intracelular heterogénea de VEGF, con la presencia de un patrón difuso perimembranoso. Este patrón era diferente en la mayoría de individuos sanos, en los que o no se detectaba VEGF o bien aparecía distribuido de manera homogénea (160,161). Por otra parte, si bien faltan resultados concernientes a animales adultos en fase previa al inicio de la HPB, el hecho de aparecer una expresión citoplásmica significativa de VEGF en animales de 12 meses relacionada con la red de actina y, sobre todo, con el aparato de Golgi, sugiere un incremento en la síntesis de VEGF con un incremento paralelo en su procesamiento post-traducciona. A este respecto, el incremento en la expresión del receptor de VEGF en ratas de 12 meses de edad podría también estar relacionado con estos cambios citoplásmicos de expresión de VEGF ligados a la red de actina y al aparato de Golgi. Hay que recordar que, de hecho, se han establecido relaciones estrechas entre el incremento de expresión del receptor de VEGF y la aparición de tumores en diversos órganos como colon, estómago y glándula mamaria (162-164). Además, en algunos casos se ha observado también una sinergia en la expresión del VEGF y de su receptor como factores ligados a la aparición de tumores (164). Por lo tanto, el incremento observado en la expresión del receptor de VEGF en animales de 12 meses podría estar relacionado de manera sinérgica con los cambios paralelos observados en la expresión de VEGF. Así, la aparición de una expresión perimembranosa de VEGF de manera paralela al aumento en sus niveles y en su ritmo de procesado intracelular a través del aparato de Golgi, conjuntamente con un incremento en los niveles de receptor de VEGF podrían ser parte de las bases en los procesos de alteración de la angiogénesis subyacentes a la instauración de la HPB.



## CONCLUSIONES

1.- El inicio de la pubertad en ratas coincide con un incremento significativo en los niveles séricos de testosterona paralelo al desarrollo y crecimiento de los ductos prostáticos. Más adelante, los niveles de testosteronemia se mantienen sin cambios significativos hasta por lo menos los 12 meses de edad, independientemente de la aparición de signos evidentes de HPB.

2.- Desde el punto de vista histopatológico, aparecen señales iniciales de HPB en algunos individuos de 6 meses de edad, observándose la instauración histopatológica del proceso en todos los individuos estudiados de 12 meses.

3.-La observación de HPB coincide con un incremento en un contenido ductal PAS positivo. Dicho contenido parece estar compuesto de manera mayoritaria por polisacáridos poco ramificados con alto contenido en enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos y bajos niveles de enlaces N-glucosídicos. Estos resultados parecen indicar la existencia de un acúmulo ductal de mucopolisacáridos asociado con la HPB.

4.- La aparición de HPB coincide con la aparición de algunas células prostáticas ductales muy ricas en glucógeno sintasa. Este hecho sugiere la presencia de algún tipo de alteración en el metabolismo del glucógeno de estas células relacionado con la HPB.

5.- La instauración de la pubertad está cronológicamente relacionado con una disminución generalizada en la expresión prostática de un gran número de citoquinas y quimioquinas, si bien algunas de estas proteínas vuelven a incrementar sus niveles a partir de los 6 meses de vida.



## Conclusiones

6.- Los animales de 12 meses de edad, con signos de HPB, mostraron una expresión alta a nivel prostático de un grupo reducido de citoquinas y quimioquinas, entre las que destacan el PDGF-AA, el TIMP-1 y el VEGF-A.

7.- Al comparar el panel de expresión prostático y sérico de citoquinas y quimioquinas en ratas de diferentes grupos de edad apenas se observaron proteínas que sufrieran variaciones equivalentes, siendo la única excepción el VEGF.

8.- El incremento en la expresión prostática de VEGF de manera paralela a la instauración de la HPB también se confirmó mediante análisis por Western blotting. La inmunocitoquímica mostró que este incremento se relacionaba con la aparición de niveles significativos citoplásmicos de VEGF en las células prostáticas, apareciendo asimismo un incremento en el procesamiento post-traducciona l de la proteína a través de su paso por el aparato de Golgi.

9.- Se observó un incremento significativo en la expresión del receptor de VEGF en ratas de 12 meses de edad. Este incremento podría estar relacionado de manera sinérgica con las alteraciones observadas en la expresión y localización intracelular de VEGF en los mismos animales.

10.- La comparación de las variaciones en los patrones de expresión de las diferentes citoquinas y quimioquinas estudiadas sugiere que el inicio de la HPB está más relacionado con cambios en los procesos de angiogénesis prostática más que en mecanismos inmunitarios “per se”.

