

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

**RESPUESTA DE LA GLÁNDULA
PROSTÁTICA A LA INFLAMACIÓN:**

**PATRÓN MORFOLÓGICO Y MODULACIÓN DE
MOLÉCULAS EPITELIALES DE DEFENSA**

Trabajo de Tesis para optar al
Título de Doctor en Medicina y Cirugía

Amado Alfredo Quintar

CÓRDOBA
REPÚBLICA ARGENTINA
2009

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS

Directora:

Prof. Dra. Cristina Maldonado

Integrantes:

Prof. Dr. Oscar Pautasso

Prof. Dra. Mariana Maccioni

Artículo 30° del Reglamento de la
Carrera de Doctorado en Medicina y Cirugía:

*“La Facultad de Ciencias Médicas no se hace solidaria con las
opiniones de esta tesis”*

DEDICATORIAS

A mis Padres

Por los principios inflexibles que guiaron nuestras vidas

A mi Esposa Camila

Por hacer que todo merezca la pena

A nuestra hija Lucero

Por las horas incompletas y por hacer más perfecto aquello en que creo

AGRADECIMIENTOS

No es sencillo pensar en las palabras adecuadas para poder definir la relación entre el autor de una tesis, su director, colaboradores y compañeros de laboratorio. Resulta más fácil adentrarse en los recónditos pasajes de una literatura creada para navegar en el recuerdo, donde coexisten la razón y la emoción.

“Tanto para iniciar como para concluir una singladura, es preciso contar con una tripulación preparada, disciplinada y entregada a su pasión por la investigación, y abierta a los que buscan, como ellos, la esencia del conocimiento, Y, por supuesto, al mando, alguien presto a escuchar, con el convencimiento de que la ilusión de su interlocutor merece una atención especial, y dispuesto, sobre todo, a ser paciente.”

En mi pequeño *viaje* particular, he tenido la gran suerte de *navegar* en el CME, siguiendo indicaciones precisas, primero del Dr. Agustín Aoki, quién muestra en forma constante lo excitante y gozoso de la investigación, y luego de la Dra. Alicia Torres, quién sabe exponer lo mejor de cada uno de nosotros.

A la Dra. Cristina Maldonado, mi directora de tesis, por su gran capacidad de trabajo, su dedicación plena, su atención continuada, su tratamiento afable y sosegado, su incansable disposición y su inestimable ayuda en TODO.

A los miembros de la comisión de seguimiento, Dr. Oscar Pautasso y Dra. Mariana Maccioni, por sus atinados y pertinentes consejos.

Al Dr. Oscar Pessah por su colaboración en los estudios microbiológicos. A los Dres. Juan Carlos Dalmaces y Daniel Bengoechea por contribuir al presente trabajo. Al Dr. Luque del LETH, Sta Fé y la Dra. Monica Bonaterra por sus enseñanzas en técnicas inmunocitoquímicas.

A Jorge Mukdsi, actual compañero de *camarote*, quién ha contribuido substancialmente al mejoramiento del manuscrito. A Elsa Orgnero por su cariño y ejemplo continuo de *corrección* estricta. A Patricia Pons, por su espontaneidad, consejos y por llenar esas lánguidas tardes.

Al Team18, virtual cuarto de máquinas, por la predisposición permanente y los *tips* permanentes. A Silvina y Ana por ayudarme a interpretar el horizonte del viaje; y a Juan por su superación indeleble, verdadera fuente *cartográfica*.

A Carolina Leimgruber por su comprensión, paciencia y ayuda desinteresada. A Elena (la *Piru*) por el *abordaje* diario, por su calidez y reminiscencia maternal.

A Felix, maestro de la creatividad, optimismo, diplomacia y entendimiento. A Liliana y Claudia por su enorme ($\Sigma\infty$) apoyo y compañía. Mi agradecimiento a Gaby Alvin y Tatiana Rodrigo por la *ráfaga* refrescante de experiencia y valentía.

Debo expresar mi reconocimiento a la labor realizada por Lucas y los Ingenieros Pittau y Balabanian en el uso del “*periscopio*”. Asimismo, a Mercedes Guevara por su magnífica dedicación, a Lucía Artino por su empeño de *comodin* y a Cristian por su alegría y ocurrencias.

A Natalia Luna, por su inquebrantable paciencia y aptitud. A Luis Magni por sus *cyberconsejos* y por completar esos espacios virtuales. A la Dra. Loli Uribe por su entusiasmo incansable.

A Luciana Noemí por su visión, coraje y constancia. A Viky Juarez por su entendimiento y carisma. Mi reconocimiento a Primo Flores por su idoneidad, a Oscar Correa por la eficiente labor en el bioterio y a Griselda Gudiño por su cumplimiento.

A dos grandes amigos que conocí en esta travesía, Andreas Doll y Manuel Lopez Seoane, quienes despertaron un enorme interés en mí para la investigación en urología, brindándome un permanente apoyo.

Difícilmente, las sensaciones vividas en esta peripecia puedan quedar descriptas en esta *bitácora*. De todos modos, mi agradecimiento a todos por lograr que consiga las fuerzas adicionales que proporcionan la competencia, el compañerismo, la amistad, la paciencia y la compasión.

ÍNDICE

RESUMEN	I
SUMMARY	III
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Perspectivas históricas	3
1.2 Anatomía, histología y fisiología de la próstata humana y su correlación con la glándula prostática de roedores	6
1.3 La prostatitis como un problemático síndrome urológico	20
1.4 Uso de modelos animales en los estudios relacionados a enfermedades prostáticas ...	27
1.5 Rol de las células residentes en el desarrollo y control de la inflamación	29
1.6 Particularidades de la inflamación prostática que fundamentan los Objetivos Planteados	38
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.1 Animales y diseños experimentales	42
2.2 Muestras de próstata humana	48
2.3 Estudio morfológico	48
2.4 Dosaje de testosterona	50
2.5 Detección de apoptosis <i>in situ</i> por TUNEL	50
2.6 Detección de la expresión de proteínas en estudio	51
2.7 Análisis estadístico	57
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	58
3.1 Caracterización de la prostatitis bacteriana en la rata (grupo PB)	59
3.2 Modulación de moléculas de inmunidad innata por <i>E. coli</i>	69
3.3 Alteraciones morfofuncionales prostáticas secundarias a obstrucción uretral	78
3.4 Respuesta inmune innata en la prostatitis no bacteriana	83
3.5 Regulación androgénica de mecanismos inmunes innatos en la próstata ventral de rata	85
3.6 Influencia de la testosterona en el desarrollo y resolución de la prostatitis bacteriana	90
3.7 Expresión de proteínas de defensa en la próstata humana	98
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	100
CONCLUSIONES	128
CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFÍA	131
APÉNDICE	153

RESUMEN

La próstata es el sitio más propenso a desarrollar procesos inflamatorios y alteraciones del crecimiento celular dentro del tracto genital masculino. Las prostatitis, síndrome clínico que experimentan los pacientes con inflamación de la próstata, constituyen una importante causa de deterioro en la calidad de vida en hombres de todas las edades y un proceso de difícil tratamiento.

Estudios recientes han postulado que los epitelios expuestos a injurias poseen mecanismos de defensa propios de la inmunidad innata, con la participación de moléculas específicas tales como TLR4 para reconocimiento bacteriano, los antibacterianos SP-D y defensinas, citocinas proinflamatorias y las inmunomoduladoras UG, PBP y Gal-1. Considerando que las células epiteliales serían las primeras en contactar con bacterias o químicos irritantes de la orina, es de fundamental importancia el análisis de la respuesta temprana de las células residentes de la próstata a estos estímulos lumbales. En este sentido, se conoce poco acerca de las consecuencias del infiltrado inflamatorio sobre las células prostáticas o el papel que podría desempeñar el epitelio en el control de la inflamación. El presente trabajo de tesis aborda el análisis de la respuesta prostática frente a la inflamación, incluyendo el estudio de proteínas del sistema inmune innato y su modulación por los andrógenos.

Inicialmente se determinó la expresión prostática de TLR4, UG y Gal-1, localizadas mediante inmunocitoquímica en el epitelio y la estroma, tanto en muestras humanas como de rata. Posteriormente, se desarrollaron dos modelos de prostatitis en ratas Wistar, uno bacteriano mediante inoculación intraprostática de *E. coli* y el otro abacteriano por obstrucción uretral. La respuesta temprana (analizada hasta las 72 h postestímulo) se evaluó mediante análisis morfológico a nivel óptico y electrónico y de expresión de las moléculas de inmunidad innatas, incluyendo técnicas de western blot e inmunocitoquímica.

Ambos modelos de prostatitis evidenciaron estimulación temprana del epitelio prostático, reflejada tanto a nivel morfológico como por el aumento en la expresión epitelial de TLR4, antimicrobianos y TNF α . Sin embargo, mientras el modelo abacteriano mantuvo la integridad epitelial hasta el final del tiempo evaluado, el bacteriano exhibió apoptosis y atrofia celular, correlacionado con numerosos PMNN invadiendo la luz acinar hacia las 72 h. Por su parte, PBP y Gal-1 exhibieron una intensa expresión en los tiempos tempranos, con una caída posterior en el caso de PBP

debido a la atrofia epitelial, mientras que Gal-1 se mantuvo a expensas de células inflamatorias.

Teniendo en cuenta el control androgénico de todas las funciones prostáticas, se determinó el rol desempeñado por la testosterona en el curso de la prostatitis bacteriana. Inicialmente, se observó que la testosterona regula en forma negativa la expresión de TLR4 y SP-D, mientras que las inmunomoduladoras resultaron ser dependientes de andrógenos. A continuación, se plantearon grupos experimentales combinando prostatitis bacteria con diferentes estatus hormonal. La castración simultánea al inicio del proceso infeccioso resultó en una eliminación más efectiva de la bacteria, determinada por inmunocitoquímica, junto a una mejor resolución del infiltrado inflamatorio y preservación epitelial; en correlación, TLR4 mostró niveles más elevados que en los grupos infectados con testosterona normal o alta. Por el contrario, los animales castrados+infectados mostraron un nivel inferior de SP-D en comparación con los animales tratados con testosterona+infectados, asociados a la menor presencia de bacterias y PMNN.

Curiosamente, la respuesta prostática a la infección no se restringió al compartimiento epitelial, sino que la estroma también mostró incremento de TLR4, signos de hipertrofia celular, desarrollo de la maquinaria biosintética y pérdida del perfil contráctil. El tratamiento con dosis altas de testosterona intensificó el cambio de fenotipo celular de las células musculares lisas hacia otro más secretorio, sugiriendo un sinergismo entre los andrógenos y los cambios estromales en el control de la inflamación.

Los datos presentados tienen un amplio rango de implicancias para la fisiología de la glándula prostática. Este órgano está provisto de una variedad de moléculas de defensa que son moduladas por andrógenos, los cuales favorecen un perfil inmunosupresor. Además, las células prostáticas funcionan como importantes componentes para la defensa del huésped ya que reconocen y responden a alteraciones en el microambiente de la glándula. Por otro lado, se presentan evidencias de que las células musculares lisas jugarían un rol protagónico en el control de situaciones que comprometen la homeostasis de la glándula prostática. Finalmente, los hallazgos del presente trabajo sugieren que los niveles de testosterona se correlacionan negativamente con la resolución de las prostatitis lo que sienta las bases para futuras terapias alternativas.

