



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**PARTICIPACIÓN DE LAS DESYODASAS EN LA INICIACIÓN Y PROGRESIÓN  
DEL CÁNCER DE PRÓSTATA. ASOCIACIÓN CON MARCADORES DE  
PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR.**

TESIS

Que para obtener el Título de:

**Bióloga**

PRESENTA

**Silvia Angulo Barbosa**

**Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano**

**DIRECTORA DE LA TESIS**

**Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM**

**2012**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano. Este trabajo fue apoyado por CONACYT (127368, 78955) y PAPIIT-UNAM (IN201210).

## **AGRADECIMIENTOS**

Infinitamente a la Dra. Carmen Aceves Velasco por abrirme las puertas de su laboratorio y haberme permitido ser parte de su equipo de trabajo y especialmente a la Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano por su comprensión, apoyo, enseñanzas y sobretodo confianza, que me han ayudado a realizar un sueño y a continuar con mi formación académica, la cual además impulsa con su ejemplo.

A Dra. Rita Arcelia del Castillo Rodríguez pues fue el artífice que me mostró el sendero a seguir, con apoyo y consejos valiosísimos al integrarme a este nuevo recinto y porqué su perspectiva ha influido directamente en esta meta.

A mis sinodales, quienes además de su excelencia académica tienen una excelente calidad humana; gracias por su dedicación, tiempo, críticas y aportaciones a este trabajo.

A Q.F.B. Guadalupe Delgado, Biol. Felipe Ortiz por el apoyo técnico brindado a este proyecto y a todos mis compañeros del laboratorio D-02 (Susy, Irasema, Paloma, Evangelina, Aura, Yunuen, Mario, Osiel, Alex y Liz) que me adoptaron, y ayudaron en toda esta aventura; convirtiéndose en miembros de mi familia.

A M.V.Z. Martín García Servín (Biotério del Instituto de Neurobiología), a M. en C. Leonor Casanova Rico (Unidad de Enseñanza), Ing. Ramón Martínez Olvera y Lic. Nancy Lorena Ortiz (Unidad de Cómputo), a la Dra. Anaid Antaramian y a M. en C. Adriána González (Unidad de Proteogenómica), Dr. Francisco J. Valles Valenzuela (Biblioteca Campus Juriquilla), Ma. de Lourdes Palma Tirado y

Elsa Nydia Hernández Ríos (Unidad de Microscopia), Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado, Biol. Ma. Teresa Ortiz Melo, M. en C. Julieta Orozco Martínez, Biol. Daniel Morales, Biol. Ángel Lara y M. en C Rafael Chávez López (Administración de la FES-Iztacala).

A mis compañeros y amigos del Instituto de Neurobiología Dr. Néstor Nazario, Dr. José Luis Luna, Dr. Ismael Baños, Dr. Daniel Ríos, Dr. Ernesto Flores, Dr. José Manuel Zamudio, Dr. José Ávila, M en C. Daniel Morales, Dra. Verónica Cabrera, Dra. Gabriela H. Puga y a mis compañeros de la Maestría, a todos por su ayuda en la orientación y visión de mi proyecto, que en diversos puntos han influido en mi formación.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de manera muy especial a mis profesores de la FES- Iztacala, pues con su pasión me hicieron amar esta carrera, sembrando la semillita de las ganas de querer saber más cada día, a no conformarme con que los procesos ocurran así porque si y maravillarme con esto que nos rodea y que conocemos con la simple pero magnífica palabra “Biología”.

A mis padres Rosalinda Barbosa Ramos y Leopoldo Angulo Casillas, por todo su apoyo, los sacrificios y esfuerzos; a mis hermanos Juan Carlos, Fernando, Santiago y Dilian, por ser tan lindos conmigo, confiar en mí y ser partícipes de mis más bellos recuerdos, a mis chaparras Magui y Brissia por obligarme a ser mejor ejemplo para ellas y por enseñarme lo que de verdad vale a cada momento.

A Mario el compañero y amor de mi vida, quien me apoya e impulsa en todo lo que hago, quien me inspira con su ejemplo a ser una mejor persona para crecer juntos y caminar compartiendo los años tomada de su mano.

A mis amiguis, los que fueron, los que serán, pero sobretodo y con muchísimo cariño a los que a pesar de la distancia y tiempo siempre están presentes.

Los amo son todos mis mentores, con sus granitos de arena me han formado.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b><u>Viii</u></b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b><u>lx</u></b>
<b><u>RESUMEN</u></b>	<b><u>X</u></b>
<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>ANTECEDENTES</u></b>	<b><u>3</u></b>
Fisiología Tiroidea.	<b><u>3</u></b>
Glándula Tiroides	<b><u>3</u></b>
Estructura de las Hormonas Tiroideas	<b><u>4</u></b>
Síntesis y Secreción de Hormonas Tiroideas	<b><u>5</u></b>
Eje Hipotálamo – Hipófisis – Tiroides	<b><u>6</u></b>
Transporte de Hormonas Tiroideas	<b><u>8</u></b>
Efectos Biológicos de las Hormonas Tiroideas	<b><u>9</u></b>
Mecanismo de acción de las Hormonas Tiroideas	<b><u>10</u></b>
Internalización de las Hormonas Tiroideas en células blanco	<b><u>11</u></b>
Metabolismo de las Hormonas Tiroideas: Regulación local / desyodación	<b><u>11</u></b>
Desyodasa Tipo 1	<b><u>12</u></b>
Desyodasa Tipo 2	<b><u>12</u></b>
Desyodasa Tipo 3	<b><u>12</u></b>

Función Tiroidea y Sistema Reproductor Masculino	<u>14</u>
<b><u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u></b>	<u>16</u>
<b><u>HIPÓTESIS</u></b>	<u>17</u>
<b><u>OBJETIVOS</u></b>	<u>17</u>
Objetivo General	<u>17</u>
Objetivos Particulares	<u>17</u>
<b><u>MATERIALES Y METODOS</u></b>	<u>18</u>
Material Biológico: Modelo TRAMP	<u>18</u>
Diseño Experimental	<u>18</u>
Análisis Histopatológico	<u>19</u>
Extracción y Cuantificación de T3 en el Tejido Prostático por ELISA	<u>19</u>
Extracción y Cuantificación de RNA	<u>20</u>
Expresión de Genes RT – PCR Tiempo Real	<u>20</u>
Análisis Estadístico	<u>21</u>
<b><u>RESULTADOS</u></b>	<u>22</u>
Peso Corporal y Prostático	<u>22</u>
Histopatología	<u>24</u>
Expresión de D1 y D3 en el Tejido Prostático Normal y Tumoral	<u>26</u>
Niveles Prostáticos de T3	<u>27</u>



Expresión de Ciclina D1 y ARA70 $\alpha$	<b><u>28</u></b>
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b><u>29</u></b>
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b><u>PERSPECTIVAS</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b><u>REFERENCIAS</u></b>	<b><u>34</u></b>
<b><u>ANEXO</u></b>	<b><u>49</u></b>
1. Aspectos generales del cáncer de próstata	<b><u>49</u></b>
2. Genotipificación de ratones TRAMP	<b><u>54</u></b>
3.- Procesamiento de los tejidos y tinción para histología	<b><u>55</u></b>
4.- Parámetros histológicos utilizados para identificar las etapas del cáncer prostático en el modelo TRAMP	<b><u>56</u></b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Localización y anatomía de la glándula tiroides.	<b><u>3</u></b>
<b>Figura 2.</b> Estructura química de las hormonas tiroideas.	<b><u>4</u></b>
<b>Figura 3.</b> Fases del proceso de síntesis y secreción de HTs, dentro de un tirocito.	<b><u>6</u></b>
<b>Figura 4.</b> Eje hipotálamo – Hipófisis – Tiroides.	<b><u>7</u></b>
<b>Figura 5.</b> Monodesyodación secuencial de las hormonas tiroideas.	<b><u>13</u></b>
<b>Figura 6.</b> Peso corporal y prostático en ratones de 8, 13, 20 y 30 semanas de edad, del grupo silvestre y TRAMP.	<b><u>23</u></b>
<b>Figura 7.</b> Fotomicrografías de cortes histológicos en parafina teñidos con hematoxilina-eosina, de ratones silvestres y TRAMP.	<b><u>25</u></b>
<b>Figura 8.</b> Expresión prostática de D1 y D3 (mRNA) en ratones silvestres y TRAMP de 8, 13, y 30 semanas de edad.	<b><u>26</u></b>
<b>Figura 9.</b> Concentraciones de T3 en la próstata de ratones silvestres y TRAMP de 8 y 30 semanas de edad.	<b><u>27</u></b>
<b>Figura 10.</b> Expresión de ciclina D1 y ARA 70 $\alpha$ , en ratones silvestre y TRAMP de 8, 13, y 30 semanas de edad.	<b><u>28</u></b>
<b>Figura 11.</b> Desarrollo del cáncer prostático en humano.	<b><u>50</u></b>
<b>Figura 12.</b> Fotografía de los producto de la PCR en gel de agarosa.	<b><u>54</u></b>
<b>Figura 13.</b> Fotomicrografía del tejido prostático normal.	<b><u>57</u></b>
<b>Figura 14.</b> Fotomicrografía del tejido prostático canceroso del modelo TRAMP.	<b><u>59</u></b>

## **ÍNDICE DE CUADROS**

<b>CUADRO 1.</b> Estructura química de las hormonas tiroideas (T3 y T4) y sus precursores (MIT Y DIT).	<b><u>5</u></b>
<b>CUADRO 2.</b> Proteínas transportadoras de HTs.	<b><u>9</u></b>
<b>CUADRO 3.</b> Efectos biológicos de las HTs.	<b><u>10</u></b>
<b>CUADRO 4.</b> Características de los olinonucleótidos utilizados en la RT-PCR.	<b><u>21</u></b>
<b>CUADRO 5.</b> Características de los oligonucleótidos utilizados en la genotipificación.	<b><u>54</u></b>
<b>CUADRO 6.</b> Soluciones para la tinción histológica con hematoxilina-eosina.	<b><u>55</u></b>

## **RESUMEN**

Las hormonas tiroideas participan en procesos fisiológicos como proliferación, diferenciación y metabolismo celular. Su disponibilidad se regula de manera órgano-específica mediante la acción de enzimas denominadas desyodasas. Las desyodasas tipo 1 y 2 (D1, D2) generan a partir de tiroxina, una tironina activa (triyodotironina o T3); mientras que la desyodasa tipo 3 (D3) genera formas inactivas. Estudios previos muestran que la expresión de la D1 prostática se induce durante el desarrollo puberal. Dicha actividad declina con la edad, pero la actividad sexual evita su descenso, sugiriendo que la T3 local participa en la diferenciación y función de la próstata. No existen estudios que analicen el metabolismo de tironinas en patologías prostáticas. El objetivo de esta tesis consistió en analizar en la próstata normal y tumoral, la expresión de las desyodasas, sus niveles de T3 y su asociación con marcadores de diferenciación (ARA 70 $\alpha$ ) y proliferación celular (ciclina D1). Se utilizó el modelo del ratón TRAMP, el cual desarrolla neoplasia intraepitelial (PIN, 13 semanas) y cáncer prostático (30 semanas). Se utilizaron ratones silvestres (C57BL/6) como grupo control (próstata normal) ajustados a la edad. Los resultados mostraron que la D1 prostática de los ratones silvestres y TRAMP disminuyó significativamente en la etapa adulta (13 y 30 semanas). Además los ratones TRAMP presentaron una menor expresión de D1 a las 8 y 13 semanas, en relación al silvestre. La expresión de ARA 70 $\alpha$  se observó en ambos grupos de 8 semanas de edad, sólo que en el silvestre aumentó significativamente a las 13 y 30 semanas y en el TRAMP no aumentó con la edad. La expresión de la D3 prostática fue indetectable en los ratones silvestres, mientras que en la próstata de los ratones TRAMP, se expresó en todas las edades, alcanzando los valores más altos a las 30 semanas. La ciclina D1 se expresó a las 8, 13 y 30 semanas en ambos grupos de ratones, pero a las 13 y 30 semanas el TRAMP presentó niveles significativamente más altos en comparación con el silvestre. La concentración de T3 prostática fue elevada en ambos grupos a las 8 semanas y disminuyó significativamente a las 30, presentando el TRAMP niveles significativamente menores a las 8 y 30 semanas. Estos datos corroboran la participación de las desyodasas en el control de la T3 prostática y sugieren que la generación local de esta hormona podría contribuir a mantener la integridad epitelial, mientras que los bajos niveles en el ratón TRAMP, parecen estar asociados al proceso canceroso (proliferación y desdiferenciación celular).

## INTRODUCCIÓN

Las hormonas tiroideas (HTs) participan en varios procesos de la fisiología reproductiva, modulando a varios niveles la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, y la actividad de las glándulas accesorias (Krassas et al., 2010). La próstata forma parte del tracto reproductor masculino, es una glándula mixta túbulo-alveolar, que está presente en todos los mamíferos. Su principal función consiste en contribuir al líquido seminal con compuestos (fosfatasa ácida, espermina, espermidina), los cuales regulan la movilidad de los espermatozoides y mantienen su viabilidad (Burden et al., 2005). El desarrollo y diferenciación de la próstata depende primordialmente de las hormonas sexuales, sin embargo, existen evidencias de que las HTs también participan en estos procesos (López-Juárez et al 2009). Una forma activa de las HTs es la triyodotironina o 3´3,5-T3, la cual se genera en órganos blanco extra-tiroideos a partir de la desyodación de la tetrayodotironina o 3´5´3,5-T4. Este proceso de activación es catalizado por las desyodasas tipo 1 (D1) y tipo 2 (D2). A su vez y por acción de la desyodasa 3 (D3), la T4 y la T3 pueden ser desyodadas a formas inactivas, como la 3´,5´3-T3 reversa y 3´,3-T2 (Bianco et al., 2002). Durante el período puberal, la próstata de rata expresa una elevada actividad D1 (vía activación) la cual declina en la etapa adulta. Sin embargo, la continua actividad sexual y a largo plazo, previene esta reducción (López-Juárez et al 2009). Por el contrario y en comparación con la glándula normal, en una línea celular de cáncer prostático diferenciado (LNCaP), se ha encontrado una reducida expresión D1, la cual prácticamente desaparece en una línea desdiferenciada (DU-145) (datos no publicados). Estas evidencias han llevado a proponer que la transcripción y activación de la D1 y la consecuente generación local del T3, son eventos que podrían estar relacionados con la diferenciación y actividad secretora del epitelio prostático. Se desconoce la participación de la D3 (vía inactivación) en la fisiopatología prostática, pero estudios en otros modelos han mostrado una elevada expresión de esta enzima en procesos proliferativos asociados al desarrollo normal de algunos órganos y tejidos (período fetal, metamorfosis, etc), así como en procesos proliferativos

patológicos (hemangiomas, hipertrofia cardíaca, cáncer, etc) (Shi et al., 2001; Dentice et al., 2005; Hernandez et al., 2007; Kester et al., 2011).

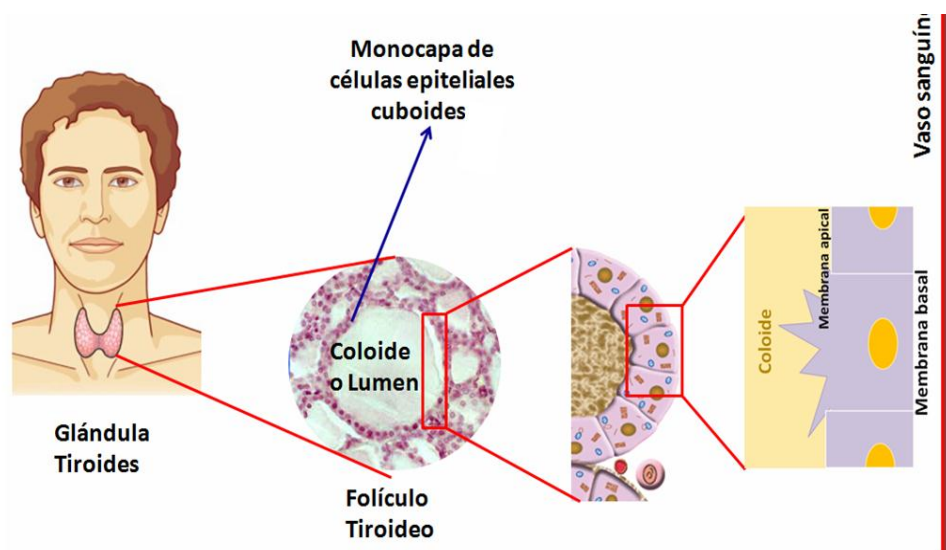
El cáncer de próstata es la neoplasia más frecuentemente diagnosticada y segunda causa de muerte en varones mayores de 50 años (American Cancer Society, 2012). Comprender los procesos moleculares asociados a la iniciación y/o progresión de esta enfermedad, permitirá un mejor alcance de las estrategias terapéuticas. Con base a lo anterior, el propósito del presente trabajo fue: 1) analizar la expresión de las desyodasas y los niveles de T3 en las diferentes etapas del cáncer prostático (iniciación, neoplasia intraepitelial y cáncer), y 2) evaluar la expresión de genes dependientes de T3 asociados a proliferación y diferenciación celular. A continuación se revisan aspectos generales de las hormonas tiroideas, así como sus posibles implicaciones en la fisiología y el cáncer prostático. Posteriormente se plantea la hipótesis y los objetivos del estudio y finalmente se presentan y discuten los resultados.

