



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA EN RED

**“Efecto del Factor de transferencia en la prostatitis autoinmune: Evaluación
en un modelo murino”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA**

Presenta:

M. en C. Pérez Alvarado Carlos M.

Directores:

Dr. D. Guillermo Pérez Ishiwara

Dr. Miguel Ángel Reyes López

CIUDAD DE MÉXICO A FEBRERO DEL 2017

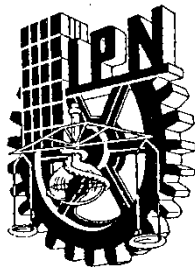


Asesores:

Dra. María del Consuelo Gómez García

Dra. Elizabeth Pérez Hernández


Dr. Juan Santiago Salas Benito



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

En la Ciudad de México el día 17 del mes Octubre del año 2016
el (la) que suscribe M. en C. Carlos M. Pérez Alvarado alumno (a) del Programa
de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro A110433,
adscrito a la ENM y H, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente
trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Guillermo Pérez Ishiwara y cede los
derechos del trabajo intitulado **“Efecto del Factor de transferencia en la prostatitis
autoinmune: Evaluación en un modelo murino”**, al Instituto Politécnico Nacional
para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos
del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser
obtenido escribiendo a la siguiente dirección gfb_carlosalvarado@hotmail.com.
Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la
fuente del mismo.



M. en C. Carlos M. Pérez Alvarado

Agradecimientos

Una Oda en prosa

Hace aproximadamente 10 años me subí a un autobús para la ciudad de México...como buen provinciano, muerto de miedo... El miedo se convirtió en confianza y en mimetismo urbano...

Hoy que sentado en otro autobús escribo estos agradecimientos, lo hago no solo para este trabajo sino para esta etapa de mi vida... personas que ya estaban y se quedaron, personas que llegaron y se fueron, personas que llegaron y se quedaron, personas que llegaron y se irán, y personas que llegaron y se quedarán por siempre... a todos por igual... Gracias...

Como en todo agradecimiento son necesarias las particularidades:

Gracias a mi madre, padre, hermano, y familia en general, por soportar mi silencio – el que me ayuda a descansar-, gracias por estar ahí siempre que los necesité y necesito...

Gracias a mis hijas Ayatzin y Tlalli... a quienes con todo el dolor que implica preferí darles un padre completo que un ser sin vida... donde esté siempre estaré con ellas...

A la peque por estar siempre con migo... pasan personas, situaciones, el tiempo, emociones, la vida y ella siempre con sus ganas de vivir...

Ale-gría en cada paso que doy...La tiene en cada célula... Estoy muy agradecido contigo... Gracias por enseñarme que la vida vale la pena...

Al Dr. Guillermo... por perder la esperanza y retomarla... por mantener la humanidad en algunos rincones... por mostrarme que debo hacer y que no...si hay que mencionar algo, es que cada quién trabaja mejor cuando mejor se acomoda...

“El arte de la guerra, al igual que el agua, no tiene una forma constante” Sun Tzu
“Solo así tu ejercito te seguirá sin que sepan a donde van”

A aquellas personas que a veces no se ven pero si no fuera por ellas, yo no habría terminado... Dra. Consuelo, Dra. Viky, Olivia, Fransisco, Wilox, Dr. Mario García, los del hospital de Tláhuac, los de Ciencias Biológicas, Caro, Fabi, Adrianita, Erika, a mis tutores, a todos los del lab, al equipo de básquet, a los de la cancha, a los pocos que me saludan sin tener una relación directa con migo... y a los que por algún motivo omití... Gracias...

A los que me enseñan como contender con la ciencia... BioMedicina Sistémica...Enrique y Ecodiálogo...

“¿Cómo conozco el origen de todas las cosas”? Por lo que hay dentro de mi” Lao Tse – A mi-

“Cuando los científicos buscaban una teoría unificada del universo olvidaron la más invisible y poderosa de las fuerzas.

El Amor es Luz, dado que ilumina a quien lo da y lo recibe. El Amor es gravedad, porque hace que unas personas se sientan atraídas por otras. El Amor es potencia, porque multiplica lo mejor que tenemos”
Albert Einstein...

Índice

I. Introducción	9
II. Antecedentes	13
A. Prostatitis autoinmune	13
i. Inflamación prostática.....	18
ii. Inflamación prostática e Hiperplasia Prostática Benigna.....	21
iii. Inflamación prostática y cáncer.....	26
B. Inmunoterapia	30
i. Extracto Dializado de Leucocitos	33
III. Justificación	38
IV. Hipótesis	39
V. Objetivos	39
A. Objetivo general	39
B. Objetivos específicos	39
VI. Metodología	40
A. Estandarización del Modelo murino	40
B. Esquema de la estrategia experimental	42
C. Pruebas histopatológicas.....	43
a. Tinción Hematoxilina-eosina.....	44
b. Tinción de azul de toluidina	45
D. Cuantificación de células inflamatorias	47
E. ELISA	47
a. Obtención y almacenamiento de la muestra.....	47
b. Preparación de los reactivos	48
c. Procedimiento del ensayo.....	48
F. Inmunohistoquímicas.....	49
G. Análisis estadístico	51
VII. Resultados	52
VIII. Discusión	90
IX. Conclusiones	115
X. Perspectivas	115
XI. Bibliografía	116
XII. Productos: Artículos reportados	129

Resumen

La etiopatología de la Prostatitis Crónica Síndrome de Dolor Pélvico Crónico (CP/CPPS, por sus siglas en inglés) no es del todo conocida, sin embargo, se ha observado que tiene un componente autoinmune. Esta enfermedad se ha relacionado con otros padecimientos como Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) y Cáncer. Aunque se cuenta con medicamentos para el tratamiento de esta patología, presentan diversos efectos secundarios. Razón por la cual muchos investigadores se han dado a la tarea de buscar alternativas de tratamiento, como lo son los inmunomoduladores, tales como el Extracto Dializable de Leucocitos (DLE), o factor de transferencia.

En el presente trabajo estudiamos el efecto del DLE en un modelo de Prostatitis Autoinmune Experimental (EAP). Se evaluó histopatológica, inmunohistoquímica y serológicamente el efecto del DLE, en nuestro modelo de EAP. Los resultados mostraron que los animales desarrollaron inflamación prostática, hiperplasia e hipertrofia prostática. El tratamiento con el DLE disminuyó el infiltrado de células inflamatorias y mastocitos en particular así como aminoró la presencia de zonas con HPB. A nivel sérico se observó que el DLE disminuyó la prostateína. En la glándula prostática se evidenció por inmunohistoquímica que el DLE disminuyó la expresión de CD-45, TNF- α , IFN- γ , IL-6 y del marcador de proliferación celular PCNA y en contraparte aumentó la expresión de IL-4. Todo esto muestra que el DLE disminuye el proceso inflamatorio en este modelo de EAP.

Abstract

The etiopathology of Chronic Prostatitis/ Chronic Pelvic Pain Syndrome (CP/ CPPS) is not entirely understandable, however it has been suggested that it has an autoimmune component. The disease has also been associated to other conditions such as Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) and prostatic cancer. Exist diverse pharmacological treatments for CP/CPPS, however it produce undesirable side effects. For these reason many researchers have looked for alternative treatments, such as Immunomodulatory agents, such as the Dialyzable Leukocyte Extract (DLE).

. Here we studied the effect of DLE in an Experimental Autoimmune Prostatitis model (EAP). We evaluated the DLE effect by histopathological, immunohistochemical and serological analyses of different inflammatory markers. The results showed that animals developed prostatic inflammation, Benign Prostatic Hyperplasia and prostatic hypertrophy. DLE administration decreased the infiltrate of inflammatory cells, particularly mast cells as well as the presence of hyperplasia in some areas of prostatic tissue. The serum prostatein levels were reduced after DLE administration. The immunohistochemical stainings showed that the DLE decreased the expression of CD-45, TNF- α , IFN- γ , IL-6, the increment of IL-4 expression and the decrease of PCNA expression. All that showed that DLE decreased the inflammatory process in this model of Experimental Autoimmune Prostatitis.

I. Introducción

La próstata se encuentra situada por delante del recto y detrás de la vejiga urinaria. Este órgano está constituido por un tejido glandular simple con una capa de células basales en la base de la membrana y una capa de células columnares secretoras (Liu y Goldstein, 2014). En la actualidad distintos autores dividen a la próstata en tres zonas, las cuales son: zona central, transicional y periférica (De Marzo y col, 2007). La zona central, comprende aproximadamente el 20% de este órgano, tiene forma cónica y ahí confluyen los conductos seminíferos y la uretra prostática, en esta región en pocas ocasiones se encuentra inflamación, hiperplasia o cáncer (De Marzo y col, 2007). La zona transicional que conforma aproximadamente el 10% de esta glándula, está conformada por tejido glandular y uretral en igual proporción y en algunas ocasiones se puede encontrar regiones hiperplásicas. La zona periférica por su parte, ocupa aproximadamente el 70% de este órgano, está conformada por tejido glandular y es la región donde con mayor frecuencia se encuentra rasgos de inflamación, hiperplasia y/o carcinoma (De Marzo y col, 2007).

La inflamación prostática, o prostatitis, es el padecimiento prostático más común en hombres adultos y puede evolucionar a padecimientos más graves como la hiperplasia prostática benigna y/o el cáncer de próstata (Liu y Goldstein, 2014; De Marzo y col, 2007). Este padecimiento es caracterizado por dolor pélvico (dolor en escroto, ano, pene o testículos, generalmente causado por espasmo muscular pélvico) y algunos trastornos urinarios. A principios del siglo XVIII esta

enfermedad es reconocida como una entidad patológica generada entre muchas cosas por alcoholismo o daño por actividad física. Es hasta 1920 cuando se plantea que la inflamación prostática puede ser causada por algún tipo de infección bacteriana y comienza a tratarse con antibióticos. Posteriormente se observó que el tratamiento de esta enfermedad con antibióticos generaba resultados dudosos, por lo que se ha puesto especial atención en su clasificación, diagnóstico y tratamiento (Bajpayee y col, 2012). Actualmente, se ha reconocido a esta enfermedad como un problema de salud a nivel mundial (Motrich, 2006).

Tradicionalmente el término prostatitis se refiere a la condición clínica asociada con infección y/o inflamación de la próstata, su diagnóstico se hace en base a síntomas, hallazgos clínicos y de laboratorio, y en algunos casos con la demostración de elementos inflamatorios en fluido prostático (Nickel y col, 2008). La inflamación prostática en humanos generalmente se asocia con una cuenta leucocitaria alta, esto se refiere a 10 o más leucocitos por campo en secreciones prostáticas (Nickel y col, 2008). Este tipo de sintomatología es más común en hombres mayores a los 50 años (Nickel y col, 2008). Diversas estadísticas muestran que la prostatitis afecta a un 10-14% de la población masculina a nivel mundial, sin importar edad o raza; por ejemplo en latinos, principalmente en mexicanos, se ha mostrado que dicha enfermedad puede llegar a tener hasta un 6% de prevalencia. Se calcula que aproximadamente el 50% de los hombres cursa con prostatitis en alguna etapa de su vida. En Estados Unidos estudios indican que la inflamación prostática se encuentra entre los 20 diagnósticos más comunes a nivel urológico. En la actualidad, se ha observado que la dieta, el fumar, así como disminución de la función sexual, trastornos hormonales, factores

psicológicos y enfermedades gastrointestinales o anorectales pueden favorecer el desarrollo de prostatitis (Bajpayee *et al*, 2012).

Esta patología es una condición urológica común, que se clasifica cómo aguda o crónica (Hou y col, 2009). La prostatitis aguda generalmente es causada por infección bacteriana, mientras que la crónica puede o no encontrarse evidencia de infección en el tracto urinario (Hou y col, 2009). El Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos (*NIH*, por sus siglas en inglés) ha establecido la red de colaboración internacional de la prostatitis, el cual sugirió clasificar a esta patología en cuatro clases: I. Prostatitis bacteriana aguda, relacionada con infección bacteriana aguda; II. Prostatitis Bacteriana Crónica, asociada a una infección bacteriana crónica en vías urinarias y próstata; III. Prostatitis Crónica/ Prostatitis Crónica Síndrome de Dolor Pélvico (CP/CPPS, por sus siglas en inglés), en esta clase de prostatitis no se ha observa una infección establecida y es acompañada de incomodidad o dolor pélvico. Este tipo de prostatitis se puede clasificar en dos subclases: i. Inflamatoria: muestra presencia de leucocitos en semen y ii. no inflamatoria: no se observan un número considerable de células inflamatorias en semen; por último se tiene el tipo de prostatitis IV. Prostatitis inflamatoria asintomática, donde no hay síntomas de inflamación prostática, sin embargo se encuentran leucocitos en secreciones prostáticas cuando se realizan estudios de otra naturaleza.

Las categorías I, II y IV de prostatitis ocupan el 5 al 10% de los casos. Mientras que la prostatitis crónica no bacteriana ocupa del 90 al 95% de todos los casos de esta enfermedad (Motrich y col, 2006). La enfermedad es de etiología desconocida y es caracterizada por la presencia de dolor, síntomas urinarios y

eyaculatorios (Hou y col, 2009; Motrich y col, 2006). Diversas evidencias apuntan que la prostatitis crónica puede tener una naturaleza autoinmune, la cual se sugiere se genera debido a pérdida de tolerancia inmunológica, pérdida que es mantenida por mecanismos inmunológicos centrales y periféricos (Hou y col, 2009). Esto se ha relacionado con observaciones de que en algunos pacientes con prostatitis crónica se han encontrado niveles elevados de citosinas inflamatorias, tanto en plasma seminal como en secreciones prostáticas (Hou y col, 2009). Además también se ha reportado la presencia de anticuerpos antígeno específicos y una respuesta autoinmune celular contra antígenos prostáticos como el antígeno específico prostático (PSA, por sus siglas en inglés), la fosfatasa ácida prostática, MAD-PRO34 y el plasma seminal (Hou y col, 2009).

La inflamación prostática constante se ha podido relacionar con padecimientos más graves. Por ejemplo, en un estudio realizado en 2115 hombres de Estados Unidos se observó una prevalencia de la prostatitis del 9% y además se mostró que una persona que ya ha cursado con dicha patología tiene una mayor probabilidad de recurrencia e incluso de desarrollar un padecimiento de mayor gravedad, como la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) (Krieger y col, 2008). Por otro lado es importante resaltar que la prostatitis se ha asociado con un aumento de hasta un 19% de desarrollar cáncer de próstata, el cual ocupa el segundo lugar en frecuencia en la población masculina a nivel mundial (Khamis y col, 2010; Hou y col, 2009; Krieger y col, 2008; Cruz-Nuricumbo y col, 2005). Estudios indican que el cáncer de próstata es el padecimiento oncológico con mayor número de casos en México, siendo las entidades más afectadas el Distrito Federal, Jalisco y Veracruz. Cabe mencionar que diversas estadísticas muestran que mexicanos de

50 años tienen una probabilidad de 15-30% de padecerlo, mientras que hombres de 80 a 90 años corren un riesgo de 60 a 90% de experimentarlo (Cruz-Nuricumbo y col, 2005).

II. Antecedentes

A. Prostatitis autoinmune

La enfermedad prostática inflamatoria crónica de origen no infeccioso, o no bacteriano, es difícil de diagnosticar y tratar. Se estima que la incidencia de este tipo de patología es 8 veces más frecuente que la prostatitis bacteriana (Maccioni, 1998). Un marcador común de inflamación prostática es una cuenta leucocitaria de polimorfonucleares (PMN) alta en frotis uretrales, secreciones prostáticas, semen o sedimento urinario (Khamis y col, 2010; Zdrodowska-Stefanow, 2008). Recientemente, se ha observado que la elastasa secretada por PMN puede ser considerada como indicador de inflamación del tracto genitourinario (Zdrodowska-Stefanow, 2008; Motrich y col, 2006). Otro parámetro útil para la evaluación de la función prostática son los niveles de ácido cítrico, ya que la próstata produce y almacena este tipo de ácido. Y se ha observado que un decremento en su concentración de ácido cítrico se relaciona con inflamación o cáncer de la próstata (Zdrodowska-Stefanow, 2008).

Existen varios modelos animales en lo que se ha evaluado la fisiopatología de la prostatitis por ejemplo Keetch y col, desarrollaron un modelo murino que concuerda con los parámetros inmunológicos relacionados con la prostatitis no bacteriana (Domínguez, 1998). En este estudio ocuparon homogeneizados de cultivos de próstatas de ratones SJL, AJ, BALB/c, C57bL/6 1pr que se inyectaron

en ratones singénicos (Domínguez, 1998). Aquí se observó que las cepas más proclives a desarrollar prostatitis fueron las SJL, AJ y C57bL/6, las cuales mostraron diferentes grados de inflamación prostática. Incluso en la cepa C57bL/6 se observó infiltración linfocitaria en el estroma y en la región periglandular. De estos resultados se concluyó que la inyección de antígenos prostáticos singénicos induce inflamación prostática similar a la prostatitis clínica no bacteriana (Domínguez, 1998).

Se ha descrito un modelo de prostatitis autoinmune experimental (EAP, por sus siglas en inglés) con ratones A/J timectizados (Hou y col, 2009; Taguchi y col, 1994). En el que se ha observado en el día tres (Tx3) después de su nacimiento, que los animales desarrollan prostatitis espontánea (Taguchi y col, 1994; Taguchi y Nishizuka, 1987). En este estudio se detectaron niveles de auto-anticuerpos contra la próstata con títulos de más de 1000 diluciones en los sueros de los ratones con prostatitis, además se mostró que la patología se podía transferir a ratones singénicos por transfusión de células T esplénicas CD4+. También se observó que una inyección de células esplénicas (4×10^6) de machos normales timectizados en el día 4 puede prevenir el desarrollo de la prostatitis autoinmune en el modelo murino A/J Tx3. Estos resultados sugieren que probablemente la patología desarrollada en el ratón timectizado resulta a partir de un fenómeno autoinmune (Taguchi y col, 1994). Taguchi y col, a partir de estos resultados concluyeron que la tolerancia inmune a auto-antígenos en órganos susceptibles a autoinmunidad, tales como la próstata, es mantenida por células T tejido específicas (Taguchi y col, 1994).

Las células T CD4⁺ que expresan receptor α de interleucina 2 (CD25) (Treg), las cuales tiene un papel central en la tolerancia inmune, suprimen la actividad inmunológica en diferentes modelos de patologías autoinmunes, entre ellos algunos relacionados con la prostatitis (Setiady y col, 2005). Al respecto se ha observado que en el modelo A/J Tx3 de prostatitis autoinmune experimental (EAP, por sus siglas en inglés), la inyección de 20 μ l de células Treg de machos con próstata en el quinto día postnacimiento, reduce la incidencia de la enfermedad en un 37%. Además las células Treg de ratones machos orquitectomizados neonatalmente con prostatitis autoinmune a los que se les administró 5 α -dihidroxitestosterona (5-DTH) restauran la capacidad de las células Treg de suprimir la EAP. También en ese mismo experimento se mostró la disminución de la expresión del antígeno de la prostatitis autoinmune experimental (EAPA) 1 y 2. De estas moléculas, la EAPA 1 es una proteína homóloga a la transglutaminasa prostática de rata y humano, que se relaciona con la supresión de la EAP (Setiady y col, 2005). Así se plantea que la supresión de la EAP por las células Treg es un proceso que depende de la presencia de autoantígenos endógenos (Setiady y col, 2005).

En otros estudios utilizando el ratón diabético no obeso (NOD, de sus siglas en inglés), el cual es una cepa genéticamente proclive a desarrollar enfermedades autoinmunes órgano específicas, se observaron varias características inmunológicas relacionadas con la prostatitis. A los ratones NOD.SCID machos se les indujo EAP mediante la inyección de un homogeneizado prostático de ratones CD1 con adyuvante completo de Freund. Las pruebas inmunohistoquímicas mostraron un alto infiltrado leucocitario en la próstata, el cual incluyó células T

CD4+ y CD8+, células B B220, células dendríticas CD11c+ y macrófagos CD11b+ (Penna y col, 2006). También se registró un aumento de la expresión de la enzima sintasa de óxido nítrico (iNOS) y de óxido nítrico (NO), los cuales se consideran mediadores de estados inflamatorios agudos y crónicos (Penna y col, 2006). Además se mostró un aumento en la producción de IFN- γ por células de nodos linfoides, lo que se sugiere la estimulación de respuesta Th1 (Penna y col, 2006). Aunado a todo esto se evidenció la producción ex vivo de IL-17, la cual es considerada una citocina proinflamatoria producida por células T patogénicas (Penna y col, 2006).

Un gen que tiene un papel central en la tolerancia inmunológica es el regulador autoinmune (*Aire*), el cual es expresado en órganos linfoides importantes para dicha tolerancia, como lo es el timo. Este gen regula la transcripción de antígenos de tejidos periféricos y además controla la tolerancia central de autoantígenos al inducir la selección negativa de células T autoreactivas (Hou y col, 2009). El ratón *Aire* deficiente es proclive a desarrollar autoinmunidad multiorgánica, lo cual en muchos casos le genera prostatitis autoinmune espontánea. En este modelo se mostró la presencia de infiltrados celulares en las glándulas prostáticas y se detectó la proteína secretoria de la vesícula seminal como autoantígeno (Hou y col, 2009). También se ha mostrado la presencia de células T productoras de IFN- γ pero no IL-10 o IL-17, lo que refuerza la noción de que en la prostatitis autoinmune existe una respuesta Th1 predominante (Hou y col, 2009; Penna y col, 2006). Así se plantea que la búsqueda de autoantígenos y la identificación de moléculas implicadas en la inflamación, como lo es el IFN- γ , puede ayudar al mejor diagnóstico y tratamiento de la prostatitis autoinmune y a la

disminución de la prevalencia del cáncer de próstata (Hou y col, 2009; Penna y col, 2006).

La identificación de moléculas inflamatorias implicadas en la prostatitis, en pacientes con prostatitis crónica no bacteriana se demostró mediante la existencia de linfocitos secretores de IFN- γ que proliferan en respuesta al antígeno prostático autoinmune y a la fosfatasa de cáncer de próstata (PA) (Motrich y col, 2006). Este grupo de pacientes mostraron niveles significativamente elevados de IFN- γ , TNF- α e IL-1 en plasma seminal, lo que evidencia un estado inflamatorio de origen no bacteriano. Estas observaciones se refuerzan con estudios realizados en un modelo de EAP en ratas Wistar sexualmente maduras, a las que se les indujo prostatitis mediante la inyección de un homogeneizado de próstatas de ratones singénicos (Motrich y col, 2006). En este modelo se observó una moderada cobertura perivascular, infiltración mononuclear acompañada por hemorragia y edema. También se encontraron niveles elevados de antígenos prostáticos, como lo son la PA y la proteína prostática de enlace a esteroides (PSBP) en suero y plasma seminal. Por otro lado en plasma seminal se registraron niveles elevados de óxido nítrico (NO), IFN- γ y TNF- α en ratas inmunizadas con respecto a ratas no inmunizadas (Motrich y col, 2006). Además en las ratas inmunizadas se observó una disminución de la concentración de ácido cítrico en plasma seminal, lo que aunado a que no se registraron cambios en los niveles de fructosa y α -glucosidasa en dicho fluido, se asume que el proceso inflamatorio sólo se experimentó en próstata. Con todo esto se menciona que este modelo de EAP genera una respuesta autoinmune específica humoral y celular que pueden

detectarse local y sistémicamente, muy parecido a lo que sucede en humanos (Motrich y col, 2006).

Otras investigaciones realizadas en ratas Wistar sugieren que la prostateína es uno de los principales autoantígenos implicados en la prostatitis (Maccioni y col, 1998). Esto se observó en dichos animales inyectados con un homogeneizado de glándulas accesorias sexuales (RAG) (próstata, vesícula seminal y glándula coagulante). En este modelo se ha observado entre otras cosas células T autoreactivas y citotóxicas, así como alteraciones tisulares caracterizadas por infiltración mononuclear en la próstata, alta proporción de degranulado de células mastocíticas, lo que indica inflamación prostática (Maccioni y col, 1998). Maccioni y col, en este modelo de EAP detectó un antígeno prostático citosólico de 20 kD por inmunoblot, el cual sólo reaccionó mediante inmunoprecipitación con extracto de próstata de animales inmunizados, mostrando que es un autoantígeno órgano específico (Maccioni y col, 1998). Posteriormente la molécula antigénica detectada se secuenció en su extremo N-terminal mostrando una exacta correspondencia con los componentes C1 y C3 de la subunidad F de la prostateína, también conocida como proteína de enlace a esteroide prostático de rata (Maccioni y col, 1998). Así se concluyó que la prostateína es un autoantígeno central en este modelo experimental de prostatitis autoinmune (Maccioni y col, 1998).

i. Inflamación prostática

Como ya se ha planteado diversos son los factores que influyen en la inflamación prostática, entre ellos se encuentran el incremento de la población leucocitaria y la

presencia de algunas interleucinas inflamatorias, por mencionar algunos. Por ejemplo en cuanto a la población leucocitaria se sabe que en una próstata de humano normal se pueden encontrar 7.3 ± 3.3 linfocitos T por milímetro cuadrado, mientras que una próstata anormal pueden presentarse hasta 55 linfocitos por milímetro cuadrado (Djavan y col, 2009; Theyer y col, 1992). Por otro lado varios autores proponen que existe un reconocimiento de antígenos foráneos por parte de “receptores como toll” (TLR’s por sus siglas en inglés) del epitelio prostático, lo cual incrementa la producción de algunas citocinas inflamatorias (Djavan y col, 2009).

La inflamación prostática se puede generar de varias formas, por ejemplo se pueden encontrar la presencia de dos capas celulares de células epiteliales, células inflamatorias mononucleares y polimorfonucleares, tanto en compartimentos estrómicos como en epiteliales, lo cual se ha designado como atrofia inflamatoria proliferativa (PIA) (Djavan y col, 2009; Steiner y col, 2002). También se ha mostrado que la inflamación prostática puede caracterizarse por un infiltrado de linfocitos T en tejido fibroblástico, fibromuscular y nódulos estrómicos de musculo liso, como ocurre en la hiperplasia prostática benigna (BPH) (Djavan y col, 2009; Steiner y col, 2002). Tagouchi y col, en 1985 mencionaron que probablemente la inflamación asociada a la HPB sea causada por una condición autoinmune órgano limitada, ya que se encuentra estrechamente asociada a la presencia del antígeno prostático específico (PSA) (Djavan y col, 2009).

Investigaciones han evidenciado cantidades aumentadas tanto a nivel proteico como de mRNA de algunas moléculas relacionadas con la inflamación, como el IFN- γ , la IL-2 y la IL-4 en la BPH, lo cual sugiere que la prostatitis puede

ser una enfermedad asociada a un desequilibrio en la respuesta Th1/ Th2 (Djavan y col, 2009; Taguouchi, 1987). Otra interleucina implicada en la prostatitis es la IL-6, esta es una molécula pleitrópica cuya concentración aumentada se ha asociado con el incremento en la proliferación de células prostáticas y consecuentemente se ha relacionado con el desarrollo de cáncer de próstata (Djavan y col, 2009; Giri y col, 2001). Además se ha mostrado *in vitro* que la IL-6 induce la producción de IL-8, citocina que tiene actividad quimiotáctica hacia neutrófilos y células mononucleares e incrementa la producción de la proteína FGF-2 que puede actuar como un factor de crecimiento de células estromales prostáticas, también asociado a la generación de cáncer (Djavan y col, 2009; Hobish y col, 1998).

Otra citocina fuertemente implicada en el proceso inflamatorio prostático es la IL-15 la cual actúa como quimioatrayente, induce la locomoción y migración de linfocitos T y contribuye a la respuesta contra microbios patógenos (Djavan y col, 2009; Handisurya y col, 2001). Handisurya y col, han documentado que un aumento en IFN- γ aumenta la producción de IL-15 por células prostáticas lo que se traduce en un incremento de la migración de linfocitos T a tejido perivascular (Djavan y col, 2009; Handisurya y col, 2001). También se ha identificado que la IL-17 también influye en la inflamación prostática al aumentar los niveles proteicos y de mRNA de IL-6, IL-8, IL-1 α y β (Steiner y col, 2003). Así se muestra que son varias las interleucinas involucradas en la respuesta inmune en la próstata y que estas interaccionan de diversas formas produciendo inflamación crónica en dicho órgano (Djavan y col, 2009).

ii. **Inflamación prostática e Hiperplasia Prostática Benigna**

La perpetuación de la inflamación en próstata se ha relacionado con el aumento del tamaño de dicha glándula por hiperplasia progresiva de células glandulares y del estroma, lo que se conoce como Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) (Nickel y col, 2006). Esta patología es caracterizada por obstrucción de las vías urinarias, por lo cual el volumen y fuerza del flujo de la orina disminuye, y además existe dolor pélvico (Robbins, 2008). La HPB es uno de los padecimientos hiperproliferativos más comunes en los seres humanos asociado con el aumento de la edad y está caracterizado, entre otros factores, por proliferación de fibroblastos/miofibroblastos y células epiteliales en próstata (Begley y col, 2008). Investigaciones en Estados Unidos indican que el 57.2% de una muestra de 5,503 hombres con prostatitis también presentaron antecedentes de HPB, mientras que 38.7% de una muestra de 7,465 hombres con HPB reportaron que padecieron de prostatitis en algún momento de su vida (Bajyapee, 2012). En otro estudio realizado en Minnesota en una muestra de 2447 pacientes se mostró que el padecer prostatitis aumenta 2.4 veces la probabilidad de experimentar HPB. En base a estos y otras investigaciones se ha planteado que las dos condiciones, la prostatitis y la HPB, pueden coexistir, y que además la prostatitis puede ser considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de HPB (Nickel, 2006).

La hiperproliferación de fibroblastos/miofibroblastos que caracteriza a la HPB se experimenta principalmente en la zona periuretral y/o la zona transicional prostática. Algunos estudios indican que la hiperplasia prostática se genera por consecuencia del incremento del volumen prostático a lo largo de la vida a través

de procesos inflamatorios no agresivos, pero constantes, los cuales aumentan la proliferación celular aproximadamente en un 0.8-1.6%, lo que equivale a 0.2-0.4mL, por año en humanos (Begley y col, 2008). También se sugiere que la constante inflamación de una próstata adulta provee un microambiente que genera aumento en a quimiotaxis y proliferación de células proinflamatorias en tejido prostático, lo que favorece el desarrollo de HPB (Begley *et al*, 2008).

En la HPB existe un infiltrado de células inflamatorias compuesto principalmente por células T activadas y macrófagos (Begley *et al*, 2008; Nickel, 2006). Esto es respaldado por estudios en muestras de tejido prostático de pacientes, principalmente de la zona de transición prostática, donde se muestra la presencia de células T y macrófagos en un número notoriamente alto (De Marzo y col, 2007). Además se ha evidenciado que en la hiperplasia el infiltrado de células inflamatorias está compuesto por leucocitos y que la mayoría son células T CD4+ de memoria. Bierhoff y colaboradores describieron un tipo de inflamación “disperso” caracterizado de un aumento significativo de linfocitos T en tejido fibroblástico, fibromuscular y nódulos del estroma de tejido muscular liso pero disminuye en nódulos mesenquimales comparado con el estroma que le rodea. De lo anterior se concluyó que el infiltrado de los nódulos del estroma debe de ser estrictamente separado de los cambios inflamatorios observados en la HPB (Djavan *et al*, 2009).

Steiner y colaboradores examinaron las propiedades biológicas e inmunofenotípicas de células inflamatorias de tejidos con inflamación crónica asociada a BPH y de tejido normal. Fue mostrado que en el tejido con inflamación crónica del total de células CD45+ (todos los leucocitos) el 70-80% son células T

CD3+, mientras que del 10-15% son células B CD19+ o CD20+. Cabe mencionar que en lesiones por inflamación crónica también hay un aumento en el número de macrófagos en tejido prostático. En términos de proporción de células CD8:CD4 se ha observado que en tejido normal hay una mayor proporción de células T CD8+ mientras que en tejido inflamado se ha mostrado una mayor presencia de células CD4+. En lo que respecta a receptores de células T (TCR's), el 90% de células T presentó el receptor estándar $\alpha\beta$, mientras que menos del 1% mostró el receptor $\gamma\delta$. Para el complejo mayor de histocompatibilidad II se observó que esta molécula se encuentra presente en aproximadamente el 40% de las células T CD3+, y además muchas de esas células expresan CD45RO, lo cual indica que dichas células han estado en contacto con algún antígeno. En cambio en epitelio prostático normal no se mostró evidencia de células T activas o de memoria (De Marzo y col, 2007).

Varios estudios indican una relación entre la infiltración crónica de células inflamatorias en próstata, linfocinas e hiperproliferación en estroma en la HPB. Por ejemplo en tejido hiperplásico se han mostrado considerables niveles de expresión de mRNA de IL-2 e IL-4 mientras que en tejido normal su expresión está disminuida. Investigaciones indican que la principal fuente del mRNA de moléculas proinflamatorias son las células T, las que producen mRNA de IFN- γ , IL-2, e IL-4 y también pequeñas cantidades de factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2). La expresión de los mRNA en tejido con hiperplasia benigna sugiere que la enfermedad es asociada a respuesta 1 y 2 de células T. Resultados preliminares usando citocinas intracelulares confirman los hallazgos anteriores y revelan un número sustancial de linfocitos T prostáticos IFN- γ + e IL-2+ que co-expresan

citocinas Th2 (IL-4 Ee IL-13). Se propone que el IFN- γ influye en la diferenciación de células TCD4+ y que dicha molécula en combinación con factor transformante de crecimiento b1 (TGFb1) favorece la proliferación de dichas células T (Djavan y col 2009).

En modelos animales de BPH se tienen registro de un aumento en la síntesis de IL-15 por células lumbinales prostáticas, la cual es una interleucina que aumenta la proliferación de linfocitos T en la BPH. Investigadores como Wilkinson y Liew sugieren que la IL-15 tiene un papel importante en la infiltración linfocitaria y el mantenimiento de la inflamación crónica en tejido hiperplásico. Teóricamente los linfocitos promueven un ambiente inflamatorio al favorecer la producción de algunas citocinas tales como el IFN- γ , molécula que se ha relacionado con un aumento en la síntesis de IL-15 por células prostáticas, lo que puede aumentar la quimiotaxis y consecuentemente reclutamiento de más linfocitos T facilitando su migración transendotelial al tejido perivascular.

Datos de algunos investigadores sugieren la importancia de un grupo particular de células T CD4+, en la HPB, conocidas como células Th17, las cuales sintetizan un grupo particular de citocinas como la IL-23 y la IL-17. Este tipo de células se ha observado están involucradas en el proceso inflamatorio de la artritis y la encefalitis, y la producción de IL-23 se ha relacionado con la generación de cáncer de piel. Steiner y col, han demostrado que las células Th17 tienen un rol central en la inflamación prostática (De Marzo y col, 2007; Penna y col, 2006). También se ha mostrado que la mayoría de la IL-17 presente en próstata en especímenes con HPB es sintetizada por estos linfocitos (Djavan y col, 2009).

Como se debe de recordar la incidencia tanto de la inflamación prostática como de la HPB aumenta paralelamente con la edad. Con respecto a esto Begley y colegas demostraron que existen diferencias en los niveles de mRNA de algunas moléculas relacionadas con la inflamación por fibroblastos de próstatas de personas mayores a 64 años con respecto a hombres menores a 52 años. El transcriptoma de dichas células procedentes de personas de 64 años incluyen 26 transcritos de moléculas proinflamatorias. La mayor parte de esos transcritos (80%) codifican para quimiocinas tipo CXC (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6, CXCL12), interleucinas (IL-11 y 33), o alguna molécula homóloga (CYTL1). Además en próstatas de personas mayores de 64 años se observó que los fibroblastos secretan niveles elevados de CXCL12, CXCL1, CXCL5 y CXCL6 en comparación con los niveles secretados por fibroblastos de próstatas de hombres menores a 52 años. De todo esto ellos concluyen que estos factores quimiotácticos presentes en los procesos inflamatorios también se relacionan con la etiología de la HPB (Begley y col, 2008). Todas la evidencias mostradas en esta sección, y otras, indican que los mediadores asociados con la inflamación prostática generan un microambiente que se puede asociar con la hiperplasia prostática. Cabe mencionar que estos mediadores inflamatorios también se han observado en los procesos oncológicos en próstata, aunque en diferentes niveles (Pallapatu y col, 2004).

iii. Inflamación prostática y cáncer

La inflamación crónica generada a partir de la liberación de moléculas proinflamatorias, así como de la activación de células generadoras de inflamación pueden promover el desarrollo de padecimientos más graves, como la hiperplasia prostática, la que ya se trató en la sección anterior, y el cáncer de próstata (De Marzo y col, 2007; Visser y col, 2006; Palapattu y col, 2004). Por ejemplo se tiene algunos estudios que indican que individuos que han padecido prostatitis tienen 8 veces más posibilidades de experimentar hiperplasia prostática maligna y 5.4 veces mayor probabilidad de padecer cáncer de próstata (Krieger y col, 2008). Se plantea que lo anterior sucede debido a que la constante actividad de los mediadores de inflamación provocan un excesivo remodelamiento y pérdida de la arquitectura del tejido afectado, y también alteraciones a nivel proteico y de DNA debido al estrés oxidativo que se produce (Palapattu y col, 2004). Esto se sustenta en investigaciones a nivel clínico donde se muestra que individuos proclives a enfermedades inflamatorias corren un mayor riesgo a desarrollar cáncer (Visser y col, 2006). Por ejemplo se ha observado que el estado inflamatorio producido por algunas bacterias, como la *Helicobacter pylori*, son la causa de al menos del 15% al 20% de tumores padecidos por humanos (De Marzo y col, 2007; Visser y col, 2006). Algunos estudios en modelos animales apoyan lo anterior al mostrar que algunas moléculas implicadas en el proceso inflamatorio como especies reactivas de oxígeno; metaloproteinasas (MMP), ciclooxigenasas (COX), interleucinas, entre otras, pueden favorecer el desarrollo de cáncer (Visser y col, 2006; Palapattu y col, 2004).

En un modelo murino de cáncer de páncreas determinaron que la MMP9 producida por macrófagos induce la producción de factor de crecimiento vascular endotelial, y estimula la proliferación de células endoteliales vasculares, favoreciendo angiogénesis y desarrollo de tumores (Visser y col, 2006). También se ha observado que la producción de MMP7 por osteoclastos induce la actividad del receptor del factor nuclear del ligando κ B e induce osteolisis, lo cual promueve la metástasis a hueso del cáncer de próstata. Por otro lado, en lo que respecta a ciclooxigenasas, en algunos estudios en modelos murinos de cáncer de mama se muestra que la sobreexpresión de COX2 induce carcinogénesis mientras que su delección genética la reduce (Visser y col, 2006; Palapattu y col, 2004). Con respecto a interleucinas, se ha evidenciado en un modelo murino que la deficiencia en la producción de TNF- α o la de su receptor disminuye la susceptibilidad química a desarrollar cáncer de piel (Visser y col, 2006). En lo que respecta a especies reactivas de oxígeno, como el óxido nítrico (NO), radicales hidroxilo (OH), entre otros, se tiene que causan peroxidación lípidica e inducen cambios genéticos somáticos; por ejemplo investigaciones muestran que el NO puede generar cambios estructurales en la proteína p53 y alterar sus función (Visser y col, 2006). Además se ha mostrado que la peroxidación lípidica puede favorecer la síntesis de prostaglandinas activando COX2, molécula que, como ya se ha mencionado, se ha asociado con el desarrollo de cáncer de próstata (Palapattu y col, 2004).

El estado inflamatorio crónico de la próstata puede iniciarse por reflujo urinario, dieta inadecuada, trastornos hormonales, entre otras cosas, lo que podría

llevar a la pérdida de la auto-tolerancia inmune y así a la perpetuación de la inflamación (De Marzo y col, 2007). En este estado hay presencia de un infiltrado de células inflamatorias en próstata y un aumento en la proliferación de células epiteliales en lesiones atróficas, a lo que se le ha llamado atrofia inflamatoria proliferativa¹ (PIA, por sus siglas en ingles). El infiltrado celular observado en la PIA está compuesto por células T CD25+, CD45+, CD8+, CD4+ (Th1, Th2 y Th17), células CD3+, y células B CD19 o CD20 (De Marzo y col, 2007). De dichas células al menos el 40% de las células T CD3+ muestran el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II), indicando su activación. También se ha mostrado que muchas de las células con MHC-II expresan CD45RO mostrándose así que dichas células han estado en contacto con antígeno, cabe mencionar que ninguna de estas dos características de las células T se exhiben en epitelio prostático normal. Algunas de estas particularidades, así como la presencia de células CD-25 y Th17, se han asociado con el desarrollo de cáncer de próstata (De Marzo y col, 2007; Steiner y col, 2003).