11.- Los resultados sugieren la posibilidad de estudiar el patrón de expresión sérica de VEGF como un posible marcador de HPB en rata.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lee C. H., Akin-Olugbade O., Kirschenbaum A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 2011;40(3):565-75.
2. Christensen B. W. Canine prostate disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2018;48(4):701-19.
3. Lewis R. W., Kim J., Irani D., Roberts J. The prostate of the nonhuman primate: normal anatomy and pathology. *The prostate.* 1981;2(1):51-70.
4. Santos F., Taboga S. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod.* 2006;3(1):3-18.
5. Zaviaèiè M. The human female prostate. *Vestigil Skerze's Paraurethral Glarzds and Ducts to Wonzen's Fitnctioizal Prostate.* 1999:171.
6. Burek J.D. Pathology of aging rats: a morphological and experimental study of the age-associated lesions in aging BN/Bi, WAG/Rij and (WAG × BN) F1 rats. CRC Press, Boca Raton, USA; 2018.
7. Hayward S. W., Cunha G. R. The prostate: development and physiology. *Radiol Clin N Am.* 2000;38(1):1-14.
8. Carballada R., Esponda P. Fate and distribution of seminal plasma proteins in the genital tract of the female rat after natural mating. *Reproduction.* 1997;109(2):325-35.
9. Shirai T., Takahashi S., Cui L., Futakuchi M., Kato K., Tamano S., Imaida K. Experimental prostate carcinogenesis—rodent models. *Mutat Res-Rev Mutat.* 2000;462(2-3):219-26.
10. Nascimento-Gonçalves E., Faustino-Rocha A. I., Seixas F., Ginja M., Colaço B., Ferreira R., Fardilha M., Oliveira P. A. Modelling human prostate cancer: Rat models. *Life Sci.* 2018;203:210-24.

## Bibliografía

11. Ginja M., Pires M. J., Gonzalo-Orden J. M., Seixas F., Correia-Cardoso M., Ferreira R., Fardilha M., Oliveira P. A., Faustino-Rocha A. I. Anatomy and Imaging of Rat Prostate: Practical Monitoring in Experimental Cancer-Induced Protocols. *Diagnostics*. 2019;9(3):68.
12. Little T. V., Holyoak G. R. Reproductive anatomy and physiology of the stallion. *Vet Clin N Am-Equine*. 1992;8(1):1-29.
13. Jesik C., Holland J., Lee C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *The Prostate*. 1982;3(1):81-97.
14. Hernandez M. E., Soto-Cid A., Aranda-Abreu G. E., Díaz R., Rojas F., Garcia L. I., Toledo R., Manzo J. A study of the prostate, androgens and sexual activity of male rats. *Reprod Biol Endocrin*. 2007;5(1):11.
15. Santamaría L., Ingelmo I., Alonso L., Pozuelo J. M., Rodriguez R. Neuroendocrine Cells and Peptidergic Innervation in Human and Rat Prostrate. Springer Science & Business Media, Berlín, Alemania; 2007.
16. Carvalho-Dias E., Miranda A., Martinho O., Mota P., Costa Â., Nogueira-Silva C., Moura R. S., Alenina N., Bader M., Autorino R. Serotonin regulates prostate growth through androgen receptor modulation. *Sci Rep-UK*. 2017;7(1):1-11.
17. Barbosa G. O., Silva J. A., Siqueira-Berti A., Nishan U., Rosa-Ribeiro R., Oliveira S. B., Baratti M. O., Ferrucci D., Santana J. C., Damas-Souza D. M. Castration-induced prostate epithelial cell apoptosis results from targeted oxidative stress attack of M1142-macrophages. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):19048-58.
18. Costello L., Franklin R. B. Effect of prolactin on the prostate. *The Prostate*. 1994;24(3):162-6.
19. Schulster M., Bernie A. M., Ramasamy R. The role of estradiol in male reproductive function. *Asian J Androl*. 2016;18(3):435.

20. Prins G. S., Birch L., Greene G. L. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology*. 1991;129(6):3187-99.
21. Nascimento-Gonçalves E., Colaço B., Ferreira R., Oliveira P. A. Human and Animal Prostate Cancer Similarities and Differences: Models to Study This Disease. 2018.
22. Simmons J. K., Elshafae S. M., Keller E. T., McCauley L. K., Rosol T. J. Review of animal models of prostate cancer bone metastasis. *Vet Sci*. 2014;1(1):16-39.
23. Lepor H. Pathophysiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. *Rev Urol*. 2004;6(Suppl 9):S3.
24. Golomb E., Rosenzweig N., Eilam R., Abramovici A. Spontaneous hyperplasia of the ventral lobe of the prostate in aging genetically hypertensive rats. *J Androl*. 2000;21(1):58-64.
25. Mahapokai W., Van Sluijs F., Schalken J. Models for studying benign prostatic hyperplasia. *Prostate Cancer P D*. 2000;3(1):28-33.
26. Suwa T., Nyska A., Peckham J. C., Hailey J. R., Mahler J. F., Haseman J. K., Maronpot R. R. A retrospective analysis of background lesions and tissue accountability for male accessory sex organs in Fischer-344 rats. *Toxicol Pathol*. 2001;29(4):467-78.
27. Wu Y., Ding Y., Cao Q., Qian S., Wang C., Duan H., Gu J., Shen H. The relationship between glucose homeostasis status and prostate size in aging Chinese males with benign prostatic hyperplasia. *World J Urol*. 2020:1-9.
28. Zhang M., Luo C., Cui K., Xiong T., Chen Z. Chronic inflammation promotes proliferation in the prostatic stroma in rats with experimental autoimmune prostatitis: study for a novel method of inducing benign prostatic hyperplasia in a rat model. *World J Urol*. 2020:1-11.
29. Nicholson T. M., Ricke W. A. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. *Differentiation*. 2011;82(4-5):184-99.

