TRABAJOS ORIGINALES

OBTENCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE ESTROMA PROSTÁTICO BENIGNO Y TUMORAL MEDIANTE EXPLANTES DE TEJIDO DESDE BIOPSIAS POR PUNCIÓN

OBTAINING PRIMARY CULTURES OF BENIGN AND TUMORAL PROSTATIC STROMAL TISSUE THROUGH EXPLANTS FROM NEEDLE BIOPSIAS

Javier Cerda-Infante[1], Ignacio F. San Francisco[2], Rodrigo Pinochet[3], Sergio Guzmán[2], Álvaro Zuñiga[2], Javier Domínguez[2], José Antonio Salvadó[2] & Viviana P. Montecinos[1*]
Departamento [1]Hematología-Oncología y [2]Urología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago Chile. [3]Departamento Urología, Hospital Sótero del Río, Santiago, Chile.

RESUMEN

Introducción: La progresión del cáncer de próstata (CaP) es regulada por el microentorno tumoral, el cual tiene como principal componente el estroma asociado al carcinoma (CAS). Sin embargo, los métodos experimentales usando cultivos primarios para modelar el comportamiento del estroma tumoral han sido insatisfactorios debido a la dificultad de obtener cultivos primarios de células estromales prostáticas humanas (HPSCs) con alta proporción de CAS. Así, el objetivo de este estudio consistió en estandarizar una metodología que permita la obtención de cultivos primarios de HPSCs con alta proporción de CAS. Métodos: Se recolectaron biopsias prostáticas de 10 pacientes, 5 de ellos con CaP localmente avanzado y/o metastásico, y 5 sin evidencia de neoplasia. Se evaluó la proporción estromal por estudios histológicos y se estandarizó la obtención de cultivos primarios de HPSCs mediante explantes de tejido. Los cultivos se caracterizaron por curvas de crecimiento y proliferación. Resultados: El tejido obtenido desde biopsias prostáticas por punción de pacientes con CaP localmente avanzado y/o metastásico presentan alta proporción de CAS. La técnica explantes de tejido permite la obtención de cultivos primarios de HPSCs desde biopsias, indicando además que los cultivos primarios de CAS presentan un patrón de crecimiento y proliferación superior a las células obtenidas de tejido benigno (BAS). Discusión: Nuestro estudio demuestra que a través de la técnica explantes de tejido es posible obtener cultivos primarios de HPSCs con CaP invasor, debido que estos presentan zonas con alta proporción de CAS.
***Palabras clave**: Biopsias prostáticas, explantes, CaP invasor & estroma tumoral.*

ABSTRACT

Introduction: Tumor microenvironment plays a critical role in the progression of prostate cancer (CaP), which main component is the «carcinoma associated stroma» (CAS). However, the in vitro models utilizing human prostate stroma cells (HPSCs) as primary cultures have failed in recapitulate the human prostate microenvironment due to the unfeasibility to obtain primary cultures of HPSCs with a pure population of CAS. The aim of this study was to standardize a new methodology that allow to obtain primary cultures of HPSCs with high proportion of CAS. Methods: Primary cultures of HPSCs were obtained from explants of human needle biopsies from 5 benign and 5 locally advanced and/or metastatic human prostate tissues. The primary cell cultures were characterized by proliferation rates and growth curves. Results: Locally advanced and/or metastatic prostate needle biopsies exhibit a high presence of CAS. The analysis of human primary cultures isolated from benign and malignant prostate tissue explants revealed distinctive populations of HPSCs that can be distinguishable by proliferation rates and growth curves. Discussion: Our studies demonstrated for the first time that prostate tissue explants from needle biopsy represents a feasible technique to obtain primary cultures of stromal cells from benign and malignant tissues and represents in more accurate way the complexity of the tumor microenvironment.
***Key words**: Prostate biopsies, explants, invasive CaP & tumor-stroma.*

INTRODUCCIÓN

El tejido prostático está conformado por dos compartimentos principales: las células epiteliales (glandular) y el tejido conectivo o estroma (fibromuscular). El estroma que rodea las células epiteliales en próstatas benignas está compuesto por una estructura conformada por fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliales y pericitos, los cuales interactúan entre si proporcionando a las células epiteliales el soporte físico y nutricional necesario para realizar su función[1]. Por otro lado, el estroma asociado a un carcinoma (CAS), a pesar de no ser canceroso, difiere sustancialmente en estructura y función al estroma presente en tejidos benignos, exhibiendo un fenotipo activado, caracterizado por alteración en la relación miofibroblastos/ fibroblastos y disminución significativa o pérdida total del fenotipo de músculo liso diferenciado acompañados por un aumento en la expresión de colágeno tipo I y III, tenascina y proteína activadora de fibroblastos (FAP). Estos cambios estructurales y funcionales conforman el llamado microentorno tumoral[1-5]. La presencia de CAS en el microentorno tumoral ha sido observado en muchos tumores sólidos, incluyendo cáncer de mama[3], CaP[4], cáncer de piel[6] y cáncer colorrectal[7].