La inflamación prostática crónica es considerada como un factor etiológico de desarrollo de cáncer de próstata, por lo que se ha considerado a los genes de las rutas inflamatorias como candidatos a determinantes genéticos de riesgo a dicha patología (Palapattu y col, 2004). Por ejemplo mutaciones en el gen del receptor del macrófago-1 (MSR1), han sido encontradas en algunas familias propensas al cáncer de próstata (De Marzo y col, 2007). También se ha mostrado que algunas variantes alélicas de la familia de receptores como toll

¹ La PIA sea a observado puede ser considerada un estado de transición a la aparición de hiperplasia benigna prostática y neoplasia intraepitelial prostática (De Marzo y col, 2007).

(TLR's), como el TLR4 y el TLR1-6-10 se han asociado con riesgo a cáncer de próstata. En cuanto a esto se tiene que el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la región UTR 3' de TLR4 incrementa el riesgo de cáncer prostático en un 26% en hombres que presentan esta SNP en comparación con individuos que no la presentan (Ohashi y col, 2000). Aunado a esto se tienen estudios que la presencia de 17 SNP's en el TLR1-6-10 aumenta de 1.20 a 1.38% el riesgo a padecer cáncer de próstata (Zheng y col, 2004). Estas y otras evidencias permiten plantear a las alteraciones en genes de moléculas relacionadas con la inflamación como factores de riesgo para el desarrollo de tumorigenesis, en este caso en particular con la generación de cáncer de próstata.

Otras evidencias de que la inflamación puede ser correlacionada con cáncer de próstata las dan estudios que indican que drogas anti-inflamatorias no esteroideas (NSAID) pueden disminuir el riesgo de padecer dicho cáncer (Leitzmann y col, 2011; Mahmud y col, 2011; De Marzo y col, 2007). Esto se logra al inhibir la actividad de COX2, y otras ciclooxigenasas, disminuyéndose así los niveles de ácido araquidónico y consecuentemente los de prostaglandina E2, lo cual en modelos murinos se ha mostrado inhibe el crecimiento de tumores prostáticos (Wechter y col, 2000). En humanos se ha mostrado una fuerte relación inversa (0.85) del uso de propionatos durante periodos de 11.1 a 16 años antes de la diagnosis, como el iboprufeno y el naproxeno, y la presencia de tumor prostático (Mahmud y col, 2011). También se ha observado en estudios realizados en humanos que el consumo frecuente de aspirina tiene una relación inversa de 0.84 en la progresión a cáncer total de próstata (Leitzmann y col, 2011). De todo esto se puede plantear que la disminución de la inflamación por algunas drogas puede

asociarse con la disminución en el riesgo de la presencia de cáncer próstata (Leitzmann y col, 2011; Mahmud y col, 2011; De Marzo y col, 2007).

B. Inmunoterapia

La inmunoterapia es un recurso terapéutico novedoso en el cual se utilizan agentes que inician una respuesta inmune y que puede ser aplicada a las enfermedades autoinmunes (Delavallee y col, 2010; Sabatos-Peyton, 2010). Como ya se mencionó anteriormente las enfermedades autoinmunes, entre las cuales se encuentra la prostatitis tipo III, resultan como consecuencia de la pérdida de tolerancia a un autoantígeno (Delavallee y col, 2010). La patogénesis de este tipo de enfermedades ha sido asociada a factores ambientales, genéticos y epigenéticos, y también se plantea están involucradas células B y células T autoreactivas (Delavallee y col, 2010). Debido a que en este tipo de padecimientos se involucra principalmente al sistema inmune se han buscado alternativas que puedan regular dicho sistema, como lo son los agentes inmunoterapéuticos (Delavallee y col, 2010; Sabatos-Peyton, 2010).

Un inmunomodulador debe de aumentar la tolerancia inmunológica, o ser tolerogénico, y además debe de inducir la generación de células T reguladoras (Sabatos-Peyton, 2010). Por ejemplo la introducción del micro RNA miRNA-142 en un vector lentiviral que codifica para la proteína fluorescente verde en un modelo murino se ha observado puede inducir tolerancia. Lo anterior suprime la expresión antigénica por células presentadoras de antígeno profesionales (APC), y favorece la producción de células reguladoras FoxP3+ antígeno específicas (Annoni y col,

2009). En otros estudios el tratamiento con el complejo sIAg7-pGAD65, el cual es un complejo péptido-complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), bloquea el desarrollo de diabetes en el ratón NOD. Esto se asoció con el incremento de células secretoras de IL-10, molécula que se ha relacionado con autoregulación inmune, y también con un aumento en el número de células reguladoras FoxP3+ antígeno específicas (Lil y col, 2009). De todo esto se concluye que los agentes inmunoterapéuticos bajo un esquema de tratamiento adecuado pueden regular el sistema inmune aumentando la tolerancia antigénica e induciendo la producción de células T reguladoras, como las productoras de IL-10 y las FoxP3+ (Sabatos-Peyton, 2010).

La vitamina D es otro inmunomodulador que está siendo estudiado en la actualidad, se ha mostrado que esta vitamina induce células dendríticas (DC) tolerogénicas. Estudios muestran que las DC's tolerogénicas inducidas por agonistas de la vitamina D, como el eloclitol, promueven la proliferación de células T reguladoras CD4+CD25+FoxP3+, las cuales son capaces de mediar tolerancia a transplantes y retrasar el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Toubi, 2010). Otros agentes que regulan la respuesta inmune han sido diseñados para disminuir o bloquear la respuesta a diversas interleucinas, lo cual se logra con anticuerpos neutralizantes (Delavallee y col, 2010). Por ejemplo se ha mostrado que el bloqueo del TNF- α en artritis reumatoide y otras enfermedades como la espondiloartropatia y psoriasis entre otras ha dado buenos resultados, esto se ha realizado mediante terapia génica y siRNA (Delavallee y col, 2010). Por otro lado en la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) se ha observado que el bloqueo de la IL-17 es eficaz en tratar esta enfermedad en modelos de

ratas (Delavallee y col, 2010). La eficacia que ha mostrado tener este tipo de terapias ha favorecido el desarrollo de agentes inmunoterapéuticos que regulan diversas citocinas inflamatorias, tales como la IL-4, la IL-5, la IL-6, la IL-13 y el IFN- γ por mencionar algunos (Delavallee y col, 2010).

En un estudio se muestra una comparación entre un agonista del receptor de la vitamina D, el Elocalitol, contra un fármaco de uso común en la prostatitis, la Dexametasona (Penna y col, 2006). Esto se realizó en ratones NOD a los que se les indujo EAP y que se agruparon en tres conjuntos, el control con EAP tratado con vehículo (miglyol 812), el grupo con EAP tratado con Elocalitol y los animales con EAP tratados con Dexametasona. Se administró 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de elocalitol por 5 días a la semana, del día 14 al 30 después de la inmunización de los ratones y la Dexametasona se administró oralmente 0.25 mg/kg por 5 días a la semana, del día 14 al 30 después de la inmunización. Por su parte el elocalitol disminuyó los infiltrados celulares intraprostáticos en un 67% en comparación con el grupo tratado con el vehículo mientras que la Dexametasona solo lo hizo en un 33%. Lo anterior se tradujo en una mayor disminución en la presencia de células T CD4+ y CD8+, células B B220, células dendríticas CD11c+ y macrófagos CD11b+ en los infiltrados prostáticos de los animales tratados con elocalitol (Penna y col, 2006). Por otro lado algunos ratones se inmunizaron con PSBP, o prostateína, y se trataron con vehículo y elocalitol por 9 días, mostrando que células de nodos linfáticos de ratones tratados con el agonista del receptor de la vitamina D producían significativamente menos IFN- γ que las tratadas con el vehículo (Penna y col, 2006). Estos resultados permiten plantear que el Elocalitol interviene en

eventos patogénicos clave en la prostatitis autoinmune establecida inhibiendo la inflamación prostática (Penna y col, 2006).

i. **Extracto Dializado de Leucocitos**

Un agente inmunoterapéutico que ha mostrado tener buenos resultados en diferentes enfermedades es el factor de transferencia o Extracto Dializado de Leucocitos (DLE, por sus siglas en ingles). El DLE fue descrito en 1955 por S. Lawrance quien lo obtuvo dializando leucocitos de donadores sanos que presentaron una prueba de tuberculina percutánea positiva, y dicho factor transfirió a receptores sanos sensibilidad a dicha prueba (Berron-Pérez y col, 2007). Lawrance y Borkowsky modificaron la obtención de DLE usando una membrana de diálisis y una segunda membrana de exclusión para moléculas de 3.5kDa que enlazaban antígenos. En 1975 el grupo de investigación de Kirckpatrick mostró que el DLE está constituido por péptidos de 5 kDa. Cuando se analizaron las secuencias parciales de nucleótidos se encontró una secuencia consenso MXLLYADQL/VEDN; la cual se sugiere enlaza al receptor del DLE (Berron-Pérez y col, 2007). Se observó también que el DLE tiene tirosinas y glicinas con una región N- terminal muy similar a algunos neuropéptidos, tales como las encefalinas (Berron-Pérez y col, 2007).

El factor de transferencia está constituido por varias moléculas de bajo peso molecular, aproximadamente de 1-6 kDa (Berron-Pérez y col, 2007). El DLE es termolábil pero presenta una gran estabilidad entre -20°C a -70°C, y DNasas,

RNAsas y tripsina no disminuyen su actividad (Berron-Pérez y col, 2007). Algunos estudios muestran que contiene un nucleótido péptido híbrido y que la hipoxantina es uno de sus componentes principales (Meier y col, 1977). Las preparaciones del factor de transferencia no son inmunogénicas y no contienen el antígeno de histocompatibilidad (Meier y col, 1977). Este agente inmunoterapéutico ha sido utilizado solo y combinado con varias drogas para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como infecciones virales, bacterianas, parasitarias o micosis, así también como para alergias, neoplasias y algunas enfermedades autoinmunes (Berron-Pérez y col, 2007).

Se ha observado que uno de los órganos implicados en el efecto de DLE es el timo, ejemplo de esto es un estudio en un niño de 9 años con infecciones pulmonares recurrentes y candidiasis mucocutánea crónica que presentaba un notable defecto en la inmunidad celular pero una respuesta humoral normal (Kirkpatrick y col, 1976). En este estudio se evidencio que el estado patológico de este niño en un principio no mostró efectos benéficos cuando se le administró factor de transferencia. Sin embargo, el niño recibió un trasplante de timo y continuo con su tratamiento con dicho agente inmunoterapéutico y mostró una notoria mejoría *in vitro* de la actividad linfocitaria (Kirkpatrick y col, 1976). Además la celularidad inmune en nodos linfáticos aumento, especialmente en zonas timo-dependientes. Estos estudios sugieren que las células timo-derivadas son requeridas para la adquisición de una inmunidad celular inducida por el factor de transferencia (Kirkpatrick y col, 1976).

En pacientes con purpura trombocitopénica autoinmune (ATP, por sus siglas en ingles) se ha observado una mejora en el índice de migración leucocitario

cuando se administra DLE (Borkowsky y Karpatkin, 1984). En este estudio se observó que el DLE obtenido de una mujer blanca de 52 años de edad con purpura trombocitopénica autoinmune intermitente de 6 años, incrementa el índice de migración leucocitario (IML) cuando leucocitos de pacientes con la misma enfermedad reaccionan con membranas de plaquetas a concentraciones de 500 y 250 $\mu\text{g/ml}$ (Borkowsky y Karpatkin, 1984). También se observó que el DLE obtenido de una mujer blanca de 42 años con purpura trombocitopénica autoinmune crónica de 24 años de duración disminuyó significativamente el IML de linfocitos de pacientes normales cuando reaccionan con soluciones de membranas plaquetarias con concentraciones de 500 a 250 $\mu\text{g/ml}$. De esto se plantea que el DLE puede disminuir la reactividad de los leucocitos aumentando la actividad supresora. Además se postula que en algunos casos el DLE puede inducir actividad y en otros suprimir la actividad inmune (Borkowsky y Karpatkin, 1984), lo cual lo hace considerar como un agente inmunomodulador (Berron-Pérez y col, 2007; Oettgen y col, 1974).

Por otro lado Sotelo en un modelo experimental de ratas con glioma, reporta que la administración de DLE disminuye significativamente el crecimiento del tumor por inducción de apoptosis (Berron-Pérez y col, 2007). En este estudio se formaron tres grupos de ratas, a uno se le administró carmustina, un agente quimioterapéutico, combinada con DLE, al segundo se le administró DLE solo y al tercero carmustina sola; de los tres grupos se registró una mejor respuesta en el primero. Además se mostró que los animales tratados solo con el DLE mostraron un incremento en linfocitos T CD4+, T CD8+ y células NK; aunado a esto se encontró un aumento en la producción de IL-2, IL-6 y TNF- α , lo cual es relevante

ya que se ha mostrado que pacientes con glioma tienen niveles disminuidos de IL-2 (Berron-Pérez y col, 2007). Por otro lado algunos estudios muestran que el DLE es capaz de inducir la expresión de IFN- γ en pacientes con herpes simplex, y también se observó que el DLE induce la producción de RANTES, una quimiocina que juega un rol activo en el reclutamiento leucocitario en algunos sitios inflamatorios y que además tiene un importante efecto en los linfocitos T de memoria (Berron-Pérez y col, 2007).

Otra enfermedad en la cual se ha utilizado el factor de transferencia es la tuberculosis. A este respecto se tiene la investigación realizada por Febre y col, en un modelo murino donde se evidenció que animales tratados con DLE combinado con medicamentos para la tuberculosis mejoraron más rápido que ratones tratados solo con DLE o solamente con fármacos antituberculosis. Además se observó que en los animales tratados con DLE se presentó una regulación de la expresión del TNF- α , de óxido nítrico e IFN- γ (Berron-Pérez y col, 2007). Se considera que estos hallazgos son importantes ya que soportan investigaciones clínicas previas de pacientes con tuberculosis donde se indica que personas tratadas con el DLE disminuyen significativamente el tiempo de respuesta al tratamiento antituberculoso (Berron-Pérez y col, 2007). Esto podría posicionar al DLE como un agente inmunomodulador que podría ser utilizado en pacientes con patologías inmunes congénitas y/o adquiridas (Berron-Pérez y col, 2007; Oettgen y col, 1974).

A nivel clínico se ha mostrado que el DLE tiene algunos efectos en padecimientos autoinmunes que implican inflamación como lo es la artritis reumatoide juvenil (ARJ) (Hoyeraal, y col, 1976; Grohn y col, 1974). Por ejemplo

Grohn y col, utilizaron DLE cromatográficamente purificado con efecto estimulador no específico en 8 casos de artritis reumatoide juvenil, aquí se mostró un aumento en la actividad inmune mediante las pruebas de piel y una mejora en cuanto a los síntomas clínicos en 5 de los 8 casos (Grohn y col, 1974). En otro estudio donde se monitorearon los efectos del DLE de 23 pacientes con ARJ se registró una disminución en el dolor y en la rigidez matutina pero que no fue estadísticamente significativa. Además se mostró una disminución en el número absoluto de linfocitos T que no fue estadísticamente significativa, mientras que el porcentaje de linfocitos T con respecto a los linfocitos totales disminuyó significativamente (Hoyeraal y col, 1976). En conjunto esto indica que el DLE puede ser una alternativa en enfermedades autoinmunes inflamatorias que cursan con un desbalance en la respuesta de células T.

En lo que se refiere al aparato genitourinario masculino se cuenta con estudios que indican que el factor de transferencia da resultados favorables en pacientes con cáncer de próstata (Corrado y col, 1989). Por ejemplo en una investigación realizada en 56 pacientes con carcinoma metastásico hormona-resistente a los que se les administró DLE se reportó una completa remisión en un paciente, remisión parcial en 6 personas, y detención de la metástasis en 14 individuos (Corrado y col, 1989). Además se reportó un aumento de la supervivencia de los pacientes de 17 meses lo que se fue el mayor grado de supervivencia en 1989 y no se reportaron efectos colaterales (Corrado y col, 1989). En otro reporte se muestra que de 50 pacientes con cáncer de próstata en fase D3 a los que se les inyectó 2 – 5 unidades de DLE al mes, 2 mostraron una remisión completa, 6 una remisión parcial y no hubo progreso de metástasis en 14

(Pizza y col, 1996). La supervivencia media fue de 126 semanas el cual es el mayor tiempo de supervivencia reportado hasta 1996 (Pizza y col, 1996). De esto se puede plantear que el DLE puede ser considerado un DLE para algunos padecimientos.

III. Justificación

Actualmente la prostatitis, y las patologías con las cuales se ha podido relacionar, son padecimientos de difícil diagnóstico y tratamiento por lo que es considerada problema de salud a nivel mundial (Motrich, 2006). Además su importancia aumenta al considerar que se ha relacionado fuertemente con patologías más graves como la HPB y el cáncer de próstata, el cual ocupa el segundo lugar en incidencia en el mundo y también en México (Khamis y col, 2010; Hou y col, 2009; Cruz-Nuricumbo y col, 2005). Por esto y otros motivos es necesario buscar alternativas terapéuticas para su tratamiento y control.

La inmunoterapia es una alternativa que se ha utilizado en diversas enfermedades autoinmunes, como lo es la CP/CPPS (Delavallee y col, 2010; Sabatos-Peyton, 2010). A este respecto se ha estado investigando la acción de diversos agentes inmunoterapéuticos, entre ellos encontramos al DLE el cual ha mostrado tener efectos benéficos en diversas patologías. En la actualidad se tienen estudios que muestran que el DLE puede disminuir los síntomas de algunas enfermedades relacionadas con la próstata, como lo es el cáncer de próstata. Sin embargo, no se tienen estudios que muestren si el DLE como inmunomodulador puede tener efectos en la prostatitis autoinmune. Por lo anterior, es pertinente

realizar estudios, como el presente, que muestren que posibles efectos puede tener el DLE en un modelo murino de prostatitis autoinmune experimental (EAP).

IV. Hipótesis

Puede el DLE generar efectos inmunomoduladores en la prostatitis autoinmune.

V. Objetivos

A. Objetivo general

Demostrar el efecto inmunomodulador del extracto dializable de leucocitos (DLE) mediante la determinación de cambios histopatológicos y moleculares asociados a inflamación en un modelo de EAP.

B. Objetivos específicos

- Instaurar el modelo de EAP en ratas.
- Posterior al tratamiento con DLE y :
 - Se evaluó en ratas con EAP cambios a nivel histopatológicos asociados a procesos inflamatorios.
 - Se determinó en ratas con EAP posibles cambios en los niveles proteicos de prostateína en suero.
 - Se registró inmunohistoquímicamente en tejido prostático de ratas con EAP posibles modificaciones en la expresión de

PCNA (proliferación celular), TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17, IL-4 y CD45.

VI. Metodología

A. Estandarización del Modelo murino

Se emplearon ratas Wistar machos de tres meses de edad o mínimo 250 g de peso, a las cuales se les extirpo próstata, vesícula seminal y glándula coagulante (glándulas accesorias sexuales masculinas o RAG por sus siglas en inglés) (Maccioni y col, 1998). Con los RAG se hizo un homogeneizado con 0.01 M de PBS a pH de 7.2 con inhibidores de proteasas (aprox. 50mL de PBS por próstata), el homogeneizado se centrifugó a 10,000 r. p. m. por 30 min, ocupándose el sobrenadante. El homogeneizado de RAG se modificó químicamente con derivados de diazonio de ácido sulfanílico o arsenílico en solución salina, esto no cambia la especificidad pero si tiene un papel adyuvante mayor (MRAG).

Para la estandarización del modelo murino se ocuparon varios esquemas de administración del MRAG, en los que se emplearon las vías de administración subcutánea e intraperitoneal. Comúnmente para generar el modelo de prostatitis autoinmune se ha utilizado la administración del homogeneizado subcutáneamente (Maccioni y col, 1998). Sin embargo, nosotros decidimos utilizar la vía de administración intraperitoneal, teniendo en consideración que la administración del MRAG en una zona cercana a la zona a afectar, como lo es el peritoneo, podría causar un mayor proceso inflamatorio en el órgano blanco. Esto

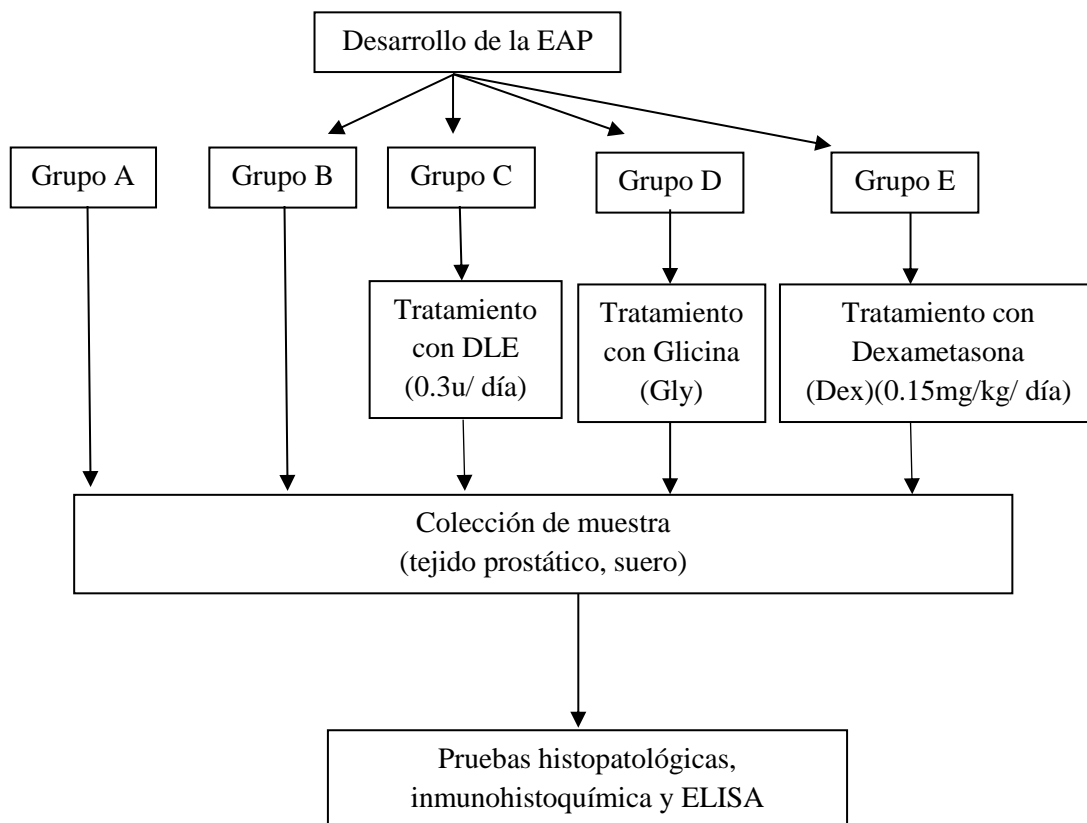
derivo en cuatro esquemas de administración. Independientemente de dicho esquema, las ratas fueron administradas en los días 0, 15 y 30 con 5 mg de MRAG emulsificado con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund. Muestras de tejido prostático y suero fueron obtenidos en el día 34 después de una o dos inyecciones de MRAG. Los esquemas de administración fueron los siguientes:

- a. Subcutáneo en las tres ocasiones (S): en los tres días de inmunización la vía de administración fue subcutánea.
- b. Intraperitoneal en las tres ocasiones (IP): en los tres días de inmunización la vía de administración fue intraperitoneal.
- c. Utilizando la administración subcutánea e intraperitoneal (SI) simultáneamente: en los tres días de inmunización el 50% del MRAG fue administrado subcutáneamente y el resto fue administrado intraperitonealmente.
- d. Alternando la administración subcutánea e intraperitoneal a lo largo del experimento (SIS): En los días 0 y 30 la administración del MRAG se realizó subcutáneamente mientras que en el día 15 la administración del homogeneizado fue intraperitonealmente.

Según los resultados histopatológicos, los que se describen en la siguiente sección de esta tesis, se eligió el esquema de administración SIS, ya que en general histopatológicamente mostró un notorio infiltrado de células inflamatorias, varias zonas con Atrofia Inflamatoria Proliferativa (AIP) y/o HPB, además de un índice de mortalidad bajo. Una vez elegido el modelo murino a utilizar se continuó

con una nueva fase experimental en la que se formaron cinco nuevos grupos experimentales. Un grupo de ratas sanas y cuatro grupos de ratas con la patología, el primero de estos cuatro grupos fue tratado con Dexametasona (0.15mg/kg/ día), el segundo con el DLE (0.3 unidades/día), el tercero con placebo (glicina) y el último grupo no recibió algún tipo de tratamiento (control patológico). Los tratamientos con Dexametasona, DLE y placebo fueron administrados oralmente del día 15 al 34, de tal forma que se aplicaron 19 tomas de cada sustancia.

B. Esquema de la estrategia experimental



C. Pruebas histopatológicas

Las pruebas histopatológicas se utilizaron principalmente para observar cambios morfológicos y estructurales en el tejido prostático, así como la presencia de células inflamatorias. Lo que se realizó fue extirpar la próstata de los animales de los diferentes grupos y fijarlos en formalina al 10%, posteriormente se deshidrataron dichos tejidos por baños sucesivos con alcohol etílico al 100%. Una vez deshidratado el tejido se procedió a ser aclarado sumergiéndolo en Xilol por lo menos por una hora. Después de esto se procedió a homogeneizar los tejidos sumergiéndolos en baños de cera, la cual se encontraba entre 58 y 60° C, por una hora.

Una vez homogeneizado el tejido se procedió a la inclusión de la muestra prostática en bloques de parafina, para esto se utilizaron unas canastillas recubiertas con papel, en las cuales se colocaron las muestras del tejido. Se vertió parafina en las canastillas hasta cubrir la muestra, la cual se acomodó de forma que quedará en la mejor posición para hacer sus respectivos cortes, estas canastillas se pusieron sobre hielo para eficientizar la solidificación de la parafina. Por último se retira el papel. Una vez incluido el tejido se realizaron cortes de 3µm mediante un micrótopo de rotación, los que se colocaron en sus laminillas correspondientes. Ahora para proceder a efectuar las tinciones utilizadas en este trabajo los cortes se desparafinaron colocando las laminillas en un horno a 60°C por 30min y ulteriormente se aclararon colocándolos en dos baños consecutivos de Xilol de 5min cada uno.

a. Tinción Hematoxilina-eosina

Una vez realizado todo lo anterior se ejecutó la tinción de hematoxilina-eosina, la cual es un método histológico práctico utilizado desde hace mucho tiempo para evaluar cambios morfológicos y otros procesos celulares en diversos tejidos. Esta técnica consiste en la aplicación de un colorante básico que colorea estructuras ácidas, como lo es la hematoxilina, con dicho colorante se tiñe el núcleo y algunos gránulos de color azul. Por otro lado se usa un colorante ácido de contraste que colorea componentes celulares básicos, como lo es la eosina, la cual tiñe estructuras como el citoplasma, de color rosa. La técnica a utilizar para la tinción es la siguiente:

Como ya se mencionó se obtuvieron las muestras de tejido prostático de las ratas de los diferentes grupos, se fijaron, se embebieron en parafina, se hicieron los cortes correspondientes y se procedió a la tinción. Para esto se desparafinaron los cortes sumergiéndolos en Xilol por tres min en dos ocasiones, posteriormente se hidrataron las muestras sumergiéndolas en alcohol absoluto 3min, después se pusieron los cortes 3min en alcohol al 95%, finalizado esto las laminillas se colocaron en alcohol al 70% por 3 min, se sumergieron en agua corriente por 5 min y por último en agua destilada por 1 min.

Una vez rehidratada la muestra los cortes fueron sumergidos en hematoxilina por 5 min, posteriormente se lavaron las laminillas sumergiéndolas en agua destilada en dos ocasiones por 1 min. Al finalizar esto las laminillas se colocaron en alcohol ácido hasta que los núcleos y otras estructuras basófilas fueron los únicos componentes celulares teñidos. Se lavaron las laminillas en agua

corriente por 2 min. Se colocaron las laminillas en bicarbonato de sodio al 2% para que el colorante virara a azul. Se lavaron las laminillas en agua corriente por 5 min. Se colocaron las laminillas en agua destilada, 2 baños 1 min cada uno. Las laminillas fueron coloreadas con eosina por 5 min. Posteriormente los tejidos fueron deshidratados en baños crecientes de alcohol etílico de (70, 95 y 100%) de un minuto cada uno. Se realizó un último baño de las laminillas en alcohol al 100% por 2 min. Posteriormente se realizaron dos baños de las laminillas en Xilol, de 1 y 2 min respectivamente, para aclarar.

Terminada la tinción se procedió a montar la muestra cubriéndola con una resina de montaje (paramount) y se colocó un cubreobjetos. Se cuidó que no quedarán burbujas de aire en la preparación. Se dejó secar la preparación y se observó en el microscopio Olympus C3672.

b. Tinción de azul de toluidina

El azul de toluidina, o cloruro de toluidina, tiñe estructuras basófilas, como la cromatina. Puede teñir algunas estructuras de azul, comportándose como colorante ortocromático, aunque también puede teñir con una tonalidad de violeta-rojo al interactuar con ciertos tipos celulares, lo que se denomina metacromasia. El comportamiento orto o metacromático dependerá del pH del medio en que se encuentre el colorante y de la naturaleza química de la sustancia teñida. Frecuentemente, debido a su comportamiento ortocromático, es utilizado para teñir estructuras ricas en proteoglicanos sulfatados, como el heparin sulfato, y glicosaminoglicanos, de células mastocíticas (Sridharan y Shankar, 2012).

Componentes celulares como los proteoglicanos son teñidas de azul y se nombran como cromotropos, los que presentan grupos ácidos con una densidad mínima de 0.5 nm entre grupos adyacentes cargados negativamente unidos por fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógenos y uniones hidrofóbicas. Las cargas negativas de los cromotropos atraen grupos cargados positivamente produciendo una agregación colorante-colorante en un orden particular generando una forma polimérica, de las cuales una la otra genera la coloración azul (Sridharan y Shankar, 2012).

Se obtuvieron las muestras de tejido prostático de las ratas de los diferentes grupos, se fijaron, se embebieron en parafina, se hicieron los cortes correspondientes y se procedió a la tinción. Se procedió a la desparafinación de las muestras colocando los tejidos en Xilol por 15 min. Posteriormente se sumergieron las laminillas en soluciones de alcohol etílico en concentraciones seriadas descendentemente al 100, 95 y 70%, se mantuvieron las laminillas en las soluciones por 10 min. Se preparó la solución stock de azul de toluidina adicionando un gramo de polvo de reactivo en 100 mL de alcohol al 70%. 5 mL de la solución stock se diluyeron en 45 mL de una solución de 0.5 g diluidos en 50 mL de agua con un pH de 2 a 2.5, se usó esta última solución inmediatamente.

Una vez que se realizó lo anterior los tejidos fueron desparafinados y rehidratados para sumergirse en la solución de trabajo de azul de toluidina por 2-3 min. Posteriormente las laminillas se bañaron en agua destilada por 5 min, esto se realizó en 3 ocasiones. Se deshidrataron los tejidos en soluciones de alcohol etílico en concentraciones seriadas ascendentemente, de 75, 95 y 100%. Se lavó

las laminillas en 2 ocasiones en xilol para aclarar el tejido, aproximadamente 5 min por lavado.

Finalizada la tinción se procedió a montar la muestra cubriéndola con una resina de montaje (paramount) y se colocó un cubreobjetos. Se cuidó que no quedarán burbujas de aire en la preparación. Se dejó secar la preparación y se observó en el microscopio Olympus C3672.

D. Cuantificación de células inflamatorias

Las células inflamatorias fueron semicuantificadas de forma general, es decir sin hacer diferenciación entre leucocitos, fibroblastos, mastocitos, etc, mediante la tinción de hematoxilina-eosina. Se revisaron 5 laminillas de cada grupo y en el aumento de 40x se eligieron 2 regiones al azar, de tal forma que se analizaron 10 regiones de cada grupo, se contaron las células inflamatorias y promediaron, esto se realizó por triplicado. En la tinción de azul de toluidina se realizó el mismo procedimiento pero sólo se contaron los mastocitos.

E. ELISA

a. Obtención y almacenamiento de la muestra

Se obtuvieron las muestras sanguíneas por punción cardiaca en un tubo vacutainer con EDTA, posteriormente se obtuvo el suero centrifugando la muestra a 1000 g por 20 min. Las muestras se almacenaron a -20° C hasta que fueron requeridas.

b. Preparación de los reactivos

La solución estándar se preparó agregando 1mL de diluyente estándar al frasco del reactivo correspondiente, se dejó a temperatura ambiente por 10 min y se agitó. Se prepararon 5 tubos con 0.5 mL de diluyente estándar, al primer tubo se le agregó 0.1 mL de solución estándar, posteriormente de ese tubo se tomaron 0.1 mL y se le agregaron al siguiente tubo y así hasta completar los 7 tubos destinados a generar las soluciones para la curva estándar. Se obtuvo una curva de 7 puntos con concentraciones de 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 y .312 ng/mL, y un último tubo solo con diluyente (blanco).

Para preparar los Assay diluent A y B. se diluyeron 6 mL de los concentrados 2x de dichos diluyentes con 6 mL de agua destilada. Los reactivos de detección A y B se centrifugaron brevemente y se diluyeron, en una proporción 1:100, con los diluyentes de ensayo A y B respectivamente. Por otro lado se diluyeron 20 mL de solución de lavado (30x) con 580 mL de agua destilada para preparar esta solución.

c. Procedimiento del ensayo

En la placa de ELISA se determinaron los pozos para la curva estándar, el blanco y las muestras. En esos pozos fueron adicionados 100 μ L de cada dilución de estándar, blanco y muestra, se cubrió la placa y se incubó por 2 h.

Una vez finalizada la incubación se removió el líquido de la placa y se adicionaron 100 μ L de la solución de trabajo del reactivo de detección A a cada

pozo, se cubrió la placa y se incubó a 37° C por una hora. Se removió el líquido y se lavó con 35 µL de solución de lavado cada pozo, se dejó reposar por 1 o 2 min. El líquido remanente fue removido poniendo la placa en papel absorbente, se realizó esto en 3 ocasiones. Después del último lavado se removió el líquido remanente por absorción. Se adicionaron 100 µL de solución de trabajo del reactivo de detección B y se incubó la placa por 30 min a temperatura ambiente. Se realizó el procedimiento de lavado en 5 ocasiones y posteriormente se adicionaron 90 µL de solución de sustrato a cada pozo, se cubrió la placa y se incubó por 25 min a 37°C. La placa se protegió de la luz y el líquido se tornó azul al adicionar el sustrato.

Por último se agregaron 50 µL de solución stop a cada pozo y el líquido cambió a amarillo. Se mezcló el líquido hasta que el color fue uniforme en todos los pozos. Se leyó a 450nm inmediatamente.

F. Inmunohistoquímicas

La técnica inmunohistoquímica (IHQ) es un método muy utilizado debido a su practicidad y a su bajo costo (Daraji y col, 2009). Estas técnicas permiten la identificación, en muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos, tales como proteínas virales, marcadores oncológicos, entre otros, en diferentes tipos celulares (Buys y col, 2007). En esta metodología se utilizan anticuerpos mono o policlonales, así como cromógenos que permiten la detección microanatómica de las moléculas blanco y su correlación con parámetros morfológicos. Son muchos los factores que influyen en la adecuada inmunotinción

de un tejido, entre ellos están, el tipo de fijación, la duración de la fijación, el pH del fijador, la temperatura de fijación, el tipo de tejido o línea celular a utilizar, el sistema de detección, el cromógeno a utilizar, entre otros (Buys y col, 2007).

En una inmunotinción además de observar si la inmunoreacción es positiva o negativa se debe de prestar atención a la distribución citológica y a las características de expresión de los antígenos en cuestión. Por ejemplo antígenos leucocitarios como los receptores CD4 y CD8, así como otras moléculas inmunes tales como el MHC y el receptor para TNF, se encuentran en la membrana celular y son ligandos involucrados en la interacción, adhesión y transducción celular de señales o interacción con proteínas solubles y/o de matriz extracelular (Buys y col, 2007). Por otro lado la proteína Ki-67 es un antígeno con localización nuclear utilizado como un indicador de proliferación celular. Lo anterior se menciona debido a que dicha proteína ha sido detectada en las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular pero no en la fase G0 y además su bloqueó es asociado con la inhibición de la proliferación celular (Nabi y col, 2008).

La inmunohistoquímica se realizó con el kit Mouse/ Rabbit polydetector plus HRP/DAB (BSB 0259). Los anticuerpos de Abcam utilizados fueron: TNF- α (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Ab 1793), CD-45, (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(Ab 10558), IL-17 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Ab 79056), IL-6 (74 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Ab 6672), IL-4 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Ab 11524) y de la casa comercial Santa Cruz se usó PCNA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (sc-53407).

Se obtuvieron las muestras de tejido de próstata de las ratas de los diferentes grupos, se fijaron en paraformaldehído al 4% y se embebieron en parafina. Posteriormente los tejidos fueron desparafinados colocándolos en la estufa entre 65-70° C durante 15 min. Se realizaron 2 lavados con Xilol por 5 min,

después se lavaron con etanol absoluto 5 min en dos ocasiones. Se realizó un nuevo lavado con etanol absoluto x 5 min, luego un lavado en PBS 1x por 2 min. Ulteriormente se realizó la recuperación de citratos con la solución adecuada situando las laminillas en un recipiente en la autoclave. Una vez finalizado lo anterior se dejó reposar las laminillas dentro de la solución de recuperación de citratos por 30 min a temperatura ambiente y después se adicionó una gota de bloqueo de peroxidasa por 10 min. Se adicionó PBS 1x en agitación durante 5 min y al finalizar se agregó una gota de solución bloqueadora por 30 min. Se agregó el anticuerpo primario y se incubo a -4°C por toda la noche.

Pasada la noche las muestras se lavaron con PBS 1X por 5 min y se le agregó una gota del segundo anticuerpo por 30 min. Al finalizar se les agregó el cromógeno, recién preparado, el tiempo de exposición vario según la molécula a analizar: para las IL-6 y 17 el tiempo de exposición fueron 2 min y para TNF, IFN, IL-4, CD-45 Y PCNA fueron 5 min. Terminado esto se lavaron las laminillas con PBS 1x por 5 min, se les agregó hematoxilina por 30s y se lavaron en un vaso con agua destilada. Las laminillas se lavaron con PBS 1x por 30 s, se colocaron en agua de llave por 5 min en dos ocasiones y se dejaron secar. Se montaron las muestras, se dejaron secar y se observaron al microscopio.

G. Análisis estadístico

Se realizó una prueba de ANOVA de una vía con prueba post hock de Tukey para los distintos resultados, el valor de $p \leq 0.05$. El análisis se realizó con el software Graph Pad Prism 6.

VII. Resultados

a) Obtención del modelo murino de Prostatitis Autoinmune Experimental (EAP)

Como ya se mencionó en el apartado de metodología para la obtención del modelo murino de EAP se utilizaron cuatro esquemas de administración del homogeneizado antigénico para la generación de prostatitis. El primer grupo fue administrado subcutáneamente en las tres ocasiones (S), el segundo fue administrado intraperitonealmente en las tres ocasiones (IP), el tercer grupo se le administró mediante las vías subcutánea e intraperitoneal simultáneamente en las tres ocasiones (SI) y en el último grupo se administró el homogeneizado alternando las vías, en el día cero y 30 se administró el homogeneizado subcutáneamente mientras que en el día 15 se administró intraperitonealmente (SIS).

Los esquemas de administración se plantearon como se describe en el párrafo anterior principalmente por dos razones. La primera fue que se observó la existencia de una diferencia en el proceso inflamatorio en cuanto a cantidad de infiltrado de células inflamatorias dependiendo de la vía de administración. También se observó que con ciertas formas de administración, en particular la administración intraperitoneal, se relacionaba con una mayor presencia de regiones con hipertrofia del tejido prostático así como hiperplasia. Por lo cual nos dimos a la tarea de probar distintos esquemas de administración del

homogenizado prostático. Esto para encontrar el esquema de administración en el cual se pudiera observar un proceso inflamatorio importante así como zonas con HPB y además fuera viable.