SUMMARY

Within the male genital tract, the prostate gland is highly exposed to develop inflammatory process as well as cell proliferation abnormalities. Prostatitis, the clinic syndrome affecting the patients with inflammation of the prostate gland, is difficult to control and has become into the main health problem affecting the quality of life of a wide range of age.

Recent studies have demonstrated that epithelia normally exposed to injuries from microenvironment are provided with host defense mechanisms, mediated by specific molecules of the innate immunity such as TLRs for microbial recognition, defensins and SP-D with antimicrobial properties, proinflammatory cytokines as TNF α , and antiinflammatory-immunomodulators as UG, PBP y Gal-1. Taking into account that epithelial cells are the first line to contact with pathogens or irritant chemicals from the urine fluid, the study of the early response of prostatic gland resident cells (epithelial and stromal) to such stimuli is critical to increase the knowledge about pathogenesis in prostatic diseases. Indeed, little information is available about the effects of inflammatory infiltrate on prostatic epithelial cells, or the role played by epithelial to modulate inflammation. This doctoral thesis presents the study of the prostatic gland response to inflammation, including the analysis of innate immunity molecules expression and the modulation exerted by androgens.

Firstly, the expressions of TLR4, UG y Gal-1 were studied in the epithelial and stromal compartments from human and rat prostates. Afterward, two experimental prostatitis models were developed in Wistar rats, one achieved by intraprostatic inoculation of *E. coli*, and the second model was abacterial and induced by uretral obstruction. The early response, including the first 72 h post-treatment, was evaluated by means of morphologic analysis and by western blot and immunocytochemistry of innate immunity molecules.

Both prostatitis experimental models evidenced early stimulation of prostatic epithelia as could be concluded from morphologic changes, increase of epithelial TLR4 expression, antimicrobial peptides, and TNF α . However, even though epithelia preserved well in the abacterial model, the bacterial prostatitis showed numerous epithelial apoptosis and atrophy at 72 h, in correlation with the PMNN invading the acinar lumen. Besides, antiinflammatory molecules as PBP and Gal-1 also exhibited an

early increased expression, followed by a drop of PBP, probably due to the epithelial atrophy; meanwhile Gal-1 levels were maintained in inflammatory cells.

Considering the androgenic control of prostatic functions, the role played by testosterone in the progression of bacterial prostatitis was further studied. Testosterone was observed to modulate the expression of TLR4 y SP-D in a negative way, contrasting with the effects on immunomodulatory molecules which demonstrated to dependent on androgens to be expressed. Then, new experimental groups were introduced in order to combine bacterial prostatitis with different hormonal status. Castration performed simultaneously with infection resulted in a more effective elimination of bacteria as was determined by immunohistochemistry, besides of a better resolution of inflammatory infiltration and consequent preservation of the epithelium. In correlation, TLR4 exhibited higher levels than the infected group with normal or high level testosterone. By contrast, castrated and infected animals exhibited the lowest SP-D levels, probably due to the significantly lower number of bacteria and PMNN observed in castrated animals.

Unexpectedly, prostatic gland response to infection was not restricted to the epithelial compartment; by contrast, the stroma also exhibited increase of TLR4, cellular hypertrophy, presence of protein synthesis organelles, and lost of contractile phenotype. Treatment with high testosterone doses intensified the acquisition of a secretory phenotype by smooth muscle cells, and the consequent lost of contractile characteristics, thus suggesting the existence of a synergism between androgens and stromal changes in inflammation control.

Results here gathered are highly implicated in the pathophysiology of prostatic gland. This gland demonstrated to be provided with a variety of defensive molecules, whose expression is modulated by androgens, thus contributing to an immunosupresor tone. Besides, the prostatic cells were shown to be important players in the defensive mechanisms as they were able to detect and act in response to changes in the microenvironment. On the other hand, evidence obtained here has shown that smooth muscle cells would play a pivotal role in the control of situations disturbing the gland homeostasis. Finally, experiments also indicated that levels of testosterone correlate negatively with the resolution of prostatitis, which could be the basis for future therapies.

CAPÍTULO

1

INTRODUCCIÓN

Durante varias décadas, la glándula prostática atrajo la atención de numerosos médicos e investigadores debido a su alta propensión a desarrollar enfermedades, tanto benignas como malignas, en el hombre. Esto derivó en la elaboración de importantes políticas sanitarias por parte de las instituciones y en el desarrollo de enormes industrias biofarmacéuticas. Sin embargo, la mayor parte de las investigaciones se focalizaron en el cáncer y la hiperplasia prostática, relegando el estudio de las prostatitis, que son consideradas el tercer componente de las patologías de la glándula prostática.

Este panorama comenzó a cambiar en la última década impulsado por un grupo de investigadores internacionales que, con el apoyo de los Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos, crearon una red de colaboración en investigaciones relacionadas a la prostatitis. En consecuencia, se reinició el estudio de aspectos básicos y clínicos de la próstata asociados a procesos inflamatorios. El análisis de la literatura de los últimos cinco años en este campo proporciona un gran número de trabajos científicos que tratan diversos temas fundamentales de la fisiología y patología prostáticas, incluyendo el estudio de la prostatitis por medio de modelos animales y el rol de la inflamación en el desarrollo del cáncer prostático e hiperplasia benigna.

El inicio de las cascadas inflamatorias en la glándula prostática necesita inevitablemente la participación del sistema inmune innato. Además, las moléculas implicadas en la reacción inmune están aparentemente también involucradas en el mantenimiento del crecimiento anómalo de los tejidos prostáticos. Uno de los hallazgos más interesantes relacionados a estas moléculas es que no sólo las células profesionales del sistema inmune pueden expresarlas, sino que las células residentes juegan un papel fundamental en su síntesis y regulación. En consecuencia, el estudio de la biología celular de cada uno de los compartimientos prostáticos en respuesta a los estímulos inflamatorios es un paso ineludible para entender luego los complejos signos clínicos observados en los pacientes.

Las investigaciones inmunológicas en la próstata constituyen un intrigante desafío ya que sus tres condiciones patológicas (prostatitis, hiperplasia y cáncer) representan, de una forma u otra, consecuencias de procesos inflamatorios. El presente trabajo de tesis aborda el análisis de la respuesta prostática frente a la inflamación, incluyendo el estudio de proteínas del sistema inmune innato. Por último, el escaso interés que los científicos han otorgado a las prostatitis queda reflejado en las palabras de Mike Hennenfent, fundador de la *Prostatitis Foundation*: “...**cancer is not the only prostate disease**”.

1.1 Perspectivas históricas

La glándula prostática fue descrita en los primeros estudios anatómicos de Herophilus alrededor de 350 años a.C.; lamentablemente, estos escritos se perdieron durante el incendio que destruyó la biblioteca de Alejandría en el año 391 d.C. Aunque posteriormente Galeno (131-200 d.C.) reconoció que la obstrucción urinaria podía ser el resultado de una masa que comprime la uretra, recién en el siglo XVI el médico veneciano Nicola Massa proporcionó la primera descripción precisa de la próstata (1), redescubriendo de esta forma una glándula de central importancia en la patología del tracto genital masculino.

La primera descripción científica de la fisiopatología de la hipertrofia prostática como causa de dificultad urinaria se atribuye a Jean Riolanus, cuyos estudios aparecieron en la *Opera Anatómica*, en 1649. Luego, en el siglo XVIII, surgieron importantes conceptos acerca de las causas del crecimiento prostático, tanto normal como patológico. Indudablemente, la contribución más innovadora de aquel tiempo al conocimiento de la fisiología prostática fue el descubrimiento de John Hunter en 1786, quien postuló que la castración en animales adultos produce atrofia de la glándula, fundamentando el rol hormonal en la regulación de la patogénesis del crecimiento prostático (2).

La prostatitis como entidad clínica independiente fue descrita por primera vez en 1815 por Legneau, quien notó que la inflamación de la glándula podría ser una complicación de uretritis. Sin embargo, fue Verdes en 1838 quien realizó una descripción anatomopatológica detallada de la inflamación prostática (3), que luego fue confirmada y ampliada por Young *et al.* en 1903 y publicada en 1906 (4).

En cuanto a las causas de la inflamación, a finales del siglo XIX, se creía que la prostatitis era secundaria a una “provocación” de la glándula prostática, como un enfriamiento o una indulgencia sexual, el consumo de alcohol, esfuerzos violentos o traumatismos repetidos, especialmente montar a caballo (revisado en ref. (3)). Estas teorías, muchas de ellas con poco fundamento científico, fueron relegadas al mismo tiempo que las nuevas hipótesis acerca de los microorganismos como causa de enfermedades empezaron a emerger. El tiempo transcurrido entre finales del siglo XIX y principios del XX fue un periodo caracterizado por la búsqueda de agentes patógenos que confirmaran los postulados de Koch y Virchow relacionados con los mecanismos de infecciones bacterianas (5-7). Los organismos gonocócicos fueron la causa predominante de prostatitis infecciosas durante el primer cuarto del siglo XX. En 1906

se describió la presentación clínica, la patología y la evaluación microscópica de los especímenes y del líquido prostático (4). Los análisis citológicos y microbiológicos del tracto urinario inferior referidos a infecciones prostáticas se describieron inicialmente en 1913 y se estandarizaron en 1930 (5-7), considerándose que la prostatitis tenía una etiología infecciosa. El tratamiento principal de las prostatitis en esa época era el masaje rectal repetido, pero con la introducción de la sulfamida, la terapia antimicrobiana fue el tratamiento de elección.

A partir de la década de 1950 se reconoció que había casos de prostatitis abacterianas, surgiendo dudas sobre el valor de la leucocitosis en el eyaculado (8). La época moderna en el manejo de las prostatitis se inicia con Meares y Stamey, en la que se abandona el masaje prostático como tratamiento, se racionaliza el uso de los antibióticos y se instauro el concepto de prostatitis crónica (9). Entre 1970 y 1980 Drach instauro una clasificación de prostatitis (10), la cual fue ampliamente aceptada y usada hasta hace pocos años. Esto fue seguido por un periodo activo de recolección de experiencias clínicas y conocimientos básicos de la próstata usando nuevos métodos de cultivos bacterianos, microscopía e inmunofluorescencia.

La década de 1990 fue probablemente la más fructífera en la búsqueda, detección e interpretación de datos, tantos clínicos como de laboratorio, acerca de las prostatitis (**Figura 1**). La nueva era en la investigación de esta enfermedad estuvo encabezada por jóvenes urólogos e investigadores frustrados por los antiguos conceptos en prostatitis, lo que llevó, entre otros adelantos, a la creación del *Chronic Prostatitis Collaborative Research Network*, patrocinado por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de Estados Unidos. Con la creación de esta nueva entidad hacia finales del siglo XX, se instigó la investigación en diversos aspectos básicos de la fisiología prostática y de los procesos inflamatorios de la glándula, incluyendo el estudio de nuevos modelos animales y del sistema inmune en la próstata (11). En este sentido, se desarrollaron variados modelos de inflamación prostática, incluyendo bacterianos y no bacterianos, donde el componente inmunológico se destacó como un importante factor patogénico de la enfermedad (12).