## Bibliografía

30. Zhang B., Chen X., Xie C., Chen Z., Liu Y., Ru F., He Y. Leptin promotes epithelial-mesenchymal transition in benign prostatic hyperplasia through downregulation of BAMBI. *Exp Cell Res.* 2020;387(1):111754.
31. Bostanci Y., Kazzazi A., Momtahn S., Laze J., Djavan B. Correlation between benign prostatic hyperplasia and inflammation. *Curr Opin in urol.* 2013;23(1):5-10.
32. Gandaglia G., Briganti A., Gontero P., Mondaini N., Novara G., Salonia A., Sciarra A., Montorsi F. The role of chronic prostatic inflammation in the pathogenesis and progression of benign prostatic hyperplasia (BPH). *BJU Int.* 2013;112(4):432-41.
33. Kwon Y. K., Choe M. S., Seo K. W., Park C. H., Chang H. S., Kim B. H., Kim C. I. The effect of intraprostatic chronic inflammation on benign prostatic hyperplasia treatment. *Korean J Urol.* 2010;51(4):266-70.
34. Consultado en <https://dle.rae.es>. 2020. Diccionario de la lengua española, [versión 23.3 en línea].
35. Müntzing J., Sufrin G., Murphy G. Prostatitis in the rat. *Scand J Urol Nephrol.* 1979;13(1):17-22.
36. Naslund M. J., Strandberg J. D., Coffey D. S. The role of androgens and estrogens in the pathogenesis of experimental nonbacterial prostatitis. *J Urol.* 1988;140(5 Part 1):1049-53.
37. Krieger J. N., Lee S. W. H., Jeon J., Cheah P. Y., Liong M. L., Riley D. E. Epidemiology of prostatitis. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31:85-90.
38. Davis N. G., Silberman M. *Bacterial Acute Prostatitis.* 2019.
39. Kirby R., Lowe D., Bultitude M., Shuttleworth K. Intra-prostatic urinary reflux: An aetiological factor in abacterial prostatitis. *Br J Urol.* 1982;54(6):729-31.

40. Lupo F., Rousseau M., Canton T., Ingersoll M. A. The immune system fails to mount a protective response to Gram-positive or Gram-negative bacterial prostatitis. *bioRxiv*. 2020.
41. Zhang J., Liang C., Shang X., Li H. Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome: A Disease or Symptom? Current Perspectives on Diagnosis, Treatment, and Prognosis. *Am. J. Men's Health*. 2020;14(1):1557988320903200.
42. Galosi A. B., Montironi R., Fabiani A., Lacetera V., Gallé G., Muzzonigro G. Cystic lesions of the prostate gland: an ultrasound classification with pathological correlation. *J Urol*. 2009;181(2):647-57.
43. Fung K., Tsang W., Kwok P. C., Lee W., Tang K. Cystic prostatic carcinoma: case report and literature review. *Hong Kong Med J*. 2020;26(1):66-9.
44. Howlader N., Noone A., Krapcho M., Miller D., Brest A., Yu M., Ruhl J., Tatalovich Z., Mariotto A., Lewis D. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD. National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2019.
45. Prostate Cancer Treatment (PDQ®) Health Professional Version Last Modified: 01/29/2020 [Internet]. 2020. Available from: <https://www.cancer.gov/types/prostate/hp/prostate-treatment-pdq>.
46. Jacobi G., Altwein J., Kurth K., Basting R., Hohenfellner R. Treatment of advanced prostatic cancer with parenteral cyproterone acetate: a phase III randomised trial. *Br J Urol*. 1980;52(3):208-15.
47. Neschadim A., Summerlee A. J., Silvertown J. D. Targeting the relaxin hormonal pathway in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2015;137(10):2287-95.
48. Schmitt B., Wilt T. J., Schellhammer P. F., DeMasi V., Sartor O., Crawford E. D., Bennett C. L. Combined androgen blockade with nonsteroidal antiandrogens for advanced prostate cancer: a systematic review. *Urology*. 2001;57(4):727-32.