Una de las pruebas histopatológicas que se realizó para evaluar el efecto de los esquemas de administración fue la tinción hematoxilina-eosina, la cual mostró que en tejido prostático de ratas normales existió una constitución normal, con glándulas con paredes alveolares, con un espacio interluminal relativamente amplio, un volumen interglandular relativamente estrecho y muy poca o nula cantidad de células inflamatorias (Figura 1A). En el tejido prostático de ratas a las que se les administró el homogeneizado intraperitonealmente se observó una escasa cantidad de células inflamatorias y a diferencia de las ratas normales algunas regiones con glándulas de paredes lisas, un aumento del espacio interluminal, una disminución del espacio intraglandular y AIP (Figura 1B). Con respecto al grupo al que se le aplicó el MRAG subcutáneamente, al igual que en el grupo anterior y en el grupo normal, también se observó una escasa cantidad de células inflamatorias y, a diferencia de lo observado en el grupo normal se mostraron zonas con un aumentó en el tamaño de las paredes glandulares, hipertrofia y AIP (Figura 1C). Refiriéndonos al grupo tratado con la combinación de las vías de administración se mostró una notoria cantidad de células inflamatorias, en comparación con lo observado en los tres grupos anteriores, y además algunas regiones con AIP, aumento el número de glándulas e hipertrofia glandular, lo que coincide con HPB que no había sido reportada en este modelo (Figura 1D). Por último en el grupo en el que administramos el homogeneizado alternado las vías

de administración, a diferencia del grupo de animales normales, encontramos una notable cantidad de células inflamatorias así como AIP y HPB (Figura 1E).

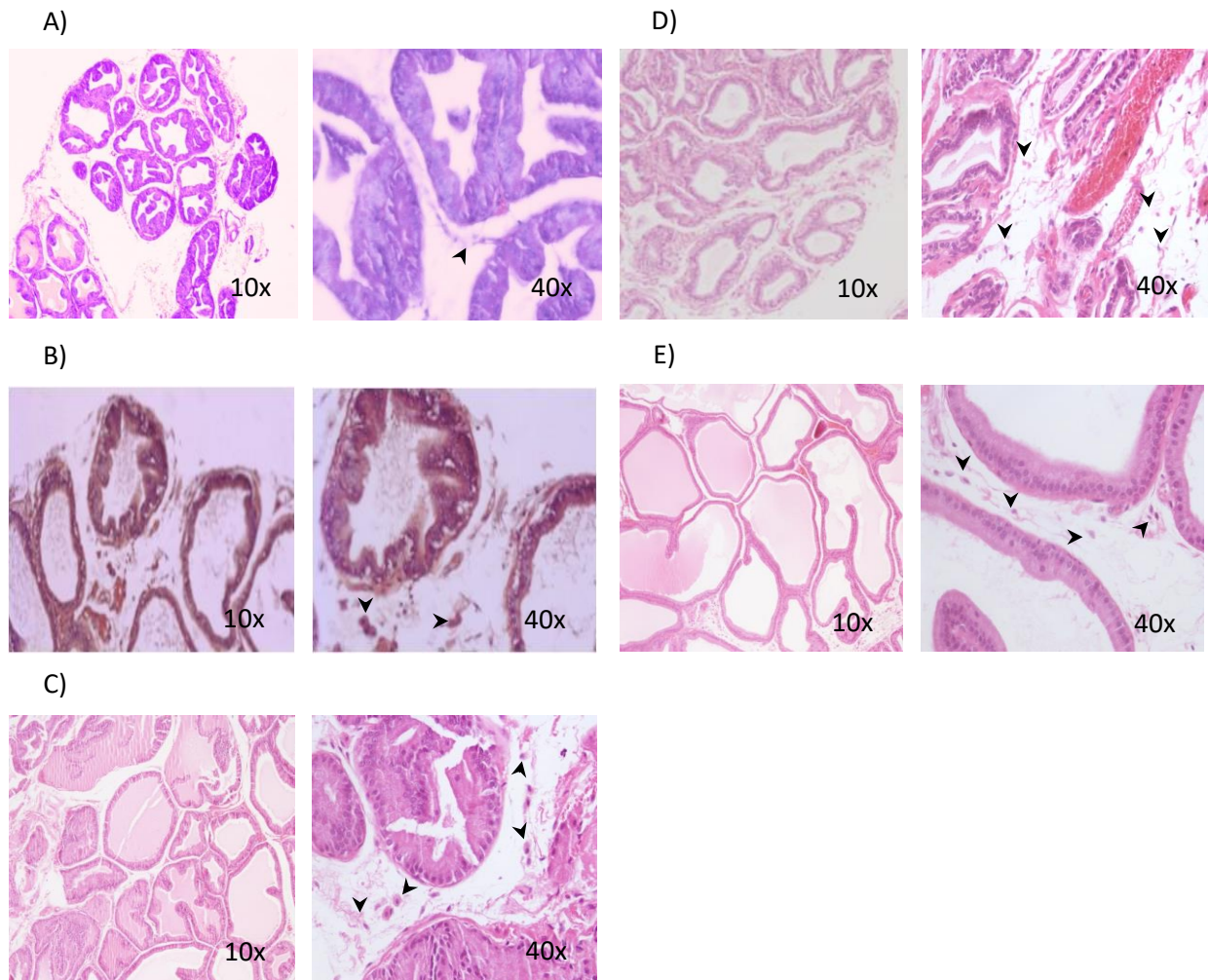


Figura 1. Tinción con hematoxilina-eosina de los diversos esquemas de administración. A. Tejido de próstata de rata normal, B. Tejido de próstata de rata administrada intraperitonealmente en las tres ocasiones, C. Tejido de próstata de rata administrada subcutáneamente en las tres ocasiones, D. Tejido de próstata de rata administrada mediante las vías de administración S e IP simultáneamente en las tres ocasiones, E. Tejido de próstata de rata administrada alternando las vías a lo largo del experimento en las tres ocasiones.

Por otro lado también se cuantificó la cantidad de células inflamatorias por campo (40x). Observándose en el grupo IP un promedio de 1.3 células por campo, en el grupo al que se administró subcutáneamente en las tres ocasiones el promedio fue de 1.7 células por campo, mientras que los grupos SI e SIS el promedio fue de 4.5 y 3.7 células por campo respectivamente (Figura 2). Se realizó una prueba estadística de ANOVA y un análisis post Hoc de Tukey mostrándose que los grupos SI y SIS tuvieron una mayor cantidad de células inflamatorias ($p=0.05$) con respecto al grupo normal y a los grupos IP y S, y que esa diferencia fue estadísticamente significativa. Entre los grupos SIS y SI no se mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de células inflamatorias.

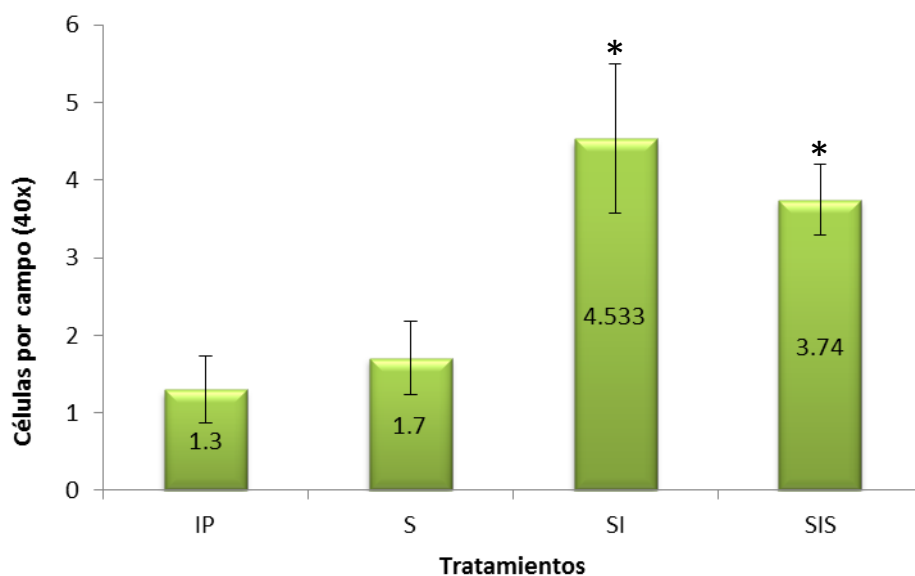


Figura 2. Número promedio de células inflamatorias por campo 40x entre los diversos esquemas de administración. (IP: Administración intraperitoneal en las tres ocasiones, S: Administración subcutánea del homogeneizado en las tres ocasiones, SI: Administración del homogeneizado intraperitoneal y subcutáneamente al mismo tiempo en las tres ocasiones, SIS: Administración subcutánea del homogeneizado en los días 0 y 30 e inmunización intraperitoneal en el día 15) * Diferencia significativa con respecto a los grupos IP y S ($p \leq 0.05$).

La tinción de azul de toluidina, para evidenciar el número de mastocitos en cada grupo, mostró que en ratas normales hubo una escasa cantidad de dichas células, los cuales aumentan en el estroma y tejido glandular de los grupos tratados con los diversos esquemas de administración del homogeneizado (Figura 3). De la misma forma que en hematoxilina-eosina se cuantificó el promedio de células por campo para mastocitos entre los diferentes grupos. En esta ocasión en

el grupo tratado con la administración intraperitoneal se obtuvo un promedio de 1.03 células por campo, mientras que en el grupo S el número de células por campo fue de 2.6, los promedios de células por campo de los grupos SI y SIS fueron de 3.7 y 2.7 respectivamente (Figura 4). También se realizó una prueba estadística de ANOVA y un análisis post Hoc de Tukey obteniendo que el grupo al que se le administró mediante las vías de administración S e IP simultáneamente presentó una mayor cantidad de mastocitos en comparación con los grupos restantes, esta diferencia fue estadísticamente significativa. El grupo al que se le administró intraperitonealmente el MRAG mostró una menor cantidad de células mastocíticas estadísticamente significativa con respecto a los otros tres grupos. En lo que respecta a la comparación entre los grupos S y SI no hubo diferencia significativa entre ellos.

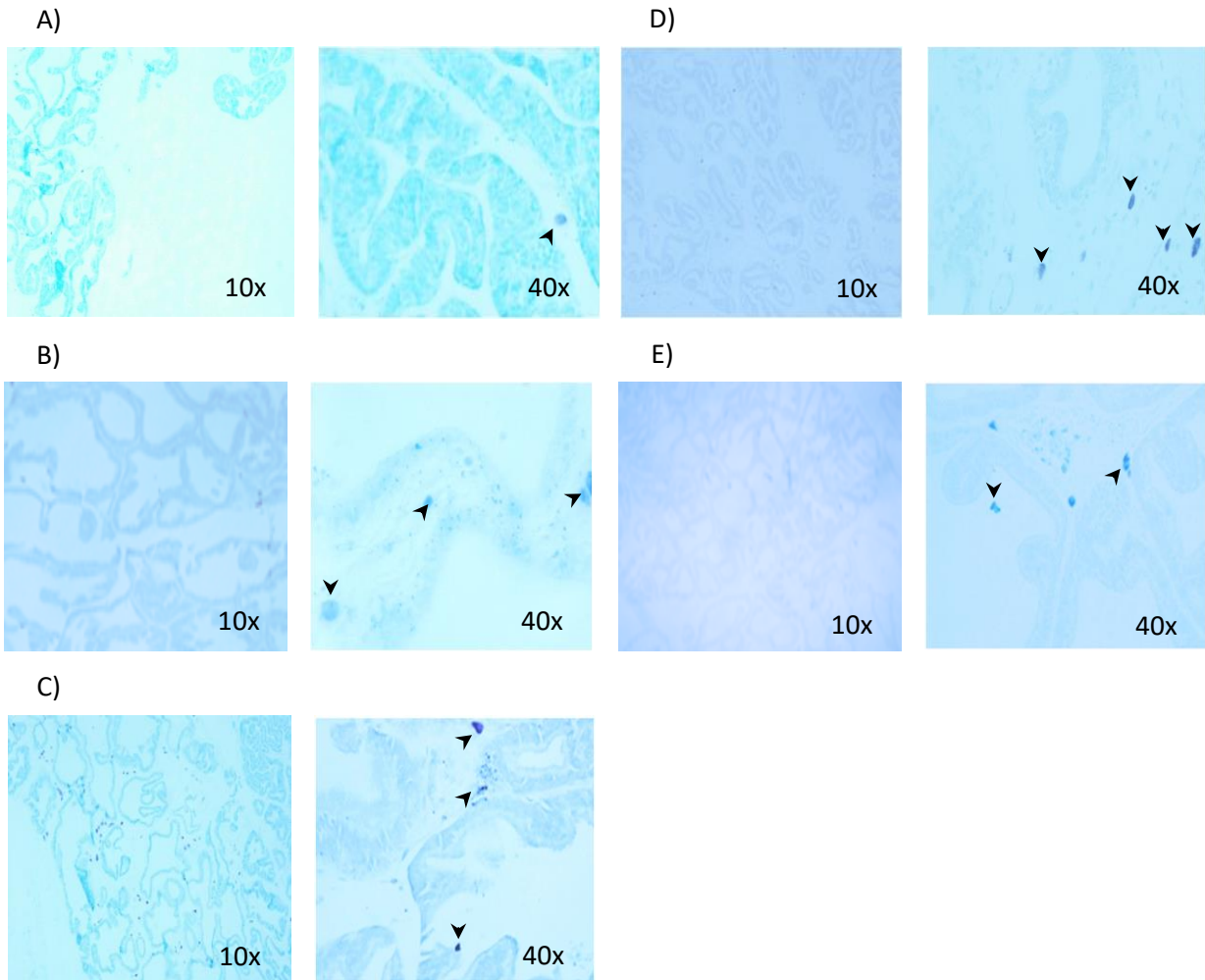


Figura 3. Tinción azul de toluidina de los diversos esquemas de administración. A. Tejido de próstata de rata normal, B. Tejido de próstata de rata administrada intraperitonealmente en las tres ocasiones, C. Tejido de próstata de rata administrada subcutáneamente en las tres ocasiones, D. Tejido de próstata de rata administrada con las vías de S e IP simultáneamente en las tres ocasiones, E. Tejido de próstata de rata administrada alternando las vías a lo largo del experimento en las tres ocasiones.

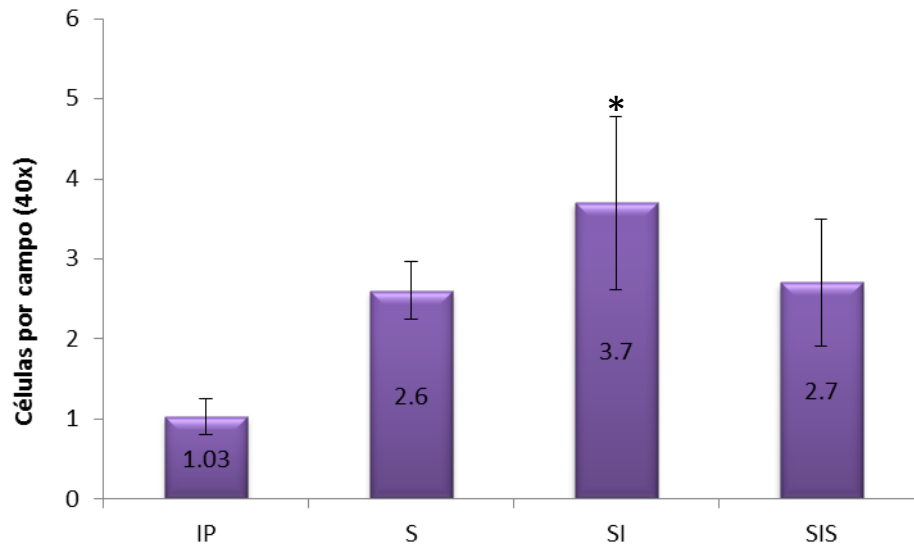


Figura 4. Número promedio de mastocitos por campo 40x entre los diversos esquemas de administración. * Diferencia significativa con respecto a los grupos restantes ($p \leq 0.05$).

A lo largo del experimento se presentó la muerte de animales en algunos esquemas de administración. En el grupo en el que el homogeneizado se administró intraperitonealmente en las tres inmunizaciones se obtuvo un 20% de mortalidad mientras que en el grupo en el que se administró mediante las vías de administración S e IP simultáneamente fue de 60%. En cambio en los grupos en los que se administró el agente inductor de prostatitis subcutáneamente y en el que se alternó las vías de administración no se registraron muertes de animales.

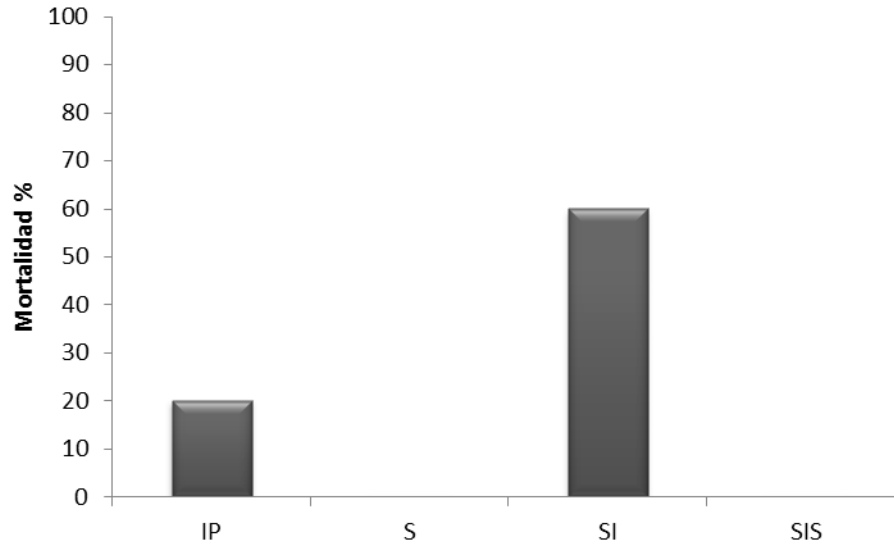


Figura 5. Gráfico del porcentaje de mortalidad en los grupos con los diversos esquemas de administración. En el grupo tratado mediante administración IP murió una rata mientras que en el grupo en el que se le administró mediante la combinación SI murieron 3 ratas. En cambio en los grupos S y SIS no se reportaron decesos.

Los resultados mostraron que los grupos en los cuales hubo un mayor número de células inflamatorias en general fueron en los que se combinaron las vías de administración en las tres ocasiones y en el que se alternaron dichas vías a lo largo del experimento. Con respecto a los mastocitos hubo una mayor cantidad en el grupo SI, sin embargo también presentó un 60% de mortalidad. Los grupos S y SIS mostraron una cantidad similar de mastocitos y 0% de mortalidad. No obstante, a diferencia del grupo S en el grupo SIS, histológicamente se registró además de zonas con atrofia intraepitelial prostática diversas regiones con HPB. Entonces debido a los notorios signos de inflamación, AIP, HPB y nulo índice de mortalidad decidimos ocupar para la siguiente fase experimental el modelo de

EAP en el que en los días 0 y 30 administramos el MRAG subcutáneamente y en el día 15 lo hicimos intraperitonealmente (SIS).

b) Evaluación histopatológica de los efectos del DLE en el modelo murino de EAP

Una vez elegido el esquema de administración mediante el cual se generaría el modelo de prostatitis se continuó con la evaluación de los efectos que el agente inmunotrapeúutico podría producir a nivel histopatológico. Para realizar esta evaluación se formaron cinco grupos de ratas, un grupo de ratas normales (n=5) y cuatro con la patología, a uno de ellos se le administró 0.15mg/kg/día de Dexametasona (Dex) (n=5), al segundo se le administró 0.3 unidades del agente inmunoterapéutico (AI) (n=5), al tercero se le administró una cantidad equivalente de placebo (Gly) (n=5) y al último grupo con la patología no se le aplicó algún tipo de tratamiento (n=5). Nuevamente se obtuvieron las próstatas de los cinco grupos y se realizaron los procedimientos que se describieron en material y métodos para poder ser analizadas. Una vez realizado esto a las muestras de los distintos grupos se les realizaron las tinciones de hematoxilina-eosina y azul de toluidina, se analizaron las laminillas a microscopia de luz obteniendo un promedio de células por campo y generándose los siguientes resultados.

En la tinción hematoxilina-eosina el tejido prostático de ratas normales se observó la constitución característica de dicho tejido, con glándulas con paredes alveolares de tamaño y forma regulares, con una clara membrana basal de un

epitelio columnar alto, con un espacio interluminal relativamente amplio y un volumen interglandular relativamente estrecho y muy poca o nula cantidad de células inflamatorias (Figura 6A). En el grupo que no recibió algún tipo de tratamiento y en el grupo tratado con placebo se encontraron zonas con glándulas con una membrana engrosada con más de una capa celular (hiperplasia), cubierta además en algunas regiones con epitelio hipertrófico y un espacio interluminal aumentado, lo que corresponde con AIP (Figura 6 B y C). El grupo tratado con Dexametasona presentó algunas zonas epiteliales ligeramente hipertróficas y glándulas con una membrana basal engrosada y edema en la matriz extracelular aunque se pudo observar una escasa cantidad de células inflamatorias (Figura 6D). Por otro lado en el grupo tratado con el DLE la morfología del tejido fue similar a lo observado en tejido de ratas normales, con glándulas de forma y tamaño normales y una membrana basal de un monocapa de células columnares con una escasa cantidad de células inflamatorias (Figura 6E).

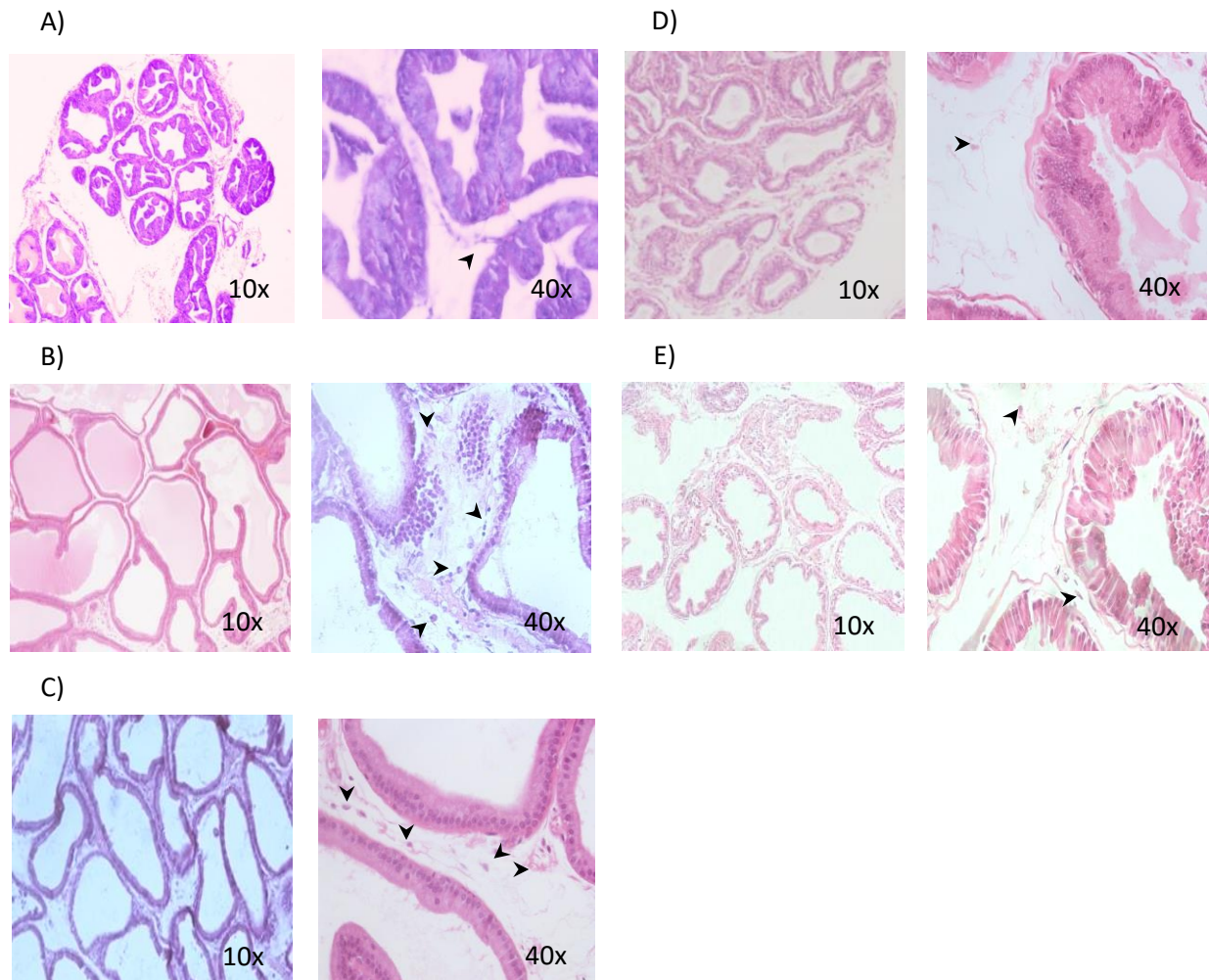


Figura 6. Características morfológicas de los tejidos con hematoxilina-eosina de los grupos en estudio. A. Tejido de próstata de rata normal, B. Tejido de próstata de rata con la patología a la que no se le administró algún tipo de tratamiento, C. Tejido de próstata de rata a la cual se le administró placebo, D. Tejido de próstata de rata a la cual se le administró Dexametasona, E. Tejido de próstata de rata a la que se le administró el DLE.

En el análisis semicuantitativo de las células por campo se obtuvo que en el grupo de ratas normales el promedio de células fue de 2.02, mientras que en el

grupo con la patología sin algún tipo de tratamiento se presentaron 3.03 células por campo. En cambio en el grupo placebo se encontraron 5.64 células por campo. Por su parte en los grupos tratados con Dexametasona (Dex) y con el DLE (AI) se encontraron 1.94 y 1.39 células por campo respectivamente (Figura 7). Se realizó una prueba estadística de ANOVA y un análisis post Hoc de Tukey observándose que el grupo normal mostró una menor cantidad estadísticamente significativa de células inflamatorias que los grupos placebo y sin tratamiento. De igual forma los grupos tratados con Dexametasona y el DLE presentaron una menor cantidad de células inflamatorias por campo de una forma estadísticamente significativa comparada con los grupos placebo y sin tratamiento. Los grupos normal, Dex y AI no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p= 0.05$).

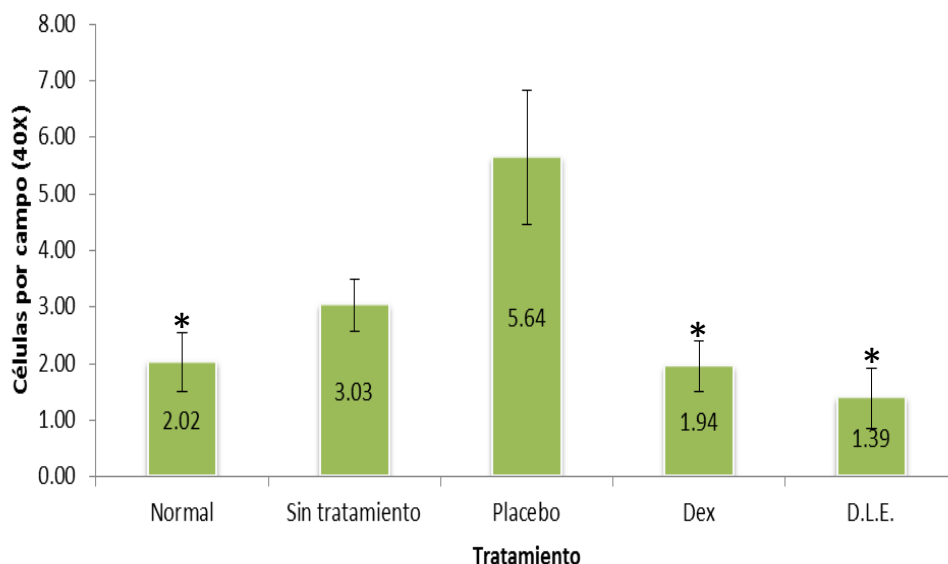


Figura 7. Promedio de células inflamatorias por campo entre los grupos con diferentes tratamientos. Las evaluaciones fueron realizadas a 40x. * Diferencia significativa con respecto a los grupos placebo y sin tratamiento ($p\leq 0.05$).

Con respecto a los mastocitos se observó que el grupo placebo y el grupo sin tratamiento (Figura 8) mostraron una mayor cantidad de dichas células, 4.49 y 3.47 respectivamente, en comparación con lo observado en tejido prostático de ratas normales (1.64 células por campo), ($p \leq 0.05$) (Figura 9). En lo concerniente a los grupos con la patología tratados con Dex y el AI, se presentó 1.88 y 1.93 células por campo, observándose que la diferencia no es estadísticamente significativa a lo observado en ratas normales (Figura 9). Esto indica que el DLE disminuye el infiltrado de mastocitos en este modelo a prostatitis autoinmune experimental.

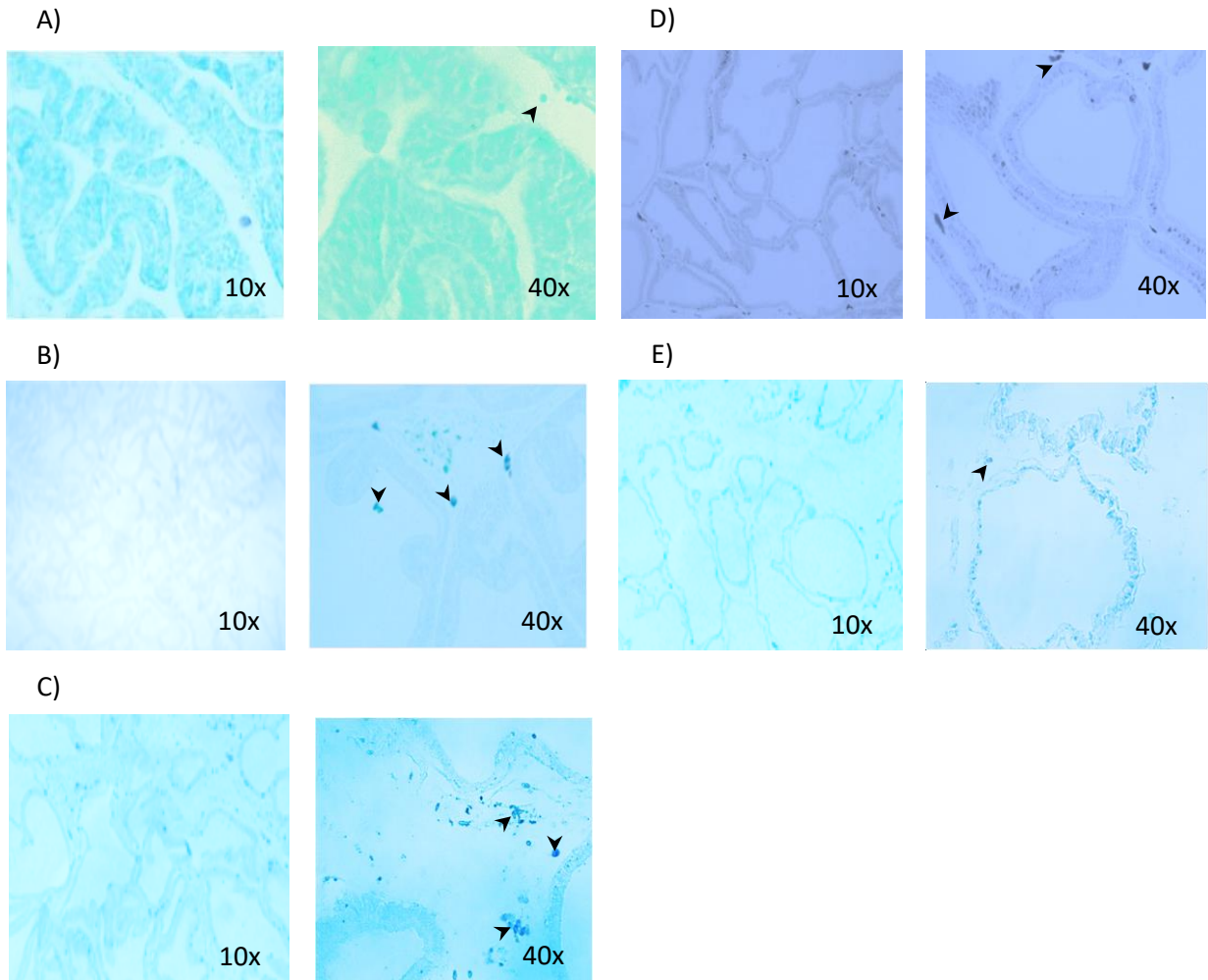


Figura 8. Detección de mastocitos en Azul de toluidina en los grupos con los diferentes tratamientos. A. Tejido prostático de rata normal, B. Tejido prostático de rata con la patología a la que no se le administró algún tipo de tratamiento, C. Tejido prostático de rata a la cual se le administró placebo, D. Tejido prostático de rata a la cual se le administró Dexametasona. E. Tejido prostático de rata a la que se le administró el D.L.E.

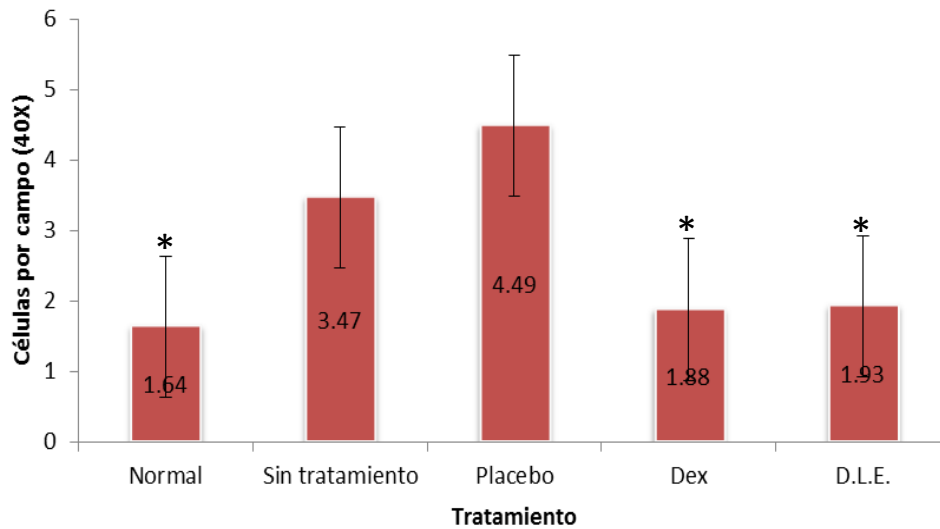


Figura 9. Gráfico del promedio de mastocitos por campo 40x entre los grupos con diferentes tratamientos. * Diferencia significativa con respecto a los grupos placebo y sin tratamiento ($p \leq 0.05$).

c) Cuantificación por medio ELISA de prostateína sérica

La prostateína es una proteína considerada como uno de los principales antígenos inductores de prostatitis en el modelo de prostatitis autoinmune experimental originalmente planteado por Galmarini y col. 1988. En nuestro caso realizamos una modificación al modelo original y evaluamos los cambios en las concentraciones séricas de prostateína que se pudieran presentar en las diferentes condiciones experimentales.

Nuestros resultados mostraron que el grupo de ratas normales presentó una concentración basal de prostateína sérica, que fue de 0.22 ng/mL, la cual fue menor a la de los grupos sin tratamiento, placebo y Dex, los cuales presentaron

3.08, 2.4 y 0.04 ng/mL, respectivamente (Figura 10). El grupo tratado con DLE por su parte registró una concentración sérica menor a lo detectable por el kit, lo que marco una diferencia estadísticamente significativa con respecto a lo observado en los grupos restantes, incluso a la concentración presente en el grupo normal (Figura 10).

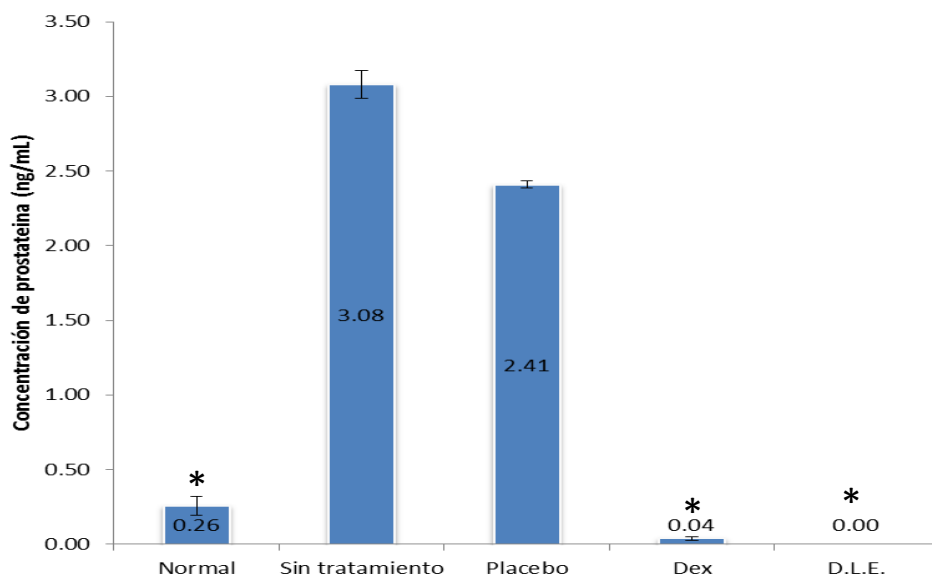


Figura 10. Concentración sérica de prostateina cuantificada por ELISA en los grupos de ratas sometidas a diferentes tratamientos. * Diferencia significativa con respecto a los grupos placebo y sin tratamiento ($p \leq 0.05$)

d) Efectos del DLE a nivel inmunohistoquímico

i. Moléculas proinflamatorias

Se evaluó inmunohistoquímicamente un marcador de proliferación celular que fue el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA, por sus siglas en inglés), así también como moléculas proinflamatorias como IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-17 y una molécula antiinflamatoria, IL-4. Se observó que TNF- α , en el tejido prostático de animales normales presento una expresión escasa en la capa basal glandular (Figura 10A). Por otro lado en el grupo que no se le administró algún fármaco pero que desarrolló la patología y en grupo el placebo se mostró una intensa inmunotinción tanto en la capa luminal como en la basal de las glándulas prostáticas (Figura 11B y C). En contraparte en el grupo al cual se le administró Dexametasona como en el grupo en que fue tratado con DLE se observó una expresión escasa de TNF- α tanto en la capa basal como en la capa luminal de las glándulas prostáticas (Figura 11D y E).