Aunque los signos de la inflamación ya aparecieron escritos en un papiro egipcio 3000 a.C., fue Celsus en el siglo I el primero en describir los cuatro signos cardinales del proceso (tumor, rubor, calor, dolor), a los que luego Virchow añadió el quinto elemento (pérdida de la función). A pesar que las respuestas inmunes adquiridas (específicas, donde están implicados linfocitos) representan aún un foco sustancial en

las investigaciones inmunológicas, durante la última década hubo un sorprendente interés en el estudio de los otros componentes innatos o inespecíficos de las defensas del huésped (13). Este resurgimiento de la inmunidad innata emergió a partir de un artículo publicado por Charles Janeway, cien años más tarde que los enunciados clásicos de Metchnikoff, donde ensayó una hipótesis de porqué los adjuvantes son necesarios para lograr respuestas inmunes efectivas (14). Según Janeway, los estímulos microbianos contenidos en los adjuvantes eran imprescindibles para activar componentes del sistema innato que luego inducirían respuestas linfocíticas productivas. Específicamente, este autor postuló que ciertos patrones conservados en microbios patógenos (**PAMPs**) son detectados por el sistema inmune a través de un grupo de receptores especializados, llamándolos *Pattern-Recognition Receptors* (**PRRs**) presentes en células del sistema inmune innato. Polly Matzinger luego sugirió que no serían PAMPs los factores claves para una inmunidad efectiva, sino mediadores endógenos producidos por células dañadas por una injuria determinada (15, 16). Si bien ambas teorías no coincidían en ese punto, el debate generado atrajo la atención de muchos investigadores al campo de la respuesta inmune innata. Fue el mismo Janeway, junto a Medzhitov, Beutler y otros, los que iniciaron la revolución en la era actual de la inmunidad innata. En 1997 se clonó el primer homólogo mamífero del gen que codifica la proteína Toll de *Drosophila* (llamado *Toll-Like Receptor 4* o **TLR4**), que había sido establecida como una molécula clave para la defensa en invertebrados (17). Las evidencias subsecuentes, confirmando que el defecto en la respuesta al lipopolisacárido (LPS) bacteriano en dos cepas de ratones se debía a una mutación de TLR4, proporcionaron el crucial “eslabón perdido” entre reconocimiento de patógenos y respuesta del huésped (18, 19).

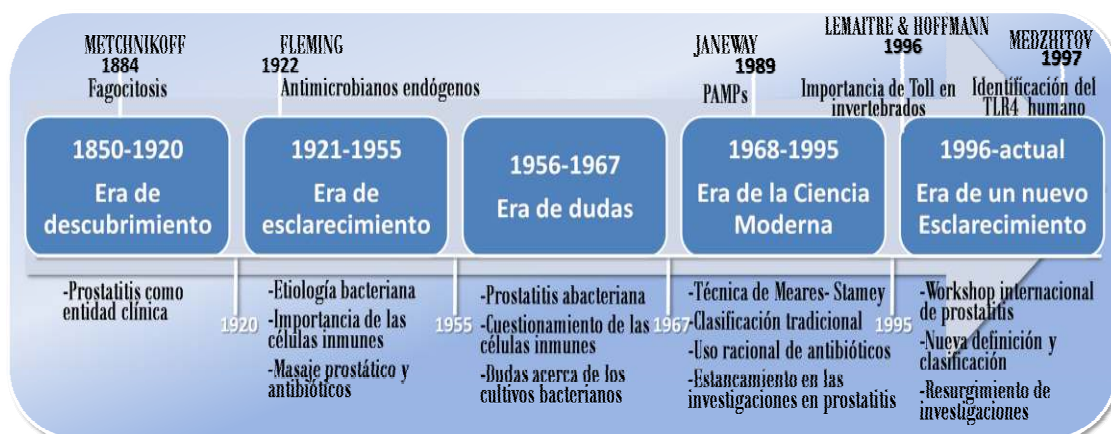


Figura 1: Cinco etapas de las investigaciones en prostatitis, con sus aspectos más sobresalientes. Por otro lado, en la parte superior se destacan cinco de los principales hitos en los estudios relacionados a la respuesta inmune innata.

El descubrimiento de TLR4 como un importante PRR desencadenó una avalancha de investigaciones relacionadas a moléculas de defensa que lleva casi una década de constantes, a veces controversiales, avances. La inmunología del siglo XXI ha ampliado sus horizontes al análisis de órganos y sistemas normalmente no asociados con el sistema inmune, así como la función del sistema inmunitario fuera de los modelos clásicos de inmunidad.

1.2 Anatomía, histología y fisiología de la próstata humana y su correlación con la glándula prostática de roedores

La próstata es una glándula accesoria del tracto genital universalmente hallada en mamíferos machos. Aunque los paralelismos fisiológicos pueden abundar, los patrones anatómicos de esta estructura son pocos. En el perro como en el hombre, por ejemplo, la próstata se encuentra íntimamente asociada al cuello vesical, mientras que en la zarigüeya muchas glándulas prostáticas se encuentran diseminadas a lo largo de la uretra. En algunos mamíferos, como en la rata, la próstata es en realidad una combinación de órganos glandulares histológicamente similares que comparten la uretra supraesfinteriana (20).

La **próstata humana**, formada por una parte glandular y una estroma fibromuscular, tiene una forma piramidal y descansa en el piso musculofascial pélvico, siendo rodeada de una fina capa de tejido conectivo. La glándula está formada por una base, un vértice y cuatro superficies: dos anterolaterales, una anterior y una posterior. La base está relacionada con el cuello vesical; mientras que el vértice está rodeado en la parte inferior por el esfínter externo, formando junto con la uretra proximal, el principal mecanismo de continencia urinaria (21). La próstata está relacionada posteriormente con el recto a través la hoja anterior de la fascia de Denonvillier; y hacia delante está fijada al pubis mediante los ligamentos puboprostáticos. La fina capa de tejido conectivo alrededor de la próstata forma la “verdadera” cápsula en la periferia del órgano, por fuera de la cual, la fascia pélvica forma la cápsula “falsa” de la glándula.

A diferencia de la humana, la **próstata múrida** (en especial la de rata y ratón) es un órgano *multilobulado* ubicado en el piso pélvico, el cual está compuesto por diferentes estructuras lobulares (**Figura 2**). Teniendo en cuenta la relación con la uretra, estos lóbulos se designan como ventrales, dorsales y laterales. Es frecuente la

descripción conjunta de los lóbulos dorsales y laterales como una unidad anatómica conjunta, denominándose próstata dorsolateral (22). Existe un cuarto integrante del complejo prostático múrido, el lóbulo anterior o glándula de coagulación, que está estrechamente relacionado con la anatomía de las vesículas seminales (23).

La próstata de roedores ha sido ampliamente usada para estudiar fenómenos fisiopatológicos de la glándula, por lo que es apropiado considerar la analogía existente entre las estructuras prostáticas de roedores y la del hombre. Clásicamente, se creía que el lóbulo ventral o próstata ventral de la rata (al igual que la del ratón) era el homólogo de la próstata humana. Aunque la embriología prostática de roedores y humanos es similar, diferenciándose a partir del seno urogenital endodérmico, en el hombre los cordones ventrales (que en los roedores dan origen al lóbulo ventral) involucionan durante el desarrollo posterior, por lo que no existiría un análogo humano directo de la próstata ventral (24). Sin embargo, la mayor parte de las investigaciones en próstata múrida han sido realizadas en ese lóbulo considerando probablemente su mejor accesibilidad dentro de la cavidad abdominal o su mayor desarrollo anatómico en comparación a los demás lóbulos.

Desde el punto de vista histológico, la glándula prostática humana puede ser dividida en tres áreas: la zona periférica, que forma alrededor del 70% del parénquima glandular, con sus conductos desembocando en la parte distal de la uretra; la zona

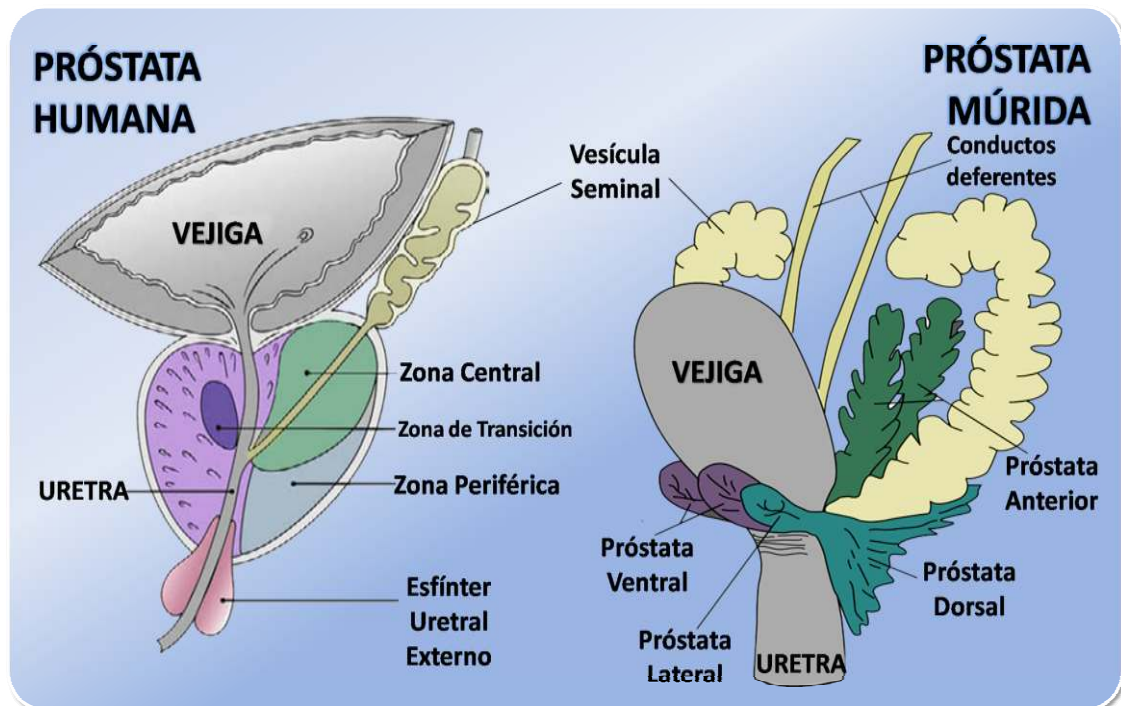


Figura 2: Esquema en vista lateral que muestra las diferencias anatómicas entre la próstata humana y el complejo prostático de roedores.

central que comprende aproximadamente el 25 % de la estructura prostática y sus conductos que convergen en uretra prostática media. Por último, la zona de transición (alrededor del 5% restante) está formada por dos pequeños lóbulos, cuyos conductos excretores desembocan en la zona uretral cercana al esfínter (25).

