

CONTENIDO

COMUNICACIONES

▪ Abstract
 ▪ PDF
 ▪ Comentarios
 ▪ Título
 ▪ Resumen
 ▪ Introducción
 ▪ Material
 ▪ Resultados
 ▪ Discusión
 ▪ Conclusiones
 ▪ Referencias
 ▪ Imágenes

PROLIFERACIÓN CELULAR Y EXPRESIÓN DE BCL-2 Y TGFβ1 EN LESIONES DISPLÁSICAS INDUCIDAS EN PRÓSTATA VENTRAL DE RATA, POR EXPOSICIÓN CRÓNICA A CLORURO DE CADMIO.

Luis Santamaría^{*}, Rocío Martín^{*}, José Juan Martín[†].

Departamento de Morfología (Histología) F. Medicina, UAM. Madrid^{*}. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Ntra. Sra. de Sonsoles, Ávila. Departamento de Anestesiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid, España.

IV-CVHAP 2001 COMUNICACIÓN-E - 012

Fecha recepción: 08/01/2001
 Fecha evaluación: 28/02/2001
 Fecha publicación: 17/03/2001

RESUMEN

Introducción: Se caracterizan cambios displásicos del epitelio prostático ventral de ratas tratadas con cadmio por vía oral. Se cuantificó la proliferación celular por inmunotinción para PCNA, así como las inmunotinciones para un marcador de resistencia a la apoptosis (bcl-2) y para TGFβ1, también implicado en procesos de modulación de proliferación y apoptosis.

Material y métodos: Se utilizaron 25 ratas Wistar expuestas a cloruro de cadmio (60 ppm administradas continuamente en el agua de bebida, durante 18 meses) y otras 25 no tratadas. El PCNA fue evaluado mediante el índice de marcaje -LIpcna- (% de núcleos inmunoreactivos sobre el total de núcleos epiteliales). El bcl-2 y TGFβ1 fueron evaluados mediante la estimación de la densidad de área epitelial inmunoteñida -Vvbc1-2, VvTGFβ1- (área inmunoteñida / área de referencia). Para la realización de las mediciones se usó un sistema de proceso de imágenes. Las medias +/- SD fueron comparadas mediante ANOVA, entre controles, experimentales y lesiones displásicas.

Resultados: Se han detectado lesiones displásicas multifocales en la próstata ventral de 5 animales tras 18 meses de exposición a cadmio. LIpcna, Vvbc1-2 y VvTGFβ1 mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$) en las displasias, en comparación con los controles y con los acini no displásicos de los animales experimentales. Se ha observado también incremento significativo ($p < 0.05$) del LIpcna en las glándulas no displásicas de los experimentales, en comparación con los controles.

Conclusiones: La exposición crónica oral a bajas concentraciones de cadmio origina displasia en la próstata de la rata, caracterizada por incremento de la proliferación celular, de la resistencia a la apoptosis, y de la expresión de TGFβ1 (que, como en el caso del cáncer de próstata humano, podría ser ineficaz para activar la apoptosis). Estos hallazgos permiten establecer similitudes entre el PIN humano y el presente modelo de preneoplasia experimental.

Palabras clave: modelo experimental | PIN | próstata | cadmio | proliferación celular | bcl-2 | TGFβ1

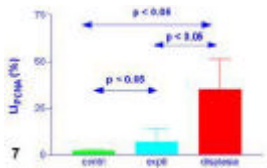


Fig. 7.

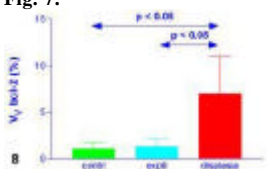


Fig. 8.

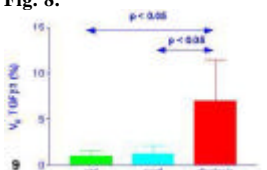


Fig. 9.



Figura 1.