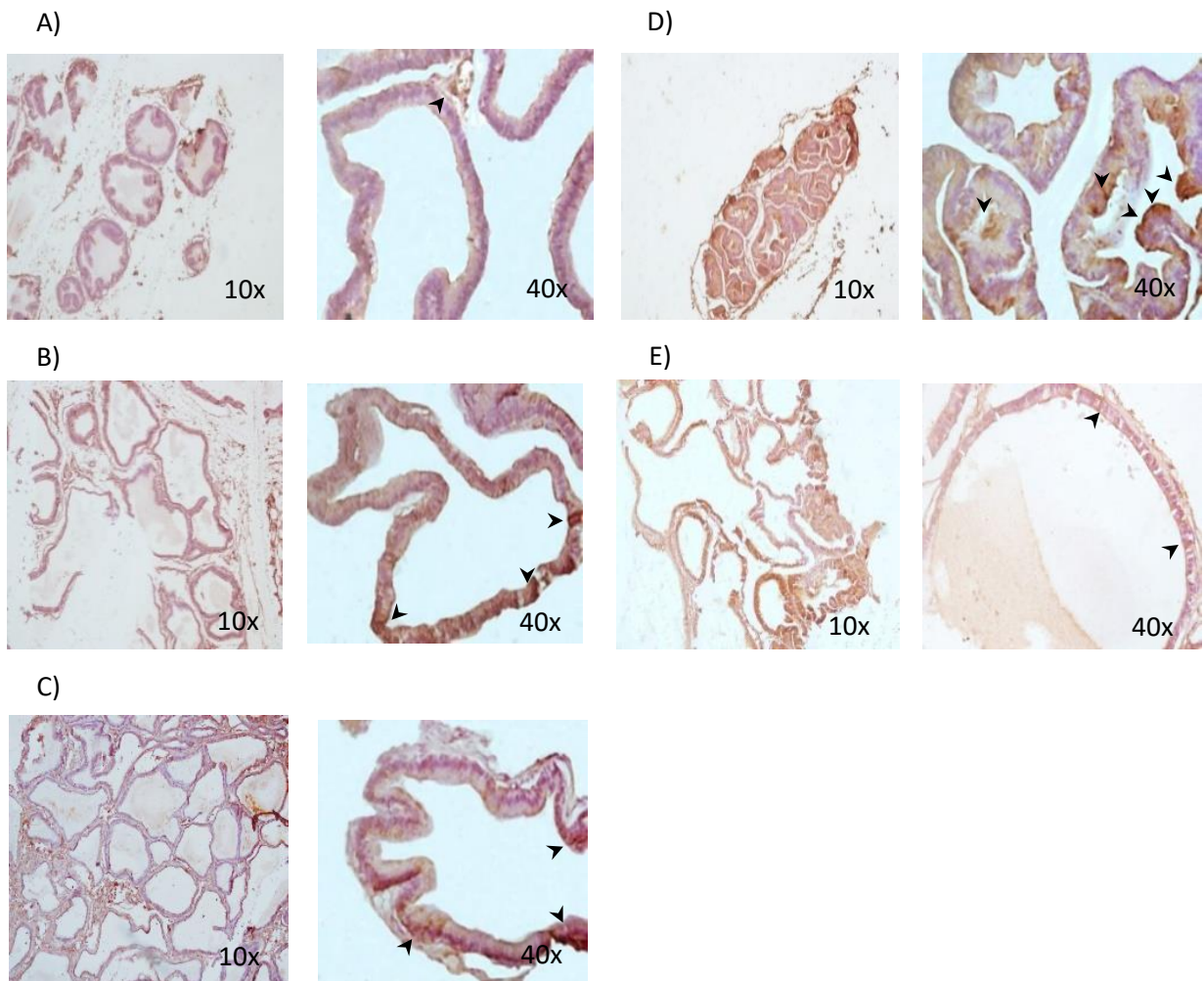


Figura 11. Detección inmunohistoquímica de TNF- α en los grupos con los diferentes tratamientos. A. Tejido prostático de rata normal, B. Tejido prostático de rata con la patología a la que no se le administró algún tipo de tratamiento, C. Tejido prostático de rata a la cual se le administró placebo, D. Tejido prostático de rata a la cual se le administró Dexametasona, E. Tejido prostático de rata a la que se le administró el agente inmunoterapéutico.

La semicuantificación de las inmunohistoquímicas para TNF- α mostraron que en tejido prostático de ratas normales el porcentaje de expresión fue de 3.9% mientras que el grupo con la patología sin algún tipo de tratamiento y el grupo placebo mostraron un aumento significativo con respecto al primer grupo registrándose una expresión de 7.1 y 6.9%, respectivamente (Figura 12). El grupo tratado con Dexametasona mostró una expresión relativa de 5.8% la cual fue estadísticamente mayor al porcentaje del grupo de ratas normales (Figura 12). En lo que respecta al grupo tratado con DLE se observó una expresión de 1.5% que es menor a lo registrado en los 4 grupos restantes (Figura 11).

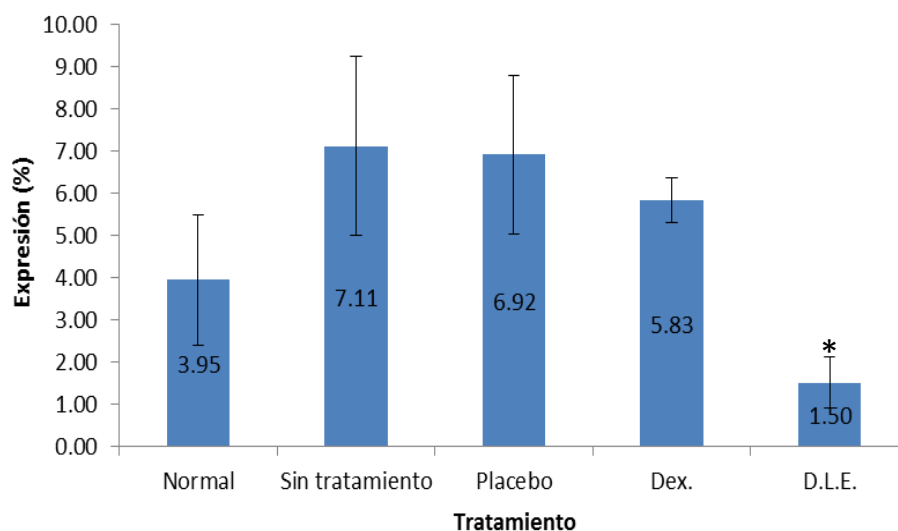


Figura 12. Gráfico del promedio del porcentaje de expresión inmunohistoquímica de TNF- α de los tejidos prostáticos de los cinco animales de los diversos grupos experimentales ($p \leq 0.05$).

La inmunotinción para IFN- γ mostró en el grupo de ratas normales una escasa expresión en la capa basal de las glándulas prostáticas (Figura 13A). En cambio en el grupo con la patología sin tratamiento y en el grupo tratado con placebo se mostró una notable expresión tanto en la capa celular basal como en la luminal de las glándulas prostáticas (Figura 13B y C). En los grupos tratados con Dexametasona y el DLE la expresión de IFN se observó en forma escasa tanto en la capa celular basal como en la luminal del epitelio glandular (Figura 13D y E).

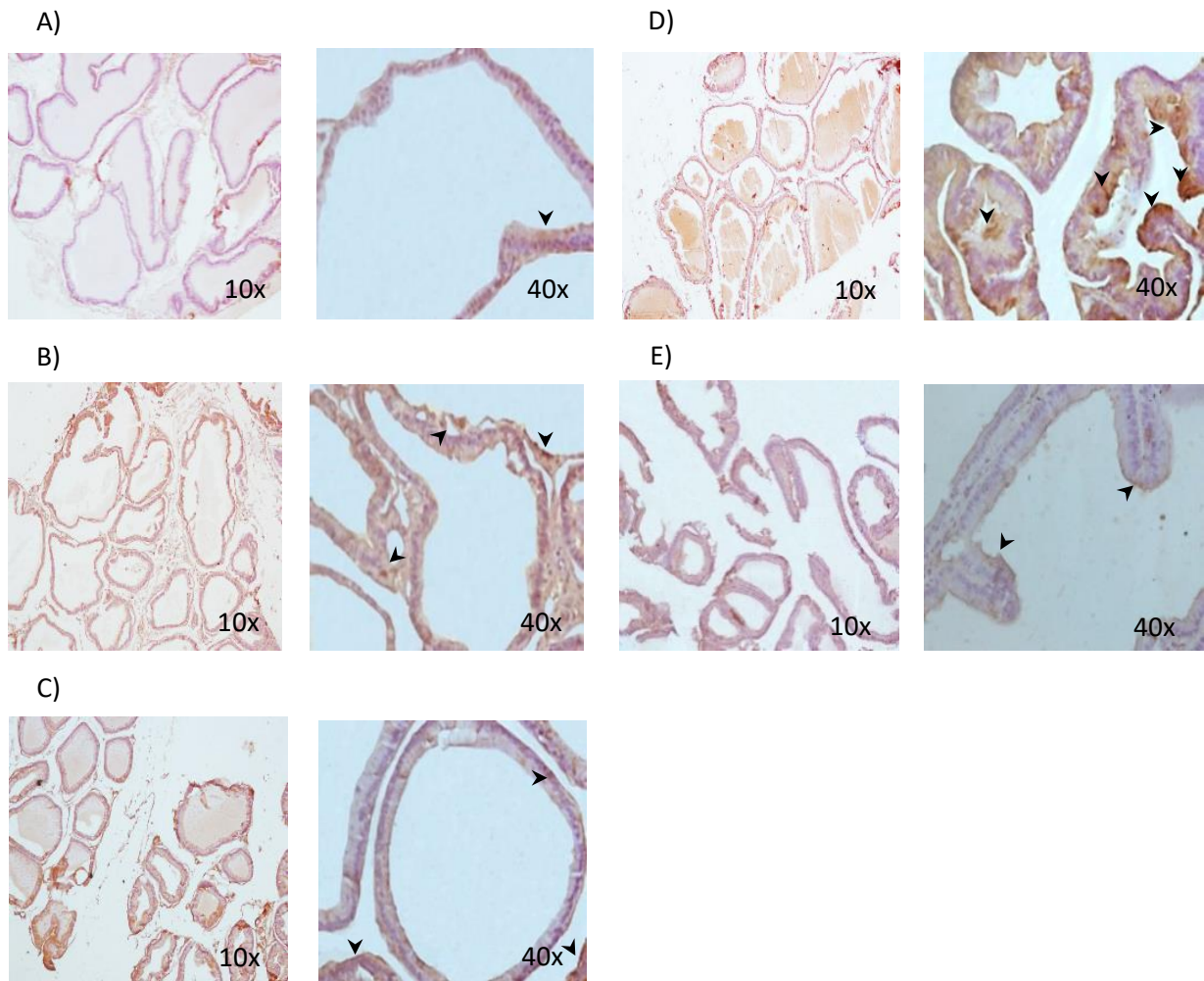


Figura 13. Detección inmunohistoquímica de IFN- γ en los grupos con los diferentes tratamientos. A. Tejido prostático de rata normal, B. Tejido prostático de rata con la patología a la que no se le administró algún tipo de tratamiento, C. Tejido prostático de rata a la cual se le administró placebo, D. Tejido prostático de rata a la cual se le administró Dexametasona, E. Tejido prostático de rata a la que se le administró el agente inmunoterapéutico.

El porcentaje de expresión de IFN- γ en ratas normales fue de 1.4% lo que es menor significativamente con respecto al 3.5% observado en tejido prostático de ratas con la patología sin algún tipo de tratamiento (Figura 14). Interesantemente el grupo tratado con placebo mostró una disminución significativa en la expresión de IFN- γ (1.1%) en relación a lo observado en el grupo con la patología y no es significativamente diferente en comparación a lo mostrado en el grupo de ratas normales (Figura 14). El grupo tratado con Dexametasona y el grupo tratado con el DLE mostraron un porcentaje de expresión de 2.1%, lo que se considera una disminución significativa con respecto a lo presentado en el grupo de ratas sin tratamiento y no es distinto significativamente con respecto a lo observado en el grupo de ratas normales (Figura 14).

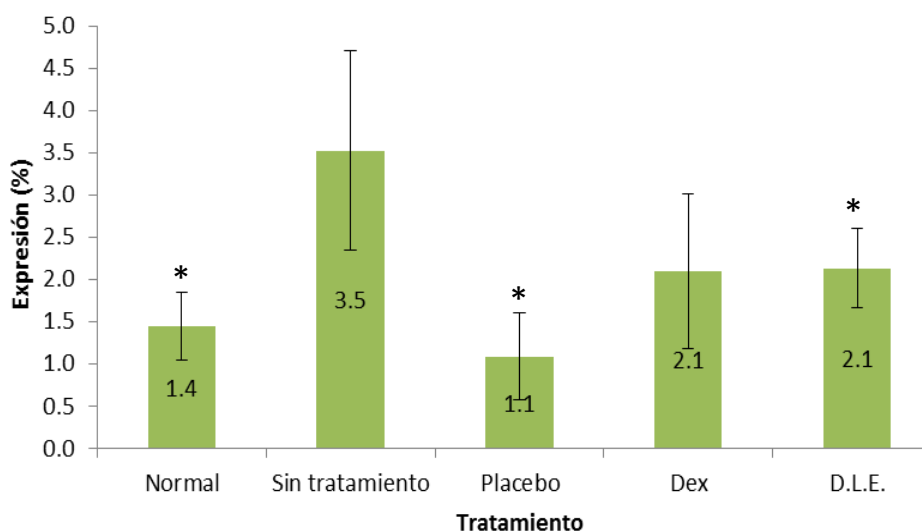


Figura 14. Gráfico del promedio del porcentaje de expresión inmunohistoquímica de IFN- γ de los tejidos prostáticos de los cinco animales de los diversos grupos experimentales ($p \leq 0.05$).

En las microfotografías para la inmunohistoquímica de IL-17 se mostró en tejido prostático de ratas normales una señal perceptible principalmente en las células de la capa basal (Figura 15 A). Por otro lado en grupo que no recibió tratamiento, el grupo placebo y el grupo tratado con Dexametasona se observó una inmunotinción positiva intensa tanto en la capa de células basales como en la capa de células lumbinales del tejido glandular (Figura 15B, C y D). Por otro lado, en el grupo con la patología que fue tratado con el DLE la inmunoseñal fue menor que en los grupos anteriormente mencionados aunque también se observó en la capa luminal y basal de las glándulas (Figura 15E).

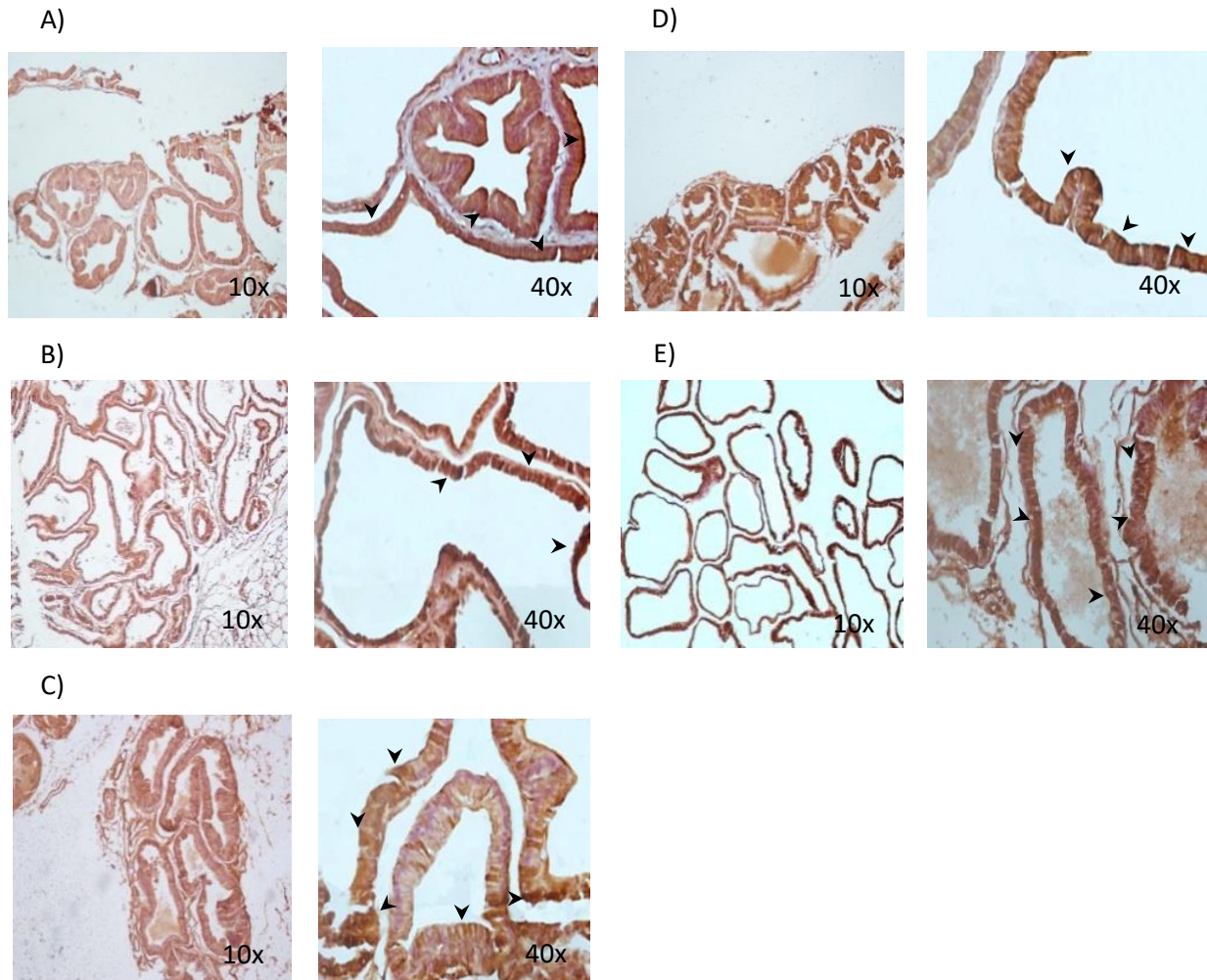


Figura 15. Detección inmunohistoquímica de IL-17 en los grupos con los diferentes tratamientos. A. Tejido prostático de rata normal, B. Tejido prostático de rata con la patología a la que no se le administró algún tipo de tratamiento, C. Tejido prostático de rata a la cual se le administró placebo, D. Tejido prostático de rata a la cual se le administró Dexametasona, E. Tejido prostático de rata a la que se le administró el DLE.

Con respecto a la IL-17, la semicuantificación mostró que en el grupo de ratas normales el porcentaje de expresión fue de 10.6%, lo cual no fue diferente estadísticamente con lo observado en los cuatro grupos restantes (Figura 16). El grupo con la patología pero sin tratamiento, el grupo placebo y el grupo tratado con Dexametasona expresaron de señal inmunohistoquímica 11.49, 10.45 y 12.03% respectivamente, no mostrando diferencias significativas entre ellas. El grupo tratado con el DLE presentó un 7.52% de expresión, lo cual muestra una disminución en la señal de esta interleucina, sin embargo la diferencia no es significativa con respecto a los grupos restantes (Figura 16).

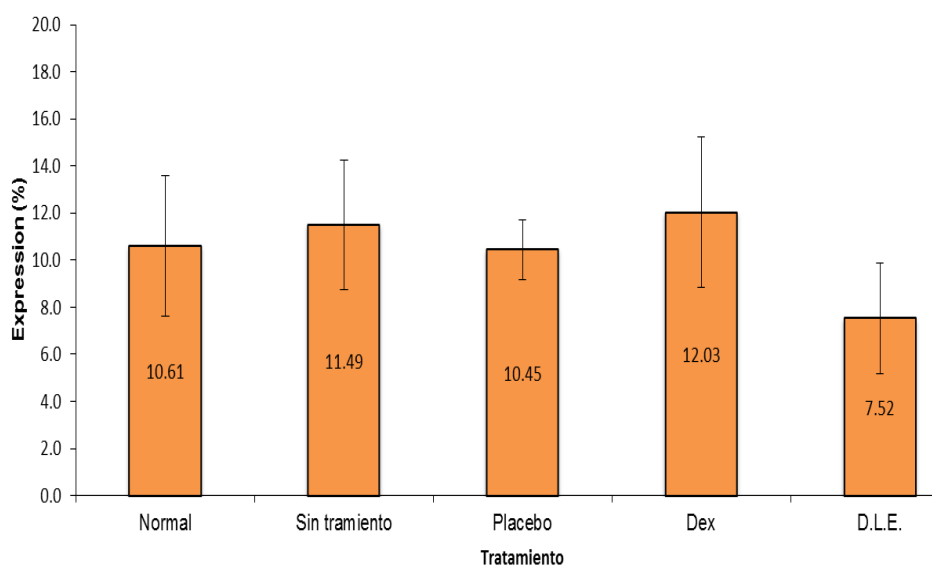


Figura 16. Gráfico del promedio del porcentaje de expresión inmunohistoquímica de IL-17 de los tejidos prostáticos de los cinco animales de los diversos grupos experimentales ($p \leq 0.05$).

La señal inmunohistoquímica de CD-45 en el grupo de ratas normales se presentó en las células glandulares de la capa basal (Figura 17A). En los grupos con la enfermedad tratados con no recibió algún tipo de tratamiento, placebo y Dexametasona se mostró una inmunotinción fuertemente positiva tanto en las células de la capa basal como de la capa luminal de las glándulas del tejido prostático (Figura 17B, C y D). De igual modo en el grupo tratado con el DLE se observó una inmunotinción positiva en la capa basal y luminal de las glándulas prostáticas solo que dicha señal fue escasa (Figura 17E).

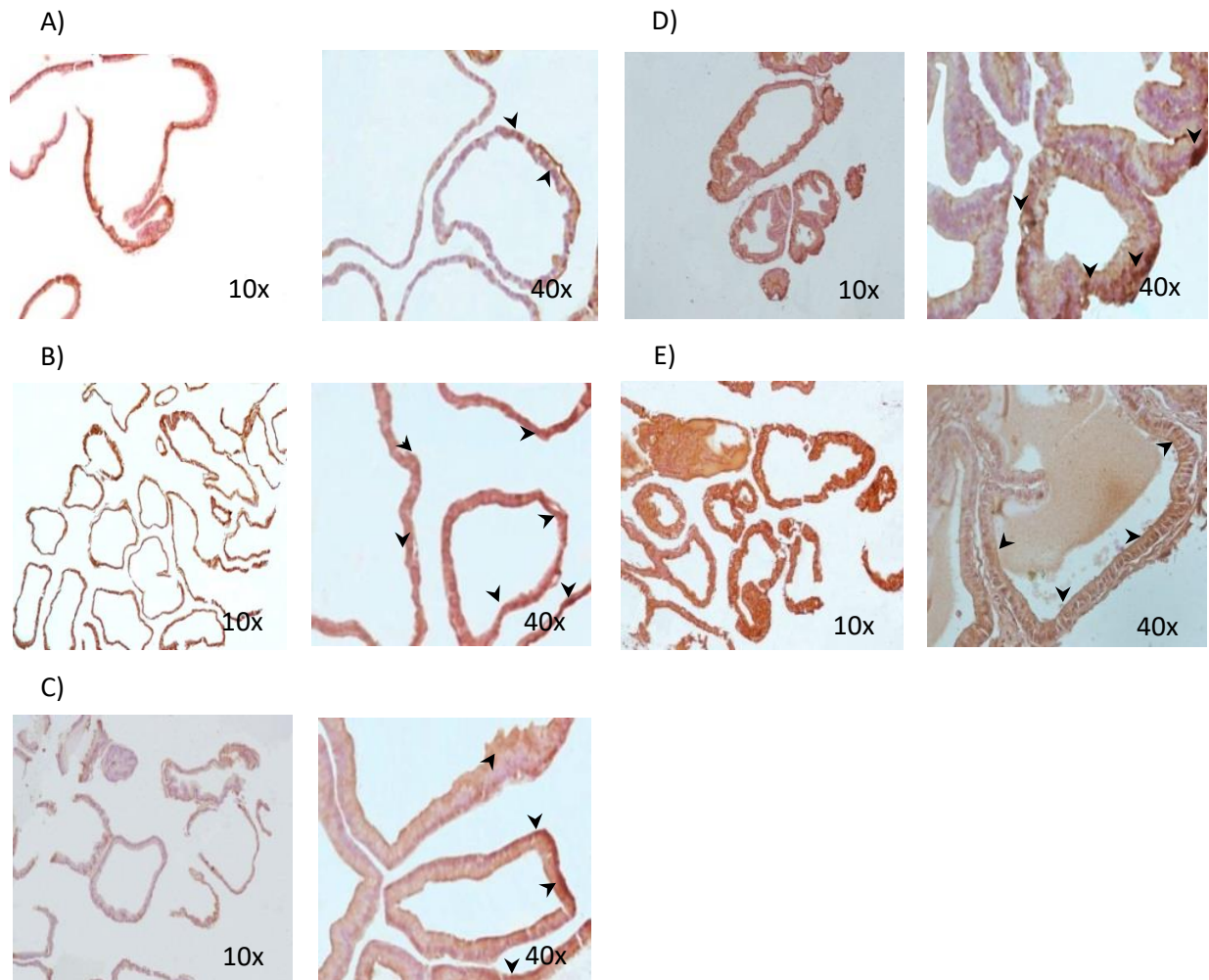


Figura 17. Detección inmunohistoquímica de CD-45 en los grupos con los diferentes tratamientos. A. Tejido prostático de rata normal, B. Tejido prostático de rata con la patología a la que no se le administró algún tipo de tratamiento, C. Tejido prostático de rata a la cual se le administró placebo, D. Tejido prostático de rata a la cual se le administró Dexametasona, E. Tejido prostático de rata a la que se le administró el DLE.

En lo que corresponde con la semicuantificación de CD-45 se obtuvo que el tejido prostático de ratas normales el porcentaje de expresión fue de 2.35% lo cual

es menor de forma significativa a lo observado en tejido de ratas con la patología sin algún tipo de tratamiento y al grupo placebo, 7.25 y 12.36% respectivamente (Figura 18). El grupo con la patología tratado con Dexametasona, presentó un porcentaje de expresión de 5.95%, no observándose una diferencia significativa con respecto al grupo con prostatitis sin algún tipo de tratamiento (Figura 18). Mientras que el grupo tratado con DLE registró un 0.87% de expresión, lo cual marca una disminución significativa con respecto a los cuatro grupos restantes.

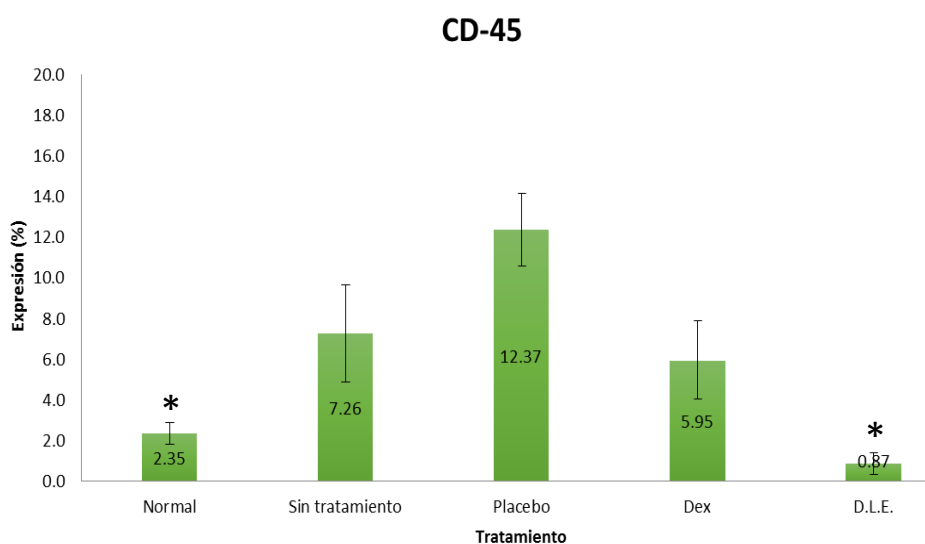


Figura 18. Gráfico del promedio del porcentaje de expresión inmunohistoquímica de CD-45 de los tejidos prostáticos de los cinco animales de los diversos grupos experimentales ($p \leq 0.05$).

La IL-6 mostró una expresión escasa en la capa basal del tejido glandular prostático de ratas normales (Figura 19A). En los grupos con patología sin tratamiento y en el grupo placebo la tinción se notó intensa tanto en la capa luminal como en la basal de las células glandulares (Figura 19B y C). En lo que corresponde a los grupos con la patología tratados con Dexametasona y el DLE se

observó una inmunotinción positiva escasa tanto en la capa basal como luminal de las glándulas prostáticas (Figura 19D y E).

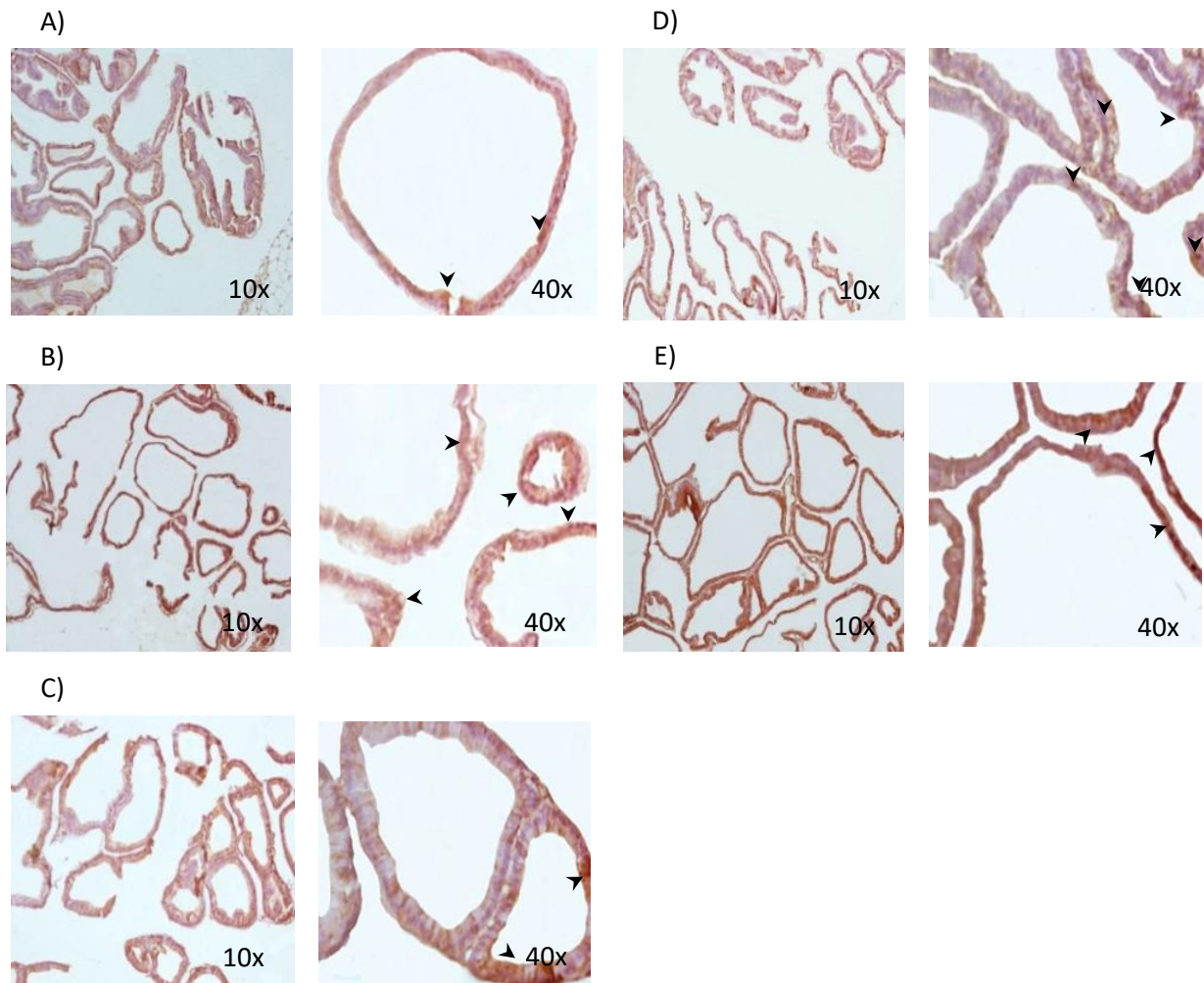


Figura 19. Detección inmunohistoquímica de IL-6 en los grupos con los diferentes tratamientos. A. Tejido prostático de rata normal, B. Tejido prostático de rata con la patología a la que no se le administró algún tipo de tratamiento, C. Tejido prostático de rata a la cual se le administró placebo, D. Tejido prostático de rata a la cual se le administró Dexametasona, E. Tejido prostático de rata a la que se le administró el DLE.

El porcentaje de expresión para IL-6 en ratas normales fue de 2.42%, lo cual fue menor significativamente con lo observado en el grupo con prostatitis sin

algún tipo de tratamiento, que fue de 6.72%. Por su parte el grupo de ratas tratadas con placebo mostraron un aumento en la expresión de IL-6 (8.83%) (Figura 20). Por otro lado los grupos con la patología tratados con Dexametasona y el DLE, presentaron 2.97 y 3.23% de expresión respectivamente y mostraron una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de ratas sin tratamiento, pero no así con el grupo de ratas normales (Figura 20).

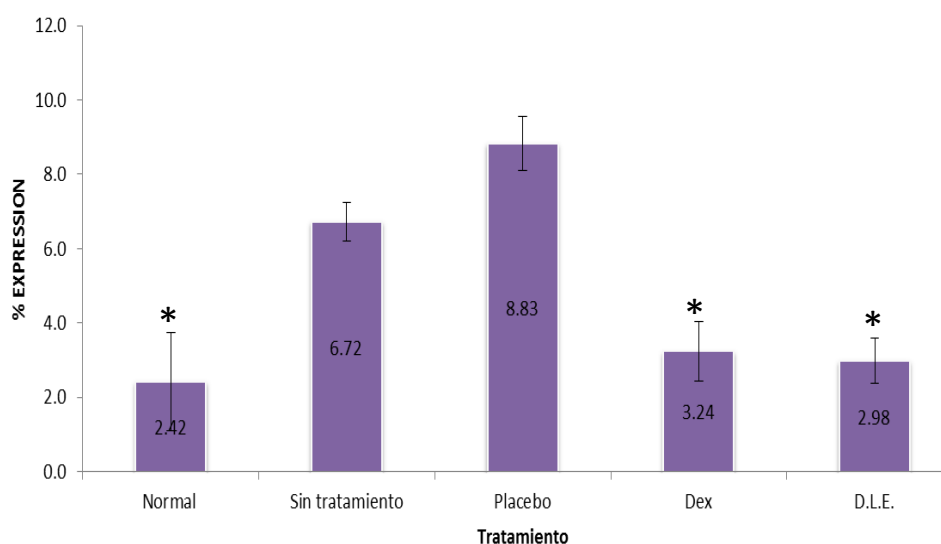


Figura 20. Gráfico del promedio del porcentaje de expresión inmunohistoquímica de IL-6 de los tejidos prostáticos de los cinco animales de los diversos grupos experimentales ($p \leq 0.05$).

ii. Molécula anti-inflamatoria

En lo que corresponde a IL-4 en tejido prostático de ratas normales se observó una señal positiva en la capa de células basales (Figura 21A). En lo que corresponde al grupo sin tratamiento y al grupo placebo la señal para IL-4 se observó de forma escasa en la capa celular basal y en la luminal de las glándulas

prostáticas (Figura 21B y C). En el grupo tratado con Dexametasona se detectó una tinción positiva tanto en la parte basal como en la parte luminal del tejido glandula (Figura 21D). Con respecto al grupo tratado con el DLE la señal inmunohistoquímica se observó principalmente en la capa de células basales (Figura 21E).

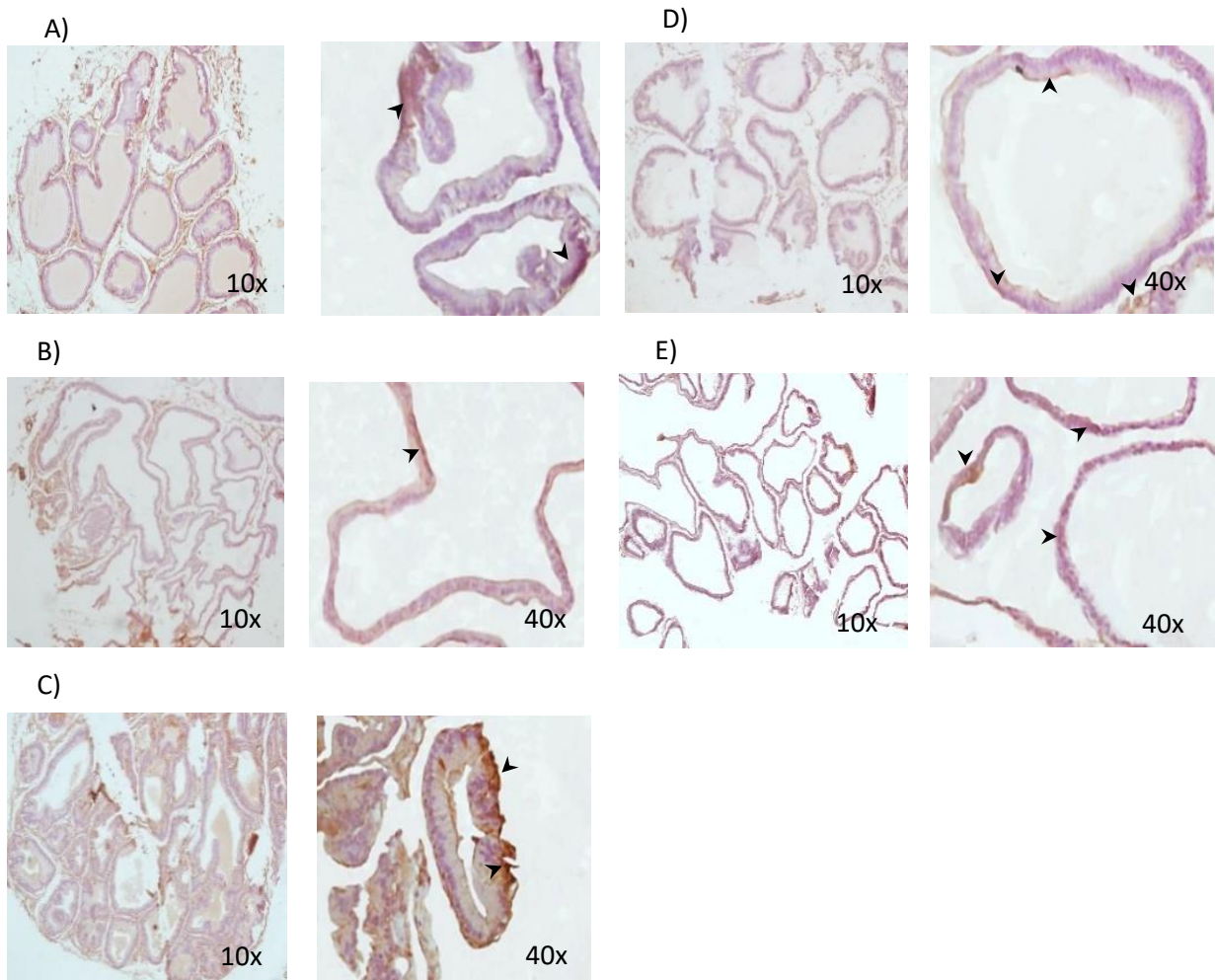


Figura 21. Detección inmunohistoquímica de IL-4 en los grupos con los diferentes tratamientos. A. Tejido de rata normal 10 y 40x, B. A. Tejido prostático de rata normal, B. Tejido prostático de rata con la patología a la que no se le administró algún tipo de tratamiento, C. Tejido prostático de rata a la cual se le administró placebo, D. Tejido prostático de rata a la cual se le administró Dexametasona, E. Tejido prostático de rata a la que se le administró el DLE.

Al realizar la semicuantificación correspondiente a la expresión de IL-4 se encontró que en tejido prostático de ratas normales el porcentaje de expresión fue

de 0.8% lo que fue similar estadísticamente al 0.7% observado en ratas con la patología sin algún tipo de tratamiento (Figura 22). El grupo placebo registró una expresión de 0.4% lo que es menor, aunque no de forma significativa, con lo observado en el grupo de ratas sin algún tipo de tratamiento (Figura 22). Los grupos con prostatitis tratados con Dexametasona y el DLE mostraron una expresión de 2.1 y 1.8% respectivamente, lo cual fue significativamente mayor con lo observado en el grupo sin tratamiento e incluso a lo registrado en el grupo de ratas normales (Figura 22).