## ANTECEDENTES

### Fisiología Tiroidea

#### Glándula Tiroides

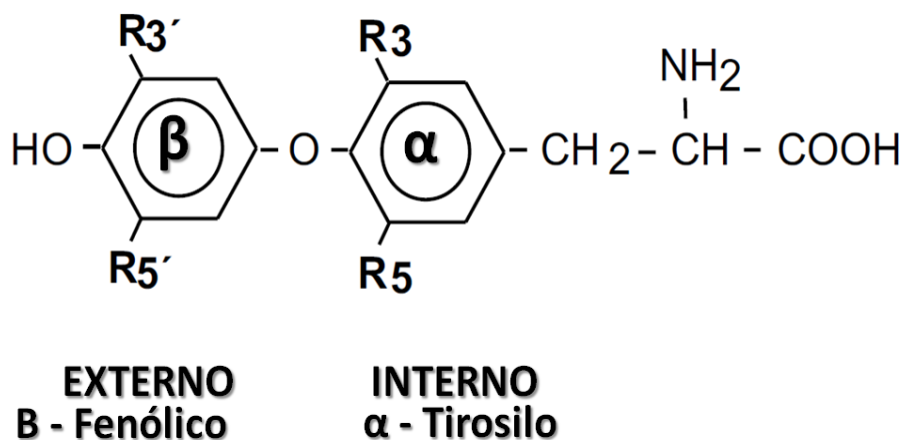
La tiroides es una glándula endocrina, que está presente en todos los vertebrados. En el humano está ubicada en la parte frontal del cuello, entre las vértebras C5 y T1, adyacente al cartílago tiroideo y sobre la tráquea. Está formada por dos lóbulos unidos por un istmo. Como se muestra en la figura 1, la unidad funcional de esta glándula es el folículo tiroideo, el cual está formado por una monocapa de células epiteliales (tirocitos) que rodean al coloide. El coloide constituye un almacén extracelular de la proteína tiroglobulina (Tg), de tirosinas y de hormonas tiroideas. La integridad de los folículos tiroideos depende de muchos factores, entre los que destacan un aporte suficiente de yodo. Está bien establecido que en humanos adultos una dosis de 150 µg /día de yodo es suficiente para mantener la función tiroidea (Greenspan et al., 2007).



**Figura 1.** Localización y anatomía de la glándula tiroides. Los folículos tiroideos constituyen la unidad funcional de la glándula, los cuales forman una monocapa epitelial (tirocitos) que rodea al coloide. Los tirocitos presentan una polaridad funcional (membrana basal y apical).

### Estructura Química de las Hormonas Tiroideas

Las hormonas tiroideas (HTs), forman parte de una familia de yodotironinas las cuales se caracterizan por contener átomos de yodo en su estructura. La síntesis de estas hormonas se lleva a cabo en la glándula tiroides, a partir de aminoácidos tirosina. En la figura 2 se muestra la estructura básica de las HTs, la cual se compone de dos tirosinas (anillos bencénicos) unidas por un puente de oxígeno (enlace éter). El anillo interno (tirosilo,  $\alpha$ ) posee una cadena alanina y el externo un grupo fenilo (fenólico,  $\beta$ ). La actividad biológica de las tironinas depende de la localización de los átomos de yodo (3,5, interno o 3',5', externo). Las hormonas activas están representadas por la tetrayodotironina o tiroxina (3',5',3,5-T4) y la triyodotironina (3',3,5,-T3).

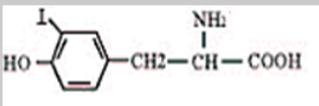
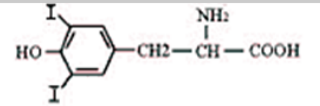
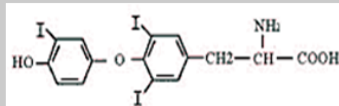
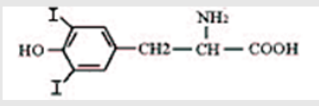
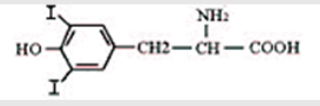
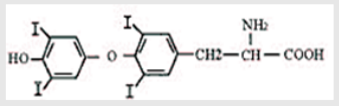


**Figura 2.** Estructura química de las hormonas tiroideas. Se sintetizan a partir del acoplamiento (enlace éter) de dos tirosinas. Se muestra el anillo interno ( $\alpha$  – tirosilo), el cual conserva los grupos amino y carboxilo y el externo ( $\beta$  – fenilo). Los grupos R representan los sitios potenciales de yodación (Modificado de Valverde, et al., 2011)

En el cuadro 1 se muestra la estructura química de los precursores yodados que dan lugar a la formación de HTs. La T4 se forma a partir de la unión de dos diyodotirosinas (DIT) y la T3 a partir de la unión de una monoyodotirosina (MIT) y una diyodotirosina (DIT) (Millares et al., 2008).

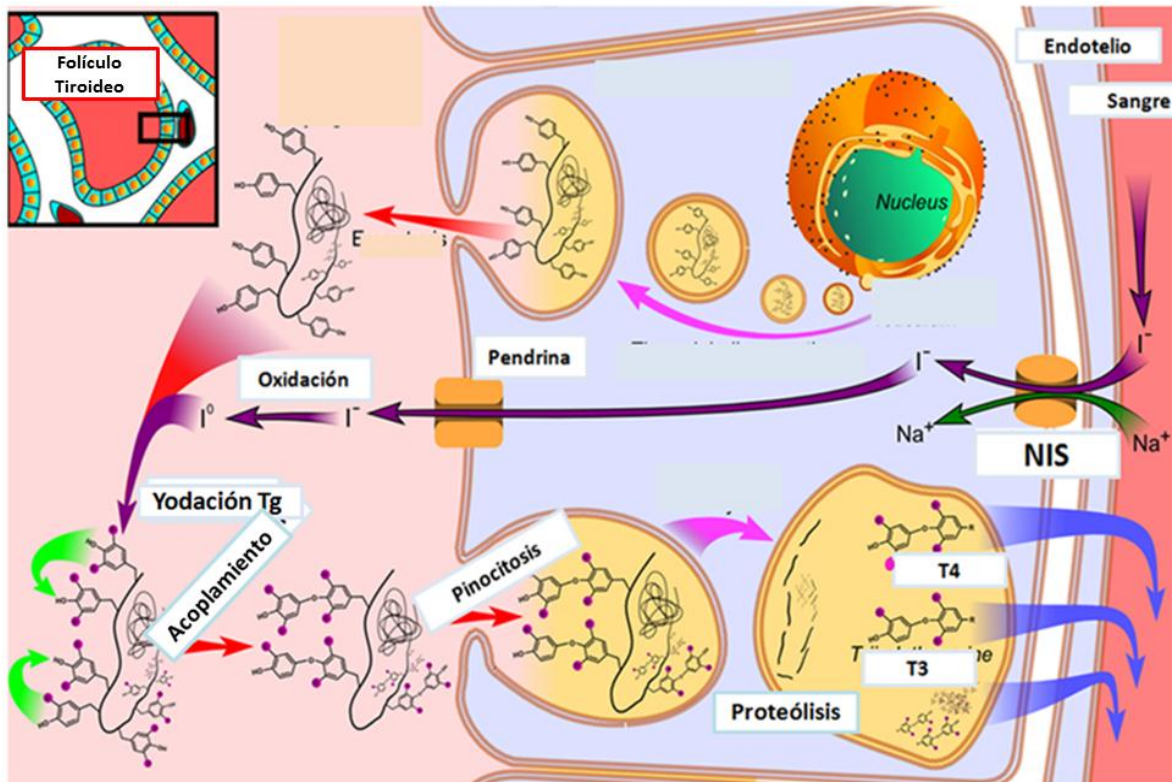


**CUADRO 1** ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS HORMONAS TIROIDEAS (T3 Y T4) Y SUS PRECURSORES (MIT Y DIT).

<b>PRECURSOR (yodotirosinas)</b>		<b>HORMONA TIROIDEA (yodotironinas)</b>
<b>3 Monoyodotirosina (MIT)</b> 	<b>3,5-Diyodotirosina (DIT)</b> 	<b>3,5,3'-Triyodotironina (T3)</b> 
<b>3,5-Diyodotirosina (DIT)</b> 	<b>3,5-Diyodotirosina (DIT)</b> 	<b>3,5,3',5'-Tetrayodotironina (T4)</b> 

### Síntesis y Secreción de Hormonas Tiroideas

En los folículos tiroideos se lleva a cabo la síntesis, secreción y almacenamiento de HTs. En la figura 3 se muestran las fases de síntesis de T4 y T3 a partir de la captura de yoduro inorgánico (I<sup>-</sup>). La membrana basal de los tirocitos expresa un cotransportador de I<sup>-</sup>/Na<sup>+</sup> (NIS, *del inglés Na/I symporter*), el cual permite la entrada de dos iones de sodio y uno de yoduro, en contra de un gradiente electroquímico. El I<sup>-</sup> se internaliza y sale hacia la membrana apical por medio de la proteína pendrina (PDS). La membrana apical expresa una enzima denominada tiro-peroxidasa (TPO), la cual transforma el I<sup>-</sup> a especies más oxidadas (I<sub>2</sub>) y permite la organificación del I<sub>2</sub> a los residuos tirosina de la tiroglobulina (Tg). Esta reacción da lugar a la formación de MIT y DIT. La T4 es producto del acoplamiento de dos DIT, mientras que la T3 se produce por la unión de un DIT más un MIT, por medio de la actividad de TPO. A través de un mecanismo de pinocitosis, se internalizan gotas del coloide (Tg yodada) al citoplasma, las cuales se fusionan a lisosomas y dan lugar a la formación de fago-lisosomas. La T4 y la T3 se liberan de la matriz proteica por medio de proteasas y salen del tirocito a la circulación (Tresguerres et al., 2004).



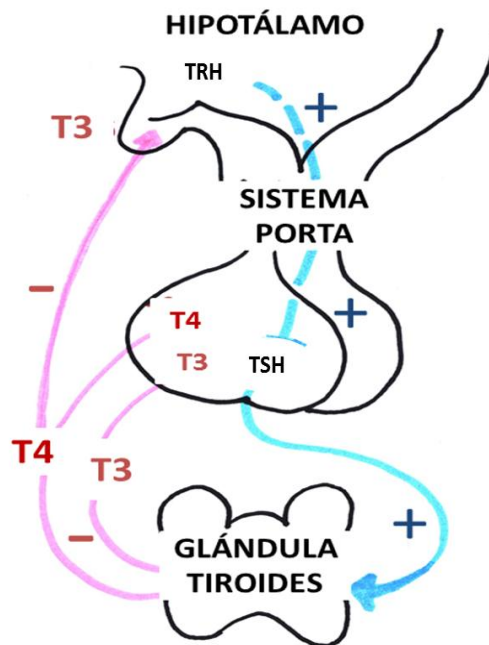
**Figura 3.** Fases del proceso de síntesis y secreción de HTs, dentro de un tirocito: De derecha a izquierda se muestra la captura de  $I^-$  (NIS), oxidación del  $I^-$  por acción de la TPO, yodación de Tg, acoplamiento de yodotirosinas, proteólisis y liberación hormonal (Tomada de: Walter et al., 2003).

### Eje hipotálamo – Hipófisis - Tiroides

La actividad de la glándula tiroides está controlada por la unidad hipotálamo-hipofisiaria y por el aporte de yodo (autoregulación) (Figura 4).

En los núcleos paraventriculares del hipotálamo se lleva a cabo la síntesis y secreción de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) al sistema porta hipofisiario. La TRH actúa a través de receptores membranales acoplados a proteínas Gq (fosfatidil-inositol/cinasa/Ca), los cuales estimulan la producción y secreción hipofisiaria de la hormona estimulante de la tiroides o TSH. La TSH se une a su receptor membranal acoplado a proteína Gi (adenilato ciclasa/ AMPc/

cinasas/ CREB) induciendo la síntesis y secreción de HTs. El control inhibitorio de la tiroides, está mediado a través de un mecanismo de retroalimentación negativa, en el que los niveles elevados de HTs inhiben a nivel hipotálamo-hipofisiario la síntesis y secreción de TRH y TSH. Se sabe que el TRH es regulado positivamente por la inervación adrenérgica y negativamente por dopamina y somatostatina. La TSH además de ser estimulada por TRH, también es regulada positivamente por catecolaminas y negativamente por glucocorticoides y estrógenos (Werner et al., 2008).



**Figura 4.** Eje hipotálamo – Hipófisis – Tiroides. El tirostatohipofisiario se regula positivamente por la TRH hipotalámica, y negativamente por las HTs, provenientes de la circulación, así como por la T3 generada en la hipófisis. TRH, Hormona liberadora de tirotropina; TSH, Hormona estimulante de tiroides. +, estimulación; -, inhibición (Greenspan et al., 2007)

Además de la regulación neuroendócrina, la glándula tiroides posee mecanismos de autoregulación. Es bien conocido que si los niveles de yoduro aumentan de 10

a 100 veces, se reduce transitoriamente la formación de AMPc en respuesta a TSH, disminuyendo la síntesis de Tg con la consecuente inhibición de la captura de yoduro. Este efecto inhibitor del yodo se restablece después de tres días y se conoce como efecto Wolff-Chaikoff. Por el contrario, la deficiencia de yodo se acompaña de un aumento en los niveles de TSH, de un aumento trófico del tamaño de la glándula tiroides (bocio) y de una deficiencia en la síntesis de HTs. Si la deficiencia ocurre durante el desarrollo, se genera cretinismo o retraso mental (Werner et al., 2008; Tresguerres, 2008).

### **Transporte de Hormonas Tiroideas**

En el torrente sanguíneo las HTs se unen a proteínas transportadoras a través de enlaces débiles. Las principales proteínas son la globulina de unión a Tiroxina (TGB), la transtiretina (TTR) y la albúmina. La TGB es la proteína menos abundante (1.5 mg/ml) pero de mayor afinidad ( $K_a=1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ), mientras que la albúmina es muy abundante (4200 mg/ml) pero presenta una menor afinidad ( $K_a=1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). En el cuadro 2 se muestran algunas características de las proteínas transportadoras (Stockigt et al., 2012).

**CUADRO 2** PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE HT<sub>s</sub>.

Proteína Transportadora	K <sub>d</sub> , T <sub>4</sub>	Hormona Transportada	Concentración (mg/dl)	Proporción T3 Y T4 unida
TGB	1x10 <sup>10</sup> M <sup>-1</sup>	75 %	1.5	T3, 80 % T4, 68 %
TTR	2x10 <sup>8</sup> M <sup>-1</sup>	10 %	25	T3, 9 % T4, 11 %
ALBUMINA	1.5x10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup>	20 %	4200	T3, 11 % T4, 20 %

Se muestra la afinidad de las proteínas transportadoras, su concentración en plasma, y la proporción de hormona unida a proteína. Aproximadamente más del 99% de T3 o T4 se transportan unidas a proteínas.