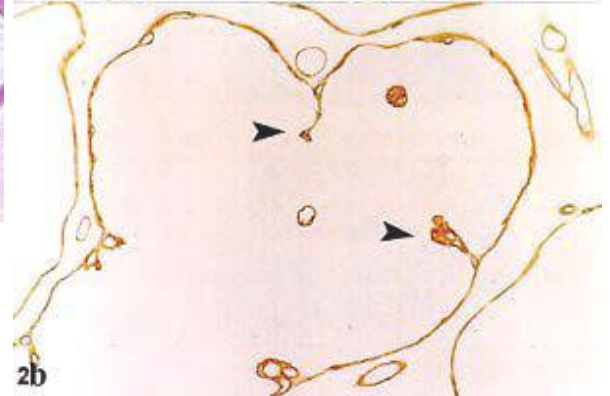


Figura 2a y 2b

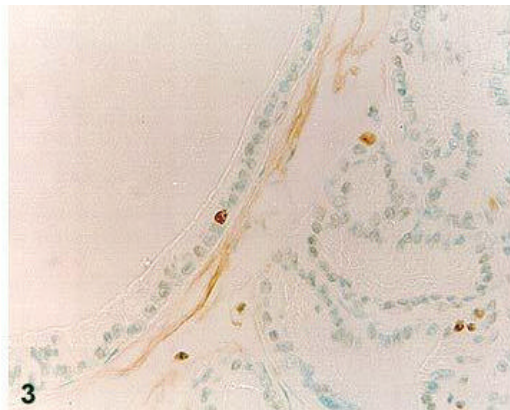


Figura 3.

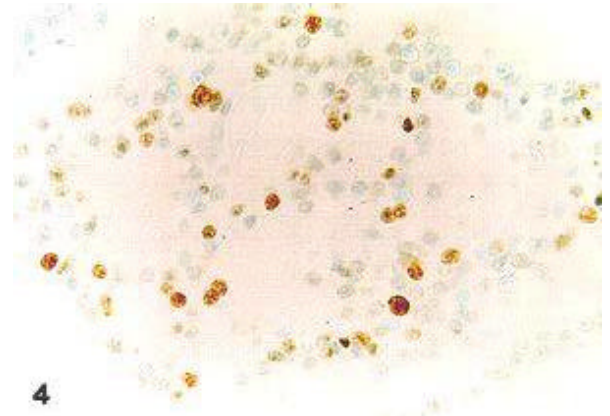


Figura 4.

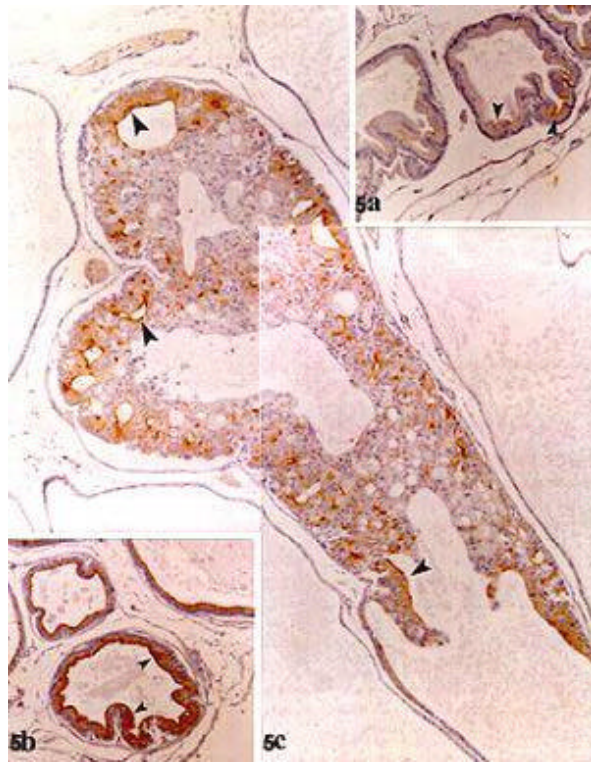


Figura 5a, 5b, y 5c.

