UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Efectos de la privación Androgénica sobre el Tejido Prostático de Ratas Sanas

Juan Sebastián Guzmán Pulido

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia
Maestría en Ciencias Farmacología
Bogotá D.C. 2016

Efectos de la Privación Androgénica sobre el Tejido Prostático de Ratas Sanas

Juan Sebastián Guzmán Pulido

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacología

Dirección
Claudio Jaime Gómez Alegría Ph.D.
Profesor Asociado, Departamento de Farmacia

Codirección
María Constanza Lozano Álvarez M.Sc.
Profesora Departamento de Farmacia

Grupo de Investigación
UNIMOL

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia
Maestría en Ciencias Farmacología
Bogotá D.C. 2016

Para Maite y Karen, por supuesto

Agradecimientos

A Karen, Maite, Pipe, Ovidio Padre, Ovidio Hijo, Rosalba, Zhenia, Mayra, Ernesto Padre, Ernesto Hijo y Diva quienes con su apoyo moral, intelectual y económico han permitido alcanzar este objetivo, gracias y espero poder retribuir.

A los estudiantes de la carrera de farmacia Iván Tavera, Daniela Carvajal y Felipe Rubiano, quienes apoyaron inmensamente el desarrollo de la tesis con su conocimiento y dedicación en el cuidado y manejo de los animales, gracias.

A mi amiga y compañera investigadora Iveth Heredia quien me apoyo con su conocimiento y me permitió el acceso a equipos indispensables para el desarrollo de la tesis, gracias.

A los profesores Claudio Gómez y María Constanza Lozano quienes dirigieron el proyecto llevándolo a buen término, gracias por la dedicación, las enseñanzas y el esfuerzo económico que representó el desarrollo del proyecto.

Al patólogo Jersson Avila por su dedicación en el estudio histológico de las muestras.

Agradezco a Chalver Farmacéutica de Colombia por la donación del Leuprolide necesario para desarrollar la tesis, en especial a mi compañera y amiga Ángela Melo por su gestión.

Agradezco al estudiante de Maestría Diego Rodríguez por la enseñanza en la técnica para la realización de las gonadectomías.

Agradezco a William Aristizabal por la asesoría estadística indispensable para el análisis de los resultados de la tesis.

Agradezco a la Universidad Nacional por el apoyo durante mi periodo de estudios como becario asistente docente.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de Figuras	IX
Lista de Tablas	X
Lista de Abreviaturas	XI
Introducción	1
1. Planteamiento del Problema	2
2. Objetivos	6
3. Marco Teórico	7
3.1 Andrógenos	7
3.2 Próstata	14
3.3 Cáncer de Próstata	17
3.4 Tratamiento Farmacológico del Cáncer de Próstata	24
3.5 Resistencia a la Terapia de Privación Androgénica	28
3.6 Ratas para el Estudio de la Próstata	30
4. Materiales y Métodos	34
4.1 Materiales	34
4.1.1 Material Biológicos	34
4.1.2 Reactivos y Fármacos	34
4.1.3 Equipos	35
4.1.4 Otros	35
4.2 Métodos	35
4.2.1 Grupos Experimentales	36
4.2.2 Tratamiento Farmacológico con Leuprolide	37
4.2.3 Gonadectomía	38
4.2.4 Eutanasia, Necropsia y Extracción de Sangre	38
4.2.5 Análisis Histopatológico	39
4.3 Índice Prostato-somático	40
4.4 Cuantificación de los Niveles de Testosterona	41
4.5 Cuantificación de los Niveles de Antígeno Prostático	43
4.6 Análisis Estadístico	46
5. Resultados	49
5.1 Modelo de Privación Androgénica	49
5.1.1 Índice Prostato-somático	49
5.1.2 Niveles Séricos de Testosterona	51
5.2 Cuantificación de los Niveles Séricos de Antígeno Prostático	54
5.3 Hallazgos Histopatológicos	57

Continuación Contenido

	Pág.
6. Discusión de Resultados……	65
6.1 Modelo de Privación Androgénica……	65
6.2 Cuantificación de los Niveles Séricos de Antígeno Prostático……	67
6.3 Histopatología……	75
6.4 Correlaciones entre Hallazgos Histológicos y Serológicos……	78
7. Conclusiones……	83
8. Recomendaciones……	84
A. Anexo: Índice Prostato-somático……	85
B. Anexo: Cuantificación de los Niveles Séricos de Testosterona……	87
C. Anexo: Cuantificación de los Niveles Séricos de Antígeno Prostático……	89
Bibliografía……	91

Resumen

Introducción: El cáncer de próstata es una enfermedad de alto impacto epidemiológico que se presenta principalmente durante la vejez, cuando los niveles de testosterona se ven disminuidos. Sin embargo, no se ha logrado establecer una relación clara entre la testosterona y la aparición de cáncer de próstata. En este trabajo se plantea la hipótesis de que la disminución de la testosterona influenciaría en la etiología de la enfermedad.

Objetivo: Evaluar la influencia de la privación androgénica sobre el tejido prostático en ratas sanas.

Metodología: Se trabajó con tres grupos experimentales de ratas Wistar sanas. Dos grupos fueron privados de andrógenos mediante gonadectomía o por tratamiento farmacológico con Leuprolide (Leuprorelina) 0,1 mg/Kg; el tercer grupo fue el control sin intervenir**.** El efecto se evaluó determinando los niveles de testosterona y de antígeno prostático específico (PSA) en sangre, y a través de análisis anatómico e histológico de la glándula prostática.

Resultados: La terapia de privación androgénica disminuyó significativamente la concentración de testosterona en sangre, pero los niveles de PSA fueron elevados o similares al control. El índice prostato-somático disminuyó significativamente pero no se encontraron cambios histológicos indicativos de cáncer de próstata. Se encontró una fuerte disminución en la presencia de células basales y cambios atróficos relativos a la edad de los animales o generados por el tratamiento.

Conclusiones: No se encontró asociación entre la disminución de los niveles de testosterona y evidencias histológicas de lesiones precancerosas o cancerosas en la glándula prostática. Sin embargo, se observaron cambios histológicos relacionados con la edad, que constituyen una importante evidencia experimental en este modelo animal.

Palabras Clave: *Neoplasias de la Próstata, Testosterona, Antígeno Prostático Específico, Gonadectomía, Leuprolide Acetato, Histología.*

Abstract

Introduction: The prostate cancer is a disease with high epidemiologic impact that is mainly presented during old age, when the testosterone levels are decreased. However, it has not gotten established a clear relation between testosterone and cancer apparition. This research establishes a hypothesis about testosterone reduction influences on illness etiology.

Objective: To evaluate the androgenic privation influence on prostatic tissue in healthy rats.

Methodology: Three experimental groups of Wistar healthy rats were tested. Two groups were deprived of androgens through gonadectomy or pharmacology therapy with leuprolide (Leuprolrelina) 0.1 mg/Kg; the third one was the control group and it was not intervened. The effect was assessed determining the testosterone and prostatic specific antigen (PSA) blood levels and through anatomic and histologic prostatic glandule analysis.

Outcomes: The androgenic privation therapy significantly reduced the testosterone blood concentration, but the PSA levels were elevated or similar to control group. The "Prostato-somatic" rating decreased significantly, however histologic changes indicating prostate cancer were not found. A reduction on basal cell presence and atrophic changes related to animal age or generated by treatment were found.

Conclusions: A relation between testosterone levels reduction and histologic evidence of prostatic or cancerous injuries was not found. However, physiological changes associated with age which constitute an important experimental evidence in this animal model were observed.

Keywords: *Prostate Neoplasm, Testosterone, Prostate-Specific Antigen, Leuprolide Acetate, Histology.*

Lista de Figuras

Figura	Título	Pág.
Figura 1	Estructura Testosterona y DHT……	7
Figura 2	Vía Clásica y Vías Alternativas de Síntesis de Andrógenos……	8
Figura 3	Regulación de la Síntesis de Testosterona Testicular……	9
Figura 4	Dominios Estructurales del Receptor de Andrógenos……	11
Figura 5	Mecanismo de Acción del Receptor de Andrógenos……	12
Figura 6	Ubicación y Regiones Anatómicas de la Próstata……	15
Figura 7	Estructura de la Glándula Prostática……	16
Figura 8	Procedimiento Cuantificación Testosterona Sérica……	41
Figura 9	Curva Estándar para la Cuantificación de Testosterona……	43
Figura 10	Procedimiento Cuantificación de Antígeno Prostático Sérico……	44
Figura 11	Curva Estándar para la Cuantificación de Antígeno Prostático……	46
Figura 12	Influencia de la Privación Androgénica sobre el Tejido Prostático……	49
Figura 13	Índice Prostato-somático……	51
Figura 14	Cuantificación de los Niveles Séricos de Testosterona……	53
Figura 15	Relación entre Concentración de Testosterona e Índice Prostato-somático…	53
Figura 16	Cuantificación de los Niveles Séricos de Antígeno Prostático……	55
Figura 17	Correlación Antígeno Prostático e Índice Prostato-somático……	56
Figura 18	Correlación Testosterona y Antígeno Prostático……	57
Figura 19	Hallazgos a Nivel de la Arquitectura Glandular……	59
Figura 20	Hallazgos a Nivel Celular……	61
Figura 21	Acinos Atróficos……	62
Figura 22	Muerte de Células Basales……	63

Lista de Tablas

Tabla	Titulo	Pág.
Tabla 1	Grupos Experimentales……	37
Tabla 2	Estándares para la Cuantificación de Testosterona……	42
Tabla 3	Estándares para la Cuantificación de Antígeno Prostático……	45
Tabla 4	Índice Prostato-somático……	50
Tabla 5	Niveles Séricos de Testosterona……	51
Tabla 6	Niveles Séricos de Antígeno Prostático……	54
Tabla 7	Frecuencias y Severidades de Hallazgos Histológicos Relevantes……	58
Tabla 8	Hallazgos a Nivel de la Arquitectura Glandular……	60
Tabla 9	Hallazgos a Nivel Celular……	64

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Término
AED	Androstenediona
AMACR	Alfa-Metil-AcilCoA-Racemasa
AR	Receptor de Andrógenos
ARE	Elementos de Respuesta a Andrógenos
BRCA-1	Cáncer de Mama 1
BRCA-2	Cáncer de Mama 2
CRPC	Cáncer de Próstata Resistente a Castración
c-Src	Protooncogen Tirosina Quinasa
DBD	Dominio de unión a DNA
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
FGFBP2	Proteína de Unión a Factor de Crecimiento Insulínico
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
HER2	Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano
HPC-1	Cáncer de Próstata Hereditario 1
LBD	Dominio de Unión a Ligando
LH	Hormona Luteinizante
MAPK	Proteína Quinasa Activada por Mitógenos
NTD	Dominio de Translocación al Núcleo
PKA	Proteína Quinasa A
SHBG	Globulina Fijadora de Hormonas Sexuales
UGM	Mesénquima Urogenital
UGS	Seno urogenital

Introducción

El cáncer de próstata es una enfermedad de alto impacto epidemiológico con una elevada incidencia en hombres de edad avanzada[1,2]. El manejo farmacológico actual de esta enfermedad contempla, entre otras alternativas, el uso de terapia hormonal tendiente a inhibir la producción y efectos de los andrógenos sobre la próstata, debido a la idea prevalente de que el cáncer de próstata es dependiente de andrógenos[3].

El presente trabajo investiga la hipotética posibilidad de que el origen del cáncer de próstata pudiese tener relación con la disminución en los niveles de testosterona en sangre, puesto que en hombres de edad avanzada se observa un descenso en los niveles plasmáticos de este andrógeno. Para poner a prueba la hipótesis, se trabajó con un modelo animal de ratas sanas que fueron sometidas a privación androgénica mediante métodos quirúrgicos (gonadectomía) o farmacológicos (tratamiento con leuprolide), y se evaluó la respuesta mediante valoración de los niveles de testosterona y de antígeno prostático específico (PSA), así como mediante valoración de parámetros anatómicos e histológicos.

1. Planteamiento del Problema

El cáncer de próstata es el cuarto más común a nivel mundial, y es el segundo cáncer más común en hombres. Un estimado de 1.1 millones de personas fueron diagnosticadas con cáncer de próstata en 2012, lo que representa el 15% de los cánceres diagnosticados en hombres en todo el mundo. Casi el 70% de los casos son reportados en regiones desarrolladas, debido al uso efectivo de antígeno prostático y biopsia como métodos diagnósticos[1]. Actualmente, se avanza considerablemente en la investigación dirigida al tratamiento de la enfermedad, sin embargo, la investigación está siendo fraccionada sin tener una integración efectiva y un análisis conjunto de resultados que permita dar una explicación al inicio de la enfermedad y proponer nuevos enfoques en su tratamiento[4].

La etiología del cáncer de próstata no es bien entendida hasta el momento; parece relacionar una interacción compleja entre el envejecimiento, la predisposición genética, los cambios hormonales y las características ambientales. Los factores de riesgo establecidos incluyen una edad avanzada, antecedentes familiares, una dieta rica en grasas, alto consumo de carnes rojas y bajo consumo de vegetales[3]. El cáncer de próstata es una enfermedad de la vejez, pues rara vez se presenta antes de los 50 años (0,1% de los casos) y, su incidencia aumenta con rapidez después de los 65 años, con más del 85% de los cánceres de próstata siendo diagnosticados después de esta edad[2].

Con un estimado de 307.000 muertes en 2012, el cáncer de próstata es la quinta causa de muerte en hombres a nivel mundial (6,6% del total). El número de muertes por esta patología es menor en las regiones desarrolladas comparado con las regiones en vía de desarrollo. Las tasas de mortalidad son relativamente altas en la población afro-descendiente, siendo de 29

por cada 100.000 habitantes en el Caribe y 19-24 por cada 100.000 habitantes en el África Subsahariana. La mortalidad es muy baja en la población de Asia (2,9 por 100.000 habitantes) e intermedia en las Américas y Oceanía[1].

En Colombia, el cáncer de próstata es el tipo de cáncer más común entre los hombres, además del cáncer de piel. Se calcula que cada año aparecen cerca de 6.500 nuevos casos de cáncer de próstata y que alrededor de 3.000 hombres morirán a causa de esta enfermedad anualmente. En el país, el cáncer de próstata es la segunda causa de muerte por cáncer en los hombres y sólo la sobrepasa el cáncer gástrico. El índice de mortalidad de la enfermedad está aumentando en Colombia y se ha triplicado en los últimos 30 años[5].

Hoy en día existen varios tratamientos farmacológicos para los pacientes con cáncer de próstata, pero su efectividad es limitada por el desarrollo de resistencia. Se Incluyen agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas, antagonistas del receptor de andrógenos, inhibidores enzimáticos, vacunas autólogas, y antimitóticos. La investigación actualmente se encamina hacia vacunas, anticuerpos monoclonales y fármacos dirigidos a mejorar la efectividad del tratamiento[3, 6, 7]. La terapia de supresión hormonal, a menudo es muy eficaz en reducir el tamaño o desacelerar el crecimiento del tumor, sin embargo, puede llegar a perder su eficacia con el pasar del tiempo. Aquellos casos en los que el cáncer resiste la terapia hormonal y la cirugía, son conocidos como cáncer de próstata resistente a castración (CRPC) que es una forma avanzada de esta patología[6]. En comparación con los pacientes sensibles a la terapia hormonal, el pronóstico de pacientes con CRPC es pobre y la supervivencia es reducida. Se estima que entre el 10 y el 20% de pacientes con cáncer de próstata desarrolla CRPC en un periodo de dos a tres años después de iniciada su terapia hormonal. Además, el 84% de estos pacientes presentan metástasis en el momento de diagnosticar la resistencia al tratamiento y

su media de supervivencia es de 14 meses[8]. Siendo así, la búsqueda de mecanismos relacionados con la influencia de la terapia sobre el tejido prostático debería contribuir al entendimiento de la enfermedad y la posible búsqueda de nuevos objetivos terapéuticos que puedan solucionar la resistencia al tratamiento.

Es evidente que el cáncer de próstata constituye una enfermedad compleja, con infinidad de variables y problemas que pueden afectar al paciente. Desde el punto de vista clínico se asume que los altos niveles de andrógenos representan un agente causal de la enfermedad, y esa es la principal razón por la cual la terapia actual se enfoca en disminuir los niveles de andrógenos para inhibir o revertir el crecimiento tumoral[9]. Sin embargo, existe un hecho particular que llama la atención de nuestro grupo y es que a medida que los hombres envejecen experimentan una disminución en sus niveles de testosterona en una tasa aproximada de 0,11 ng/L al año[10,11], al tiempo que se observa un aumento incidencia de cáncer de próstata[12], lo cual es paradójico y no se tiene una explicación. Al respecto, algunos estudios han evaluado una potencial relación entre la disminución en los niveles de testosterona y el riesgo de cáncer de próstata. Por ejemplo, en la obesidad se produce una disminución del 30% en la producción de testosterona[13] y un aumento del índice de masa corporal que se correlacionan positivamente con el riesgo de sufrir la enfermedad, además de un aumento del riesgo de sufrir un tumor de alta agresividad[14]. Así mismo, en el hipogonadismo la terapia de sustitución con testosterona no tiene relación con el incremento del riesgo de sufrir cáncer de próstata[15], pero si se ha evidenciado que en los hombres que sufren la enfermedad el riesgo de sufrir cáncer de próstata se incrementa cuanto mayor es la disminución de testosterona y cuanto mayor es la expresión de antígeno prostático (PSA)[16].

Por otro lado, algunos estudios epidemiológicos se han enfocado en buscar una potencial relación entre los niveles aumentados de andrógenos y la aparición de cáncer de próstata. En una revisión sistemática realizada con 18 estudios prospectivos en donde se incluían 3.886 hombres con cáncer de próstata y 6.438 controles, se analizó la relación entre los niveles circulantes de diferentes tipos de andrógenos, observándose que los altos niveles séricos de andrógenos no se correlacionarían con la aparición de cáncer de próstata[17].

En su conjunto, lo anterior nos lleva a plantear la hipótesis de que la disminución en los niveles de testosterona podría asociarse con la aparición de un fenotipo indicativo de cambios neoplásicos o pre-neoplásicos en próstata.

Con este trabajo se pretende dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación: ¿existe relación entre la disminución de los niveles de testosterona y la aparición de un fenotipo indicativo de cáncer de próstata?

2. Objetivos

Objetivo General

Evaluar la influencia de la privación androgénica sobre el tejido prostático en ratas sanas

Objetivos Específicos

1. Implementar un modelo de ratas sanas con privación androgénica inducida experimentalmente.

2. Determinar los niveles serológicos de antígeno prostático en ratas sanas sometidas a privación androgénica.

3. Determinar posibles cambios histológicos en el tejido prostático de ratas sanas sometidas a privación androgénica.

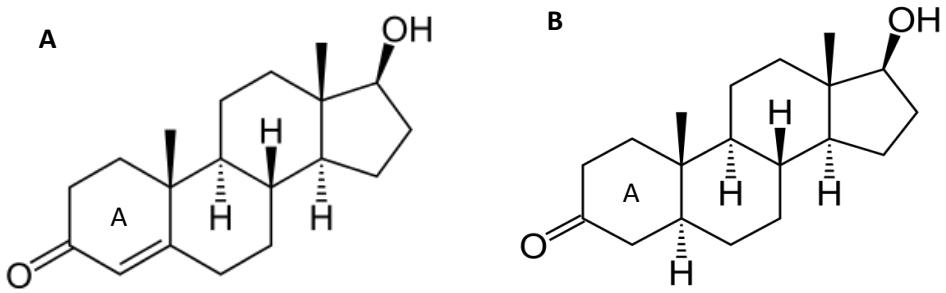
4. Establecer potenciales relaciones entre los hallazgos histológicos y serológicos obtenidos a partir de ratas sanas sometidas a privación androgénica.

3. Marco Teórico

3.1 Andrógenos

Los andrógenos son hormonas esteroidales derivadas del anillo estructural ciclopentanoperhidrofenantreno (Figura 1).

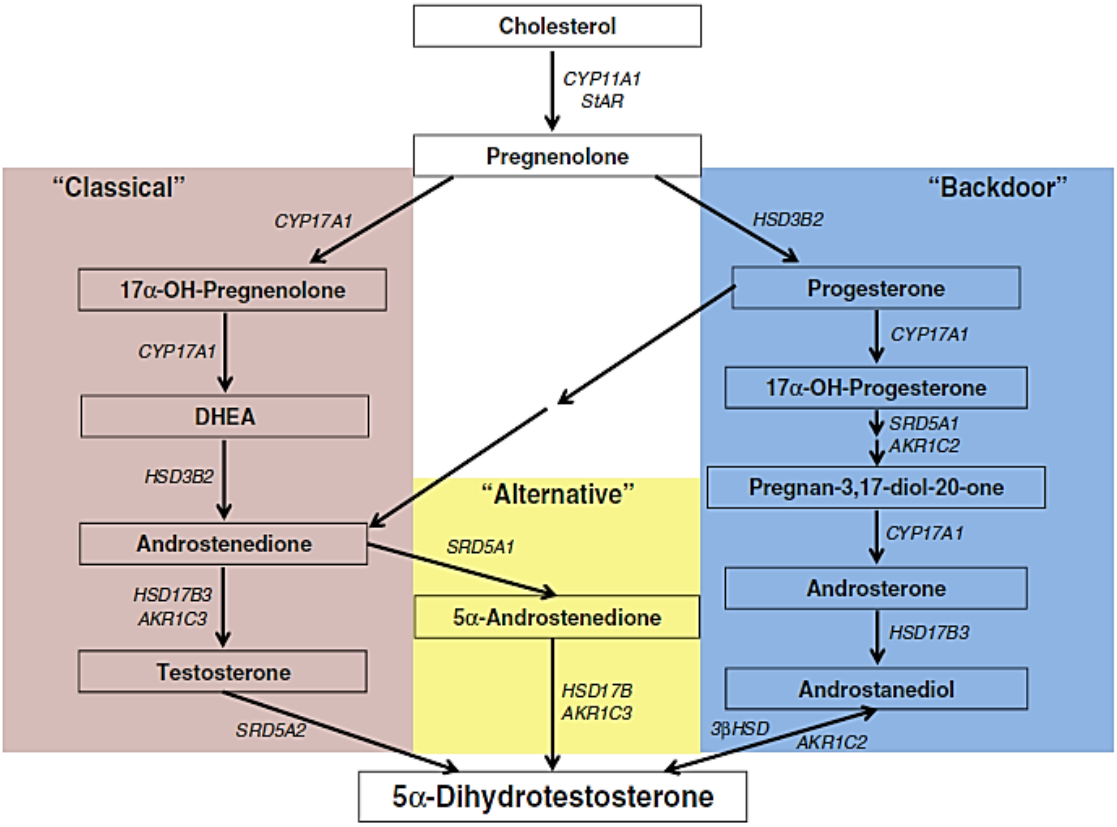
Figura 1. Estructuras Testosterona y DHT



A. Testosterona, B Dihidrotestosterona. Se observa la reducción de la molécula de DHT con la pérdida del doble enlace 4,5 en el anillo A, efecto producido fisiológicamente por la 5α-Reductasa y que aumenta la afinidad por el receptor de andrógenos [18].

La síntesis de andrógenos es un proceso llevado a cabo en los testículos y en menor proporción en las glándulas suprarrenales. La testosterona es el andrógeno determinante de los caracteres sexuales masculinos y su síntesis ocurre en las células de Leidyg, a partir de colesterol[19] y mediante una serie de reacciones que se muestran en la figura 2. Las vías alternativas de síntesis hacen parte de los mecanismos de resistencia al tratamiento hormonal y será abordada más adelante en el texto (Marco Teórico; Sección 3.5)

Figura 2. Vía Clásica y Vías Alternativas de Síntesis de Andrógenos [18].

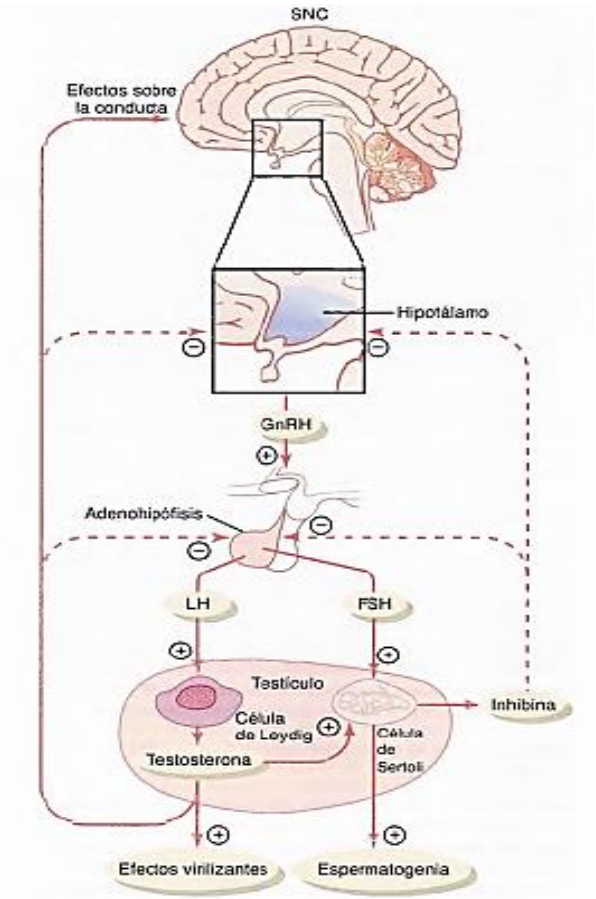


En las células de Leydig, los ésteres de colesterol son metabolizados y convertidos a los principales precursores de la síntesis de andrógenos, la pregenenolona y la progesterona (21 Carbonos), que se convierten a los andrógenos dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona (AED) (19 Carbonos) por la actividad liasa e hidroxilasa de la CYP17A1 (Figura 2). Posteriormente, una serie de reacciones que implican la actividad enzimática de enzimas hidroxiesteroide dehidrogenasas como HSD3B y HSD17B, y de las aldo-ceto reductasas como AKR1C convierten estos andrógenos en testosterona, hormona que es secretada al torrente sanguíneo[19]. Los andrógenos DHEA y AED también pueden ser producidos por las glándulas suprarrenales y ser secretados al torrente sanguíneo para luego ingresar a la próstata y ser

convertidos a testosterona al interior del órgano, pues la próstata cuenta con el arsenal enzimático para la producción de testosterona a partir de andrógenos suprarrenales[9].