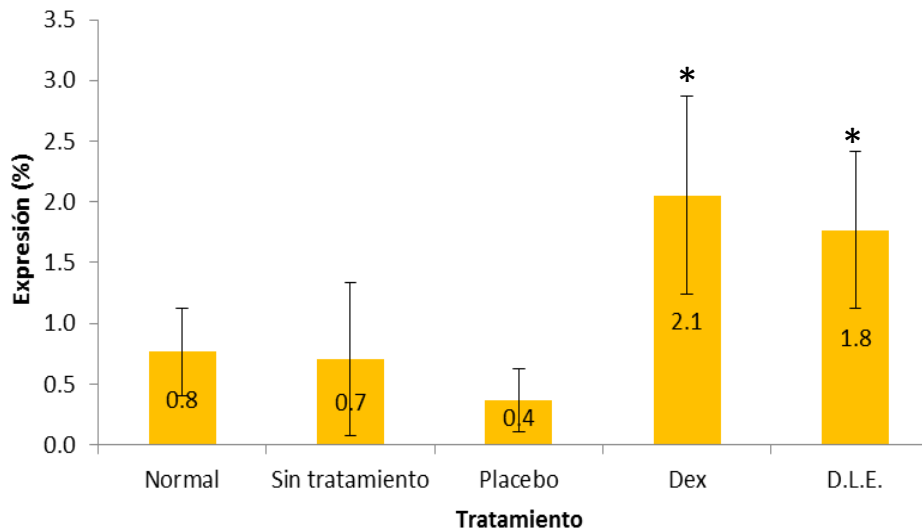


Figura 22. Gráfico del promedio del porcentaje de expresión inmunohistoquímica de IL-4 de los tejidos prostáticos de los cinco animales de los diversos grupos experimentales ($p \leq 0.05$).

iii. Marcador de proliferación celular

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA por sus siglas en inglés) mostró una inmunotinción positiva en la capa basal del tejido prostático en el grupo de ratas normales (Figura 23A). En el grupo con la patología sin tratamiento y en el cual se administró placebo se registró una visible señal tanto en células luminales como basales de las glándulas prostáticas (Figura 23B y C). En los grupos con la patología tratados con Dexametasona y el DLE se observó que la señal para PCNA se presentó tanto en células basales como en luminales del tejido prostático (Figura 23D y E).

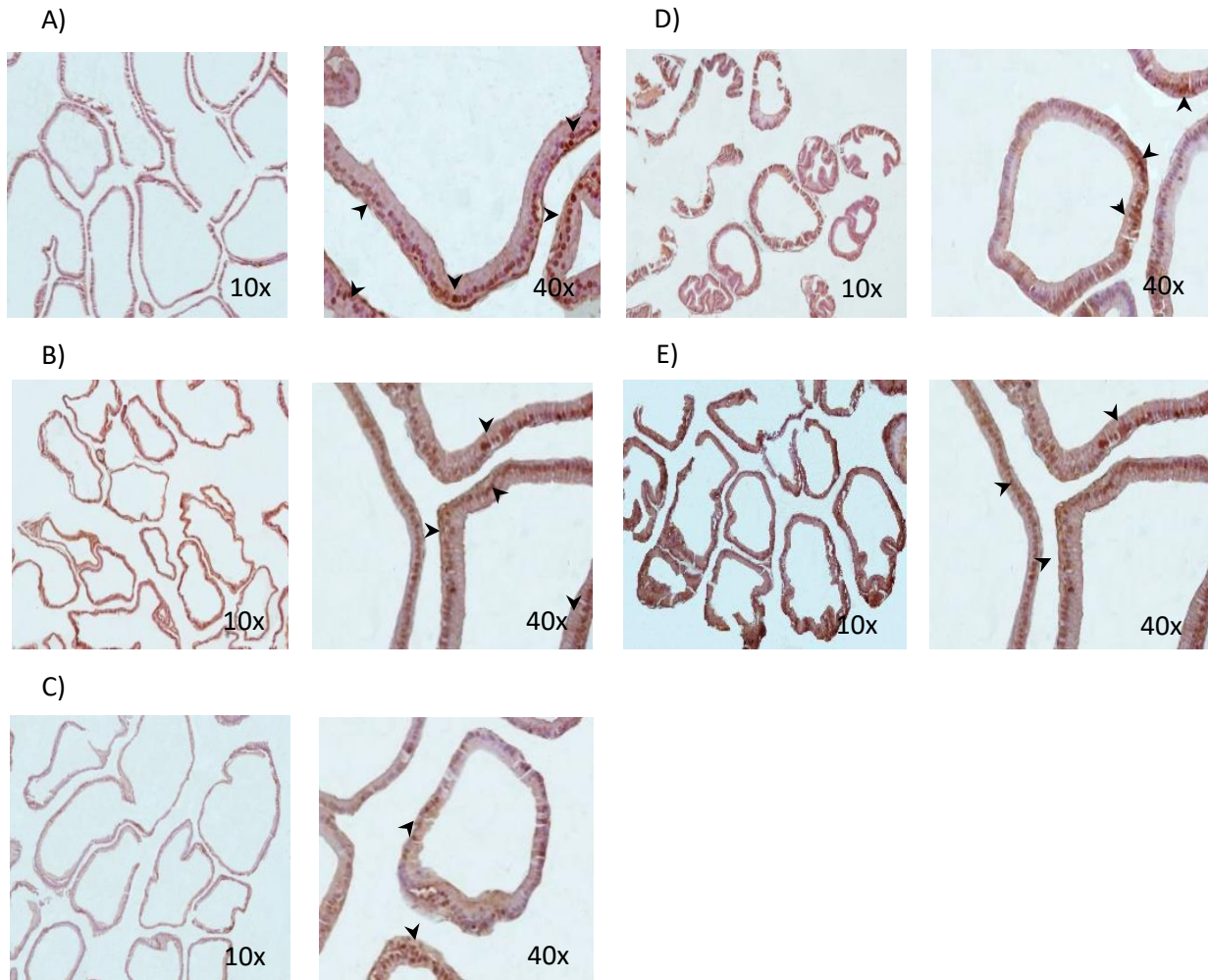


Figura 23. Detección inmunohistoquímica de PCNA en los grupos con los diferentes tratamientos. A. Tejido de rata normal 10 y 40x, B. A. Tejido prostático de rata normal, B. Tejido prostático de rata con la patología a la que no se le administró algún tipo de tratamiento, C. Tejido prostático de rata a la cual se le administró placebo, D. Tejido prostático de rata a la cual se le administró Dexametasona, E. Tejido prostático de rata a la que se le administró el DLE.

La semicuantificación de las microfotografías de PCNA mostraron que el porcentaje de expresión de esta molécula en tejido de ratas normales fue de 2.73% lo cual fue menor de forma significativa con lo observado en tejido prostático de ratas con prostatitis sin tratamiento y al del grupo placebo, 5.03 y 5.9% respectivamente (Figura 24). El grupo tratado con Dexametasona registró un 3.51% de expresión siendo menor significativamente a lo presente en el grupo sin tratamiento y el placebo (Figura 24). Por su parte el grupo que recibió el DLE presento una expresión de esta molécula de 1.7% la cual fue menor significativamente con respecto a lo observado en los cuatro grupo restantes (Figura 24).

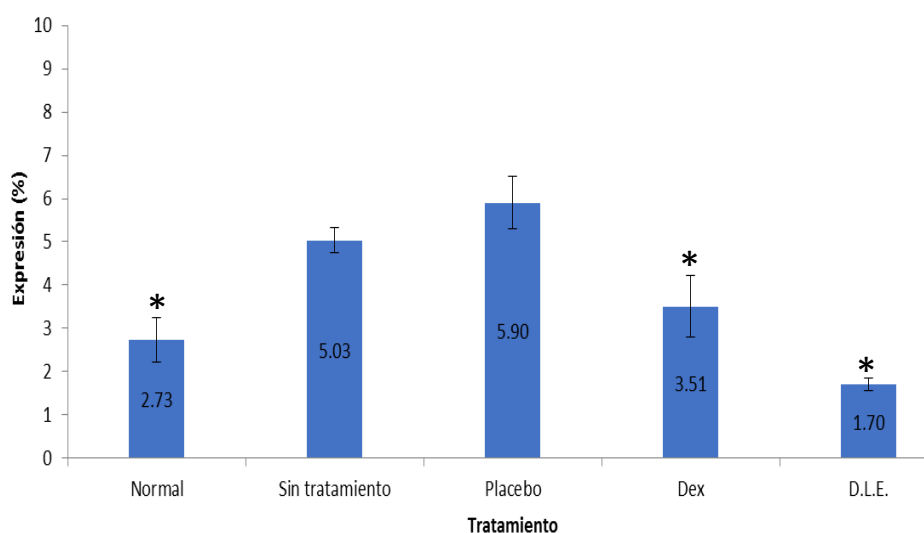


Figura 24. Gráfico del promedio del porcentaje de expresión inmunohistoquímica de PCNA de los tejidos prostáticos de los cinco animales de los diversos grupos experimentales ($p \leq 0.05$).

VIII. Discusión

a) Cambios histológicos

Hasta ahora no se conoce a ciencia cierta la causa de CP/CPPS por lo cual desde ya hace décadas se ha puesto particular atención en la creación de modelos animales cercanos a los signos presentes en la inflamación de la próstata humana. Pacheco y col en 1984 estandarizaron un modelo de prostatitis donde se inmuniza intradérmicamente ratas con un homogeneizado de próstata, vesícula seminal y glándula coagulante (MAG por sus siglas en inglés, glándulas accesorias de machos) (Pacheco y col, 1984). En ese estudio se reportó una respuesta inflamatoria en próstata después de tres inmunizaciones en el 45% de los animales, caracterizada principalmente por presencia de linfocitos T (Pacheco y col, 1984). Por su parte Galmarini y col, 1988 usó ratas Wistar de 3 meses de edad inmunizadas con MAG modificado con sales de diazonio (MRAG) y adyuvante completo de Freund administrado subcutáneamente en dos o tres ocasiones. En dicho modelo se observó una respuesta inflamatoria más evidente que cuando solo se usa el homogeneizado MAG. En este modelo a nivel histológico se observó una reacción inflamatoria caracterizada por pequeños infiltrados mononucleares perivasculares y en los casos más severos dicho infiltrado constaba de células polimorfonucleares (Galmarini y col, 1988). Se considera que este modelo es consistente con una inflamación moderada auto-limitante causada mediante mecanismos humorales y celulares.

En el presente estudio se generó un modelo de EAP en rata, teniendo en cuenta los modelos previamente desarrollados particularmente el de Galmarini y col de 1988. Para esto decidimos modificar el esquema de inmunización alternando dos vías de administración del homogeneizado, las vía subcutánea y la intraperitoneal. La vía subcutánea por su parte se observó genera un proceso inflamatorio moderado en próstata. Por otro lado mediante la administración del homogeneizado por vía intraperitoneal se obtuvo una mayor respuesta inflamatoria, producto de la irritación generada a nivel peritoneal. Con respecto a esto se tienen estudios como el de Correa y col, en 1997 donde se observó que la administración intraperitoneal de RAG teniendo como vehículo liposomas generó una respuesta inmune primaria y secundaria así como lesiones órgano-específicas en próstata (Correa y col, 1997). En esa investigación se mostró que las células dendríticas peritoneales están implicadas en la prostatitis autoinmune ya que son positivas para CD-14 y también para algunas moléculas de adhesión como ICAM-1 y Mac-1. De esta forma se plantea que mediante la alternancia de las dos vías de administración, subcutánea e intraperitoneal, se desarrollara un proceso inflamatorio considerable en próstata, sin poner en riesgo la vida de los animales.

Cómo ya se mostró en la sección de metodología en este modelo de EAP la vía subcutánea se utilizó en los días 0 y 30, mientras que la inmunización intraperitoneal se ocupó el día 15. Lo que se observó a nivel histopatológico fue un notorio infiltrado de células inflamatorias, principalmente linfocitos y mastocitos como es reportado en la literatura (Rivero y col, 1995). Además congruente con un proceso inflamatorio prostático se observaron áreas con glándulas con paredes aplanadas, un volumen interluminal escaso y un volumen interglandular amplio, lo

que es característico de la Atrofia Inflamatoria Prostática (PIA, por sus siglas en ingles) (Motrich y col, 2007). Aunado a esto y de forma interesante se observaron áreas con células glandulares con un aumento en su tamaño, lo que se presenta en la Hiperplasia Prostática Benigna, hecho que no había sido reportado en el modelo de Galmarini y col 1988.

El infiltrado de células inflamatorias observado en este tipo de modelos de EAP, que alcanzan su máximo al día 28 de iniciado el modelo, consiste principalmente en mastocitos así como células T CD4+ y CD8+ y un número escaso de macrófagos (Motrich, 2007). Se plantea que la degranulación tanto de linfocitos T, células mastocíticas y especies reactivas de oxígeno liberadas por macrófagos son responsables de las alteraciones observadas a nivel histológico. En lo que corresponde a células T se tienen evidencias que en la prostatitis autoinmune aumenta la síntesis de algunas interleucinas proinflamatorias como: TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6 e IL-17 (Djavan y col, 2009). Esto se ha asociado directamente con un incremento en la proliferación del epitelio glandular así como presencia de capas de células mononucleares y polimorfonucleares en el epitelio y estroma prostático (Djavan y col, 2009), lo cual observamos en nuestro modelo de EAP. Por otro lado se ha registrado que el aumento en la expresión genética de IFN- γ e IL-2 y otras moléculas proinflamatorias puede relacionarse con la presencia de HPB (Kramer y col, 2007). Lo anterior puede correlacionarse con nuestros hallazgos de HPB en varias regiones del tejido prostático.

En nuestro modelo de EAP se observó un pico en cuanto a la cantidad de células inflamatorias a los 34 días al igual que en modelos como el de Galmarini y col, y Pacheco y col. Además como ya mencionamos nuestro modelo mostró un

notorio infiltrado inflamatorio, compuesto por células mono y polimorfonucleares, en próstata también desarrolló zonas con HPB e Hipertrofia, a diferencia de lo reportado por Galmarini y col, en 1988. Por otro lado, cabe mencionar que gracias al tipo de administración que usamos se desarrolló la patología en un 95-100% de los animales involucrados en el estudio. Lo anterior indica en nuestro modelo animal una mejora de la efectividad del desarrollo de prostatitis autoinmune generada por administración de MRAG en comparación con otros modelos de EAP. Por otro lado, a diferencia del modelo de Hou y col. en el 2009 donde utilizan animales timentizados para observar el desarrollo de EAP, nosotros usamos animales sanos y los expusimos a sus propios antígenos, lo que es más cercano a la evolución natural de la patología. Esto sugiere a nuestro modelo como una alternativa práctica en el estudio de la prostatitis y su relación con el desarrollo de HPB.

En lo que corresponde a células mastocíticas, de las cuales observamos una gran cantidad en nuestro modelo, se ha mostrado que están ampliamente distribuidas en tejido conectivo y tienen una función importante en la respuesta inflamatoria. Rivero y col en 1995 en un modelo de prostatitis autoinmune reportaron un infiltrado de mastocitos en próstata y la gran mayoría de ellos estaban degranulados. Se ha sugerido que la degranulación de los mastocitos es mediada por IgE o un factor derivado de células T antígeno específico (Rivero y col, 1995). Esto incrementa la permeabilidad vascular en el área donde se encuentran los mastocitos y genera edema local así como atracción y activación de leucocitos (Rivero y col, 1995). Lo anterior se respalda por estudios donde se muestra que la IL-1 β puede estimular células mastocíticas a liberar IL-6, además

también liberan proteasas que estimulan receptores en otras células inmunes. Otras moléculas inflamatorias que generan los mastocitos son TNF- α e IL-2, las que pueden aumentar el infiltrado de células T y otras células inflamatorias.

Papadoukakis y col en 2010 en un modelo de HPB en ratas Wistar reportaron 2.9 mastocitos por campo a 400x mientras que en nuestro estudio se reportan 2.8 células mastocíticas por campo, esto refuerza nuestra observación de la presencia de HPB en nuestro modelo de prostatitis autoinmune experimental. En este punto es conveniente mencionar que los mastocitos secretan también factor de crecimiento de colonias monocíticas-granulocíticas (GM-CSF) y TGF- β que se han relacionado con la generación de cáncer de próstata.

Como ya se mencionó en el párrafo anterior la inflamación crónica en próstata puede acelerar el desarrollo de cáncer al favorecer cambios en diversos procesos celulares que pueden culminar con la modificación fenotípica de algunas células glandulares. Por ejemplo se ha observado que en la PIA como la que se observa en nuestro modelo, se presentan cambios en la expresión genética de algunos marcadores como p27 y Bcl2 que pueden estar relacionados a una célula secretoria inmadura (De Marzo y col, 2009). Reforzando lo anterior se ha mostrado que la constante inflamación del tejido prostático puede generar una diferenciación de células basales a lumbales promoviendo así un estado parecido al embrionario en el estroma prostático adulto (Liu y Goldstein, 2014). Known y col en el 2013 mostraron en un modelo de prostatitis inducido por infección bacteriana que la iniciación del cáncer de próstata de células basales está limitado por la diferenciación basal-luminal y que la inflamación acelera este proceso. Reforzando lo anterior, en otro estudio se mostró que la prostatitis promueve un

microambiente, como un señalamiento alterado de NF- κ B, que favorece la diferenciación de células basales a lumbinales (Known y col, 2013). Además se ha mostrado que la propagación de células tumorales es favorecido por un fenotipo celular luminal el cual podría mantener el comienzo del cáncer a partir de células basales (Stoyanova y col, 2013; Liu, 2014). Por otro lado, también se tienen evidencias de la alteración de moléculas como MYC y H3K27 en cáncer prostático que se relacionan con una heterocromatina activa correspondiente a un fenotipo celular inmaduro (Pellakuru y col, 2012). Todas estas evidencias muestran como el microambiente inflamatorio experimentado en la prostatitis puede promover la evolución de dicha patología en padecimientos más graves, como lo es el cáncer de próstata.

Como ya se mencionó en la introducción, varios son los medicamentos que han sido utilizados para el tratamiento de la prostatitis, entre ellos encontramos algunos antibióticos como la ciprofloxacina y la lemovloxacina (Vykhovanets y col, 2009) y alfabloqueadores, como la alfuzocina (Duclos y col, 2007). Otro fármaco utilizado ampliamente para el tratamiento de la prostatitis crónica es la Dexametasona, la cual es un inhibidor de NF- κ B que se ha demostrado disminuye la extravasación leucocitaria a próstata y la síntesis de IL-1 β e IL-17 entre otras moléculas proinflamatorias (Vykhovanets y col, 2009). Cabe recordar que en nuestro grupo con EAP tratado con Dexametasona, similar a lo reportado en la literatura, observamos una disminución en la presencia de infiltrado inflamatorio, así como disminución en la expresión de moléculas proinflamatorias como IL-6 e IFN- γ . Todos estos medicamentos generan distintos efectos secundarios por lo que se ha buscado tratamientos alternativos como lo son los agentes

inmunoterapéuticos. Este es el caso del Elocalcitol, agonista del receptor de vitamina D, en un modelo murino de prostatitis autoinmune disminuye la presencia del infiltrado inflamatorio de células T CD4+ y CD8+ en próstata (Penna y col, 2006). Esto es similar a la disminución del infiltrado de células inflamatorias en tejido prostático, particularmente de células mastocíticas, que nosotros observamos en este trabajo cuando los animales fueron tratados con DLE. Este hecho se correlaciona con estudios que muestran que dicho inmunomodulador puede disminuir el proceso inflamatorio en algunas patologías autoinmunes (Stanciková y col, 1994), infecciosas (Armides y col, 2006) y en procesos degenerativos como la osteoartritis (Acosta y col, 2016). Así se plantea que el DLE al disminuir el proceso inflamatorio en próstata podría disminuir la posibilidad de que la prostatitis evolucione a HPB o cáncer de próstata.

Para poder observar los efectos del DLE en la evolución de la prostatitis decidimos administrarlo a partir del día 15 hasta el día 34 después de iniciada la inducción de la EAP. Esto ya que es conocido que en este tipo de modelo de EAP la inflamación prostática es instaurada a los 15 días de comenzado el modelo y alcanza su máximo en el día 30 (Motrich y col, 2007). En lo que corresponde a la cantidad de DLE administrado se tienen investigaciones *in vitro* de la actividad del DLE en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Lysteria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi*, en donde se observó un efecto bactericida desde 0.29 hasta 0.62 U (Franco-Molina y col, 2006). Además, en la práctica, en nuestro laboratorio hemos observado que la administración de 0.3 U de DLE tiene un efecto inmunomodulador en ratas. Con respecto a la frecuencia de la administración no se tienen antecedentes directos

de con que periodicidad es adecuado la administración del DLE en la prostatitis autoinmune. Algo cercano a esta situación es el estudio de Pizza y col en 1996 donde evidenciaron en pacientes con cáncer de próstata que un régimen de administración de 2 a 5 U al mes por 1 a 9 años puede generar efectos clínicos benéficos en este tipo de pacientes. No obstante con la periodicidad de administración de DLE en este modelo de EAP que se describe en metodología logramos observar cambios en cuanto al proceso inflamatorio en próstata tanto a nivel histológico como a nivel molecular como se hace evidente en la sección de resultados.

b) La prostateína

La prostateína, o proteína prostática esteroide-enlazante de rata, es una molécula secretada por glándulas acinares de la parte ventral de la próstata de la rata, hasta ahora no se ha encontrado que sea sintetizada por otro órgano y constituye la mayor porción de la proteína total del citosol prostático (Lea y col, 1978). Esta molécula es un tetrámero de 40,000 kDa, compuesta de dos diferentes subunidades: los dímeros S y F, y es identificada como un antígeno blanco en la prostatitis autoinmune. En 1998 Maccioni y col, aislaron la prostateína y la inocularon en ratas Wistar observándose una respuesta inmune celular caracterizada por la presencia de un número importante de mastocitos, y también una respuesta humoral, relacionada con la presencia de anticuerpos contra la prostateína, lo cual sugiere que esta proteína es un antígeno central en la prostatitis (Maccioni y col, 1998). Se ha sugerido que dicho autoantígeno genera una respuesta inmune celular específica y auto-anticuerpos de isotipos asociados

a Th1 (Motrich y col, 2007). De esto se concluyó que aunque son necesarios varios antígenos para generar una inflamación prostática, la prostateína debe de ser uno de los principales generadores de la prostatitis autoinmune (Penna y col, 2006; Rivero y col, 2006).

En otros estudios realizados en ratas Lewis se describe a la PSBP y se encontró una respuesta humoral y celular en contra de la prostateína (Liu y col, 1996). Nuestros resultados concuerdan con lo descrito en la literatura debido a que encontramos en ratas normales y en el grupo tratado con Dexametasona que la concentración de prostateína fue baja. En lo que corresponde al grupo que se le indujo prostatitis, y que no fue expuesto a algún tratamiento adicional, y en el grupo que recibió placebo se mostró que la concentración de prostateína fue considerablemente alta. Lo anterior, aunado a la notoria presencia de un infiltrado inflamatorio, nos indica que nuestro modelo desarrolló una prostatitis autoinmune. Por otro lado se observó que el DLE disminuyó significativamente los niveles de la prostateína y el infiltrado de células inflamatorias pudiéndose plantear como un agente adecuado para padecimientos autoinmunes y de tipo inflamatorio, como en este caso la prostatitis. Estos resultados se refuerzan con estudios que indican como en un modelo murino de artritis reumatoide el DLE administrado en 9 ocasiones por 18 días puede disminuir los síntomas de dicha enfermedad autoinmune (Stancikova y col, 1994). Más aún como recientemente nuestro grupo reportó el efecto antiinflamatorio de DLE en un modelo animal de osteoartritis (Acosta y col, 2016)

c) Moléculas inflamatorias

i. CD45

El microambiente inflamatorio que caracteriza a la prostatitis autoinmune como ya se describió anteriormente está compuesto por un infiltrado de células inflamatorias que producen distintas moléculas proinflamatorias. Entre dichas moléculas encontramos a CD45 o receptor de protein tirosin fosfatasa tipo C anteriormente llamado antígeno leucocitario común, la cual es una molécula que regula varios procesos celulares tales como crecimiento y diferenciación celular y la oncogénesis. Esta molécula es esencial en las funciones de células T y B pero también puede ser encontrada en otras células tales como células de mama, fibrocitos y células prostáticas (Adegun y col, 2013). Con relación a esto Adegun y col, en el 2013 observaron la expresión de esta molécula en epitelio glandular prostático en biopsias de pacientes con HPB (Adegun y col, 2013). CD45 se compone de un dominio extracelular, un segmento simple transmembranal y dos dominios catalíticos intracitoplasmáticos en *tándem*. Hay evidencias de varias isoformas de esta protein tirosin fosfatasa, su gen contiene 34 exones de los cuales tres exones sufren *splicing* alternativo generando 8 diferentes mRNA's maduros, los cuales al ser traducidos generan 8 diferentes productos proteicos. Las isoformas de CD45 se nombran como: CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RAB, CD45RAC, CD45RBC, CD45RO y CD45R (Adegun y col, 2013).

Recientemente, en un modelo murino de prostatitis inducido por la administración de IL1- β se observó la expresión de esta proteína por inmunohistoquímica la cual fue escasa en animales sin patología y aumentada en ratas con prostatitis (Vykhovanets y col, 2009). De forma similar en este estudio

nosotros observamos una expresión aumentada de CD45 en glándulas prostáticas de animales con la patología. En otras investigaciones *in vitro* se ha mostrado que células prostáticas CD45 infectadas con *Chlamydia trachomatis*, aumentan el mRNA de algunas moléculas inflamatorias tales como: IL-1 β , TNF- α e IFN- γ (Mackern y col, 2011). Además en una investigación realizada en tejido de pacientes con cáncer de próstata se observó que el aumento en la expresión de CD45 se puede relacionar con un aumento en la proliferación celular (Adegun y col, 2013). Similar a lo encontrado en la literatura en nuestra investigación se observó que en el grupo con la patología sin tratamiento y en el grupo tratado con placebo la expresión de CD45 aumento significativamente, lo que se puede relacionar con la presencia de un proceso inflamatorio en próstata.

Vykhovanets y col, en su modelo de prostatitis inducido por administración de IL1- β mostraron que la administración de Dexametasona no tiene un efecto significativo en la expresión de CD45 (Vykhovanets y col, 2009). De forma similar a lo que corresponde a lo que nosotros encontramos en nuestro grupo tratado con este fármaco. En lo que se refiere al grupo tratado con el DLE se mostró que el DLE disminuyó la expresión de CD45 incluso a niveles menores a lo observado en el grupo de ratas normales. Similar a lo que nosotros registramos para el DLE existen evidencias de que otro DLE, el Permixon (extracto de *Serenoa repens*) posee ciertos efectos aunque no fueron estadísticamente significativos en la expresión de CD45 (Bernichtein y col, 2015). De esta forma se puede plantear que algunos agentes inmunoterapéuticos tales como el DLE pueden tener efectos en el control de la expresión de esta molécula proinflamatoria.

ii. TNF- α

TNF- α es una citocina proinflamatoria con un papel importante en la prostatitis ya que influye tanto en la inmunidad como en la remodelación celular, en la apoptosis y en la regeneración celular (Royuela y col, 2008). Esta molécula de 17 kDa es producida por varios tipos celulares ya sea relacionados con el sistema inmune o no (Royuela y col, 2008). El TNF- α cuenta con al menos dos receptores TNFR1 y TNFR2, y su interacción con ellos genera la trimerización y reclutamiento de varias proteínas a su dominio citoplasmático. El TNFR1 es el principal mediador de la acción de TNF- α en apoptosis, proliferación de fibroblastos y actividad antiviral (Royuela y col, 2008). El enlace de TNF- α a TNFR1 forma el complejo del receptor de TNF asociado al dominio de muerte celular (TRADD, por sus siglas en inglés), esto activa al receptor de TNF asociado al factor-2 (TRAF-2), el cual representa un punto de integración de señales pro- y anti-apotóticas. TRAF-2 puede estimular 2 rutas diferentes, una inicia con la interacción de TRAF-2 con una cinasa inductora de NF- κ B (NIK), el cual promueve factores de supervivencia tales como Bcl-2 y Bcl-XL. La otra ruta activa la cascada de reacciones que inicia una cinasa reguladora de señal (ASK-1), la protein cinasa mitógeno activada (MEK-4) y una cinasa Jun N-terminal (JNK), esto culmina con la fosforilación de la proteína activadora-1 (AP-1), la cual estimula la apoptosis directamente o por la activación de p38. Paradójicamente TNF- α según la situación fisiológica, como en la prostatitis o el cáncer de próstata, puede promover la proliferación celular (Royuela y col, 2008).

En lo que respecta a la inflamación prostática, estudios realizados en un modelo murino de prostatitis autoinmune en el cual se administró un péptido de la proteína que interactúa con la espermina mostró un número escaso de células inflamatorias en ratones normales en comparación con los animales con la patología (Atluntas y col, 2013), parecido a lo que nosotros describimos en este trabajo. Además en dicho estudio se encontró que los animales con la patología presentaron un aumento en la expresión génica de algunas moléculas inflamatorias tales como el TNF- α (Atluntas y col, 2013). Sugihara y col, mostraron que esta molécula se expresó inmunohistoquímicamente en citoplasma de epitelio de células no cancerosas prostáticas y también en epitelio prostático canceroso (Sugihara y col, 1998). Concordante con esto, en nuestro trabajo encontramos que las ratas con la patología sin algún tipo de tratamiento y las del grupo placebo, registraron una mayor expresión por inmunohistoquímica de dicha molécula en comparación con el grupo de ratas normales. La sobreexpresión de TNF- α se ha observado en tejido de cáncer prostático; se plantea que una ruta por la cual TNF- α puede modificar el equilibrio entre supervivencia, proliferación y muerte celular es a través de la alteración de la ruta de NIK (Royuela y col, 2008). Se propone que la molécula TRAF-2 actúa sobre NIK aumentando la expresión de IKK α /IKK β lo cual culmina con un aumento en la translocación de NF- κ B al núcleo, cuya expresión se ha relacionado con un aumento en el crecimiento y proliferación celular en el cáncer de próstata. Esto puede ser debido a que NF- κ B regula la expresión de c-myc, ciclina D-1 o IL-6 (Royuela y col, 2008).

En un modelo de prostatitis al que se le administra TNF- α (10 μ /kg) se mostró que esta molécula puede incrementar la actividad de NF- κ B lo que influye

en el proceso inflamatorio en próstata (Vykhovanets y col, 2008). En dicho modelo se registró que la administración de Dexametasona reduce la actividad de NF- κ B pudiendo relacionarse esto con la disminución del proceso inflamatorio en próstata (Vykhovanets y col, 2008), disminución que nosotros observamos en nuestro grupo tratado con este fármaco. Por otro lado cabe hacer notar que en el grupo tratado con el DLE se registró una disminución significativa en la expresión de TNF- α con respecto a los grupos restantes, incluyendo el grupo tratado con Dexametasona. Lo que además coincide con la disminución en el infiltrado de células inflamatorias en próstata, este hecho sugiere que al estar disminuido TNF- α no influye de una manera patológica en la ruta de NF- κ B, además que retoma su función de promoción de la apoptosis de una manera adecuada. Concordante con esto están los hallazgos de nuestro grupo de trabajo en donde mostramos como el DLE puede disminuir la translocación de NF- κ B al núcleo, lo cual coincide con una menor expresión de otras moléculas proinflamatorias tales como IFN- γ y TNF- α (Acosta y col, 2016). Además en estudios realizados en la línea celular L929 se observa que la administración de DLE puede generar una disminución en la síntesis de TNF- α por parte de dichas células aun cuando son estimuladas con lipopolisacarido (Ojeda y col, 1996).

iii. IFN- γ

Otra molécula que se ha observado está involucrada fuertemente en la prostatitis autoinmune es el IFN- γ , el cual es un monómero compuesto por seis hélices y una secuencia lineal en la región C- terminal, es sintetizado por células CD4+, CD8+, células NK, células B, células profesionales presentadoras de antígeno

(macrófagos y células dendríticas), entre otras (Steiner y col, 2002). Royuela y col, en el 2000 mostraron que el IFN- γ se expresó inmunohistoquímicamente tanto en células estromales como basales del epitelio glandular prostático (Royuela y col, 2000). La producción de esta molécula es controlada por la IL-12 y la IL-8 principalmente, por ejemplo la IL-12 favorece la síntesis de IFN- γ por células NK. El IFN- γ tiene dos receptores funcionales (IFNGR, por sus siglas en inglés) IFNGRI y II. El receptor IFGNR2 puede considerarse como un factor limitante de la acción de IFN- γ ; por ejemplo cuando en la superficie celular de células Th1 existe baja expresión de IFNGRII hay un aumento en el número de estas células. Por otro lado se ha observado que cuando se presenta una expresión aumentada de IFNGRII en células Th2, mediante su interacción con IFN- γ , ocasiona inhibición, proliferación y/o aumento de la apoptosis. De esta forma este interferón influye de forma directa en el equilibrio entre células Th1 y Th2. En otras cosas se ha observado que el IFN- γ aumenta la cantidad y diversidad de péptidos presentados al MHC I y II (Steiner y col, 2002). Además se ha mostrado que a ciertos niveles de IFNGR el IFN activa lentamente a la molécula STAT-1 y consecuentemente se promueven niveles bajos de IRF-1 lo cual disminuye la apoptosis celular tanto de células Th1, como de macrófagos y otros tipos celulares. Por otro lado el IFN- γ favorece la migración de leucocitos a sitios de inflamación aumentado la expresión de algunas quimiocinas, tales como IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α/β , RANTES entre otras, y moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1, las cuales sinérgicamente son reguladas por TNF- α e IL-1 β .

En diferentes modelos de inflamación prostática se ha observado un aumento en la expresión de IFN- γ , tanto en células T y células endoteliales y del

estroma prostático (Atluntas y col, 2013). Por ejemplo Atluntas y col, desarrollaron un nuevo modelo de CP/CPPS en ratones SWXJ donde observaron en sobrenadante de cultivos celulares de células esplénicas un aumento en la expresión génica de IFN- γ (Atluntas y col, 2013). En otro modelo de prostatitis autoinmune en ratones NOD se mostró que en el sobrenadante de células de nodos linfáticos de ratones con prostatitis hay un aumento en los niveles IFN- γ por medio de ELISA (Penna y col, 2006). Investigaciones indican que en células normales el IFN- γ no estimula la proliferación celular, como lo podemos ver en el grupo de ratas sin prostatitis, mientras que en células con HPB dicha molécula estimula la proliferación e incluso puede inhibir efectos antiproliferativos de moléculas como la IL-4 (Kramer y col, 2007). Estos datos correlacionan con lo obtenido en el grupo sin tratamiento y en el grupo placebo. En HPB en general se ha observado un aumento en los niveles de IFN- γ el que se ha relacionado con un aumento en el reclutamiento de células T en tejido prostático (Kramer y col, 2007).

La disminución de IFN- γ se ha relacionado con una reducción de la severidad del proceso inflamatorio en próstata y se ha observado que en algunos modelos murinos de prostatitis es favorecida por algunos fármacos como la Dexametasona (Atluntas y col, 2013), como se observó en este trabajo en el grupo tratado con dicho fármaco. En lo que se refiere al grupo tratado con DLE también observamos una disminución significativa en la expresión inmunohistoquímica de esta molécula proinflamatoria. Lo cual coincide con los resultados de nuestro grupo donde mostramos que el DLE disminuye la expresión génica de IFN- γ (Acosta y col, 2016). Todo lo mencionado hasta el momento corresponde con la disminución en el infiltrado de células inflamatorias, lo cual podría ser debido a que

el IFN- γ ya no favorece la expresión de quimiocinas, como RANTES, y moléculas de adhesión como ICAM-1.

iv. IL-6

La IL-6 es una molécula central en la inflamación prostática, esta molécula anteriormente nombrada como factor estimulador de células B-2 e IFN- β 2, es una citocina pleiotrópica que influye en la respuesta antígeno específica y reacciones inflamatorias (Steiner y col, 2002). Su estructura es helicoidal de 4 hélices, dos orientadas hacia abajo y dos hacia arriba, y tiene una región N-terminal flexible aproximadamente de 15 a 22 residuos. Se ha mostrado que esta citocina induce la proliferación de células T y su diferenciación a células T citotóxicas, por aumento de la expresión del receptor de IL-2 y además la síntesis de dicha interleucina (Steiner y col, 2002). La IL-6 también induce la síntesis de distintas moléculas de adhesión y la producción endotelial de proteína-1 quimioatrayente de monocitos. En lo que se refiere a su receptor, este consiste en dos cadenas polipeptídicas, una de 80 kDa y otra de 130 kDa (gp130). La cadena de 80 kDa se presenta en forma transmembranal y en forma soluble (Hobish y col, 1998). La forma transmembranal tiene una región intracitoplasmática corta y su interacción con la IL-6 favorece su asociación con gp130, mientras que la unión con el receptor soluble favorece la trans-señalización.

La IL-6 se ha observado está involucrada en distintos tipos de enfermedades prostáticas relacionadas con la inflamación; por ejemplo, en el cáncer de próstata se ha observado que la expresión proteica de esta citocina esta elevada en individuos con la patología en comparación con individuos normales

(Giri y col, 2001). Milicevic y col, 2015 mostraron que la IL-6 fue expresada diferencialmente por células basales glandulares y del estroma prostático en muestras de pacientes normales, con HPB y con cáncer de próstata (Milicevic y col, 2015). De manera similar nosotros mostramos que en el grupo con inflamación prostática sin tratamiento y en el grupo placebo la expresión de IL-6 fue mayor en comparación con el grupo normal. Otros estudios en un modelo de prostatitis en ratas Sprague Dawley inducida subcutáneamente con lipopolisacarido mostró una expresión aumentada de IL-6 por Western Blot (Kim y col, 2013). A nivel clínico se ha observado una relación entre altos niveles séricos de IL-6 y la presencia de hiperplasia prostática benigna o incluso cáncer de próstata (Schenk y col, 2010). Con respecto a todo esto se plantea que altas concentraciones de IL-6 pueden influir en la expresión de otras moléculas proinflamatorias como TNF- α e IL-2 favoreciendo la proliferación celular en próstata y la perpetuación del estado inflamatorio en dicho órgano (Kim y col, 2013; Giri y col, 2001).

Uno de los fármacos que se ha observado puede disminuir la actividad inflamatoria de IL-6 es la Dexametasona, por ejemplo en el modelo murino de prostatitis inducido por administración de IL-1 β se observó que dicho fármaco disminuye la actividad de NF- κ B en la presencia de IL-6 (Vykhovanets y col, 2008). Además se ha indicado que pacientes con cáncer de próstata que responden al tratamiento con Dexametasona disminuyen significativamente los niveles séricos de IL-6 en comparación con personas con ese padecimiento que no responden al tratamiento con el glucocorticoide (Akakura y col, 2003). Todo esto refuerza nuestras observaciones de que este fármaco disminuye la expresión de IL-6 en el

modelo de EAP. En el tratamiento con DLE observamos, al igual que en el grupo tratado con Dexametasona, una disminución en la expresión de IL-6. Esto es respaldado por estudios que indican que otros agentes inmunoterapéuticos como una fórmula herbal compuesta por: *C. nippon*, *P. ginseng*, *C. officinalis*, *A. gigas*, *L. chinense* y *C. zeylanicum*, puede disminuir las lesiones histopatológicas y la expresión de IL-6 en un modelo murino de prostatitis (Yoon y col, 2013). Además estudios en leucocitos humanos estimulados con lipopolisacárido muestran que el DLE es capaz de disminuir la producción de IL-6 por dichas células (Franco-Molina y col, 2007). Esto permite sugerir que el DLE es un DLE que puede modular la expresión de IL-6 en este modelo EAP.

v. IL-17

La IL-17 es una proteína implicada en la prostatitis que consta de 155 aminoácidos que consiste en un péptido de 23 aminoácidos seguido de una región de 122 aminoácidos y es producida como un homodímero enlazado por puentes disulfuro de 30-35 kDa. Esta es una citocina secretada por células T activas y tiene 6 isotipos (IL-17A – IL-17F) (Moseley y col, 2003). La interacción de esta molécula con su receptor activa la proteína cinasa, la cinasa c-Jun N-terminal (JNK) y la ruta de la MAP cinasa P38. La activación de dichas rutas aumentan la síntesis de IL-6, IL-1 y NF- κ B (Moseley y col, 2003).

Recientemente, se ha observado que esta citocina cumple con un rol central en prostatitis. por ejemplo en un modelo de prostatitis inducida por la inoculación de *E.coli* en ratón NOD se mostró un aumento significativo en células

T_H17 en próstata de ratones con la patología con respecto a animales sin la patología (Quik y col, 2013). Se plantea que la IL-17 secretada por células T_H17 es un regulador de metaloproteasas, proteínas de fase aguda, la IL-6 y las quimiocinas CXCL que favorecen la reclutación de neutrófilos así como su movilización y activación (Quik y col, 2013). En otro modelo murino de CP/CPPS inducida por administración de un péptido de la proteína espermina se observó un aumento en la expresión génica de IL-17 aunado con un incremento en la síntesis de proteína C reactiva y otras proteínas inflamatorias (Atluntas y col, 2013). Además estudios han demostrado que la IL-17 es expresada tanto en tejido epitelial como en el estroma de la próstata en un modelo murino de prostatitis (Murphy y col, 2015). Todo esto es consecuente con nuestras observaciones sobre la presencia del infiltrado de células inflamatorias y del aumento en la expresión de otras moléculas inflamatorias, tales como IL-6. Por otro lado se ha observado que células de HPB aumentan la síntesis de IL-17 producida por células T_H17, las cuales son efectores clave en varias enfermedades autoinmunes, como la CP/CPPS (Penna y col, 2009). Esto se puede relacionar con la notoria presencia de regiones con HPB tanto en el grupo sin tratamiento como en el grupo placebo. Por otro lado en cáncer de próstata también se ha mostrado un aumento en la expresión de IL-17 en el estroma prostático, el cual aumenta según la severidad de la patología (Moseley, 2003).