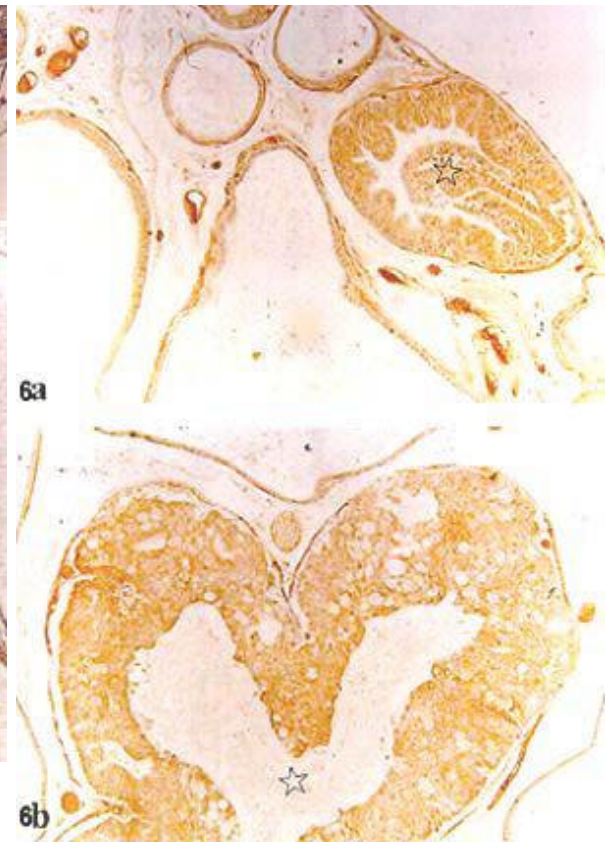


Figura 6a y 6b.

INTRODUCCIÓN

Las relaciones entre neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y carcinoma invasivo de próstata, están bien documentadas en el hombre (1,2). Diversos estudios han llegado a la conclusión de que el PIN de alto grado representa una lesión premaligna que podría evolucionar hacia la neoplasia invasiva (2).

Se han desarrollado diversos modelos de carcinogénesis prostática en ratas (3-6), observándose semejanzas morfológicas entre el PIN humano y los cambios displásicos promovidos experimentalmente en roedores (7). Sin embargo, se han realizado hasta la fecha escasos estudios usando en ratas los marcadores que caracterizan el PIN humano (8,9).

Por otro lado, existen estudios epidemiológicos que establecen relaciones entre la exposición ocupacional y/o ambiental al cadmio y el cáncer de próstata, observándose que los niveles de cadmio en próstata se correlacionan con la incidencia del adenocarcinoma prostático (10). También se ha comprobado que el cloruro de cadmio produce lesiones epiteliales premalignas y/o invasivas en la próstata ventral de la rata cuando se administra en el agua de bebida (10,11).

El presente trabajo se propone dilucidar si los cambios causados en el lóbulo ventral de la próstata de la rata originados por ingesta de cadmio (una ruta de administración de interés para la exposición de este metal en humanos), son morfológica e inmunofenotípicamente similares a los detectados en el PIN humano. Con este fin, se realizarán los siguientes estudios: (a) evaluación de la proliferación celular (mediante la cuantificación de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular -PCNA-); (b) cuantificación del marcador de resistencia a la apoptosis bcl-2; (c) cuantificación del factor transformador del crecimiento TGFb1, regulador de la deposición de matriz extracelular y de la proliferación epitelial.

Se han utilizado 50 ratas macho Wistar adultas, que pesaban un promedio de 200 g al comienzo del experimento. A 25 animales se les añadió en el agua de bebida cloruro de cadmio (Panreac, Madrid, España), a una concentración de 60 ppm, durante todo el transcurso del experimento (18 meses). En este tiempo se administró agua de bebida libre de cadmio a las 25 ratas restantes (controles).

Al concluir los 18 meses, todas las ratas fueron sacrificadas por narcosis con CO₂. El complejo prostático fue disecado, separándose el lóbulo ventral, el cual fue incluido en agar y seccionado exhaustivamente en rodajas de 2 mm de espesor, perpendiculares al eje sagital de la glándula. Dichas rodajas se fijaron en metacarn (metanol-cloroformo- ácido acético, 6:3:1) durante 24hrs y se incluyeron en parafina.

De cada animal se seleccionaron 3 bloques (cada bloque contiene una rodaja) mediante muestreo sistemático al azar (Systematic Random Sampling: SRS) (12). De cada bloque se efectuaron cortes seriados de 5µm, parte de ellos se tiñeron con hematoxilina-eosina y parte se destinaron a inmunohistoquímica.