La regulación de la producción testicular de testosterona es mediada por el eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal que involucra la secreción hipotalámica de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), que estimula a la adenohipófisis para producir y liberar las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). La LH viaja a los testículos estimulando la producción de testosterona por parte de las células de Leydig, mientras que la FSH junto con la testosterona producida, estimulan las células de Sertolli, resultando en la espermatogénesis. Las células de Sertolli producen inhibina, una proteína que posee un efecto de retroalimentación negativa sobre la producción de GnRH y LH, efecto compartido con la testosterona[10] (Figura 3).

Figura 3. Regulación de la Síntesis de Testosterona Testicular[10]

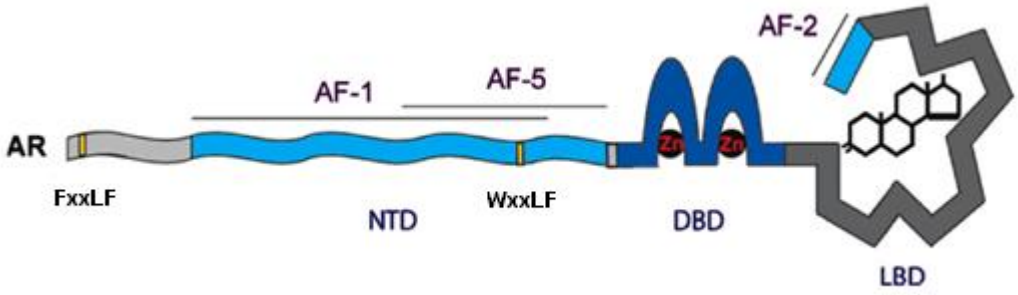


Alrededor del 97% de la testosterona circulante se une a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina o, con mayor afinidad, a una globulina beta denominada globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG). La hormona unida a proteína circula por la sangre fijándose a tejidos como el prostático o degradándose a productos inactivos que luego son secretados por la orina[10].

En las células prostáticas la testosterona ingresa al citoplasma por difusión pasiva y por acción de la enzima 5α reductasa es convertida a dihidrotestosterona (DHT), un andrógeno estructuralmente similar a la testosterona (como se mostró en la figura 1) pero con actividad biológica 100 veces mayor[19]. La DHT se une posteriormente al receptor de andrógenos (AR), activando su dimerización y translocación al núcleo[20].

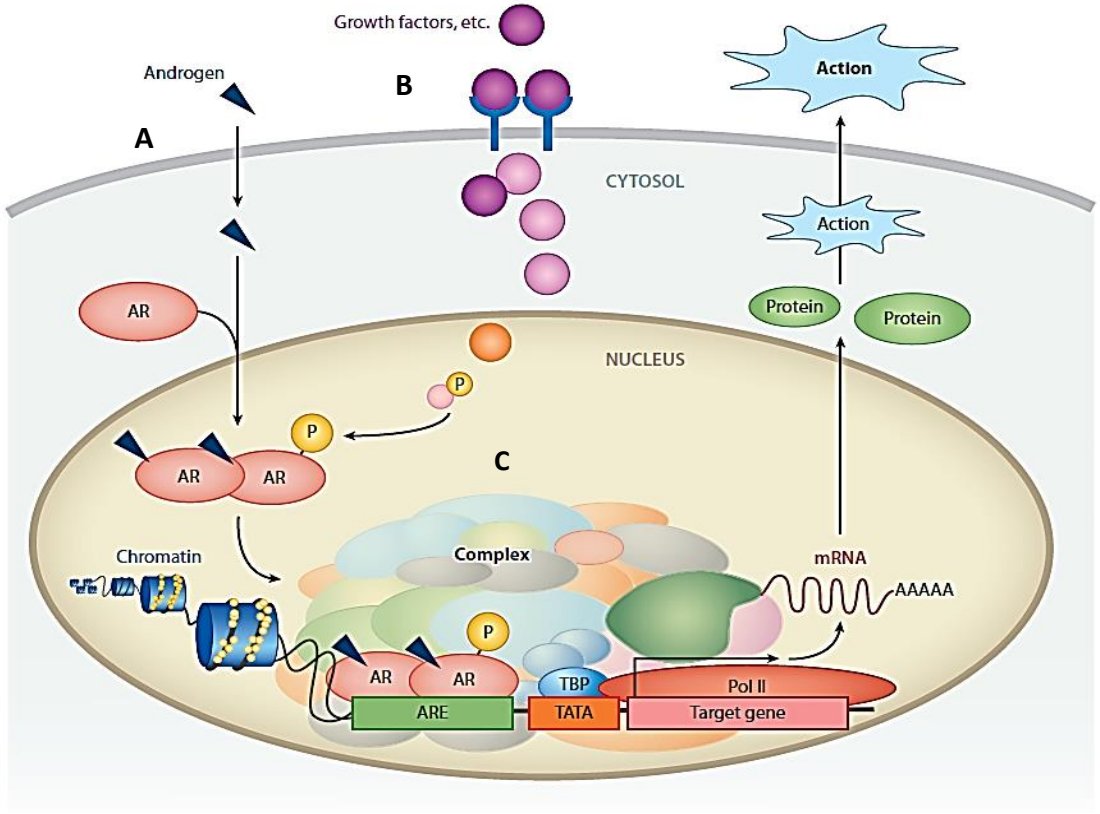
El receptor de andrógenos (AR) es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares y actúa como factor de transcripción dependiente de ligando. El gen que codifica el AR en humanos se encuentra localizado en el cromosoma 21, contiene 8 exones y codifica una proteína de aproximadamente 919 aminoácidos[18]. El receptor AR está constituido por tres dominios importantes para su función (Figura 4): (*i*) un dominio de unión a ADN (DBD) que permite la unión del receptor al ADN en la región reguladora de los genes sensibles a andrógenos, (*ii*) un dominio de unión a ligando (LBD) que es el sitio donde se fija la hormona para activar el receptor, y (*iii*) un dominio de translocación al núcleo (NTD) que permite el ingreso del receptor al núcleo en respuesta a la unión del andrógeno. Los motivos AF1-AF5 son importantes para la unión de coreguladores que permiten regular la actividad transcripcional del receptor, mientras que los motivos WxxLF y FxxLF median la interacción con el ligando al favorecer un ambiente hidrofóbico[18, 20, 21].

Figura 4. Dominios Estructurales del Receptor de Andrógenos[22].



El mecanismo de acción clásico de los andrógenos implica la unión de la hormona al receptor AR, seguido de la formación de homo-dímeros del receptor y de su translocación al núcleo celular. En el núcleo el receptor dimérico se fija a los elementos de respuesta a andrógenos (ARE) localizados en el ADN genómico, donde actúa regulando la expresión de genes sensibles a la actividad androgénica[20] (Figura 5). Existen más de 150 coreguladores identificados que presentan diferentes actividades enzimáticas conducentes a la modificación postraduccional de histonas y del receptor mismo (fosforilación, acetilación, otras), que en conjunto permiten un ajuste fino en la regulación de la expresión génica dependiente de andrógenos[18].

Figura 5. Mecanismo de Acción del Receptor de Andrógenos.



Se observa la vía de activación clásica (A), y una vía de activación alternativa mediada por receptores de factores de crecimiento (B), lo que lleva la formación de complejos multiprotéicos con múltiples reguladores en el promotor de genes sensibles (C), todo lo cual lleva a un ajuste fino de la expresión génica en respuesta a andrógenos. AR, Receptor de Andrógenos. ARE, Elementos de respuesta a andrógenos[20].

El receptor de andrógenos regula la expresión de múltiples genes relacionados con crecimiento, diferenciación, y funcionamiento normal de la próstata, entre ellos el gen *KLK3* que codifica para el antígeno prostático específico (PSA), una proteasa de serina que ha servido en el monitoreo y manejo del cáncer de próstata, puesto que sus niveles séricos se relacionan con la actividad del receptor de andrógenos[23].

Se han propuesto diferentes mecanismos para la función que ejerce el receptor de andrógenos en la próstata; el mejor descrito es la unión del homodímero a los elementos de respuesta a andrógenos (ARE) en donde se reclutan diferentes coreguladores que activan la transcripción (Figura 5). Sin embargo, el receptor tiene la capacidad de unir corepresores que darían como resultado un bloqueo de la transcripción genética, tiene la capacidad de unirse a otros factores de transcripción y actuar como un coactivador de la expresión génica o puede activar vías kinasas, por ejemplo las relacionadas con la proteína *src* (tirosina quinasa) o con el receptor EGRF (receptor del factor de crecimiento epidermal). Todos estos procesos se encuentran relacionados con el crecimiento y la diferenciación celular[18].

Múltiples estudios han sugerido que algunas respuestas a esteroides no involucrarían la vía clásica de activación del receptor AR citoplasmático[24], sino más bien vías de activación alternativas que partirían en un receptor AR de membrana plasmática, todo esto evidenciado por el hecho de que múltiples andrógenos se unen a la membrana plasmática de distintos tipos celulares incluyendo células endoteliales, osteoblastos, células de próstata, células de mama, linfocitos T y macrófagos[25].

Estos mecanismos no genómicos alternos se caracterizan por presentarse en un periodo corto de tiempo (minutos), no implican cambios en la transcripción de genes, e involucran la participación de factores de crecimiento y de mecanismos de señalización mediados por segundos mensajeros, lo que sugiere la existencia de receptores de andrógenos acoplados a proteína G[25].

La existencia de estas vías alternativas para la activación del receptor de andrógenos abre un nuevo reto en el entendimiento de cómo las hormonas pueden regular la función celular e

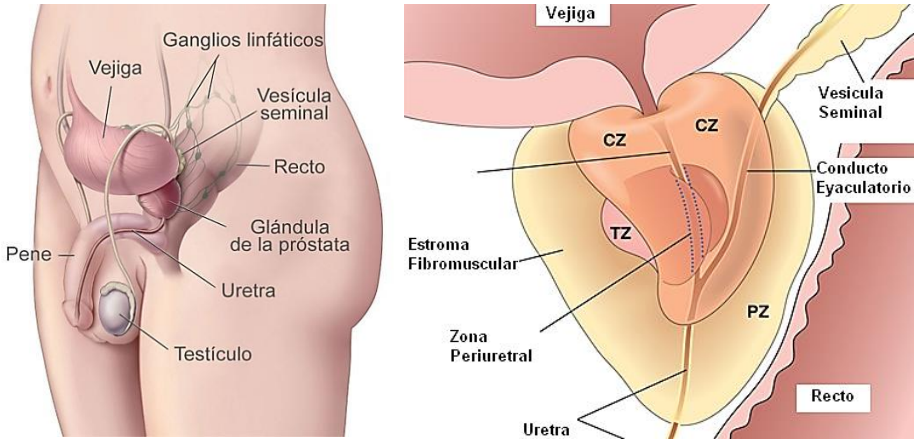
invalidan la creencia de que el cambio en los niveles hormonales minuto a minuto no tiene importancia en la fisiología celular[25].

3.2 Próstata

La próstata es una glándula que sintetiza los componentes del líquido seminal, incluyendo proteasas tales como el antígeno prostático específico (PSA). El órgano se desarrolla a partir del seno urogenital (UGS) que contiene una capa externa de tejido conectivo embrionario denominado el mesénquima seno-urogenital (UGM) que expresa el receptor AR. Este receptor regula la expresión de genes para el normal funcionamiento y desarrollo de la próstata. Además, el AR estromal presente en el UGM regula la morfogénesis ductal a través de señalización paracrina, iniciando el desarrollo de la próstata y funcionando como modulador clave de la proliferación, supervivencia y diferenciación de células epiteliales[18].

La glándula prostática se encuentra en el compartimento subperitoneal, entre el diafragma pélvico y la cavidad peritoneal, por detrás de la sínfisis púbica, anterior al recto e inferior a la vejiga urinaria. Clásicamente se describe en forma de nuez y rodea la uretra. La próstata está compuesta de elementos glandulares y estromales fusionados dentro de una pseudocápsula. La capa interior de la cápsula de la próstata está conformada por músculo liso con un revestimiento exterior de colágeno. El tejido nervioso de la próstata es derivado del plexo prostático, mientras el suministro arterial es derivado de la arteria iliaca interna. Los vasos linfáticos de la próstata drenan principalmente en los ganglios iliacos internos[26] (Figura 6).

Figura 6. Ubicación y Regiones Anatómicas de la Próstata.



CZ, Zona Central. TZ, Zona de Transición. PZ, Zona Periférica[12]

La glándula se divide en 3 zonas: la zona periférica, la zona central y la zona de transición. Estas zonas tienen diferentes orígenes embriológicos y se pueden distinguir por su anatomía, histología, función biológica y susceptibilidad a patologías. La mayoría de los cánceres de próstata surgen en la zona periférica que se deriva principalmente del UGS. Por el contrario, la zona central que se deriva del conducto de Wolffian tiene muy baja incidencia de esta patología. No obstante, en la zona de transición que tiene el mismo origen embrionario que la periférica surgen aproximadamente el 25% de los cánceres de próstata. La diferencia en la incidencia de cáncer en la zona periférica con respecto a la zona de transición puede explicarse debido al componente estromal ya que el estroma de la zona de transición es particularmente fibromuscular y es el lugar donde se produce la hiperplasia prostática benigna[26] (Figura 6).

Histológicamente la glándula se encuentra conformada por varias líneas celulares importantes para su normal funcionamiento. El estroma se encuentra constituido principalmente de fibroblastos y tejido muscular liso, que contribuye a la síntesis de la matriz extracelular. En general, el estroma incluye algunos nervios, vasos sanguíneos y diversos tipos de células

inmunes y proinflamatorias infiltrantes. En conjunto, las células estromales y la matriz extracelular generan un microambiente que regula el crecimiento de las células epiteliales adyacentes. El epitelio está compuesto por tres tipos de células; las luminales secretoras de tipo columnar alto que recubren los conductos glandulares, las células basales aplanadas que rodean a las secretoras y algunas células neuroendocrinas en menor proporción[27] (Figura 7).

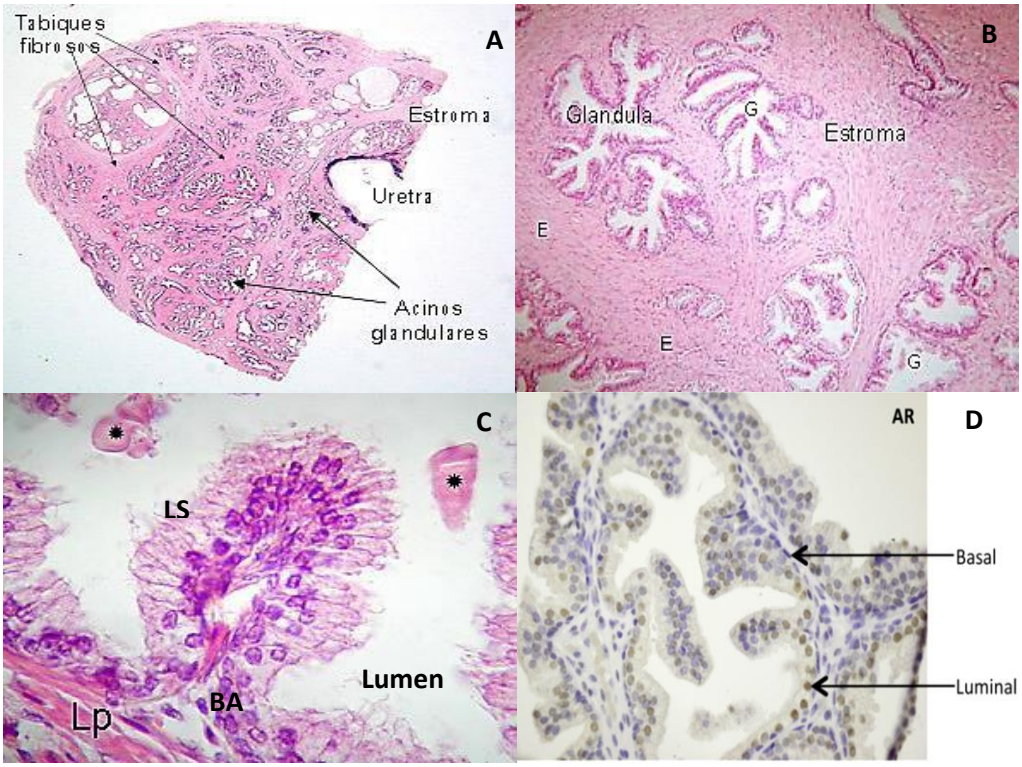


Figura 7. Estructura de la Glándula Prostática. A. *Estructura General de la Glándula donde se distinguen la uretra, el estroma y los acinos glandulares. B. Se observan las ramificaciones características de la glándula dentro del tejido conjuntivo fibroso (estroma). C. Epitelio distribuido en dos capas celulares, luminales secretoras columnares (LS) y células basales aplanadas (BA) en contacto con la lámina propia (Lp). En el lumen pueden observarse cuerpos amiláceos (asterisco). D. Estructura Acino Glandular*[28].

En cuanto a la fisiología y mantenimiento del órgano, en la próstata adulta el receptor AR se expresa en todas las células del lumen prostático y en algunas epiteliales intermedias, así como en las células del estroma. Las células epiteliales dependen directamente de la estimulación

androgénica e indirectamente de factores de crecimiento inducidos por andrógenos y que son secretados por las células estromales[26]. La función principal del receptor AR en las células epiteliales parece ser la producción de proteínas secretadas por la próstata. Es interesante el hecho de que el AR desempeña un papel estimulador e inhibidor de crecimiento, pues funciona como un factor de supervivencia para las células luminales y como un supresor de la proliferación celular basal regulando el crecimiento normal de la próstata[18].

Perfiles de expresión en ratas han demostrado que durante el desarrollo, el receptor de andrógenos se expresa en las células mesenquimales del UGS, especialmente aquellas adyacentes al epitelio y lleva a la formación de pequeñas germinaciones a medida que la próstata se desarrolla y las células mesenquimales se diferencian para formar músculo liso. Por el contrario, durante el periodo postnatal el receptor se expresa predominantemente en el tejido glandular. Siendo así, la regulación del crecimiento y diferenciación de las células epiteliales se atribuye principalmente al receptor de andrógenos. Gran parte de esta actividad se cree esta mediada por la liberación de factores paracrinos independientes del receptor epitelial[27].

3.3 Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata constituye una enfermedad de alto impacto epidemiológico por su elevada incidencia y prevalencia, especialmente en hombres de edad avanzada. La mayoría de casos son reportados en Estados Unidos y Australia, países con una dieta rica en grasas y alto consumo de carnes rojas, mientras se observa una menor incidencia en Japón y los países orientales donde se consumen una elevada cantidad de vegetales. Los factores genéticos,

familiares y raciales son importantes en la patogénesis del cáncer de próstata. La enfermedad es más común en americanos y africanos que en asiáticos o europeos. El riesgo familiar se estratifica según el número de casos y su relación con el afectado. El 85% de todos los casos de la enfermedad son esporádicos, mientras los casos de cáncer de próstata hereditario son los más comunes en pacientes jóvenes. Además, se cree que los andrógenos tienen un papel protagónico en la patogénesis de la enfermedad[3]. Aunque la relación hasta el momento no se encuentra bien definida[26].

El inicio de la enfermedad se caracteriza por la aparición de lesiones neoplásicas intraepiteliales de alto grado que son consideradas una manifestación precancerosa en seres humanos y en modelos de roedores con cáncer, donde se observa la sustitución de células luminales normales por células neoplásicas, con la preservación de la capa de células basales. Las células neoplásicas pueden propagarse a través de los conductos prostáticos, exhibiendo un patrón cribiforme[26]. Los criterios histológicos mayores para el diagnóstico de carcinoma de próstata son: (1) acinos que infiltran el estroma prostático particularmente entre las glándulas benignas, (2) atipia nuclear, asociada o no a macro nucléolos prominentes, (3) citoplasma basófilo, (4) contenido intraluminal del tipo de cristaloides o (5) necrosis eosinófila, y (6) ausencia de la capa de células basales. En la mayoría de los casos, el diagnóstico de adenocarcinoma mínimo es posible a partir de la utilización de esos criterios. Únicamente un número limitado de rasgos tales como las glomerulaciones, la fibroplasia mucinosa (micronódulos de colágeno) y la invasión perineural son patognomónicos de cáncer de próstata[29]. Para confirmar el diagnóstico histológico de adenocarcinoma de próstata, la capa de células basales se debe perder, una característica crítica de la enfermedad[26]. Los tumores generalmente se componen de células epiteliales con diferentes grados de diferenciación y

diferente arquitectura glandular. El sistema de clasificación histológica estándar aceptado para el adenocarcinoma de próstata es el desarrollado por Gleason y se basa en el grado de diferenciación. A medida que la puntuación de Gleason aumenta, el grado de diferenciación glandular se reduce. Existe una fuerte correlación entre el grado histológico y el comportamiento biológico de malignidad[3]. En un estudio realizado en Colombia, luego de analizar 400 biopsias de adenocarcinoma de próstata se encontró que las características histológicas comunes en glándulas neoplásicas fueron: infiltración del estroma 100%, ausencia de capa basal 100%, nucléolo prominente (98%), múltiples nucléolos (60%), cristaloides intraluminales (40%), material eosinófilo amorfo intraluminal (70%), micronódulos de colágeno (1%), estructuras glomeruloides (10%), invasión perineural (20%), retracción del estroma (32%) e invasión de la grasa (1%)[30].

En cuanto al comportamiento del receptor de andrógenos durante el desarrollo de cáncer de próstata, estudios en ratones modificados con ablación del receptor AR tanto en células epiteliales como en células estromales dan lugar a tumores de próstata primarios, pequeños y con bajos niveles de proliferación. Por el contrario, el análisis de ablación del receptor AR específicamente en células epiteliales sugirió en un principio que su función se relaciona con la supresión de la proliferación del tumor y de la metástasis debido a que su ablación provocó un aumento de la proliferación de las células basales y luminales, además de tumores metástasicos mas grandes[31]. Sin embargo, la sobreexpresión del receptor de andrógenos en células epiteliales de ratones transgénicos sanos genera la aparición de neoplasia prostática intraepitelial de alto grado, paso anterior a la generación de cáncer de próstata, lo que sugiere que tanto bajos como elevados niveles de receptor epitelial en tejido sano pueden inducir la aparición de cáncer de próstata[32]. En cuanto a las células estromales, se ha evidenciado que

tanto células AR positivas como AR negativas en ausencia de andrógenos promueven el crecimiento de las células epiteliales tumorales por secreción de factores paracrinos independientes del receptor de andrógenos. Por el contrario, en presencia de andrógenos las células estromales AR positivas disminuyen el crecimiento y la capacidad invasiva de células tumorales epiteliales por secreción de factores paracrinos dependientes de la presencia hormonal y del receptor[27]. Además, estudios realizados sobre líneas celulares recombinantes tanto en cáncer de próstata como en CRPC, indican que la baja expresión del receptor de andrógenos estromal ejerce un marcado efecto proliferativo[33]. En muestras tomadas de pacientes con cáncer de próstata con suspensión del tratamiento hormonal y con resistencia al tratamiento se evidencia una pérdida del receptor estromal en tejido adyacente al tumor, lo que indica que niveles bajos de receptor se asocian tanto con la patogénesis de la enfermedad como con la resistencia al tratamiento[34]. En resumen, en tejido prostático normal y en adenocarcinoma sin tratamiento, el receptor de andrógenos epitelial favorece la proliferación celular mientras el receptor estromal cumple un efecto inhibitorio. Siendo así, el tratamiento debe dirigirse al bloqueo del receptor de andrógenos epitelial, sin afectar el receptor estromal pues se estarían favoreciendo procesos proliferativos y de resistencia[27].

Por lo anterior, es evidente que el cáncer de próstata parece ser altamente dependiente de factores paracrinos y autocrinos de comunicación entre el estroma y las células epiteliales. Aunque no es claro qué factores críticos pueden influir en estas interacciones recíprocas, es importante resaltar que el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento insulínico I (IGF-I), y el factor de crecimiento transformante-β (TGF-β) pueden cumplir tales funciones[20].