En 2009 Vykhovanets y col, mostraron en su modelo de prostatitis inducida por IL-1 β que la expresión inmunohistoquímica de IL-17 en animales tratados con Dexametasona no registró diferencia significativa en comparación con animales con la patología a los que no se les administró el fármaco (Vykhovanets y col,

2009). Esto corresponde con lo que observamos en el grupo tratado con Dexametasona. En el caso de algunos agentes inmunoterapéuticos que pueden influir en la expresión de IL-17 existen estudios en cultivos de esplenocitos de animales con EAP donde se evidenció que el Elocalcitol, un agonista del receptor de la vitamina D, disminuyó los niveles séricos de dicha molécula (Penna y col, 2006). En este estudio no encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de animales tratados con DLE y los demás grupos, sin embargo cabe mencionar que este es el primer estudio donde se intenta registrar qué efectos puede tener el DLE en la expresión de IL-17 en un modelo de EAP o en alguna otra patología prostática.

d) Molécula anti-inflamatoria

IL-4

En la prostatitis autoinmune se ha observado existe un desajuste en la síntesis de algunas moléculas proinflamatorias, tales como IL-4. Esta molécula es un monómero de 15 kDa (129 aminoácidos) producido por células TH2, basófilos, mastocitos y eosinófilos (Akdis y col, 2011). La IL-4 interactúa con dos tipos de receptores: CD124 y CD132; el primer receptor sólo se expresa en células T y el último se expresa tanto en células hematopoyéticas como en células inmunes excepto en células T. Es una citocina pleitrópica que regula condiciones alérgicas, estimula la diferenciación de células T hacia células TH2, suprime la respuesta TH1 e induce el cambio de clase en células B a IgE. Esta interleucina inhibe la producción de IL-1, IL-6, IFN- γ y TNF- α y se ha utilizado en el tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes (Akdis y col, 2011).

Algunos estudios han mostrado que en ratas normales la IL-4 tiene una expresión basal a nivel de mRNA, esto se ha relacionado también con el decremento en la expresión a nivel de mRNA de IFN- γ e IL-6 y la disminución de la proliferación celular en tejido prostático (Djavan y col, 2009). Goldstein y col, en el 2011 mostraron que la IL4 generó una inmunoreactividad distinta en células del epitelio glandular prostático en pacientes normales, con HPB y cáncer de próstata (Goldstein y col, 2011). Lo anterior se puede relacionar con lo encontrado en este estudio en el grupo de ratas normales. En un modelo de prostatitis, con ratones C57BL/6 IL-4KO, inducida por administración de homogeneizado prostático se mostró que en estos ratones se exagera la inflamación prostática (Motrich y col, 2016). Esto es similar a lo que nosotros observamos en el grupo de animales sin tratamiento y el grupo placebo. Cabe mencionar que la escasa expresión de IL-4 acompañado por el incremento de la expresión de algunas moléculas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α genera un microambiente que favorece la perpetuación del estado inflamatorio en próstata. En la literatura se señala que en este microambiente inflamatorio la interacción IL-4/IL-4R puede activar la vía de STAT3 y así aumentar la proliferación celular, incrementando la posibilidad de desarrollo de HPB o cáncer de próstata. Esto se refuerza por estudios que muestran que en tejido prostático con HPB aumenta la expresión de IL-4 y que además en dicho tejido se acrecenta la expresión de mRNA de IL-4 e IL-17 (Vital y col, 2013), lo cual concuerda con nuestras observaciones de la presencia de HPB en el grupo con prostatitis sin algún tipo de tratamiento.

Convencionalmente es conocido que la Dexametasona disminuye la síntesis de IL-4 en varias patologías (Franchimont y col, 1994), sin embargo

existen algunos casos como en la enfermedad de Alzheimer en la cual la administración de dicho fármaco no lo hace (Nijhuis y col, 2004). Esto aunado a que hasta el momento no existen estudios que indiquen qué efectos puede tener la Dexametasona en la expresión de IL-4 en prostatitis no contradice nuestros hallazgos de un aumento en la expresión de esta interleucina en el grupo tratado con ese medicamento en comparación de los animales con la patología. Cabe mencionar que tampoco existen reportes en la literatura de los efectos que el DLE pudiera tener en la expresión de IL-4 en la prostatitis autoinmune o en algún otro padecimiento. Un estudio que puede respaldar los cambios en la expresión de IL-4 es el realizado por nuestro grupo (Acosta y col, 2016) donde se reporta una disminución de la expresión génica de IFN- γ al administrar DLE en un modelo de osteoartritis (Acosta y col, 2016). Se sabe que esta variación puede modificar la expresión de IL-4 (Akdis y col, 2011, Kramer y col, 2007). Estos datos refuerzan nuestras observaciones de que los niveles IL-4 en nuestro modelo de EAP aumentaron significativamente en el grupo tratado con DLE en comparación con los grupos normal, sin tratamiento y placebo. Diversos autores plantean que bajo ciertas circunstancias, como disminución de niveles de IFN- γ e IL-6 la IL-4 puede disminuir la proliferación celular (Goldstein y col, 201), tal y como lo vimos en el grupo tratado con DLE. Entonces se puede plantear que el DLE al disminuir algunos estímulos proinflamatorios, como la expresión de CD-45, IL-6, IFN- γ y TNF- α , y al aumentar la expresión de IL-4 puede disminuir el proceso inflamatorio en este modelo de EAP. Además esto se refuerza por la disminución en la proliferación que se presentó en el grupo con prostatitis tratado con el DLE.

a) Proliferación celular

Como ya se mencionó a lo largo de este trabajo es conocido que el microambiente inflamatorio que se observa en la prostatitis autoinmune, como el que se muestra en nuestro modelo de EAP, se puede relacionar con un aumento en la proliferación celular en próstata (Djavan y col, 2009). En un adulto sano la proliferación celular se genera en un porcentaje mínimo (Leze y col, 2011) como lo pudimos observar en el grupo de ratas normales. Sin embargo, cuando se experimenta prostatitis se favorece un aumento en la proliferación celular, como se mostró en el grupo con la patología sin otro tipo de tratamiento, que en algunos casos puede relacionarse con HPB y cáncer de próstata (Motrich y col, 2007).

Se plantea que la hiperproliferación inducida por la constante inflamación en próstata es generada por la secreción de distintas citocinas inflamatorias (Macoska y col, 2011; Pace y col, 2011). Esto es apoyado por varios estudios, por ejemplo en un modelo murino de BPH se mostró que en este estado de hiperproliferación prostática existe un aumento en la expresión de IL-6 y en la síntesis de otros marcadores de inflamación como H_2O_2 (Chen y col, 2015). Por otro lado en pacientes con HPB y en personas con cáncer de próstata se registró un aumento en la expresión de algunos marcadores de inflamación como IL-6, CD-40 e ICAM-I (Pace y col, 2011). Todo esto se puede relacionar con el aumento de la proliferación celular observado en nuestro grupo con la patología. Por otro lado diversas investigaciones indican que el aumento de la proliferación celular prostática se relaciona también con cambios en la expresión de I κ B y de la fosfatasa supresora de tumores y homóloga a la tensina (PTEN). Por ejemplo en un modelo murino de cáncer de próstata se ha mostrado que la activación de NF-

κ B por I κ B acompañada por mutaciones de los genes de PTEN se asocian con un aumento en la proliferación del epitelio glandular prostático que pueden relacionarse con los inicios de cáncer de próstata (Birbach y col, 2011).

Con respecto a los grupos tratados con Dexametasona y DLE se observó una disminución en la proliferación celular. En el caso de la Dexametasona es conocido que este fármaco puede disminuir la proliferación en próstata, por ejemplo en un modelo murino de resistencia a la insulina se observó que la Dexametasona disminuye la expresión de PCNA en tejido prostático (Costa y col, 2012). En lo que respecta al DLE no hay hasta ahora estudios que indiquen su efecto en la proliferación celular en próstata, sin embargo existen evidencias que el DLE puede influir en la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama (Mendoza-Gamboa y col, 2008; Franco-Molina y col, 2006). Por ejemplo, estudios *in vitro* en células de cáncer de mama MF7 indican que este DLE suprime la expresión a nivel de mRNA de p53, bag-1, c-myc, Bax y Bcl-2 y así influye en la apoptosis de dichas células cancerígenas (Franco-Molina y col, 2006). Otros estudios también realizados en células de cáncer de mama MF7 indican que el DLE disminuye la proliferación celular reduciendo la actividad de AP-1, así como la expresión proteica de c-Jun y modula la expresión génica de NFATx, NFATc, NF- κ B, c-Jun y c-Fos (Mendoza-Gamboa y col, 2008). Reforzando lo anterior está nuestra investigación donde en un modelo de osteoartritis se observó que el DLE disminuye la translocación de NF- κ B al núcleo. Todo esto en conjunto coincide con nuestro hallazgo de que el DLE puede disminuir la proliferación celular en tejido prostático en este modelo en rata de EAP.

IX. Conclusiones

En este estudio se desarrolló un modelo de prostatitis autoinmune experimental caracterizado por: infiltrado de células inflamatorias e HPB. El tratamiento con DLE se mostró que disminuye el infiltrado de células inflamatorias, los niveles séricos de prostateína y las áreas con HPB en este modelo de EAP. Además la administración del DLE se puede relacionar con la disminución en la expresión en tejido prostático de PCNA, CD45, IL-6, IL-17, TNF- α e IFN- γ . Aunado a todo lo anterior también se observó que el DLE promueve la expresión de IL-4, la cual es considerada una molécula anti-inflamatoria en la prostatitis autoinmune. En general se puede plantear que la dosis y periodicidad con la cual se administró el DLE en este estudio puede contrarrestar el proceso inflamatorio en este modelo de EAP y así disminuir el riesgo de evolución de un proceso crónico de prostatitis a HPB o incluso a cáncer de próstata.

X. Perspectivas

- Evaluar la expresión a nivel de ARNm de las moléculas evaluadas en este estudio: CD-45, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17 e IL-4.
- Registrar modificaciones en la translocación de NF- κ B al núcleo en este modelo de EAP.
- Mostrar modificaciones en los niveles séricos de Antígeno Prostático Específico en este modelo de EAP.

- Evidenciar cambios en la expresión de otras moléculas involucradas en el proceso inflamatorio en próstata en este modelo de EAP: por ejemplo IL-8.
- Mostrar si este modelo de EAP puede ser viable para estudiar la evolución de la prostatitis ha HPB y/o cáncer de próstata.
- Registrar modificaciones en la translocación de NF-κB al núcleo generadas por la administración de DLE en este modelo de EAP.
- Mostrar si la mejora en el estado inflamatorio provocado por el DLE puede relacionarse con una disminución en la incidencia de HPB y/o cáncer de próstata.
- Llevar a cabo un estudio clínico del efecto del DLE en pacientes con prostatitis crónica.

XI. Bibliografía

- Acosta P, Pérez N, Pérez E, Correa B, Pérez C, Gómez C, Sánchez V, Pérez DG, **“Anti-inflammatory effect of dialysable leucocyte extract in a rat model of osteoarthritis: histopathological and molecular characterization”**, Scand J Rheumatol 2016;00:1–8.
- Adegun P.T, Ogundele O.M, Falode D.T, Taiwo O.J, Ajonijebu D.C, Omoaghe A.O, Kobomoje O, **“Mapping Angiogenic Cells CD31 (PECAM1) and CD45 in PCa and BPH Biopsies”**, JCREO, 2013 ; Vol. 5(1), pp. 1-7.

- Akakura K, Suzuki H, Ueda T, Komiya A, Ichikawa T, Igarashi T, Ito H, **“Possible mechanism of dexamethasone therapy for prostate cancer: suppression of circulating level of interleukin-6”**, Prostate. 2003 Jul 1;56(2):106-9.
- Armides Franco-Molina M, Mendoza-Gamboa E, Castillo-Tello P, Tamez-Guerra RS, Villarreal-Treviño L, Tijerina-Menchaca R, Castillo-León L, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Padilla C. **“In vitro antibacterial activity of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract.”** Immunopharmacol Immunotoxicol. 2006; 28(3):471-83.
- Altuntas CZ, Daneshgari F, Veizi E, Izgi K, Bicer F, Ozer A, Grimberg KO, Bakhautdin B, Sakalar C, Tasdemir C, Tuohy VK, **“A novel murine model of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS) induced by immunization with a spermine binding protein (p25) peptide”**. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2013 Mar 15;304(6):R415-22.
- Bajpayee P, Kumar K, Sharma S, Maurya N, Kumar P, Singh R, Lal C. **Prostatitis: prevalence, health impact and quality improvement strategies**, Acta Pol Pharm. 2012 Jul-Aug;69(4):571-9. Review.
- Bernichtein S, Pigat N, Camparo P, Latil A, Viltard M, Friedlander G, Goffin V, **“Anti-inflammatory properties of Lipidosterolic extract of Serenoa repens (Permixon®) in a mouse model of prostate hyperplasia.”** Prostate. 2015 May;75(7):706-22. doi: 10.1002/pros.22953. Epub 2015 Feb 14.

- Berrón-Pérez R, Chávez-Sánchez R, Estrada-García I, Espinosa-Padilla S, Cortez-Gómez R, Serrano-Miranda E, Ondarza-Aguilera R, Pérez-Tapia M, Pineda Olvera B, Jiménez-Martínez Mdel C, Portugués A, Rodríguez A, Cano L, Pacheco PU, Barrientos J, Chacón R, Serafín J, Mendez P, Monges A, Cervantes E, Estrada-Parra S, **“Indications, usage, and dosage of the transfer factor”**, Rev Alerg Mex. 2007 Jul-Aug;54(4):134-9. Review.
- Borkowsky W, Karpatkin S, **“Leukocyte migration inhibition of buffy coats from patients with autoimmune thrombocytopenic purpura when exposed to normal platelets: modulation by transfer factor”**, Blood. 1984 Jan;63(1):83-7.
- Chen KC, Sung SY, Lin YT, Hsieh CL, Shen KH, Peng CC, Peng RY, **“Benign prostatic hyperplasia complicated with T1DM can be alleviated by treadmill exercise-evidences revealed by the rat model”**, BMC Urol. 2015 Nov 17;15:113.
- Corrado F, Pizza G, de Vinci C, Corrado G, **“Immunotherapy with transfer factor in hormone-resistant metastasized carcinoma of the prostate”**, Arch Esp Urol. 1989;42 Suppl 2:191-6.
- Correa SG, Riera CM, Iribarren P, **“Involvement of peritoneal dendritic cells in the induction of autoimmune prostatitis”**, J Autoimmun. 1997 Apr;10(2):107-13.
- Costa MM, Violato NM, Taboga SR, Góes RM, Bosqueiro JR. **“Reduction of insulin signalling pathway IRS-1/IRS-2/AKT/mTOR and decrease of**

epithelial cell proliferation in the prostate of glucocorticoid-treated rats.” Int J Exp Pathol. 2012 Jun;93(3):188-95.

- Cruz-Nuricumbo, Gutiérrez-Ochoa, Romero-Arriola, Gaytán-Paz, Nerubay-Toiber, Gutiérrez-Godínez, **“Prevalencia de cáncer prostático por toma de biopsia en pacientes con sospecha clínica”**, Rev Mex Urol 2005; 65(5): 295-302.
- De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. **“Proliferative inflammatory atrophy of the prostate”**; Am J Path 1999; 155: 1985–92.
- Delavallée L, Duvallet E, Semerano L, Assier E, Boissier MC, **“Anti-cytokine vaccination in autoimmune diseases”**, Swiss Med Wkly. 2010 Nov 1;140:w13108. doi: 10.4414/smw.2010.13108
- Djavan B, Eckersberger E, Espinosa G, Kramer G, Handisurya A, Lee C, Marberger M, Lepor H, Steiner G, **“Complex mechanism in prostatic inflammatory response”**, European urology supplements 8 (2009), 872-878.
- Dominguez GJ Sr, Hellstrom WJ, **“Prostatitis”**, Clin Microbiol Rev. 1998 Oct;11(4):604-13. Review.
- Duclos AJ1, Lee CT, Shoskes DA, **“Current treatment options in the management of chronic prostatitis”**, Ther Clin Risk Manag. 2007 Aug;3(4):507-12.
- Elberry AA, Mufti ST, Al-Maghrabi JA, Abdel-Sattar EA, Ashour OM, Ghareib SA, Mosli HA, **“Anti-inflammatory and antiproliferative activities of date palm pollen (*Phoenix dactylifera*) on experimentally-induced**

atypical prostatic hyperplasia in rats", J Inflamm (Lond). 2011 Dec 23; 8(1):40.

- Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Castillo-Tello P, Isaza-Brando CE, García ME, Castillo-León L, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C, **"Bovine dialyzable leukocyte extract modulates cytokines and nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated human blood cells"**, Cytotherapy. 2007;9(4):379-85.
- Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernández D, Zapata-Benavides P, Castillo-León L, Isaza-Brando C, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C, **"In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells"**, Cytotherapy. 2006;8(4):408-14.
- Franchimont, Louis, Dewe, Martens, **"Effects of dexamethasone on the profile of cytokine secretion in human whole blood cell cultures"**, Regulatory peptides 73 (1998), 59-65.
- Fujisawa T, Yamaguchi Y, Kimura H, Arita M, Baba M, Shiba M, **"Adjuvant immunotherapy of primary resected lung cancer with transfer factor"**, Cancer. 1984 Aug 15;54(4):663-9.
- Giri D, Ozen M, Ittmann M. **"Interleukin-6 is an autocrine growth factor in human prostate cancer"**; Am J Path 2001; 159: 2159–65.
- Goldstein R, Hanley C, Morris J, Cahill D, Chandra A, Harper P, Chowdhury S, Maher J, Burbridge S. **"Clinical investigation of the role of interleukin-4 and interleukin-13 in the evolution of prostate cancer"**, Cancers (Basel). 2011; 16; 3(4):4281-93.

- Handisurya H, Steiner G, Stix U, et al, **“Differential expression of interleukin-15, a proinflammatory cytokine and T-cell growth factor, and its receptor in human prostate”**, Prostate 2001; 49:251–62.
- Hobisch A, Eder IE, Putz T, et al, **“Interleukin-6 regulates prostate specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor”**; Cancer Res 1998;58:4640–5.
- Hou Y, DeVoss J, Dao V, Kwek S, Simko JP, McNeel DG, Anderson MS, Fong L, **“An aberrant prostate antigen-specific immune response causes prostatitis in mice and is associated with chronic prostatitis in humans”**, Clin Invest. 2009 Jul;119(7):2031-41.
- Kim HJ¹, Park JW, Cho YS, Cho CH, Kim JS, Shin HW, Chung DH, Kim SJ, Chun YS, **“Pathogenic role of HIF-1 α in prostate hyperplasia in the presence of chronic inflammation”**, Biochim Biophys Acta. 2013 Jan;1832(1):183-94.
- Kirkpatrick CH, Ottenson EA, Smith TK, Wells SA, Burdick JF, **“Reconstitution of defective cellular immunity with foetal thymus and dialysable transfer factor. Long-term studies in a patient with chronic mucocutaneous candidiasis”**, Clin Exp Immunol. 1976 Mar;23(3):414-28.
- Kramer G, Mitteregger D, Marberger M, **“Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease?”**, Eur Urol. 2007 May;51(5):1202-16. Epub 2006 Dec 11. Review.

- Krieger JN, Lee SW, Jeon J, Cheah PY, Liong ML, Riley DE, **“Epidemiology of prostatitis”**, Int J Antimicrob Agents. 2008 Feb;31 Suppl 1:S85-90. Epub 2007 Dec 31. Review.
- Liu KJ, Chatta GS, Twardzik DR, **“Identification of rat prostatic steroid-binding protein as a target antigen of experimental autoimmune prostatitis: implications for prostate cancer therapy.”** J Immunol 1997;159:472–80.
- Liu X, Goldstein AS, **“Inflammation promotes prostate differentiation”**, Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Feb 4; 111(5):1666-7. doi: 10.1073/pnas.1323181111. Epub 2014 Jan 23.
- Maccioni M, Rivero VE, Riera CM, **“Prostatein (or rat prostatic steroid binding protein) is a major autoantigen in experimental autoimmune prostatitis”**, Clin Exp Immunol. 1998 May;112(2):159-65.
- Mackern Oberti JP, Breser ML, Nuñez N, Maccioni M, Rodríguez N, Wantia N, Ertl T, Miethke T, Rivero VE, **“Chemokine response induced by Chlamydia trachomatis in prostate derived CD45+ and CD45- cells”**, Reproduction. 2011 Sep;142(3):427-37. doi: 10.1530/REP-11-0163. Epub 2011 Jul 5.
- Maza-Fernández ME, Vecchi-Martini E. **“History, overview and challenges of the breast cancer movement in Mexico”**, Salud Publica Mex. 2009;51 Suppl 2:s329-34.
- Meier CR, LoBuglio AF, **“Transfer factor: a potential agent for immunotherapy of cancer”**, World J Surg. 1977 Sep;1(5):617-23.

- Mendoza-Gamboa E, Franco-Molina MA, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P, Vera-García ME, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. **"Bovine dialyzable leukocyte extract modulates AP-1 DNA-binding activity and nuclear transcription factor expression in MCF-7 breast cancer cells."** *Cytotherapy*. 2008;10(2):212-9.
- Miličević N, Mrčela M, Galić J, Marjanović K, **"Expression of proinflammatory cytokine interleukin-6 in tissue samples of human prostate obtained by needle biopsy"**, *Pathol Res Pract*. 2015; 211(11):865-70.
- Motrich RD, Bresler ML, Sánchez LR, Godoy GJ, Prinz I, Rivero VE. **"IL-17 is not essential for inflammation and chronic pelvic pain development in an experimental model of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome"**, *Pain*. 2016 Mar;157(3):585-97.
- Motrich RD, Maccioni M, Riera CM, **"Autoimmune prostatitis: state of the art."** *Scand J. Immunol.*; 2007, 66:217.
- Motrich RD, Maccioni M, Ponce AA, Gatti GA, Oberti JP, Rivero VE, **"Pathogenic consequences in semen quality of an autoimmune response against the prostate gland: from animal models to human disease"**, *J Immunol*. 2006 Jul 15;177(2):957-67.
- Murphy SF, Schaeffer AJ, Done J, Wong L, Bell-Cohn A, Roman K, Cashy J, Ohlhausen M, Thumbikat P. **"IL17 Mediates Pelvic Pain in Experimental Autoimmune Prostatitis (EAP)"**, *PLoS One*. 2015 May 1;10(5):e0125623.

- Nijhuis E, Hinloopen B, van Duijn C, Hofman A, Rozing J, Nagelkerken L, **“Decreased sensitivity to dexamethasone in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease”**, Clin Immunol Immunopathol. 1994 Oct;73(1):45-52.
- Oettgen HF, Old LJ, Farrow JH, Valentine FT, Lawrence HS, Thomas L. ” **Effects of dialyzable transfer factor in patients with breast cancer”**, Proc Natl Acad Sci U S A. 1974 Jun;71(6):2319-23.
- Ojeda Ojeda M, Fernandez Ortega CB, Araña Rosáinz MJ, **“Dialysable leucocyte extract (DLE) reduces lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor secretion in human leucocytes”**, Biotherapy. 1996;9(1-3):163-70.
- Pace G, Di Massimo C, De Amicis D, Vicentini C, Ciancarelli M, **“Inflammation and endothelial activation in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer”**, Int Braz J Urol., 2011, 2011Sep-Oct;37(5):617-22.
- Pacheco-Rupil B, Depiante-Depaoli M, Casadio B. **“Experimental autoimmune damage to rat male accessory glands. II. T cell requirement in adoptive transfer of specific tissue damage”**. Am J Reprod Immunol. 1984 Jan-Feb;5(1):15-9.
- Penna G, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Mariani R, Sanvito F, Doglioni C, Adorini L. **“Treatment of experimental autoimmune prostatitis in nonobese diabetic mice by the vitamin D receptor agonist elocalcitol”**, J Immunol. 2006 Dec 15;177(12):8504-11.

- Pineda B, Estrada-Parra S, Pedraza-Medina B, Rodriguez-Ropon A, Pérez R, Arrieta O, “**Interstitial transfer factor as adjuvant immunotherapy for experimental glioma**”, J Exp Clin Cancer Res. 2005 Dec;24(4):575-83.
- Pizza G, De Vinci C, Cuzzocrea D, Menniti D, Aiello E, Maver P, Corrado G, Romagnoli P, Dragoni E, LoConte G, Riolo U, Palareti A, Zucchelli P, Fornarola V, Viza D, “**A preliminary report on the use of transfer factor for treating stage D3 hormone-unresponsive metastatic prostate cancer**”, Biotherapy. 1996;9(1-3):123-32.
- Pizza G, Viza D, Boucheix C, Corrado F. “**In vitro production of a transfer factor specific for transitional-cell carcinoma of the bladder**”, Br J Cancer. 1976 Jun; 33(6):606-11.
- Rivero V, Carnaud C, Riera CM. “**Prostatein or steroid binding protein (PSBP) induces experimental autoimmune prostatitis (EAP) in NOD mice**”. Clin Immunol. 2002 Nov;105(2):176-84.
- Rivero VE, Iribarren P, Riera CM, “**Mast cells in accessory glands of experimentally induced prostatitis in male Wistar rats**”, Clin Immunol Immunopathol. 1995 Mar;74(3):236-42.
- Royuela M, de Miguel MP, Ruiz A, Fraile B, Arenas MI, Romo E, Paniagua R, “**Interferon-gamma and its functional receptors overexpression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma: parallelism with c-myc and p53 expression**”, Eur Cytokine Netw. 2000; 11(1):119-27.

- Sabatos-Peyton CA, Verhagen J, Wraith DC, **“Antigen-specific immunotherapy of autoimmune and allergic diseases”**, Curr Opin Immunol. 2010 Oct;22(5):609-15. Epub 2010 Sep 17.
- Setiady YY, Ohno K, Samy ET, Bagavant H, Qiao H, Sharp C, She JX, Tung KS, **“Physiologic self antigens rapidly capacitate autoimmune disease-specific polyclonal CD4+ CD25+ regulatory T cells”**, Blood. 2006 Feb 1;107(3):1056-62. Epub 2005 Oct 13.
- Stanciková M, Rovenský J, Pekárek J, Orvický E, Blazícková S, Cech K. **“Influence of various forms of dialyzable leukocyte extracts on rat adjuvant arthritis.”** Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1994;42(4):295-9.
- Steiner GE, Stix U, Handisurya A, et al. **“Cytokene expression pattern in benign prostatic hyperplasia infiltrating T cells and impact of lymphocytic infiltration on cytokine mRNA profile in prostatic tissue”**, Lab Invest 2003;83:1131–46.
- Steiner GE, Djavan B, Kramer G, et al. **“The picture of the prostatic lymphokine network is becoming increasingly complex”**; Rev Urol 2002;4:171–7.
- Sugihara A, Maeda O, Tsuji M, Tsujimura T, Nakata Y, Akedo H, Kotake T, Terada N, **“Expression of cytokines enhancing the osteoclast activity, and parathyroid hormone-related protein in prostatic cancers before and after endocrine therapy: an immunohistochemical study”**, Oncol Rep. 1998;5(6):1389-94.

- Taguchi O, Kontani K, Ikeda H, Kezuka T, Takeuchi M, Takahashi T, Takahashi T, **“Tissue-specific suppressor T cells involved in self-tolerance are activated extrathymically by self-antigens”**, Immunology. 1994 Jul; 82(3):365-9.
- Taguchi O, Nishizuka Y, **“Self tolerance and localized autoimmunity. Mouse models of autoimmune disease that suggest tissue-specific suppressor T cells are involved in self tolerance”**, J Exp Med. 1987 Jan 1;165(1):146-56.
- Theyer G, Kramer G, Assmann I, et al. **“Phenotypic characterization of infiltrating leukocytes in BPH”**; Lab Invest 1992;66:96–107.
- Vykhovanets EV, Shukla S, MacLennan GT, Vykhovanets OV, Bodner DR, Gupta S. **“IL-1 beta-induced post-transition effect of NF-kappaB provides time-dependent wave of signals for initial phase of intrapostatic inflammation.”** Prostate. 2009 May 1;69 (6):633-43.
- Vykhovanets EV, Shukla S, MacLennan GT, Resnick MI, Carlsen H, Blomhoff R, Gupta S, **“Molecular imaging of NF-kappaB in prostate tissue after systemic administration of IL-1 beta”**, Prostate. 2008 Jan 1;68(1):34-41.
- Yoon BI¹, Bae WJ, Kim SJ, Kim HS, Ha US, Sohn DW, Hwang SY, Kim SW, **“The Anti-Inflammatory Effects of a New Herbal Formula (WSY-1075) in a Nonbacterial Prostatitis Rat Model”**, World J Mens Health. 2013 Aug; 31(2):150-6.

- Zdrodowska-Stefanow B, Ostaszewska-Puchalska I, Badyda J, Galewska Z, **“The evaluation of markers of prostatic inflammation and function of the prostate gland in patients with chronic prostatitis”**, Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2008 Jul-Aug;56(4):277-82. Epub 2008 Jul 29.

XII. Productos: Artículos reportados

International Scientific Indexing (ISI) Impact factor: 1.310

JCBPS; special Issue, Section C; 30 Nov. 2014 Vol. 4, No. 5, 25-32.

E- ISSN: 2249 -1929

Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences



An International Peer Review E-3 Journal of Sciences

Available online at www.jcbpsc.org

Section C: Medical and Pharmaceutical Biotechnology

CODEN (USA): JCBPAT

Research Article

Chronic Prostatitis / Chronic Pelvic Pain Syndrome: Histological Evidences of treatment with an Immunotherapeutic Agent in a Murine Model

Pérez-Alvarado Carlos Manuel², Ma del Consuelo Gómez García², Miguel Reyes López⁷,
Mario García Solís⁵, Elizabeth Pérez Hernández⁶, Carlos Adolfo Pérez de la Mora⁴, Bulmaro
Esteban Correa Meza⁴, Virginia Sánchez Monroy^{2,3}, Francisco Paz Bermudez⁸ and David
Guillermo Pérez Ishiwara^{1,2}.

¹ Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Instituto Politécnico Nacional. Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala, Doctorado en Biotecnología, Red de Investigación en Biotecnología IPN, México, DF.

² Programa Institucional de Biomedicina Molecular ENMyH; Instituto Politécnico Nacional, Guillermo Massieu Helguera No. 239, CP 07320, México, DF.

³ Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, UDEFA, Lomas de San Isidro, CP 11620, México, DF.

⁴ BIOEXPORT, Naranjos 129, Colonia Petrolera, Deleg. Azcapotzalco, CP 02840, México, DF.

⁵ Hospital regional de Tláhuac^b, Av. Dde la Turva No655, Col Villa Centro Americana y de Caribe Deleg. Tláhuac C.P. 13278, México, DF.

⁶ Hospital de ortopedia IMSS^c, Eje vial fortuna S/N y Av. IPN Col. Magdalena de las salinas^d Deleg. Gustavo A. Madero, C.P. 07320, México, DF.

⁷ Centro de Biotecnología Genómica-IPN, Blvd. del Maestro esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tam., México.

⁸ Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Del. G.A. Madero, Zacatenco, CP 07360, México, DF.

Abstract: Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS) has a strong autoimmune component and is the most important type of prostatitis in worldwide. Here,

using a modification of the murine model of experimental autoimmune prostatitis (EAP), we showed that besides an infiltrate of inflammatory cells in the prostatic tissue, animals developed benign prostatic hyperplasia. Different doses of immune regulatory agent were administered to experimental animals, observing that the dialyzable leukocyte extract (DLE) decreased the infiltrate of inflammatory and mast cells.

Key words: *autoimmune, prostatitis, Chronic Prostatitis, inflammation, Dialyzable leucocyte Extract*

INTRODUCTION

Prostatitis indicates an inflammation state of the prostate gland and comprises several syndromes¹. Chronic inflammatory prostatic disease of non- bacterial prostatitis (CP/CPPS) is difficult to diagnose and treat and it is the most common type of prostatitis. Epidemiological data suggest that its incidence exceeds the bacterial prostatitis, however, its etiology is unknown although an autoimmune origin is suggested. Moreover, the disease have been also associated in some cases with benign prostatic hyperplasia (BPH). Other evidences indicate that chronic prostatic inflammation could be related with prostatic cancer, which is the second cause of cancer-related deaths in males². Many reports indicated that inflammation may play a critical role in the proliferation and transformation of the luminal epithelium³ and many authors have emphasized the relevance of specific studies to determine the immunological mechanisms of prostate gland inflammation. Experiments done in animal models for experimental autoimmune prostatitis (EAP), date the possible molecular and cellular mechanisms involved⁴. Rivero and coworkers⁵, reported infiltrating mononuclear cells (MNC) approximately 7 days after priming, growing up rapidly 28 days later. Infiltrating MNC were located in the stroma of the prostate gland, surrounding the acini and very close to blood vessels. The presence of mast cells, hemorrhage, disorganization of tissue architecture and fibrosis were also typical features. Infiltrates consisted mainly of CD4+ and CD8+T cells. Many treatments for chronic prostatitis such as the receptor agonist BXL-628 (elocalcitol) of vitamin D, have been evaluated in different EAP models. Elocalcitol studies showed that 2 weeks of administration, significantly inhibits the intraprostatic inflammation, leading to an important reduction in the number of CD-4 and CD8-T cells, B cells, macrophages and dendritic cells⁶. In addition, BXL-628 inhibited the production of proinflammatory cytokines and chemokines⁷.

The objective of this work was to modify the EAP model developed for Motrich *et al.*¹ to induce a higher inflammatory process besides the induction of a prostatic hyperplasia to evaluate the putative effects of an immune modulatory agent in the chronic autoimmune prostatitis.

METHODS

Animals: Normal and immunized male Wistar rats of 3 months old, were used in this study. Another normal rats were used for the preparation of prostatic antigen for immunization.

Antigens preparation: Male sex accessories glands (RAG) excised from Wistar rats were homogenized in 0.01M PBS at pH 7.2 using protease inhibitors. The homogenate was centrifuged at 10000 g for 30 min and the supernatant was used them as RAG homogenate. For the immunization procedure, the RAG homogenate was chemically modified (MRAG) by coupling the RAG saline extract to diazonium derivate of sulphanilic and arsalinilic acids.

Immunization and treatment: Rats (n=33) were intradermal injected at day 0, then animals were intraperitoneal injected at day 15 and finally rats were again intradermal injected at day 30. The immunization was doing with 5 mg of MRAG emulsified with 0.5ml of Freund's complete adjuvant (FCA). After second immunization we administrated dexamethasone (Dex 0.15mg/kg/day), DLE (1u) or placebo. A control group with the pathology without treatment and a normal group (without immunization) were included. The rats were sacrificed after 34 days and prostatic tissue was obtained.

Histopathology analyses: Prostates from immunized and control rats were studied by light microscopy. At necropsy, the prostate was separated from the adjacent tissues and weighted. The specimens were immediately placed in 10% formalin for at least 24h, dehydrated in alcohol, cleared in xilol, and embedded in paraffin. The glands were sectioned at 5 μ m. After cutting, the sections were stained with hematoxylin-eosin. For identification of mast cells, sections were stained in toluidine blue at pH 3.5. The slides were examined and scored by 2 experienced pathologists independently. The inflammatory cells were quantified as density per unit area by randomly counting on 10 spots under high- power fields (HPF, 400x magnification). Every slide had 2 values, and the mean of the 2 values was the final score for the slide. The mean of the 4 slides scores in given prostate was the final score for each prostate.

RESULTS AND DISCUSSION

The use of two different pathways for immunization produced two different kind of signs together: we found signs of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH), like the increase of glandular and fibro muscular cells; and also a very important infiltration of inflammatory cells, which have not been reported previously in similar models of EAP (Figure 1. Panel A). This results could be due the pro-inflammatory micro-environment generated, inducing stromal hyper proliferation and tissue remodeling with a local hypoxia induced by increased oxygen demands of proliferating cells. This support the chronic inflammation as a source of oxidative stress, leading to tissue injury in infiltrating area^{8,9}. Moreover, the constant prostatic inflammation also has been associated with prostate intraepithelial neoplasia and prostate cancer^{1,9}. Analysis of prostate needle biopsies from patients suspected of prostate cancer revealed an important association between chronic inflammation and prostate epithelial malignant changes¹. Taking in consideration these studies, the animals with the pathology but without treatment could be developed other pathologies like BPH. Studies in other murine models suggest that these conditions could evolve in other more serious diseases like prostatic cancer^{1,8}.

In hematoxylin-eosin staining, we observed in the group without treatment a considerable amount of inflammatory cells (Figure 1. Panel A and B) like in other murine models of EAP, where is reported that immunization of rats or mice with prostate gland extracts produce infiltration of inflammatory cells^{10,11}. It is known that the infiltrate of inflammatory cells present in this model of EAP are mainly T-cells CD-4 and CD-8. Some studies shown that T-cell in EAP could produce IFN- γ , IL-6, IL-17 and other pro-inflammatory cytokines that have an essential role in disease induction, perpetuation and evolution of the prostatitis^{9,12}. The cytokine production may contribute to local growth factor production and angiogenesis in the prostatic tissue¹³.

In general, after treatment of animals with the different doses schemes, we observed a significantly decrease in the inflammatory infiltrates in the groups treated with DLE (1.3 cell per HPF) compared with the pathologic group (3 cell for HPF) and placebo group (5.6 cell for HPF) (Figure 1, panel B). In concordance with the studies that shown beneficial effects of DLE in some autoimmune diseases like thrombocytopenic

purple¹⁴ and allergies; the DLE also show beneficial effects in different kinds of cancer, for example breast¹⁵ and prostatic cancer¹⁶. In this work non-treated animal groups showed significantly more inflammatory infiltrate, compared to that of groups treated with dexamethasone (1.9 cell for HPF) and DLE (Figure 1 and 2). *t* Student analysis showed significant differences between experimental and control groups ($p=0.05$).

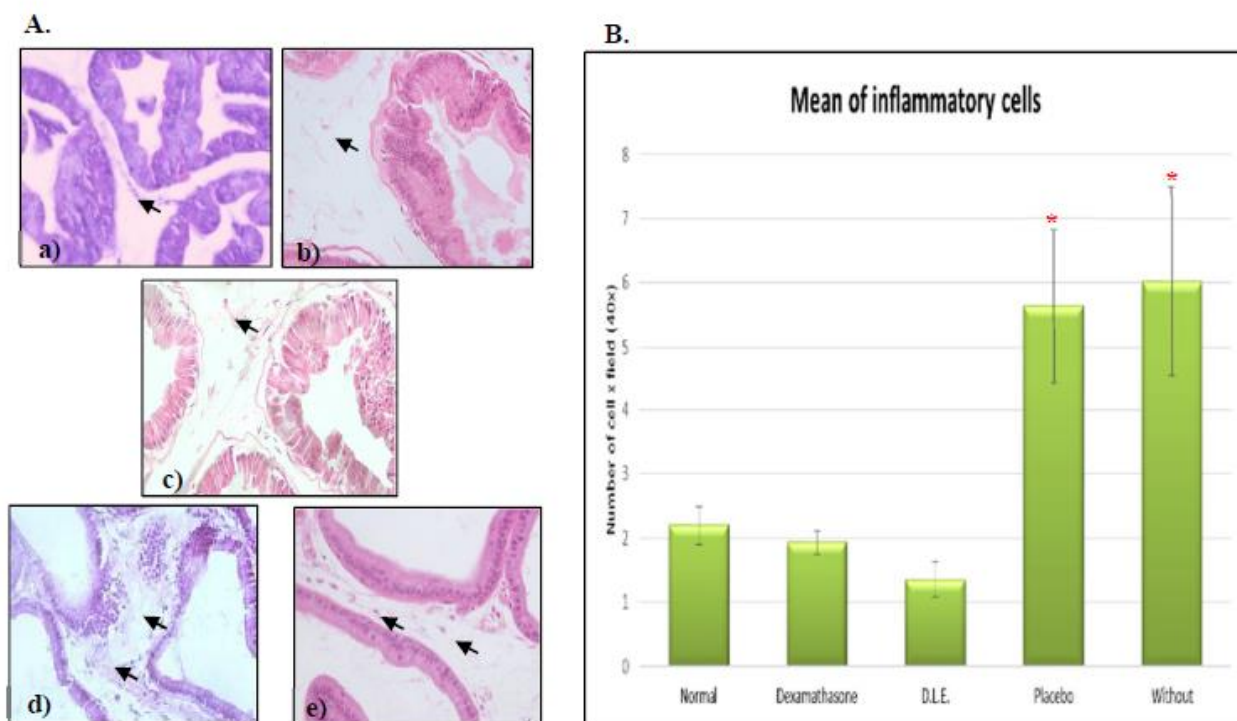


Figure 1: A. Hematoxiline-eosine staining. The arrows indicate inflammatory cells. a) Normal group, b) Dexamethasone group, c) DLE group, d) Placebo group and e) non-treated group, B. Graphic of the mean of inflammatory cell for high- power field in each treated group. * Statiditically significantly differences ($p=0.05$).