## Bibliografía

49. Bryan J. N., Keeler M. R., Henry C. J., Bryan M. E., Hahn A. W., Caldwell C. W. A population study of neutering status as a risk factor for canine prostate cancer. *Prostate*. 2007;67(11):1174-81.
50. Teske E., Naan E. C., Van Dijk E., Van Garderen E., Schalken J. Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;197(1-2):251-5.
51. Leav I., Schelling K. H., Adams J. Y., Merk F. B., Alroy J. Role of canine basal cells in prostatic post natal development, induction of hyperplasia, sex hormone-stimulated growth; and the ductal origin of carcinoma. *Prostate*. 2001;47(3):149-63.
52. Obradovich J., Walshaw R., Goullaud E. The influence of castration on the development of prostatic carcinoma in the dog 43 cases (1978–1985). *J Vet Intern Med*. 1987;1(4):183-7.
53. Bell F., Klausner J. S., Hayden D., Feeney D. A., Johnston S. Clinical and pathologic features of prostatic adenocarcinoma in sexually intact and castrated dogs: 31 cases (1970-1987). *JAVMA-J AM Vet Med A*. 1991;199(11):1623-30.
54. Schrank M., Romagnoli S. Prostatic Neoplasia in the Intact and Castrated Dog: How Dangerous is Castration? *Animals*. 2020;10(1):85.
55. Johansson J.-E., Adami H.-O., Andersson S.-O., Bergström R., Holmberg L., Krusemo U. B. High 10-year survival rate in patients with early, untreated prostatic cancer. *Jama*. 1992;267(16):2191-6.
56. Ott J., Ullrich A., Miller A. The importance of early symptom recognition in the context of early detection and cancer survival. *Eur J Cancer*. 2009;45(16):2743-8.
57. Brawer M. K., editor *Screening for prostate cancer*. Seminars in surgical oncology; 2000: Wiley Online Library.
58. Thompson I. M., Pauler D. K., Goodman P. J., Tangen C. M., Lucia M. S., Parnes H. L., Minasian L. M., Ford L. G., Lippman S. M., Crawford E. D. Prevalence of prostate

cancer among men with a prostate-specific antigen level  $\leq 4.0$  ng per milliliter. *N Engl J Med.* 2004;350(22):2239-46.

59. Uribe Arcila J. F. La bioquímica del antígeno específico de próstata (AEP) y sus fracciones. *Medicina & Laboratorio.* 2008;14(03-04):153-66.

60. Lilja H. A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest.* 1985;76(5):1899-903.

61. Becker C., Lilja H. Individual prostate-specific antigen (PSA) forms as prostate tumor markers. *Clin Chim Acta.* 1997;257(1):117-32.

62. Brawer M. Prostate specific antigen: a review. *Acta Oncol.* 1991;30(2):161-8.

63. Li T. S., Beling C. G. Isolation and characterization of two specific antigens of human seminal plasma. *Fertil Steril.* 1973;24(2):134-44.

64. Wang M., Valenzuela L., Murphy G., Chu T. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol.* 1979;17(2):159-63.

65. Ørsted D. D., Nordestgaard B. G., Jensen G. B., Schnohr P., Bojesen S. E. Prostate-specific antigen and long-term prediction of prostate cancer incidence and mortality in the general population. *Eur Urol.* 2012;61(5):865-74.

66. Catalona W. J., Smith D. S., Ratliff T. L., Dodds K. M., Coplen D. E., Yuan J. J., Petros J. A., Andriole G. L. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *New Engl J Med.* 1991;324(17):1156-61.

67. Catalona W. J., Partin A. W., Sanda M. G., Wei J. T., Klee G. G., Bangma C. H., Slawin K. M., Marks L. S., Loeb S., Broyles D. L. A multi-center study of [- 2] pro-prostate-specific antigen (PSA) in combination with PSA and free PSA for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/mL PSA range. *J Urol.* 2011;185(5):1650.

68. Catalona W. J., Hudson M. L. A., Scardino P. T., Richie J. P., Ahmann F. R., Flanigan R. C., deKernion J. B., Ratliff T. L., Kavoussi L. R., Dalkin B. L. Selection of optimal



## Bibliografía

prostate specific antigen cutoffs for early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves. *J Urol.* 1994;152(6 Part 1):2037-42.

69. Krumholtz J. S., Carvalhal G. F., Ramos C. G., Smith D. S., Thorson P., Yan Y., Humphrey P. A., Roehl K. A., Catalona W. J. Prostate-specific antigen cutoff of 2.6 ng/mL for prostate cancer screening is associated with favorable pathologic tumor features. *Urology.* 2002;60(3):469-73.