### **Efectos Biológicos de las Hormonas Tiroideas**

Las HTs están presentes en todos los vertebrados y sus efectos se clasifican en dos grandes categorías desarrollo y metabolismo. En el cuadro 3 se resumen algunas de las principales funciones de las HTs en mamíferos (Pascual A y Aranda A, 2012; Warner A y Mittag J., 2012).

**CUADRO 3. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS HTs.**

<b>FUNCIONES</b>	<b>EFFECTOS</b>
Termogénesis	Aumento de la tasa metabólica (Incrementa consumo de oxígeno)
Metabólicos	Participa en la glucogénesis, gluconeogénesis y lipólisis.
Cardiovasculares	Aumenta frecuencia y fuerza de contracción cardiaca (aumenta presión sistólica y disminuye diastólica)
Desarrollo	SNC Hueso Adipocitos Intestino Pulmón Gónadas
Reproducción	Maduración sexual Modulan la actividad del eje hipotálamo- hipófisis-gónada Fertilidad

**Mecanismo de acción de HTs**

Los efectos biológicos de HTs están mediados por mecanismos: no-genómicos y genómicos. Los efectos no-genómicos ocurren a través de la interacción membranal con la integrina  $\alpha V\beta 3$ , o el receptor a hormonas tiroideas TR $\beta$ 1, activando cascadas de segundos mensajeros (PKC, PKA, MAPK,), modificando el flujo iónico a través de cambios en los canales de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y K<sup>+</sup> en las membranas celulares; así como en los sistemas de fosforilación (activados por fosfolipasa C) asociados con citoesqueleto (Davis et al., 2007).

Los mecanismos genómicos de T3, están mediados por su interacción con los receptores nucleares, los cuales actúan como factores de transcripción

dependientes de ligando, activando o reprimiendo la expresión de genes. Se conocen principalmente dos receptores, codificados por dos genes alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ), localizados en los cromosomas 17 y 3, respectivamente. El gen  $\alpha$  codifica para cuatro proteínas, pero un solo receptor nuclear real (TR $\alpha$ 1), las otras isoformas (TR $\alpha$ 2, TR $\Delta\alpha$ 1 y TR $\Delta\alpha$ 2) se comportan como antagonistas de TR $\alpha$ 1. Mientras que el gen  $\beta$ , codifica para dos receptores, TR $\beta$ 1 y TR $\beta$ 2 (Cheng et al., 2010).

### **Internalización de HTs en las células blanco**

Anteriormente y debido a su naturaleza lipofílica, se creía que el ingreso de HTs a la célula ocurría por difusión pasiva. Sin embargo recientes datos indican que el ingreso/egreso es un proceso activo, saturable y dependiente de energía; el cual está mediado por tres familias de transportadores: 1) monocarboxilatos, 2) aniones orgánicos, y 3) aminoácidos (Kinne et al., 2011).

### **Metabolismo de HTs: Regulación local/ desyodación**

Las HTs son susceptibles de ser degradadas para su excreción o ser metabolizadas en formas activas o inactivas. La degradación ocurre a través de reacciones de sulfatación (sulfatoconjugados), desaminación o descarboxilación (derivados acéticos), cuyos compuestos son eliminados a través de la orina o heces. (Leonard et al., 2000).

La desyodación es un mecanismo enzimático órgano-específico, capaz de producir intracelularmente hormona tiroidea activa o inactiva. Está mediado por una familia de seleno-enzimas denominadas desyodasas, las cuales catalizan la remoción esteroespecífica de átomos de yodo de las tironinas. Con base en sus características operacionales y moleculares se han descrito tres isoenzimas: La desyodasa tipo 1 (D1), desyodasa tipo 2 (D2) y desyodasa tipo 3 (D3) (Figura 5).



### **Desyodasa Tipo 1 (D1)**

La enzima D1, posee la capacidad de desyodar tanto el anillo interno (tiroilo), como el externo (fenólico) de la T4 y dar lugar a la formación de T3 (vía de activación) o rT3 (vía de inactivación). La selectividad por uno u otro anillo no está bien comprendida, pero se ha propuesto que la vía de activación se favorece a un pH de 6.5-7.4, mientras que la vía de inactivación a un pH alcalino ( $\geq 8$ ) (Köhrle et al., 1982). Esta enzima se expresa abundante en hígado, riñón y en menor cantidad en hipófisis, intestino, y en las glándulas salivales, mamaria y prostática. Se localiza en la membrana plasmática, tiene una vida media de 12 horas y forma homodímeros (27KDa). En términos generales, su expresión y actividad se regulan positivamente por T3, ácido retinóico, hormona del crecimiento, TSH e insulina y negativamente por citocinas y glucocorticoides (Maia et al., 2011).

### **Desyodasa Tipo 2 (D2)**

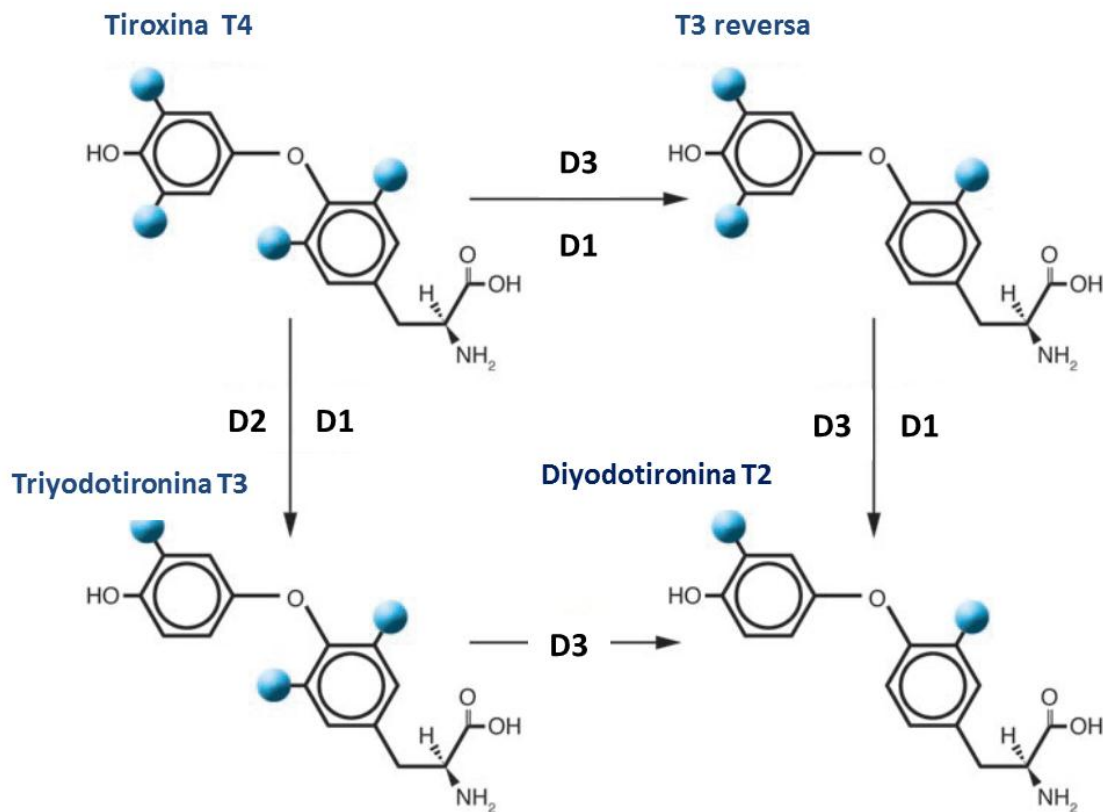
La D2 desyoda selectivamente el anillo externo (fenólico) y da lugar a la formación de T3 (vía de activación). Se expresa en sistema nervioso central (SNC), tejido adiposo café, hipófisis, placenta, tiroides, músculo esquelético y corazón. Se localiza en retículo endoplásmico, tiene una vida media de 1 hora y forma heterodímeros (27KDa y 29KDa). La regulan positivamente la estimulación  $\beta$ -adrenérgica, insulina y el glucagón, mientras que la T3 y la hormona del crecimiento la inhiben (Williams G y Bassett J., 2011).

### **Desyodasa Tipo 3 (D3)**

La D3 desyoda selectivamente el anillo externo (fenólico) de T4 y da lugar a la rT3 (vía de inactivación). A su vez la D3 puede desyodar la T3 y dar lugar a una forma inactiva de T2. Esta enzima se expresa de manera muy abundante en prácticamente todos los tejidos, durante el desarrollo fetal, y en la vida adulta está presente en cerebro, piel, útero y placenta. La D3 se localiza en la membrana plasmática, tiene una vida media de 12 horas y forma homodímeros (33KDa). Su



expresión se regula positivamente por T3, factores de crecimiento (TGF- $\beta$ , EFG FGF), hormonas sexuales, factor inductor de hipoxia, y negativamente por glucocorticoides. En tejidos que normalmente no expresan D3 en la etapa adulta, se induce su expresión en procesos inflamatorios y proliferativos (regeneración, hiperplasia y cáncer) (Salvatore et al. 1995; Dentice et al. 2011).



**Figura 5.** Monodesyodación secuencial de las hormonas tiroideas. La D1 puede potencialmente desyodar ambos anillos de la T4 y dar lugar a la formación de T3 o rT3. La D2 monodesyoda el anillo externo mientras que la D3 únicamente el anillo interno (Modificada de Dentice et al., 2011).

### **Función Tiroidea y Sistema Reproductor Masculino**

Existen múltiples reportes que indican que las HTs son esenciales para el desarrollo y función del tracto reproductor. Estas hormonas participan en el desarrollo gonadal, estimulando la diferenciación de las células de Sertoli (regulan espermatogénesis) y Leydig (esteroidogénicas) (Cooke et al., 1991 y 1994; Auharek S y Franca L., 2010). El hipotiroidismo en etapas pre-puberales retrasa la maduración sexual y en sujetos adultos se acompaña de infertilidad, lo cual ha sido explicado por una disminución en los niveles circulantes de testosterona así como en la respuesta hipofisiaria a GnRH (hormona liberadora de gonadotrofinas). En contraste, el hipertiroidismo se acompaña de un aumento en la expresión de la proteína transportadora de hormonas sexuales, y en los niveles circulantes de testosterona, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). En sujetos adultos el hipertiroidismo también provoca alteraciones en la fertilidad, disminuyendo la movilidad espermática (Krassas et al., 2010; Zamoner et al., 2011; Dittrich et al., 2011). Los efectos del hipo- e hipertiroidismo también han sido estudiados en los órganos accesorios del tracto reproductor y han llevado a proponer que las HTs promueven el crecimiento prostático de manera indirecta, a través de sus bien conocidos efectos en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Maran et al., 1998). Además existen evidencias que las HT podrían ejercer efectos directos sobre el epitelio prostático. En tejidos humanos y líneas celulares se ha mostrado que el epitelio prostático expresa receptores a HTs (Sakurai et al 1989; Esquenet et al 1995) y en cultivos de órganos se ha mostrado que el tratamiento con T3, estimula de manera lóbulo- específica una gran variedad de enzimas (fosfatasa ácida y alcalina, ATPasas dependientes de Na/K, Ca, Mg y glucosidasas) involucradas en procesos de transporte activo y en el metabolismo de azúcares (Maran et al., 1998; Sidharthan et al. 1993). En relación a los mecanismos de desyodación prostática, se sabe que la glándula normal expresa la enzima D1 capaz de generar T3 a partir de la desyodación de T4. Esta enzima se expresa alrededor de la etapa puberal y declina su expresión en la etapa adulta. En esta glándula la actividad es regulada positivamente por T3, prolactina,

estradiol, y NA, y negativamente por andrógenos (testosterona y DHT) (Anguiano et al 2006; Delgado-González 2011). En la etapa adulta la actividad sexual constante evita el decline de la actividad D1 asociado a la edad (López-Juárez et al., 2009). Estos datos han llevado a proponer que la generación local de T3 es un proceso fundamental en el desarrollo y función de la próstata.

Por otra parte, en una línea celular de cáncer prostático diferenciado (LNCaP) se ha reportado que la T3 aumenta la proliferación celular y potencia el efecto proliferativo de los andrógenos (Esquenet et al 1995). En contraste, la T3 no induce proliferación en las líneas celulares de cáncer desdiferenciado (DU-145, PC-3) y se ha propuesto que esto podría estar asociado a una disminución en el receptor TR $\beta$ 1 y a una alteración en el proceso de translocación al núcleo (Zhang et al., 1999; Hsieh M y Juang H., 2005). Estudios de nuestro grupo en células DU-145, han mostrado una reducida expresión de D1 (datos no publicados) en comparación con el tejido normal. Estudios en cáncer mamario y hepático han mostrado que la deficiencia de hormonas tiroideas promueve procesos de invasión celular y metástasis (expresión de metaloproteasas y del factor de crecimiento endotelio vascular), y acelera la adquisición del fenotipo mesenquimal (disminución de E-caderina, queratina 8/18 y aumento en vimentina) (Martínez-Iglesias et al., 2009).

No existen estudios que analicen la participación de la D3 en procesos fisiológicos o patológicos de la próstata. Sin embargo una elevada expresión de D3 ha sido reportada tanto en tumores humanos como en varias líneas celulares cancerosas (Piekielko – Witkowska et al., 2011). En un modelo de carcinoma de piel (G2N2C tricoblastoma), se ha reportado una sobre-expresión de D3, la cual está asociada a una activación de la vía *sonic hedgehog* (Shh/ciclina D1) (Dentice et al., 2006 y 2007). En ratones inmunosuprimidos inoculados con células cancerosas de piel (*knockdown* D3), se encontró una reducción del crecimiento tumoral, lo cual apoya la noción de que la D3 participa en el proceso tumorigénico (Dentice et al., 2006).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Es bien conocido que en períodos críticos del desarrollo, las hormonas tiroideas participan en la regulación de procesos de proliferación, diferenciación y metabolismo celular, siendo la regulación coordinada de las desyodasas (activación/desactivación), un evento crucial para regular el efecto biológico de las hormonas tiroideas, de manera órgano-específica y espacio-temporal.

La próstata es una glándula exocrina cuya diferenciación comienza en el periodo fetal y culmina hasta la pubertad. Es precisamente en este período fisiológico que el epitelio prostático alcanza su total diferenciación e inicia su actividad secretora. Aunque es bien conocido que la diferenciación y maduración de esta glándula depende primordialmente de hormonas sexuales (andrógenos/estrógenos), estudios de nuestro grupo han aportado evidencia de la participación de T3 en estos procesos. Estudios cinéticos y moleculares muestran que la próstata de rata expresa la D1. Esta desyodasa se expresa selectivamente a partir de la pubertad y declina con la edad, pero la actividad sexual constante (machos sexualmente activos), previene dicha disminución. El aumento en D1 está estrechamente asociado a un aumento en las concentraciones prostáticas de T3 (vía activación). Estas evidencias han llevado a proponer que la T3 prostática podría participar en la diferenciación y función del epitelio prostático. En contraste, se ha mostrado que las líneas celulares de cáncer prostático no tienen la capacidad de generar T3, pues no expresan la enzima D1 (mRNA/actividad). En relación a la enzima D3, no existen estudios que analicen su participación en el desarrollo normal y/o patológico de la próstata, pero es probable su presencia en el cáncer, dado que una elevada actividad D3 está asociada a procesos proliferativos. Con base a lo anterior, proponemos que la D1 y D3 se expresarán de manera diferencial, en el tejido prostático normal y canceroso. Esto se analizará en la próstata del ratón TRAMP (del inglés, *transgenic adenocarcinoma mouse prostate*), el cual representa un excelente modelo de cáncer prostático, pues la progresión de la enfermedad asemeja a lo que ocurre en la patología humana. Detalles sobre la

iniciación y progresión del cáncer prostático, así como sus marcadores, se muestran en el anexo. La enfermedad inicia con una lesión precancerosa (PIN, del inglés *prostate intraepithelial neoplasia*), la cual progresa a un cáncer diferenciado y eventualmente a un cáncer desdiferenciado.

### **HIPÓTESIS**

El cáncer de próstata, correlacionará con una elevada expresión de D3 y bajos niveles de hormona tiroidea activa (T3).