On the other hand, we also observed an increment of mast cell in the non-treated group (2.9 cells for HPF). This is consistent with findings of other authors like Rivero *et al.*⁵ in 1997 (Figure 2. Panel A) The mast cell is considered an integrator or amplifier of autoimmune responses, it has been involved in the breakdown of immune tolerance and/or autoimmune activation and recognition of different tissue, like prostatic tissue¹⁷. Evidences indicate that mast cells are activated via the complement pathway but are known to be activated also directly by T cells¹⁸. Activate mast cell secrete pro-inflammatory and nociceptive mediators that include histamine, cytokines and proteolytic enzymes, promoting the perpetuation of the inflammatory microenvironment and pelvic pain¹⁹. For example, in CPPS is observed that the synthesis of Neural Grown Factor (NGF) correlated with the presence of mast cell in prostatic nerves, linking mast cells to chronic pain^{6, 18, 20}. Moreover the amount of mast cell in non- treated group was similar to 2.9 mast cells for HPF observed by Papadoukakis *et al.*²¹, who found benign prostatic hyperplasia, reinforcing our observation that prostatic rat tissue showed inflammation and prostatic hyperplasia²¹. Mast cells have also been linked to prostate cancer; evidences indicate that those cells could regulate angiogenesis, tissue remodeling, and immunomodulation in human and murine cancer; however mores investigations are necessary¹⁷.

In the DLE group the amount of mast cells (1.93 cell for HPF) decrease significantly compared with the amount of cells presented in non- treated group (2.9 cell for HPF) and in the group treated with placebo (4.4 cell for HPF) (Figure 2. Panel B). Furthermore DLE group did not show statistically significant differences with dexamethasone group (1.8 cell for HPF) (Figure 2. Panel B). Besides DLE and dexamethasone groups did not show statistically significant differences with the normal group (Figure 2. Panel B). In contrast, in the placebo group was observed more inflammatory cells that the others groups. The effect of DLE could modify the perpetuation of inflammatory process in prostatic tissue, suggesting that it could induce the return to the autoimmune tolerance or the reduction of autoimmune activation.

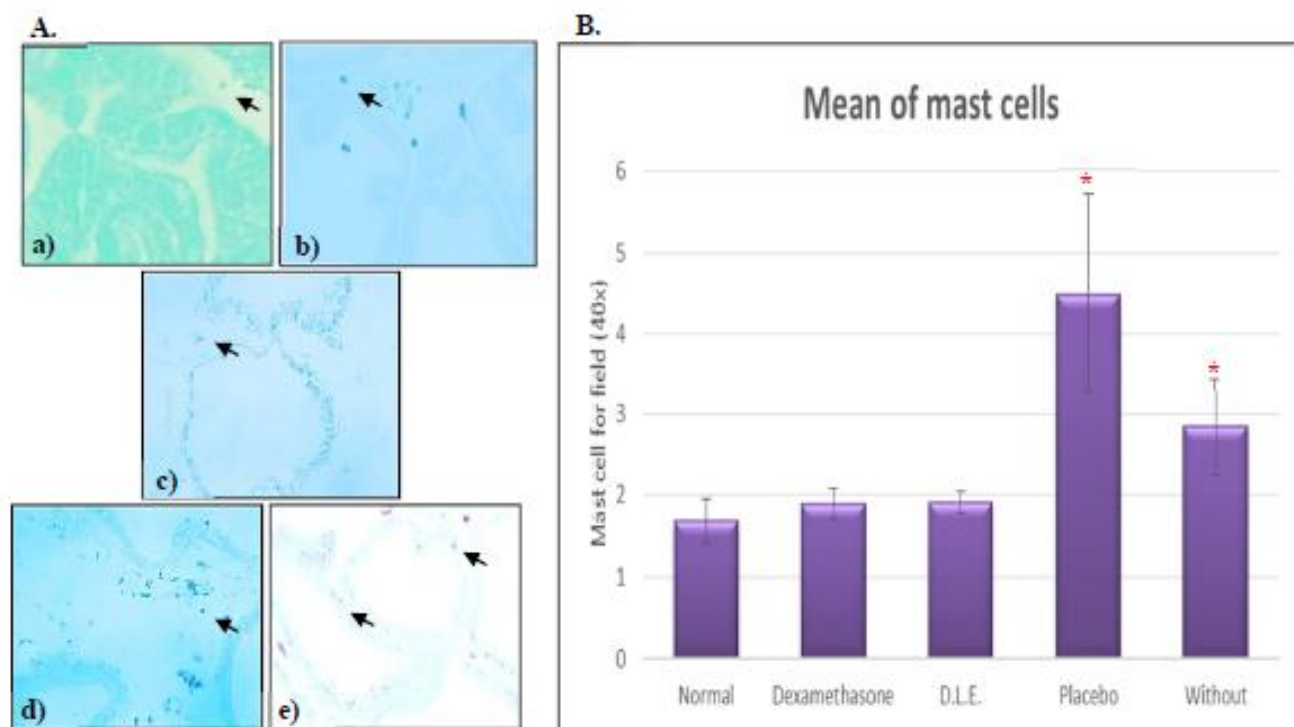


Figure 2: A. Toluidine blue staining. The arrows indicate inflammatory cells. a) Normal group, b) Dexamethasone group, c) DLE group, d) Placebo group and e) non-treated group, B. Graphic of the mean of mast cell for high- power field in each treated group. * Statistically significant differences ($p=0.05$).

CONCLUSIONS

The method of EAP developed in this work presented signs of prostatic inflammation and moreover BPH.

It presents a notorious infiltrate of inflammatory cells, particularly mast cell. It was observed that DLE could decrease the signs of inflammation, it reduce the infiltrate of inflammatory cells, particularly of mast cells and diminish the hyperplasia process.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is funded by the CONACyT and SIP-IPN given to C.G.C and G.P.I.

REFERENCES

1. R.D. Motrich, M. Maccioni, C.M. Riera, V.E. Rivero, Autoimmune prostatitis: state of the art, *Scand J Immunol.* Aug-Sep, 2007, 66(2-3):217-27. Review.
2. J. Jiang, J. Li, Z. Yunxia, H. Zhu, J. Liu, C. Pumill. The role of prostatitis in prostate cancer: meta-analysis, *PLoS One*, 2013, 2013 Dec 31; 8(12):e85179.
3. A. Goldstein, O. Witte. Does the microenvironment influence the cell types of origin for prostate cancer?, *Genes Dev*, 2013, Jul 15;27(14):1539-44.
4. M. Maccioni, V. Rivero, C. Riera, Prostatein (or rat prostatic steroid binding protein) is a major autoantigen in experimental autoimmune prostatitis, *Clin Exp Immunol.* May, 1998, 112(2):159-65.
5. V.E. Rivero, P. Iribarren, C.M. Riera. Mast cells in accessory glands of experimentally induced prostatitis in male Wistar rats, *Clin Immunol Immunopathol.* Mar, 1995, 74(3):236-42.[20]
6. L. Miller, K. Fischer, S. Goralnick, M. Litt, J. Burleson, P. Albertsen, D. Kreutzer, Nerve growth factor and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome, *Urology*, 2002, Apr;59(4):603-8.
7. L. Adorini, G. Penna, S. Amuchastegui, C. Cossetti, F. Aquilano, R. Mariani, B. Fibbi, A. Morelli, M. Uskokovic, E. Colli, M. Maggi. Inhibition of prostate growth and inflammation by the vitamin D receptor agonist BXL-628 (elocalcitol), *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007 Mar;103(3-5):689-93. Epub, 2007, 2007 Jan 22.
8. G. Kramer, D. Mitteregger, M. Marberger. Is benign prostatic hyperplasia(BPH) an immune inflammatory disease? *Eur Urol.* 2007 May, 51(5):1202-16. Epub 2006 Dec 11. Review.
9. G. Pace, C. Di Massimo, D. De Amicis, C. Vicentini, M. Ciancarelli, Inflammation and endothelial activation in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer, *Int Braz J Urol.*, 2011, 2011Sep-Oct;37(5):617-22.
10. G. Palapattu, S. Sutcliffe, P.J. Bastian, E. Platz, A. De Marzo, W. Isaacs, W. Nelson. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights, *Carcinogenesis.* Jul; 26(7):1170-81. Epub 2004 Oct 21. Review. .
11. G. Penna, S. Amuchastegui, C. Cossetti, F. Aquilano, R. Mariani, N. Giarratana, E. De Carli, B. Fibbi, L. Adorini. Spontaneous and prostatic steroid binding protein peptide-induced autoimmune prostatitis in the nonobese diabetic mouse, *J Immunol.* Aug, 2007, 1; 179 (3):1559-67.
12. J. Schenk, A. Kristal, M. Neuhaus, C. Tangen, E. White, D. Lin, M. Kratz. Thompson IM, Biomarkers of systemic inflammation and risk of incident, symptomatic benign prostatic hyperplasia: results from the prostate cancer prevention trial, *Am J Epidemiol*, 2010, Mar 1; 171(5):571-82.
13. B. Chughtai, R. Lee, A. Te, S. Kaplan. Role of inflammation in benign prostatic hyperplasia, *Rev Urol.*, 2011, 13(3):147-50.
14. W. Borkowsky, S. Karpatkin. Leukocyte migration inhibition of buffy coats from patients with autoimmune thrombocytopenic purpura when exposed to normal platelets: modulation by transfer factor, *Blood.* Jan; 1984, 63(1):83-7.
15. H. Oettgen, L. Old, J. Farrow, F. Valentine, H. Lawrence, L. Thomas. Effects of dialyzable transfer factor in patients with breast cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1974, Jun;71(6):2319-23.
16. G. Pizza, C. De Vinci, D. Cuzzocrea, D. Menniti, E. Aiello, P. Maver, G. Corrado, P. Romagnoli, E. Dragoni, G. LoConte, U. Riolo, A. Palareti, P. Zucchelli, V. Fornarola, D. Viza, A preliminary report on the use of transfer factor for treating stage D3 hormone-unresponsive metastatic prostate cancer, *Biotherapy*, 1996, 9(1-3):123-32.

17. G. Taverna, G. Giusti, M. Seveso, R. Hurle, P. Colombo, S. Stifter, F. Grizzi. Mast cells as a potential prognostic marker in prostate cancer, *Dis Markers*;35(6):711-20. doi: 10.1155/2013/478303. Epub 2013 Nov 11. Review.
18. J.D. Done, C.N. Rudick, M.L. Quick, A.J. Schaeffer, P. Thumbikat. Role_of_mast cells_in male chronic pelvic pain, *J Urol*. 2012 Apr; 187(4):1473-82. doi: 10.1016/j.juro.2011.11.116. Epub Feb 17.
19. T.C. Theoharides, D.E. Cochrane. Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress, *J Neuroimmunol*. Jan, 2004, 146(1-2):1-12. Review.
20. K. Horigome, J.C. Pryor, E. Bullock, E. Johnson. Mediator release from_mast cells_by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation, *J Biol Chem*, 1993, Jul 15; 268(20):14881-7.
21. S. Papadoukakis, A. Kyroudi-Voulgari, M. Truss, D. Perea, D. Mitropoulos. Quantitative study of mast cells in experimentally induced benign prostatic_hyperplasia, *Urol Int*. 2010; 84(1):100-4.

*** Corresponding author: Guillermo Pérez**

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Instituto Politécnico Nacional.
Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala, Doctorado en Biotecnología, Red de Investigación
en Biotecnología IPN, México, DF. ishiwaramx@yahoo.com.mx,
qfb_carlosalvarado@hotmail.com

BioMed Internatinal Research (IF:2.147) In press

Dear Dr. Pérez,

The review process of Research Article 1832853 titled "Anti-inflammatory effect of dialyzable leukocyte extract in autoimmune prostatitis: evaluation in animal model " by Carlos Pérez, María del Consuelo Gomez-García, Miguel Reyes, Mario Garcia Solis, Elizabeth Pérez, Carlos Pérez de la Mora, Virginia Sánchez Monroy and David Guillermo Pérez-Ishiwara submitted to BioMed Research International has been completed. I am pleased to inform you that your manuscript has now been accepted for publication in the journal.

The publication process of your manuscript will be initiated upon the receipt of electronic files. Please log in to the Manuscript Tracking System at the link below using your username and password, and upload the electronic files of your final accepted version within the next 2-3 days.

<http://mts.hindawi.com/author/1832853/upload.files/>

The electronic files should include the following:

- 1- Source file of the final accepted manuscript (Word or TeX/LaTeX).
- 2- PDF file of the final accepted manuscript.
- 3- Editable figure files (each figure in a separate EPS/PostScript/Word file) if any, taking into consideration that TIFF, JPG, JPEG, BMP formats are not editable.

Thank you again for submitting your manuscript to BioMed Research International.

Best regards,

Humberto H. Lara

**Anti-inflammatory effect of dialyzable leukocyte extract in autoimmune prostatitis: evaluation in
animal model**

**Carlos Pérez-Alvarado¹, Consuelo Gómez¹, Miguel Reyes², Mario García³, Elizabeth Pérez⁴, Carlos
Pérez de la Mora⁵, Virginia Sanchez⁶, and Guillermo Pérez^{1†}.**

¹ENMyH, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

²CBG, Instituto Politécnico Nacional, Cd. Reynosa, Tam., México.

³Hospital General Milpa Alta, Ciudad de México.

⁴Hospital de Traumatología IMSS, Ciudad de México.

⁵Farmainmune, Ciudad de México.

⁶Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Ciudad de México.

†Correspondence: ENMyH, Instituto Politécnico Nacional, Guillermo Massieu Helguera, No 239, Fracc. La escalera, Ticomán, Ciudad de México. Telephone: (+52) 55-57-29-60-00 ext. 55539 e-mail: ishiwaramx@yahoo.com.mx

Objective. To evaluate the anti-inflammatory properties of Dialyzable Leukocyte Extract (DLE) in a murine model of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS). *Methods.* Histopathological characterization, Prostatein Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay and immunohistochemical analysis for CD45, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17 and IL-4 molecules were done in prostatic Wistar rats treated with DLE, placebo or dexamethasone. *Results.* Histopathological analysis of animals induced to prostatitis showed inflammatory infiltrate, mainly constituted by leucocytes and mast cells as well as Benign Prostatic Hyperplasia. Serum prostatein concentrations were 14 times higher than those displayed by healthy animals. After DLE and Dexamethasone treatments, the inflammatory infiltrate decreased; the tissue morphology was similar to that of a normal prostate, and the prostatein decreased to the basal levels of healthy animals. DLE treatment produced a decreased expression of the cell surface marker CD45 and the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-17. On the other hand, the expression of anti-inflammatory cytokine IL-4 increased in both the Dexamethasone and DLE groups. *Conclusion.* DLE is able to modulate the inflammatory response in Experimental Autoimmune Prostatitis (EAP).

Key words: *Inflammation, Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome, Autoimmune, Dialyzable Leukocyte Extract.*

1. Introduction

Prostatitis affects 10-20% of men from all ages and ethnic groups. The chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS) comprises more than 90% of all cases [1, 2]. The etiological mechanism remains unclear, with complex clinical symptoms and recurrent episodes. Several authors suggest that CP/CPPS could be related with an autoimmune response [1]. Ludwig et al have reported that T and B cells, granulocytes and macrophages were found in semen and other expressed prostate secretions from CP/CPPS patients without infection [3]. On the other hand, Maccioni *et al* found self-antigen specific IgG in sera from rats with CP/CPPS [4]. Furthermore, in a murine model of prostatitis, prostate-specific auto-antibodies as well as NO, TNF- α , and IFN- γ in seminal plasma were elevated [5]. All these data suggest that CP/CPPS may have, in part, autoimmune etiopathogenic features that involve an immune response against prostate specific antigens, thereby tending to prolong a chronic inflammation status [5, 6]. The constant inflammation in chronic prostatitis could be related with Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) development or even more to Prostatic Cancer (PC) [1].

Prostatitis therapies have been based on the use of antibiotics and anti-inflammatory drugs, although alpha-blockers, 5-alpha reductase inhibitors and some immunotherapeutic agents have also been used [1, 2]. Due to the undesirable side effects caused by conventional prostatitis treatments, many researchers have sought other agents that could regulate the immune response. For example, Elocalcitol, a vitamin D receptor agonist, decreases the inflammatory process by diminishing the expression of IFN- γ and IL-17 and by inhibiting CD4+ and CD8+ prostate infiltrate in a murine model [7]. Dialyzable leukocyte extract (DLE) has been used for the treatment of many inflammatory diseases, like osteoarthritis [8], autoimmune [9], bacterial [10] and viral diseases [11] among others. Pizza *et al.* in 1996 showed that DLE promoted cancer remissions and increased the survival of prostatic cancer patients [12]. Here, we report using a modified Experimental Autoimmune Prostatitis model [13], the effects of DLE treatment in autoimmune prostatitis

through histopathological analysis, the detection of prostatein by Enzyme-Linked Immuno Sorbent (ELISA) and immunohistochemical staining for anti- and pro-inflammatory cytokines.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals. 3-month-old male Wistar rats were maintained under specific pathogen-free conditions at room temperature and a 12-h/12-h light/dark cycle. Experimental procedures with the animals were approved by the Bioethics and Biosecurity Committee from Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN.

2.2 Prostatic antigens preparation. Male sex accessory glands (RAG) were excised from ten rats and homogenized in a pyrex homogenizer by using 0.01M PBS at pH 7.2, in the presence of protease inhibitors (Roche 0469311600 Complete; Mannheim, Germany). The homogenate was centrifuged at 10000 g for 30 min and the supernatant was then used as RAG homogenate. Finally, the RAG homogenate was chemically modified (MRAG) by coupling the RAG saline extract to a diazonium derivate of sulphanilic (0.0865 g) and arsanilic (0.1085 g) acids.

2.3 Immunization and treatments. Rats ($n=25$) were MRAG intradermal injected at day 0, then, the animals received intraperitoneal injections at day 15, followed by another intradermal injection at day 30. The immunizations were done with 5 mg of MRAG emulsified with 0.5 ml of Freund's complete adjuvant (FCA). After the second immunization (15 days), groups of 5 animals were formed and treated by oral administration with DLE, dializable leucocyte extract from *Cocodrillus moreletii* [8], (37.5mg/Kg/day) (DLE group), dexamethasone (0.15mg/kg/day) (Dexamethasone group) or Glycine (50 mg/kg/day) (Placebo group), daily during 34 days. A control group with the pathology without any treatment (WOT group) and a healthy group of rats that did not receive any kind of manipulation (Normal group) were included. All the rats were sacrificed at day 34 to obtain prostatic tissue and serum."

2.4 Histopathological analyses. The prostates of animals from all groups were dissected and sections were fixed in 10% formalin, dehydrated in alcohol, cleared in xilol, and embedded in paraffin. Five μm sections were cut and stained with hematoxylin-eosin or toluidine blue at pH 3.5. Slides were examined and scored by 2 experienced pathologists, independently. Inflammatory cells were counted in 10 aleatory fields under high-power fields (HPF, 400x magnification), and the values of 5 slides per group were averaged.

2.5 *ELISA*. Serum prostatein concentrations were determined by using an ELISA kit assay (SEE174Hu; Uscn, Wuhan, China) according to the manufacturer's instructions. Briefly, multiwall plates were coated with 100 µl per well of LIPB standard solution or serum samples obtained from animals, incubated at 37° C for 2 h and washed with washing solution. Solution A was added, incubated at 37° C for 1 h and washed again. Then, solution B was added, incubated at 37° C for 30 min and washed. Ninety µl of substrate solution were added and incubated at 37° C for 30 min. Finally, 50 µl of stop solution were added. Absorbances were measured at 450 nm. The samples were analyzed in triplicate and the mean concentrations were calculated. The sensitivity limit of the method was 0.114 ng/mL.”

2.6 *Immunohistochemistry assays*. Prostatic sections were fixed overnight in a 10% buffered paraformaldehyde solution. The tissues were ethanol-dehydrated and embedded in paraffin wax. Sections of 5 µm were cut with microtome, deparaffinized at 70°C for 20 min, incubated 5 minutes each in xylene; ethanol-xylene and 100% ethanol. Finally, the samples were washed with distilled water to be processed for immunohistochemical analysis. Immunolabeling was done by using Mouse/ Rabbit polydetector plus HRP/DAB (BSB 0259; BioSB) kit according to the manufacturer's instructions. The antibodies used were TNF-α (50µg/mL) (Abcam 1793; Massachusetts, USA), IFN-γ (50µg/mL)(Abcam 7740; Massachusetts, USA) , CD-45, (1µg/mL)(Abcam 10558, Massachusetts, USA), IL-17 (1µg/mL) (Abcam 79056, Massachusetts, USA), IL-6 (74 µg/mL) (Abcam 6672; Massachusetts, USA), IL-4 (0.5µg/ml) (Abcam 11524; Massachusetts, USA) and PCNA (100 µg/mL) (Santa Cruz-53407, Texas, USA). After the immunohistochemistry procedure, microphotographs were taken and the relative expression percentages were semiquantified in the Image Pro Premier software 9.1.

2.7 *Statistical analysis*. Data were expressed as the mean ± standard deviation (SD) of the indicated numbers of samples. One way ANOVA and Tukey's multiple comparison Test were used to assess changes in the levels of prostatein and in the expression percentage of the different cytokines. Two-tailed tests were used for all processes, and p values ≤ 0.05 were considered statistically significant. The analysis was done with Graph Pad Prism 6.

3. RESULTS

3.1 *DLE decreases BPH and inflammatory cells.* Hematoxylin-eosin staining and histological analysis of the prostate showed few changes in prostatic urethra, showing only a little urothelial metaplasia of prostatic acinar epithelium and a faint fibrosis in the prostatic area adjacent to the seminal vesicles (data not shown). However, in the subcapsular peripheral zone we observed the histological and morphological changes, such as inflammatory infiltration and hyperplasia, so we decided to focus our analysis in this area.

In non-pathological group hematoxylin-eosin staining showed that this group displayed normal prostatic histology characterized by alveolar glands of regular size and form; a clear basal membrane lined by a tall columnar epithelium (Fig. 1a). Few inflammatory and mast cells were observed (approximately 2 cells per HPF) (Fig. 1b). In the pathological group without treatment (WOT), or in the placebo group, we observed hyperplasia of glandular structures with a thickened basal membrane, coated with a cellular hypertrophic epithelium (Fig. 1a). Besides, an infiltrate of inflammatory cells, from 3.03 to 5.64 cells per HPF, respectively, were found (Fig. 1b). The presence of inflammatory cells in the WOT and placebo groups was significantly higher in comparison with normal group. On the other hand, prostatic tissue from the Dexamethasone treated group showed slightly hypertrophic epithelium and glands with a thick basal membrane and edema in the extracellular matrix, with an infiltrate of 1.94 cells per HPF on the average. In DLE treated group the architecture of the prostatic tissue showed glands with a regular size and shape with a thin basal cell membrane similar to the tissue of normal animals, and with 1.38 inflammatory cells per HPF on the average. Cellular infiltrate in the Dexamethasone and DLE treated groups was statistically lower than in the WOT and placebo treated ones.

Toluidine Blue staining showed that in the non-pathological group the amount of mast cells was of 1.64 cells per HPF, while in the WOT and placebo treated groups there were 4.49 and 3.47 cells per HPF, respectively. Instead, the DLE and Dexamethasone treated groups showed a decreased amount of mast cells compared to the WOT group, displaying an average of 1.88 and 1.93 cells per HPF, respectively (Fig. 1b). Statistical analysis showed that the decrease in mast cell numbers was significant in the DLE and Dexamethasone groups in contrast with the WOT and placebo groups (Fig. 1b).

3.2 The DLE decrease the Prostatein Serum Levels. Prostatein serum concentrations showed that the normal concentration in non-pathological animals was 0.22 ng/ml (± 0.06). Whereas WOT animals or animals with the pathology treated with placebo displayed 3.1 ng/ml and 2.4 ng/ml, respectively, representing a 14.09 and 10.9 fold excess, over healthy animals. In contrast, the groups treated with dexamethasone, and interestingly those treated with DLE displayed an important reduction; 0.04 ng/ml or non-detectable concentrations, respectively (Fig. 2).

3.3 DLE decreases cell proliferation. Fig. 3 shows the immunohistochemical analysis of the PCNA cell proliferation marker. In normal tissue we observed a clear basal membrane constituted only by a lined tall columnar epithelium; in contrast, in the WOT and placebo groups we observed a pseudostratified epithelium and hyperplasia (Fig. 3a). On the other hand in the Dexamethasone and DLE groups we noted a monolayer of columnar epithelium similar to that in the normal group (Fig. 3a). Semi-quantification of the PCNA marker indicated that in the normal group we observed a 2.72% expression rate; in contrast, animals from the WOT and placebo groups displayed 5.03% and 5.9%, respectively (Fig. 3b). On the other hand, the Dexamethasone group displayed a PCNA expression rate of 3.5%, while animals from the DLE group showed a diminished PCNA expression (1.7%) which is statistically different in contrast to the WOT group (Fig. 3b).

3.4 DLE decreased the expression of CD-45, TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-17. CD45 is located in leucocytes and some investigations also reported that prostatic cells could express it [17]. In human BPH, Adegun, *et al*, 2013; found CD45 in the epithelium of the gland, staining it very strongly [17]. Here we found that in a normal epithelium we observed a low signal of CD45 in the apical region of the gland (Fig. 4a). The WOT and placebo groups showed an intense immunohistochemical signal in the basal and luminal region (Fig. 4a). The signal of this marker in the Dexamethasone and DLE treated groups was diffuse in the apical glandular region and like the one we observed in the normal group (Fig. 4a). Making a distribution analysis along ten aleatory zones in prostatic tissue, we found a basal staining rate (2.34%) in non-pathological animals, while animals with prostatitis WOT or from placebo groups displayed 7.25% and 12.36% ($P < 0.05$), respectively (Fig. 4b). The animals from the dexamethasone treated group did not show a significant difference in the CD45 rate of expression (5.94%) when we compare them with those from the WOT group. In contrast, the

animals treated with DLE, displayed a statistically significant reduction in the CD45 expression (0.86%) (Fig. 4b).

TNF- α is expressed in the cell membrane of T cells, fibroblasts, macrophages, mast cells, and could spread to the glandular epithelium [18]. Sugihara *et al*, showed that TNF- α was detected by immunohistochemical staining in the cytoplasm of the epithelium of non-cancerous prostatic human glands and also in epithelium of prostatic cancer glands [19]. We observed here in normal group a weak signal in the apical glandular region of the glandular epithelium (Fig. 4a). The WOT group showed an intense but diffuse signal and in the placebo treated group the signal increased in the luminal and basal regions (Fig. 4a). In the Dexamethasone and DLE treated groups the signal decreased in comparison with the signal presented in the WOT and placebo treated groups (Fig. 4a). Semiquantification showed a 3.94% expression in the normal group, which was significantly lower than the expression showed in the WOT (7.11%) or in the placebo (6.91%) animals (Fig. 4b). The Dexamethasone treated group had a 5.83% expression rate, which was increased statistically to that of the WOT group. The animals treated with DLE, displayed a 1.5% expression rate, which was significantly lower than in the other groups (Fig. 4b).

IFN- γ is expressed in T cells, mast cells and fibroblasts and is also expressed in basal and epithelial prostatic cells [20]. Royuela, *et al*, 2000 indicated that IFN- γ was also expressed by immunohistochemistry in basal cells of the prostatic epithelium and in some stromal cells. Its expression was higher in both, basal and columnar epithelial cells in specimens with BPH and cancer [20]. In our study we observed that the normal group showed the signal for this molecule in the rim of the glandular epithelium (Fig. 4a). In the WOT and placebo groups we observed a more intense but diffuse immunohistochemical signal in the luminal and basal glandular regions (Fig. 4a). In the Dexamethasone and DLE treated groups we noted a diffuse and weak signal of this marker in the luminal and basal regions (Fig. 4a). In the semiquantification analysis, we observed in the normal group that the IFN- γ expression was of 1.4%, while in the WOT it was higher (3.5%), and in the placebo group the expression was 1.1% (Fig. 4b). On the other hand, the groups treated with Dexamethasone and DLE showed similar expression (2.1%) with no statistical differences from the healthy group (Fig. 4b).

IL-6 is expressed principally in T cells, fibroblast, macrophages and mast cells; however, it could also be detected interacting with its receptor in prostatic cells [21]. Milicevic, *et al* in 2015, showed that IL-6 is

expressed in epithelial and basal prostatic cells from normal, prostatic, BPH and in premalignant and malignant epithelial cells as well as in some stromal cells [22]. Here, the healthy group showed a spotted IL-6 signal distribution in basal and luminal regions (Fig. 4a). In the WOT and placebo groups we observed an increased expression area, detecting a diffuse signal in basal and luminal regions (Fig. 4a). On the other hand, the Dexamethasone and DLE treated groups showed a smaller area in basal and luminal regions (Fig. 4a). Semiquantification showed an expression rate of 2.43% in the normal group. In contrast, the WOT and placebo groups displayed 6.72 and 8.82% respectively (Fig. 4b). However the application of Dexamethasone and DLE treatments diminished the IL-6 expression area to 3.23% and 2.97%, respectively (Fig. 4b).

IL-17 is expressed in T cells and mast cells principally, and could also interact with its receptor in prostatic cells [23]. Moseley and coworkers indicated that in current versions of the EST database some isoforms of IL-17 are expressed in the prostate [24]. Other authors also demonstrated by immunohistochemistry that IL-17 increases its expression in both, stromal and epithelial tissue of the dorsolateral prostate in a murine prostatitis model [25]. In our case we observed in normal group an IL-17 signal in basal and luminal glandular regions (Fig. 4a). The WOT and placebo groups also showing an intense signal in said regions (Fig. 4a). In the Dexamethasone group we again observed a signal of this marker in the basal and luminal region, whereas the DLE treated group showed the signal for IL-17 with a frosted pattern (Fig. 4a). However, in the semi-quantitative analysis of this molecule, we didn't observe any significantly differences of expression among the non-pathological (10.6%), WOT (11.49%), placebo (11.49%), Dexamethasone (12.03%), and DLE (7.52%) groups ($P=0.5$) (Fig. 4b).

3.5 DLE increased the expression of anti-inflammatory IL-4. Finally, IL-4 is expressed in T cell and mast cells and it could also be detected associated with its receptor in prostatic cells [26]. Goldstein and co-orkers, 2011 showed a different immunoreactivity of IL-4 in prostatic cells of BPH and prostatic cancer. Analysis of benign and malignant prostate tissues demonstrated that the source of IL-4 is the epithelial cells rather than infiltrating leukocyte [27]. In the normal group we observed a glandular epithelium with cellular monolayer and an IL-4 signal in the basal area, while in the WOT and placebo groups we observed hyperplastic and hypertrophic regions and a poor IL-4 expression in the luminal region (Fig. 5a). In the Dexamethasone and DLE groups we observed glandular tissue morphology similar to that of the normal group and an increased

IL-4 signal in luminal and basal glandular areas (Fig. 5a). Semiquantitative analysis showed 0.76% of expression in the normal group which was statistically similar to that expressed in the WOT and placebo groups (0.76 and 0.36% respectively) (Fig. 5b). In contrast, in the groups treated with Dexamethasone (2.05%) and DLE (1.76%), we observed a significant increase in IL-4 expression ($P < 0.05$) (Fig. 5b).

4. DISCUSSION

Several authors have reported that DLE can modulate the immune response in several diseases, such as bacterial diseases [10], autoimmune diseases [9], cancer [12, 28] and others [29, 30, 31, 32]. The DLE effects on the immune system include cytokine modulation [30], monocyte activation, macrophage chemotaxis and natural killer activity enhancement [11]. *In vitro*, DLE regulates the NF- κ B activity and reduces TNF- α and TGF- β 1 secretion, down-regulating the HIV transcription [11]. Recently, our group also showed that DLE diminishes the inflammatory and degenerative processes of cartilage by increasing the synthesis of proteoglycans, promoting collagen formation and the induction of tissue repair in a murine model of osteoarthritis [8]. DLE reduced the NF- κ B nuclear translocation, thus promoting the expression of the anti-inflammatory cytokines PDGF and FGF-2 [8]. These evidences strongly suggest that DLE regulates the inflammatory process in some diseases [8].

CP/CPPS is considered an autoimmune inflammatory pathology characterized by the presence of inflammatory cells such as granulocytes, macrophages, mast cells, and T and B lymphocytes in prostatic secretions or in prostatic tissue. The inflammation could be mediated by an adaptive immune response directed against a self-genital tract antigen, like prostatein [4, 7] and spermine [6]. Dexamethasone, a well-known NF- κ B inhibitor, decreased the leukocyte extravasation to the prostate and reduced the activity of proinflammatory cytokines, IL-1 β and IL-17 [33]. Some antibiotics, like ciprofloxacin and lomefloxacin, have also been used for prostatitis treatment; therefore due it is known that these drugs could have an anti-inflammatory effect, independently of their antimicrobial effects [34]. Other drugs conventionally used in chronic prostatitis, such as alpha-blockers like alfuzosin, have been employed, demonstrating little clinical improvement after several months of treatment [34]. Due to the undesirable secondary effects and the longer administration time of conventional drug treatments [35], several researchers have proposed other agents for the prostatic inflammation treatment, such as modulators of the immune system. For example, *Ginkgo biloba*

leaf extract decreased the signs of inflammation associated with BPH in prostatic tissue [36]. Also, a clinical report on metastatic prostate cancer suggested a correlation between DLE treatment and patient survival or remission [12]. Here, we used a modification of the Galmarini prostatitis model [13, 37], in order to increase the amount of mast cells and to induce epithelial atrophy and BPH [37]. Our model was also characterized by increased levels of prostatein, incremented of epithelium proliferation and the expression of some pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IFN- γ and IL-6 in the epithelium. In general, the inflammatory cell infiltrate produced a pro-inflammatory micro-environment that probably induced stromal hyperproliferation and tissue remodeling with local hypoxia [38]. Other authors have pointed out that infiltrated mast cells secrete proinflammatory and nociceptive mediators including histamine, cytokines and proteolytic enzymes, thereby promoting the perpetuation of inflammatory microenvironment and pelvic pain, playing an important role in prostatitis and in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia [39, 40].

The increase of the inflammatory infiltrate we observed in this work has been related in other works with the expression of prostatein. Penna and coworkers using an EAP NOD mice model observed that the immunization with synthetic peptides of prostatein was related with increased inflammatory infiltrate [41], and Maccioni and co-workers, using a similar model reported here, state that prostatein secreted to the seminal fluid could be able to elicit prostatitis [4]. This is in concordance with Rivero *et al* in 2002, suggesting that prostatein administration in a NOD mice prostatitis model produced the pathology, characterized by lymphocytic inflammatory lesions in prostatic tissue [42]. Therefore, prostatein could be considered an autoantigen that facilitates the perpetuation of inflammation in EAP [41, 42]. It is known that persistent inflammation is considered the pathogenic background of hyperproliferation in prostatic tissue, possibly as a consequence of autoimmune responses and the increased synthesis of proinflammatory molecules [1]. For example, studies realized in a murine model of chronic bacterial inflammation showed that prostatic inflammation is characterized by the infiltration of inflammatory cells and the presence of epithelial and stromal hyperplasia [43]. In a NOD mice model of EAP, it was observed that dexamethasone could decrease the inflammatory infiltrate [7]. Similarly, we observed that DLE diminished the serum prostatein levels and decreased the inflammatory infiltrate, thereby recovering the normal morphology of prostatic tissue in the animals treated with this agent.

The inflammatory microenvironment accompanied by hyperproliferation observed in the WOT group is in concordance with the increased expression of CD45 cell surface marker, TNF- α and IFN- γ proinflammatory cytokines within the epithelium. CD45 is a molecule associated with activated leucocytes, but can also be found in other cells, such as breast cells, fibrocytes and prostatic epithelial cells [17]. Adegun and coworkers observed increased expression of CD45 around the epithelium of the prostatic gland in biopsies of BPH patients [17]. Similarly, we observed increased expression of CD45 in prostatic tissue of WOT group and its decrement in tissue from DLE group. Yoon *et al* 2013, in animals treated with ciprofloxacin and with WSY-1075 herbal formula, showed that the serum levels of TNF- α decreased [44]. Here we showed that DLE treatment decreased IFN- γ expression in prostate. Penna and co-workers reported that Elocalcitol treatment decreased the production of IFN- γ by lymph node cells of autoimmune prostatic mice [7].

IL-6 cytokine is also involved in prostatitis development, increasing the proliferation and inflammatory infiltrate [45]. Chen *et al*, 2015 observed that higher levels of IL-6 could be associated with the presence of inflammatory cells and prostate hyperproliferation [45]. Some immunomodulating agents like *Serenoa repens* extract (Permixon) decreased IL-6 genetic expression, suggesting that it is associated with decrease of histopathological BPH characteristics [46]. Here, in the DLE treated group we observed a decreased expression of IL-6, a reduction of inflammatory cells and, even more, a diminishing epithelial cell proliferation. On other hand, several authors have also suggested that IL-17 possesses an important role in the perpetuation of prostatic inflammation. Penna, *et al* 2007 using a NOD mice model of EAP showed an IL-17 decreased expression in prostate draining lymph node T cells after Elocalcitol treatment. In our work, we observed a tendency to diminish its expression in the gland in DLE treated group, although statistical analysis showed no differences. On the other hand, IL-4 cytokine has been considered to counteract the effects of some pro-inflammatory molecules such as IFN- γ , IL-6 and IL-8, in prostatic inflammation [47]. Some reports on healthy prostatic cells and on BPH cells suggest that the expression of IL-4 diminishes hyperproliferation [39]. Moreover, studies in patients with prostatic cancer have indicated that aspirin, a non-steroidal anti-inflammatory drug used for prostatic inflammation, is able to increase the serum levels of IL-4 [48]. These results are in concordance with our findings, observing that in the groups treated with Dexamethasone or

DLE, we found an increased expression of IL-4 and a reduction in the expression of some proinflammatory cytokines such as IL-6 and IFN- γ .

Vykhovanets *et al* 2008, showed that the administration of TNF- α , IL-6 or IL-1 β , induces the activation of NF- κ B in the prostate and that Dexamethasone could down-modulate the activation of the NF- κ B cytokine [49]. A similar result has been showed in an ulcerative colitis model in which Dexamethasone increased the expression of IL-4 [50]. In our study, DLE and Dexamethasone, significantly decreased the expression of TNF- α , IFN- γ and IL-6 and increased the expression of IL-4. This cytokine behavior is in concordance with the anti-inflammatory effects obtained in an osteoarthritis model, in which DLE inhibited NF- κ B activation by diminishing the proinflammatory status [8].

5. Conclusion

In conclusion, here we give evidence to support the theory that DLE decreases the inflammatory infiltrate in autoimmune prostatitis and consequently the levels of serum prostatein by decreasing the expression of some pro-inflammatory molecules, such as CD45, TNF- α , IFN- γ and IL-6, and increasing the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-4, in a similar way that the Dexamethasone treatment did, but without the undesirable effects [35]. Therefore, we propose DLE as an alternative, adjuvant or complementary immune-modulator treatment for autoimmune prostatitis and also for the prevention of other complications such as BPH and cancer.