70. Smith D. S., Carvalhal G. F., Mager D. E., Bullock A. D., Catalona W. J. Use of lower prostate specific antigen cutoffs for prostate cancer screening in black and white men. *J Urol.* 1998;160(5):1734-8.

71. De Angelis G., Rittenhouse H. G., Mikolajczyk S. D., Shamel L. B., Semjonow A. Twenty years of PSA: from prostate antigen to tumor marker. *Rev Urol.* 2007;9(3):113.

72. Cohn J. A., Wang C. E., Lakeman J. C., Silverstein J. C., Brendler C. B., Novakovic K. R., McGuire M. S., Helfand B. T., editors. Primary care physician PSA screening practices before and after the final US Preventive Services Task Force recommendation. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations;* 2014: Elsevier.

73. Paclikova K., Kohout P., Vlasin M. Diagnostic possibilities in the management of canine prostatic disorders. *Vet Med-Czech-.* 2006;51(1):1.

74. Gobello C., Castex G., Corrada Y. Serum and seminal markers in the diagnosis of disorders of the genital tract of the dog: a mini-review. *Theriogenology.* 2002;57(4):1285-91.

75. Zhang L., Wang Y., Qin Z., Gao X., Xing Q., Li R., Wang W., Song N., Zhang W. Correlation between Prostatitis, Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer: A systematic review and Meta-analysis. *J Cancer.* 2020;11(1):177.

76. Gurel B., Lucia M. S., Thompson I. M., Goodman P. J., Tangen C. M., Kristal A. R., Parnes H. L., Hoque A., Lippman S. M., Sutcliffe S. Chronic inflammation in benign prostate tissue is associated with high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidem Biomar.* 2014;23(5):847-56.

77. Cheng I., Witte J. S., Jacobsen S. J., Haque R., Quinn V. P., Quesenberry C. P., Caan B. J., Van Den Eeden S. K. Prostatitis, sexually transmitted diseases, and prostate cancer: the California Men's Health Study. *PLoS One*. 2010;5(1).
78. Ørsted D. D., Bojesen S. E., Nielsen S. F., Nordestgaard B. G. Association of clinical benign prostate hyperplasia with prostate cancer incidence and mortality revisited: a nationwide cohort study of 3 009 258 men. *Eur Urol*. 2011;60(4):691-8.
79. Dai X., Fang X., Ma Y., Xianyu J. Benign prostatic hyperplasia and the risk of prostate cancer and bladder cancer: a meta-analysis of observational studies. *Medicine*. 2016;95(18).
80. Kopp R. P., Freedland S. J., Parsons J. K. Associations of benign prostatic hyperplasia with prostate cancer: the debate continues. *Citeseer*; 2011.
81. Sfanos K. S., De Marzo A. M. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology*. 2012;60(1):199-215.
82. De Marzo A. M., Platz E. A., Sutcliffe S., Xu J., Grönberg H., Drake C. G., Nakai Y., Isaacs W. B., Nelson W. G. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):256-69.
83. De Nunzio C., Kramer G., Marberger M., Montironi R., Nelson W., Schröder F., Sciarra A., Tubaro A. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur Urol*. 2011;60(1):106-17.
84. Giovannucci E., Rimm E. B., Colditz G. A., Stampfer M. J., Ascherio A., Chute C. C., Willett W. C. A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer I*. 1993;85(19):1571-9.
85. Perwez Hussain S., Harris C. C. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer*. 2007;121(11):2373-80.

## Bibliografía

86. Kim S., Takahashi H., Lin W.-W., Descargues P., Grivennikov S., Kim Y., Luo J.-L., Karin M. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*. 2009;457(7225):102.
87. Huss W. J., Hanrahan C. F., Barrios R. J., Simons J. W., Greenberg N. M. Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch. *Cancer Res*. 2001;61(6):2736-43.
88. Duffy A. M., Bouchier-Hayes D. J., Harmey J. H. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in non-endothelial cells: autocrine signalling by VEGF. *Madame Curie Bioscience Database (formerly, Eureka Bioscience Database)*. Angiogenesis. Landes Bioscience, Austin (TX), USA, 2000–2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6482/>.
89. Mukherjee P., Sotnikov A. V., Mangian H. J., Zhou J.-R., Visek W. J., Clinton S. K. Energy intake and prostate tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor expression. *J Natl Cancer I*. 1999;91(6):512-23.
90. Ferrer F. A., Miller L. J., Andrawis R. I., Kurtzman S. H., Albertsen P. C., Laudone V. P., Kreutzer D. L. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human prostate cancer: in situ and in vitro expression of VEGF by human prostate cancer cells. *J Urol*. 1997;157(6):2329-33.
91. Lawrence F., Yeo K.-T., Berse B., Morgentaler A., Dvorak H. F., Rosen S. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is strongly expressed in the normal male genital tract and is present in substantial quantities in semen. *J Urol*. 1995;154(2):576-9.
92. Zhu H., Gao M., Gao X., Tong Y. Vascular endothelial growth factor-B: Impact on physiology and pathology. *Cell Adhes Migr*. 2018;12(3):215-27.
93. Grivas N., Goussia A., Stefanou D., Giannakis D. Microvascular density and immunohistochemical expression of VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 in benign prostatic hyperplasia, high-grade prostate intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Cent European J Urol*. 2016;69(1):63.