1.2.1 Sistema Ductal Prostático y su organización celular

La próstata forma acinos y conductos que se ramifican desde la uretra y que pueden visualizarse en forma similar a un pequeño árbol, ya que el crecimiento ocurre principalmente sobre los extremos distales a medida que los conductos se extienden y ramifican durante el desarrollo de la glándula. Algunos autores crearon el término ***Sistema Ductal Prostático*** para referirse a la unidad funcional prostática formada por todas las estructuras glandulares (acinos, túbulos, conductos, etc.) que comparten el mismo conducto excretor en la uretra (26). En el hombre, se cree que más de 30 de estos sistemas forman la glándula completa; mientras que cada lóbulo ventral de la rata está compuesto por 8 sistemas ductales (27). Teniendo en cuenta el eje de cada ***Sistema Ductal Prostático*** y la distancia desde el orificio uretral del sistema, éste puede ser dividido en tres regiones, designadas como proximal, intermedia y distal. Como se verá más adelante (**Figura 6**), existen importantes diferencias regionales tanto en el epitelio como en la estroma dentro de un mismo sistema.

A pesar de las diferencias anatómicas, las próstatas de humanos y roedores son muy similares a nivel celular. Siguiendo los conceptos histológicos clásicos, la próstata está compuesta por estructuras glandulares de tipo tubuloacinares (también conocidas como tubuloalveolares), rodeadas por una estroma fibromuscular (23). Cada sistema ductal está revestido por un epitelio cilíndrico, a menudo pseudoestratificado en el humano, formado principalmente por tres tipos celulares: células secretorias, células basales y células neuroendocrinas. El compartimiento estromal que rodea a los sistemas ductales consiste en una matriz extracelular, una sustancia fundamental y distintas células que incluyen fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliales capilares, mastocitos y axones neuronales.

Las ***células secretorias*** componen la fracción exocrina del epitelio prostático y se caracterizan como células cilíndricas altas (10 a 12 μm), que sintetizan y secretan proteínas como el ***antígeno prostático específico*** (PSA) y ***fosfatasa ácida*** (PAP) en el hombre, y ***prostatic binding protein*** (PBP) en la rata. En los preparados histológicos habituales, se reconocen fácilmente por ser las más cuantiosas del epitelio prostático y

por sus abundantes gránulos secretorios. El núcleo se encuentra en la base, justo por debajo de una zona clara (2 a 8 μm) de abundante aparato de Golgi (28). La zona apical de estas células se proyecta al lumen glandular emitiendo microvellosidades en su membrana plasmática, mientras que su superficie inferior asienta sobre la membrana basal o contactando con células basales. Las células secretorias tienen alta expresión de receptor de andrógenos (AR) y requieren de testosterona para su supervivencia, aunque su metabolito reducido, la dihidrotestosterona (DHT), es considerado más potente en la estimulación de la actividad secretoria prostática (29). Los biomarcadores más usados para identificar células secretorias prostáticas humanas incluyen PSA, PAP, AR (28); en tanto que los usados para identificar estas células en tejidos múridos son PBP, AR y PAP entre otros (30). Bhatia-Gaur *et al.* han propuesto a Nkx3.1 como un marcador de diferenciación prostático temprano, conservado aún en células secretorias cultivadas *in vitro*, y señalado como un fundamental gen oncosupresor de la próstata (31). Las células secretorias prostáticas también expresan las citoqueratinas (CKs) 8 y 18, pero no CKs 5 y 15, diferenciándose de esta forma de las células basales.

Las **células basales** residen por debajo de las células secretorias prostáticas. Sus características ultraestructurales han permitido describir adecuadamente su morfología, la cual tiene un amplio rango de presentaciones, desde pequeñas y aplanadas con cromatina altamente condensada y escaso citoplasma, hasta células cuboidales con núcleos activos. En la próstata humana, las células basales forman una capa continua que asienta sobre la membrana basal mientras que en otras especies se encuentran dispersas y en un número más reducido; siendo 1:7 la relación entre células basales y secretorias en rata, ratón y perro, mientras que en el hombre dicha relación es aproximadamente de 1:1 (32). Es interesante recalcar que las células basales no son dependientes del control androgénico para su supervivencia (33), aunque poseen una expresión baja de AR (34). El citoplasma está desprovisto de productos secretorios como PAP, siendo rico en tonofilamentos de 5 nm y CKs 5 y 14 (35-38). Aunque el papel exacto de las células basales prostáticas es esencialmente desconocido, se cree que cumplen un importante rol mediando las comunicaciones paracrinas necesarias para la homeostasis glandular. La presencia de proteínas y estructuras específicas de barreras hematotisulares en estas células, tanto en humano como en roedores, sugiere la existencia de una barrera física hematoprostática, que explicaría la deficiente concentración que alcanzan ciertas drogas en la glándula (39). Por último, el

compartimiento basal es necesariamente el reservorio natural de las células madres que da origen a las células funcionales de un determinado epitelio.

Las *células neuroendocrinas* componen un número muy reducido en la próstata adulta. Sin embargo, en el recién nacido y en ciertos periodos de la pubertad, la cantidad y la distribución de estas células cambian, haciéndose más abundantes en la proximidad de la uretra prostática. Existen dos tipos de células neuroendocrinas: el primer tipo es abierto y posee microvellosidades especializadas que protruyen al lumen; el otro tipo es cerrado, con largos procesos celulares similares a dendritas que contactan con células epiteliales vecinas (35, 36). Estas células tienen una diferenciación terminal, no proliferan y son negativas para PSA y AR, expresando en forma típica cromogranina A, enolasa neuronal específica, serotonina, calcitonina y sinaptofina entre otros productos. En 1999 Aumüller *et al.* demostraron por primera vez el origen neurogénico de estas células, representando un linaje celular diferente de las células secretorias y basales (27). Las evidencias actuales sugieren que las células neuroendocrinas regulan el crecimiento, diferenciación y la actividad secretoria del epitelio prostático por medio de factores autocrinos y paracrinos (40-44).

Las *células estromales* prostáticas son un grupo de elementos pleomórficos de origen mesenquimal, que tienen el potencial de cambiar su fenotipo celular en respuesta a alteraciones del entorno dentro de la próstata (45). El tipo celular exacto y la nomenclatura de estas células han sido poco caracterizados. Básicamente, se pueden reconocer dos tipos celulares residentes de acuerdo a estudios inmunocitoquímicos: las células musculares lisas, que expresan *alfa actina de músculo liso* (α SMA) y son negativas para *vimentina*; mientras que el segundo tipo está formado por células que expresan vimentina y son negativas para α SMA, considerado un perfil fibroblástico por la mayoría de investigadores (46). Las células musculares lisas conforman una capa continua alrededor de los acinos prostáticos, mientras que los fibroblastos, más escasos en número, se localizan en la parte periférica de la capa muscular periacinar como elementos aislados. También se suelen encontrar fibroblastos entre las células musculares y la membrana basal del acino glandular (47). La disposición de ambos tipos celulares cambia a lo largo del los sistemas ductales, siendo las células musculares más abundantes en el área proximal (**Figura 6**).

Aunque se conoce muy poco acerca de las *células inmunes* en la próstata normal, recientemente se reportó que la glándula humana posee un *sistema linfoide asociado*, similar al que poseen las mucosas de otros sitios, denominado PALT (del

inglés *prostate-associated lymphoid tissue*), el cual está conformado por leucocitos intraepiteliales (principalmente células T CD8+) y agregados linfocitarios estromales de linfocitos B foliculares y T CD4+ parafoliculares, con una importante presencia de linfocitos T Foxp3+, los cuales son altamente inmunosupresores (20, 24, 48, 49). La próstata normal posee además un inesperado número de células NK y NKT, descrito en una cepa de ratas, que teóricamente la protegerían de procesos autoinmunes y mejorarían su respuesta antitumoral (50).

1.2.2 Función de la próstata

Dado que históricamente la mayoría de los tratamientos para las enfermedades prostáticas han sido quirúrgicos, se ha prestado mucha atención a la anatomía de la próstata, relegando casi a un segundo plano las investigaciones acerca de su rol fisiológico en reproducción tanto humana como de otros mamíferos. Transcurrido los primeros años de este siglo XXI, se conoce muy poco aún acerca de temas fundamentales como la fisiología prostática o la importancia de este órgano como reservorio de patógenos responsables de enfermedades venéreas.

Como glándula accesoria del tracto reproductor, la principal función de la próstata es aportar secreciones al eyaculado. Este rol fue reconocido hace muchos años y revisado por muchos investigadores (20, 51-53). El plasma seminal contiene concentraciones altas de potasio, zinc, ácido cítrico, fructosa, fosfatidilcolina, espermina, prostaglandinas, enzimas y aminoácidos libres, muchos de ellos sintetizados y secretados por la próstata. Al estudiar el semen, se encontraron muchas proteínas con diversas funciones, desconociéndose el origen exacto de muchas de ellas, por lo que se suelen estudiar en conjunto como proteínas secretadas por las glándulas accesorias (20). Al presente, es limitado el conocimiento que se tiene acerca de las funciones de estos productos en el plasma seminal, con la excepción de las actividades enzimáticas específicas de coagulación y lisado que poseen algunas de estas sustancias en el semen. En la **Figura 3** se alistan algunas de las proteínas de origen prostático aisladas de fluido seminal humano, así como su actividad conocida. Otros compuestos secretados por las células epiteliales prostáticas humanas incluyen zinc, ácido cítrico o citrato y poliaminas.

Los estudios electroforéticos han demostrado literalmente cientos de sustancias distintas en extractos prostáticos. Como se dijo anteriormente, algunas de éstas han sido caracterizadas mejor que otras, aunque la función de la mayoría de ellas es aún

desconocida (54). El *ácido cítrico* o su sal, el *citrato*, es un ácido orgánico encontrado en el líquido prostático que ha sido utilizado como marcador biológico de estimulación hormonal en muchas investigaciones. En los seres humanos, puede actuar como agente quelante de iones metálicos. *PAP* y *PSA* son dos enzimas presentes en las secreciones prostáticas que han hallado gran uso clínico como marcadores para seguir la progresión del carcinoma de próstata (23, 30, 55). Si bien PSA constituye el principal producto secretorio de la próstata humana, los reportes acerca de homólogos en la próstata de roedores no son concluyentes (56), por lo que el conocimiento del rol de PSA en animales experimentales es limitado.