### **OBJETIVO GENERAL**

Analizar en la próstata normal y tumoral la expresión de las desyodasas, los niveles de T3 y su asociación con marcadores de proliferación y diferenciación celular.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Analizar la expresión de D1 y D3 en el tejido prostático normal, precanceroso (PIN) y canceroso, en el modelo del ratón TRAMP.
2. Determinar las concentraciones locales de T3 en los tejidos anteriormente mencionados.
3. Analizar la expresión de genes asociados a diferenciación (ARA 70 $\alpha$ ) y proliferación celular (ciclina D1), dependientes de T3.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material Biológico: Modelo TRAMP**

Se trabajó con una cepa de ratones transgénicos denominados TRAMP, los cuales desarrollan PIN y cáncer de próstata. Estos ratones expresan el oncogen viral de retinoblastoma de simio SV40 (antígeno tumoral transformante (Tag), el cual está ligado al gen de una proteína específica de próstata probasina (PB-Tag), cuya expresión depende de andrógenos (Greenberg, 1994b). Los ratones TRAMP provienen de un fondo genético de la cepa C57BL6, cuyo pie de cría fue obtenido de los laboratorios Jackson (Sacramento, California). La tipificación se realizó mediante PCR, a partir de DNA extraído de la cola (Gingrich et al., 1999). Los detalles del método se muestran en el anexo. Los ratones recibieron alimento y agua “*ad libitum*” y se mantuvieron con temperatura ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y fotoperiodo controlado (12:12). El sacrificio se realizó por decapitación bajo previa administración de una mezcla de ketamina/xilacina (30 y 6 mg/kg de peso corporal). Este protocolo fue aprobado por el comité de Ética del INB (UNAM), con base a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

### **Diseño Experimental**

Se utilizaron ratones TRAMP de 8, 13 y 30 semanas de edad, cuyo desarrollo tumorigénico corresponde a la etapa de iniciación, precancerosa (PIN) y cáncer, respectivamente. Como grupo control, se utilizaron ratones silvestres de edades equivalentes a las del grupo TRAMP. El día del sacrificio se registró el peso corporal y prostático. El peso prostático se normalizó respecto al peso corporal. El tejido prostático normal y/o tumoral se almacenó en formalina (10%) para su posterior procesamiento en parafina (5  $\mu\text{m}$ ) y tinción con hematoxilina-eosina (ver anexo), o se congeló a  $-70^\circ\text{C}$ , para su análisis molecular. La expresión de los mRNA que codifican para D1, D3, ciclina D1 (marcador de proliferación), y ARA70 $\alpha$  (marcador de diferenciación y como un gen supresor de tumores) (Zhu W

y Young C., 2001), se analizó por RT-PCR (tiempo real). La cuantificación de la T3 prostática se llevó a cabo mediante un ELISA (Diagnóstica internacional).

### **Análisis Histopatológico**

En el momento de la inclusión en parafina, el tejido prostático se orientó en relación a la ubicación de la uretra. De cada muestra se realizaron dos cortes (transversales) de 5 µm cada uno y de cada corte, se analizó el tejido completo normal o tumoral a 10X, 20X y 40X. En total se analizaron 2 cortes/muestra, provenientes de 3 animales independientes. El análisis histopatológico de los tejidos se realizó de acuerdo a los criterios descritos por Kaplan - Lefko (2003), mostrados en el anexo. El PIN se caracteriza por presentar pseudoestratificación nuclear, crestas epiteliales con células en penacho (núcleos polarizados y exceso de citoplasma apical) y estructuras cribiformes (agrupación celular con espacios circulares bien delimitados). El cáncer bien diferenciado, además de lo anterior presenta desmoplasia (fibrosis) y pleomorfismo (infiltración de células epiteliales al lumen).

### **Extracción y Cuantificación de T3 en el Tejido Prostático por ELISA**

La próstata normal o tumoral se pesó y se homogenizó en una proporción 1:4 (peso/volumen) en una solución de metanol + 1.0 mM PTU (6-n-propil-2-thiouracilo). El homogeneizado se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se evaporó a 65°C y se resuspendió en suero hipotiroideo de rata. La cuantificación de T3 se llevó a cabo mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA, Diagnóstica Internacional), utilizando suero hipotiroideo de humano en la curva estándar. Se utilizó una curva estándar de .075 a 10 ng/ml de T3. La reacción se incubó durante 1 hora con el primer anticuerpo (anti-T3 en ratón) y el conjugado unido y libre se separó con un segundo anticuerpo (IgG anti-ratón de cabra). El complejo unido se analizó a una longitud de onda de 450 nm.

### **Extracción y Cuantificación de RNA**

La extracción de RNA total se llevó a cabo a partir de la homogenización del tejido en Trizol, en una porción 1:10 (peso: volumen). El homogeneizado se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, y se adicionó 200  $\mu$ l de cloroformo. Posteriormente la mezcla se centrifugó (12 000 rpm a 4°C) durante 30 minutos y la fase acuosa se mezcló con 500  $\mu$ l de isopropanol, para precipitar el RNA. El precipitado se lavó con etanol (75%), se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua estéril y se almacenó a -70°C. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro a 260 nm (Nanodrop Technologies). La pureza e integridad del RNA se determinó mediante el cociente de absorbancia 260/280 nm y mediante una electroforesis (agarosa 1%).

### **Expresión de Genes (RT- PCR Tiempo Real)**

La generación de cDNA se realizó a partir de la retrotranscripción de 2  $\mu$ g de RNA de la siguiente manera: El RNA se incubó con oligo dT (50  $\mu$ M), durante 5 minutos a 64°C. Posteriormente se adicionó a la mezcla DTT (0.1 M), enzima RNAsin (40 u/ $\mu$ l), dNTPs (10 pmoles) y buffer (Tris HCl 200 mM a pH 8.4 y KCl 500 mM), A 42°C, se le adicionará la enzima Superscript II. Dicha mezcla se incubó durante 1 hora en el termociclador, seguida de otra hora a 55°C por 20 minutos.

La reacción de PCR se realizó a partir de 1.0  $\mu$ l de cDNA, y se adicionó 6  $\mu$ l SYBR Green (agente intercalante, en la estructura secundaria del DNA), 2  $\mu$ l de oligonucleótidos 1  $\mu$ l de Rox (1:10). En el cuadro 4 se muestran las características de los oligonucleótidos que se utilizaron: D1, D3, Cyc D1 y ARA70 $\alpha$  los cuales se interpolaron en la curva estándar y se normalizaron con la expresión del gen constitutivo ( $\beta$ -Actina). La fluorescencia emitida por el compuesto intercalante, es directamente proporcional al número de copias de DNA (doble cadena) generado en cada ciclo de la PCR. En todos los casos se verificó que el producto generado corresponde al tamaño esperado (electroforesis en geles de agarosa) y que los



oligos no formen dímeros (curva de *melting*). Los resultados se expresan como: número de copias del gen de interés/ número de copias de actina.

#### CUADRO 4. CARACTERÍSTICAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LA RT-PCR

Producto	Secuencia	Temperatura alineación	Tamaño producto (pb)	GenBank ID
<b>β-Actina</b>	s: CCATCATGAAGTGTGACGTTG as: ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA	55°C	173	NM_007393
<b>D1</b>	s:ATTTGACCAGTTCAAGAGACTCGTAG as: CCACGTTGTTCTTAAAAGCCCA	60°C	112	NM_007860
<b>D3</b>	s: TTCATGGCGCGGATGAG as: GATGATAAGGAAGTCAACGTCGC	60°C	72	NM_172119
<b>Cyc D1</b>	s: GTGCAGAGGGAGATTGTGCC as: GTGCAGAGGGAGATTGTGCC	64°C	315	NM_007631
<b>ARA70α</b>	s: TGCCATTGGTCTTCAGGCTCCT as: CAGGCATCGCTGAAGAACTGC	67°C	115	NM_019744

#### Análisis Estadístico

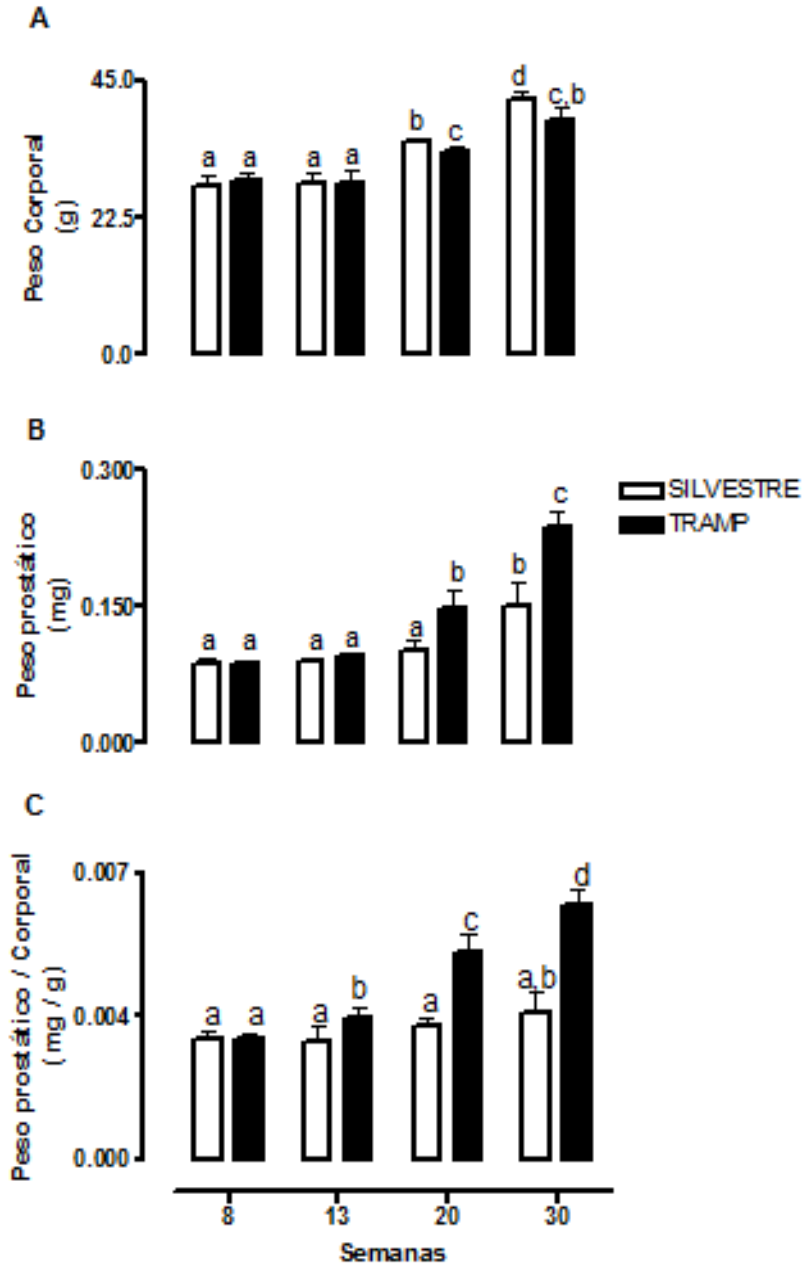
Los datos representan el promedio +/- desviación estándar. Se utilizó un tamaño de muestra (n) de 4 a 8 animales/ grupo. Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. Factor 1 (silvestre o TRAMP) y Factor 2 (8, 13 y 30 semanas de edad). Las diferencias entre grupos se determinaron con la prueba de comparación múltiple (Tuckey,  $p < 0.05$ ). El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico GraphPadPrism 4.

## **RESULTADOS**

### **Peso Corporal y Prostático.**

En la figura 6 se muestra la ganancia de peso corporal y el peso prostático, de los animales silvestres y TRAMP de 8, 13 y 30 semanas de edad. En ambos grupos (silvestre y TRAMP), el peso corporal aumentó significativamente a partir de las 20 semanas, pero en la semana 30, el peso corporal del grupo TRAMP fue significativamente menor que el del grupo silvestre (Figura 6A).

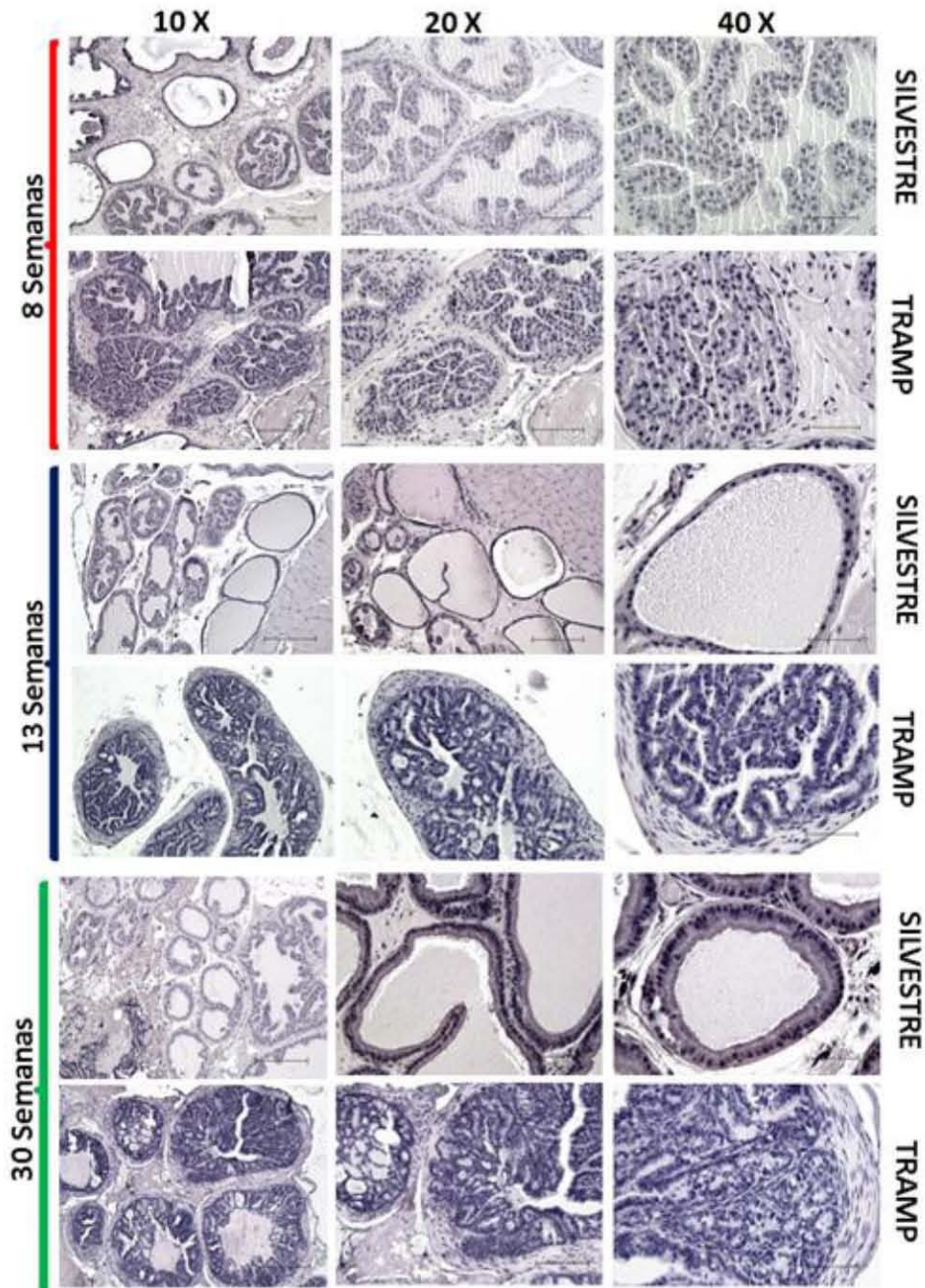
En relación al peso prostático (Figura 6B), no hubo diferencias significativas entre el grupo silvestre y TRAMP, de 8 y 13 semanas. El peso del grupo silvestre aumentó significativamente hasta la semana 30, mientras que en el TRAMP fue a partir de la semana 20. Al final del estudio (semana 30), el peso del grupo TRAMP, fue significativamente mayor que el del silvestre. Con el propósito de analizar si el cambio en el tamaño de la glándula estaba asociado al peso corporal, se normalizó el peso de la próstata en función de esta variable (índice: p. próstata/corporal) (Figura 6C). El cociente del peso prostático de los animales silvestre no se modificó a lo largo del estudio, mientras que el cociente del peso de los TRAMP fue significativamente mayor a las 20 y 30 semanas de edad.