94. Olsson A.-K., Dimberg A., Kreuger J., Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - In control of vascular function. *Nat Rev Mol.* 2006;7(5):359-71.
95. Staels W., Heremans Y., Heimberg H., De Leu N. VEGF-A and blood vessels: a beta cell perspective. *Diabetologia.* 2019:1-8.
96. Eisermann K., Fraizer G. The androgen receptor and VEGF: mechanisms of androgen-regulated angiogenesis in prostate cancer. *Cancers.* 2017;9(4):32.
97. Hopirtean C., Nagy V. Optimizing the use of anti VEGF targeted therapies in patients with metastatic colorectal cancer: review of literature. *Clujul Med.* 2018;91(1):12.
98. Caldamone A. A., Emilson L. B., Al-Juburi A., Cockett A. T. Prostatitis: prostatic secretory dysfunction affecting fertility. *Fertil Steril.* 1980;34(6):602-6.
99. Cutruzzolà F., Giardina G., Marani M., Macone A., Paiardini A., Rinaldo S., Paone A. Glucose metabolism in the progression of prostate cancer. *Front Physiol.* 2017;8:97.
100. Cohen R. J., McNeal J. E., Edgar S. G., Robertson T., Dawkins H. J. Characterization of cytoplasmic secretory granules (PSG), in prostatic epithelium and their transformation-induced loss in dysplasia and adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 1998;29(12):1488-94.
101. Gonzalez-Menendez P., Hevia D., Mayo J. C., Sainz R. M. The dark side of glucose transporters in prostate cancer: Are they a new feature to characterize carcinomas? *International J Cancer.* 2018;142(12):2414-24.
102. del Rosario A. D., Bui H. X., Abdulla M., Ross J. S. Sulfur-rich prostatic intraluminal crystalloids: a surgical pathologic and electron probe x-ray microanalytic study. *Hum Pathol.* 1993;24(11):1159-67.
103. Cohen R. J., McNeal J. E., Redmond S. L., Meehan K., Thomas R., Wilce M., Dawkins H. J. Luminal contents of benign and malignant prostatic glands: correspondence to altered secretory mechanisms. *Hum Pathol.* 2000;31(1):94-100.

## Bibliografía

104. Costello L. C., Franklin R. B. The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. *Mol Cancer*. 2006;5(1):17.
105. Sfanos K. S., Wilson B. A., De Marzo A. M., Isaacs W. B. Acute inflammatory proteins constitute the organic matrix of prostatic corpora amylacea and calculi in men with prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(9):3443-8.
106. Cross P., Bartley C., McClure J. Amyloid in prostatic corpora amylacea. *J Clin Pathol*. 1992;45(10):894-7.
107. Prather G. C., Skinner D. Prostatic corpora amylacea. *The Journal of urology*. 1956;76(1):107-14.
108. Cardoso L., Falcao P., Sampaio F. Increased and localized accumulation of chondroitin sulphate proteoglycans in the hyperplastic human prostate. *BJU Int*. 2004;93(4):532-8.
109. Gomori G. The periodic-acid Schiff stain. *Am J Clin Pathol*. 1952;22(3\_ts):277-81.
110. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54.
111. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-82.
112. Gray G. D., Smith E. R., Dorsa D. M., Davidson J. M. Sexual behavior and testosterone in middle-aged male rats. *Endocrinology*. 1981;109(5):1597-604.
113. Moger W. Serum 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ , 17/3-Diol, Androsterone, and Testosterone Concentrations in the male Rat. Influence of Age and Gonadotropin Stimulation. *Endocrinology*. 1977;100(4):1027-32.