Sabiendo que las células epiteliales son las principales responsables de la aparición de cáncer de próstata, actualmente, se realizan amplios esfuerzos por conocer cuál es el tipo de célula epitelial que da origen a la enfermedad, sin embargo aún existen posiciones encontradas. Las células luminales se cree dan origen al cáncer de próstata porque la enfermedad se caracteriza por una expansión de este tipo celular con una pérdida de las células basales. Pese a lo anterior, se ha observado que las células basales además de expresar marcadores característicos como p63 y K5 también expresan receptor AR y pueden dar origen a la enfermedad. Además, se ha propuesto que el cáncer de próstata surge de una población menor de células madre que proliferan lentamente y se limitan al compartimento basal. Durante el desarrollo de la próstata, la población de células madre se diferencia en células luminales en respuesta a andrógenos, expresando marcadores como AR, PSA y fosfatasa acida prostática (PAP), proteína útil en el diagnóstico de metástasis en cáncer de próstata[26].

Para evaluar el efecto de las células epiteliales basales se realizó un estudio en el que se utilizaron ratones inmunosuprimidos y un xenotransplante con células basales que expresan AKT, ERG y AR lo que resultó en el desarrollo de adenocarcinoma[35]. Por otra parte, se ha observado que la integrina $\alpha_2\beta_1$ está implicada en el mantenimiento del fenotipo de células basales inmaduras, y los andrógenos regulan a la baja su expresión, es decir los andrógenos inducen una maduración de las células epiteliales basales. Para evaluar el efecto de los andrógenos en células basales maduras se realizaron estudios en los que se cultivaron células basales humanas derivadas de la zona periférica y de la zona de transición, mostrando que la expresión del receptor de andrógenos aumentó en respuesta a la dihidrotestosterona en el tejido periférico pero no en el tejido derivado de la zona de transición. Sabiendo que es la zona periférica la responsable de la mayoría de casos de cáncer de próstata se señaló a las células basales de la zona periférica como posibles orígenes del cáncer de próstata humano[36]. Todos

estos hechos llevan a pensar que son las células basales las responsables de la patogénesis de la enfermedad. Pero a pesar de la evidencia, Wang y col (2014) analizaron múltiples modelos de ratón y encontraron que las células basales sólo pueden generar tumores en injertos y una vez que se diferencian a células luminales, mientras que las células luminales pueden dar origen al tumor en muchos otros contextos y por esta razón afirman que estas últimas son las responsables del inicio de la enfermedad[37].

En cuanto al perfil molecular del cáncer de próstata, muchos genes candidatos para la susceptibilidad al cáncer de próstata se han identificado, entre ellos el gen HPC-1 (Cáncer de Próstata Hereditario-1) es el mejor caracterizado. También hay un aumento del riesgo de cáncer de próstata en hombres que expresan los genes BRCA-1 y BRCA-2[3]. En general, el cáncer de próstata es una enfermedad muy heterogénea tanto en su perfil molecular como en su presentación clínica. Análisis genómicos muestran diferencias en la expresión de genes entre las células prostáticas normales y las células cancerosas, así como diversidad de expresión de diferentes clones dentro de un mismo tumor[38]. Sin embargo, existen algunas proteínas características de diferentes estadíos de la enfermedad. Entre los resultados relevantes obtenidos hasta el momento se observa que la proteína IGFBP2 (proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulínico) se encuentra sobreexpresada en el 100% de los casos de cáncer de próstata resistente a castración (CRPC), en el 36% de los tumores primarios y en ningún caso de hiperplasia prostática benigna. Además se ha demostrado que la proteína Alfa-metilacil-CoA Racemasa (AMACR) involucrada en el metabolismo energético se encuentra sobreexpresada en cáncer de próstata y actualmente se utiliza como marcador para la detección de la enfermedad. Por otra parte, MUC1 una mucina de superficie celular se ha encontrado relacionada con agresividad y alto riesgo de recurrencia después de

prostatectomía, mientras que la glicoproteína ASGP1 se ha asociado a una disminución del riesgo de recurrencia[4].

Además, el cáncer de próstata se relaciona con un aumento en la expresión del oncogén *K-ras* y una disminución de los genes supresores tumorales PTEN, KLF6 y APC, condiciones propicias para que se produzca un crecimiento celular no controlado. En un 20-30% de los casos se observan mutaciones en el gen supresor tumoral p53 las cuales se relacionan con agresividad y resistencia a terapia hormonal. En cuanto a aberraciones cromosomales, estudios bioinformáticos, han permitido observar que en el 50% de los adenocarcinomas de próstata localizados se produce una proteína aberrante conocida como TMPRSS2-ERG. El fenómeno se produce gracias a que la actividad del receptor AR como factor de transcripción produce un plegamiento del ADN y facilita el acercamiento de las regiones codificantes para el promotor TMPRSS2 y los factores de transcripción ERG1 y ETV, quienes tras un daño del ADN terminan fusionándose. El promotor TMPRSS2 es una región de respuesta a andrógenos , mientras que ERG1 y ETV1 son oncogenes miembros de la familia de factores de transcripción ETS. Siendo así, la fusión de un gen de respuesta a andrógenos y los oncogenes permiten que la estimulación androgénica aumente la expresión de TMPRSS2-ERG, una proteína asociada con formas agresivas del cáncer de próstata y que exhibe efectos oncogénicos[4, 20].

Actualmente la investigación epigenética ha tomado fuerza debido a su importancia en la regulación de la expresión genética. En el cáncer de próstata se ha observado sobreexpresión de histonas deacetilasas e histonas metiltransferasas, enzimas implicadas principalmente en el silenciamiento genético. Además, la hipermetilación del gen GSTP1 que codifica para la glutatión S transferasa P implicada en el metabolismo de xenobióticos, se ha observado en aproximadamente un 70% de los casos de cáncer de próstata. Este silenciamiento afecta vías

de regulación de la reparación del daño al ADN y aumenta la susceptibilidad de sufrir la enfermedad. Por otra parte, los genes APC y MDR1 también se observan hipermetilados. Por estas razones las modificaciones epigenéticas han sido propuestas como eventos oncogénicos claves para explicar el inicio de la enfermedad[4].

3.4 Tratamiento Farmacológico del Cáncer de Próstata

En un principio, el cáncer de próstata puede ser efectivamente tratado bloqueando la actividad de los andrógenos sobre la próstata; sin embargo, en un 10-20% de los pacientes se produce resistencia a este tratamiento, fenómeno conocido como cáncer de próstata resistente a castración (CRPC) y que actualmente no tiene solución. La terapia de privación androgénica representa el principal enfoque en el tratamiento del cáncer de próstata. Es bien sabido que el bloqueo de la activación del receptor de andrógenos representa en un principio la reversión de la enfermedad, y el objetivo se logra mediante mecanismos como bloqueo de la conversión de testosterona a dihidrotestosterona, bloqueo de producción de andrógenos suprarrenales, testiculares y de tejido prostático, y supresión de la estimulación hormonal a nivel cerebral. Sin embargo, tras la disminución de los niveles de testosterona debido a la terapia se produce fallo terapéutico y la mencionada resistencia[9, 39].

Actualmente existen varios enfoques farmacológicos para el tratamiento del cáncer de próstata. En primer lugar se encuentran los antiandrógenos no esteroidales que bloquean la acción de los andrógenos tanto de origen adrenal como testicular debido a su antagonismo sobre el receptor de andrógenos, su efecto impide la activación del receptor y su posterior translocación al núcleo. A este grupo de fármacos pertenecen flutamida, bicalutamida y enzalutamida. Particularmente la enzalutamida se encuentra indicada para el tratamiento de

CRPC debido a que inhibe la unión de andrógenos al receptor, la translocación del receptor al núcleo y subsecuentemente interacción con el ADN, de manera diferencial a flutamida y bicalutamida; sin embargo, ya se reportan casos de resistencia[40].

Otro grupo de fármacos utilizados son los inhibidores selectivos e irreversibles de la enzima CYP17A1, enzima involucrada en la biosíntesis de andrógenos que se encuentra altamente expresada en tejido testicular, adrenal y prostático[9]. A este grupo farmacológico pertenece la abiraterona, un derivado esteroidal de la progesterona, inhibe la conversión de 17α-hidroxipregnelonona a dehidroepiandrosterona (DHEA)[40]. Similar a la abiraterona, el ketoconazol puede llegar a inhibir el CYP17A1 pero de manera inespecífica y muy débil. Además, el ketoconazol inhibe también la conversión de colesterol en pregnenolona, actividad realizada por la enzima CYP11A1[40].

En ratones, ratas, monos y humanos, existen dos isoenzimas principales de la 5α reductasa, enzima necesaria para la conversión de testosterona a dihidrotestosterona (DHT)[20]. En humanos la 5α reductasa tipo I se encuentra predominantemente en glándulas sebáceas, piel, cuero cabelludo e hígado y es responsable de la producción de un tercio de la DHT total, mientras la 5α reductasa tipo II se encuentra en próstata, vesícula seminal, epidídimo, folículos pilosos así como también en hígado, y es responsable de la producción de dos tercios de la DHT circulante. La conversión de testosterona a DHT es inhibida por finasteride y dutasteride dos fármacos indicados en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna. Finasteride es capaz de inhibir la 5α reductasa tipo II mientras dutasteride inhibe las isoenzimas I y II[40].

Otro grupo de agentes farmacológicos es el de los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina. Su principal representante, el acetato de leuprolide (Leuprorelina), es un nona-

péptido sintético análogo de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que ejerce una inhibición reversible y potente de la secreción de gonadotropina, llegando a la supresión de la esteroidogénesis testicular y ovárica. Su administración inicial tiene como resultado un aumento de la hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), que conduce a un aumento transitorio de los esteroides gonadales, sin embargo, su administración continua resulta en la reducción de los niveles de LH y FSH[41]. En los hombres tratados con agonistas de la GnRH, se observa que andrógenos séricos residuales son sintetizados por las glándulas suprarrenales. Además, la evidencia sugiere que en el tratamiento se presenta síntesis intratumoral de andrógenos. Tanto los andrógenos producidos por la glándula suprarrenal como los producidos intratumoralmente pueden ser inhibidos por ketoconazol y abiraterona[9].

Actualmente se investigan nuevos enfoques farmacológicos para bloquear la actividad del receptor de andrógenos (AR). Es bien sabido que AR se une a proteínas de choque térmico que previenen su degradación, y moléculas como tanespimicina y geldanamicina evitan la unión del receptor con la proteína de choque térmico HSP90 facilitando la degradación y disminución de los niveles de AR. Por otra parte, en cáncer de próstata se ha visto que la activación de receptores tirosina kinasa en particular HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano), pueden activar el receptor de andrógenos. Las proteínas Ack1 y SRC, activadas por HER2 se encuentra implicadas en la fosforilación del receptor de andrógenos sobre residuos de tirosina, además las vías de señalización de AKT y MAPK también se encuentran implicadas[38]. Por esta razón, anticuerpos monoclonales como trastuzumab y pertuzumab, así como inhibidores de tirosina quinasa como erlotinib y lapatinib que tienen como blanco molecular el receptor HER2 están siendo evaluados para utilizarlos en la terapia del cáncer de próstata. Otros inhibidores de kinasas como dasatinib bloquean la tirosina quinasa *Src* y también

podrían ser usados en el tratamiento de la enfermedad. Finalmente, los cofactores epigenéticos que activan el receptor AR tras su localización al núcleo incluyen histonas deacetilasas, que modifican la estructura de la cromatina y son esenciales para el reclutamiento de RNA polimerasa II y el inicio de la transcripción. Inhibidores de las histonas deacetilasas pueden llegar a bloquear este proceso y evitar la activación de genes relacionados con crecimiento y diferenciación celular[9].

Teniendo en cuenta la historia natural de la enfermedad, la guía de práctica clínica de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO), recomienda que el diagnóstico de cáncer de próstata debe comenzar con la implementación del tacto rectal y antígeno prostático en combinación, con el objetivo de evitar el diagnóstico tardío de la enfermedad. La decisión de realizar una biopsia debe estar soportada en los hallazgos del tacto rectal, tamaño de la próstata, la etnia, la edad, comorbilidades, antecedentes familiares y la historia clínica[42].

Una vez diagnosticado, los pacientes pueden ser clasificados como de bajo riesgo en caso de que el tumor no sea palpable y se encuentre confinado a la próstata, en cuyo caso no se recomienda ningún tratamiento y se debe discutir la posibilidad de mantener únicamente en observación puesto que el riesgo de muerte es mínimo y los tratamientos actuales no muestran ningún beneficio. En caso de que los pacientes se encuentren diagnosticados como riesgo intermedio en donde el tumor es palpable pero aún no ha salido de la próstata, los tratamientos recomendados incluyen prostatectomía radical y radioterapia, más terapia de privación androgénica. En pacientes con cáncer de próstata de alto riesgo, en donde el cáncer ha invadido estructuras adyacentes como la vesícula seminal, los nódulos linfáticos o ha hecho metástasis a hueso, se recomienda radioterapia más tratamiento hormonal durante al menos

dos años u orquidectomía radical bilateral, mientras que la prostatectomía y la linfadectomía deben ser consideradas en casos selectos[42].

Los pacientes que desarrollan cáncer de próstata resistente a castración (CRPC), deben continuar la supresión androgénica pero cambiando los fármacos utilizados inicialmente. Sin embargo, la quimioterapia con docetaxel podría ser preferible en los pacientes con mala respuesta hormonal inicial o síntomas graves[42].

3.5 Resistencia a la Terapia de Privación Androgénica

La reactivación del receptor de andrógenos es un mecanismo clave en el desarrollo de CRPC[4]. Los mecanismos de reactivación incluyen amplificación o sobreexpresión genética, mutaciones somáticas, modificaciones epigenéticas aberrantes sobre el receptor, expresión de variantes de splicing alternativo, perturbación de cofactores de unión a AR y esteroidogénesis intratumoral. El CRPC se caracteriza por resistencia a terapia hormonal y cirugía, niveles bajos de testosterona similares a castración, aumento de los niveles de antígeno prostático y metástasis principalmente a tejido óseo[23].

Algunos estudios muestran que las mutaciones somáticas sobre el receptor de andrógenos son más comunes en pacientes metastásicos que en pacientes con cáncer de próstata primario, sugiriendo un potencial mecanismo en el desarrollo de CRPC. Un polimorfismo común, T877A, localizado en el dominio de unión a ligando (LBD), cambia el mecanismo de acción de la flutamida desde un antagonismo hasta un agonismo del AR, produciendo el efecto contrario al deseado[23]. Además, existen otras mutaciones relacionadas con el uso de antagonistas del receptor de andrógenos, por ejemplo la mutación V716M, localizada en el LBD genera un

receptor promiscuo que es activado por estrógenos, cortisol y otros andrógenos. La mutación W435L localizada en el dominio de translocación al núcleo y observada tanto en pacientes en tratamiento con flutamida como con bicalutamida genera una transactivación aumentada con respecto al receptor silvestre mientras que la mutación E255K localizada en este mismo dominio además de favorecer su translocación, inhibe la degradación del receptor[21]. Como se puede observar los polimorfismos son un potente mecanismo de resistencia al tratamiento.

Otro mecanismo de resistencia descrito es el de las variantes de maduración alternativa (*splicing*) [21]. La variante ARV-7 detectada en líneas de cáncer resistente a castración carece del dominio de LBD, generando receptor AR constitutivamente activo, y una respuesta independiente de la estimulación androgénica[43].

Otro mecanismo sería mediado por factores de crecimiento y citoquinas extracelulares, que pueden promover la actividad del receptor AR. Estos factores estimulan receptores tirosina kinasa y receptores acoplados a proteínas G, activando cascadas quinasas como MAPK y AKT quienes a su vez activarían el receptor incluso con niveles bajos de andrógenos. Esta activación se asocia a la unión de coactivadores así como a modificaciones aberrantes sobre el receptor que incluyen fosforilación, acetilaciones, metilaciones y sumoilaciones[38].

En cáncer de próstata así como en muchos otros tumores sólidos existe una evidente glicólisis anaerobia a pesar de la presencia de oxígeno, efecto conocido como Warburg. En células resistentes, a diferencia de aquellas sensibles a la terapia hormonal, se observa un aumento en la actividad de lactato deshidrogenasa, enzima responsable de la producción de lactato durante la glicólisis, así como una sobreexpresión del transportador MCT1 responsable de la salida de lactato de la célula. Tanto el transportador como el lactato han sido asociados a mal pronóstico, aumento de la movilidad, angiogénesis y metástasis[44]. No sólo el metabolismo de

los carbohidratos ha sido implicado: el metabolismo lipídico también se ha visto involucrado con el desarrollo de la enfermedad. En células de cáncer de próstata se ha observado que el alto consumo de glucosa y su ingreso al ciclo de Krebs lleva a una alta producción de acetilCoA que a su vez es convertido a malonilCoA y promueve la síntesis de ácidos grasos como mecanismo de almacenamiento de energía. Por otra parte, el acetilCoA al ser convertido a mevalonato promueve la síntesis de colesterol y posteriormente la síntesis de andrógenos[19, 45]. En células resistentes a castración se ha observado el fenómeno de esteroidogénesis por una vía alternativa. Como se mencionó previamente, a través de la vía clásica el colesterol es convertido a pregnelonona y tras una serie de cinco pasos se llega a dihidrotestosterona (DHT); en células CRPC, la pregnelonona es convertida a progesterona para luego producir dihidrotestosterona por una vía completamente diferente; la CYP17A1 juega un papel clave en los pasos iniciales de ambas vías, razón por la cual abiraterona se dirige a bloquearla[18].

3.6 Ratas para el Estudio de la Próstata

En contraste con la próstata humana, la glándula de los roedores es rudimentaria al momento del nacimiento y se desarrolla en gran medida dentro de los primeros 15 días de vida. Al nacer, los lóbulos ventral y dorsal consisten principalmente en conductos sólidos, que posteriormente dan lugar al órgano prostático. Durante los primeros 15 días ocurre una fuerte proliferación de células epiteliales en los conductos distales y posteriormente se desarrollan ramificaciones secundarias y terciarias que llevan a diferenciar los lóbulos ventral y dorsal. La diferenciación de células epiteliales y del mesénquima se coordina con la ramificación de los

conductos prostáticos y se produce en dirección proximal a distal. La diferenciación de células madre progenitoras en células basales y luminales produce alteraciones en la expresión del receptor de andrógenos y citoqueratinas durante el proceso de desarrollo, este hecho mantendrá la próstata funcional a lo largo de la vida. La morfogénesis de todo el complejo se termina entre los días postnatales 15 y 30. El crecimiento y la maduración final ocurren en la pubertad, es decir, entre los días 24 y 40, momento en el que los niveles circulantes de andrógenos aumentan considerablemente[46].

En las ratas la pubertad llega con un aumento en los niveles de hormona luteinizante (LH) y una elevación de los niveles de testosterona, además de la activación de una compleja red neuronal en el hipotálamo que lleva a la producción de Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), esencial para la maduración sexual y el normal funcionamiento del eje Hipotálamo–Hipófisis–Gónadas. El desarrollo sexual en las ratas se puede dividir en 4 etapas: un periodo neonatal que compromete la primera semana de vida extrauterina, un periodo infantil que se extiende desde el día 8 al 21, un periodo juvenil que finaliza el día 35 y un periodo peripubertal que finaliza hacia los días 55 – 60 en donde se tienen niveles hormonales completos y un esperma maduro en las vías eferentes[47].

En ratas, la Hormona folículo estimulante (FSH) se une a las células de sertoli dentro de los túbulos seminíferos para promover la espermatogénesis. La hormona luteinizante (LH) estimula la secreción de testosterona, actúa directamente sobre las células de Leydig estimulando su secreción. La testosterona es el andrógeno más importante producido por las gónadas en los machos, ya que desempeña un papel crucial en la espermatogénesis, el mantenimiento de los órganos sexuales y el comportamiento sexual. Esta hormona ejerce retroalimentación negativa sobre el eje hipotalámico–hipofisario durante toda la vida. Todo este sistema de control hormonal es similar al de los humanos expuestos anteriormente[47].

La próstata de las ratas se divide en 4 lóbulos llamados ventral, dorsal, lateral y anterior. El lóbulo dorsal y lateral generalmente se agrupan como lóbulo dorsolateral. La próstata rodea la uretra y se encuentra por debajo de la vejiga urinaria encapsulada en una fina capa de tejido conectivo. El estroma que rodea cada uno de los lóbulos se encuentra formado principalmente por fibras de colágeno y tejido nervioso. Los diferentes lóbulos tienen diferentes características histológicas. El lóbulo ventral es una estructura en forma de hoja que rodea de forma incompleta la parte dorsal de la uretra, se encuentra rodeado por una fina capa de estroma y se compone de epitelio cilíndrico. El lóbulo ventral está compuesto por células epiteliales columnares, con núcleos situados basalmente que contienen pequeños nucléolos. No existe un homologo al lóbulo ventral en los humanos[26].

El lóbulo dorsal se encuentra rodeado por un estroma muy denso, que se compone de células epiteliales columnares con citoplasma granular basófilo y núcleos situados en el centro. El lóbulo lateral se asemeja al lóbulo dorsal y está compuesto por una superficie luminal plana de células epiteliales. Las secreciones granulares y eosinofílicas son principal característica. El lóbulo dorsolateral es el que muestra una mayor homología a la región periférica de la próstata humana. La próstata anterior, también conocida como la glándula de coagulación, se encuentra adyacente a las vesículas seminales, está revestida por epitelio cilíndrico simple con un patrón papilar y cribiforme. La próstata anterior es homologa a la región central de la próstata humana[26].

Aunque no existe evidencia para afirmar que los roedores desarrollan espontáneamente cáncer de próstata, se han desarrollado múltiples modelos de ratas con cáncer de próstata por la inducción con xenobióticos. La próstata de los animales tiene la capacidad y el potencial para presentar características similares con la enfermedad humana, lesiones pre-neoplásicas o características de metástasis. El lóbulo dorsolateral es el lugar donde generalmente se

detectan los cambios neoplásicos debido a su homología con la región periférica de la próstata humana[48].

Múltiples estudios sobre la próstata han sido desarrollados utilizando ratas como modelo animal debido a su similitud estructural y fisiológica con el ser humano[49, 50]. Existe evidencia de la actividad de inhibidores de 5α-reductasa como dutasteride[50] o agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina como leuprolide (leuprorelina)[51], utilizando las ratas para comprobar su actividad farmacológica. Siendo así, las ratas constituyen un modelo animal adecuado para el estudio de la próstata y los resultados obtenidos sirven como indicativos de lo que sucede con este órgano en los seres humanos.

En ratas sanas, es todavía motivo de discusión si existen diferencias entre los niveles de testosterona sérica total relacionados con la edad. Según Wu y col (2010) los niveles de testosterona total en ratas sanas varían entre 1 y 10 ng/ml en la juventud y entre 0,5 y 6 ng/ml en la edad media, una diferencia no significativa estadísticamente, pero también existe literatura que indica una disminución mucho más drástica. Ha sido difícil llegar a un consenso debido a que los niveles de testosterona varían según la cepa de las ratas, la hora del día y el comportamiento sexual[52]. Por otra parte, a nivel central la expresión del receptor de andrógenos hipotalámico parece no variar con la edad, mientras que someter ratas sanas a castración disminuye la expresión del receptor de andrógenos en el hipotálamo, el administrar testosterona exógena puede restaurar su función[52].

4. Materiales y Métodos

4.1 Materiales

4.1.1. Material Biológico

Ratas Wistar macho sanas con edad promedio de 6 meses al inicio de los tratamientos. Los animales fueron obtenidos y manipulados en el bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

4.1.2. Reactivos y Fármacos

- Leoprostin®: Leuprolide (Leuprorelina) polvo de liberación modificada para reconstituir (3,75mg/vial), fue una donación de laboratorios Chalver Farmacéutica (Bogotá, Colombia).
- Ketamina 50®: Solución inyectable de Ketamina 50mg/mL, disponible en el mercado, fabricada por laboratorios Gabrica (Bogotá, Colombia).
- Seton 2%®: Solución inyectable de Xilacina 20mg/mL disponible en el mercado, fabricada por laboratorios Calier de los Andes S.A. (Bogotá, Colombia)
- Anafen 10%®: Solución inyectable de Ketoprofeno 10mg/mL disponible en el mercado, fabricada por laboratorios Carval de Colombia (Bogotá, Colombia).
- Euthanex®: Solución inyectable pentobarbital sódico 390mg/mL y difenilhidantoína 50mg/mL, disponible en el mercado, fabricado por laboratorios Invet (Bogotá, Colombia).
- Testosterone ELISA Kit®: inmunoensayo ELISA competitivo catálogo Nº ab108666, disponible en el mercado y fabricado por Abcam (Cambridge, Inglaterra).

- Rat PSA ELISA kit®: inmunoensayo ELISA sandwich, catálogo Nº R6648, fabricado por TSZ ELISA (Waltham, USA).