Puesto que los animales expuestos a cadmio (experimentales) mostraban grupos de acini displásicos entremezclados con grupos de acini histológicamente normales, ambos tipos de acini se evaluaron por separado. En los 5 animales que manifestaron alguna displasia focal, todas las secciones seriadas de los 3 bloques seleccionados fueron estudiadas, encontrándose un promedio de 5 displasias (rango: 2-7) por animal. Para la realización de la cuantificación, dentro de cada foco displásico se seleccionaron 5 campos mediante muestreo SRS. Para la evaluación de los acini no displásicos, se seleccionaron así mismo 5 cortes por bloque mediante SRS. El mismo procedimiento de muestreo fue usado para las ratas control.

Se inmunotñieron al menos 10 cortes por antígeno a estudiar y por próstata, tanto en el grupo experimental como en el control. Los cortes desparafinizados y rehidratados fueron tratados durante 30 minutos con agua oxigenada (0.3% en PBS, pH 7.4) para bloquear la peroxidasa endógena. Se utilizaron anticuerpos primarios monoclonales obtenidos en ratón. Para PCNA: anticuerpo anti PC10 (Biomeda, Foster City, USA) a 1:400. Para analizar el balance entre proliferación y apoptosis (14) se utilizó un anticuerpo contra la proteína bcl-2 (Dako, Glostrup, Dinamarca), diluido a 1:20 y un anticuerpo anti TGFβ1 (Serotec, Oxford, UK), diluido a 1:100. Para visualizar la membrana basal de los acini se empleó un anticuerpo anti colágeno IV (Biogenex, San Francisco, Ca, USA) diluido a 1:100. Las secciones inmunoteñidas para bcl-2 fueron pretratadas por calor a alta presión (olla a presión) en un buffer citrato. Todos los anticuerpos fueron diluidos en PBS con 1% de albúmina (BSA). Todas las incubaciones con los antisueros primarios se efectuaron a 4° C en cámara húmeda, durante toda la noche.

Como anticuerpo secundario se empleó una inmunoglobulina biotinilada anti-ratón (Dako) diluida a 1:400. A continuación, los cortes fueron incubados con un complejo de estreptavidina-biotina-peroxidasa (Dako). El producto de la inmunotinción fue revelado usando 3,3'-diaminobencidina (Sigma, Barcelona, España) más peróxido de hidrógeno.

Después de la inmunotinción, los cortes fueron contrastados con verde de metilo o con hematoxilina de Harris; deshidratados en serie creciente de alcoholes, aclarados en xilol y montados en Depex (Serva, Heidelberg, Alemania).

La especificidad de las inmunotinciones fue comprobada mediante incubación de algunos cortes con suero no inmune en substitución del anticuerpo primario.

La proliferación celular fue cuantificada evaluando el porcentaje de núcleos inmunoteñidos para PCNA (LIPCNA) (14), que fue calculado en cada corte seleccionado en ratas control, acini displásicos de ratas tratadas y acini displásicos de ratas tratadas, utilizando la siguiente fórmula: N° de núcleos marcados X 100 / n° total de núcleos (marcados + no marcados).

Las mediciones fueron efectuadas mediante un microscopio Olympus equipado con un objetivo de inmersión de 100X (apertura numérica: 1.4), a unos aumentos finales de 1200X. Se empleó el software de estereología GRID (Interactivision, Silkeborg, Dinamarca). Este programa permite la selección de los campos de medida mediante SRS. Se analizó un promedio de 20 campos/corte, evaluándose un total de 500 núcleos/corte en cada grupo (controles, no displásicos, displásicos) por animal. La selección sistemática de campos con comienzo al azar (método SRS) asegura que las estimaciones de proliferación celular fueron representativas de todo el tejido prostático, ya que no todas las regiones de la glándula muestran la misma tasa de proliferación (15). La inmunorreactividad para PCNA fue considerada positiva, independientemente de la intensidad de inmunotinción.

Para cuantificar la inmunoreactividad para bcl-2 y TGFb1 se ha estimado su fracción de volumen (VV), es decir la razón entre el área inmunoteñida del epitelio y el área de tejido epitelial acinar (área de referencia, un promedio de 2000 $\mu\text{m}^2/\text{campo}$). El VV se expresó como porcentaje de epitelio inmunoteñido.