Diversos trabajos se han enfocado en dilucidar el rol de CAS en CaP. En 1999 Cunha y colaboradores[4], trabajando con cultivos primarios de estroma de próstata de tejido benigno y maligno, demostraron un exacerbado crecimiento tumoral en tumores de líneas celulares implantados en animales que contenían el estroma de pacientes con CaP, en comparación con el crecimiento alcanzado con los tumores que contenían estroma extraído de próstata no cancerosa. Estos datos *in vivo* se correlacionan con los estudios histopatológicos desarrollados por el grupo de Rowley donde se analizaron las alteraciones en los componentes del estroma de tumores prostáticos en una cohorte de más de 800 pacientes con CaP luego de la prostatectomía radical (PR). Este estudio reveló que pacientes que poseían alteraciones histológicas estromales más profundas (estroma reactivo grado 3), tenían una sobrevida estadísticamente menor, aún cuando tuviesen el mismo grado de diferenciación cancerosa (score de Gleason)[8]. Estos resultados demuestran que las alteraciones en el microentorno que rodea las células cancerosas tienen incidencia a tal nivel en la progresión del carcinoma que, son capaces de definir la sobrevida de estos pacientes. A pesar de ésto, los mecanismos moleculares responsables del incremento en la progresión tumoral por parte de CAS aún no han sido totalmente dilucidados.

La principal dificultad para lograr resultados esclarecedores en estudios in vitro ha sido la imposibilidad de obtener cultivos primarios estromales de próstata con alta proporción de estroma asociado a tejido benigno (BAS) o CAS[9]. Esto se debe principalmente a que los procedimientos actualmente utilizados se basan en la obtención de células estromales mediante digestión enzimática de grandes zonas de tejido de próstata designadas como tumoral y/o benigna luego de PR. Este procedimiento no considera la compleja heterogeneidad histológica del CaP, en el que las células tumorales y CAS se encuentran dispersos a través de toda la extensión glandular en la zona periférica prostática (PZ), por lo que en las áreas seleccionadas para obtención de cultivos primarios existe una mezcla de BAS y CAS.

El objetivo de nuestro trabajo fue la estandarización de una técnica que permita obtener cultivos primarios de estroma tanto benigno como tumoral con alta proporción de BAS y/o CAS. Para ello, utilizamos la técnica de explantes de tejido obtenidos desde biopsias por punción de pacientes sin evidencia de neoplasia o con CaP localmente avanzado y/o metastásico, que al examen rectal presentaban infiltración total de la próstata por tumor (T3). Los cultivos primarios de células estromales de próstata humana (HPSCs) obtenidos desde estos explantes se caracterizaron de acuerdo a sus curvas de crecimiento y proliferació.

Nuestros resultados demuestran que mediante la técnica de explantes de tejido desde biopsias por punción es posible obtener cultivos primarios de HPSCs con alta proporción de BAS y/o CAS. Los cultivos primarios obtenidos desde tejido con alta proporción de CAS presentaron tasas de proliferación estadísticamente superiores a los cultivos de BAS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de tejido prostático. El tejido prostático necesario para el presente estudio, se obtuvo mediante biopsias por punción de pacientes que presentaban sospecha de neoplasia por sus niveles de antígeno prostático específico (APE) o de pacientes con infiltración de toda la superficie prostática de acuerdo al tacto rectal (T3 total). Se recibieron dos cilindros de tejido por paciente cuyas dimensiones fueron de 1-2 cms de largo y 0,8-1,0 mm de grosor. Luego del informe histopatológico, las muestras incluidas en el presente estudio se seleccionaron de acuerdo a dos criterios: benignas, muestras de zona periférica sin evidencia de neoplasia confirmada por el informe anatomopatológico; y tumorales, muestras de zona periférica extraída de próstatas de pacientes con cáncer de próstata clínicamente T3 de toda la superficie prostática y con cáncer confirmado en el informe de anatomía patológica (Tabla 1).

Todos los pacientes previa realización de la biopsia por punción firmaron un consentimiento informado emanado desde el comité de ética, PUC, autorizando el uso de las muestras de tejido para este estudio.