4.1.3 Equipos

- TRIAD Series Multimode Detector®: Espectrofotómetro fabricado por Dynex Technologies, disponible en el laboratorio de ingeniería de tejidos, Depto. de Farmacia.
- Balanza Mecánica: Referencia 750-SO, Balanza de triple brazo marca Ohaus disponible en el bioterio de farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.
- Balanza Analítica: Referencia PA214, fabricada por Ohaus disponible en el bioterio de farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

4.1.3 Otros

- Lab Diet®: Rodentina, alimento para ratas disponible en el bioterio de Farmacia.
- Vycril®: Sutura estéril reabsorbibles calibre seis ceros disponible en el mercado y fabricadas por laboratorios Johnson y Johnson.
- Silkam®: Sutura estéril no reabsorbibles calibre cinco ceros disponible en el mercado y fabricadas por laboratorios Braun.
- Isodine Solución®: Solución de Yodopovidona 10%, disponible en el mercado y fabricada por laboratorios boehringer ingelheim.
- Alcohol Antiséptico: Solución de alcohol etílico al 70% disponible en el mercado y fabricada por laboratorios MK

4.2 Métodos

Primero que todo es importante señalar que los métodos y protocolos de manipulación de animales del presente proyecto contaron con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad

de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, según consta en acta del día 22 de Junio de 2015 (Acta 06-2015) y en la comunicación escrita de fecha 2 de julio de 2015.

En el entrenamiento en todos los protocolos experimentales (técnica quirúrgica, de aplicación del medicamento, y de extracción de sangre) se emplearon tres ratas y fue llevado a cabo antes del inicio de los experimentos.

4.2.1 Grupos Experimentales.

Las ratas Wistar de 6 meses de edad fueron mantenidas en cajas con una ocupación máxima de 5 ratas por caja, con agua y alimento Lab Diet® a libre albedrío, y con periodos de luz y oscuridad de 12 horas.

Los animales fueron agrupados es tres grupos:

- Grupo 1 (18 animales): Grupo de animales control sin tratamiento.
- Grupo 2 (12 animales): Privación androgénica inducida con leuprolide (Leoprostin®).
- Grupo 3 (12 animales): Privación androgénica inducida por gonadectomía.

Los animales del grupo 1 (control) sólo recibieron inyecciones con solución salina estéril por vía subcutánea. Los animales del grupo 2 recibieron tratamiento farmacológico con Leuprolide, como se describe más adelante. Los animales de grupo 3 fueron sometidos a gonadectomía desde el tiempo cero del estudio según se describe más adelante. En lo posterior, estos animales del grupo 3 sólo recibieron solución salina estéril por vía subcutánea.

La Tabla 1 resume la distribución de animales por grupo y los tiempos estudiados.

Tabla 1. Grupos Experimentales

	0 Semanas	**10 Semanas**	**20 Semanas**	***Total Ratas por Grupo***
Grupo 1: Control	6	6	6	18
Grupo 2: Leuprolide	0	6	6	12
Grupo 3: Gonadectomía	0	6	6	12
Total Ratas Sacrificadas por Tiempo	6	18	18	**42**

El tiempo cero fue considerado en el momento en el que la totalidad de las ratas se encontraban sometidas a castración. A tiempo 0 fueron sacrificadas 6 ratas del grupo control con el fin de evaluar histopatología, niveles de antígeno prostático, niveles séricos de testosterona total e índice próstato-somático. Este grupo tuvo por objetivo conocer las características basales de todos los parámetros evaluados en el trabajo. En el tiempo 10 y 20 semanas fueron sacrificadas 6 ratas de cada grupo con el fin de evaluar los mismos parámetros (Tabla 1).

4.2.2 Tratamiento Farmacológico con Leuprolide

Se realizó la aplicación vía subcutánea de leuprolide (Leoprostin®) con una fórmula de liberación modificada para aplicación mensual. El cálculo de la dosis tuvo en cuenta el peso de la rata y como factor de conversión se utilizó la dosis estándar aprobada para humanos en donde una cantidad de 7,5mg de leuprolide de liberación modificada mensual se utiliza en una persona de 70 Kg de peso[41], por lo tanto la dosis mensual utilizada en las ratas fue de 0,1 mg/Kg.

Para la aplicación del fármaco la rata fue puesta en posición inversa y exponiendo su abdomen se realizó un pliegue sobre su piel en donde fue inyectado el fármaco, técnica que garantiza la administración subcutánea en una zona de alta irrigación para la adecuada distribución del principio activo.

4.2.3 Gonadectomía

La gonadectomía fue llevada a cabo según las guías establecidas por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico[53, 54]. Se realizó utilizando como anestésico intraperitoneal ketamina (75mg/Kg) más xilacina (10mg/Kg). Una vez terminada la cirugía se administró ketoprofeno (5mg/Kg) por vía subcutánea como analgésico. Para la cirugía se utilizó para el tejido interno suturas reabsorbibles punta cortante de calibre seis ceros (Vycril®); para el tejido externo se utilizó sutura no reabsorbible, punta cortante calibre cinco ceros (Silkam®). Para la curación de los animales se lavó diariamente la sutura con yodo povidona al 10% y alcohol antiséptico hasta total cicatrización.

4.2.4 Eutanasia, Necropsia y Extracción de Sangre

El procedimiento de eutanasia se llevó a cabo con Euthanex®, inyectado vía intraperitoneal a una dosis de 0,2mL/Kg, este proceso tiene una duración aproximada de 5 minutos, tiempo en el cual no hay sufrimiento para el animal.

Posteriormente se realizó el procedimiento de necropsia, con un corte de la piel de tipo vertical desde el pene hasta el esternón y un corte rectangular desde las costillas hasta los miembros inferiores del animal, evitando cortar venas o arterias principales que pudieran

generar un sangrado y complicar de este modo la identificación de la próstata; dicho corte rectangular facilita la identificación y extracción del órgano de interés. Inmediatamente después, se realizó un corte longitudinal del esternón, abriendo la cavidad torácica y permitiendo la visualización directa del corazón. Mediante punción cardiaca se obtuvo un volumen aproximado de 4ml de sangre en tubo tapa amarilla especial para la extracción de suero, que inmediatamente fue llevado a refrigeración de 2-8 °C. Posteriormente la sangre fue centrifugada, se extrajo el suero sobrenadante y cada muestra fue dividida en una porción de suero destinada a la cuantificación de testosterona y otra destinada a la cuantificación de antígeno prostático. Finalmente, el suero fue almacenado a una temperatura de -80°C.

La próstata fue identificada por su posición anatómica y características macroscópicas. Se extrajo la totalidad del tejido prostático, se pesó y se deposito en formaldehido para su fijación y posterior análisis histopatológico.

4.2.5 Análisis Histopatológico

La próstata de los animales fue sometida a análisis anatomopatológico, para lo cual las muestras fueron fijadas en formaldehído. Los tejidos se procesaron por la técnica de rutina del Laboratorio de Histopatología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia descrita por Luna en 1968[55], y utilizando tinción hematoxilina-eosina.

Los análisis histopatológicos fueron contratados con la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. En general, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1. Documentación de la histología de la próstata de los roedores teniendo en cuenta los cambios anatómicos según el estadio de maduración del animal.
2. Documentación de las lesiones observadas en los componentes celulares y no celulares del tejido prostático.
3. Evaluación microscópica:
    a) Evaluación de la arquitectura general del tejido a fin de determinar el segmento específico de próstata remitido, estadio de maduración prostática y su correlación con la edad del animal y la identificación de alteraciones estructurales del tejido.
    b) Evaluación del componente de células epiteliales luminales
    c) Evaluación del componente de células basales
    d) Evaluación de la membrana basal
    e) Evaluación del estroma de tejido conectivo

4. Segunda opinión de patólogo experto

Los resultados obtenidos por un análisis histológico son totalmente cualitativos, por tal razón se decidió asignar un valor numérico de acuerdo a la severidad de la característica observada por el patólogo experto, siendo 3 una característica leve, 6 una característica moderada y 9 una característica severa. Se le asignó un valor 0 o nulo a las características no mencionadas durante el análisis, esto con el fin de facilitar el análisis estadístico de la información.

4.3 Índice Prostato-somático

Con el objetivo de verificar la eficacia de la terapia de privación androgénica, justo antes de cada uno de los sacrificios en 0, 10 y 20 semanas se registró el peso de los animales y el peso de cada una de las próstatas tras su extracción. Se define el índice prostato-somático como:

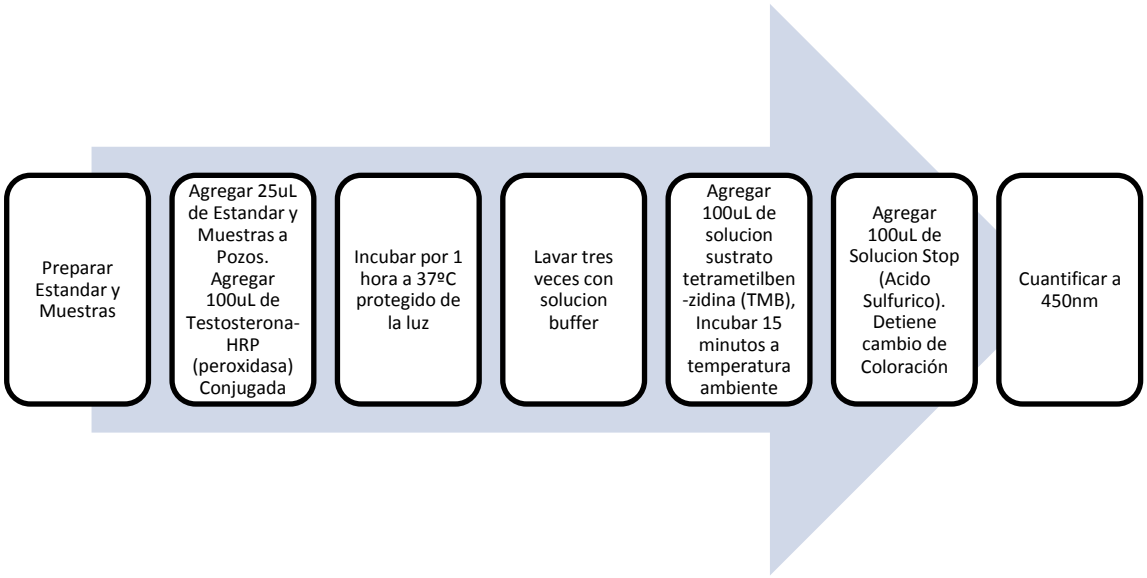
$$Indice\ Organo\ Somatico = \frac{Peso\ Próstata}{Peso\ Animal}\ x\ 100$$

Siendo así, el índice prostato-somático nos permite relacionar el peso del animal con el tamaño de su próstata y corregir las posibles diferencias que se generen en los resultados debido al crecimiento del animal.

4.4 Cuantificación de los Niveles de Testosterona Sérica

Con el fin de medir los niveles séricos de testosterona total en ratas, se utilizó un inmunoensayo ELISA competitivo utilizando el Kit Testosterone ELISA fabricado por *Abcam*[56]. Se siguieron las instrucciones del fabricante, que se resumen en el diagrama de la Figura 8.

Figura 8. Procedimiento Cuantificación Testosterona Sérica.



Se muestra el diagrama del protocolo experimental

La totalidad de las muestras fueron evaluadas por duplicado y sin diluir. El método de cuantificación se basa en que un anticuerpo contra testosterona fijo en una fase solida

interacciona con la hormona presente en las muestra o en el estándar. Posteriormente se agrega testosterona marcada con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) que compite con la testosterona de las muestras por la unión con los anticuerpos en fase sólida. Después de lavar y remover la testosterona no unida a la placa, se agrega el sustrato de la peroxidasa, la tetrametilbenzidina (TMB) que tras su oxidación genera una solución color azul que cambia su intensidad según la cantidad de testosterona presente en cada pozo, en este caso a mayor concentración de testosterona proveniente de las muestras estándares menor será la intensidad del color y por lo tanto menor será la absorbancia registrada. Finalmente, se agrega una solución de parada conteniendo ácido sulfúrico, que detiene la reacción enzimática y cambia el color de la solución desde azul hasta amarillo. Se determina la absorbancia a 450nm y la concentración de testosterona puede ser calculada a partir de la curva estándar, que se construye a partir de soluciones patrón o de concentración estándar que vienen con el kit[56], y que se indican en la tabla 2.

Tabla 2. Estándares para la Cuantificación de Testosterona Sérica

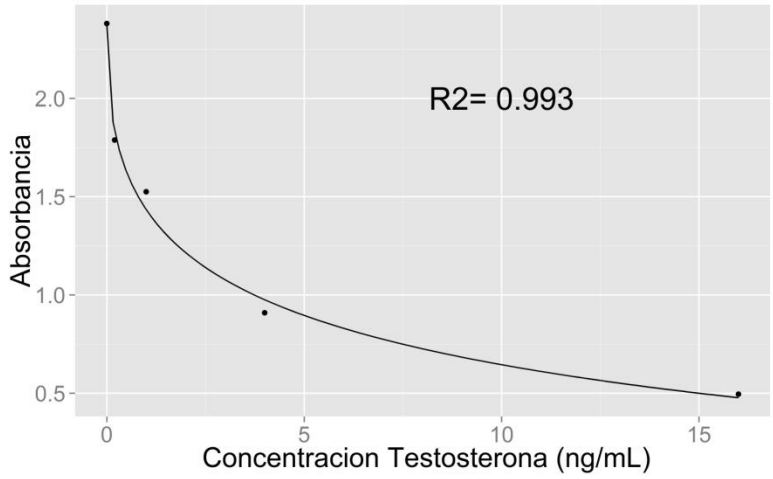
Numero Estándar	Concentración Testosterona (ng/mL)
1	0,0
2	0,2
3	1,0
4	4,0
5	16,0

Los datos experimentales de absorbancia obtenidos a partir de las soluciones patrón fueron graficados y ajustados por el método de mínimos cuadrados a la ecuación logística de 4 parámetros:

$$F(x) = \left(\frac{A - D}{1 + (x/C)^B}\right) + D$$

La curva estándar obtenida (Figura 9), nos permitió determinar la concentración de testosterona en suero de los animales evaluados.

Figura 9. Curva Estándar para la Cuantificación de Testosterona.

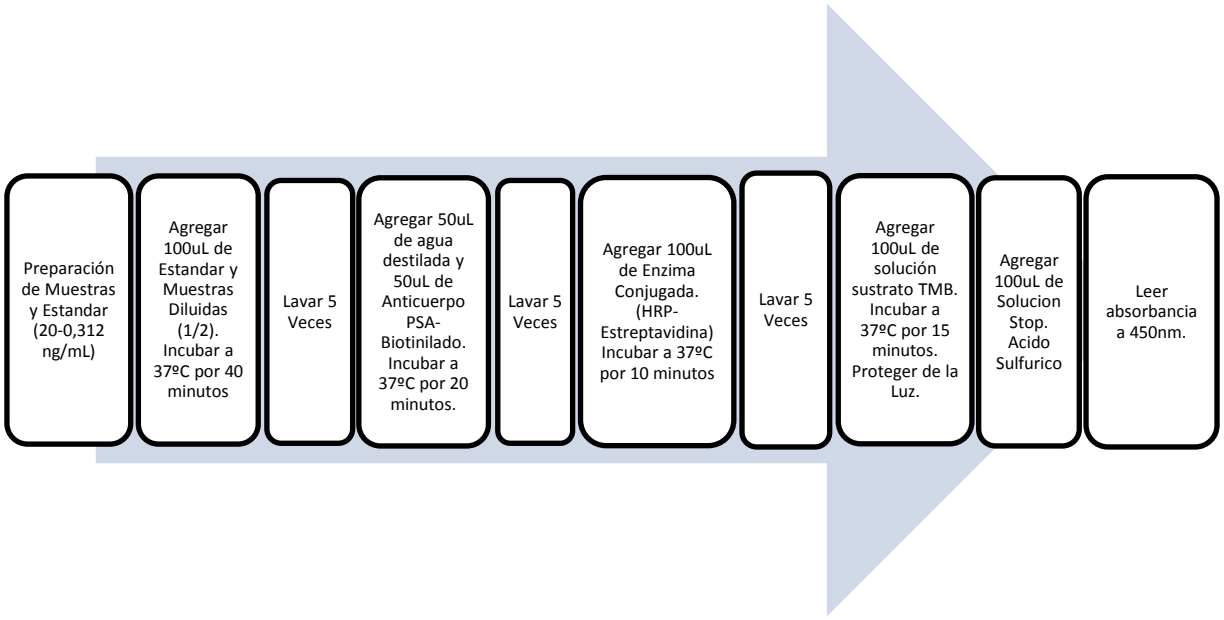


La construcción de la curva de calibración se realizó utilizando R Project 2015[62]*, así se obtuvo un* R^2 *de 0,993. Para la ecuación logística de 4 parámetros se llegó a determinar las siguientes variables* A= 2,374; B=0,445; C=7,566; D=-0,882.

4.5 Cuantificación de Niveles de Antígeno Prostático Específico

La cuantificación del antígeno prostático específico se llevó a cabo por medio de un inmunoensayo ELISA utilizando el Kit *Rat Prostate Specific Antigen (PSA)* fabricado por TSZ[57]. Se siguieron las instrucciones del fabricante que se resumen en el diagrama de la Figura 10.

Figura 10. Procedimiento Cuantificación de Antígeno Prostático Sérico



Se muestra el diagrama del protocolo experimental.

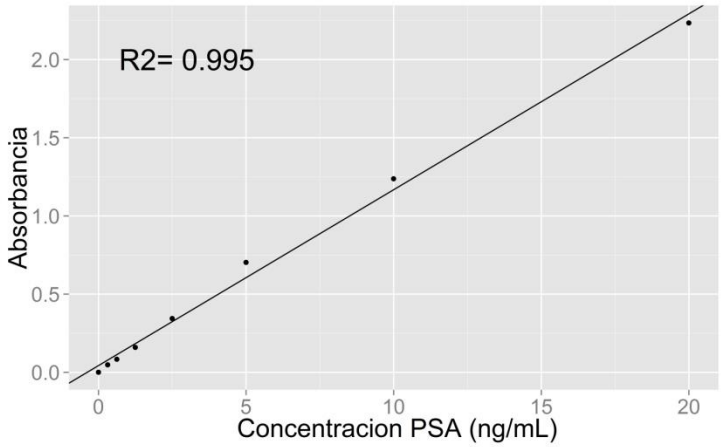
Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado y diluidas 2 veces para garantizar una lectura adecuada, según recomendación del fabricante. El método de cuantificación se basa en el uso de un ensayo de ELISA con doble anticuerpo (ELISA tipo sándwich). Los pozos vienen previamente preparados con anticuerpos anti-PSA de rata fijados en su superficie. Luego se agrega las muestras o los estándares, y el PSA en estas muestras (estándares) forma complejos con el anticuerpo que está en fase sólida. Posteriormente se agrega un anticuerpo anti-PSA biotinilado, que se une al complejo formado anteriormente formando una estructura en forma de sándwich. Después de la formación del sándwich se agrega estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa de rábano (HRP). La estreptavidina tiene una elevada afinidad por la biotina, razón por la cual se va a producir su unión al complejo antígeno-anticuerpo. Luego de lavar y remover todos los anticuerpos no unidos a la placa, se agrega el sustrato de la

peroxidasa (tetrametilbenzidina o TMB) que tras su oxidación genera una solución color azul. A mayor concentración de PSA, mayor será la intensidad del color y por lo tanto mayor será la absorbancia registrada. Finalmente se agrega una solución conteniendo ácido sulfúrico que frena la reacción enzimática y cambia el color de la solución desde azul hasta amarillo. Se determina la absorbancia a 450nm y la concentración de PSA puede ser calculada a partir de la curva estándar[57]. Las concentraciones de los estándares que vienen con el kit se muestran a continuación en la Tabla 3, y la curva estándar obtenida con nuestros datos se muestra en la Figura 11. A partir de dicha curva se calcularon las concentraciones de PSA en los animales evaluados.

Tabla 3. Estándares para la Cuantificación de Antígeno Prostático (PSA)

Numero Estándar	Concentración PSA (ng/mL)
1	20,0
2	10,0
3	5,0
4	2,5
5	1,25
6	0,625
7	0,312
8	0,0

Figura 11. Curva Estándar para la Cuantificación de Antígeno Prostático.



La construcción de la curva de calibración se realizó utilizando R Project 2015[62], logrando obtener una ecuación lineal (ver grafica) con un R^2 de 0,995. La variable X fue despejada de la ecuación lineal y = 0,1125x + 0,0429 para luego calcular la concentración de testosterona de cada una de las muestras, resultados que se muestran en la tabla 8.

4.6 Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos, así como las gráficas, se realizaron utilizando el software R Project 2015[58].

El análisis estadístico de los datos cuantitativos obtenidos del índice prostato-somático, la cuantificación de testosterona y la cuantificación de antígeno prostático específico fueron analizados mediante cuatro pruebas: En primer lugar se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el objetivo de evaluar la influencia de los tratamientos en la variable respuesta, prueba que responde a la pregunta ¿alguno de los tratamientos influyó en la respuesta?. Posteriormente se realizó un análisis de regresión para definir el tipo de influencia que tiene cada uno de los tratamientos mediante una prueba *t* aplicada a cada uno de los parámetros de la regresión, prueba que responde a las preguntas ¿Cuál de los tratamientos tuvo mayor influencia? y ¿El tratamiento lleva a un aumento o disminución de la variable respuesta?[59].

Luego se compararon las magnitudes de los efectos de los tratamientos mediante una prueba de diferencia de medias para dos muestras, el test de Welch, prueba que responde a la pregunta ¿Existen diferencias entre los efectos de los tratamientos?[59]. Y finalmente, se utilizó una factorial 2x3 (2 tiempos x 3 grupos experimentales) para comparar el tiempo 10 semanas contra el tiempo 20 semanas para cada uno de los grupos. Se realizaron correlaciones entre las variables utilizando el test de Spearman[60].

Los resultados cuantitativos se presentan en tablas y diagramas de cajas y bigotes. En el diagrama de cajas y bigotes se observa la distribución/forma de la muestra obtenida para el estudio de este fenómeno. El límite inferior de cada una de las cajas representa el cuartil número 1 mientras el límite superior representa el cuartil número 3; siendo así, las cajas representan la distribución del 50% de los datos. La línea horizontal representa la mediana, medida robusta con respecto al promedio. La resta del cuartil 3 y el cuartil 1 se conoce como rango intercuartilico. Los bigotes representan el espacio de 1,5 veces el rango intercuartilico (IQR) o en su defecto los valores máximos y mínimos en caso de ser menores al IQR (ver apartado de Resultados)

Los resultados cualitativos fueron filtrados según su frecuencia, seleccionando aquellas características presentes en más del 10% de la población. Posteriormente se calcularon las frecuencias y severidades de las variables respuesta para cada grupo y se analizaron los datos mediante una extensión de la prueba exacta de Fisher para tablas de contingencia. Esta prueba responde a las preguntas: ¿Existe evidencia para afirmar que los tratamientos influyen estadísticamente sobre la severidad de los hallazgos histológicos? y ¿Existe evidencia para afirmar que el tiempo influye en la severidad de los hallazgos histológicos?[61] Para cuantificar la

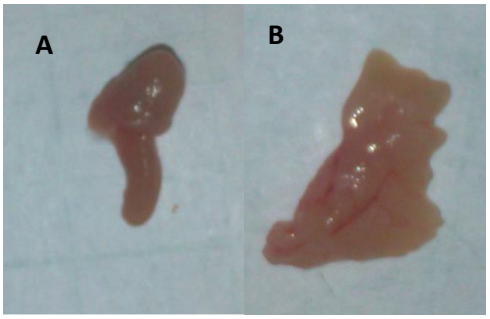
influencia de los tratamientos y el tiempo sobre la severidad del hallazgo histológico se utilizó el coeficiente de contingencia V-cramer que es una medida de relación estadística[62].

5. Resultados

5.1 Modelo de Privación Androgénica

Con el fin de lograr la privación androgénica con los animales de estudio, los animales fueron sometidos a gonadectomía o a tratamiento farmacológico con leuprolide. La Figura 12 muestra un ejemplo representativo del efecto que produce la privación androgénica, en este caso particular con gonadectomía o leuprolide, sobre el tamaño de la glándula prostática.

Figura 12. Influencia de la privación androgénica sobre el tamaño de la próstata.



Se compara una próstata de una rata sometida a privación androgénica (A) y el tamaño del órgano de una rata del grupo control (B).

Claramente, la privación androgénica produce una disminución en el tamaño del órgano prostático, y esto es válido independiente del procedimiento empleado para lograr dicha privación hormonal (gonadectomía o tratamiento con leuprolide).

5.1.1 Índice Prostato-somático

Con el objetivo de verificar de manera indirecta la privación androgénica inducida experimentalmente, se calculó el índice Prostato-somático. La Tabla 4 resume los valores promedios observados para este índice en los diferentes grupos experimentales. Estos datos se representan de manera gráfica en la Figura 13, y es lo que se describirá a continuación.