**Figura 6.** Peso corporal y prostático en ratones de 8, 13, 20 y 30 semanas de edad, del grupo silvestre y TRAMP. A) peso corporal. B) peso prostático. C) peso prostático/ peso corporal. Los datos se analizaron con un análisis de varianza de dos vías (grupo vs edad). Las diferencias entre grupos, se determinaron con la prueba de Tuckey de comparación múltiple. Letras diferentes representan diferencias significativas,  $p < 0.05$ .

## **Histopatología**

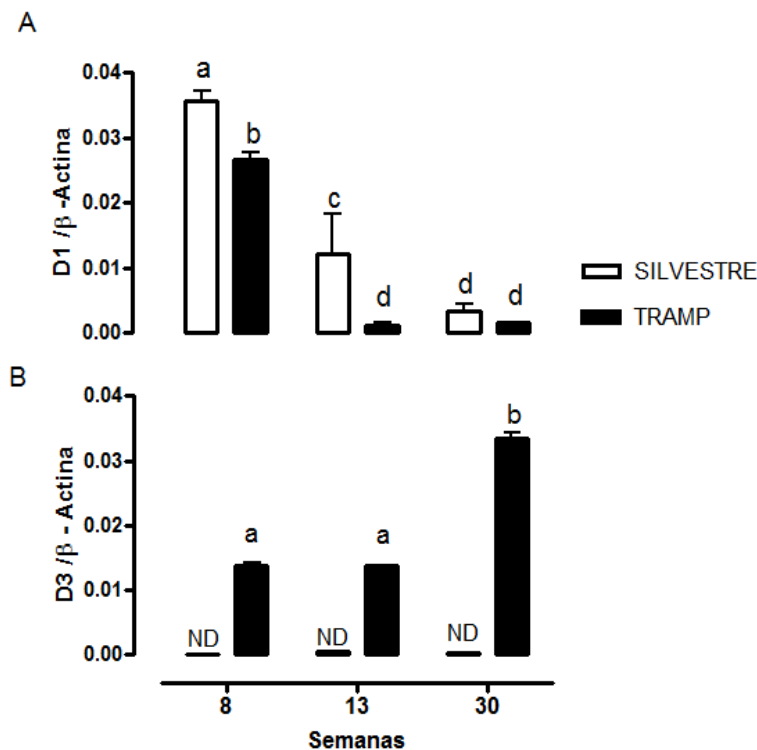
En la figura 7 se muestran microfotografías del tejido prostático de ratones de 8, 13 y 30 semanas de edad, del grupo silvestre y TRAMP. El grupo silvestre presentó un fenotipo normal a todas las edades; mientras que en el grupo TRAMP, de 8 semanas de edad, el 25 % de los animales presentaron lesiones PIN (hiperplasia). A las 13 semanas de edad, el 25 % de los animales presentaron PIN y el 75 % cáncer bien diferenciado. A las 30 semanas el 100 % de los animales presentaron cáncer bien diferenciado.



**Figura 7.** Fotomicrografías de cortes histológicos en parafina teñidos con hematoxilina-eosina, de ratones silvestres y TRAMP. Se observa un mayor número de invaginaciones intraluminales y núcleos hipercromáticos en los ratones TRAMP de 8 semanas (fenotipo PIN). Además de lo anterior, en los ratones TRAMP de 30 semanas se observa desmoplasia (fenotipo canceroso). Magnificación 100X (200  $\mu$ m), 200X (100  $\mu$ m) y 400X (50  $\mu$ m).

### Expresión de D1 y D3 en la Próstata Normal y Tumoral

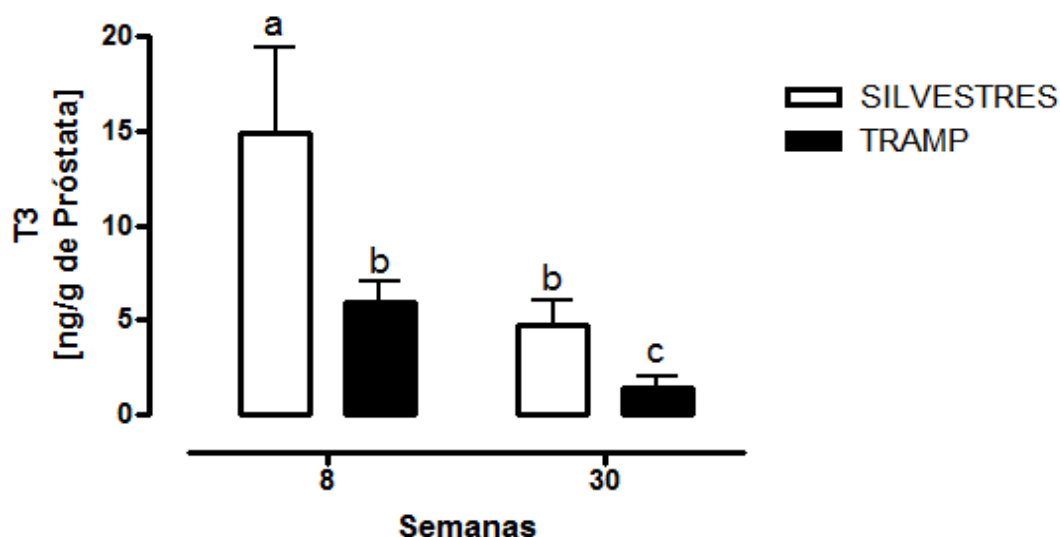
Los resultados de la figura 8 muestran la expresión de las enzimas D1 y D3, en ratones silvestres y TRAMP de 8, 13 y 30 semanas de edad. La D1 se expresó abundantemente en los ratones silvestres y TRAMP de 8 semanas de edad, pero en ambos grupos, disminuyó significativamente a las 13 y 30 semanas. Cabe destacar que las próstatas de los ratones TRAMP de 8 y 13 semanas de edad, presentaron una expresión 30 % menor en D1, en comparación con la expresión del grupo silvestre (Figura 8A). Se encontró que la próstata del grupo silvestre no expresó D3 en ninguna de las edades. En contraste, la próstata del grupo TRAMP expresó D3 en todas las edades, siendo significativamente más elevada en el grupo de 30 semanas (Figura 8B).



**Figura 8.** Expresión prostática de D1 y D3 (mRNA) en ratones silvestres y TRAMP de 8, 13, y 30 semanas de edad. Los datos se analizaron con un análisis de varianza de dos vías (grupo vs edad). Las diferencias entre grupos, se determinaron con la prueba de Tuckey de comparación múltiple. Letras diferentes representan diferencias significativas,  $p < 0.05$ .

### Niveles prostáticos de T3

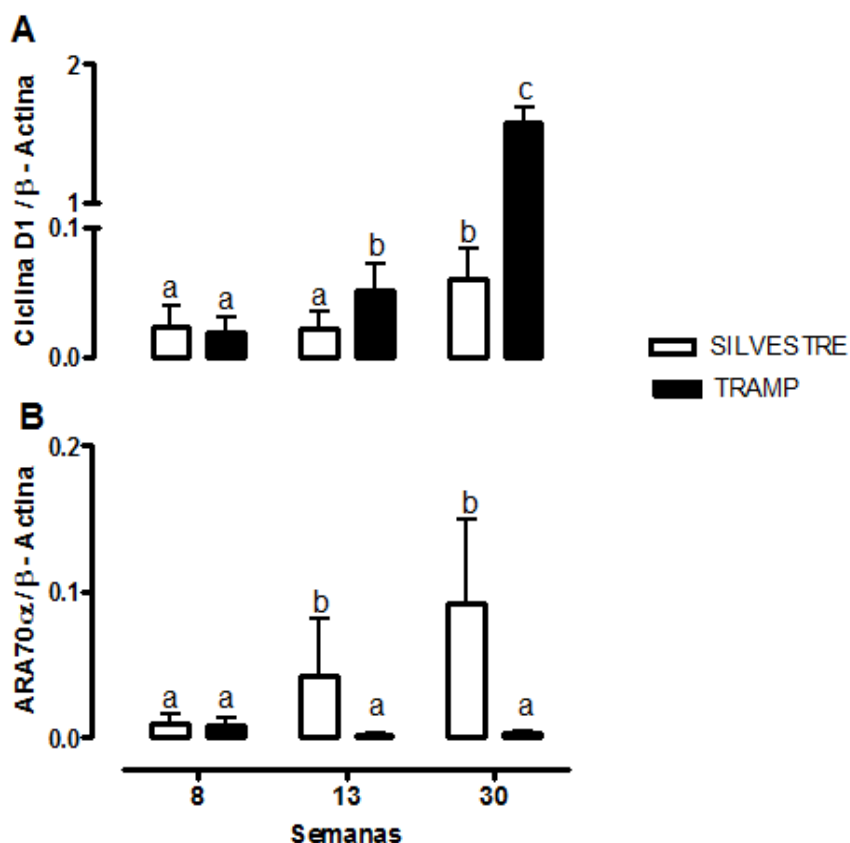
En la figura 9 se muestran los niveles prostáticos de T3 en ratones silvestres y TRAMP de 8 y 30 semanas de edad. Los ratones TRAMP de 8 semanas de edad, presentaron una reducción del 50 % en los niveles de T3, en comparación con el grupo silvestre. En ambos grupos, los niveles de T3 disminuyeron significativamente a las 30 semanas de edad, siendo significativamente más bajos en el grupo TRAMP.



**Figura 9.** Concentraciones de T3 en la próstata de ratones silvestres y TRAMP de 8 y 30 semanas de edad. Los datos se analizaron con un análisis de varianza de dos vías (grupo vs edad). Las diferencias entre grupos, se determinaron con la prueba de Tuckey de comparación múltiple. Letras diferentes representan diferencias significativas,  $p < 0.05$ .

### Expresión de Ciclina D1 y ARA 70 $\alpha$

Los resultados de la figura 10 muestran la expresión prostática de ciclina D1 (Figura 10A) y ARA 70 (Figura 10B), en los ratones silvestres y TRAMP de 8, 13 y 30 semanas de edad. La expresión de ciclina D1 en el grupo silvestre fue mayor a las 30 semanas de edad, mientras que en grupo TRAMP el incremento significativo se presentó desde la semana 13 (PIN) y a las 30 semanas (cáncer) siendo mayor (40%). Por otra parte, en los ratones silvestres la expresión de ARA 70 $\alpha$ , presentó un incremento significativo a las 13 semanas, mientras que en el grupo TRAMP no se observó dicho incremento con relación a la edad.



**Figura 10.** Expresión de ciclina D1 y ARA 70 $\alpha$ , en ratones silvestre y TRAMP de 8, 13, y 30 semanas de edad. Los datos se analizaron con un análisis de varianza de dos vías (grupo vs edad). Las diferencias entre grupos, se determinaron con la prueba de Tuckey de comparación múltiple. Letras diferentes representan diferencias significativas,  $p < 0.05$ .



## DISCUSIÓN

En este trabajo se muestra por primera vez la expresión diferencial de las desyodasas 1 y 3, en la próstata normal y tumoral de los ratones silvestre y TRAMP. En ambos grupos de animales se observó un aumento significativo del peso corporal en función de la edad, lo cual está directamente relacionado con su tasa de crecimiento. Es probable que el menor peso corporal observado en el grupo TRAMP de 30 semanas de edad, esté asociado al estado catabólico propio del cáncer (Milke P y Rivera R., 2010). El aumento del peso prostático observado en los ratones TRAMP, es congruente con el hecho de que los ratones de 13 y 30 semanas presentaron un fenotipo tumoral (PIN y canceroso respectivamente). Aunque en los ratones de 8 semanas de edad no se observaron diferencias en el peso prostático, el análisis histológico mostró que desde esta edad, los ratones TRAMP ya presentaban un fenotipo PIN. Esto contrasta con estudios previos de la literatura, en los que se muestra que las lesiones tipo PIN aparecen a partir de la semana 10 (Gingrich et al., 1999). Sin embargo nuestro hallazgo no es sorprendente, dado que la secreción de andrógenos ocurre entre la semana 4 y 5 de edad (pre-pubertad), momento en el cual se inicia la expresión del transgene (Greenberg et al., 1994b; Asamoto et al., 2001).

La elevada expresión de la D1 observada en los ratones silvestres y TRAMP de 8 semanas, así como la disminución gradual en su expresión asociada a la edad, corrobora hallazgos previos en los que se muestra una elevada actividad D1 en la próstata de ratas púberes (Anguiano et al., 2006, López-Juárez et al., 2009). Se sabe que la actividad D1 prostática, está regulada positivamente por T3, prolactina, estrógenos y negativamente por andrógenos (Anguiano et al., 2006). Más aún, se ha reportado que la actividad sexual continua a largo-plazo previene la disminución en D1 asociada a la edad (Delgado-González et al., 2011), demostrando fuertemente que la regulación de la D1 prostática se encuentra bajo un complejo control neuroendócrino. Esta es la primera vez que se analiza *in vivo* la expresión de D1 en la próstata tumoral, y llama la atención la menor expresión observada en los ratones TRAMP, en comparación con su contraparte normal de 8

y 13 semanas. Esto correlaciona con datos previos de nuestro laboratorio que muestran una baja expresión de D1, en células tumorales de próstata, (datos no publicados), Nuestros resultados no permiten discernir el porqué de esta disminución, pero estudios en cáncer tiroideo, mamario y renal han mostrado una menor expresión de D1 en comparación con el tejido normal (Arnaldi et al., 2005; García-Solis et al., 2003; Pachucki et al., 2001).

Por otra parte, la expresión de D3 se presentó únicamente en la próstata tumoral de los ratones TRAMP, y alcanzó los valores más altos de expresión a las 30 semanas de edad. Estos hallazgos concuerdan con datos de la literatura en los que se ha mostrado que tejidos que normalmente no presentan D3, se induce su expresión en condiciones patológicas de inflamación (Boelen et al., 2008), y proliferación (crecimiento tumoral benigno y maligno) (Hernández, et al., 2007; Kester et al., 2011 & Gereben et al., 2008). Se ha reportado que la expresión de D3 está positiva y directamente regulada por la vía Sonic hedgehog (Shh/Gli2), el factor inductor de hipoxia (HIF-1) y factores de crecimiento (TGF- $\beta$ ) (Dentice et al., 2006 & 2011).

Hasta donde sabemos este es el primer estudio en donde se analizan las concentraciones intratumorales de T3. En ambos grupos de ratones los niveles prostáticos de esta hormona disminuyeron significativamente con la edad, presentando los ratones TRAMP niveles más bajos, en comparación con los ratones silvestres. Estos hallazgos nos permiten proponer que en la próstata normal, los niveles locales de T3 dependen primordialmente de la expresión D1, mientras que en la próstata tumoral, los bajos niveles de T3, parecen depender de una baja expresión en D1 y de una alta expresión en D3. Estos datos no descartan la posibilidad de que parte de la T3 también provenga del torrente sanguíneo (Schroder-van der Elst y Van-der Heide 1990). Se desconoce la posible relevancia fisiológica de la generación de T3 en la próstata, pero estudios de nuestro grupo han sugerido su participación en la diferenciación (pubertad) y funcionalidad

(actividad secretora) de la glándula normal. En efecto, estudios previos han mostrado que en los animales adultos sexualmente activos se mantiene elevada la actividad D1 (Delgado-González et al., 2011), por lo que resultaría de interés analizar si la actividad sexual regula la generación de tironinas en la próstata tumoral. Interesantemente, datos epidemiológicos sugieren que la actividad sexual frecuente podría representar un factor de protección en el desarrollar cáncer de próstata (Dennis et al., 2005). Además de lo anterior, nuestros hallazgos nos permiten proponer que la generación local de T3, podría ser un evento fundamental para mantener la diferenciación del epitelio prostático en la etapa adulta. Esto es congruente con el hecho de que líneas celulares de cáncer prostático desdiferenciado no expresan la enzima D1 (datos no publicados). En este estudio se exploró la expresión de ARA 70 $\alpha$  (coactivador del receptor de andrógenos), como un gen dependiente de T3, como un marcador de diferenciación celular y como un gen supresor de tumores (Ya-Hui et al., 2007). En la próstata normal y tumoral de los animales púberes (8 semanas), la expresión de ARA 70 $\alpha$  correlaciona con la presencia de T3. En los animales adultos (13 y 30 semanas), ARA 70 $\alpha$  alcanza sus niveles más altos de expresión en el tejido normal, pero en la próstata tumoral no incrementa. El aumento en la expresión de ARA 70 $\alpha$  en la próstata normal puede deberse a que este coactivador, además de ser regulado por T3, su transcripción también es promovida por las hormonas sexuales (Culig et al., 2001) y a partir de las 12 semanas de edad, los ratones son sexualmente maduros. Nuestros datos no permiten explicar la baja expresión de ARA 70 $\alpha$  observada en la próstata tumoral de los ratones adultos, pero se sabe que las células cancerosas presentan niveles más bajos de expresión, en comparación con células no cancerosas (Li et al., 2002). Esto concuerda con el hecho de que la función de ARA 70 $\alpha$  está asociada a efectos antiproliferativos (Ligr et al., 2010). Contrariamente, se ha reportado que líneas celulares de cáncer prostático expresan la isoforma beta (ARA 70 $\beta$ ), la cual está relacionada con acciones pro-tumorales (Niu et al., 2010). En nuestro modelo no se analizó la expresión de ARA 70 $\beta$ ; pero se ha propuesto que un cambio en el balance de

expresión de estas dos isoformas podría inhibir o facilitar la progresión tumoral. Hasta el momento estos datos sugieren que la integridad epitelial podría estar asociada a la generación local de T3, a través de regular en coordinación con los andrógenos, la expresión de genes antitumorales como ARA-70 $\alpha$ . Es probable que en la próstata cancerosa, la menor disponibilidad de T3 (aumento D3) se acompañe de un aumento del crecimiento tumoral, lo cual se ve reflejado en un aumento en la expresión de ciclina D1. Esto nos permite sugerir que el aumento de ciclina D1 en la próstata tumoral es producto de un control dual: 1) de una disminución en los factores inhibidores, como T3 y 2) de un aumento de los factores estimuladores. Esto es congruente con estudios que muestran que la administración de T3 inhibe la transcripción de ciclina D1 (Natsume et al., 2003), y que existen factores que inducen su expresión (factores de crecimiento) (Maofu et al 2004).