Análisis histológico por Hematoxila/Eosina (H&E). El análisis histológico se realizó mediante muestras congeladas. Los cortes de tejido de 3 mm^3 fueron incluidos en una resina criopreservadora (OCT, Sakura Tissue Tek, USA). Las muestras se conservaron a -80°C hasta su seccionamiento en un criostato (Leica Microsystems, Exton, PA). Cortes de 10um de grosor fueron fijados con etanol 70% y teñidos 5 minutos con Hematoxilina (Mayer) y 3 minutos con Eosina (Polyscienses Inc)

Cultivos primarios de estroma prostático. La obtención de HPSCs se realizó mediante explantes de tejido. Los cilindros de tejido prostático se cortaron en pequeños trozos 0,5-1,0 mm^3, los cuales se depositaron en una placa de cultivo celular de 60 mm, en la cual previamente se marcaron con un bisturí cruces de aproximadamente de 1cm, con el objetivo de asegurar la adherencia del tejido a la placa de cultivo. Luego de la adherencia al plástico se agregó medio de cultivo DMEM (HyClone Laboratorios, Inc. South Logan) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, HyClone Laboratorios), 100 U/ml penicilina-100 ug/ml estreptomicina (Gibco, BRL Life Technologies, Gaithersburg, USA) y ciprofloxacino 1ug/mL (Laboratorio Chile). Las condiciones de cultivo fueron 37°C en 95% O2 5% CO_2 atmosférico. Durante los 5 primeros días se cambió el medio cada 24 horas, desde el quinto día el recambio del medio de cultivo se realizó cada 3-5 días.

Los términos utilizados en este estudio de BAS y CAS hacen referencia al origen patológico de las células estromales de próstata humana (HPSCs), BAS proviene del inglés «*Bening-associated estroma cells»* y CAS deriva de «*Carcinoma-associated stoma cells*». Por lo que los cultivos de HPSCs provenien-

Tabla 1. Resumen de muestras seleccionadas para la obtención de HPSCs en el estudio. Zona Periférica (PZ), Estroma Asociado a tejido Benigno (BAS), Estroma Asociado a Carcinoma (CAS).

	Sigla	Diagnóstico	Edad	PSA	Gleason	Metástasis
	PZ-BAS-1	Prostatitis	67		N/A	N/A
	PZ-BAS-2	Prostatitis	58	7,5	N/A	N/A
PZ-B	PZ-BAS-3	S/evidencia Neoplasia	55	7	N/A	N/A
	PZ-BAS-4	S/evidencia Neoplasia	64	28	N/A	N/A
	PZ-BAS-5	S/evidencia Neoplasia	58	4,3	N/A	N/A
	PZ-CAS-1	CaP invasivo	64	3008,8	4+3	M1
	PZ-CAS-2	CaP invasivo	74	92		M1
PZ-C	PZ-CAS-3	CaP invasivo	82	4730		M1
	PZ-CAS-4	CaP invasivo	85	278,99		M1
	PZ-CAS-5	CaP invasivo	41			M1

tes de tejido benigno recibieron la denominación de PZ-BAS y aquellos cultivos obtenidos de tejido tumoral recibieron la denominación de PZ-CAS, el prefijo PZ se debe a la zona de obtención de las biopsias (zona periférica).

Curvas de crecimiento celular. Para determinar el tiempo de duplicación (Dt, *Doubling time*) y la curva de crecimiento de cada población celular, se realizó un conteo de numero de células a distintos tiempos. En una placa de 96 pocillos se sembraron 5000 células por pocillo, cultivadas en DMEM 10% de SFB, 100 U/ml penicilina-100 ug/ml estreptomicina. Los tiempos a medir fueron 0, 1, 2, 3, 6, 8, 10, 13 y 15 días. Para cada uno de los días en estudio los experimentos se realizaron en triplicado. El conteo celular se registro bajo un microscopio invertido (TE 300, Nikon, Melville, NY). Para determinar el Dt se utilizó la fórmula: Dt= Log (N° células final / N° células inicial) / Log 2.

Inmunocitoquímica para Ki-6. Células fijadas en p-formaldehído al 4% fueron permeabilizadas en buffer Tris-HCl 1% BSA, 0,1% Triton (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) durante 30 minutos y luego incubadas 12-18 hrs con anticuerpo anti Ki-67 (1:500, rabbit Abcam, Cambridge, MA) y 2 horas a temperatura ambiente con IgG de burro anti conejo (1:200, Molecular Probes, Eugene, OR) conjugado con AlexaFluor 488. Se utilizó 4', 6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para la tinción nuclear y vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) como medio de montaje. Las imágenes se registraron en un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY)

Análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó mediante el uso del software STATA 11.1 utilizando la prueba T de student. Para esto se trabajó con la media de datos independientes determinando, la desviación estándar y el error estándar medio (SEM).