114. Frankel A. I., Mock E. J. Time course of hormonal response to sexual behavior in aging male rats. *Exp gerontol.* 1981;16(5):363-9.
115. Ghanadian R., Lewis J. G., Chisholm G. D. Serum testosterone and dihydrotestosterone changes with age in rat. *Steroids.* 1975;25(6):753-62.
116. Wu D., Gore A. C. Changes in androgen receptor, estrogen receptor alpha, and sexual behavior with aging and testosterone in male rats. *Horm behav.* 2010;58(2):306-16.
117. Gruenewald D. A., Naai M. A., Marck B. T., Matsumoto A. M. Age-related decrease in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression, but not pituitary responsiveness to gnrh, in the male brown norway rat. *J. Androl.* 2000;21(1):72-84.
118. Wu D., Gore A. C. Sexual experience changes sex hormones but not hypothalamic steroid hormone receptor expression in young and middle-aged male rats. *Horm Behav.* 2009;56(3):299-308.
119. Green M. R., Zeidan M., Hodges T. E., McCormick C. M. Age-dependent regulation by androgens of gene expression in the anterior hypothalamus and stress-induced release of adrenal hormones in adolescent and adult male rats. *J Neuroendocrinol.* 2019;31(6):e12714.
120. Okuyama M., Saburi W., Mori H., Kimura A.  $\alpha$ -Glucosidases and  $\alpha$ -1, 4-glucan lyases: structures, functions, and physiological actions. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(14):2727-51.
121. Preece I., Shadaksharaswamy M. Reducing-group production from starch by the action of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases of barley malt. Activity of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases. *Biochem J.* 1949;44(3):270-4.
122. Colonna W. J., Magee P. Glycogenolytic enzymes in sporulating yeast. *J Bacteriol.* 1978;134(3):844-53.

## Bibliografía

123. Krisman C. R., Tolmasky D. S., Raffo S. Branching enzyme assay: selective quantitation of the  $\alpha$ 1, 6-linked glucosyl residues involved in the branching points. *Anal Biochem.* 1985;147(2):491-6.
124. Martikainen P., Malmi R., Suominen J. Distribution of glycoconjugates in normal rat ventral prostate and their use as markers of androgen-controlled secretory function in culture. *Prostate.* 1986;8(1):37-49.
125. Aitkin R. Carbohydrate complexes in bull prostate. *J Histochem Cytochem.* 1960;8(1):71-71.
126. Cohen R. J., Holland J. W., Redmond S. L., McNeal J. E., Dawkins H. J. Identification of the glycosaminoglycan keratan sulfate in the prostatic secretory cell. *Prostate.* 2000;44(3):204-9.
127. Manners D. J. Recent developments in our understanding of glycogen structure. *Carbohydr Polym.* 1991;16(1):37-82.
128. Zeqiraj E., Tang X., Hunter R. W., García-Rocha M., Judd A., Deak M., von Wilamowitz-Moellendorff A., Kurinov I., Guinovart J. J., Tyers M. Structural basis for the recruitment of glycogen synthase by glycogenin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(28):E2831-E40.
129. Selvakumar P., Ashakumary L., Helen A., Pandey A. Purification and characterization of glucoamylase produced by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Lett Appl Microbiol.* 1996;23(6):403-6.
130. Munkley J. Glycosylation is a global target for androgen control in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2017;24(3):R49-R64.
131. Ojalill M., Rappu P., Siljamäki E., Taimen P., Boström P., Heino J. The composition of prostate core matrisome in vivo and in vitro unveiled by mass spectrometric analysis. *Prostate.* 2018;78(8):583-94.

132. Sachs B. D., Meisel R. L. Pubertal development of penile reflexes and copulation in male rats. *Psychoneuroendocrinology*. 1979;4(4):287-96.
133. Korenbrot C., Huhtaniemi I., Weiner R. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol Reprod*. 1977;17(2):298-303.
134. Rajagopal S., Hutchinson J., Dorward D., Rossi A., Norman J. Crosstalk between monocytes and myometrial smooth muscle in culture generates synergistic pro-inflammatory cytokine production and enhances myocyte contraction, with effects opposed by progesterone. *Mol Hum Reprod*. 2015;21(8):672-86.
135. Sivarajasingam S., Imami N., Johnson M. Myometrial cytokines and their role in the onset of labour. *J Endocrinol*. 2016;231(3):R101-R19.
136. Wijayarathna R. d., De Kretser D. Activins in reproductive biology and beyond. *Hum Reprod Update*. 2016;22(3):342-57.
137. Movsas T. Z., Sigler R., Muthusamy A. Vitreous levels of luteinizing hormone and VEGF are strongly correlated in healthy mammalian eyes. *Curr Eye Res*. 2018;43(8):1041-4.
138. Brew K., Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(1):55-71.
139. Stetler-Stevenson W. G. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal*. 2008;127:re6.
140. Oh J., Takahashi R., Kondo S., Mizoguchi A., Adachi E., Sasahara R. M., Nishimura S., Imamura Y., Kitayama H., Alexander D. B. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*. 2001;107(6):789-800.
141. Handsley M. M., Edwards D. R. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer*. 2005;115(6):849-60.