La principal proteína secretada por la próstata ventral mürida es *prostatic*

PROTEINA/GEN	PESO MOLECULAR (kDa)	PLASMA SEMINAL (mg/ml)	CARACTERÍSTICAS
Antígeno Prostático Específico (PSA)	33-36	0,70	Proteasa sérica, esterasa de arginina
Calicreína 2 (KLK2)	28.4	0,012	Activación in vivo de pro-PSA, esterasa de arginina
Calicreína L1 (KLK-L1)	Desconocido	Desconocido	Proteasa sérica
Calicreína 11	40	0,002-0,037	Proteasa sérica
Fosfatasa Ácida Prostática (PAP)	102-106	0,3-1,0	Fosfatasa de proteínas fosfotirosiladas
Transglutaminasa Prostática Específica (PTG)	17	Desconocido	Involucradas en la formación de grupos aminos primarios
Semenogelinas I y II	50.63	2 mM	Inhibe la actividad de PSA en el semen
Antígeno Específico de Membrana (PSMA)	120	Desconocido	Estructura idéntica a glutamato carboxipeptidasa II y a folato hidrolasa I
Antígeno de Células Madres Prostáticas	24	Desconocido	Antígeno tumoral asociado al cáncer de próstata
Proteína prostática específica (PSP-94) / β -Microseminoproteína (β -MSP)	10.7-16	0,6-0,9	Se encuentran también en células de otros órganos como el estomago
Immunoglobulinas	160	0,007-0,022	Con funciones inmunológicas específicas
Complement C3	178	0,018	Parte integral del complemento
Transferrina	77	0,18	Proteína plasmática que transporta hierro

Figura 3: Principales proteínas secretadas por de las glándulas sexuales accesorias en humanos, junto a sus características y funciones conocidas.

binding protein (PBP) o *prostateína* (23), que pertenece a la familia de las secretoglobinas, con propiedades inmunosupresoras e inmunomoduladoras (57). Las investigaciones iniciales propusieron a PBP como un importante regulador de biodisponibilidad intracelular de testosterona en las células epiteliales prostáticas ya que fija testosterona y otros compuestos, actuando como aceptor de andrógenos (58). En estudios más recientes, se reportó que PBP tiene además la capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos (59), la actividad fagocítica de macrófagos y la producción de especies reactivas de oxígeno (60), cumpliendo una importante función inmunomoduladora y antioxidante en el semen. Este rol inmunosupresor es también ejercido por *prostasomas*, las cuales son pequeñas organelas secretadas por las células prostáticas que poseen también actividad antiviral e inhibidora del complemento (61). Las secreciones prostáticas son conocidas también por sus propiedades antimicrobianas, que son ejercidas principalmente por el *zinc*, el cual es secretado por las células epiteliales e incrementa en procesos inflamatorios de la próstata (23, 27, 62). Otras sustancias como las poliaminas y prostaglandinas o el clásico factor antibacteriano prostático también contribuyen a las características inmunosupresoras y antimicrobianas de las secreciones prostáticas que acompañan al espermatozoide (20).

1.2.3 Regulación del crecimiento prostático

Al igual que otras estructuras propias del hombre, la próstata requiere una

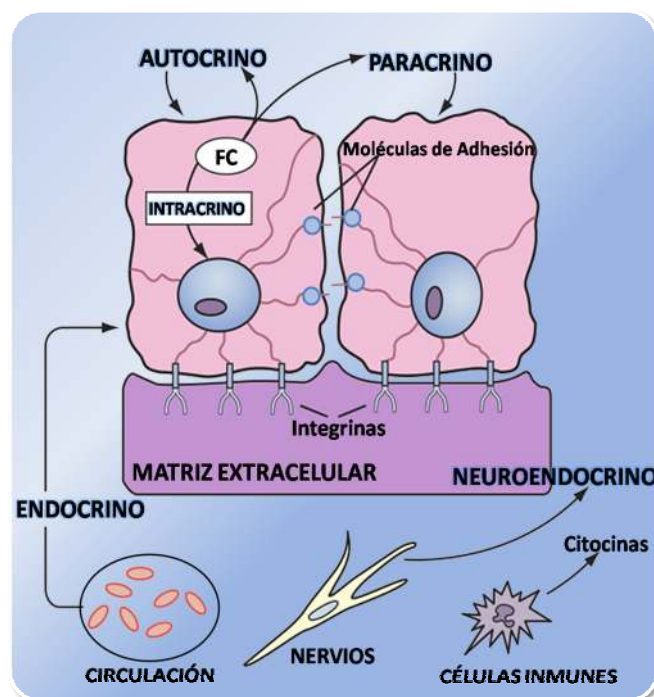


Figura 4: Mecanismos que regulan el crecimiento y la función secretoria de las células epiteliales prostáticas. FC: Factores de crecimiento.

temprana y transiente estimulación por parte de esteroides androgénicos para un apropiado desarrollo embriológico. Luego de la pubertad, también son necesarios los andrógenos en niveles continuos y constantes para asegurar el crecimiento y el mantenimiento del tamaño glandular adulto (63). Sin embargo, los andrógenos no son los únicos factores implicados en el control del crecimiento de la próstata, sino que existen múltiples niveles de regulación, que incluyen la acción de otras hormonas esteroideas, factores de crecimiento, citocinas y diferentes tipos de comunicación célula-célula, así como la interacción con la matriz extracelular (2, 23, 64, 65). Este complejo sistema de control se lleva a cabo mediante la interacción de diversas redes de señalización, como se muestra en la **Figura 4** e incluyen:

- **Factores endocrinos** o señales que arriban a la próstata por transporte sérico de sustancias originadas en órganos distantes; estas incluyen hormonas esteroideas como testosterona y estrógenos, y sustancias peptídicas como prolactina y gonadotrofina.
- **Señales neuroendocrinas** originadas en terminales nerviosas, que incluyen serotonina, acetilcolina y noradrenalina.
- **Factores paracrinos** o sustancias solubles elaboradas por células vecinas dentro de los compartimientos prostáticos. Estos factores pueden ser estimulantes o inhibidores del crecimiento e incluyen FGF, TGF, EGF, IGF y otros.
- **Factores autocrinos**, los cuales son secretados por una determinada célula y luego se unen a receptores de membrana de la misma, regulando así su propio crecimiento o función.
- **Factores intracrinos** que funcionan de manera similar a los autocrinos, pero en el interior de la célula.
- **Factores insolubles de la matriz extracelular** como glicosaminoglicanos que contactan con las células mediante integrinas y moléculas de adhesión ubicadas en la membrana basal, comunicando el citoesqueleto con componentes extracelulares.
- **Interacciones intercelulares** mediante uniones estrechas o proteínas transmembrana, incluyendo caderinas y otras moléculas de adhesión.

El mecanismo de control **endócrino** por parte de los andrógenos fue el primero en ser ampliamente estudiado en la glándula prostática. En las últimas dos décadas se han realizado importantes avances en el conocimiento de los otros sistemas de señales,

particularmente el rol interactivo de los factores de crecimiento y sus receptores en los compartimientos prostáticos.

Desde el descubrimiento de la transformación que experimenta la testosterona en dihidrotestosterona (DHT) en la próstata por Wells Farnsworth en 1963 (20), se sabe que son éstos los dos principales esteroides involucrados en el crecimiento prostático. La testosterona se convierte en DHT, diez veces más potente que aquella, por medio de la enzima 5- α reductasa presente en las células epiteliales prostáticas y en otros tejidos blancos de la acción androgénica (66). Para ejercer sus efectos, los andrógenos se unen a su receptor intracelular (AR), una proteína de 110 kDa con dominios conservados característicos, típicos de los miembros de la familia de receptores esteroideos. Estudios inmunocitoquímicos en próstata adulta de rata y humana han demostrado que el AR es abundante en el núcleo de células epiteliales prostáticas secretorias. Sin embargo, las células estromales prostáticas (fibroblastos y células musculares lisas) también expresan el AR nuclear, por lo que representan blancos de la acción androgénica en la próstata (27, 67).

Los andrógenos tienen tres principales influencias sobre las células prostáticas *in vivo* que pueden explicar los atributos estimulatorios de estos esteroides en el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de la homeostasis de la glándula prostática (20, 67-71), a saber: a) los andrógenos estimulan la proliferación, especialmente de células epiteliales; b) los andrógenos favorecen la diferenciación de células epiteliales hacia un perfil secretorio; y c) suprimen la apoptosis de células epiteliales prostáticas. En general, se cree que este potencial multiacción de los andrógenos sobre la próstata es el resultado de algunos efectos directos sobre las células prostáticas; esto implica que los andrógenos podrían regular la síntesis de componentes moleculares claves implicados en las cascadas de señales para cada uno de estos tres procesos celulares básicos. Alternativamente, estos tres mecanismos podrían compartir vías de señalización comunes, las cuales serían reguladas directamente por los andrógenos (20)

La regulación paracrina, autocrina e intracrina del crecimiento prostático se realiza mediante **factores de crecimiento**, los cuales son sintetizados y secretados por células tanto del compartimiento estromal como del epitelial. A pesar de ser un órgano de crecimiento lento, la próstata adulta contiene altos niveles de factores de crecimiento (67, 70, 72). Sin embargo, se ha propuesto que estas sustancias no estarían completamente activadas en condiciones normales, sino que se encontrarían fijadas a componentes de la matriz extracelular como heparan sulfato que actuarían modulando la

activación de los factores de crecimiento en la próstata (72, 73). Por otro lado, existe un balance entre factores que estimulan el crecimiento y aquellos que lo inhiben, que a su vez serían regulados por hormonas esteroideas. En consecuencia, la interacción de esteroides, factores de crecimiento y matriz extracelular con las células prostáticas es recíproca, dinámica y puede tener efectos tanto positivos como negativos sobre el crecimiento normal.

El **EGF** es producido principalmente por el epitelio prostático y constituye el principal factor mitogénico para las células de este compartimiento. Las células de la próstata también secretan IGFs, funcionalmente similares a insulina, los cuales están incrementados en situaciones de crecimiento patológico (43, 74). Otros factores fuertemente implicados en la regulación del crecimiento prostático son los pertenecientes a la familia de FGF, cuyo principal sitio de expresión en la glándula es la estroma. Dentro de estos factores, el FGF7 (también llamado KGF) tiene un rol fundamental en la organogénesis de la próstata y es el de mayor expresión en la glándula, seguido por FGF2 y FGF1 (74). En conjunción con TGF β , FGF2 afecta la inducción y remodelación de la matriz extracelular, actuando principalmente en el compartimiento estromal. En general, los FGF son potentes agentes mitogénicos para células estromales prostáticas, promoviendo además angiogénesis y quimiotaxis celular, con poco efecto sobre el epitelio.

Las funciones de **TGF β** y la familia de proteínas relacionadas a este factor han sido ampliamente estudiadas en la glándula prostática. De las cinco isoformas, sólo TGF β 1, β 2 y β 3 se expresan en mamíferos, siendo las dos primeras localizadas en células prostáticas. TGF β 1 es de extrema importancia en la próstata, actuando como un complejo sistema de regulación ya que en condiciones normales inhibe el crecimiento de células epiteliales y estimula a células de origen mesenquimático, con formación de matriz extracelular y angiogénesis (75). Sin embargo, ante situaciones patológicas como cáncer o hiperplasia, las células epiteliales cambian su reactividad, pudiendo ser estimuladas por TGF β 1 (76). La supresión de andrógenos produce un aumento de TGF β 1 en la próstata ventral de rata que determina importantes cambios proliferativos estromales, sugiriendo que la testosterona regula inversamente la expresión de TGF β 1 y la de su receptor (68, 77-80). Recientes estudios han determinado que este factor es clave además en la reacción estromal observada en el cáncer prostático, modulando la funcionalidad miofibroblastos (77), los cuales constituyen un tipo celular fenotípicamente similar a fibroblastos y células musculares lisas.

El complejo equilibrio entre las acciones estimulatorias e inhibitorias de los factores de crecimiento es mantenido en situaciones normales por niveles constantes de testosterona, la que a su vez posee efectos propios sobre el trofismo tisular. A pesar del gran avance en el conocimiento de los mecanismos alterados en el cáncer y la hiperplasia prostática, se conoce muy poco acerca del rol de estos sistemas durante la inflamación de la glándula.