RESULTADOS

Muestras obtenidas desde biopsias por punción de pacientes sin evidencia de neoplasia o con CaP localmente avanzado y/o metastásico presentan alta proporción de BAS o CAS. Al realizar el estudio histológico de las biopsias por punción analizadas en este estudio se puede apreciar que el tejido clasificado como benigno (Figura 1-A) presenta una estructura glandular normal, se encuentra conservada la distribución radial de las glándulas y no se observa acinos y/ microacinos que no respeten la estructura típica glandular. Además se observa la morfología estromal fibromuscular característica de tejido benigno, caracterizado por grandes zonas rodeando la región glandular, sin infiltración de estas últimas en el componente estromal (Figura 1-A). En oposición, el tejido designado como tumoral muestra en su mayoría células asiladas, poco diferenciadas, vertidas al compartimiento estromal. Las células epiteliales prostáticas presentes en el tejido no se encuentran formando conglomerados celulares típicos de glándulas benignas y no es posible distinguir el compartimiento glandular del estromal (Figura 1-B). Adicionalmente no se hace evidente el patrón microadenomatoso, indicando que corresponde a un tejido tumoral en estadio avanzado y poco diferenciado.

Explantes de tejido prostático son una técnica viable para obtener cultivos primarios de células estromales. Debido que la técnica explantes de tejido no se encuentra desarrollada para la obtención de cultivos de HPSCs se estandarizó primeramente este procedimiento. Para ello, se utilizaron muestras de tejido de zona de transición provenientes de pacientes cuyo diagnóstico fue Hiperplasia Prostática Benigna (datos no mostrados).

Por cada muestra obtenida desde biopsias por punción se recolectaron 2 cilindros de tejido cuyas dimensiones oscilaron de 1-2 cms de largo y de 0,8-1 mm de grosor (Figura 2-A). Se obtuvieron 10 explantes aproximadamente por cilindro, los cuales se montaron sobre una placa de cultivo (Figura 2-B y C). Luego de 5-10 días de adherencia a la placa de cultivo, las células prostáticas comenzaron a brotar desde el tejido, por todo el perímetro del explante (Figura 2-D). Para este estudio el número de muestras fue de 10 biopsias prostáticas obtenidas de zona periférica prostática (PZ), 5 de las cuales fueron designadas como benignas (PZ-BAS) y 5 como tumorales (PZ-CAS) (Tabla 1).

Los explantes permanecieron adheridos a la placa proporcionando células por más de 4 semanas, no encontrando diferencias en la viabilidad celular

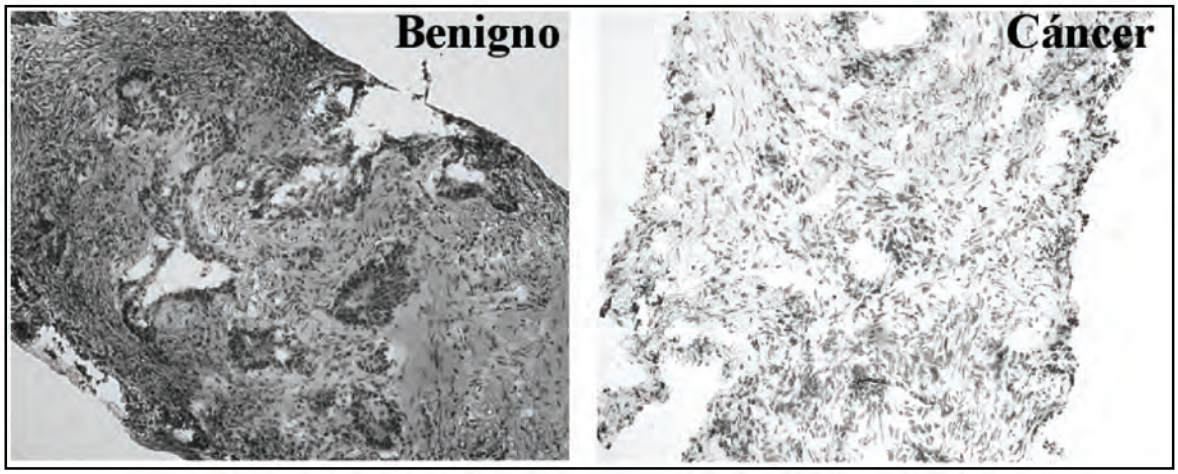

Figura 1: Análisis histológico de tejido prostático mediante tinción de Hematoxilina/Eosina (H&E). En el cuadro de la izquierda se muestra tejido prostático benigno obtenido por biopsia por punción. A la derecha se observa la tinción H&E para una biopsia por punción de tumor primario de próstata. Magnificación 100x