Tabla 4. Índice Prostato- somático

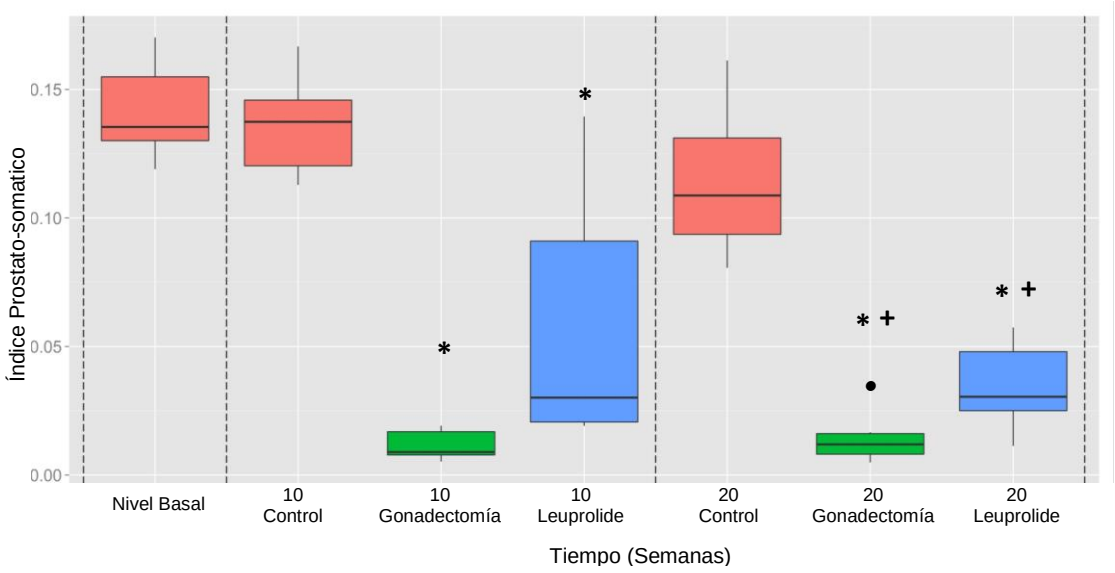
Grupo	Tiempo Cero	Tiempo 10 Semanas	Tiempo 20 Semanas
Control	0,142±0,019	0,136±0,020	0,114±0,030
Leuprolide	ND	0,058±0,053	0,034±0,018
Gonadectomía	ND	0,012±0,006	0,015±0,011

Se muestra el promedio y la desviación estándar (n=6). ND= No Determinado. (Ver Anexos A-1 y A-2 para los datos experimentales y estadísticos de las medidas realizadas)

En el grupo control, el índice órgano-somático disminuye en un 20% con el paso del tiempo entre 0 y 20 semanas, sin ser una diferencia significativa (Figura 13). En la semana 10 ambos tratamientos mostraron una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (p_L=0,0008 ; p_G=0,00009, donde p_L y p_G se refieren a la estadística para el tratamiento con leuprolide o gonadectomía, respectivamente) (Figura 13). En la semana 20 de tratamiento, se mantuvo un comportamiento similar, y la privación androgénica generó una diferencia significativa con respecto al control en ambos grupos (p_L=0,00001 ; p_G=0,000001) (Figura 13). Al comparar los tratamientos (gonadectomía versus leuprolide) no se observaron diferencias significativas en la semana 10 (p_{10}=0,08407), pero si se observa una diferencia estadísticamente significativa en la semana 20 (p_{20}=0,0483), siendo mayores los índices prostato-somáticos obtenidos en el grupo leuprolide.

Al comparar el índice prostato-somático en función del tiempo, no se observan diferencias significativas entre las 10 y las 20 semanas para el grupo gonadectomía (p=0,277) y tampoco se observan diferencias significativas entre las 10 y las 20 semanas para el grupo leuprolide (p=0,943) (Figura 13). La disminución del índice prostato-somático se traduce en un bajo peso de la próstata en comparación con el peso total del animal.

Figura 13. Índice Prostato-somático.



Diferencias Estadísticamente Significativas con respecto al control (Prueba t<0,05). + Diferencias Estadísticamente significativas entre tratamientos Gonadectomía vs Leuprolide (Prueba Welch<0,05). •Datos Atípicos (Dato>1,5 veces IQR)

5.1.2 Niveles Séricos de Testosterona

Con el objetivo de verificar de manera directa la privación androgénica inducida por los tratamientos y verificar la implementación de un modelo de ratas sanas sometidas a privación androgénica, se cuantificaron los niveles séricos de testosterona. Los resultados se resumen en la Tabla 5, y se presentan de manera gráfica en la figura 14.

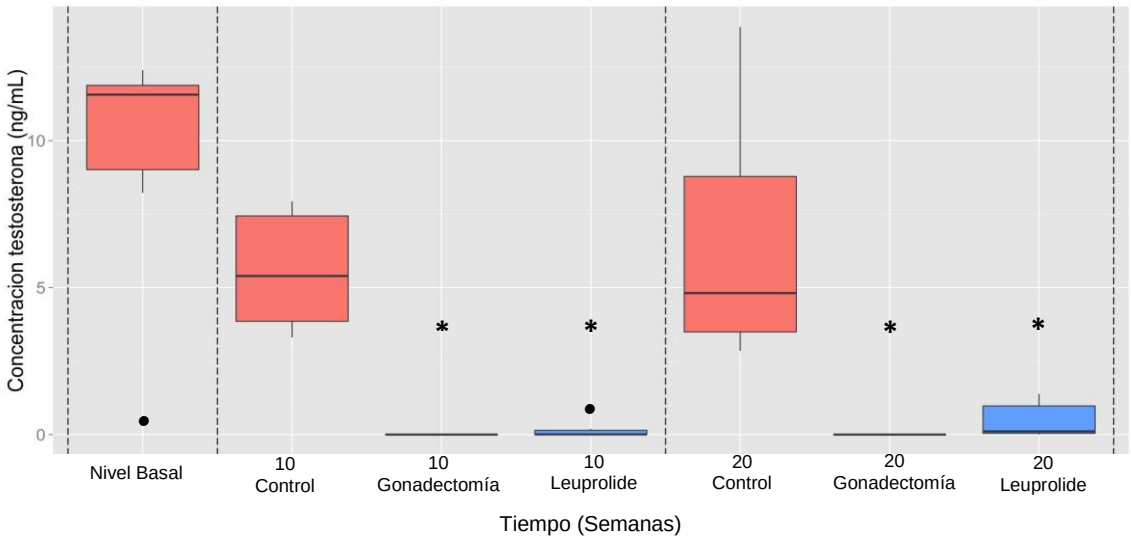
Tabla 5. Niveles Séricos de Testosterona

Grupo	Tiempo Cero (ng/mL)	Tiempo 10 Semanas (ng/mL)	Tiempo 20 Semanas (ng/mL)
Control	9,361± 4,590	5,528±2,056	6,528±4,383
Leuprolide	ND	0,174±0,329	0,483±0,654
Gonadectomía	ND	0,001±0,001	0,003±0,003

Se presentan los valores promedio y sus desviaciones estándar (n=6). ND= No Determinado. (Ver Anexo B-1 y B-2 para los datos experimentales y estadísticos de las medidas realizadas)

En el grupo control se observa una disminución de un 30-40% en los niveles de testosterona sérica a las 10 y 20 semanas comparado con el nivel basal inicial (tiempo cero) disminución que sería consecuencia del envejecimiento de los animales que resulta ser significativa (Figura 14). En la semana 10, ambos tratamientos mostraron una diferencia significativa con respecto al control: (p_{L10}= 0,000; p_{G10}=0,000); la gonadectomía redujo la testosterona 5.500 veces respecto del control, mientras que leuprolide lo hizo 30 veces (Tabla 5 y Figura 14). En la semana 20 de tratamiento, se presenta un comportamiento similar y ambos tratamientos mostraron una diferencia significativa con respecto al control, donde la gonadectomía disminuyó la testosterona 2.000 veces, y leuprolide lo hizo 13 veces (p_{L20}= 0,0009; p_{G20}=0,0005). No se presentaron diferencias significativas al comparar el efecto de la gonadectomía contra el efecto de leuprolide sobre los niveles de testosterona (p_{10}=0,2535; p_{20}=0,1320). Tampoco se presentaron diferencias al comparar el tiempo 10 semanas contra el tiempo 20 semanas (p_L= 0,6750; p_G=0,5450) (Figura 14).

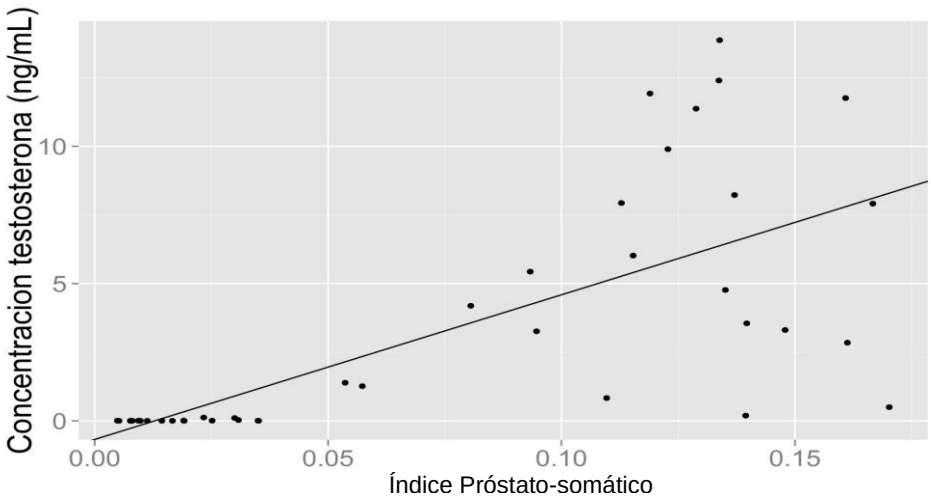
Figura 14. Cuantificación de Los Niveles Séricos de Testosterona.



**Diferencias Estadísticamente Significativas con respecto al control (Prueba t<0,05). •Datos Atípicos (Dato>1,5 veces IQR)*

A continuación se intentó establecer una potencial relación entre los niveles de testosterona y el índice prostato-somático, encontrándose que a menor concentración de testosterona, menor es el índice (Correlación 0,709; p=0,0000) (Figura 15). En consecuencia, la privación androgénica influyo en la disminución del peso de la próstata.

Figura 15. Relación concentración de testosterona e Índice Prostato-Somático



Los datos anteriores, en conjunto, nos permite afirmar que disponemos de un modelo de ratas sanas con privación androgénica inducida quirúrgicamente (por gonadectomía) o farmacológicamente (por tratamiento con leuprolide). Además, la gonadectomía resultó ser un método más efectivo en disminuir el índice prostato-somático a largo plazo y en reducir los valores de testosterona sérica, aunque en este último caso la diferencia no parece ser significativa desde el punto de vista estadístico.

5.2 Cuantificación de los Niveles Séricos de Antígeno Prostático

La cuantificación de PSA se realizó con el objetivo de tener una estimación indirecta de la actividad del receptor de andrógenos bajo las condiciones de tratamiento. Los resultados se muestran a continuación (Tabla 6).

Tabla 6. Cuantificación de los Niveles Séricos de Antígeno Prostático

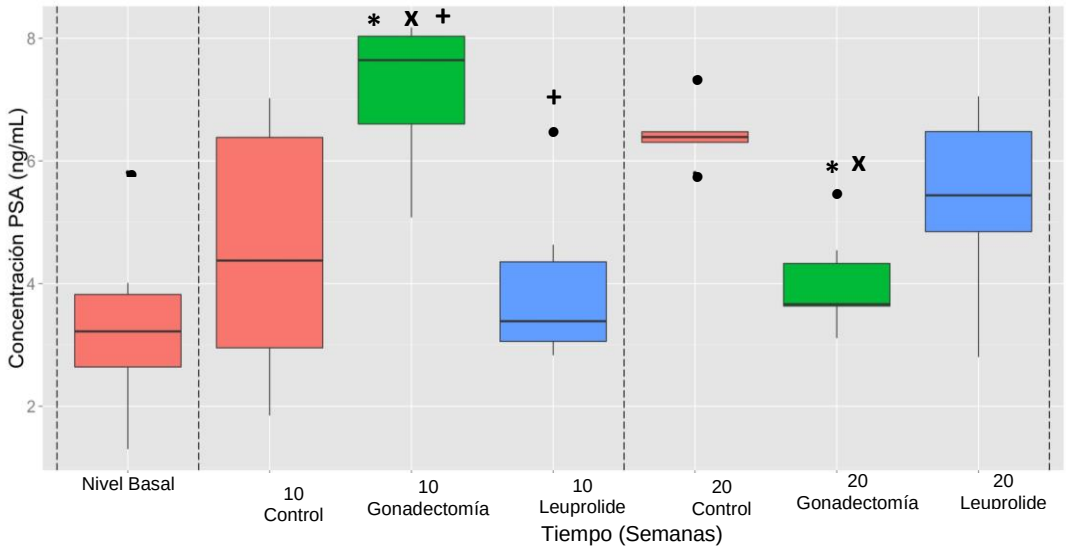
Grupo	Tiempo Cero (ng/mL)	Tiempo 10 Semanas (ng/mL)	Tiempo 20 Semanas (ng/mL)
Control	3,337±1,518	4,526±2,160	6,451±0,502
Leuprolide	ND	3,952±1,394	5,367±1,548
Gonadectomía	ND	7,726±1,908	4,017±0,857

Se observan los valores promedio de los niveles séricos de antígeno prostático y sus desviaciones estándar (n=6). ND= No determinado.

En el grupo control se observa un aumento de casi un 100% en los niveles séricos de PSA en función del tiempo que resulta ser significativa (Figura 16). En la semana 10 de tratamiento, las ratas tratadas con gonadectomía mostraron un aumento estadísticamente significativo de las concentraciones de PSA (p_{G10}=0,00898) mientras que las ratas sometidas a tratamiento con leuprolide no mostraron diferencias con respecto al control (p_{L10}=0,59875)(Figura 16). En la semana 20 de tratamiento, la gonadectomía produjo una disminución estadísticamente

significativa de los niveles de PSA (p_{G20}=0,00124) y las ratas sometidas a tratamiento con leuprolide no mostraron diferencias significativas con respecto al control (p_{L20}= 0,09786) (Figura 16). Al comprar los tratamientos es evidente que existen diferencias significativas entre ellos a la semana 10 (p_{10}=0,00344) debido a las elevadas concentraciones de PSA en el grupo gonadectomía. Sin embargo, no existen diferencias en el punto 20 semanas (p_{20}=0,09951). Al comparar los tiempos 10 y 20 semanas existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que el grupo gonadectomía mostró un cambio, pasando de un aumento significativo a la semana 10, a una disminución significativa de los niveles de PSA a la semana 20 (p_G=0,0008). El grupo leuprolide no muestra diferencias (p_L=0,6821) (Figura 16)(Ver Anexo C).

Figura 16. Cuantificación de los Niveles Séricos de Antígeno Prostático

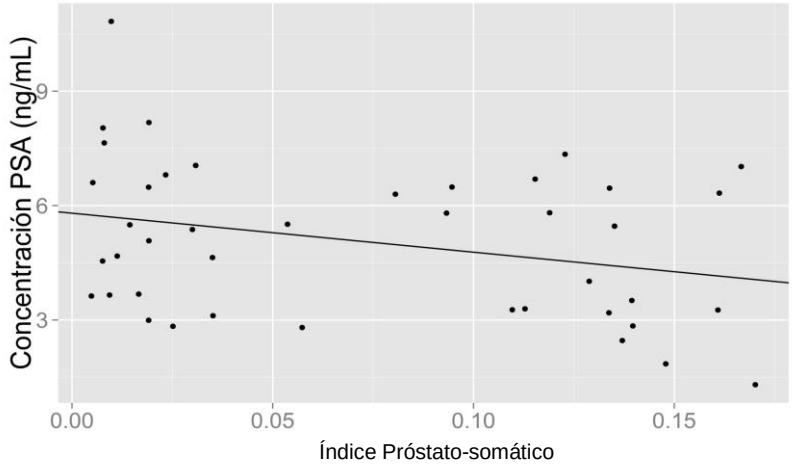


Diferencias Estadísticamente Significativas con respecto al control (Prueba t<0,05). + Diferencias significativas entre tratamientos Gonadectomía vs Leuprolide (Prueba Welch<0,05). X Diferencias entre tiempos 10 y 20 semanas (Factorial <0,05). • Datos Atípicos (Dato>1,5 veces IQR)

A continuación, se intentó establecer la relación entre las concentraciones de antígeno prostático y el índice prostato-somático para la totalidad del conjunto de datos (0, 10 y 20

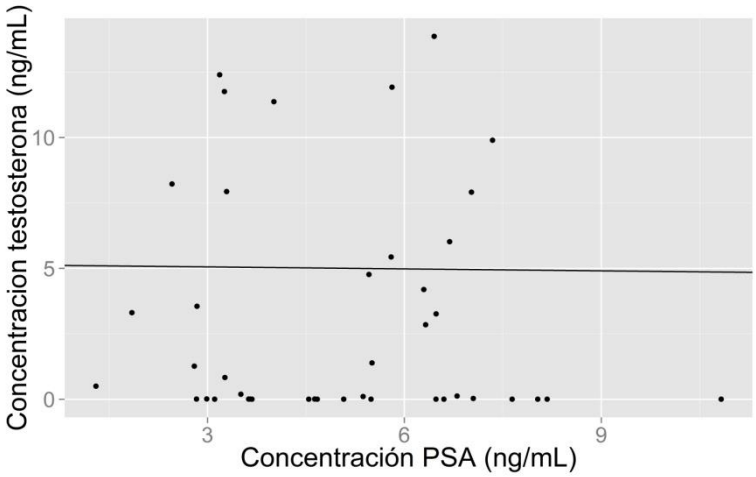
Semanas), pero no se encontró relación entre estas dos variables (Correlación -0,29; p=0,054) (Figura 17). La disminución del peso de la próstata producida por la privación androgénica no influyó sobre la concentración de PSA de manera estadísticamente significativa.

Figura 17. Correlación Antígeno Prostático e Índice Prostato-somático



Por último, se intentó establecer una relación entre las concentraciones de testosterona y las de antígeno prostático para la totalidad del conjunto de datos (0, 10 y 20 Semanas), encontrándose que no es posible correlacionar las dos variables (Correlación -0,054; p=0,209). (Figura 18). La disminución de las concentraciones de testosterona producida por la privación androgénica no influyó sobre la concentración de PSA de manera estadísticamente significativa.

Figura 18. Correlación Concentración de Testosterona y PSA



Es interesante observar que a pesar de la privación androgénica comprobada experimentalmente, no se observa influencia de la terapia sobre los niveles de antígeno prostático específico.

5.3 Hallazgos Histopatológicos

Siguiendo el protocolo descrito en Materiales y métodos, en un principio se encontraron 42 hallazgos histológicos distribuidas en la totalidad de las muestras, todas ellas con diversas frecuencias y severidades. Para realizar el análisis estadístico cualitativo se seleccionaron 24 hallazgos con alta frecuencia (>10%) (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencia de Hallazgos Histológicos

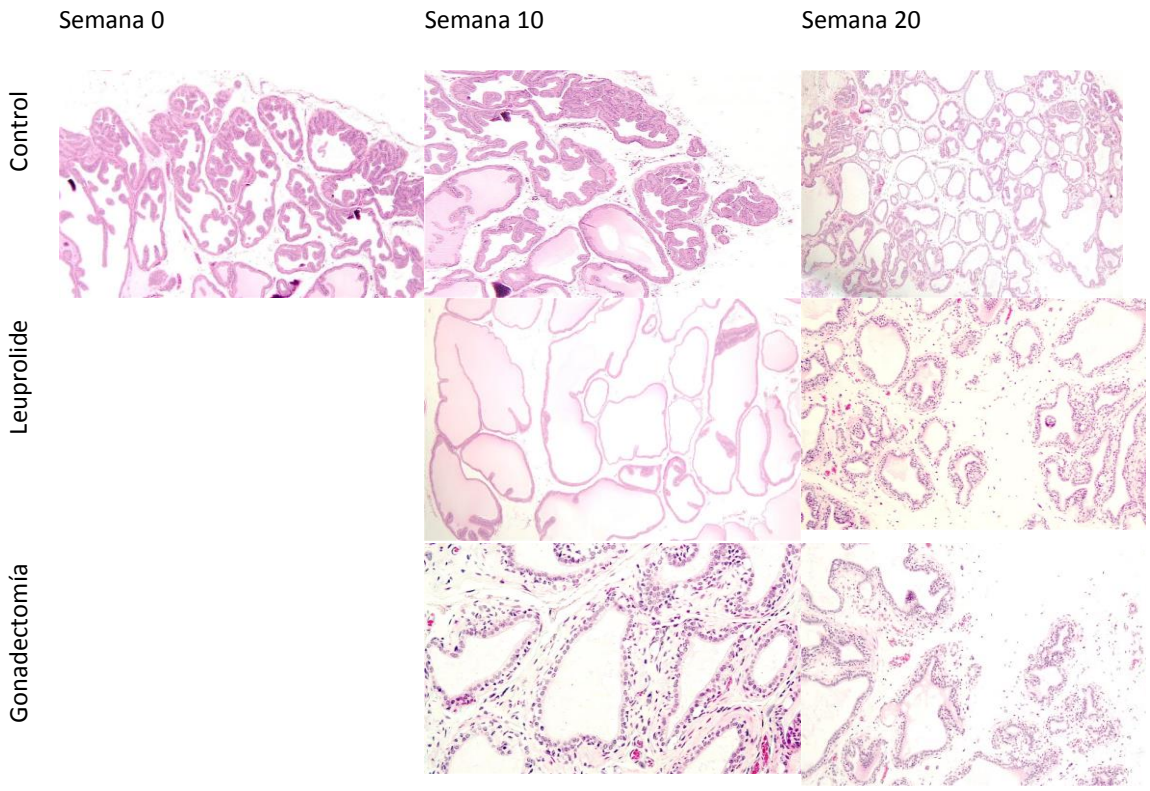
Característica	Frecuencia Total (%)
Edema en Estroma	76
Presencia de Células de Mast en Estroma	71
Atrofia de Células Luminales	66
Perdida de Secreción Apocrina	62
Presencia de Linfocitos en Estroma	60
Proyecciones Luminares Micropapilares y Papilares hacia la Luz	57
Congestión de Estroma	57
Muerte de Células Basales	50
Dilatación Acinar	43
Prominencia Nucleolar Multifocal en Células Epiteliales	43
Focos de Cromatina con Patrón Granular y Vesiculado	40
Ausencia de Focos de Estratificación o Pseudoestratificación	31
Perdida de la Polaridad	31
Dilatación Multifocal de Linfáticos	31
Muerte Células Epiteliales Luminales	29
Vacuolización Citoplasmática Apical Eosinofilica	24
Cambios Hidrópico Multifocal del Epitelio Luminal	24
Reducción del Lumen	24
Acinos Atróficos	19
Focos de Cambios Degenerativos	17
Fibrosis Periacinar Multifocal con fibroblastos activos	17
Variación en Morfología Nuclear (Pleomorfismo)	14
Acumulo de Material Eosinofilo en Estroma	14
Reducción de Numero de Acinos	12
Separación Plasma Eritroide	7
Infiltrado Células de Mast Intraepitelial	7
Microvacuolización del Citoplasma Epitelial	7
Presencia de Células Esfaceladas	5
Colágeno Periglandular Compacto	5
Activación Aparente de fibroblastos intersticiales	5
Celularidad	5
Anisocitosis	2
Prominencia en Tamaño y Agregación de células Basales	2
Vesiculización Nuclear	2
Cariomegalia	2
Neoformación Periacinar	2
Lumen Asociado a Presencia M0s con morfología espumosa	2
Infiltrado Polimorfo Nucleares Pigmentados Multifocal	2
Células Descamadas	0,02
Aumento de TC Interglandular y entre ramas	0,02
Irregularidades del Contorno de Membrana	0,02

Se seleccionaron para análisis estadístico las características con una frecuencia mayor al 10%

El análisis estadístico aplicado a estos datos, reveló que sólo 12 características se vieron afectadas significativamente por la influencia del tiempo y de los tratamientos experimentales (p-fisher<0,05 y V-Cramer>0,6). Los hallazgos significativos observados pueden clasificarse en dos grupos: aquellos que se presentan a nivel de la arquitectura glandular, y los que se presentan a nivel celular.

Los hallazgos observados en la organización y arquitectura de la glándula fueron: disminución de proyecciones papilares hacia la luz, acinos atróficos, reducción del número de acinos, dilatación acinar, reducción del lumen prostático y ausencia de focos de estratificación y pseudoestratificación (Figura 19).

Figura 19. Hallazgos Histológicos a Nivel de la Arquitectura Glandular.



Tinción Hematoxilina-Eosina. Todas las imágenes fueron obtenidas con un aumento de 100X. Se observan las características histológicas del control en comparación con las características histológicas de las ratas sometidas a privación androgénica durante 10 y 20 semanas. En las ratas del grupo control se observa que el envejecimiento produce dilatación acinar, se disminuyen las proyecciones papilares y se observa disminución de la estratificación en los acinos. En el grupo leuprolide tras 10 semanas de privación androgénica se observa ausencia de estratificación y atrofia con dilatación de los acinos y en la semana 20 la dilatación acinar y la disminución de proyecciones papilares son significativas con respecto al control. Mientras que en el grupo Gonadectomía a las 10 semanas de tratamiento se produce dilatación acinar, ausencia de estratificación y disminución de proyecciones, a la semana 20 se produce disminución del número de acinos, disminución del lumen prostático y atrofia acinar, cambios significativos con respecto al control.