1.2.4 Interacciones recíprocas entre el epitelio y la estroma que mantienen la homeostasis glandular

La glándula prostática constituye un sistema biológico integrado, en el cual el epitelio está en permanente “diálogo” con la estroma circundante. Las **interacciones** que se establecen entre ambos compartimientos son dinámicas, recíprocas y representan un aspecto fundamental en el desarrollo, diferenciación y crecimiento de la glándula, tanto en condiciones normales como patológicas (68, 81). Las hormonas esteroideas, en

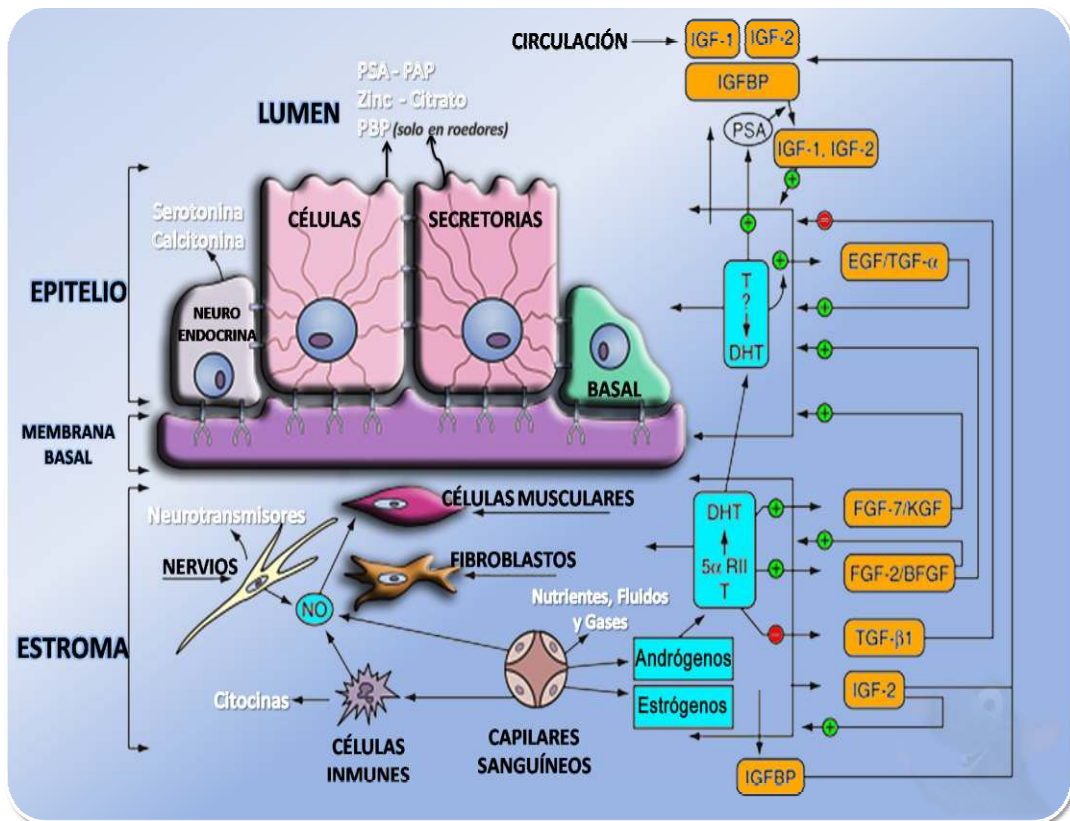


Figura 5: Complejidad de las interacciones epitelio-estromales. Los esteroides pueden actuar en forma directa sobre las células prostáticas o por medio de factores de crecimiento (en naranja). El óxido nítrico (NO) es formado en terminales nerviosas, células endoteliales y macrófagos, afectando la contracción de las células musculares. Este diálogo bidireccional entre los compartimientos mantiene la homeostasis glandular a través de factores estimulantes e inhibitorios que son producidos localmente por las células prostáticas o que pueden arribar por la circulación general. IGFBP: *insulin-like growth factor-binding proteins*. Otras abreviaturas tratadas en el texto.

particular DHT, dirigen la producción de numerosas moléculas estromales (llamadas *Andromedinas* por algunos autores) que actúan sobre las células epiteliales regulando su crecimiento y función secretoria (**Figura 5**). El espectro de andromedinas estromales incluye un gran número de enzimas de remodelación tisular, citocinas, hormonas (82) y factores de crecimiento (27) responsables del mantenimiento de la homeostasis tisular. Las hormonas esteroideas también pueden actuar sobre las células epiteliales prostáticas en forma directa estimulando la secreción de factores que regulan el comportamiento estromal, por lo que el control de las funciones prostáticas depende del balance resultante de las complejas redes de señalización paracrina entre los dos compartimientos.

La regulación que ejercen estas interacciones queda evidenciada en la existencia de variaciones regionales en los tipos celulares presentes en los sistemas ductales, que determinan procesos diferentes de acuerdo a las zonas prostáticas. Como se muestra en la **Figura 6**, el área cercana a la uretra (zona proximal) es rica en células musculares lisas, con escasos fibroblastos; mientras que el epitelio presenta células cuboidales con poca actividad mitótica y frecuente apoptosis. Por el contrario, las zonas distales de los sistemas ductales contienen abundantes fibroblastos estromales y pocas células musculares; en este sitio, el epitelio muestra una gran tendencia proliferativa (83). Se postula que la actividad de las células epiteliales es dictaminada por señales provenientes de la estroma; en consecuencia, las células musculares producirían factores inhibitorios para el epitelio (TGF β 1), mientras que los fibroblastos actuarían como potentes estimuladores de la proliferación epitelial (EGF). Según esta hipótesis, en la región intermedia de la próstata (correspondiente a la mayor parte del órgano) ambos estímulos trabajarían en concierto, manteniendo un óptimo estado funcional en el epitelio secretorio (77, 78, 84). De esta forma, en la próstata madura, los andrógenos actuarían mediante señales paracrinas emitidas por las células musculares (las cuales expresan AR) para mantener al epitelio quiescente y completamente diferenciado (85, 86).

Las investigaciones en interacciones epitelio-estromales durante el desarrollo de la próstata llevan más de 30 años de estudio. Recientemente se ha revisado la importancia de las mismas (78), destacándose que la organogénesis de la glándula depende casi exclusivamente de testosterona actuando sobre células de mesénquima, ya que aún en ausencia de AR en las células epiteliales, la próstata se desarrolla normalmente (87). Sin embargo, la presencia de AR en el epitelio es necesaria para la

expresión de proteínas secretorias, lo cual se asocia a una correcta diferenciación de las células epiteliales (76).

La comunicación bidireccional recíproca entre los compartimiento prostáticos es sensible a alteraciones del microambiente. Más aún, se postula que el inicio de la transformación neoplásica involucra una disrupción secuencial de las interacciones homeostáticas entre los diferentes tipos celulares presentes en la próstata, que resulta en la dediferenciación tanto de las células tumorales emergentes como de la estroma circundante (40, 76). Este componente estromal es llamado a menudo *estroma reactivo* y está constituido principalmente por miofibroblastos (88), un tipo celular altamente plástico originado a partir de células musculares dediferenciadas que produce un amplio espectro de mediadores capaces de controlar numerosas funciones celulares. Al cambiar su fenotipo, las células musculares ejercen una señalización anómala hacia las células epiteliales, con una pérdida progresiva del control sobre la proliferación y diferenciación epitelial. Una de las proteínas implicadas en la dediferenciación estromal es TGF β 1 (89, 90), el cual tendría un rol fundamental en el mantenimiento del proceso neoplásico; sin embargo, este factor no sería el único involucrado en este proceso, sino que la red de señales involucraría a FGF2 y otros (91). En actualidad la hipótesis de la disrupción de las interacciones epitelio-estromales es ampliamente aceptada para muchos tipos de cáncer y se están desarrollando estrategias dirigidas al estroma reactivo para disminuir el crecimiento tumoral.

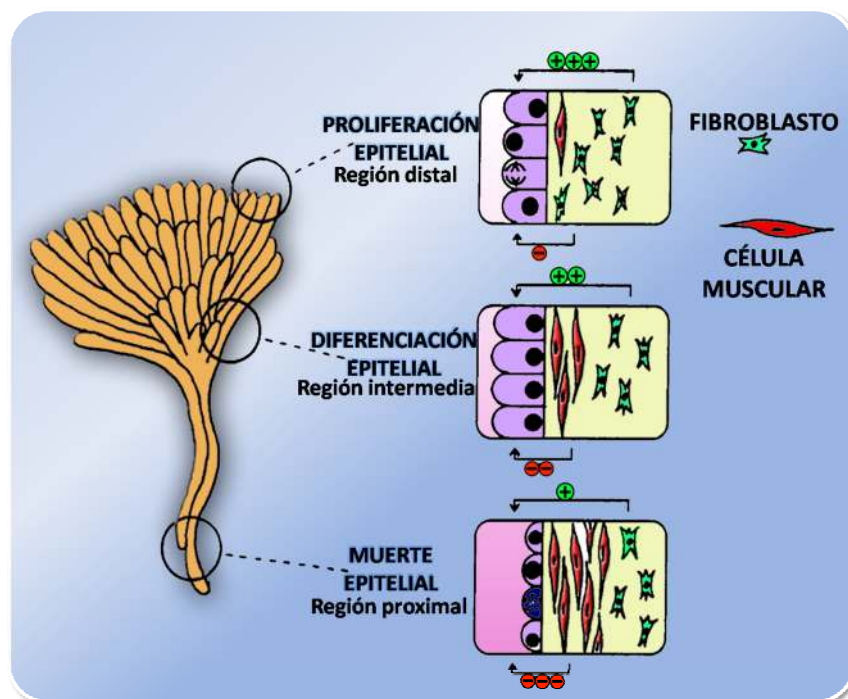


Figura 6: Efectos propuestos de la heterogeneidad celular de la estroma sobre la actividad epitelial en de los sistemas ductales prostáticos.

1.3 La prostatitis como un problemático síndrome urológico

1.3.1 Importancia médica de la próstata

Se piensa que en la mayoría de los mamíferos la próstata no posee gran importancia patológica. Por el contrario, en los seres humanos la glándula prostática muestra una marcada tendencia al comportamiento patológico, de hecho, este órgano representa el sitio más frecuente en el hombre de lesiones tanto benignas como malignas. Dentro de las glándulas accesorias del tracto genital masculino, la próstata representa el único lugar común para estas enfermedades y para procesos inflamatorios, sugiriendo ciertas particularidades en la biología celular, regulación del crecimiento y en la respuesta inmune dentro de esta glándula.

Los problemas médicos causados por la glándula prostática están aumentando a una velocidad alarmante y solo en tiempos recientes se ha establecido su magnitud e impacto en forma completa (5). Los síntomas de la prostatitis, como el dolor pélvico crónico, la disuria, dolor con la eyaculación y la dispareunia, representan un importante problema de salud a escala internacional. El impacto de esta enfermedad sobre la calidad de vida del paciente es equivalente al del Infarto de Miocardio, Angor Pectoris y Enfermedad de Crohn (6). La etiología de la prostatitis es variada y poco conocida, por lo que este síndrome ha merecido varias clasificaciones.