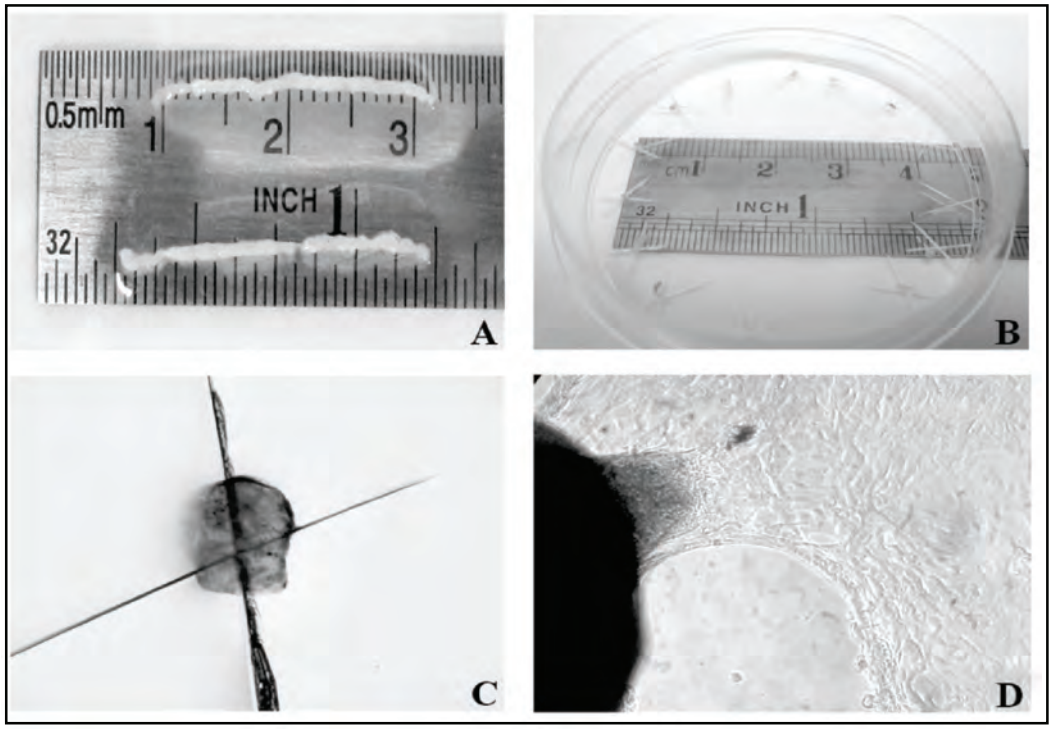

Figura 2. Representación del procedimiento de la técnica explantes en biopsias prostáticas. A, Tejido prostático obtenido desde biopsia por punción, cilindros de aproximadamente 2 cm largo 1 mm grosor. B, Ilustración de la metodología de explantes, cada explante tiene una dimensión de 1-2 mm2, estos se ubicaron en los extremos de la placa de cultivo mediante cruces en la superficie. (A y B registradas por cámara Digital Sony 4 megapixeles,Zoom 10x). C, Amplificación de explante de tejido prostático mediante lupa de disección, (Magnificación 100x). D, Brote de células prostáticas a partir de explante de tejido, 12 días en cultivo (DMEM 10% FBS). Magnificación 200x.

de los explantes de tejido benigno o tumoral. La eficiencia de la técnica de explantes de tejido fue superior al 85%, permitiendo con esto obtener un número elevado de células, asegurando así que el escaso tejido no se desperdiciara. La ecuación de eficiencia se definió por la relación de n°de explantes con células/n°de explantes totales. No se registraron diferencias en términos eficiencia entre explantes de PZ-BAS y PZ-CAS (Tabla 2). Si bien el procedimiento que se realizó fue el mismo para muestras designadas como BAS o CAS, encontramos diferencias significativas en el tiempo en que cada tipo de tejido comenzó a brotar células. Explantes obtenidos desde biopsias por punción de zonas benignas tardaron en promedio 13 días, mientras que el tejido obtenido de zonas tumorales comenzó a brotar células luego de 6 días del procedimiento (Tabla 2).

Cultivos primarios de HPSCS obtenidos por explantes de tejido de zonas con alta proporción de BAS o CAS, presentan morfología estromal y tasas de proliferación diferencial

Luego que las células comenzaron a brotar del explante, se esperó que alcanzaran 60% de confluencia para realizar subcultivos. Se observó que en los dos primeros subcultivos las células que brotaban de los explantes presentaban predominantemente morfología estromal, y en menor proporción morfología epitelial. Sin embargo, luego de los subcultivos sucesivos, las células con morfología epitelial fueron disminuyendo, hasta desaparecer por completo el fenotipo epitelial. Este último punto, se verificó mediante inmunocitoquímica para el marcador epitelial Pan-citoqueratina (datos no mostrados). En la Figura 3 se pueden observar cultivos de BAS y CAS donde la morfología estromal es la exclusiva. Adicionalmente, no se observan diferencias entre la morfología que prima entre PZ-BAS y PZ-CAS.