La Tabla 8 señala la frecuencia y severidad de cada uno de estos hallazgos, así como su relación estadística con respecto al tipo de tratamiento y/o duración del mismo. En el grupo control se observa una disminución significativa de la dilatación acinar y la ausencia de estratificación a causa del envejecimiento. La privación androgénica con leuprolide genera un aumento significativo de la dilatación acinar y una disminución de las proyecciones papilares al comparar con respecto al control. El tratamiento con gonadectomía genera un aumento significativo de los acinos atróficos, la reducción del número de acinos y la reducción del lumen prostático tras 20 semanas de tratamiento en comparación con el grupo control; estas lesiones son exclusivas de este grupo pues no se presentan en el tratamiento con leuprolide.

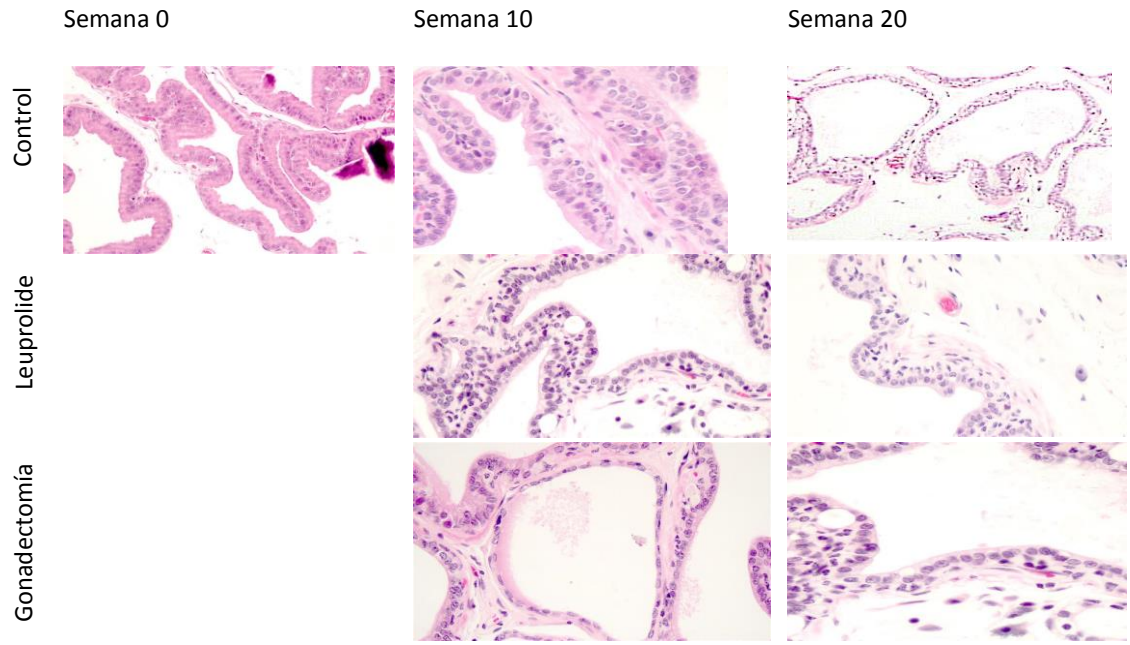
Tabla 8. Hallazgos a Nivel de la Arquitectura Glandular

Grupo	Tiempo (Semanas)	Edad (Meses)	Acinos Atróficos		Dilatación Acinar		Disminución Proyecciones Papilares		Ausencia de Estratificación		Reducción del Número de Acinos		Reducción del Lumen Prostático	
			F (%)	S	F (%)	S	F (%)	S	F (%)	S	F (%)	S	F (%)	S
Control	0	6	17	6	100	6	83	6	0	0	0	0	0	0
	10	8,5	0	0	83	6	100	6	0	0	0	0	0	0
	20	11	0	0	67	$^{+}3$	50	3	33	$^{+}3$	0	0	0	0
Leuprolide	10	8,5	17	6	0	0	0	0	67	6	0	0	0	0
	20	11	0	0	100	*9	83	*3	83	6	0	0	0	0
Gonadec.	10	8,5	0	0	100	3	83	*3	33	3	0	0	0	0
	20	11	100	$*^{+}9$	67	3	0	0	0	0	83,3	$*^{+}6$	83	$*^{+}6$

La severidad (S) fue clasificada como Leve=3; Moderada=6 y Severa=6. Las frecuencias (F) corresponden al porcentaje de animales que presentaron el hallazgo. ****** *Influencia del tratamiento sobre severidad del hallazgo histológico.* ***+*** *Influencia del tiempo sobre severidad del hallazgo histológico p<0,05 Correlación V-Cramer >0,6 (relativamente intensa).*

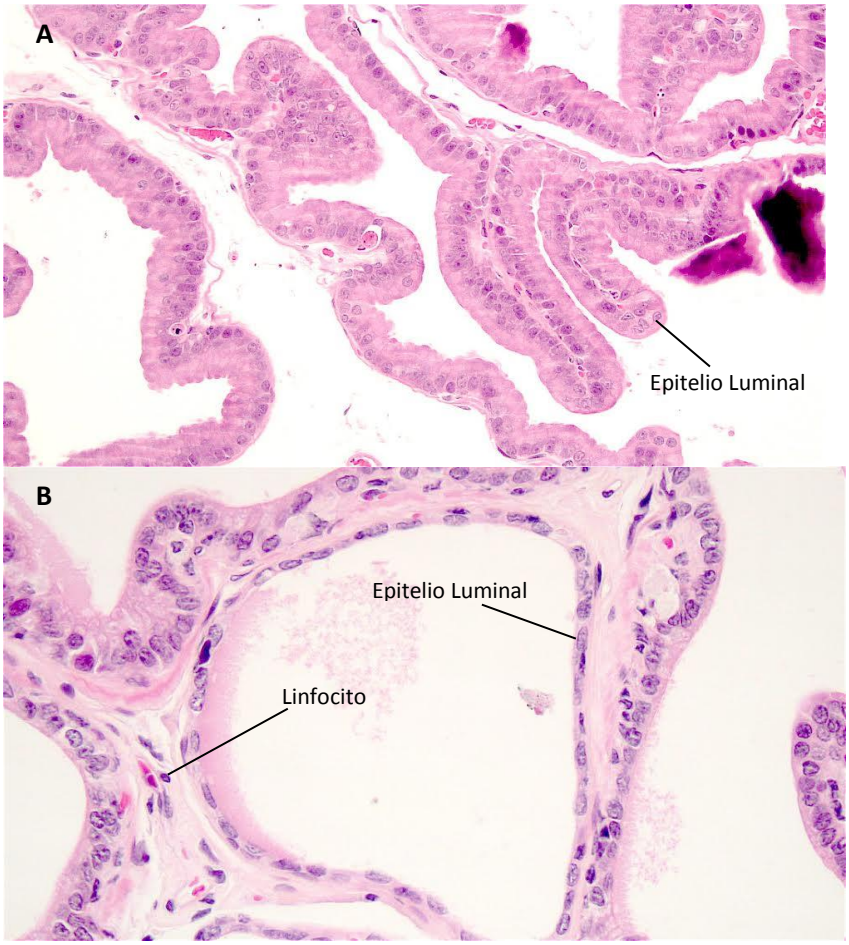
Los hallazgos presentados a nivel celular pueden ser clasificados como luminales, basales y estromales. Los hallazgos luminales encontrados fueron: pérdida de secreción apocrina, vacuolización citoplasmática eosinofílica, atrofia, y prominencia nucleolar. Los hallazgos basales y estromales fueron: muerte de células basales y presencia de linfocitos en estroma (Figura 20; Figura 21; Figura 22).

Figura 20. Hallazgos a Nivel Celular



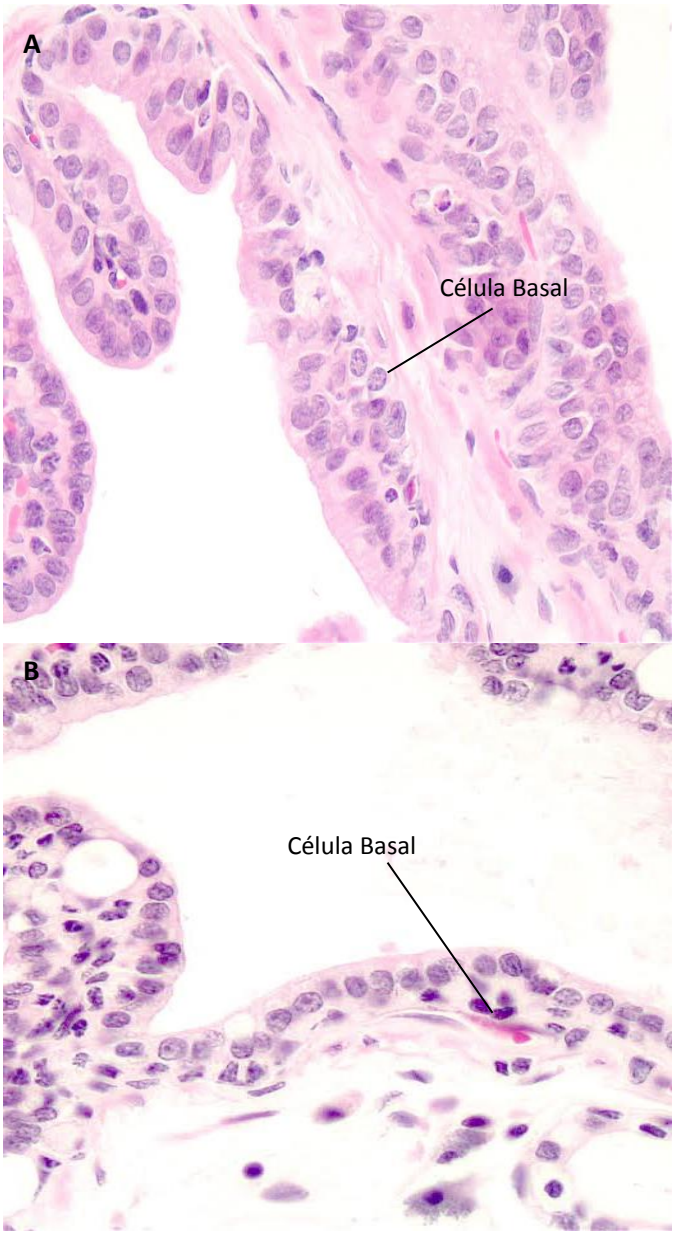
Tinción Hematoxilina-Eosina (400x). Se observan las características histológicas del control en comparación con las características histológicas de las ratas sometidas a privación androgénica durante 10 y 20 semanas. En las ratas del grupo control se observa que el envejecimiento produce la perdida de la secreción apocrina. En el grupo leuprolide tras 10 semanas de tratamiento se observa la atrofia de las células luminales y en la semana 20 se observan principalmente la presencia de linfocitos en estroma. Para el grupo Gonadectomía en la semana 10 también se observa la atrofia de las células luminales y en la semana 20 se observa la muerte de células basales y la presencia de linfocitos en estroma.

Figura 21. Acinos Atróficos



Tinción Hematoxilina-Eosina (400x). Se observa las características del acino en el grupo control (A) y en una de las ratas sometidas a privación androgénica (B). Es evidente la atrofia de las células luminales con una transición de epitelio columnar a cubico bajo. La atrofia se acompaña de la perdida de secreción apocrina. Además se observa la infiltración de linfocitos en estroma.

Figura 22. Muerte de Células basales.



Tinción Hematoxilina-Eosina (400x) A. Se observa una célula del epitelio basal del grupo control con su núcleo integro B. Se observa una célula del epitelio basal en proceso de apoptosis, su núcleo se ha dividido.

Las frecuencias, severidades y significancia estadística para cada uno de los hallazgos se muestran en la Tabla 9. En el grupo control, el envejecimiento produce una disminución de la prominencia nucleolar y un aumento de la vacuolización citoplasmática hallazgos propios de células senescentes. La privación androgénica genera una pérdida significativa de la secreción apocrina acompañada de atrofia del tejido luminal tras 10 semanas de tratamiento. El tratamiento quirúrgico genera un elevación significativa de la infiltración de linfocitos en estroma y de la muerte de células basales tras 20 semanas de tratamiento.

Tabla 9. Hallazgos a Nivel Celular

Grupo	Duración de Tratamiento (Semanas)	Edad (Meses)	Células Luminales								Células Basales y Estroma			
			Prominencia Nucleolar		Pérdida Secreción Apocrina		Atrofia		Vacuolización Citoplasmática		Muerte de Células Basales		Presencia de Linfocitos en Estroma	
			F (%)	S	F (%)	S	F (%)	S	F (%)	S	F (%)	S	F (%)	S
Control	0	6	100	6	67	3	33	3	0	0	0	0	50	3
	10	8,5	100	6	67	3	83	3	0	0	0	0	33	3
	20	11	33	$^{+}3$	67	6	67	6	83	$^{+}3$	50	3	50	3
Leuprolide	10	8,5	17	3	83	$^{*}9$	83	$^{*}9$	0	0	50	3	50	3
	20	11	17	3	67	3	67	3	83	$^{+}6$	33	3	33	3
Gonadec.	10	8,5	33	3	67	$^{*}6$	100	$^{*}3$	0	0	100	6	100	3
	20	11	0	0	17	6	83	3	0	0	100	$^{+*}6$	100	$^{*}3$

La severidad (S) fue clasificada como Leve=3; Moderada=6 y Severa=6. Las frecuencias (F) fueron determinadas como presencia o ausencia del hallazgo histológico. ******* *Influencia del tratamiento sobre severidad del hallazgo histológico.* ***+*** *Influencia del tiempo sobre severidad del hallazgo histológico p<0,05 Correlación V-Cramer >0,6 (relativamente intensa)*

6. Discusión

El presente trabajo se planteó con el fin de investigar la posibilidad de que los bajos niveles de testosterona sean responsables de la aparición de un fenotipo indicativo de cambios neoplásicos o pre-neoplásicos en la glándula prostática. Para ello se implementó un modelo de ratas sanas sometidas a privación androgénica, lo que se hizo por un método quirúrgico (gonadectomía) y un método farmacológico (leuprolide), y se evaluó el efecto de la privación androgénica sobre la histología prostática y sobre los niveles serológicos de antígeno prostático específico (PSA).

6.1 Modelo de Privación Androgénica

El modelo se implementó en ratas con una edad promedio de 6 meses al momento de comenzar los tratamientos (tiempo cero). A esa edad, estos animales se encuentran en su total desarrollo sexual y los niveles circulantes de testosterona son suficientes para verificar la privación androgénica[46, 47]. Tanto la gonadectomía como el tratamiento farmacológico con leuprolide redujeron de manera significativa el índice prostato-somático en comparación con el grupo control, lo que se traduce en bajos pesos de las próstatas comparados con el peso total del animal (Figura 13). Los tratamientos generaron también una disminución significativa de los niveles de testosterona tanto a la semana 10 como a la semana 20 de tratamiento (Figura 14). Estos hechos comprueban el cumplimiento del objetivo terapéutico de la gonadectomía y el leuprolide, y permiten afirmar que se implementó un modelo de ratas sanas sometidas a privación androgénica.

La disminución del peso de la próstata y de las concentraciones de testosterona debido a la influencia de la cirugía y del tratamiento farmacológico es un fenómeno bien documentado, y es el foco principal de la terapia contra el cáncer de próstata[42]. La ausencia de estimulación androgénica genera la involución y atrofia del órgano prostático pues se disminuye la conversión de testosterona a dihidrotestosterona (DHT) y se disminuye la estimulación de la vía del receptor de andrógenos responsable del mantenimiento de la próstata[63].

Al comparar los dos tratamientos empleados para inducir privación androgénica, se observa que la gonadectomía resultó ser un método más efectivo en la disminución del peso de la próstata a largo plazo (Figura 13). Esto puede explicarse por el hecho que la intervención quirúrgica asegura una disminución drástica de los niveles de testosterona, mientras que el tratamiento farmacológico puede verse influenciado por las características farmacocinéticas del tratamiento, la aplicación del fármaco y las características propias de cada animal, lo que lleva a tener promedios de concentración de testosterona más elevados en este grupo (Tabla 5).

Por otro lado, al evaluar el efecto del tiempo de privación androgénica sobre el índice prostato-somático y sobre las concentraciones de testosterona, es posible afirmar que antes de 10 semanas de tratamiento ya se había logrado el objetivo terapéutico tanto para el leuprolide como para la gonadectomía y por esta razón no fue posible observar diferencias significativas al comparar los tiempos 10 y 20 semanas.

Es interesante observar que en el grupo control los niveles basales de testosterona (9,4±4,6ng/mL) se encontraron dentro del rango de normalidad reportado en la literatura para estos animales (1-10ng/mL)[52]. Además, las ratas presentan un comportamiento muy similar al de los humanos en cuanto a la influencia del envejecimiento sobre sus niveles séricos de

testosterona, puesto que en el grupo de ratas control se observó una disminución total del 30-40% en los niveles de testosterona sérica en función del tiempo (Tabla 5 y Figura 14), y en los humanos se presenta la misma tendencia [10, 11].

6.2 Niveles Séricos de Antígeno Prostático (PSA)

El antígeno prostático secretado por las células glandulares es una proteasa cuya expresión se encuentra regulada positivamente por los andrógenos que activan el receptor AR[18, 20,23] . La privación androgénica afecta la actividad del receptor de andrógenos y por lo tanto debería afectar la expresión de PSA. En nuestro estudio la cuantificación de PSA se complementó con la cuantificación de los niveles de testosterona sérica y con el análisis histopatológico de la próstata, con la idea de evaluar la presencia de un fenotipo indicativo de lesiones neoplásicas o pre-neoplásicas.

Desde el punto de vista estadístico fue posible observar que los datos obtenidos para la cuantificación de PSA presentaron mucha variabilidad tanto a la semana 10 como a la semana 20, y por esta razón la precisión de la medida de antígeno prostático resultó ser baja. Es posible que la amplia variabilidad de los datos haya impedido ver una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo leuprolide. Para aumentar la precisión del estudio, específicamente en cuanto a los niveles de PSA, sería necesario utilizar una mayor cantidad de ratas, hecho que tiene implicaciones económicas, logísticas y éticas que impidieron que esto se llevara a cabo. Sin embargo, llama la atención que en la mayoría de casos el antígeno prostático resultó ser estadísticamente similar o superior a los controles. El fenómeno se presentó a pesar de la disminución comprobada del índice prostato-somático y los niveles séricos de testosterona.

En la semana 10 de tratamiento las ratas sometidas a gonadectomía aumentaron significativamente sus niveles de PSA (Figura 15). Sin embargo, los niveles de antígeno prostático pueden variar por diversas circunstancias, como prostatitis, infección de vías urinarias, infecciones agudas y crónicas de la próstata, o cirugías[20, 23, 42]. Por esta razón, es prudente pensar que el aumento del PSA pudo deberse a la influencia de la cirugía en este grupo. En este punto toma especial relevancia la posibilidad de tener infecciones o inflamaciones crónicas de la próstata no detectadas debido a la cercanía temporal con la intervención quirúrgica. Siendo así, pudiese ser necesaria la implementación de controles medio ambientales más estrictos para el desarrollo de las cirugías, y posiblemente el control hematológico y clínico de los animales para evitar sesgos en la medida.

En la semana 20 de tratamiento en el grupo gonadectomía es evidente una disminución significativa de antígeno prostático con respecto al control, resultado esperado debido a la privación androgénica y que nos indica que la disminución significativa de la testosterona lleva a una disminución de la actividad del receptor de andrógenos y por lo tanto a una disminución en la expresión del antígeno[64], enfoque principal de la terapia contra el cáncer en la actualidad[42] (Figura 16).

En el grupo de leuprolide se observó que tanto a tiempo 10 semanas como a tiempo 20 semanas, los promedios de antígeno prostático disminuyeron con respecto al control pero no representan una diferencia estadísticamente significativa (Figura 16). Teniendo en cuenta que el antígeno prostático tiene una vida media de 3.1 días[65] y no es posible que las concentraciones iniciales se mantengan durante un tiempo de 10 o 20 semanas, sería posible afirmar que el receptor de andrógenos mantuvo su actividad a pesar de la disminución androgénica comprobada al tratar con el fármaco leuprolide. Estos resultados podrían explicarse por diferentes posibilidades:

- El leuprolide genera una disminución menos drástica de los niveles de testosterona en comparación con el tratamiento quirúrgico, y posiblemente los niveles residuales de testosterona permitan la activación del receptor de andrógenos. Sería interesante evaluar qué tan drástica es la disminución de la actividad del receptor a los diferentes niveles de testosterona sérica, como ocurrió en nuestro experimento logrados con este tratamiento.
- El PSA podría ser activado por otras vías de señalización diferentes a la del receptor de andrógenos. Por ejemplo se ha asociado un incremento del PSA con un aumento de la actividad del factor de transcripción NF-kB, promotor de genes antiapoptóticos implicado en la resistencia a la muerte celular, sin embargo aún falta más evidencia que permita afirmar que el PSA puede ser regulado por otras vías[66].

- La actividad farmacológica de los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas sólo suprime los niveles de testosterona, pero no afecta las concentraciones de andrógenos adrenales DHEA y androstenediona, que son producidos en pequeñas cantidades por la corteza suprarrenal y luego convertidos en testosterona y DHT por acción de la enzima 5α-reductasa que se encuentra presente en el tejido prostático[66]. Estudios en hombres con histología normal de la próstata, hiperplasia y cáncer han demostrado que la castración química solo reduce en un 70-75% en los niveles de testosterona del tejido prostático, y en un 80-90% la DHT[9]. Este proceso puede estar involucrado en la patogénesis del cáncer de próstata en donde bajos niveles de testosterona activen vías alternativas de síntesis de DHT y mantengan la actividad del receptor de andrógenos. Cabe aclarar que en ratas también se produce el proceso de compensación androgénica adrenal[67].

- Al disminuir los niveles de testosterona se podrían activar mecanismos de síntesis intraprostática de andrógenos. La glándula cuenta con las enzimas necesarias para sintetizar testosterona en su interior y garantizar el mantenimiento de la actividad del receptor de andrógenos (5α reductasa, CYP17A1[68] y aldo ceto-reductasa son algunas enzimas clave en este proceso). Dichas enzimas podrían sobreexpresarse o sufrir modificaciones estructurales que permitan el mantenimiento de los niveles de andrógenos necesarios para la activacion del AR. En cuanto a la actividad de la 5α reductasa, es bien sabido que existen tres subtipos enzimaticos que se expresan en la próstata. La 5α reductasa 1 se expresa principalmente en las celulas epiteliales, y se ha observado sobreexpresada en casos de cáncer de próstata: la 5α reductasa 2 se expresa tanto en tejido epitelial como en tejido estromal y por esta razón se ha visto involucrada en la hiperplasia prostática benigna, mientras la 5α reductasa 3 recientemente se ha descrito como una enzima característica de CRPC[69,70]. Siendo así, la disminución de los niveles de testosterona sérica y el mantenimiento de los niveles de PSA podría explicarse por el mantenimiento o la sobrexpresión de alguno de los tres subtipos enzimáticos. Por otra parte, la aldo-ceto reductasa, enzima involucrada en vías alternativas de síntesis de DHT, podría estar elevada y mantener cantidades suficientes de andrógenos intraprostáticos, a pesar de la disminución de los niveles de testosterona sérica[71,72]. Aunque la síntesis intraprostática de andrógenos ha sido descrita en casos de cáncer de próstata resistente a castración, existe la posibilidad de que sea la terapia de privación androgénica la responsable de su activación. En este sentido, los niveles de andrógenos residuales y la expresión persistente de genes diana del AR ha sido demostrada en tejido prostático benigno después de cortos periodos de castración, asi como en tumores localizados[19].

Todo lo anterior abre nuevas posibilidades de investigación. Sería interesante evaluar las enzimas expresadas en el tejido prostático sometido a privación androgénica con el objetivo de determinar los mecanismos que se relacionarían con el mantenimiento de la actividad del receptor AR bajo nuestras condiciones experimentales.

Nuestros hallazgos ponen en discusión la utilidad de la terapia de privación androgénica individual para el tratamiento del cáncer de próstata. Debido a los fenómenos mencionados anteriormente, debería acompañarse siempre de terapias coadyuvantes como antagonistas del receptor o inhibidores de CYP17A1. La terapia con agonistas de la hormona liberadora de la gonadotropina se implementa sólo debido a que los tamaños de la próstata se ven disminuidos cuando se bloquea la actividad de los andrógenos sobre el órgano, y no porque exista una relación causal entre los elevados niveles de andrógenos y el cáncer de próstata[17]. Si nuestra hipótesis es cierta, la terapia de reemplazo durante la andropausia quizás pudiese ser una aproximación farmacológica novedosa y útil para prevenir el cáncer de próstata. Curiosamente, en la literatura existe evidencia que relaciona bajos niveles de testosterona con tumores metastasicos [73], inducción de transición epitelio-mesenquimal[74] y mayor agresividad[75], lo que estaría de acuerdo con la hipótesis de nuestro estudio.