## Bibliografía

142. Seo D.-W., Li H., Guedez L., Wingfield P. T., Diaz T., Salloum R., Wei B.-y., Stetler-Stevenson W. G. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell*. 2003;114(2):171-80.
143. Yoon S.-O., Park S.-J., Yun C.-H., Chung A.-S. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol*. 2003;36(1):128-37.
144. Hiraoka N., Allen E., Apel I. J., Gyetko M. R., Weiss S. J. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell*. 1998;95(3):365-77.
145. Itoh Y., Takamura A., Ito N., Maru Y., Sato H., Suenaga N., Aoki T., Seiki M. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J*. 2001;20(17):4782-93.
146. Bergers G., Brekken R., McMahon G., Vu T. H., Itoh T., Tamaki K., Tanzawa K., Thorpe P., Itohara S., Werb Z. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*. 2000;2(10):737-44.
147. Zhou Z., Apte S. S., Soininen R., Cao R., Baaklini G. Y., Rauser R. W., Wang J., Cao Y., Tryggvason K. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(8):4052-7.
148. Shao J.-C., Wang Y., Zhang S.-W., Luo D.-K., Chang D.-G., Wu X.-Q., Tang M., He Z.-M. Angiogenesis and regulatory factors in rats with BPH induced by testosterone. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2005;11(6):413-8.
149. Lekas A. G., Lazaris A. C., Chrisofos M., Papatsoris A. G., Lappas D., Patsouris E., Deliveliotis C. Finasteride effects on hypoxia and angiogenic markers in benign prostatic hyperplasia. *Urology*. 2006;68(2):436-41.
150. de Bono J. S., Guo C., Gurel B., De Marzo A. M., Sfanos K. S., Mani R. S., Gil J., Drake C. G., Alimonti A. Prostate carcinogenesis: inflammatory storms. *Nat Rev Cancer*. 2020:1-15.

151. Weich H. A., Bando H., Brokelmann M., Baumann P., Toi M., Barleon B., Alitalo K., Sipos B., Sleeman J. Quantification of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) by a novel ELISA. *J Immunol Methods*. 2004;285(2):145-55.
152. Connolly J., Sun X., Rose D. A comparison of the expression of the malignant phenotype in two androgen-independent human prostate cancer cell lines after orthotopic implantation in nude mice. *Int J Oncol*. 1997;11(4):771-6.
153. Stachon A., Schlüter T., Köller M., Weisser H., Krieg M. Primary culture of microvascular endothelial cells from human benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 2001;48(3):156-64.
154. Papaioannou A. I., Kostikas K., Kollia P., Gourgoulisanis K. I. Clinical implications for vascular endothelial growth factor in the lung: friend or foe? *Respir Res*. 2006;7(1):128.
155. Thickett D. R., Armstrong L., Christie S. J., Millar A. B. Vascular endothelial growth factor may contribute to increased vascular permeability in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(9):1601-5.
156. Thickett D. R., Armstrong L., Millar A. B. A role for vascular endothelial growth factor in acute and resolving lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(10):1332-7.
157. Jackson M. W., Bentel J. M., Tilley W. D. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *J Urol*. 1997;157(6):2323-8.
158. Weber D. C., Tille J.-C., Combescure C., Egger J.-F., Laouiti M., Hammad K., Granger P., Rubbia-Brandt L., Miralbell R. The prognostic value of expression of HIF1 $\alpha$ , EGFR and VEGF-A, in localized prostate cancer for intermediate-and high-risk patients treated with radiation therapy with or without androgen deprivation therapy. *Radiat Oncol*. 2012;7(1):1-8.

## Bibliografía

159. Huo Q., Colon J., Cordero A., Bogdanovic J., Baker C. H., Goodison S., Pensky M. Y. A facile nanoparticle immunoassay for cancer biomarker discovery. *J Nanobiotechnology*. 2011;9(1):20.
160. Djordjevic G., Mozetic V., Mozetic D. V., Licul V., Ilijas K. M., Mustac E., Oguic R., Fuckar Z., Jonjic N. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in clear cell renal cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2007;203(2):99-106.
161. Matušan-Ilijaš K., Babarović E., Hadžisejdić I., Grahovac M., Grahovac B., Jonjić N. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  correlates with vascular endothelial growth factor A and C indicating worse prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009;28(1):40.
162. Xie B., Tam N., Tsao S., Wong Y. Co-expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (flk-1 andflt-1) in hormone-induced mammary cancer in the Noble rat. *Br J cancer*. 1999;81(8):1335-43.
163. Waldner M. J., Wirtz S., Jefremow A., Warntjen M., Neufert C., Atreya R., Becker C., Weigmann B., Vieth M., Rose-John S. VEGF receptor signaling links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. *J Exp Med* 2010;207(13):2855-68.
164. Lian L., Li X.-L., Xu M.-D., Li X.-M., Wu M.-Y., Zhang Y., Tao M., Li W., Shen X.-M., Zhou C. VEGFR2 promotes tumorigenesis and metastasis in a pro-angiogenic-independent way in gastric cancer. *BMC cancer*. 2019;19(1):1-15.