Debido a que en cultivo HPSCs obtenidas desde PZ-BAS y PZ-CAS manifestaron diferencias proliferativas, se realizó un ensayo de crecimiento celular para HPSCs durante 15 días. Los datos obtenidos revelan diferencias significativas entre el Dt de las HPSCs obtenidas de explantes de tejido tumoral y el de tejido benigno. En PZ-BAS el Dt en días obtenido fue de 7,5 + 0,5 días, en cambio en PZ-CAS fue 3,7 + 0,8. El análisis gráfico muestra curvas de crecimiento con pendientes estadísticamente significativas ($p<0,05$), indicando que HPSCs obtenidas de explantes de tejido tumoral proliferan en mayor medida que las obtenidas de tejido benigno (Figura 4-A,B).

Para corroborar estos datos, se realizó un estudio en PZ-BAS y PZ-CAS de expresión para el marcador de proliferación celular Ki-67 mediante tinción de inmunofluorescencia bajo las mismas condiciones del ensayo de crecimiento durante 5 días. Los resultados muestran patrones de tinción diferenciales entre los distintos grupos celulares. PZ-CAS superó el 70% de tinción positiva para K-i67, en cambio PZ-BAS no alcanzó el 20% (Figura 4-C, D), validando los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento celular.

Tabla 2. Resumen de la eficiencia de la técnica de explantes de muestras seleccionadas para la obtención de HPSCs en el estudio.

	Sigla	Explantes Totales	Explantes con Cells	% Eficiencia	Días que tardó en Brotar Cells
PZ-B	PZ-BAS-1	7	7	100	14
	PZ-BAS-2	20	20	100	5
	PZ-BAS-3	9	9	100	12
	PZ-BAS-4	19	18	95	11
	PZ-BAS-5	20	17	85	13
PZ-C	PZ-CAS-1	9	9	100	5
	PZ-CAS-2	24	22	92	4
	PZ-CAS-3	18	17	94	6
	PZ-CAS-4	20	19	95	8
	PZ-CAS-5	20	17	85	7

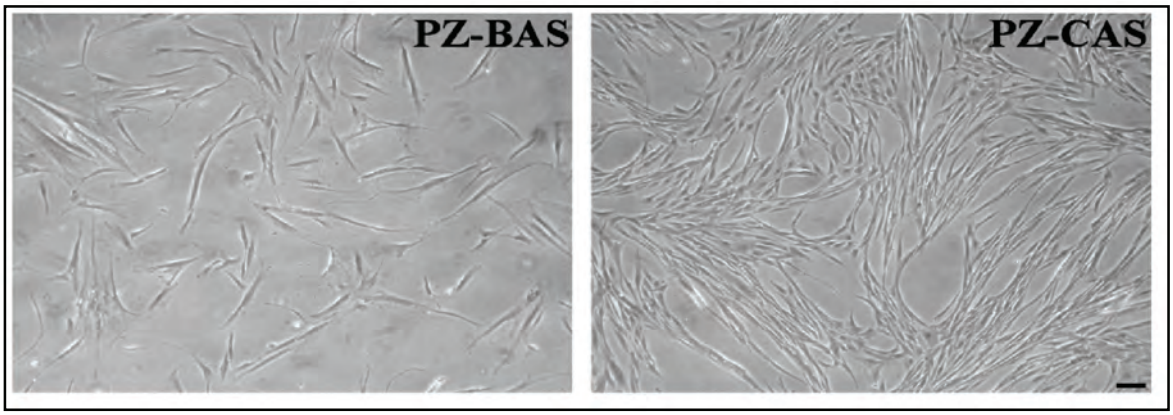

Figura 3: Microscopía óptica de cultivos primarios de HPSCs en pasaje 4. Cultivos primarios de HPSCs obtenidos por explantes, zona periférica benigna (PZ-B) y zona periférica tumoral (PZ-CAS). Imágenes ilustran la morfología estromal predominante en los HPSCs de distinto origen patológico en subcultivo 4. Condiciones de cultivo DMEM 10% SFB, 95% O2 5% CO2. Barra 100 μm.