En un estudio retrospectivo de una cohorte de pacientes sometidos a prostatectomía radical, se investigó la relación de los niveles de testosterona en sangre y la agresividad del tumor, encontrando que los pacientes con menores niveles de testosterona antes de su cirugía presentaron una mayor cantidad de metástasis[73]. Similarmente, en un estudio en ratones sanos sometidos a privación androgénica por castración quirúrgica durante 14 días, se observó una transición epitelial-mesenquimal con la expresión de marcadores de células madre. En las células epiteliales de la próstata sana se observó una pérdida de marcadores epiteliales como

E-cadherina y una ganancia de marcadores mesenquimales como N-cadherina y vimentina, así como una sobreexpresión de represores de E-cadherina como Twist, Snail y Slug. Resulta interesante que la expresión de represores y de marcadores mesenquimales se vio disminuida tras la administración de testosterona, lo que podría indicar un efecto protector de la testosterona a la transición epitelio-mesenquimal, mientras que la privación androgénica se relaciona con migración e invasión y resistencia a la terapia, características de las células madre y de tumores agresivos. Mediante el uso de microarreglos, un efecto similar fue observado clínicamente en pacientes con cáncer de próstata sometidos a privación androgénica[74].

Adicionalmente, se han comparado los perfiles de expresión genética en ratones xenotransplantados con LuCaP23.1 (línea celular de cáncer de próstata), observándose que los tumores generados en el modelo se pueden agrupar en dos formas: un grupo de crecimiento rápido y otro de crecimiento lento. Los tumores de crecimiento rápido expresaron proteínas indicativas de capacidad de invasión como la uroquinasa (uPA), factores de proliferación como timidilato sintasa (TS) y factores de supervivencia como HER1, mientras los tumores de crecimiento lento tenían como característica la sobreexpresión de 5α reductasa 1. Una vez se implementó la privación androgénica por castración quirúrgica en un periodo de 5 semanas, todos aquellos tumores de crecimiento rápido y la mayoría de crecimiento lento progresaron a independencia de andrógenos con una sobreexpresión marcada de marcador de supervivencia HER1, marcador de angiogénesis uPA y la proteína antiapoptótica Bcl2. Así, la privación androgénica en el modelo animal generó una resistencia al tratamiento con la sobreexpresión de marcadores de agresividad, lo que lleva a pensar en la posibilidad de que durante el envejecimiento se produzca una expresión de dichas proteínas, debido a la disminución de la testosterona sérica[75].

Por otra parte, al evaluar la influencia de la administración de testosterona en perros se propuso un posible mecanismo inhibidor de la proliferación celular ejercido por la testosterona sobre la próstata. Se propone que la dihidrotestosterona (DHT) mediante la acción enzimática de 3β Hidroxiesteroide deshidrogenasa es convertida al estrógeno 3βAdiol que posteriormente se une al receptor de estrógenos beta (ERβ). Al estimular el receptor de estrógenos la DHT estaría actuando como un regulador negativo del crecimiento de la próstata. En este sentido se observó que al administrar testosterona en perros sanos, no existía un aumento significativo en la expresión del receptor de andrógenos. Sin embargo, si existe una disminución en el índice de proliferación celular, evaluado a partir del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), proteína nuclear sintetizada en la fase G1 y S, necesaria para la síntesis de ADN. Tras la administración de testosterona, se disminuyó la expresión del mRNA de la 5α reductasa, enzima necesaria para la síntesis de dihidrotestosterona (DHT) y adicionalmente se observó una sobreexpresión del receptor de estrógenos ERβ. Además, se evidenció una disminución del citocromo CYP7B1 que metaboliza y degrada 3βAdiol. En conjunto, la evidencia sugiere que la disminución de CYP7B1 genera una posible acumulación de 3βAdiol, que por estimulación de ERβ ejerce un efecto anti-proliferativo en el tejido prostático, todo esto tras la administración de testosterona[76].

La evidencia molecular e histológica reportada en la literatura sugiere que la testosterona puede ejercer un efecto antiproliferativo sobre la próstata y que la disminución de los niveles séricos hormonales podría desencadenar la sobreexpresión de factores indispensables para la proliferación y el crecimiento celular. Sin embargo, es necesario realizar una mayor cantidad de estudios que evalúen los diferentes mecanismos que pueden estar implicados en la

patogénesis del cáncer de próstata. Todas estas observaciones están de acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo.

Finalmente, al comparar nuestros resultados del grupo con leuprolide versus los del grupo gonadectomizadas es posible afirmar que los niveles de PSA fueron estadísticamente diferentes en la semana 10 y similares a la semana 20 (Figura 15). Como ya se discutió anteriormente, la diferencia estadística a la semana 10 se explicaría por la influencia de la cirugía sobre los niveles de PSA del grupo con gonadectomía. Sin embargo, a la semana 20 no se obervaron diferencias significativas entre los tratamientos; quizás si se aumenta el tamaño de muestra la influencia del leuprolide en la semana 20 sería significativa.

En conclusión, la influencia de la cirugía, la compensación androgénica, la actividad de la enzima 5α reductasa y la síntesis intraprostática de andrógenos son razones que podrían explicar el aumento o mantenimiento de los niveles de antígeno prostático a pesar de la privación androgénica corroborada en nuestro estudio. El comportamiento de los niveles de PSA tras la privación androgénica, soporta la idea de que la disminución de los niveles de testosterona podrían generar un aumento en la actividad del receptor de andrógenos y por lo tanto elevar la posibilidad de sufrir cáncer de próstata. Sería interesante evaluar si el PSA puede ser activado por otras vías de señalización que se activen por la privación androgénica y definir claramente los fenómenos que llevan al mantenimiento de su concentración.

6.3. Histopatología

El inicio del cáncer de próstata en humanos y en modelos de roedores se caracteriza por la aparición de una neoplasia intraepitelial considerada una lesión pre-neoplásica en la que aún se conserva la capa de células basales, pero se sustituyen las células luminales normales por

células de características neoplásicas. Una vez se pierde la capa de células basales es posible confirmar el diagnóstico de cáncer de próstata[48]. En nuestro estudio, el hallazgo histológico más cercano a la descripción de una lesión pre neoplásica fue la muerte de células basales, encontrándose una influencia significativa de la privación androgénica sobre dicho hallazgo. Sin embargo, no se acompaña de cambios neoplásicos en las células luminales como lo reporta la literatura, por tal razón no existe evidencia histológica para afirmar que la disminución de los niveles de testosterona genere la aparición de un fenotipo indicativo de cáncer de próstata en ratas sanas, tras 20 semanas de tratamiento.

La literatura reporta cambios morfológicos en más del 70% del tejido prostático sano tras la disminución de los niveles séricos de testosterona. Algunos cambios característicos son la atrofia de células luminales, la prominencia de células basales, la hiperplasia de células basales y la vacuolización del tejido epitelial. Se describe que estos cambios son muy poco comunes en próstatas no expuestas a privación androgénica[63]. En nuestro estudio es evidente una marcada atrofia de las células luminales y la vacuolización del tejido epitelial debido a la influencia de la privación androgénica. Sin embargo, en las células basales no se observó un comportamiento similar a lo reportado en la literatura. Se ha reportado que el receptor de andrógenos es un supresor de la proliferación celular basal[18], y que la falta de estimulación androgénica produciría un aumento de dicha proliferación o su hiperplasia[77]. En nuestro estudio, tras la privación androgénica se produjo una marcada muerte de células basales con una influencia estadísticamente significativa de la privación androgénica tras 20 semanas de tratamiento (Figura 21).

Por otra parte, se reporta que la privación androgénica generaría un desbalance entre la proliferación y la muerte celular en el compartimiento luminal y el basal, en donde el número

de células luminales se vería reducido[63]. En nuestro estudio los tratamientos no influyeron significativamente sobre la muerte de células luminales, pero sí sobre una serie de cambios indicativos de atrofia en este tipo de células como pérdida de la secreción apocrina, y vacuolización citoplasmática evidencia acorde con lo reportado en la literatura[18].

En los últimos años la atrofia y la inflamación del tejido epitelial prostático ha sido relacionada con la aparición de cáncer de próstata poco agresivo, debido a la formación de radicales libres de oxígeno y al desbalance de señales proliferativas y anti-proliferativas[78, 79]. La supresión androgénica se asocia con una atrofia prostática difusa, sin embargo algunas lesiones focales podrían estar implicadas con la carcinogénesis. Las lesiones focales se dividen en dos grandes grupos, atrofia proliferativa (PA) y atrofia inflamatoria proliferativa (PIA), que se diferencian en el contenido de células inflamatorias; lesiones de atrofia focal que contienen un aumento de las células inflamatorias mayor que el encontrado en el tejido normal se clasifican como PIA y las que no, se consideran PA. La PA se subclasifica en: atrofia simple con o sin formaciones quísticas, atrofia parcial, hiperplasia post-atrófica y atrofia esclerótica[80]. Todas ellas comparten características como células acinares con escaso citoplasma, núcleos hipercromáticos y una estructura epitelial en monocapa. Sin embargo, las lesiones de tipo PIA presentan además un epitelio proliferativo con características morfológicas y moleculares similares a las del cáncer de próstata. Debido a las características histológicas y genéticas que comparten las PIA con la neoplasia intraepitelial de alto grado y el cáncer de próstata, han sido las lesiones principalmente asociadas con la enfermedad[79]. La atrofia de las células epiteliales en nuestro estudio no se acompaña de las características proliferativas descritas para el modelo animal[81], ni cumple con las características para establecer una relación con lesiones del tipo PIA[80], por lo tanto no es posible establecer una asociación con lesiones pre-neoplásicas

o neoplásicas, sin embargo sí existe una infiltración significativa de linfocitos en el estroma que podría ser explicada por la muerte celular y la atrofia del órgano (Figura 20).

El tejido estromal es un factor clave para proteger el órgano de la aparición de cambios neoplásicos en respuesta a la terapia de privación androgénica, debido a que las células estromales ejercen un efecto protector frente a la proliferación celular en la próstata[27, 34]. Alteraciones sobre el tejido estromal generan la aparición de características propias de un tejido en reparación con fibroblastos estimulados por el factor de crecimiento transformante (TGF-1) para expresar componentes de la matriz extracelular. Esta condición se asocia con la aparición y progresión del cáncer de próstata[82]. Siendo así, es importante en la práctica clínica el diseño de estrategias terapéuticas que eviten su influencia sobre este tejido.

En cuanto a nuestros hallazgos a nivel de la arquitectura glandular, es evidente que el envejecimiento y los tratamientos afectan la conformación del órgano generando cambios atróficos como ausencia de focos de estratificación, atrofia de acinos, reducción del número de acinos, disminución de las proyecciones papilares y reducción del lumen prostático que se han reportado como cambios debidos a la senescencia[82]. En general, muchos de los hallazgos tanto a nivel celular como a nivel de la arquitectura glandular se observan tanto en el grupo control como en los grupos sometidos a privación androgénica, mostrando que el proceso de envejecimiento de las ratas afecta significativamente las características histológicas de su órgano.

6.4 Correlaciones entre los Hallazgos Histológicos y Serológicos

En primer lugar, es interesante el hecho de que las ratas sometidas a tratamiento quirúrgico presenten menores niveles de testosterona que las ratas sometidas a tratamiento farmacológico y este hecho se ve reflejado en las características histológicas de los órganos. A largo plazo, la influencia de la gonadectomía produce una atrofia mucho más marcada del órgano, reflejada en una mayor disminución de los pesos de las próstatas. En este grupo se observaron cambios como reducción del número de acinos y reducción del lumen prostático, que no aparecieron en el grupo leuprolide. Siendo así, parecen existir diferentes niveles de testosterona con una influencia variable sobre la próstata que puede llegar a ser importante para evaluar la influencia de la hormona en la aparición de cáncer de próstata. Los hallazgos histológicos nos muestran que la disminución de los niveles de testosterona simula el envejecimiento de los animales en el órgano prostático. Cambios reportados en la literatura como propios de la senescencia en ratas sanas como disminución de proyecciones papilares, ausencia de focos de estratificación y disminución del número de acinos[82], en nuestro estudio aparecieron debido a la influencia significativa de la privación androgénica.

Al correlacionar el índice prostato-somático con las concentraciones de testosterona encontramos que la disminución de la concentración de testosterona tiene una influencia estadísticamente significativa sobre el índice prostato-somático: a menor concentración de testosterona menor fue el índice, este hecho demuestra la dependencia del órgano prostático de la actividad androgénica. En la próstata los andrógenos estimulan a las células estromales para producir factores de crecimiento que mantienen las células epiteliales. En el epitelio, el receptor de andrógenos activado por la DHT es un factor de supervivencia para las células luminales y un supresor de la proliferación para las células basales, regulando el funcionamiento normal del órgano[18].

Interesantemente, el índice prostato-somático no mostró relación alguna con los niveles de antígeno prostático específico: a pesar de la disminución en los pesos de la próstata, los niveles de antígeno prostático no se vieron disminuidos. Tampoco se observó una correlación entre los niveles séricos de testosterona y los niveles de antígeno prostático: la disminución de los niveles de testosterona no género una disminución en los niveles de antígeno prostático. Siendo así, se termina de comprobar el mantenimiento de las concentraciones de PSA a pesar de la privación androgénica y la disminución del tamaño del órgano.

El mantenimiento de los niveles de PSA muy probablemente nos indica un mantenimiento de la actividad del receptor AR aún en condiciones de privación androgénica, hecho que estaría de acuerdo parcialmente con nuestra hipótesis de trabajo. Sin embargo, la elevación de PSA no se acompaña de hallazgos histológicos indicativos de cáncer de próstata, lo que estaría en contravía de nuestra hipótesis de trabajo.

Con base en esto, nuestros resultados no fueron lo suficientemente claros como para corroborar o descartar la hipótesis. Se requieren más estudios para ello.

Este trabajo representa el punto de inicio de nuevos trabajos tendientes a comprender las bases celulares y moleculares del desarrollo del cáncer de próstata, que puedan sacar a luz nuevas dianas farmacológicas para tratar este problema. En este contexto, consideramos necesario evaluar nuevas condiciones experimentales, aumentando por ejemplo el tiempo de tratamiento, analizar la expresión y/o actividad del receptor AR en respuesta a los tratamientos, o evaluar nuevos factores de riesgo conjuntamente con la privación androgénica aquí evaluada. Debido a que los niveles de testosterona disponible afectan la función del órgano prostático, es necesario también poder determinar con certeza cuales son los niveles de testosterona mínimos necesarios para la activación del receptor o para generar cambios a nivel histológico.

Finalmente, al correlacionar la hipótesis planteada en este trabajo y la evidencia reportada en la literatura se podría plantear una respuesta que permita explicar por qué la disminución de los niveles séricos de testosterona estarían implicados en la aparición del cáncer de próstata. En primer lugar es importante resaltar que el envejecimiento disminuye los niveles de testosterona debido principalmente a disfunción testicular y a la reducción de la capacidad de respuesta por parte del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. A medida que pasa el tiempo se aumentan los niveles de LH, sobre-estimulando las células de Leydig y generando una retroalimentación negativa de la testosterona sobre el hipotálamo que finalmente produce incapacidad por parte de los testículos de producir cantidades adecuadas de testosterona[83]. Los niveles de testosterona terminan disminuyendo aproximadamente en un 50% durante la vejez [10].

Ante la disminución de la estimulación androgénica las células estromales promueven el crecimiento de las células epiteliales por secreción de factores paracrinos independientes de andrógenos (EGF, FGF, IGF-1, TGF-B), que están implicados en vías alternativas de activación del receptor[27,33]. Siendo así, la estimulación paracrina junto con la disminución de los niveles hormonales producen una elevación en la expresión del receptor de andrógenos epitelial, que lleva a una elevación de los niveles de PSA durante el envejecimiento. En modelos animales con bajos y con elevados niveles del AR epitelial se ha visto la aparición de cáncer de próstata[31,32]. Anteriormente se explicaron las diversas posibilidades que existen para mantener la actividad del receptor de andrógenos y por lo tanto mantener los niveles de PSA, a pesar de la privación androgénica (Apartado 6.1); mediante cualquiera de estos mecanismos se podría mantener la actividad del receptor e iniciar procesos oncogénicos. El aumento de la expresión del receptor epitelial seguramente se acompañaría de una disminución de la expresión del

receptor de andrógenos estromal puesto que este hecho se ha observado tanto en cáncer de próstata como en CRPC[34].

Ante dicha situación en la que se sobrexpresa el receptor epitelial y se disminuye la expresión del receptor estromal, se produciría una falta de control del crecimiento y diferenciación de las células epiteliales (basales y luminales), puesto que los andrógenos y su receptor ejercen dicho control[36]. Se ha planteado que en el inicio de la enfermedad, la falta de estimulación androgénica produce un fenómeno conocido como transición epitelio-mesenquimal en el que se expresan factores similares a las células madre en el tejido epitelial prostático, este tipo celular tendría una capacidad de supervivencia elevada y se acompañaría de una multiplicación descontrolada[74]. Una vez se han multiplicadas sin control las células epiteliales prostáticas, la falta de estimulación androgénica facilita procesos metástasicos[73]y tumores de mayor agresividad[75]. Cuanto mayor es la agresividad del cáncer, mejor es su capacidad para efectuar el reemplazo adrenal[72], mecanismo implicado en resistencia a la terapia de privación androgénica pero que también podría estar implicado en el inicio de la enfermedad.

Por otra parte, el envejecimiento trae consigo la producción de factores inflamatorios en la próstata, como NF-kB, IL6 y factor de necrosis tumoral α (TNF-α), que regulan la metilación del gen responsable de la producción de 5α reductasa 2 (SRD5A2) disminuyendo su expresión proteica [84,85]. Posiblemente durante el envejecimiento y en el inicio del cáncer de próstata la isoenzima 2 disminuye su expresión y se aumenta la expresión de la isoenzima 1. La disminución de los niveles de testosterona durante el envejecimiento no afectaría drásticamente la actividad de la 5α reductasa, puesto que se ha observado que puede seguir produciendo DHT suficiente para mantener la actividad del receptor y facilitar el crecimiento tumoral a pesar de someter tejido sano a privación androgénica[86,87]. Datos *in vivo* e *in vitro*

han mostrado que niveles de DHT de 0,5 a 1ng por gramo de tejido prostático son suficientes para activar el receptor AR[87].

9. Conclusiones

1. Se implementó un modelo de ratas sanas con privación androgénica inducida experimentalmente por tratamiento quirúrgico y tratamiento farmacológico.
2. La gonadectomía resultó ser un método más efectivo que el farmacológico para inducir privación androgénica.
3. No se encontró relación entre la disminución de testosterona y hallazgos histopatológicos sugestivos de neoplasia o pre-neoplasia.
4. La evaluación histológica tanto en condiciones normales como bajo privación androgénica reveló cambios no reportados en la literatura para el modelo animal utilizado.
5. Los cambios histológicos observados se relacionarían con involución y atrofia prostática propias del paso del tiempo, o debidos a la privación androgénica.

10. Recomendaciones

1. Determinar los niveles mínimos de testosterona sérica necesarios para mantener la actividad del receptor de andrógenos.
2. Analizar el perfil androgénico de las ratas en las que no se disminuyó la concentración de antígeno prostático.
3. Estudiar la actividad del receptor de andrógenos en ratas sometidas a privación androgénica.
4. Utilizar leuprolide como método de privación androgénica con el objetivo de evitar sesgos en la medida de antígeno prostático y aumentar el número de ratas utilizadas con el objetivo de aumentar la precisión del estudio.

A. Anexo: Índice Prostato-somático

Tabla A-1. Índice Prostato-somático

Tiempo	Grupo	Id.	Caja	Rata	Peso Próstata (g)	Peso Rata (g)	Índice Prostato-somático	Promedio	Desviación Estándar
Tiempo Cero	Control	**1**	3	3	0,543	319	0,170		
		2	8	2	0,484	353	0,137		
		3	9	1	0,530	396	0,134		
		4	10	2	0,423	355,5	0,119		
		5	6	6	0,406	315	0,129		
		6	4	4	0,533	331	0,161	0,142	0,020
10 Semanas	Control	**7**	11	1	0,510	452	0,113		
		8	9	2	0,664	398,5	0,167		
		9	6	3	0,574	388	0,148		
		10	7	4	0,522	386	0,135		
		11	2	5	0,475	340	0,140		
		12	8	5	0,415	360	0,115	0,136	0,020
	Leuprolide	**13**	5	1	0,618	443	0,139		
		14	3	2	0,444	405	0,110		
		15	11	3	0,082	427	0,019		
		16	8	4	0,090	358	0,025		
		17	7	5	0,062	322	0,019		
		18	9	5	0,111	317	0,035	0,058	0,053
	Gonadectomía	**19**	3	1	0,059	308	0,019		
		20	4	2	0,072	376	0,019		
		21	10	4	0,019	370	0,005		
		22	4	5	0,026	341	0,008		
		23	2	4	0,035	353	0,010		
		24	11	5	0,028	350	0,008	0,012	0,006
20 Semanas	Control	**25**	3	4	0,359	384,4	0,093		
		26	4	3	0,543	442	0,123		
		27	8	1	0,584	436	0,134		
		28	5	3	0,415	438	0,095		
		29	10	1	0,392	486,2	0,081		
		30	11	2	0,714	442,6	0,161	0,114	0,030
	Leuprolide	**31**	2	2	0,130	422,6	0,031		
		32	2	3	0,217	404,7	0,054		
		33	4	1	0,110	469	0,023		
		34	6	4	0,126	420	0,030		
		35	10	5	0,050	445,4	0,011		
		36	6	1	0,246	428,9	0,057	0,034	0,018
	Gonadectomía	**37**	3	5	0,048	287	0,017		
		38	5	2	0,132	375	0,035		
		39	7	3	0,036	470	0,008		
		40	11	4	0,051	355,1	0,014		
		41	6	2	0,039	413,1	0,009		
		42	8	3	0,023	472,4	0,005	0,015	0,011

Tabla A-2. Análisis Estadístico Índice Prostato-somático

Tiempo	Grupo	Estimado	Pr(>|t|) (Prueba t)	Pr(>F) (Prueba ANOVA)*	Valor P (Prueba de Welch)*	Grupo	Valor P (Factorial)
10 Semanas	Media Control	0,13628	0,000000	0,0000337	0,0840	Gonadectomía	0,277
	Gonadectomía	-0,12475	0,000009				
	Leuprolide	-0,07835	0,000888				
20 Semanas	Media Control	0,114418	0,000000	0,00000162	0,0483	Leuprolide	0,943
	Gonadectomía	-0,099727	0,000001				
	Leuprolide	-0,079992	0,000010				

* La prueba de ANOVA y la prueba de Welch se realizan comparando los datos de los grupos experimentales gonadectomía y leuprolide

ANOVA: Pr(>F)<0.05 existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que alguno de los dos tratamientos influye en el peso de la próstata a las 10 y 20 semanas.

Prueba t: Debido a que Pr(>|t|)<0.05 existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que la gonadectomía y el leuprolide disminuyen el peso de la próstata tanto en la semana 10 como en la semana 20.

Prueba Welch: En la semana 10 se cumple que el valor p>0,05 por lo tanto no existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que alguno de los tratamientos influye más que el otro en la disminución del peso de la próstata. En la semana 20 se cumple que el valor p<0,05 por lo tanto existe evidencia estadísticamente significativa que gonadectomía tuvo una mayor efectividad para disminuir el peso de la próstata que leuprolide. Se sabe que el grupo de mayor influencia fue gonadectomía debido a que en la columna estimado el valor -0,099 representa una mayor influencia que el valor -0,079. Los signos negativos indican disminución del peso de la próstata.

Factorial: Pr(>|t|)<0.05 Al comparar los tiempos 10 y 20 semanas, no existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que alguno de los tratamientos mostró diferencias.