1.3.2 Clasificaciones de prostatitis

La patología inflamatoria de la próstata fue descrita a principios del siglo XX como un evento agudo y producido por la invasión bacteriana de la glándula (8). Más

CLASIFICACIÓN TRADICIONAL (1978)	CLASIFICACIÓN NIH (1995)	DESCRIPCIÓN
PROSTATITIS BACTERIANA AGUDA	CATEGORÍA I	Infección aguda de la próstata
PROSTATITIS BACTERIANA CRÓNICA	CATEGORÍA II	Infección crónica de la próstata
	CATEGORÍA III - SINDROME DOLOROSO PELVICO CRÓNICO -(CPPS)	Dolor genitourinario crónico en ausencia de bacterias localizadas en la próstata por metodologías estándar
PROSTATITIS NO BACTERIANA	CATEGORÍA IIIA (CPPS INFLAMATORIO)	Presencia de abundantes leucocitos en secreción prostática, semen u orina post-masaje
PROSTATODINIA	CATEGORÍA IIIB (CPPS NO INFLAMATORIO)	Número insignificante de leucocitos en secreciones, semen u orina
	CATEGORÍA IV PROSTATITIS INFLAMATORIA ASINTOMÁTICA	Signos histológicos de infección prostática

Figura 7: Clasificaciones de prostatitis. Actualmente se recomienda el uso de la clasificación elaborada por los Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos (NIH).

tarde, von Lackum clasificó las prostatitis en bacterianas activas y latentes (10). A partir de la década de 1950, los investigadores aceptaron la existencia de procesos crónicos sin hallazgos microbiológicos, denominándolos prostatitis no bacteriana (9). La clasificación tradicional de Drach *et al.* en 1978 (92) incluyó todas las formas de la enfermedad, estableciendo cuatro entidades (prostatitis bacteriana aguda, bacteriana crónica, no bacteriana y prostatodinia) que tuvieron utilidad clínica por más de dos décadas. La inflamación de la próstata fue definida en base a la presencia de leucocitos en la secreción prostática; Meares y Stamey propusieron la existencia de 10 o más glóbulos blancos por campo como un signo diagnóstico de prostatitis (93). Este parámetro tiene ciertas limitaciones debido a la dificultad de obtener secreción prostática, por lo que se sugirieron otros estudios para definir la presencia de inflamación en la glándula.

En diciembre de 1995, durante el taller sobre prostatitis organizado por NIH, se propuso una nueva clasificación de prostatitis, más adecuada para el diagnóstico y caracterización de la enfermedad. Esta clasificación reconoce al dolor pélvico como el síntoma cardinal del proceso, junto a un amplio rango de alteraciones miccionales, sexuales y psicológicas presentes en los pacientes. La nueva clasificación, presentada en la **Figura 7**, fue luego aceptada y validada por un grupo internacional de urólogos y finalmente publicada para su uso clínico en 1999 (94).

1.3.3 Aspectos etiopatológicos

Desde el descubrimiento de las enfermedades infecciosas por Pasteur y otros científicos a principios del siglo XX, los agentes microbianos han sido involucrados como agentes etiológicos en la mayoría de las enfermedades inflamatorias, inclusive las prostatitis. Aunque no caben dudas que la infección bacteriana generalizada de la próstata produce síntomas y signos de prostatitis bacteriana aguda, el rol de los microorganismos en los síndromes crónicos es esencialmente poco claro o desconocido. Por otro lado, en la actualidad se han reconocido otros factores implicados en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación prostática y del dolor pélvico.

Aspectos Microbiológicos: en los casos de prostatitis bacterianas (Categorías I y II), los agentes patogénicos más comunes son las enterobacterias (**Figura 8**), y dentro de ellas, *E. coli* uropatogénica es la responsable de cerca del 90 % de los casos agudos y crónicos (9, 93, 95). En la actualidad se estudia el rol de otros microorganismos como causantes de inflamación prostática (96). La patogenicidad de bacterias para el tejido

prostático fue confirmada para un grupo de bacterias Gram negativas uropatógenas incluyendo *E coli*, *Klebsiella spp.*, *Serratia* y *Pseudomona spp* (93, 97). Además, bajo ciertas condiciones se pueden encontrar temporariamente posibles patógenos como *Staphylococcus coagulasa negativos*, *Chlamydia*, *Ureaplasma*, *Cándida* y *Trichomonas* (96).

Muchos de los pacientes que se presentan con síntomas de prostatitis crónica suelen referir un episodio inicial de naturaleza infecciosa como uretritis o cistitis, que a veces se documenta y en otras muchas oportunidades no. Se ha especulado que si la bacteria no es totalmente erradicada al inicio del proceso, desarrolla una forma de supervivencia protectora dentro de la glándula prostática. Este mecanismo de autopreservación, llamado formación de *biofilms*, implica la adherencia de microcolonias bacterianas a la pared de los acinos o ductus, para lo cual secretan una sustancia de exopolisacáridos en la cual las bacterias sobreviven en un estado de baja actividad metabólica. Este estado de “hibernación”, sumado al glicocaliz propio de las bacterias, protege a los microorganismos de los antibióticos y de la reacción inmune dentro de la próstata (96). Ciertos agentes podrían sacar a la bacteria de este estado, permitiéndole replicarse y promover inflamación crónica. Mediante microscopia electrónica, se encontró *biofilms* en biopsias prostáticas (96), por lo que esta hipótesis explicaría algunos aspectos etiopatogénicos de las prostatitis y fundamenta el uso de antibióticos en su tratamiento.

Factores Anatómicos: existen dos anomalías anátomo-funcionales que están

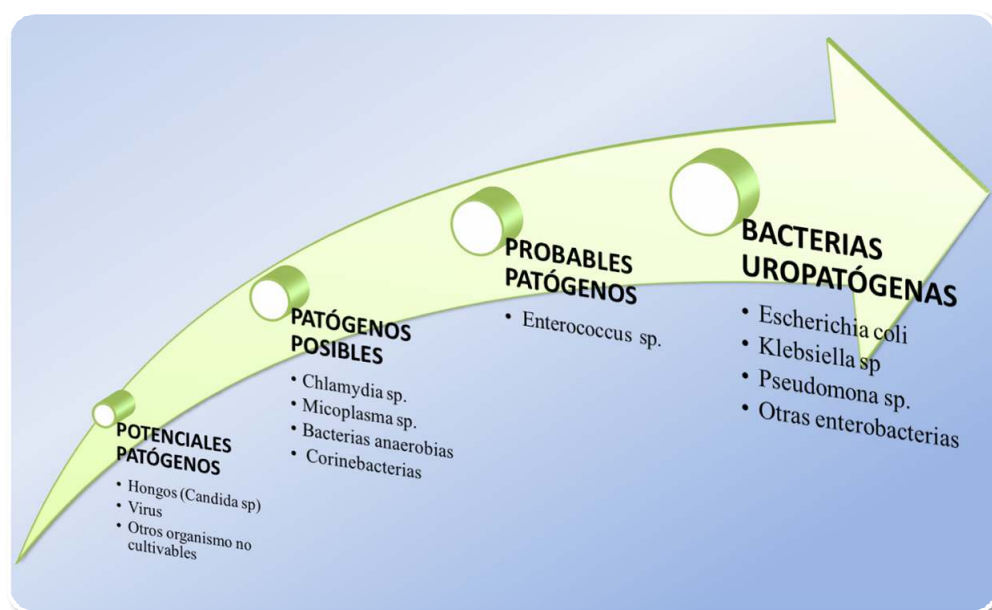


Figura 8: Agentes infecciosos implicados en la etiopatogénesis de la prostatitis.

relacionadas al desarrollo y propagación de la inflamación prostática: **obstrucción** y **reflujo urinario** (47).

La obstrucción del tracto urinario bajo, ya sea por hiperplasia prostática, disfunción del cuello vesical, disinergia del esfínter externo, estenosis uretral o del meato, o fimosis, puede causar aumento de la presión de orina al momento de la micción; tales obstrucciones producen cambios en el flujo característico de la orina en la uretra, creando flujos reversos que literalmente barren bacterias desde la uretra distal hacia el área de la uretra prostática. Dependiendo de la anatomía prostática de cada paciente, particularmente el ángulo de inserción de los ductos prostáticos en la uretra, el reflujo urinario puede invadir la glándula. En consecuencia, constituyentes urinarios tóxicos y/o microorganismos pueden contactar con los conductos y aún con acinos prostáticos, creando un ambiente propicio para la respuesta inflamatoria. Esta teoría para el inicio de la inflamación prostática, con sus consiguientes síntomas, puede explicar el beneficio de algunas terapias medicas (α -bloqueantes, finasteride) y quirúrgicas (incisión del cuello vesical) que se aplican a pacientes con prostatitis.

Mecanismos Traumáticos: desde hace tiempo se ha reconocido la importancia de los traumas perineales repetitivos como causa de dolor perineal o pélvico crónico. Observaciones recientes han incluido a ciclistas y camioneros como grupos de riesgo para desarrollar el síndrome pélvico doloroso crónico debido a este mecanismo. Según el Dr. Curtis Nickel (12, 98-100), los microtraumas perineales pueden resultar en una distrofia simpática refleja; explicando así los síntomas y signos musculares, neurogénicos y vasculares observados en algunas variantes de prostatitis.

Factores Inmunológicos: cualquier bacteria, sustancia tóxica de la orina u otro agente etiológico es incapaz de causar inflamación sin la participación de una reacción inmune. Si bien es poco probable que el sistema inmune *per se* inicie los eventos que llevan a la inflamación prostática, está íntimamente involucrado en la patogénesis y propagación de la inflamación. La presencia de PALT y células NKT en la próstata normal, más la alta concentración de inmunosupresores sugieren una estricta regulación de los procesos inmunes intraprostáticos (100); sin embargo, los datos de investigación básica y clínica indican una alta propensión a desarrollar prostatitis autoinmunes (96). Junto con la disminución de las moléculas antimicrobianas, los procesos inflamatorios prostáticos crónicos suelen asociarse en muchos casos con una reacción autoinmune contra componentes glandulares propios, como PSA en el hombre y PBP en modelos murinos (96). En consecuencia, las prostatitis crónicas podrían mantenerse por

mecanismos autoinmunes aún cuando el agente causal inicial haya sido erradicado o desaparecido.

Neuromuscular: los síntomas que experimentan los pacientes con prostatitis crónica eventualmente se desarrollan en un típico patrón de dolor neuropático con disfunción muscular local asociada (101, 102). Sin embargo, es poco probable que la desregulación del sistema neurológico pélvico sea un mecanismo primario causante de los síntomas y represente en realidad la consecuencia de las causas precedentes.