En síntesis, estos datos sugieren que el balance D1/D3 es fundamental para mantener las concentraciones intracelulares de T3 en el tejido prostático y una alteración inversa en sus niveles, parece estar involucrada en el proceso tumorigénico.

## **CONCLUSIONES**

1. Los niveles prostáticos de T3 correlacionaron positivamente con la expresión de D1 y de manera inversa con la expresión de D3.
2. La generación local de T3 podría contribuir a mantener la integridad epitelial.
3. Los bajos niveles de T3 en la próstata del ratón TRAMP, parecen estar asociados al desarrollo tumoral.

## **PERSPECTIVAS**

Una propuesta de este trabajo es que un aporte suficiente de T3 (local y/o sistémico), disminuirá la progresión del cáncer prostático. El aporte local de T3 podría promoverse a través de la actividad sexual continua y el aporte sistémico a través de una dosis moderada de T3. En estos modelos se analizarían algunas vías de señalización asociadas a diferenciación celular, proliferación invasión y metástasis, con el propósito de empezar a identificar los posibles mecanismos moleculares involucrados en los efecto de T3.

## REFERENCIAS

- Alen P., Claessens F., Schorenmarkers E., Swinnen J., Verhoeven G., Rombauts W., Peeters B., 1999. "Interaction of the putative androgen receptor-specific coactivator ARA70/ELE1 alpha with multiples steroid receptors and identification of internally deleted ELE1 betha isoform" *Molecular Endocrinology* 1: 117-128
- American Cancer Society, 2012. "Cancer Facts and Figures" *Atlanta: American Cancer Society*
- Anguiano B., López-Juárez A., Delgado G., Romero C., Aceves C., 2006. "Deiodinase type 1 activity is expressed in the prostate rats and is modulated by thyroid hormones, prolactin and sex hormones" *The Journal of Endocrinology* 190: 363-371
- Arnaldi L., Borra R., Maciel R., Cerutti J., 2005. "Gene expression profiles reveal that DCN, DIO1, and DIO2 are underexpressed in benign and malignant thyroid tumors" *Thyroid* 15: 210-221
- Aroto-Ohshima T y Sawa H., 1999. "Over-expression of cyclin D1 induces glioma invasión by increasing matrix metalloproteinase activity and cell motility" *International Journal of Cancer* 83: 387-392
- Asamoto M., Hokaiwado N., Cho Y., Takahashi S., Ikeda Y., Shirai T., 2001. "Prostate carcinomas developing in transgenic rats with SV40 T Antigen expression under probasine promotor control are strictly androgen dependent" *Cancer Research* 61: 4693-4700
- Auharek S y de Franca L., 2010. "Post-natal testis development, sertolli cell proliferation and number of different spermatogonialtyper in C57Bl6J mice made transiently hipo and hyper-thyroidic during the neonatal period" *Journal of Anatomy* 216: 577-578

- Balk S., Ko Y., Bubley J., 2003 "Biology of prostate-specific antigen" *Journal of Clinical Oncology* 2: 383-391
- Barrera-Hernández et al., 1999 "Thyroid hormone-induced cell proliferation in GC cells is mediated by changes in G1 cyclin/cyclin-dependent kinase levels and activity" *Endocrinology* 11: 5267-74
- Bianco A y Kim B., 2006. "Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action" *Journal of Biological Chemistry* 116: 120
- Bianco A., Salvatore D., Gereben B., Berry M., Larsen P., 2002. "Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological roles of the Iodothyronine selenodeiodinases" *Endocrine Reviews* 23: 38-89
- Boelen A., Borrsma J., Kwalkkel J., Weiland C., Renkens R., Visser T., Fliers E., Wiersinga W., 2008 "Type 3 deiodinase is highly expressed in infiltrating neutrophilic granulocytes in response to acute bacterial infection" *Thyroid* 18: 1095-103
- Burden H., Holmes C., Persad R., Whittington K., 2005. "Their effects of human role reproduction and fertility" *Human Reproduction* 12: 283-292
- Cheng S., Leonard J., Davis P., 2010. "Molecular aspects of thyroid hormone actions" *Endocrinology Review* 31: 139-170
- Comstock C., Revelo M., Buncher C., Knudsen K., 2007. "Impact of differential cyclin D1 expression and localization in prostate cancer" *Breast Journal Cancer* 96: 970-979
- Cooke P y Meisami E., 1991. "Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels" *Endocrinology* 129: 237-243
- Cooke P., Zhao Y., Bunick D., 1994. "Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultures neonatal sertolli cells: Possible

mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment" *Biology of Reproduction* 51: 1000-1005

Cuhna G., Donjacour A., Cooke P., Mee S., Bigsby R., Higgins S., Sugimura Y., 1987. "The endocrinology and developmental biology of the prostate" *Endocrinology Review* 8: 338-362

Culig Z., Klocker H., Bartsch G., Hobisch A., 2001. "Androgen receptor mutations in carcinoma of the prostate: significance for endocrine therapy" *American Journal of Pharmacogenomics* 1: 241-249

Davis P., Leonard J., Davis F., 2007. "Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone" *Elsevier* 29: 211-218

Delgado-González E., Aceves C., Anguiano B., 2011. "Post-Ejaculatory Increase of prostatic triiodothyronine (T3) depends on sympathetic innervation in the rat". *Biology of Reproduction* 84: 118-123

Dennis L., Ritchie J., Resnick M., 2005. "Prostate cancer and consistency of reporting sexual histories in men over age 50" *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 8: 243-247

Dentice M., Ambrosio R., Salvatore D., 2011. "Role of type 3 deiodinase in cancer" *Expert Opinion of Therapeutic Targets* 13: 1363-1373

Dentice M., Luongo C., Huang S., Ambrosio R., Elefante A., Mirebeau-Prunier D., Zavacki A., Fenzi G., Grachtchouk M., Hutchin M., Dlugosz A., Bianco A., Missero C., Larsen R., Salvatore D., 2006. "Sonic-hedgehog-induced type 3 deiodinase blocks thyroid hormone action enhancing proliferation of normal and malignant keratinocytes" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 14466-14471

Dentice M., y Salvatore D., 2005. "Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local impact of thyroid hormone inactivation" *The Journal of Endocrinology* 209: 273-282



- Dittrich R., Beckmann M., Oppelt P., Hoffmann I., Lotz L., Kuwert T., Mueller A., 2011. "Thyroid hormone receptors and reproduction" *Journal of Reproductive Immunology* 90: 58-66
- Donald S., Galton A., Hernández A., 2009. "Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges" *Endocrinology* 150: 1097-1107
- Esquenet M., Swinnen J., Heyns W., Verhoeven G., 1995. "Triiodothyronine modulates growth, secretory function and androgen receptor concentration in the prostatic carcinoma cell line LNCaP" *Molecular Cellular Endocrinology* 1: 105-111
- Ferris-i-Tortajada., García-i-Castell., Berbel-Tornero., Ortega-García., 2011. "Constitutional risk factors for prostate cancer" *Actas Urológicas Españolas* 5: 282-288
- Fleishman A., Rocha C., Saxer-Sekulic N., Zlobec I., Sauter G., 2011. "High-level cytoplasmic cyclin D1 expression in lymph node metastases from prostate cancer independently predicts early biochemical failure and death in surgically treated patients" *Histology* 58: 781-789
- Maofu F., Wan C., Li Z., Sakamaki T., Pestell R., 2004. "Mini review: Cyclin D1: Normal and abnormal functions" *Endocrinology* 145: 5439-5447
- Furomoto H., Ying H., Chandramouli G., Zhao L., Walker R., Meltzer P., Willigam M., Cheng M., 2008 "An unliganded thyroid hormone receptor activities the cyclinD1/cyclin dependent kinases/Retinoblastoma/E2F pathway and induces pituitary tumorigenesis" *Molecular and Cellular Biology* 25: 124-135
- García-Silva S y Aranda A., 2004. "The Thyroid hormone receptor is a suppressor of ras-mediated transcription, proliferation, and transformation" *Molecular Cellular Biology* 24: 7514-7523

García-Silva S., Pérez-Juste G., Aranda A., 2002. "Cell cycle control by the thyroid hormone in neuroblastoma cells" *Toxicology* 182: 179-182

García-Solis P y Aceves C., 2003. "5'Deiodinase in two breast cancer cell lines: effect of triiodothyronine, isoproterenol and retinoids" *Molecular Cellular Endocrinology* 201: 25-31

Gereben B., Zeöld A., Dentice M., Salvatore D., Bienco A., 2008. "Activation and inactivation of thyroid hormones by deiodinases: local action with general consequences". *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 570-590

Gingrich J., Barrios R., Foster B., Greenberg M., 1999. "Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model" *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2: 70-75

González-Sancho JM et al., 2002 "Inhibition of proliferation and expression of T1 and cyclin D1 genes by thyroid hormone in mammary epithelial cells". *Molecular Carcinogenesis* 1: 25-34

Green S., Mostaghel E., Nelson P., 2012. "Androgen action and metabolism in prostate cancer" *Molecular Cell Endocrinology* Disponible electrónicamente desde 20 de marzo de 2012 DOI:10.1016/j.mice.2011.09.046

Greenberg M., De Mayo F., Sheppard P., Barrios R., Lebovitz R., Finegold M., Angelopoulou. R., Dodd J., Duckworth M., Rosen J., 1994. "The rat probasina gene promoter directs hormonally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice" *Molecular Endocrinology* 8: 230-239

Greenberg N., Evangelou A., Winter S., Huss W., Bok R., 2004b. "Steroid hormones, polypeptide growth factors, hormone refractory prostate cancer, and the neuroendocrine phenotype" *Journal Cell Biochemistry* 91: 671-683

Greenspan., 2007. "The thyroid" en: *Basic and Clinical Endocrinology* Appleton & Lange 8°. Capítulo: 8 pp 209-281

- Gronberg H., Isacacs S., Smith J., Carpten J., 1997 "Characteristics of prostate cancer in families potentially linked to the hereditary prostate cancer 1 (HPC1) locus". *The Journal of the American Medical Association* 278: 1251-55
- Hellevik A., Asvold B., Bjoro T., Romundstad P., Nilsen T., Vatten L., 2009. "Thyroid function and cancer risk: A prospective population study" *Cancer Epidemiol Biomarkers* 18: 570-574
- Hernandez A., García B., Obregón M., 2007. "Gene expression from the imprinted Dio3 locus is associated with cell proliferation of cultured brown adipocytes" *Endocrinology* 148: 3968-3976
- Holsberger D y Cooke P., 2005. "Understanding the role of thyroid hormone in sertolli cell development: a mechanistic hypothesis" *Cell Tissue Research* 322: 133-140
- Hsieh M y Juang H., 2005. "Cell growth effects of triiodothyronine and expression of thyroid hormone receptor in prostate carcinoma cells" *Journal of Andrology* 3: 422-428
- Huang Y., Tsai M., Lin K., 2008 "Thyroid hormone dependent regulation of target genes and their physiological significance" *Chang Gung Medical Journal* 4: 325-334
- Huei-min L., Zhao L., Cheng S., 2002. "CyclinD1 is a ligand independent co-represorfot thyroid hormone receptors" *The Journal of Biological Chemistry* 277: 28733-28741
- Kaplan-Lefko P., Chen T., Ittmann M., Barrios R., Ayala G., Huss W., Maddison L., Foster B., Greenberg N., 2003. "Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical Transgenis Mouse Model" *The Prostate* 55: 219-237
- Kester M., Toussaint M., Punt C., Matondo R., Aarnio A., Darras V., Everts M., deBruin A., Visser T., 2011. "Large induction of type III deiodinase

- expression after partial hepatectomy in the regenerating mouse and rat liver” *Endocrinology* 150: 540-545
- Khosravi P y Pérez G., 2006. “Metastatic Prostate Cancer” *Oncology Review* 10: 398-404
- Kinne A., Schülien R., Krause G., 2011. “Primary and secondary thyroid hormone transporters” *Thyroid Research* 4: S1 641-650
- Köhrle J., Müller M., Ködding R., Seitz H., Hesch R., 1982. “pH-dependency of iodothyronine metabolism in isolated perfused rat liver” *Biochemistry* 202: 667-75
- Kollara A y Brown T., 2012. “Expression and function of nuclear receptor co-activator 4: evidence of a potential role independent of co-activator activity” *Cellular and Molecular Life Sciences* Disponible electrónicamente desde 5 de mayo de 2012 mayo Doi: 10.1007/s00018-012-1000-y
- Krassas G., Poppe K., Glinoeer D., 2010. “Thyroid function and human reproductive health” *Endocrine Review* 31: 702-755
- Kress E., Samarut J., Plateroti M., 2009. “Thyroid hormones and the control of cell proliferation or cell differentiation: paradox or duality” *Molecular and cellular Endocrinology* 313: 36-49
- Lagu S., Bhavsar N., Sharma R., Ramachandran A., 2005. “Neonatal hypothyroidism-induced changes in rat size; dependence on temperature” *Neuroendocrinology* 26: 780-788
- Laine H., Sulg M., Kirjavainen A., Pirvola U., 2010. “Cell cycle regulation in the inner ear sensory epithelia: Role of Cyclin D1 and cyclin-dependent kinase inhibitors” *Development Biology* 337: 134-146
- Lara P., Deníz F., Ruíz A., Pinar B., Sáez-Bravo M., 2004 “Cancer de Próstata” *Biocancer* 24: 136-178