La estimación de VV bcl-2 y VV TGFb1 fue realizada usando el programa de dominio público NIH Image, desarrollado por US National Institute of Health y que está disponible en Internet en <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/> (16). Los campos seleccionados por SRS se fotografiaron a unos aumentos finales de 500X, se digitizaron mediante un scanner HP y más tarde fueron capturados por el programa de análisis de imagen, umbralizados y binarizados, de modo que el porcentaje de área epitelial inmunoteñida fue automáticamente medido para la obtención de VV.

Se obtuvo la media \pm SD de las estimaciones de LIPCNA, VV bcl-2 y VV TGF b1 para cada próstata ventral en los tres grupos (acini de próstatas control, acini no displásicos de ratas experimentales y acini displásicos de ratas experimentales). Las diferencias entre medias fueron evaluadas por ANOVA, siendo efectuada la comparación entre cada par de medias por medio de la prueba de Fisher y Behrens. Se seleccionó un nivel de significación de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Se han detectado cambios displásicos multifocales en 5 de los 25 animales, después de 18 meses de exposición oral a cloruro de cadmio. Los acini de los animales control mostraban un epitelio columnar monoestratificado (Figura 1), mientras que los acini displásicos aparecían revestidos por un epitelio engrosado irregularmente (Figura 2a). Los acini no displásicos de ratas tratadas con cadmio mostraban una morfología similar a la de los controles. En comparación con los controles (Figura 1), las glándulas displásicas mostraron un mayor tamaño (Figura 2a), presentando con frecuencia un patrón cribiforme. Los núcleos presentaron importante heterogeneidad de tamaño, con nucleolos usualmente prominentes. No se detectaron figuras de mitosis ni infiltración del estroma circundante. La membrana basal de los acini displásicos evidenció una intensa inmunoreactividad para colágeno IV, no mostrando interrupciones (Figura 2b).

Los acini displásicos mostraban una cantidad de núcleos inmunoteñidos para PCNA mayor que los controles (Figura 3 y Figura 4). La inmunoreactividad para bcl-2 fue más evidente en el epitelio de los acini displásicos que en los controles o en los acini normales de las ratas experimentales. La inmunoreactividad para bcl-2 en controles y acini no displásicos era de aspecto granular y se expresaba predominantemente en el borde apical del epitelio. En las glándulas displásicas, la inmunotinción para bcl-2 era más abundante y más extendida a todo el citoplasma, siendo más evidente cerca de la luz de las estructuras cribiformes (Figura 5). La inmunoreactividad para TGFb1 era heterogénea en la próstata control, observándose más inmunoreactividad en los acini más periféricos (Figura 6a). En los acini displásicos la inmunotinción para TGFb1 era intensa y distribuida uniformemente por todo el epitelio (Figura 6b).

El LIPCNA fue significativamente más alto ($p < 0.05$) en los acini displásicos en comparación tanto con los acini normales de las ratas tratadas como con los acini de las ratas control. Las diferencias entre estos dos últimos grupos también fueron significativas ($p < 0.05$) (Figura 7). Se ha detectado un incremento significativo ($p < 0.05$) de VV bcl-2 y de VV TGFb1 en el epitelio displásico en comparación tanto con los acini normales de las ratas tratadas como con los acini de las ratas control. No se han detectado diferencias significativas entre estos dos últimos grupos (Figura 8 y Figura 9).

DISCUSIO

N

El presente estudio confirma las observaciones de diversos autores sobre el papel del cadmio en la carcinogénesis prostática (10,11). Han sido reseñadas muchas descripciones de los cambios preneoplásicos causados por el cadmio u otros agentes carcinogénicos (3-7, 11, 17, 18), sin embargo, no se ha efectuado hasta la fecha una evaluación cuantitativa de los hallazgos inmunohistoquímicos.