Conflict of Interests

The authors declares that there is no conflict of interest regarding the publication of this article

Acknowledgments

This work was supported by CONACyT (grant number 316626). We would like to express our gratitude to Olivia Medel (ENMyH, Instituto Politécnico Nacional, México), Francisco Paz (Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, México) and Rodolfo Ocadiz (Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV, México) for their practical advice.

6. References:

1. Bajpayee P, Kumar K, Sharma S. Prostatitis: prevalence, health impact and quality improvement strategies. *Acta Pol Pharm.* 2012; 69:571.
2. Sung YH, Jung JH, Ryang SH. Clinical significance of national institutes of health classification in patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Korean J Urol.* 2014; 55: 276.
3. Ludwig M, Steltz C, Huwe P, Schaffer R, Altmannsberger W, Weidner W. Immunocytological analysis of leukocyte subpopulations in urine specimens before and after prostatic massage. *Eur Urol*2001;39:277–82.
4. Maccioni M, Rivero VE, Riera CM. Prostatein (or rat prostatic steroid binding protein) is a major autoantigen in experimental autoimmune prostatitis. *Clin Exp Immunol.* 1998; 112(2):159-65.
5. Motrich RD, Maccioni M, Ponce AA, Gatti GA, Oberti JP, Rivero VE. Pathogenic consequences in semen quality of an autoimmune response against the prostate gland: from animal models to human disease. *J Immunol.* 2006; 15;177(2):957-67.
6. Altuntas CZ, Daneshgari F, Veizi E, Izgi K, Bicer F, Ozer A, Grimberg KO, Bakhautdin B, Sakalar C, Tasdemir C, Tuohy VK. A novel murine model of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS) induced by immunization with a spermine binding protein (p25) peptide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013; 304:R415.
7. Penna G, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Mariani R, Sanvito F, Doglioni C, Adorini L. Treatment of experimental autoimmune prostatitis in nonobese diabetic mice by the vitamin D receptor agonist elocalcitol. *J Immunol.* 2006;177:8504.
8. Acosta P, Pérez N, Pérez E, Correa B, Pérez C, Gómez C, Sánchez V, Pérez DG. Anti-inflammatory effect of dialyzable leucocyte extract in a rat model of osteoarthritis: histopathological and molecular characterization, *Scand J Rheumatol* 2016;00:1–8.
9. Stanciková M, Rovenský J, Pekárek J, Orviský E, Blazícková S, Cech K. Influence of various forms of dialyzable leukocyte extracts on rat adjuvant arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1994;42(4):295-9.

10. Armides Franco-Molina M, Mendoza-Gamboa E, Castillo-Tello P, Tamez-Guerra RS, Villarreal-Treviño L, Tijerina-Menchaca R, Castillo-León L, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Padilla C. In vitro antibacterial activity of bovine dialyzable leukocyte extract. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2006; 28(3):471-83.
11. Lara HH, Ixtepan-Turrent L, Garza-Treviño EN, Badillo-Almaraz JI, Rodríguez-Padilla C, Antiviral mode of action of bovine dialyzable leukocyte extract against human immunodeficiency virus type 1 infection, *BMC Res Notes.* 2011; 1;4:474.
12. Pizza G, De Vinci C, Cuzzocrea D, Menniti D, Aiello E, Maver P, Corrado G, Romagnoli P, Dragoni E, LoConte G, Riolo U, Palareti A, Zucchelli P, Fornarola V, Viza D. A preliminary report on the use of transfer factor for treating stage D3 hormone-unresponsive metastatic prostate cancer. *Biotherapy.* 1996;9(1-3):123-32.
13. Galmarini M, Ferro ME, Riera CM. Delayed hypersensitivity and lesions following isoimmunization with modified rat male accessory glands: kinetics of induction. *J Reprod Immunol.* 1988; 13(2):147-57.
14. Lea OA, Petrusz P, French FS, Prostatein. A major secretory protein of the rat ventral prostate. *J Biol Chem.* 1979; 10;254(13):6196-202.
15. Lee B, Endocrine and Cellular Inductive Factors in the Development of Human Benign Prostatic Hypertrophy. *rostatic Hypertrophy.* In: Hinman, F., Jr, editor. *Benign prostatic hypertrophy.* New York: Springer-Verlag; 1983. p. 179-92.
16. Li H, Pham T, McWhinney BC, Ungerer JP, Pretorius CJ, Richard DJ, Mortimer RH, d'Emden MC, Richard K. Sex Hormone Binding Globulin Modifies Testosterone Action and Metabolism in Prostate Cancer Cells. *Int J Endocrinol.* 2016.
17. Adegun PT, Ogundele OM, Falode DT, Taiwo OJ, Ajonijebu DC, Omoaghe AO, Kobomoje O. Mapping Angiogenic Cells CD31 (PECAM1) and CD45 in PCa and BPH Biopsies, *JCREO,* 2013 ; Vol. 5(1), pp. 1-7.
18. Galheigo MR, Cruz AR, Cabral ÁS, Faria PR, Cordeiro RS, Silva MJ, Tomiosso TC, Gonçalves BF, Pinto-Fochi ME, Taboga SR, Góes RM, Ribeiro DL, Role of the TNF- α receptor type 1 on prostate carcinogenesis in knockout mice, *Prostate.* 2016 Jul;76(10):917-26.

19. Sugihara A, Maeda O, Tsuji M, Tsujimura T, Nakata Y, Akedo H, Kotake T, Terada N. Expression of cytokines enhancing the osteoclast activity, and parathyroid hormone-related protein in prostatic cancers before and after endocrine therapy: an immunohistochemical study. *Oncol Rep.* 1998;5(6):1389-94.
20. Royuela M, de Miguel MP, Ruiz A, Fraile B, Arenas MI, Romo E, Paniagua R, Interferon-gamma and its functional receptors overexpression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma: parallelism with c-myc and p53 expression, *Eur Cytokine Netw.* 2000; 11(1):119-27.
21. Du Y, Long Q, Zhang L, Shi Y, Liu X, Li X, Guan B, Tian Y, Wang X, Li L, He D. Curcumin inhibits cancer-associated fibroblast-driven prostate cancer invasion through MAOA/mTOR/HIF-1 α signaling. *Int J Oncol.* 2015;47(6):2064-72.
22. Miličević N, Mrčela M, Galić J, Marjanović K, Expression of proinflammatory cytokine interleukin-6 in tissue samples of human prostate obtained by needle biopsy. *Pathol Res Pract.* 2015; 211(11):865-70.
23. You Z, Dong Y, Kong X, Zhang Y, Vessella RL, Melamed J, Differential expression of IL-17RC isoforms in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancers, *Neoplasia.* 2007; 9(6):464-70.
24. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(2):155-74. Review.
25. Murphy SF, Schaeffer AJ, Done J, Wong L, Bell-Cohn A, Roman K, Cashy J, Ohlhausen M, Thumbikat P. IL17 Mediates Pelvic Pain in Experimental Autoimmune Prostatitis (EAP). *PLoS One.* 2015 May 1;10(5):e0125623.
26. Debinski W, Puri RK, Kreitman RJ, Pastan I. A wide range of human cancers express interleukin 4 (IL4) receptors that can be targeted with chimeric toxin composed of IL4 and Pseudomonas exotoxin, *J Biol Chem.* 1993;268(19):14065-70.
27. Goldstein R, Hanley C, Morris J, Cahill D, Chandra A, Harper P, Chowdhury S, Maher J, Burbridge S. Clinical investigation of the role of interleukin-4 and interleukin-13 in the evolution of prostate cancer. *Cancers (Basel).* 2011; 16; 3(4):4281-93.

28. Lara HH, Turrent LI, Garza-Treviño EN, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C, Clinical and immunological assessment in breast cancer patients receiving anticancer therapy and bovine dialyzable leukocyte extract as an adjuvant, *Exp Ther Med*. 2010;1(3):425-431.
29. Medina-Rivero E, Merchand-Reyes G, Pavón L, Vázquez-Leyva S, Pérez-Sánchez G, Salinas-Jazmín N, Estrada-Parra S, Velasco-Velázquez M, Pérez-Tapia SM, Batch-to-batch reproducibility of Transferon™. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;88:289-94.
30. Hernandez ME, Mendieta D, Pérez-Tapia M, Bojalil R, Estrada-García I, Estrada-Parra S, Pavón L. Effect of selective serotonin reuptake inhibitors and immunomodulator on cytokines levels: an alternative therapy for patients with major depressive disorder, *Clin Dev Immunol*. 2013; doi: 10.1155/2013/267871..
31. Franco-Molina MA¹, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Vera-García ME, Castillo-Tello P, García de la Fuente A, Mendoza RD, Garza RG, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. IMMUNEPOTENT CRP (bovine dialyzable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non-small cell lung cancer patients. *Cytotherapy*. 2008;10(5):490-6.
32. Mendoza-Gamboa E¹, Franco-Molina MA, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P, Vera-García ME, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. Bovine dialyzable leukocyte extract modulates AP-1 DNA-binding activity and nuclear transcription factor expression in MCF-7 breast cancer cells. *Cytotherapy*. 2008;10(2):212-9.
33. Vykhovanets EV, Shukla S, MacLennan GT, Vykhovanets OV, Bodner DR, Gupta S. Il-1 beta-induced post-transition effect of NF-kappaB provides time-dependent wave of signals for initial phase of intrapostatic inflammation. *Prostate*. 2009; 69(6):633-43.
34. Duclos AJ, Lee CT, Shoskes DA, Current treatment options in the management of chronic prostatitis, *Ther Clin Risk Manag*. 2007 Aug;3(4):507-12.
35. Ribeiro DL, Rafacho A, Bosqueiro JR, Taboga SR, Góes RM. Cellular changes in the prostatic stroma of glucocorticoid-treated rats. *Cell Tissue Res*. 2008; 332(3):499-508.
36. Peng CC, Liu JH, Chang CH, Chung JY, Chen KC, Chou KY, Peng RY. Action Mechanism of Ginkgo biloba Leaf Extract Intervened by Exercise Therapy in Treatment of Benign Prostate Hyperplasia. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; doi: 10.1155/2013/408734.

37. Pérez-Alvarado CM, Gómez García C, Reyes López M, García Solís M, Pérez Hernández E, Pérez de la Mora CA, Correa Meza BE, Sánchez Monroy V, Paz Bermudez F, Pérez Ishiwara DG. Chronic Prostatitis / Chronic Pelvic Pain Syndrome: Histological Evidences of treatment with an Immunotherapeutic Agent in a Murine Model, JCBPSC, Special Issue; Nov.2014, 4: 5, 26-32.
38. Pace G, Di Massimo C, De Amicis D, Vicentini C, Ciancarelli M. Inflammation and endothelial activation in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer, *Int Braz J Urol.*, 2011; 37(5):617-22.
39. Rivero VE, Iribarren P and Riera CM. Mast cells in accessory glands of experimentally induced prostatitis in male Wistar rats. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995; 74:236.
40. Papadoukakis S, Kyroudi-Voulgari A, Truss MC, Perea D, Mitropoulos D. Quantitative study of mast cells in experimentally induced benign prostatic hyperplasia. *Urol Int.* 2010;84(1):100-4.
41. Penna G, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Mariani R, Giarratana N, De Carli E, Fibbi B, Adorini L. Spontaneous and prostatic steroid binding protein peptide-induced autoimmune prostatitis in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol.* 2007; 179(3):1559-67.
42. Rivero V, Carnaud C, Riera CM. Prostatein or steroid binding protein (PSBP) induces experimental autoimmune prostatitis (EAP) in NOD mice. *Clin Immunol.* 2002; 105(2):176-84.
43. Simons BW, Durham NM, Bruno TC, Grosso JF, Schaeffer AJ, Ross AE, Hurley PJ, Berman DM, Drake CG, Thumbikat P, Schaeffer EM. A human prostatic bacterial isolate alters the prostatic microenvironment and accelerates prostate cancer progression. *J Pathol.* 2015 Feb;235(3):478-89.
44. Yoon BI, Bae WJ, Kim SJ et al: The Anti-Inflammatory Effects of a New Herbal Formula (WSY-1075) in a Nonbacterial Prostatitis Rat Model. *World J Mens Health.* 2013;31:150.
45. Chen KC, Sung SY, Lin YT, Hsieh CL, Shen KH, Peng CC, Peng RY, Benign prostatic hyperplasia complicated with T1DM can be alleviated by treadmill exercise-evidences revealed by the rat model, *BMC Urol.* 2015; 15:113.
46. Bernichtein S, Pigat N, Camparo P, Latil A, Viltard M, Friedlander G, Goffin V, Anti-inflammatory properties of Lipidosterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon®) in a mouse model of prostate hyperplasia. *Prostate.* 2015; 75(7):706-22.

47. Kramer G, Steiner GE, Handisurya A, Stix U, Haitel A, Knerer B, Gessl A, Lee C, Marberger M. Increased expression of lymphocyte-derived cytokines in benign hyperplastic prostate tissue, identification of the producing cell types, and effect of differentially expressed cytokines on stromal cell proliferation. *Prostate*. 2002; 52(1):43-58.
48. Lang Kuhs KA, Hildesheim A, Trabert B, Kemp TJ, Purdue MP, Wentzensen N, Katki HA, Pinto LA, Loftfield E, Safaeian M, Chaturvedi AK, Shiels MS, Association between Regular Aspirin Use and Circulating Markers of Inflammation: A Study within the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015 May;24(5):825-32.
49. Vykhovanets EV, Shukla S, MacLennan GT, Resnick MI, Carlsen H, Blomhoff R, Gupta S. Molecular imaging of NF-kappa B in prostate tissue after systemic administration of IL-1 beta. *Prostate*. 2008 Jan 1; 68(1):34-41.
50. Wu P1, Guo Y, Jia F, Wang X. The Effects of Armillarisin A on Serum IL-1 β and IL-4 and in Treating Ulcerative Colitis. *Cell Biochem Biophys*. 2014; 72(1):103-6.

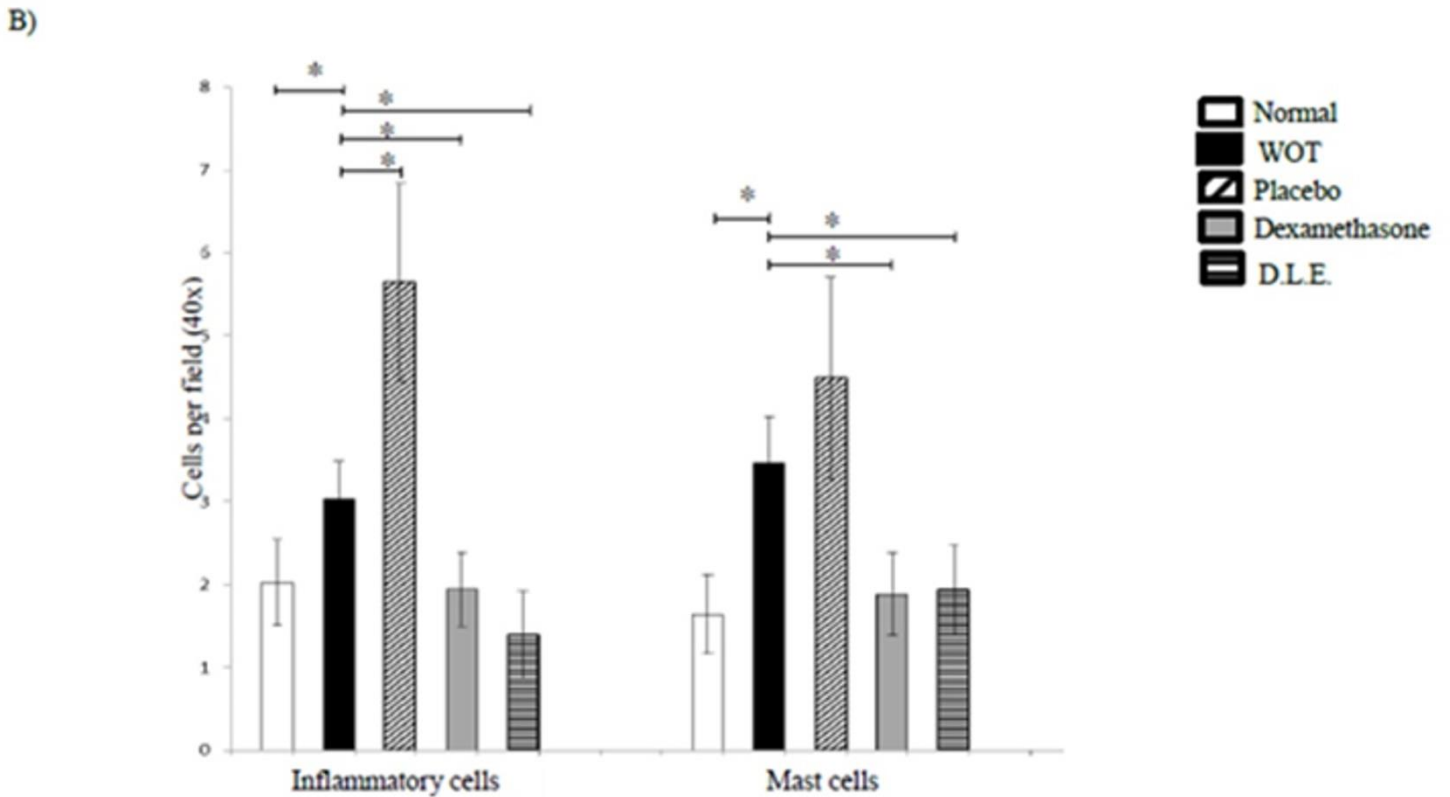
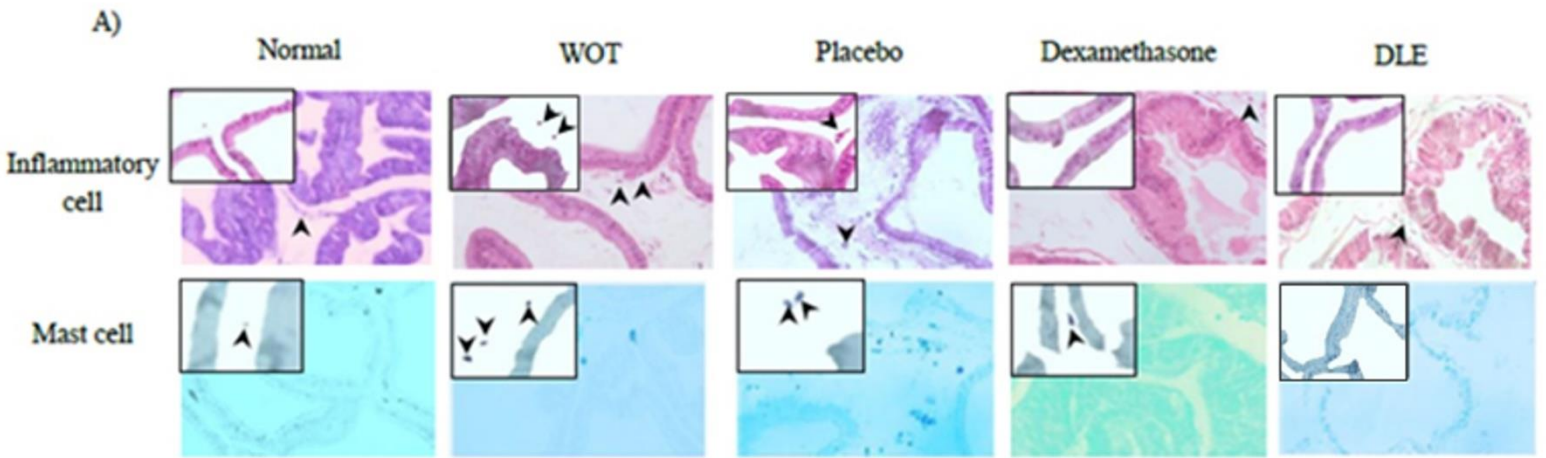


Fig. 1 DLE decreases the inflammatory and mast cell infiltration. a. Animals from the placebo and WOT groups showed a notorious infiltrate of inflammatory and mast cells. Also, tissue regions with prostatic intraepithelial atrophy and BPH were observed. Microphotographs 40x, Inset close up 100x. b. Quantification of the inflammatory and mast cells. (*) Indicate groups that showed statistical significance ($P < 0.05$), the lines indicate groups that were compared.

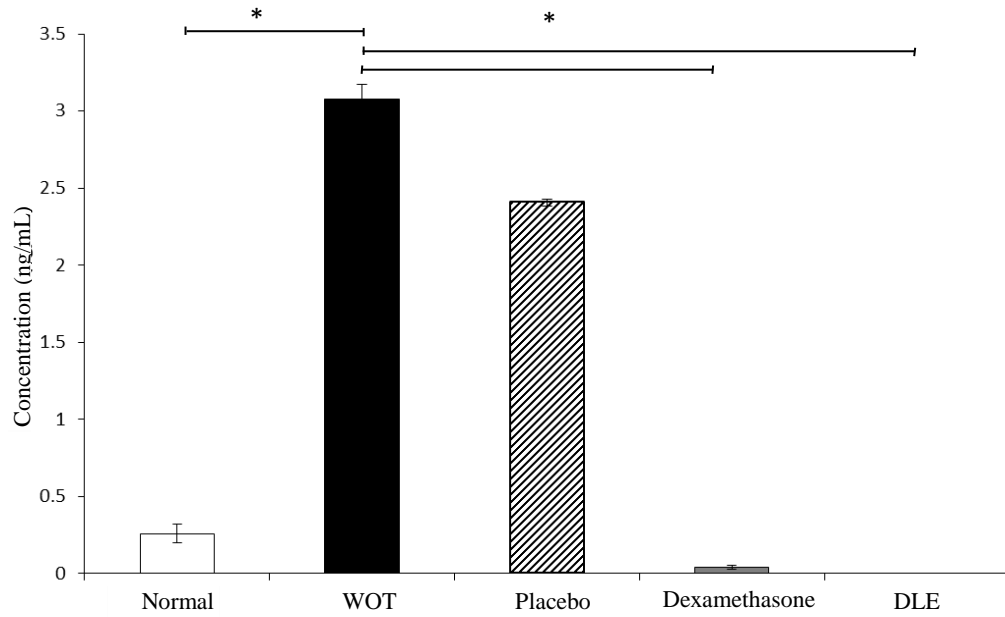


Fig. 2 DLE decreased the prostatein serum concentration of prostatein in comparison with other groups. The serum level of prostatein in the Dexamethasone group also diminished. The placebo and WOT group presented a significantly higher prostatein concentration. (*) Indicate groups that showed statistical significance ($P < 0.05$), the lines indicate groups that were compared.

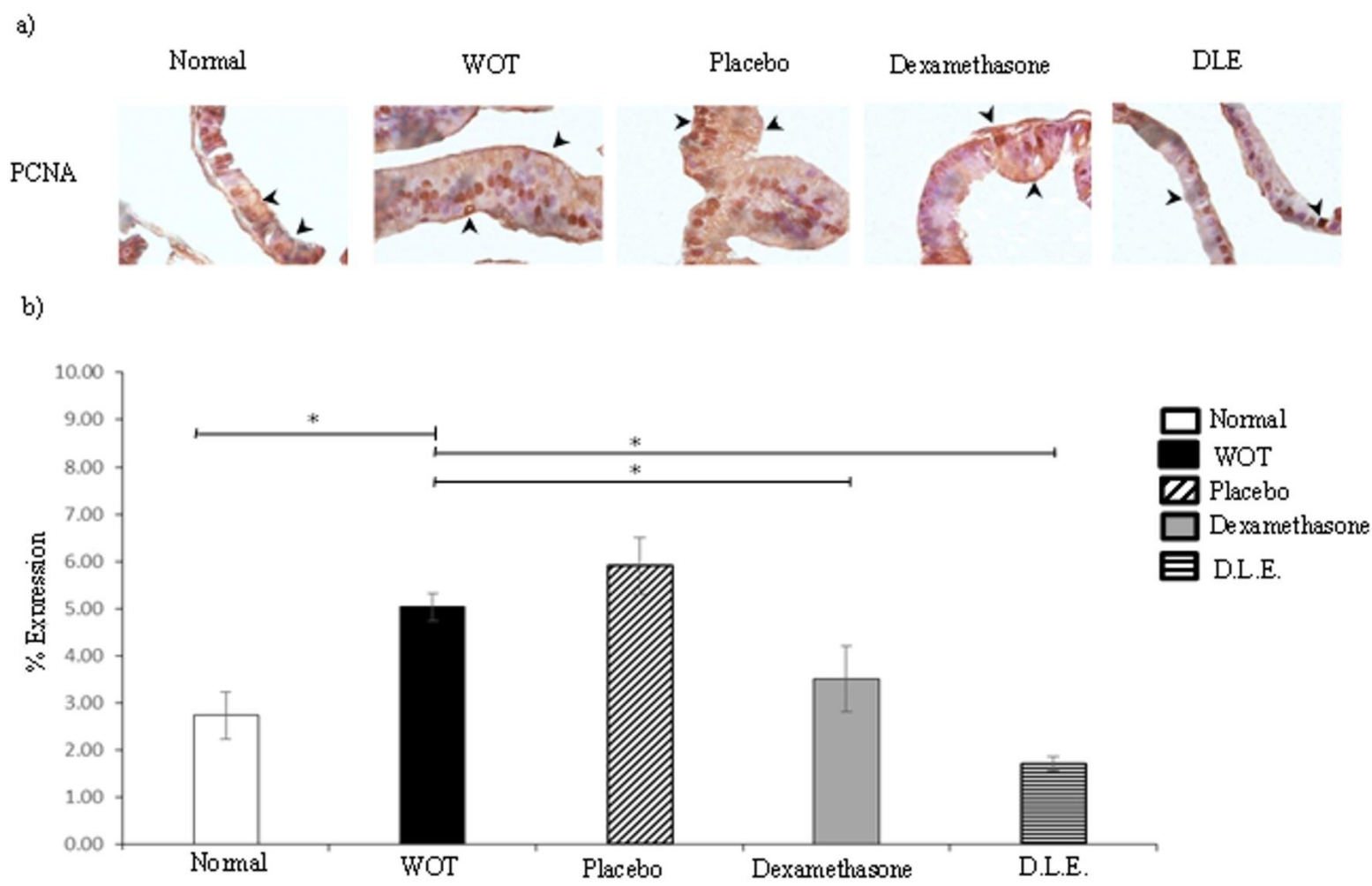
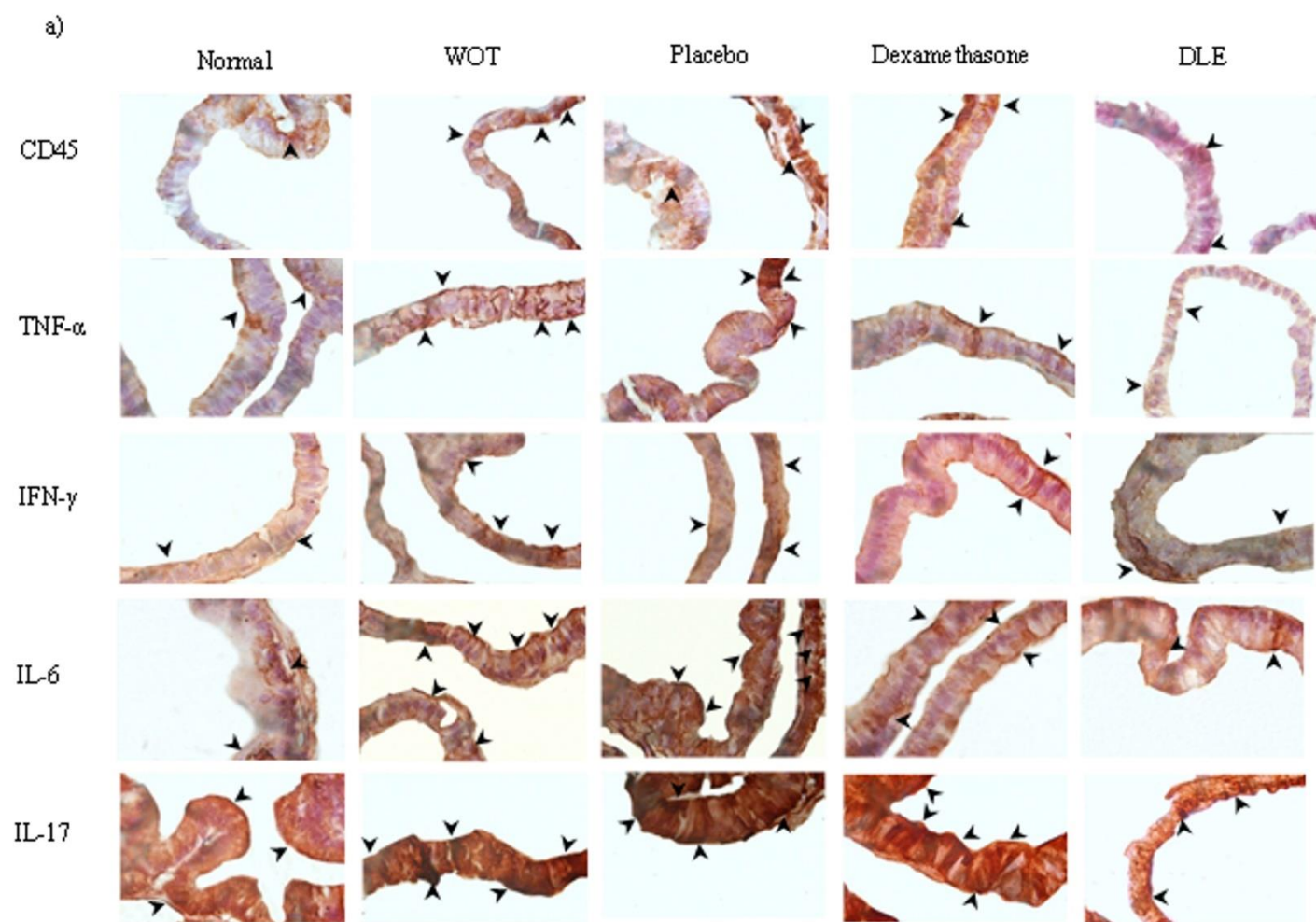


Fig.3 DLE decreased the expression of PCNA. a. Microphotographs are in 100x. Normal tissue showed an expression of PCNA similar to the Dexamethasone group. The DLE group presented a decreased expression of PCNA in comparison with the other treatments. The placebo and WOT groups presented a significantly higher expression of PCNA in contrast to other groups. b. Semiquantification of PCNA expression (*) Indicate groups that showed statistical significance ($P < 0.05$), the lines indicates groups that were compared.



b)

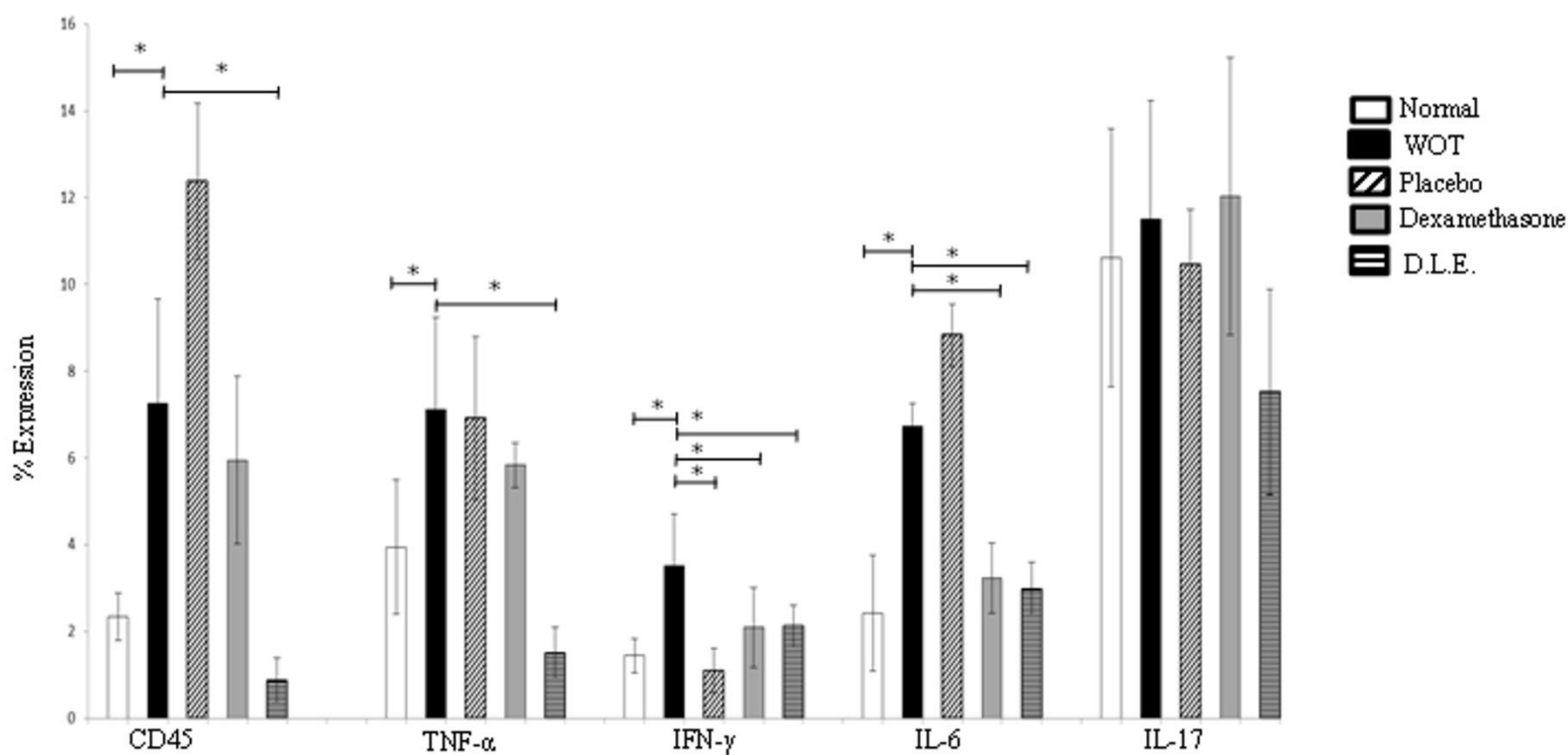


Fig.4 DLE modified the expression of some proinflammatory molecules. The expression percentage was semiquantified with software Image Pro Premier. a. Microphotographs are in 100x. CD45 in normal tissue showed a basal expression. CD-45 expression in the Dexamethasone treated group was similar to the WOT group. The DLE treated group showed a significantly lesser expression in comparison to the other groups. TNF- α in the normal group also showed a basal expression. The Dexamethasone treated group showed a TNF- α expression similar to the WOT. The DLE treated group showed a significantly lower expression than that in other groups. IFN- γ in the normal group displayed a basal expression. The placebo treated group showed a decreased IFN- γ expression in comparison with the other groups. The Dexamethasone and DLE treated groups showed an IFN- γ expression similar to normal group. IL-6 in the normal group showed a basal expression. In the Dexamethasone and DLE treated groups, the IL-6 expression was similar to the normal group. For IL-17 we did not observe any significant differences. b. Graph of the semiquantification of the percentage of expression in all groups. (*) Indicate groups that showed statistical significance ($P < 0.05$), the lines indicate groups that were compared.

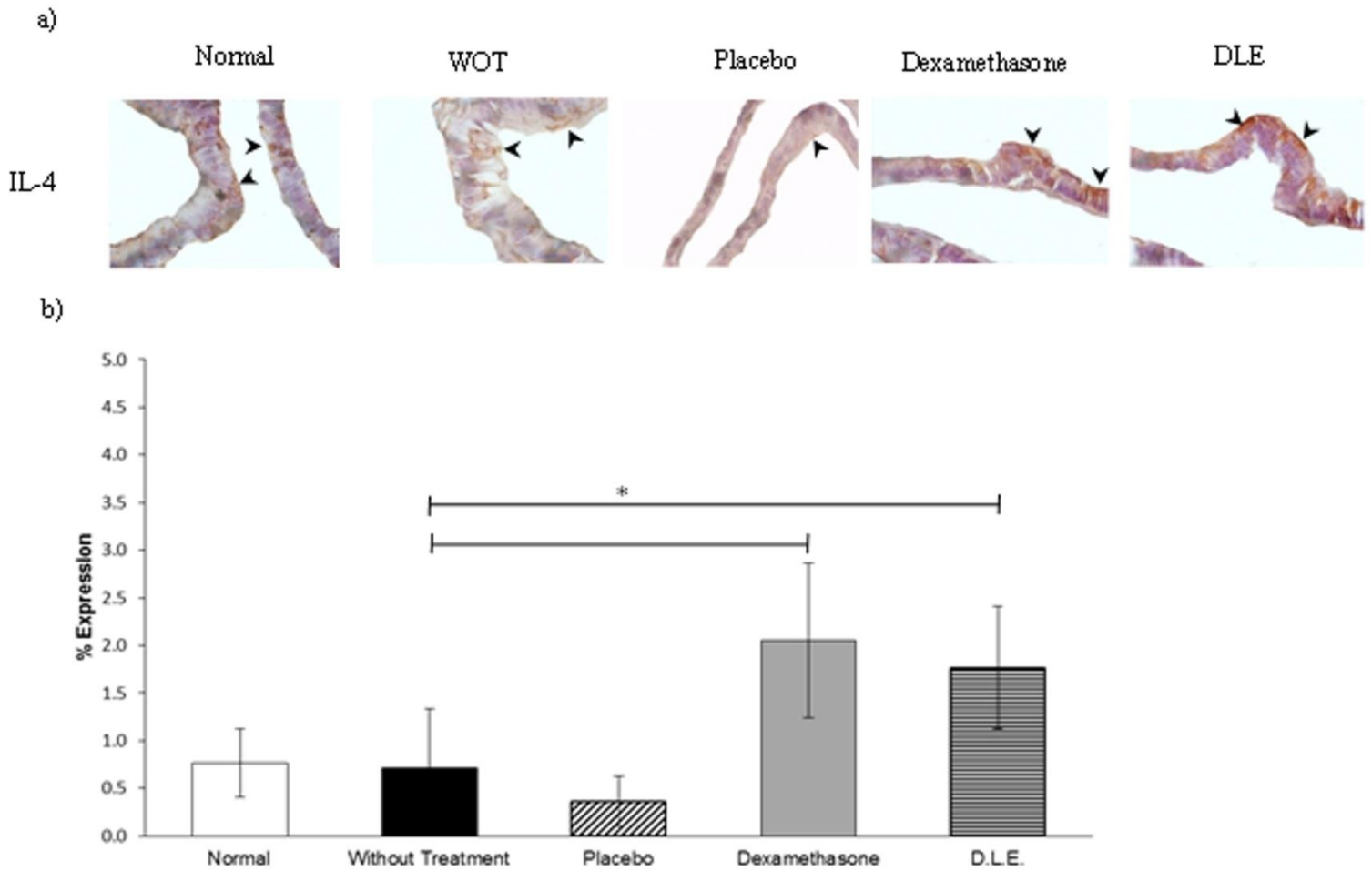


Fig. 5 DLE increased the IL-4 expression. The expression percentage was semiquantified with software Image Pro Premier. a. Microphotographs are in 100x, the normal group showed a basal expression of IL-4, similar to that displayed by the placebo and WOT treated groups. The Dexamethasone and DLE groups displayed a significantly higher IL-4 expression than the other groups. b. Semiquantification of the IL-4 expression in all groups. (*) Indicate groups that showed statistical significance ($P < 0.05$), the lines indicate groups that were compared.



SECRETARÍA DE
SALUD

La Secretaría de Salud del Gobierno del Distrito Federal
a través de la Dirección de Educación e Investigación,
otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A: *M. en C. Carlos M. Pérez Alvarado*

Por su participación en la presentación de la Investigación:

*“Efecto de un nuevo agente inmunomodulador en la prostatitis
autoinmune: Evaluación en un modelo murino ”*

Foro de Investigación
Noviembre del 2013

Dr. Antonio Fraga Mouret
Director de Educación e Investigación

df.gob.mx

salud.df.gob.mx



GOBIERNO DEL
DISTRITO FEDERAL



Instituto Politécnico Nacional
 Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada Tlaxcala

Otorgan la presente
CONSTANCIA

A: **Carlos Manuel Pérez Alvarado**

Por su asistencia al

1ST BIOTECHNOLOGY & 9^º ENCUENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA DEL IPN

Atlihuetzia Tlaxcala, del 13 al 16 de octubre de 2014.

Comité organizador

Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuill

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara

Dra. María Myrna Solís Oba