- Lee C., Akin.Olugbade O., Kirschenbaum A., 2011. "Overview of prostate anatomy, histology and pathology" *Endocrinology Metabolism Clinical of North America* 40: 565-575
- Leitzmann M., Platz E., Stampfer M., Willett W., Giovannucci E., 2004. "Ejaculation frequency and subsequent risk of prostate cancer." *The Journal of the American Medical Association* 291: 1578-86
- Leonard., 2000. "Intracellular pathways of iodothyronine metabolism" en: *The Thyroid Werner & Ingbar's 8°*. Capítulo: 3 pp 36-163
- Li P., Yu X., Ge K., Melamed J., Roeder R., Wang Z.,2002. "Heterogeneous expression and functions of androgen receptor co-factors in primary prostate cancer" *American Society for Investigative Pathology* 161: 1467-1474
- Ligr M., Li Y., Daniels G., Melamed J., Peng Y., Wang W., Wang J., Ostrer H., Pagano M., Wang Z., Garabedian M., Lee P., 2010. "Tumor suppressor fuction of androgen receptor coactivator ARA70 $\alpha$  in prostate cancer" *Tumorogenesis and Neoplastic Progression The American Journal of Pathology* 176: 1981-1900
- Longcope., 2000. "The male and female reproductive system in hypo and hyperthyroidism" en: *The Thyroid Werner & Ingbar's 8°*. Capítulo pp 824-846
- López-Juárez A., Delgado G., Aceves C., Anguiano B., 2009. "Type 1 deiodinase activity and generation of triiodothyronine (T3) in prostate of sexually active rats. *Prostate* 69: 1651-1659
- Maia A., Goemanni., Meyer E., Wajner S., 2011. "Deiodinases: the balance of thyroid hormone: type 1 iodothyronine deiodinases in human physiology and disease" *The Journal of Endocrinology* 209: 283-297

- Maofu Fu, et al., 2004 “Minireview: Cyclin D1: Normal and abnormal functions” *Endocrinology* 12: 5439–5447
- Maran R y Arhuldas M., 2002 “Adverse effects of neonatal hypothyroidism on wistar rat spermatogenesis” *Endocrinology Research* 3: 141-154
- Maran R., Arhuldas M., Udhayacumar R., Subramanian S., Rajendiran G., Anthony F., Arunakaran J., Govindarajulu P., 1998. “Impact of altered thyroid hormone status on prostatic glycosidases” *International Journal of Andrology* 21: 121-128
- Marker P., Dojancour A., Dahiya R., Cuhna G., 2003. “Hormonal cellular and molecular control of prostatic development” *Development Biology* 253: 165-174
- Martínez-Iglesias O., García-Silva S., Regadera J., Aranda A., 2009. “Hypothyroidism enhances tumor invasiveness and metastasis development” *Plos One* 4: 10.1371
- Milke P y Rivera R., 2010. “Síndrome de Anorexia-Caquexia” *Revista de Gastroenterología de México Elsevier* 2: 205-207
- Millares, 2008. “Regulación hormonal y balance nutricional” *Endocrinología y nutrición*. Universidad Salamanca McGraw Hill 1º edición Capítulo 5 pp125-247
- Narod S. 1999. “Genetic epidemiology of prostate cancer”. *Biochemistry and Biophysics Acta* 29; 1423-1424
- Natsume H., Sasaki S., Katawa M., Kashiwabara Y., Matsushita A., Nakano K., Nishiyama K., Nagayama K., Misawa H., Masuda H., Nakamura H., 2003. “b-Catenin/Tcf-1-mediated transactivation of cyclin D1 promoter in negatively regulated by thyroid hormone” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309: 408-413

- Niu Y., Chang T., Yeh S., Ma W., Wang Y., Chang C., 2010. "Differential androgen receptor signals in different cells explain why androgen-deprivation therapy on prostate cancer fails" *Oncogen review* 29: 3593-3604
- NOM-062-ZOO-1999. "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio". *Norma Oficial Mexicana*.
- Oatley M., Racicot K., Oatley J., 2011. "Sertolli cell dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis" *Biology of Reproduction* 84: 45
- Pachucki J., AmbroziaK M., Tnaski Z., Luczak J., Nauman A., 2001. "Type I 5'iodothyronine deiodinases activity and mRNA are remarkably reduced in renal clear cell carcinoma" *Journal of Endocrinological Investigation* 24: 253-61
- Padalecki S., Troyer D., Hansen M., Saric T., Schneider B., O'Connell P., Leach R., 2000. "Identification of two distinct regions of allelic imbalance on chromosome 18q in metastatic prostate cancer". *International Journal of Cancer* 5: 654-658
- Pascual A y Aranda A., 2012. "Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation" *Biochemistry and Biophysica Acta* Disponible en linea desde 29 de marzo de 2012. Doi:10.1016/j.bbagen.2012.03.012
- Peng Y., Li C., Chen F., Wang Z., Ligr M., Melamed J., Wei J., Gerald W., Pagano M., Garabedian M., Lee P., 2008. "Stimulation of prostate cancer cellular proliferation and invasion by the androgen receptor co-activator ARA70". *American Journal Pathology* 1: 225-235
- Perez-Juste G et al., 1999. "Differentiation of neuroblastoma cells by phorbol esters and insulin-like growth factor 1 is associated with induction of retinoic acid receptor beta gene expression". *Oncogene* 18: 5393-402
- Piekielko-Witkowska A., y Naumann A., 2011. "Iodothyronine deiodinases and cancer" *Journal of Endocrinological Investigation* 34: 716-728

Porlan E., Vega S., Iglesias T., Rodríguez-Peña A., 2004. "Unliganded thyroid hormone receptor beta1 inhibits proliferation of murine fibroblast by delaying the onset of the G1 cell-cycle signals" *Oncogene* 23: 8756-8765

Puzianowska-Kuznicka M, et al., 2006 "Thyroid hormones and their receptors in the regulation of cell proliferation" *Acta Bioquímica Polónica* 4: 641-50

Puzianowska-Kuznicka M., Pietrzak M., Turowska O., Nauman A., 2011. "Thyroid hormones and their receptors in the regulation of the cell proliferation" *Acta Biochimica Polaca* 53: 641-650

Sakurai A., Nakai A., DeGroot L., 1989. "Expression of three forms of thyroid hormone receptors in human tissues" *Molecular Endocrinology* 2: 392-399

Salvatore D 1995. "Type 3 Iodothyronine deiodinase: cloning in vitro expression and functional analysis of the placental selenoenzyme" *The journal of Clinical Investigation* 96: 2421-2430

Schorender-van del Elst y Van-der Heide 1990. "Thyroxine, 3,5,3triiodothyronine, 3,3,5 triiodothyronine concentration in several tissues of the rat: effects of the amiodarone and desethylamiodarone and thyroid hormone metabolism" *Endocrinology* 127: 1656-1664

Sheng-Qiang Y., Lai X., Xia S., Chang H., Chang C., Yeh S., 2009. "The diverse and contrasting effects of using human prostate cancer cell lines to study androgen receptor roles in prostate cancer" *Asian Journal of Andrology* 11. 39-48

Shi Y., Fu L., Hsia S., Tomita A., Buchholz D., 2001. "Thyroid hormone regulation of apoptotic tissue remodeling during anuran metamorphosis" *Cell Research* 11: 245-252



- Sidharthan V., Rose P., Rajalingam R., Udhayakumar R., Arhuldas M., Govindarajulu P., 1993. "Dorsolateral prostatic phosphomonoesterases and adenosine triphosphatases in hypo- hyperthyroid rats" *Indian Journal for Experimental Biology* 32: 616-618
- Smith M., Chen I., Zhan Q., O'Connor P., Fornace A., 1995. "Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage" *Oncogene* 6: 1053-1059
- Sreekantaiah C., Ladanyi M., Rodríguez E., Chaganti R., 1994. "Chromosomal aberrations in soft tissue tumors. Relevance to diagnosis, classification, and molecular mechanisms" *American Journal of Pathology* 6:1121-34
- Stockigt., 2012. "Thyroid hormone binding and variants of transport proteins" en: *The Thyroid Werner & Ingbar's 6°*. Capítulo: 93 pp 631-642
- Tai P., Huang Y., Shih C., Chen R., Chen C., Chen W., Wang C., Lin K., 2007. "Direct regulation of androgen receptor-associated protein 70 by thyroid hormone and its receptors" *Endocrinology* 148: 3485-3495
- Tresguerres y Escobar del Rey 2004. "Fisiología del sistema endócrino, la glándula Tiroides" de: *Fisiología humana*. McGraw Hill 4° Edición, Capítulo 72 pp 880-889
- Valverde C., Solís J., García C., Robles-Osorio L., 2011. "Bioactivity of thyroid hormones. Clinical significance of membrane transporters deiodinases and nuclear receptors" *Revista de Investigación Clínica* 63: 287-308
- Wagner M., Wajner S., Maia A., 2009. "Is there a role for thyroid hormones on spermatogenesis?" *Microscopic Research Technology* 72: 796-808
- Walter., 2003. "Synthesis of thyroid hormones Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach". *Elsevier* 48: 1300-1301

- Warner A y Mittag J., 2012. "Thyroid hormone and the central control of homeostasis" *Journal of Molecular Endocrinology* Disponible en línea desde 14 de mayo de 2012 Doi: 10. 1530/JME-12-0068
- Warner M., Wajjner S., Maia A., 2011. "The role of thyroid hormone in testicular development and function" *The journal of Endocrinology* 199: 351-365
- Weinberg R., 1995. "The retinoblastoma protein and cell cycle control" *Cell* 3: 323-330
- Werner, 2008. "Comparative anatomy and Physiology" en: *The Thyroid: A fundamental and clinical text*. William & Willkins 8°. Capítulo: 1 pp 20-35
- Williams G y Bassett J., 2011. "Deiodinases: the balance of thyroid hormone local control and thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase" *Journal of Endocrinology* 209: 261-272
- Witte J., 2009 "Prostate cancer genomics: towards and new understanding" *Nature Reviews Genetics* 10: 77-82
- Wu X., Chen F., Sahin A., Albarracin C., Pei Z., Zou X., Singh B., Xu R., Daniels G., Li Y., Blake M., Scheider R., Cowin P., Lee P., 2011. "Distinct functions of androgen receptor coactivator ARA70 $\alpha$  y  $\beta$  in mammary gland development, and in breast cancer" *Breast Cancer Research Treatment* 2: 391-400
- Wu X., Chen F., Sahin A., Albarracin C., Pei Z., Zou X., Singh B., Xu R., Daniels G., Li Y., Wei J., Blake M., Schneider R., Cowin P., Lee P., 2011. "Distint function of androgen receptor coactivator ARA70 $\alpha$  and ARA70 $\beta$  in mammary gland development, and in breast cancer" *Breast cancer research treatment* 128: 391-400
- Ya-Hui H., Tai P., Shih C., Chen R., Chen C., Chen W., Wang C., Lin K., 2007. "Direct regulation of androgen receptor-associated protein 70 by thyroid hormone and its receptors" *Endocrinology* 148: 3485-3495

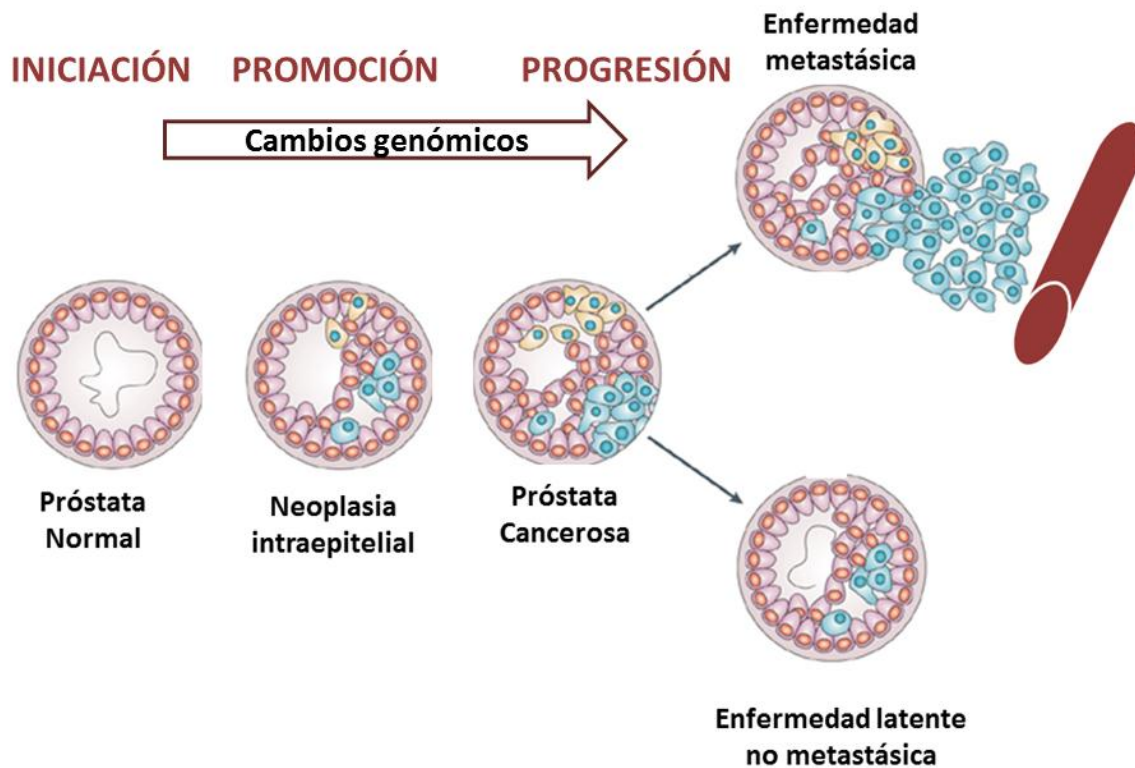
- Yi P., Li C., Chen F., Wang Z., Ligr M., Melamed J., Wei J., Gerald W., Pagano M., Garabedian M., Lee P., 2008. "Stimulation of prostate cancer cellular proliferation and invasion by the androgen receptor co-activator ARA70" *American Journal of Pathology* 1: 225-235
- Zamoner A., Pessoa-Pureur R., Silva F., 2011. "Membrana-initiated actions of thyroid hormones and the male reproductive system" *Elsevier* 89: 507-514
- Zhang S., Hsieh M., Zlu W., Klee G., Tindall D., Young C., 1999. "Interactive effects of triiodothyronine and androgens on prostate cell growth and gene expression" *Endocrinology* 140: 1665-1671
- Zhiping L., Wang C., Prendergast G., Pestell R., 2006. "Cyclin D1 functions in cell migrations" *Cell Cycle* 5: 2440-2442
- Zhu W y Young C., 2001. "Androgen dependent transcriptional regulation of the prostate-specific antigen gene by thyroid hormone 3,5,3'-L-triiodothyronine" *Journal of Andrology* 22: 136-141

## **ANEXO**

### **Aspectos generales del cáncer de próstata**

Tanto a nivel mundial como en nuestro país, el cáncer de próstata ocupa el primer lugar de neoplasias en hombres mayores de 50 años (representando el 29% de todos los cánceres y segundo lugar en mortalidad [9%], seguido de pulmón y bronquios) (Sociedad Americana de Cáncer, 2012). El cáncer de próstata presenta una heterogeneidad genética y molecular por lo que es considerado como una enfermedad de origen multifactorial (Lara et al., 2004). Los factores de riesgo mejor comprendidos son: la edad (mayores de 50 años), raza y/o grupo étnico (afroamericanos) y antecedentes familiares (mutaciones de los genes HPC1 del acrónimo de inglés: *human prostatic cancer 1* y BRCA1 del inglés: *Breast Cancer 1*, GSTP1, del inglés: *glutathion s transferasa type 1*). Además existen otros factores asociados como son: biológicos (virus, infecciones), ambientales (exposición a cancerígenos), estilo de vida (dieta, sedentarismo) y hormonales (Ferris-i-Tortajada et al., 2011).

En la próstata, el proceso de carcinogénesis aún no está claramente identificado, sin embargo, inicia con múltiples cambios genómicos que incluyen diversas mutaciones (puntuales, deleciones, inserciones, translocaciones y amplificaciones), alterando entre otros la expresión de proto-oncogenes (factor de crecimiento tumoral- $\alpha$ , ciclina D1, Ras, erb-B, myc) y/o genes supresores de tumor (retinoblastoma, p53, PTEN) (Weinberg et al., 1995; Smith et al., 1995; Gronberg et al., 1997). Cuando se pierde la función de los genes supresores, se facilita la iniciación o progresión tumoral, permitiendo la perpetuación de la nueva estirpe (clona) dañada (Sreekantiah et al., 1994; Khosravi P y Pérez G., 2006).



**Figura 11.** Desarrollo del cáncer prostático en humano. Imagen modificada de Witte et al., 2009.

Desde el punto de vista clínico, el proceso tumorigénico, cursa con la presencia de lesiones precancerosas (neoplasia intraepitelial de bajo y alto grado) y cancerosas (invasión y metástasis) (Figura 11).

### **Marcadores de cáncer prostático**

Es bien sabido que los fenómenos de la iniciación, promoción y progresión tumoral, involucran la activación e inactivación de múltiples genes que participan en la patogénesis.