Un estudio previo (19) estimó los cambios histológicos observados en la próstata de la rata tratada por cadmio, desde el punto de vista de la heterogeneidad del tamaño nuclear. Las lesiones observadas fueron histológicamente similares a las descritas como hiperplasia prostática atípica inducida en ratas por tratamiento con fenilefrina (20), y comportaban un incremento en la densidad numérica celular (número de células por unidad de volumen de tejido epitelial prostático). Los cambios proliferativos descritos en el presente estudio están de acuerdo con el incremento de la actividad proliferativa descrita en trabajos previos (21, 22) y sugieren que el daño tisular repetido y la subsecuente reparación por proliferación celular pueden originar promoción tumoral (23). Cuando la exposición al cadmio se prolonga en el tiempo, algunas áreas focales del epitelio podrían experimentar transformación en el sentido de un incremento de la expresión de bcl-2, lo cual originaría una resistencia focal a la apoptosis. Este incremento de bcl-2, junto con la proliferación podría inducir la progresión hacia la displasia en esas áreas, como ha sido postulado para el PIN humano (24,25). Como ha sido demostrado en otro estudio (26), la combinación de una baja tasa de apoptosis con elevada actividad proliferativa puede contribuir a un incremento de la densidad de la población celular tal como se evidencia en los acini displásicos. La oncoproteína bcl-2 se ha asociado a la progresión de las células del cáncer de próstata humano hacia un fenotipo metastásico (8). Esta proteína también aparece implicada en la tumorigénesis temprana (27) y confiere resistencia a la apoptosis andrógeno-dependiente del epitelio displásico (28). Es conocida la complejidad de acción del TGFb1 en distintos sistemas orgánicos. Se trata de un factor multifuncional, que en ocasiones puede activar la proliferación, en otras inhibirla, siendo capaz también de regular la deposición de matriz extracelular y la angiogénesis (29). En el cáncer de próstata humano y en diversos modelos experimentales se ha detectado incremento tanto in vivo como in vitro de TGFb1, se piensa que este factor sería capaz de inhibir la proliferación o incrementar la apoptosis in vitro pero no in vivo (29). En el presente estudio el incremento observado de TGFb1 es un dato más que apoya el carácter pretumoral de las lesiones ocasionadas por el cadmio y su semejanza con el PIN humano.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que los cambios displásicos inducidos por el cloruro de cadmio en la próstata ventral de la rata muestran similitudes con el PIN humano en lo que respecta a los hallazgos morfológicos, la actividad proliferativa y la expresión incrementada de bcl-2 y TGFb1.

NOTAS AL PIE DE PÁGINA

Correspondencia: Luis Santamaría Solís. Departamento de Morfología (Histología). Facultad de Medicina UAM C/ Arzobispo Morcillo, 2, 28029-Madrid. España. <mailto:luis.santamaria@uam.es>

REFERENCIAS

1. Bostwick DG: Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): Current concepts. *J Cell Biochem Suppl* 1992;16:10- 19.
2. Haggman MJ, Macoska JA, Wojno KJ, Oesterling JE: The relationship between prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: critical issues. *J Urol* 1997;158:12-22.
3. Schleicher RL, Fallon MT, Austin GE, Zhang M, Dillehay DL, Collins DC: Intravenous versus intraprostatic administration of N-methyl-N-nitrosourea to induce prostate cancer in rats. *Prostate* 1996;28:32- 43.
4. Bosland MC, Ford H, Horton L: Induction at high incidence of ductal prostate adenocarcinomas in NBL/Cr and Sprague-Dawley Hsd:SD rats treated with a combination of testosterone and estradiol-17b or diethylestilbestrol. *Carcinogenesis* 1995;1311-1317.
5. Shirai T, Imaida K, Masui T, Iwasaki S, Mori T, Koto T, Ito N: Effects of testosterone, dihydrotestosterone

and estrogen on 3,2-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced rat prostate carcinogenesis. *Int J Cancer* 1994;57:224- 228.

6. Bosland MC: Animal models for the study of prostatic carcinogenesis. *J Cell Biochem Suppl* 1992;16:89- 98.

7. Pylkkänen L, Mäkelä S, Santti R: Animal models for the preneoplastic lesions of the prostate. *Eur Urol* 1996;30:243-248.

8. Furuya Y, Krajewski S, Epstein JI, Reed JC, Isaacs JT: Expression of bcl-2 and the progression of human and rodent prostatic cancers. *Clin Cancer Res* 1996;2:389-398.