Anexo B: Cuantificación de los Niveles Séricos de Testosterona

Tabla B-1. Cuantificación de los Niveles Séricos de Testosterona

Tiempo	Grupo	Id.	Absorbancia		Promedio	Resta Blanco	T (ng/mL)	Prom.	Desv. Estándar
Tiempo Cero	Control	**1**	1,598	1,655	1,626	1,594	0,5005	9,361	4,590
		2	0,721	0,710	0,716	0,684	8,2239		
		3	0,570	0,566	0,568	0,536	12,3952		
		4	0,591	0,573	0,582	0,550	11,9204		
		5	0,599	0,599	0,599	0,567	11,3694		
		6	0,587	0,587	0,587	0,555	11,7555		
10 Semana	Control	**7**	0,723	0,736	0,729	0,698	7,9341	5,582	2,056
		8	0,721	0,738	0,730	0,698	7,9123		
		9	1,039	1,047	1,043	1,011	3,3058		
		10	0,892	0,935	0,913	0,882	4,7681		
		11	1,029	1,006	1,018	0,986	3,5495		
		12	0,833	0,824	0,829	0,797	6,0201		
	Leuprolide	**13**	1,829	1,859	1,844	1,812	0,1916	0,174	0,329
		14	1,420	1,557	1,489	1,457	0,8282		
		15	2,278	2,384	2,331	2,299	0,0005		
		16	2,217	2,260	2,238	2,207	0,0067		
		17	2,230	2,199	2,214	2,183	0,0098		
		18	2,186	2,282	2,234	2,202	0,0072		
	Gonadectomía	**19**	2,333	2,328	2,330	2,299	0,0005	0,001	0,001
		20	2,243	2,372	2,307	2,276	0,0013		
		21	2,354	2,219	2,287	2,255	0,0024		
		22	2,304	2,455	2,380	2,348	0,0035		
		23	2,250	2,461	2,355	2,324	0,0001		
		24	2,375	2,327	2,351	2,319	0,0001		
20 Semana	Control	**25**	0,846	0,886	0,866	0,834	5,4337	6,582	4,383
		26	0,643	0,656	0,649	0,617	9,8966		
		27	0,520	0,537	0,528	0,496	13,8644		
		28	0,994	1,102	1,048	1,016	3,2589		
		29	0,889	1,029	0,959	0,928	4,1924		
		30	1,065	1,125	1,095	1,063	2,8472		
	Leuprolide	**31**	2,118	2,144	2,131	2,099	0,0266	0,483	0,654
		32	1,269	1,398	1,334	1,302	1,3849		
		33	1,936	1,920	1,928	1,896	0,1215		
		34	1,878	2,039	1,958	1,926	0,1015		
		35	2,190	2,388	2,289	2,257	0,0023		
		36	1,326	1,400	1,363	1,332	1,2623		
	Gonadectomía	**37**	2,231	2,352	2,292	2,260	0,0021	0,003	0,003
		38	2,217	2,414	2,315	2,283	0,0010		
		39	2,242	2,519	2,381	2,349	0,0001		
		40	2,247	2,311	2,279	2,247	0,0029		
		41	2,214	2,278	2,246	2,214	0,0058		
		42	2,166	2,300	2,233	2,201	0,0073		

Tabla B-2. Análisis Estadístico de los Niveles Séricos de Testosterona

Tiempo	Grupo	Estimado	Pr(>|t|) (Prueba t)	Pr(>F) (Prueba ANOVA)*	Valor P (Prueba de Welch)*	Grupo	Valor P (Factorial)
10 Semanas	Media Control	5,5816	0,0000	0,0000	0,2535	Gonadectomía	0,5450
	Gonadectomía	-5,5809	0,0000				
	Leuprolide	-5,4076	0,0000				
20 Semanas	Media Control	6,5820	0,0000	0,0007	0,1320	Leuprolide	0,6750
	Gonadectomía	-6,5790	0,0005				
	Leuprolide	-6,0990	0,0009				

* La prueba de ANOVA y la prueba de Walch se realizan comparando los datos de los grupos experimentales gonadectomía y leuprolide

ANOVA: Pr(>F)<0.05 existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que alguno de los dos tratamientos influye sobre la concentración de testosterona a las 10 y 20 semanas.

Prueba t: Pr(>|t|)<0.05 existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que la gonadectomía y el leuprolide disminuyen la concentración de testosterona tanto en la semana 10 como en la semana 20.

Prueba Welch: p>0,05 No existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que alguno de los tratamientos influye más que el otro en la disminución de la concentración de testosterona tanto a la semana 10 como a la semana 20.

Factorial: Pr(>|t|)<0.05 Al comparar los tiempos 10 y 20 semanas, no existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que alguno de los tratamientos mostró diferencias.

Anexo C. Cuantificación de los Niveles Séricos de Antígeno Prostático

Tabla C-1. Cuantificación de los Niveles Séricos de Antígeno Prostático

Tiempo	Grupo	Id.	Absorbancia		Promedio	Resta Blanco	PSA (ng/mL)	Ajuste Factor de Dilución (2x)	Prom.	Desv. Estándar
Tiempo Cero	Control	**1**	0,119	0,130	0,124	0,116	0,650	1,300	3,337	1,518
		2	0,187	0,192	0,189	0,181	1,229	2,459		
		3	0,230	0,230	0,230	0,222	1,592	3,185		
		4	0,378	0,378	0,378	0,370	2,905	5,811		
		5	0,277	0,277	0,277	0,269	2,006	4,012		
		6	0,234	0,234	0,234	0,226	1,629	3,258		
10 Semana	Control	**7**	0,188	0,285	0,236	0,228	1,645	3,291	4,526	2,160
		8	0,399	0,493	0,446	0,438	3,511	7,022		
		9	0,118	0,193	0,155	0,147	0,924	1,849		
		10	0,368	0,349	0,358	0,350	2,730	5,460		
		11	0,193	0,229	0,211	0,203	1,420	2,841		
		12	0,404	0,451	0,428	0,419	3,345	6,691		
	Leuprolide	**13**	0,260	0,237	0,249	0,240	1,755	3,509	3,952	1,394
		14	0,236	0,234	0,235	0,227	1,632	3,265		
		15	0,382	0,449	0,416	0,408	3,241	6,482		
		16	0,191	0,230	0,210	0,202	1,416	2,832		
		17	0,194	0,245	0,219	0,211	1,495	2,989		
		18	0,305	0,318	0,312	0,304	2,317	4,635		
	Gonadectomía	**19**	0,489	0,533	0,511	0,503	4,088	8,176	7,726	1,908
		20	0,339	0,334	0,337	0,329	2,539	5,077		
		21	0,469	0,376	0,423	0,414	3,301	6,602		
		22	0,544	0,462	0,503	0,495	4,016	8,033		
		23	0,629	0,691	0,660	0,652	5,414	10,828		
		24	0,448	0,514	0,481	0,473	3,821	7,643		
20 Semana	Control	**25**	0,393	0,362	0,377	0,369	2,900	5,799	6,451	0,502
		26	0,462	0,466	0,464	0,456	3,672	7,343		
		27	0,413	0,415	0,414	0,406	3,227	6,454		
		28	0,433	0,399	0,416	0,408	3,242	6,484		
		29	0,398	0,413	0,405	0,397	3,148	6,297		
		30	0,414	0,400	0,407	0,399	3,163	6,325		
	Leuprolide	**31**	0,438	0,457	0,448	0,440	3,525	7,051	5,367	1,548
		32	0,358	0,364	0,361	0,353	2,754	5,508		
		33	0,403	0,464	0,434	0,426	3,401	6,803		
		34	0,350	0,357	0,353	0,345	2,685	5,371		
		35	0,314	0,315	0,314	0,306	2,336	4,673		
		36	0,211	0,206	0,209	0,200	1,400	2,800		
	Gonadectomía	**37**	0,257	0,259	0,258	0,250	1,839	3,678	4,017	0,857
		38	0,225	0,227	0,226	0,218	1,555	3,110		
		39	0,304	0,310	0,307	0,299	2,272	4,544		
		40	0,329	0,391	0,360	0,352	2,746	5,492		
		41	0,272	0,242	0,257	0,248	1,826	3,652		
		42	0,262	0,248	0,255	0,247	1,813	3,627		

Tabla C-2. Análisis Estadístico de los Niveles Séricos de Antígeno Prostático

Tiempo	Grupo	Estimado	Pr(>|t|) (Prueba t)	Pr(>F) (Prueba ANOVA)*	Valor P (Prueba de Welch)*	Grupo	Valor P (Factorial)
10 Semanas	Media Control	4,52570	0,00002	0,00622	0,00344	Gonadectomía	0,0008
	Gonadectomía	3,20080	0,00898				
	Leuprolide	-0,57370	0,59875				
20 Semanas	Media Control	6,45030	0,00000	0,00453	0,09951	Leuprolide	0,68215
	Gonadectomía	-2,43320	0,00124				
	Leuprolide	-1,08270	0,09786				

* La prueba de ANOVA y la prueba de Walch se realizan comparando los datos de los grupos experimentales gonadectomía y leuprolide

ANOVA: Pr(>F)<0.05 existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que alguno de los dos tratamientos influye sobre la concentración de Antígeno Prostático a las 10 y 20 semanas.

Prueba t: Pr(>|t|)<0.05 existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que la gonadectomía aumenta la concentración de testosterona(Estimado (+)) en la semana 10 y la disminuye (Estimado (-))en la semana 20. Pr(>|t|)>0.05 no existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que el tratamiento con leuprolide influyó en la concentración de antígeno prostático tanto a la semana 10 como a la semana 20.

Prueba Welch: p<0,05 existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que la gonadectomía influye más que el leuprolide sobre la concentración de PSA a la semana 10. P>0,05 no existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que alguno de los tratamientos influye más que el otro sobre la concentración de PSA en la semana 20.

Factorial: Pr(>|t|)<0.05 Al comparar los tiempos 10 y 20 semanas existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que la gonadectomía mostro un cambio significativo. El grupo leuprolide no mostro cambios significativos.

Bibliografía

1. Globocan.iarc.fr. Francia: International Agency for Research on Cancer; 2012. Estimated Cancer Incidence and Prevalence World Wide. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

2. Porth C & Heymann G. Fisiopatología. Salud enfermedad: un enfoque conceptual. Función Genitourinaria y Reproductiva. 7 edición: Bogotá . Panamericana; 2006. p.1017-1099

3. Linton K, Catto J. Prostate Cancer. Renal and Urological Surgery. 2013; 31 (10); 516-522.

4. Reynolds M. Molecular alterations in prostate cáncer. Cancer Letters. 2008; 270: 13-24. doi:10.1016/j.canlet.2008.04.047

5. Ligacontraelcancer.com.co. Colombia: Liga Contra el Cáncer Seccional Bogotá; 2002. Cáncer de Próstata: Magnitud del Problema. Disponible en: http://www.ligacontraelcancer.com.co/tiposcancerdeprostata.php

6. Cancer.org. United States: American Society of cancer; 2014. Cáncer de Próstata: Guía Detallada. Disponible en: http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeprostata/guiadetallada/index

7. Thieu W, Tilki D, de Vere R, Evans P. The role of microRNA in castration-resistant prostate cancer. Urologic Oncology. Seminars and Original Investigations. 2014; 32: 517–523.

8. Kirby M, Hirst C, Crawford ED. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. Int J Clin Pract. 2011; 65 (11): 1180–1192. doi: 10.1111/j.1742-1241.2011.02799.x

9. Chen Y, Sawyers C & Scher H. Targeting the androgen receptor pathway in prostate cancer. Curr Opin Pharmacol. 2008; 8(4): 440–448. doi:10.1016/j.coph.2008.07.005.

10. Guyton & Hall. Tratado de fisiología médica. Endocrinología y Reproducción. 12 edición: Madrid. Elsevier; 2011. p. 895-904.

11. Harman S, Metter J, Tobin J, Pearson J & Blackman M. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Clinical Endocrinology & Metabolism. 2001; 86 (2):724-731. doi 10.1210/jcem.86.2.7219

12. National cancer institute. Estados Unidos: Browse the SEER cancer statistics review 1975-2011; 2011. Cancer of the Prostate. Disponible en: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/browse_csr.php?sectionSEL=23&pageSEL=sect_23_table.10.html

13. Wiren S & Stattin P. Androgens and prostate cancer risk. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2008; 22 (4): 601–613. doi:10.1016/j.beem.2008.06.002

14. MacInnis R & English D. Body size and composition and prostate cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. Cancer Causes Control. 2006; 17:989–1003. doi 10.1007/s10552-006-0049-z

15. Haider A, Zitzmann M, Doros G et al. Incidence of prostate cancer in hypogonadal men receiving testosterone therapy: observations from 5-Year median follow-up of 3 registries. The Journal of Urology. 2014; 5347(14) 80-85. doi:10.1016/j.juro.2014.06.071

16. Morgentaler A & Rhoden E. Prevalence of prostate cancer among hypogonadal men with prostate-specific antigen levels of 4.0 ng/ml or less. Urology. 2006; 68 (6): 1263-1267. doi:10.1016/j.urology.2006.08.1058

17. Roddam A. Endogenous Sex Hormones and Prostate Cancer: A collaborative analysis of 18 prospective studies. JNCI. 2008; 100 (3): 170-183. doi 10.1093/jnci/djm323

18. Shafi A, Yen A, Weigel N. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. Pharmacology & Therapeutics. 2013; 140: 223–238.

19. Mostaghel E, Nelson P. Intracrine androgen metabolism in prostate cancer progression: mechanisms of castration resistance and therapeutic implications . Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2008; 22(2):243–258. doi:10.1016/j.beem.2008.01.003

20. Matsumoto T, Sakari M, Okada M et al. The androgen receptor in health and disease. Annu. Rev. Physiol. 2013; 75:201–224. doi 10.1146/annurev-physiol-030212-183656

21. Steinkamp M, O'Mahony O, Brogley M, et al. Treatment-dependent androgen receptor mutations in prostate cancer exploit multiple mechanisms to evade therapy. Cancer Res. 2009; 69: 4434-4442. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3605

22. Robins D. Androgen receptor gene polymorphisms and alterations in prostate cancer: Of humanized mice and men. Molecular and Cellular Endocrinology . 2012; 352: 26–33. doi 10.1016/j.mce.2011.06.003

23. Knudsen K, Penning T. Partners in crime: deregulation of AR activity and androgen synthesis in prostate cancer. Trends in Endocrinology and Metabolism. 2010; 21 (5): 315-324. doi:10.1016/j.tem.2010.01.002

24. Michels H. Rapid actions of androgens. Frontiers in Neuroendocrinology. 2008; 29: 182–198. doi:10.1016/j.yfrne.2007.08.004

25. Foradori C, Handa W. Non-genomic actions of androgens. Frontiers in Neuroendocrinology. 2008; 29: 169–181. doi:10.1016/j.yfrne.2007.10.005

26. Lee C, Olugbade O & Kirschenbaum A. overview of prostate anatomy, histology, and pathology. Endocrinol Metab Clin N Am. 2011; 40: 565–575. doi:10.1016/j.ecl.2011.05.012

27. Singh R, M, Jha R, Melamed J et al. Stromal androgen receptor in prostate development and cancer. The American Journal of Pathology. 2014; 184 (10): 2598- 2607. http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.06.022

28. Unioviedo. Oviedo: Espematogénesis. Sistema reproductor masculino de mamíferos; 2016 Disponible en:
http://www.unioviedo.es/morfologia/asignatu/biologia/embriologia/Library/Pract01.htm#12

29. Molinié V, Baumert H. Nuevos marcadores en las biopsias de prostata. Actas Urol Esp.2007; 31(9): 1009-1024.

30. Hoyos A, Correa J, Hessen M et al. Criterios diagnósticos en 400 biopsias de adenocarcinoma de próstata. Urol Colomb. 2014; 23(1): 35-38.

31. Niu Y, Altuwaijri S, Yeh S et al. Targeting the stromal androgen receptor in primary prostate tumors at earlier stages. PNAS. 2008; 105(34): 12188–12193.

32. Stanbrough M, Leav I, Kwan L et al. Prostatic intraepithelial neoplasia in mice expressing an androgen receptor transgene in prostate epithelium. Medical Science. 2001; 98 (19): 10823–10828.

33. Li Y, Li C, Ye H et al. Decrease in stromal androgen receptor associates with androgen-independent disease and promotes prostate cancer cell proliferation and invasion. J. Cell. Mol. Med. 2008; 12(6): 2790-2798. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00279.x

34. Olapade E, MacKay E, Taub N et al. Malignant transformation of human prostatic epithelium is associated with the loss of androgen receptor inmunoreactivity in the surrounding stroma. Clinical Cancer Research. 1999; 5 (3): 569–576.

35. Goldstein A, Huang J, Guo C, et al. Identification of a cell of origin for human prostate cancer. Science. 2010; 329 (5991): 568–71.

36. Kirschenbaum A, Liu XH, Yao S, et al. Sex steroids have differential effects on growth and gene expression in primary human prostatic epithelial cell cultures derived from the peripheral versus transition zones. Carcinogénesis. 2006; 27(2):216–224.

37. Wang Z, Toivanen R, Bergren S et al. Luminal cells are favored as the cell of origin for prostate cancer. Cell Reports. 2014; 8: 1339–1346. doi:10.1016/j.celrep.2014.08.002

38. Lamont K & Tindall D. Minireview: Alternative activation pathways for the androgen receptor in prostate cancer. Mol Endocrinol. 2011; 25(6):897–907. doi: 10.1210/me.2010-0469

39. Heidegger I, Massoner P, Eder I et al. Novel therapeutic approaches for the treatment of castration-resistant prostate cancer. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 2013; 138: 248– 256.

40. Drugbank 4.1. Canada: The Metabolics Innovation Center; Enero 2016. Disponible en http://www.drugbank.ca/about

41. Micromedex 2.0. Canada: Thompson Health Products; 2016. Disponible en http://www.micromedexsolutions.com/home/dispatch

42. Horwich A, Parker C, Reijke T et al. Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology. 2013; 24 (6): 106–114. doi:10.1093/annonc/mdt208

43. Shafi A, Cox M & Weigel N. Androgen receptor splice variants are resistant to inhibitors of Hsp90 and FKBP52, which alter androgen receptor activity and expression. Steroids. 2013; 78: 548–554.

44. Vaz C, Alvez M, Márquez R et al. Androgen-responsive and nonresponsive prostate cancer cells present a distinct glycolytic metabolism profile. Biochemistry & Cell Biology. 2012;44: 2077–2084.

45. Suburu J & Chen Y. Lipids and prostate cáncer. Prostaglandins & other Lipid Mediators. 2012; 98: 1– 10.

46. Prins G & Lindgren M. Accessory sex glands in the male. in: Plant , Zeleznik , editors. Physiology of Reproduction. Chicago: Academic Press; 2015. p. 773-804.

47. Prevot V. Puberty in mice and rats. Physiology of Reproduction. Lille France: Academic Press; 2015. p. 1395-1439

48. Roy Burman P, Wu H, Powell WC, et al. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. Endocr Relat Cancer 2004; 11:225–54.

49. Estrada R, Zadnik P, Molina C et al. A rat model of metastatic spinal cord compression using human prostate adenocarcinoma: histopathological and functional analysis. The Spine Journal. 2013; 13: 1597–1606.

50. Wang D, Zha X, Nagase K et al. Effects of the 5a-reductase inhibitor dutasteride on rat prostate a1A-adrenergic receptor and its mediated contractility. Urology. 2015; 85 (3): 704-714.

51. Zheng J & Fulu M. Decrease of genital organ weights and plasma testosterone levels in rats following oral administration of leuprolide microemulsión. International Journal of Pharmaceutics. 2006; 307: 209-215. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.007

52. Wu Di & Gore A. Changes in androgen receptor, estrogen receptor alpha, and sexual behavior with aging and testosterone in male rats. Hormones and Behavior. 2010; 58: 306–316. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.03.001

53. Draft OECD Guideline for the Testing of Chemicals. The hershberger bioassay in rats: a short term test for (anti)androgenic properties. 2008. Disponible en http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/41733575.pdf

54. Kennel P, Pallen C & Bars R. Evaluation of the rodent hershberger assay using three reference endocrine disrupters (androgen and antiandrogens) Reproductive Toxicology. 2004; 18: 63–73. doi:10.1016/j.reprotox.2003.10.012

55. Luna L.G. 1968. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. American Registry of Pathology. Blakiston Division, McGraw-Hill. USA;1968.

56. abcam.com. Cambridge, Inglaterra: abcam; [Actualizado 10 Dic 2015]. Diponible en http://www.abcam.com/ps/products/108/ab108666/documents/ab108666%20Testosterone-ELISA%20Kit%20v_9%20(website).pdf.

57. tszelisa.com. Waltham, USA: *tsz elisa;* [Actualizado 2016]. Disponible en http://www.tszelisa.com/index.php?main_page=product_info&cPath=0&products_id=3511

58. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D and R Core Team (2016). *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. R package version 3.1-128. http://CRAN.R-project.org/package=nlme.

59. Montilla J. Relevancia de los tests estadísticos t y f en comparación de medias para muestras independientes. Academia. 2010; 9(18): 4-14.

60. Myles Hollander & Douglas A. Wolfe. Nonparametric Statistical Methods. *Operations* Research.1973: 22 (4): 912-914

61. Mehta C. R. & Patel, N. R. Algorithm 643. FEXACT: A fortran subroutine for Fisher's exact test on unordered r*c contingency tables. ACM Transactions on Mathematical Software. 1986;12 (2): 154-161 doi: 10.1145/6497.214326

62. Sabado J. fundamentos de bioestadística y análisis de datos para enfermería. 1 ed. Barcelona España: Servei. Dic 2009.

63. Tetu B. Morphological changes induced by androgen blockade in normal prostate and prostatic carcinoma. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2008; 22(2): 271–283. doi:10.1016/j.beem.2008.01.005

64. Grossman M et al. Androgens and prostate cancer: pathogenesis and deprivation therapy. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2013; 27: 603-616.

65. Pund C, Partin W, Eisenberger M, et al. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. JAMA 1999;281:1591-7.

66. Cansino JR, Vera R, Bethencourt R et al. Antígeno prostático específico y NF-kB en patología prostática: relación con la malignidad. Actas Urol Esp.2011; 35(1):16-21

67. Veltri R, Rodriguez R. Biología Molecular, endocrinología y fisiología de la próstata y las vesículas seminales. En: Campbell, Walsh . Urología. 9 ed. Buenos Aires: medica panamericana; 2008. P. 2675- 2725

68. Auchus R. The backdoor pathway to dihydrotestosterone. Endocrinology and Metabolism. 2004; 15 (9): 432-438. doi:10.1016/j.tem.2004.09.004

69. Iehlé C, Radvanyi F, Medina S, et al. Diferences in steroid 5a-reductase iso-enzymes expression between normal and pathological human prostate tissue. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.1999; 68:189-195

70. Bratoeff E, Garrido M, Apan T, et al. Effect of dehydroepiandrosterone derivatives on the activity of 5a-reductase isoenzymes and on cancer cell line PC-3. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2014; 22: 6233–6241

71. Byrns M, Mindnich R, Duan L & Penning T. Overexpression of aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) in LNCaP cells diverts androgen metabolism towards testosterone resulting in resistance to the 5reductase inhibitor finasteride. Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 2012; 130: 7– 15

72. Nishiyama T, Ikarashi T, Hashimoto et al. The change in the dihydrotestosterone level in the prostate before and after androgen deprivation therapy in connection with prostate cancer aggressiveness using the gleason score. Urology. 2007; 178: 1282-128

73. Kratzik et al. Lower serum total testosterone is associated with lymph node metastases in a radical prostatectomy cohort study. Anticancer Research. 2011; *31*: 3615-3618.

74. Sun Y, Wang B, Leong K et al. Androgen deprivation causes epithelial-mesenchymal transition in the prostate: implications for androgen-deprivation therapy. *Cancer Res*. 2012; 72:527-536. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3004

75. Fina F, Muracciole X, Rocchi P et al. Molecular profile of androgen-independent prostate cancer xenograft LuCaP 23.1. Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 2005; 96:355–365. doi:10.1016/j.jsbmb.2005.04.041

76. Shidaifat F & Lin Y. Testosterone effect on the expression of genes that mediate testosterone metabolism and genes that mediate the effect of those metabolites on the prostate. Life Sciences . 2012; 91: 194–198. doi:10.1016/j.lfs.2012.07.012

77. Van der Kwast TH, Tetu B, Suburu ER et al. Cycling activity of benign prostatic epithelial cells during long-term androgen blockade: evidence for self-renewal of luminal cells. The Journal of Pathology 1998; 186: 406–409.

78. De Marzo AM, Platz EA, Epstein JI, Ali T, Billis A, Chan TY, et al. A working group classification of focal prostate atrophy lesions. Am J Surg Pathol. 2006; 30: 1281-91.

79. A Celma, P. Serviána, J. Planasa, J. Placera, M.T. Quilezb, M.A. Arbós. de Torres, J. Morotea. Clinical significance of proliferative inflammatory atrophy in prostate biopsy. Actas Urol Esp. 2014; 38(2): 122-126.

80. Davor Tomas, Bozo Kruslin, Hermann Rogatsch, Georg Schafer, Mladen Belicza, Gregor Mikuz. Different types of atrophy in the prostate with and without adenocarcinoma. European Urology. 2007; 51: 98–104

81. Bosland M.C., Tuomari D.L., Elwell M.R., et al. Proliferative lesions of the porostate and other accessory sex glands in male rats. Guides for Toxicologic Pathology. 1998; 1-20.

82. Tuxhorn J.A., Ayala G.E., Smith M.J., Smith V.C., Dang T.D., Rowley D.R. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. Clinical Cancer Research. 2002; 8: 2912–2923

83. Araujo A & Wittert G. Endocrinology of the aging male. Best practice & research clinical endocrinology & metabolism. 2011; 25: 303–319

84. Rongbin G, Wang Z, Bechis S, et al. DNA methyl transferase 1 reduces expression of SRD5A2 in the aging adult prostate. American Journal of Pathology. 2015; 185(3)

85. Otsetov A. Influence of Age and Obesity on 5α-Reductase 2 Gene Expression. Curr Bladder Dysfunct Rep .2016 11:140–145

86. Thomas L, Douglas R, Lazier C, et al. Type 1 and type 2 5a-reductase expression in the development and progression of prostate cancer. european urology . 2 0 0 8; 53: 244–252

87. Labrie F. Combined blockade of testicular and locally made androgens in prostate cancer: A highly significant medical progress based upon intracrinology. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 2014:1-13.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.05.012

88. Mustafa E.A., Mansoor M.A., El-Atyy E.H., Ibrahim A.S. Postnatal developmental changes of the prostatic gland in albino rat. Journal of American Science. 2013; 9(7): 141-149.