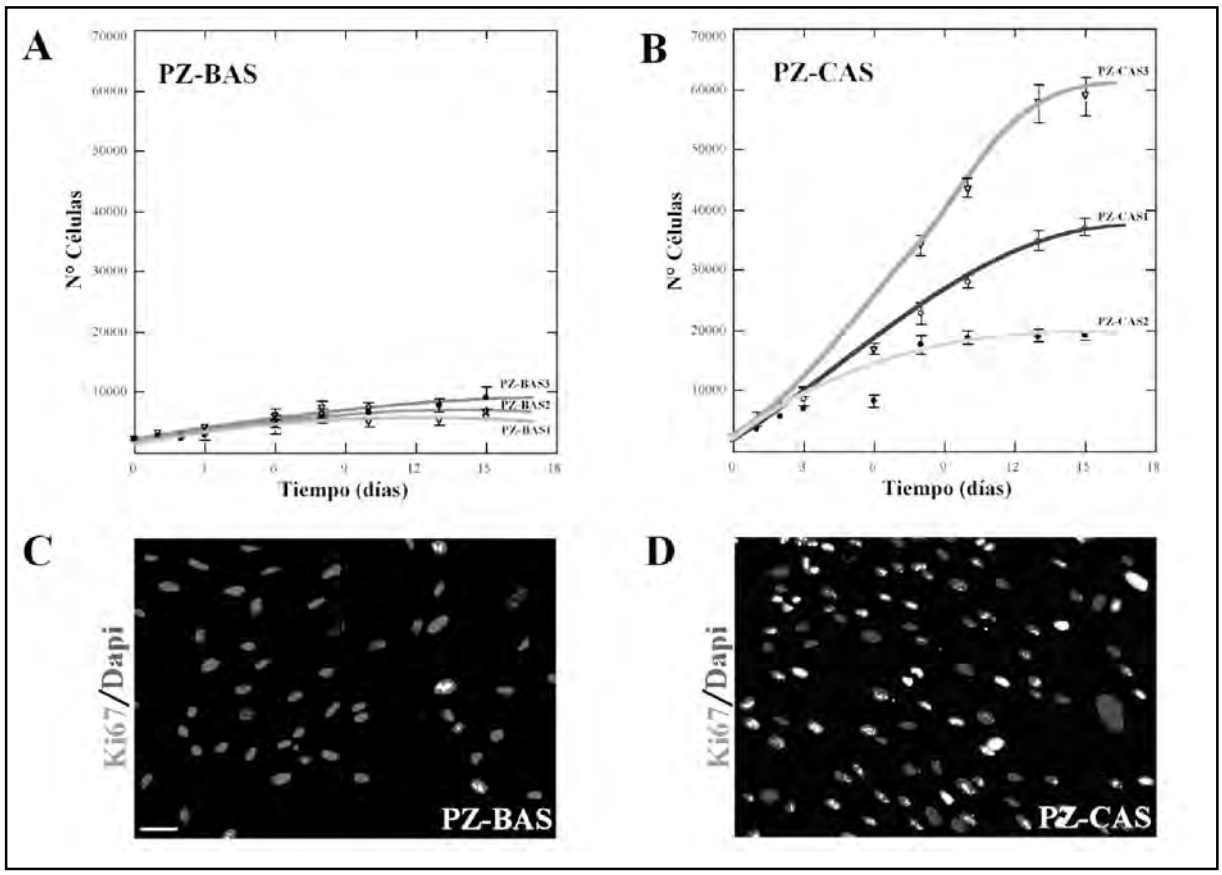

Figura 4. Tasas de crecimiento celular de cultivos primarios de HPSCs asociadas a BAS y CAS. Ensayo de crecimiento celular, 20000 HPSCs fueron cultivadas en DMEM 10% SFB durante 15 días. A.- Gráfico de PZ-BAS. B.- Gráfico PZ-CAS. C-D Inmunotinción de Ki67 (verde) en PZ-BAS y PZ-CAS. DAPI (azul) se utilizó para tinción nuclear. Barra 200 μm.

DISCUSIÓN

Los estudios experimentales que relacionan el estroma asociado al carcinoma con la progresión del CaP han utilizado principalmente cultivos primarios de HPSCs desde tejido obtenido por PRs[4 10, 11]. Este sesgo experimental conlleva necesariamente que los modelos utilizados para experimentación se han restringido en general, a cultivos primarios de pacientes cuyo score de Gleason no supera la graduación 3+4, excluyendo los tejidos de pacientes con CaP localmente avanzado y/o metastásico. La principal razón de esta limitación, ha sido la metodología estándar de obtención de cultivos primarios, basada en digestión enzimática de grandes extensiones de tejido prostático, designadas como benignas o tumoral luego del análisis patológico. Para lograr un éxito en este procedimiento se requiere como mínimo 3-5grs de tejido, por lo que la PR es el único método de obtención de tejido. Nuestros resultados indican que mediante la técnica de explantes de tejido expuesta en este trabajo es posible obtener cultivos primarios de estroma de próstata humana desde pequeñas cantidades de tejido, como son las biopsias por punción. De esta manera, al cultivar células estromales desde biopsias mediante la técnica de explantes, pacientes con CaP localmente avanzado y/o metastásico podrán ser incluidos en las investigaciones venideras y así insertar en los estudios experimentales a este grupo importante de pacientes.