9. Shibata MA, Ward JM, Devor DE, Liu ML, Green JE: Progression of prostatic intraepithelial neoplasia to invasive carcinoma in C3(1)/SV40 large J antigen transgenic mice : histopathological and molecular biological alterations. *Cancer Res* 1996;56:4894-4903.

10. Waalkes MP, Rehm S: Cadmium and prostate cancer. *J Toxicol Environ Health* 1994;43:251-269.

11. Waalkes MP, Rehm S: Carcinogenicity of oral cadmium in the male Wistar (WF/NCr) rat: Effect of chronic dietary zinc deficiency. *Fund Appl Toxicol* 1992;19:512-520.

12. Howard CV, Reed MG: "Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy". 1st ed. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 1998.

13. Lu QL, Abel P, Foster CS, Lalani E: Bcl-2: Role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol* 1996;27:102-110.

14. Connolly KM, Bogdanffy S: Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: A dual-stain comparison with 5-bromo 2' deoxyuridine. *J Histochem Cytochem* 1993;41:1-6.

15. Sensibar JA: Analysis of cell death and cell proliferation in embryonic stages, normal adult, and aging prostates in human and animals. *Microsc Res Techn* 1995;30:342-350.

16. Rasband WS, Bright DS: NIH Image: A public domain image processing program for the Macintosh. *Microbeam Anal* 1995;4:137-149.

17. Hoffmann L, Putzke HP, Bendel L, Erdmann T, Huckstorf C: Electron microscopic results on the ventral prostate of the rat after CdCl₂ administration. A contribution towards etiology of the cancer of the prostate. *J Cancer Res Clin Oncol* 1988;114:273-278.

18. Cohen MB, Heidger PM, Lubaroff DM: Gross and microscopic pathology of induced prostatic complex tumours arising in Lobund-Wistar rats. *Cancer Res* 1994;54:626-628.

19. Santamaria L, Martin R, Martin JJ: Volume-weighted mean nuclear volume in dysplastic glands from the ventral prostate of rats treated with cadmium chloride, and resembling human prostatic intraepithelial neoplasia. *Acta Stereol* 1998;34:214-221.

20. Golomb E, Kruglikova A, Duir D, Parnes N, Abramovici A: Induction of atypical prostatic hyperplasia in rats by sympathomimetic stimulation. *Prostate* 1998;34:214-221.

21. Montironi R, Magi-Galluzzi C, Marina S, Diamanti L: Quantitative characterization of the frequency and location of cell proliferation and death in prostate pathology. *J Cell Biochem Suppl* 1994;19:238-245.

22. Santamaria L, Martin R, Martin JJ: Cell proliferation and bcl-2 protein immunoreactivity in dysplastic lesions induced by chronic exposure to cadmium chloride in rat ventral prostate (abstract). *Biol Reprod* 1998;58 Suppl 1:205A.

23. Waalkes MP, Coogan TP, Barter RA: Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit Rev Toxicol* 1992;22:175-201.

24. Stattin P, Damber JE, Karlberg L, Nordgren H, Bergh A: Bcl-2 immunoreactivity in prostate tumorigenesis in relation to prostatic intraepithelial neoplasia, grade, hormonal status, metastatic growth and survival. *Urol Res* 1996;24:257-264.

25. Bostwick DG: Progression of prostatic intraepithelial neoplasia to early invasive adenocarcinoma. *Eur Urol* 1996;30:145-142.
26. Martin JJ, Martin R, Codesal J, Fraile B, Paniagua R, Santamaria L: Cadmium chloride- induced dysplastic changes in the ventral rat prostate: An immunohistochemical and quantitative study. *Prostate* 2001;46:11-20.
27. Morton DH, Barrack ER: Modulation of transforming growth factor beta-1 effects on prostate cancer proliferation by growth factors and extracellular matrix. *Cancer Res* 1995;55:2596-2602.
28. Bonkhof H, Fixemen T, Remberger K: Relation between bcl-2, cell proliferation and the androgen receptor status in prostate tissue and precursors of prostate cancer. *Prostate* 1998;34:251-258.