En este estudio se evaluó la expresión de ciclina D1 (marcador proliferación) y ARA70 $\alpha$  (marcador diferenciación), porque ambos son genes tironino dependientes. Ciclina D1 es regulado negativamente por T3, mientras ARA70 de forma positiva (Furumoto et al., 2005; Huang et al., 2008).

### **Ciclina D1**

Es una proteína que participa en el ciclo celular, regulando las cinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (CDK4 y CDK6). El complejo ciclina/cinasa fosforila e inactiva a la proteína del retinoblastoma (Rb- proteína supresora de tumores) y de esa manera promueve la transición de la fase G1/S del ciclo celular. Estudios recientes muestran que ciclina D1 además de regular el ciclo celular, también regulan la actividad de factores de transcripción coactivadores y corepresores que rigen la acetilación de histonas y la remodelación de cromatina (Maofu et al., 2004). En cáncer prostático la expresión nuclear de ciclina D1 está aumentada en comparación con el tejido normal. Además se sabe que su elevada expresión, es esencial en la adhesión y migración celular, aumentando el potencial invasivo. (Fleishman et al., 2011; Comstock et al., 2007; Aroto-Ohshima T y Sawa H., 1999; Zhiping et al., 2006).

Las primeras observaciones sobre la influencia de T3 sobre Ciclina D1, se hicieron en líneas celulares cancerosas. La administración de T3 disminuye la expresión y actividad de esta proteína en neuroblastoma y cáncer mamario (Perez-Juste G et al., 1999; González-Sancho et al., 2002). El promotor de Ciclina D1 no tiene presente el clásico elemento de respuesta tiroideo (TRE), pero existen evidencias que la T3 podría inhibir la transcripción de ciclina D1 a través de un efecto indirecto mediado por CREB (proteína de unión al elemento de respuesta AMPc) (García-Aranda et al., 2004). En células de tricoblastoma el tratamiento con T3 arresta el ciclo celular e induce diferenciación, sugiriendo que la inhibición de la progresión del ciclo celular mediada por T3, involucra Ciclina D1. (Puzianowska-Kuznicka M, et al., 2006).

### **ARA70**

Es una proteína que forma parte del complejo coactivador que interactúa con el receptor de andrógenos, de forma dependiente de ligando, para promover su actividad transcripcional, durante el desarrollo normal y tumoral del sistema

reproductor masculino. Inicialmente se identificó como un gen fusionado con el oncogén RET y posteriormente fue caracterizado como coactivador, el cual posee dos variantes  $\alpha$  y  $\beta$ , donde la variante  $\beta$  es generada por un corte y empalme alternativo. Se ha descrito que la variante  $\alpha$  posee propiedades como un gen supresor de tumores, inhibiendo el crecimiento tumoral a través de la inducción de apoptosis y reduce la invasión de forma independiente de andrógenos, mientras que la variante  $\beta$ , funciona como un oncogen de cáncer prostático, donde promueve la proliferación celular (mayor número de células en fase S del ciclo celular, 57%), mediante el incremento en ciclina A , B1 y *skp2*, y decremento en *p27*, además refuerza la capacidad invasiva, mediante ensayos de invasión con matrigel. (Alen et al., 1999; Peng et al., 2008; Ligr et al., 2010; Wu et al., 2011; Kollara et al., 2012).

El gen de ARA70 es regulado positivamente por T3, y se han identificado dos elementos de respuesta, en una región río arriba en el sitio -234/-190 o +56/+119. Mediante ensayos de movilidad electroforética se confirmó la interacción del TR-TRE en el gen de ARA70. Por otro lado se observó que ARA70es capaz de suprimir la señalización de T3 de manera TRE-dependiente. Indicando que T3 es capaz de promover la expresión génica de ARA70 y posteriormente ella suprime la señalización a cargo de T3 (Tai P et al., 2007).

### Genotipificación de ratones TRAMP

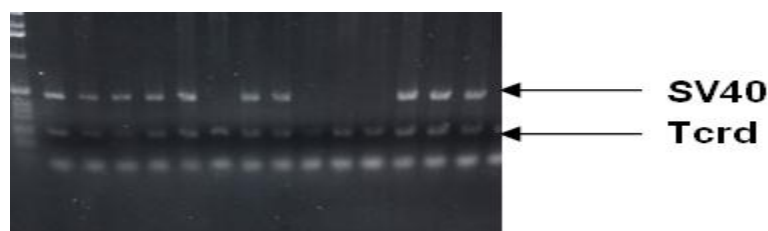
Se tomó biopsia de cola y se digirió durante toda la noche a 55°C, en 100µl de buffer de lisis y 10 µl de proteinasa K. Se inactivó a 80°C por 10 minutos. Se centrifugó a 7000 rpm durante 3 minutos.

Se preparó la reacción de la PRC mezclando 1.2 µl de buffer, 1 µl de cofactor MgCl<sup>2</sup> 0.25 µl de dNTPs, 0.3 µl de oligonucleótido SV40 (transgene), 0.15 µl de oligonucleótido Tcrd (gene constitutivo), 0.5 µl de enzima Taq polimerasa y 1 µl del sobrenadante de la digestión.

#### **CUADRO 5. CARACTERÍSTICAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LA GENOTIPIFICACIÓN.**

Producto	Secuencia	Temperatura alineación	Tamaño producto (pb)
<b>SV40</b>	s: CAGAGCAGAAATTGTGGAGTGG as: GGGACAAACCACA ACTAGAATGCAGTG	53°C	500
<b>Tcrd</b>	s: CAAAATGTTGCTTGTCTGGTG as: GTCAAGTCGAGTGCACAGTTT	58°C	200

Posterior a la PCR se corrieron las muestras en gel de agarosa al 2% a 80mV y se confirman los tamaños de las bandas presentes.



**Figura 13.** Producto de amplificación de la PCR en gel de agarosa. De izquierda a derecha se observa la escalera (1kb). Imagen representativa del DNA genómico, se observa la expresión del SV40 (transgene) y de Tcrd (gen constitutivo). Las muestras de los ratones que no presentan SV40, se consideran TRAMP negativo (silvestres).



### **Procesamiento de los tejidos y tinción para histología**

Tras obtener el tejido se fijó en formalina al 10%. Concluido el tiempo de fijación (se recomienda sea aproximadamente de 4 días) se procedió a realizar una serie de lavados en agua corriente para eliminar el exceso de formaldehído (se sabe que puede dañar tanto el corte como las tinciones). Posteriormente se deshidrató en alcohol a concentraciones ascendentes (60 – 100). Se infiltró e incluyó en parafina. Se realizaron cortes de 5µm usando micrótopo rotatorio y se tiñó con hematoxilina y eosina.

### **CUADRO 6. SOLUCIONES PARA LA TINCIÓN HISTOLÓGICA CON HEMATOXILINA-EOSINA**

<b>Soluciones:</b>	
<b>Hematoxilina de Harris</b>	<b>Solución de Eosina – Floxina</b>
Agua amoniacal	Hematoxilina 5.0g
	Etanol al 100% 50.0ml
Solución saturada de carbonato de litio	Alumbre de potasio o de amonio 100.0g
	4.- Agua destilada 1000.0ml
	5.- Oxido rojo de mercurio 2.5g

Procedimiento para tinción:

- 1.-Se desparafinaron las laminillas e hidrate antes de teñir.
- 2.-Se tiñeron en hematoxilina de Harris filtrada, de 6 a 15 minutos.
- 3.-Se lavaron en agua corriente de 2 a 5 minutos.

- 4.-Se deshidrataron en alcohol ácido al 1%, 1 o 2 repeticiones.
- 5.-Se lavaron brevemente en agua corriente.
- 6.-Se colocaron las laminillas en una solución débil de agua amoniaca o en una solución saturada de carbonato de litio hasta que las secciones se vean de un color azul brillante.
- 7.-Se lavaron en agua corriente por 10 minutos.
- 8.-Se colocaron en etanol al 80%, por 1 o 2 minutos.
- 9.-Se contrastaron en solución de eosina – floxina por 2 minutos.
- 10.-Se deshidrataron y aclararon a través de 2 cambios de etanol al 95% cada uno, luego etanol absoluto, y luego xileno, 2 minutos en cada cambio.
- 11.-Se montaron con resina.
- 12.- Los núcleos se tiñeron de azul y el citoplasma de rosa

### **Parámetros histológicos utilizados para identificar las etapas del cáncer prostático en el modelo TRAMP**

Basado en el artículo original de Kaplan – Lefko et al 2003 “Pathobiology of Autochthonous Prostate Cancer in a Pre-Clinical Transgenic Mouse Model” *The Prostate* 55:219 -237

#### **Características del epitelio prostático NORMAL**

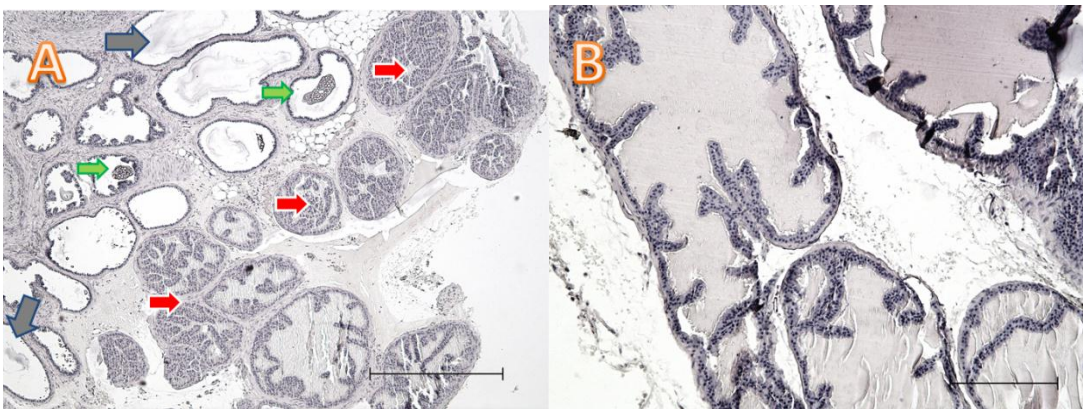
**Lóbulo Dorsal.-** Epitelio columnar bajo, con plegamientos moderados. Lumen homogéneo y eosinófilo. Los núcleos hipercromáticos (muy basófilos,).

**Lateral.-** Epitelio mayoritariamente cúbico, con muy pocos y pequeños plegamientos (proyecciones intraluminales). Lumen con secreciones amorfas, fragmentadas y eosinófilas.

**Ventral.-** Proyecciones intraluminales de epitelio columnar. La secreción es serosa (partículas homogéneas).

**Anterior.-** Proyecciones intraluminales digitiformes de epitelio columnar. Tienen citoplasma eosinófilo granular. Secreciones: homogéneas serosas y ligeramente eosinófilas.

A continuación se muestra una fotomicrografía del tejido prostático normal indicando la ubicación y apariencia de los lóbulos.



**Figura 14.** Fotomicrografía de tejido prostático normal. En A, se puede observar la apariencia histológica del tejido prostático normal, donde las flechas grises corresponden

al lóbulo ventral, las verdes al lóbulo anterior y las rojas al dorsal. En B, se observa el lóbulo anterior.

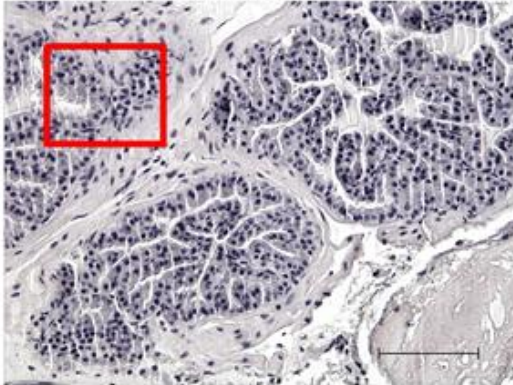
### **Características del epitelio prostático CANCEROSO**

**PIN** (Neoplasia intraepitelial).- Presenta epitelio mayoritariamente columnar con pseudoestratificación nuclear, múltiples crestas epiteliales con células en penacho (núcleos polarizados y exceso de citoplasma apical) y estructuras cribiformes (agrupación celular con espacios circulares bien delimitados).

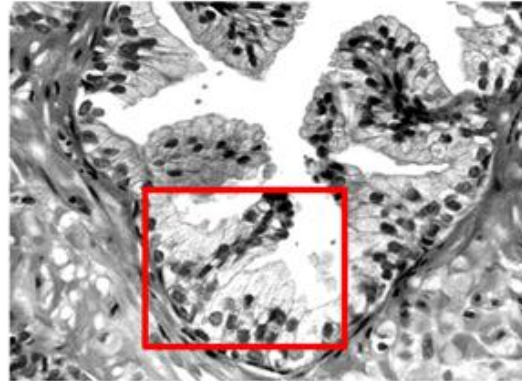
**Cáncer Bien Diferenciado.**- Además de lo anterior puede presentar un aumento en la apariencia de pseudoacinos (como pequeñas glándulas o infiltración de células epiteliales al lumen), con frecuencia hay respuestas desmoplásicas (fibrosis) o engrosamiento del estroma, que puede ser pausible (sin células) o hiper celular. Inflamación severa (muchos linfocitos). Las células tienen formas aberrantes (no se distingue si son cúbicas o columnares). A continuación se indican algunas microfotografías donde se pueden observar imágenes de cada una de las características a evaluar.



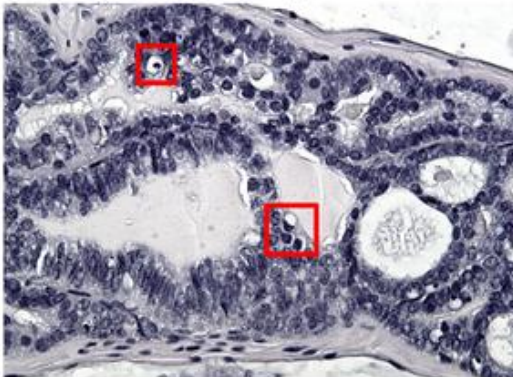
Pseudoestratificación nuclear



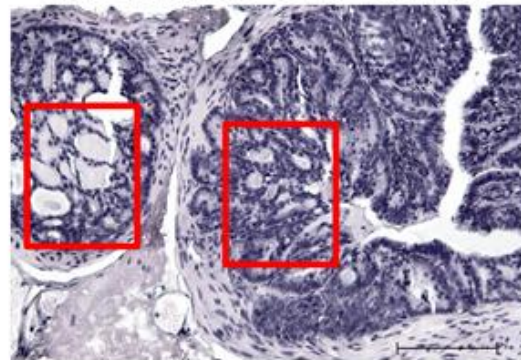
Células en penacho



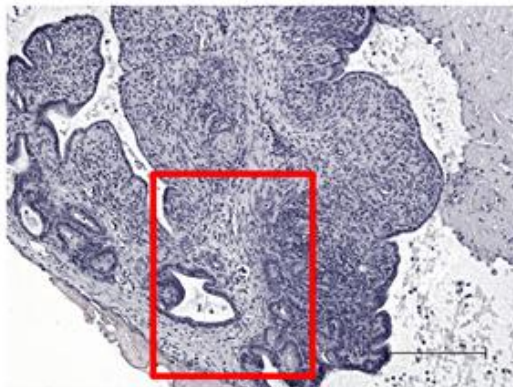
Figuras apoptóticas



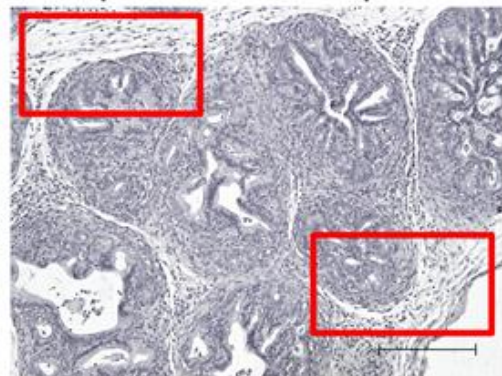
Estructuras Cribiformes



Infiltración de Células estromales



Respuesta desmoplásica



**Figura 15.** Fotomicrografía de tejido prostático del modelo TRAMP. Se pueden observar en los recuadros rojos las características de una próstata cancerosa.