Otro ámbito relevante que es posible concluir de este estudio, fue la confirmación que mediante la técnica de explantes desde biopsias por punción, es posible obtener con considerable precisión, una alta proporción de estroma «activado» o asociado al carcinoma. El carácter multifocal del CaP es un hecho reconocido, y en muchos casos la biopsia sistemática permite confirmar más de un foco tumoral intraglandular no palpable, con gran variedad de patrones histológicos, lo que dificulta la clasificación estos tumores según su diferenciación o score de Gleason. Este es un punto crucial para los estudios traslacionales, ya que, en las zonas tumorales procuradas para investigación necesarias para la digestión enzimática (3-5 grs), se hace casi imposible la determinación y cuantificación de los grados de diferenciación y extensión de la zona tumoral y por ende, la proporción de estroma «activado» o asociado al carcinoma presente en una muestra específica Así, estudios previos realizados tanto por nuestro grupo como por otros, mediante cultivos primarios de HPSCs obtenidos por disgregación enzimática[4,10,11,12], han encontrado resultados variables al estudiar la influencia de CAS en la progresión del CaP.

En nuestro estudio, los diez pacientes seleccionados correspondieron a casos cuyas biopsias prostáticas indicaron mediante sus respectivos informes patológicos, que no existía evidencia alguna de neoplasia o que presentaban CaP. En el caso de los pacientes con CaP, el urólogo confirmó mediante tacto rectal la presencia de tumores con clasificación clínica T3 con toda la superficie prostática infiltrada por tumor, para así tener seguridad que el cilindro obtenido para explante estuviera comprometido por tumor para de esa manera obtener CAS.Desde que se logró aislar células provenientes de estroma prostático a través de digestión enzimática, se ha intentado hallar propiedades que permitan caracterizar las poblaciones celulares de BAS y CAS. Debido que los cultivos primarios de HPSCs obtenidos en este estudio difieren en la técnica y procedencia para su obtención con aquellas descritas anteriormente, es necesario caracterizar estás poblaciones celulares. En base a esto, nuestro primer parámetro evaluado fue la morfología que presentaron en cultivo poblaciones celulares de BAS o CAS, siendo imposible diferenciar morfológicamente HPSCs de origen benigno o de CaP invasor, ya que ambas exhibieron el mismo patrón estromal. En cambio, si encontramos diferencias significativas en la proliferación celular que manifestaron BAS y CAS, donde el Dt de las células estromales obtenidas desde pacientes con CaP invasor (3,7 días) fue el doble al alcanzado por HPSCs de tejido benigno (7,5 días). La inmunotinción para el marcador de proliferación Ki-67 corroboró las diferencias entre BAS y CAS halladas en los ensayos de crecimiento celular.

Los datos de proliferación y de Dt dejan de manifiesto que las HPSCs obtenidas en este estudio, difieren sustancialmente con las obtenidas por digestión enzimática, ya que estas últimas en estudios previos[4,10] no mostraron diferencias en términos proliferativos entre BAS y CAS. En base a esto, se puede sugerir que las diferencias se deben en pri-

mer lugar a la técnica de obtención, así como también a las características patológicas de los pacientes con CaP de este estudio. Sin embargo, evaluación de otros parámetros son necesarios para confirmar esta conjetura.

En conclusión, este estudio inserta en la investigación del CaP una técnica que permite obtener HPSCs con alta proporción de BAS o CAS, las cuales en cultivo se pueden caracterizar por su patrón de proliferación. Paralelamente, permite incluir a pacientes que presentan CaP localmente avanzado y/o metastásico en los ensayos in vitro, posibilitando que este grupo de pacientes se beneficie de los avances de la investigación científica.

REFERENCIAS

1. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4:839-849, 2004.
2. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res,* 8:2912-2923, 2002.
3. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121:335-348, 2005.
4. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*, 59:5002-5011, 1999.
5. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol*, 166:2472-2483, 2001.
6. Skobe M, Fusenig NE. Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA,* 95:1050-1055, 1998.
7. Hewitt RE, Powe DG, Carter GI, Turner DR. Desmoplasia and its relevance to colorectal tumour invasion. *Int J Cancer*, 53:62-69, 1993.
8. Ayala G, Tuxhorn JA, Wheeler TM, Frolov A, Scardino PT, Ohori M, Wheeler M, Spitler J, Rowley DR. Reactive stroma as a predictor of biochemical-free recurrence in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 9:4792-4801, 2003.
9. Peehl DM. Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocrine-related cancer*, 12:19-47, 2005.
10. San Francisco IF, DeWolf WC, Peehl DM, Olumi AF. Expression of transforming growth factor-beta 1 and growth in soft agar differentiate prostate carcinoma-associated fibroblasts from normal prostate fibroblasts. *Int J Cancer*, 112:213-218, 2004.
11. Zhao H, Ramos CF, Brooks JD, Peehl DM. Distinctive gene expression of prostatic stromal cells cultured from diseased versus normal tissues. *Journal of cellular physiology*, 210:111-121, 2007.
12. Peehl DM, Sellers RG. Induction of smooth muscle cell phenotype in cultured human prostatic stromal cells. *Experimental cell research*, 232:208-215, 1997.