Etiopatogenia multifactorial, “la vía final”: teniendo en cuenta los posibles factores involucrados en el desarrollo y progresión de las manifestaciones clínicas de la inflamación prostática, queda claro que este síndrome no posee un simple, único y definido agente etiológico, sino que consiste en un cuadro conformado por un espectro continuo, iniciado y propagado por múltiples factores interrelacionados. La teoría más convincente considera la existencia de factores iniciadores o disparadores del proceso (infección, reflujo urinario a la próstata, trauma, tóxicos, etc.) que resultan en injuria y/o inflamación (103). Esta injuria puede alcanzar a nervios y músculos locales, e incluso comprometer tejido prostático (especialmente en caso de infecciones). La neuropatía inicial y la reacción inmunológica pueden progresar debido a la persistencia de los factores iniciadores (bacterias, trauma perineal u obstrucción del tracto); sin embargo, ambas condiciones pueden persistir aún con la erradicación o supresión de los agentes

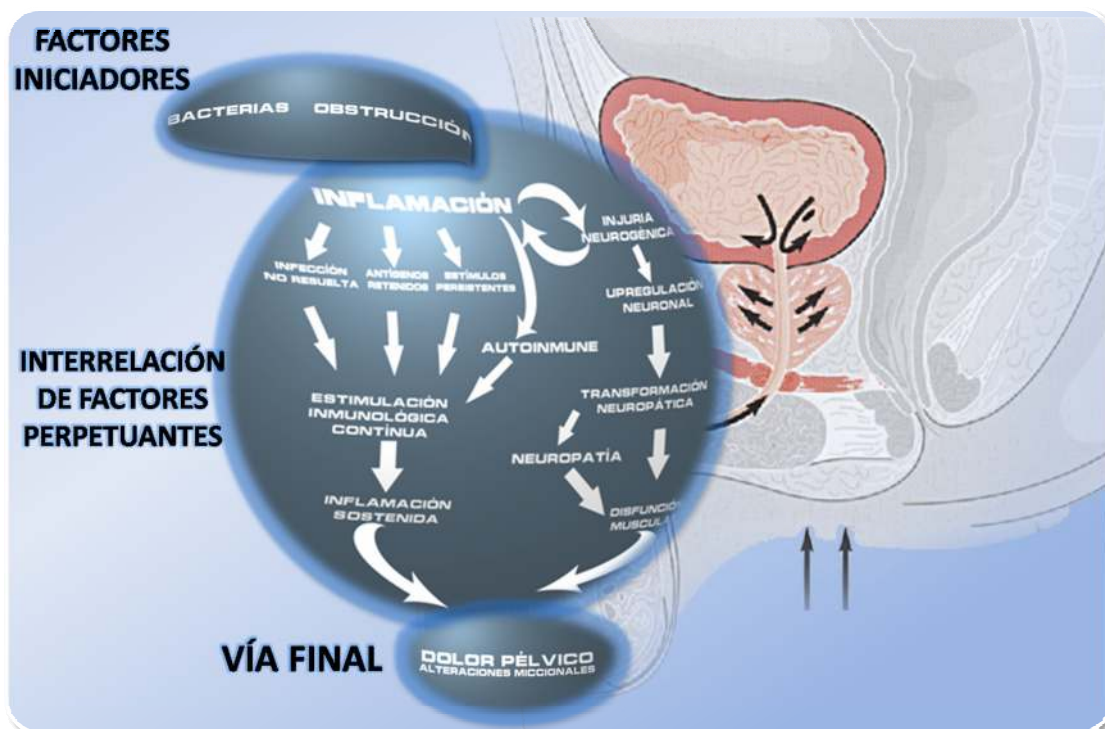


Figura 9: Factores etiopatogénicos involucrados en la patogénesis de las prostatitis.

disparadores por medio de mecanismos autoinmunes y neuropáticos crónicos, perpetuando el proceso inflamatorio (**Figura 9**).

El resultado de esta compleja red de factores patogénicos para el paciente es el dolor crónico perineal, pélvico o genital, alteraciones miccionales y varios grados de disfunción sexual, debido a la proximidad de los mecanismos eréctiles en el área. Desafortunadamente, este es el estado en el cual se presentan la mayoría de los pacientes con prostatitis al especialista en urología. El tratamiento antibiótico es importante ya que está dirigido a erradicar los potenciales agentes disparadores; sin embargo, a largo plazo, el mismo puede ser ineficaz ya que el síndrome progresa en el espectro de la enfermedad donde los factores iniciales son irrelevantes.

1.3.4 Otras patologías y su relación con la prostatitis

La prevalencia real de prostatitis a nivel histológico en ausencia de otras enfermedades prostáticas es difícil de determinar. En general, las publicaciones referidas a inflamación prostática han usado tejidos de pacientes mayores de 40 años, donde es común la presencia de células inmunes; por otro lado, el tejido prostático reacciona frente a la hiperplasia o el cáncer con infiltrado inflamatorio. Los pacientes raramente refieren haber sido examinados para confirmar o descartar el diagnóstico de prostatitis, sino que los estudios siempre conducen a evaluar obstrucciones uretrales por crecimiento benigno y/o descartar neoplasias de la próstata. Sin embargo, varios grupos de trabajo están evaluando actualmente el rol de la inflamación prostática como factor desencadenante o atenuante del crecimiento patológico de la glándula (104, 105).

1.3.4.1 Hiperplasia prostática benigna y prostatitis

A pesar de la gran prevalencia de ambas patologías, se ha prestado poca atención a la asociación entre hiperplasia y prostatitis. Clínicamente, la dispareunia representa uno de los síntomas más comunes e irritantes experimentados en forma diferencial por los pacientes con prostatitis crónica (106), mientras que los signos resultantes de la obstrucción urinaria son los más comunes en la hiperplasia. En varios estudios realizados en diferentes comunidades se ha reportado que aproximadamente el 5%-31% de los hombres con hiperplasia tienen dolor durante la eyaculación, lo que sugiere la coexistencia de ambas patologías en este porcentaje de pacientes (107). Más aún, en un reciente reporte se indica que el diagnóstico previo de prostatitis representa un factor de riesgo para el desarrollo posterior de hiperplasia prostática (102).

El estudio de los mecanismos etiopatogénicos responsables de la hiperplasia prostática benigna ha establecido un rol fundamental para la inflamación en la potenciación de los cambios histológicos hiperplásicos (108). El infiltrado inflamatorio observado en los nódulos hiperplásicos es la principal fuente de las citocinas que mantienen el crecimiento fibromuscular (revisado en (109)). La inmigración de linfocitos T al área es estimulada por los altos niveles de citocinas proinflamatorias como IL6, IL8 e IL25 (110); estos linfocitos destruirían las células del entorno, dejando espacios vacíos que son posteriormente ocupados por nódulos de tejido fibromuscular (111).

1.3.4.2 Cáncer de próstata y prostatitis

La prostatitis afecta las partes más periféricas de la glándula, coincidiendo con la localización más frecuente del cáncer prostático. Este hecho fue señalado, entre otros, por Hennenfent (112-116) quien sugirió la conexión entre prostatitis y cáncer en varios casos clínicos. Sin embargo, faltan estudios longitudinales poblacionales que evalúen la posible prevalencia mayor de cáncer prostático en pacientes con prostatitis.

Aunque la asociación entre inflamación y cáncer ha sido un punto de debate desde la clásica hipótesis de Virchow, un renovado enfoque molecular ha emergido en los últimos años (117). En la próstata en particular, varias especulaciones han apuntado a la prostatitis como factor de riesgo para el cáncer prostático (111, 118-122). Es interesante apuntar al respecto que ciertos factores de transcripción implicados en la respuesta inflamatoria como el NF- κ B, están también implicados en el desarrollo o mantenimiento de células tumorales (101). Numerosas revisiones han sido publicadas en el último lustro discutiendo el rol que juega la inflamación en la carcinogénesis (123); sin embargo, son muy pocas las conclusiones claras que se pueden obtener de los resultados hasta la actualidad. Se postula que la infección bacteriana podría actuar como un factor iniciador que, en coordinación con hormonas esteroideas y factores ambientales, llevaría a cambios histológicos crónicos que serían los precursores de las lesiones neoplásicas en la próstata (60, 123, 124).

1.4 Uso de modelos animales en los estudios relacionados a enfermedades prostáticas

El empleo de modelos animales que mimeticen condiciones patológicas humanas es de fundamental importancia para el estudio de las influencias genéticas, factores ambientales, vías de señalización molecular, así como para el éxito de estrategias terapéuticas. Los animales afectados en forma experimental por dichas patologías ofrecen una oportunidad única para revelar factores, vías y condiciones asociadas a la enfermedad, lo cual es complejo y a veces imposible de definir en el humano. En la actualidad, muchas patologías no tumorales tienen apropiados modelos animales que sirven como fuente inestimable de datos acerca de la etiopatogenia y posibles blancos terapéuticos. Se cree que la próstata del perro es muy similar a la próstata humana, de hecho, el perro es la única especie que desarrolla en forma espontánea ciertas lesiones proliferativas como el hombre (125-128). Se describieron modelos caninos de hiperplasia prostática benigna, adenocarcinoma y prostatitis (129); además, la distribución de varias drogas en el tejido prostático fue evaluada en esta especie (130). En primates, se reportaron modelos de prostatitis que permitieron confirmar la vía ascendente como ruta de infección y la importancia de la virulencia de *E. coli* en estos procesos (131). Sin embargo, las especies más usadas en los laboratorios de investigación han sido los roedores debido a su fácil manipulación y el menor costo en su crianza, mantenimiento y acondicionamiento. El uso de animales de experimentación permite estudiar, entre otros factores, la cinética de los cambios que experimenta determinado proceso patológico a través del tiempo, situación casi imposible en humanos, ya que la mayoría de los pacientes se presentan con síntomas cuando las alteraciones moleculares y tisulares llevan un prolongado tiempo. Las estrategias terapéuticas utilizadas actualmente para el cáncer e hiperplasia prostática provienen de estudios de modelos animales; por otro lado, el conocimiento de aspectos básicos como las mutaciones de genes causantes de procesos malignos y el estudio de las vías de señalización (normales y patológicas) constituye un aporte fundamental de los modelos experimentales.

1.4.1 Modelos animales de prostatitis

Numerosos modelos de prostatitis han sido desarrollados en diferentes especies. Por lo expuesto anteriormente, la mayoría de las experiencias se han realizado en rata y ratón, lo que permitió abordar diferentes enfoques en la fisiopatogenia de esta entidad

(Figura 10). El estudio de estos modelos suministró importantes conceptos como la importancia de las bacterias (132) y la obstrucción uretral en el inicio de las prostatitis (133). Naslund *et al.* (99, 134-136) demostraron experimentalmente que las prostatitis no bacterianas son el resultado de un desbalance hormonal que, junto a un perfil genético determinado, llevan a la inflamación prostática. Por otro lado, se ha indicado que las prostatitis crónicas son mediadas, al menos en parte, por procesos autoinmunes, explicando la fuerte asociación entre las formas crónicas de la enfermedad, ya sean originadas por infecciones o no (12, 137). Asimismo, los modelos autoinmunes de prostatitis demostraron que la próstata tiene una alta tendencia a reaccionar contra antígenos propios (138). Finalmente, se han descrito también formas espontáneas de

MODELO	CEPA de RATAS	SITIO de INFLAMACIÓN	CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES
ESPONTÁNEO	Wistar, Lewis, Copenhagen	PL PV	Prostatitis lateral dependiente de edad y cepa (Sprague-Dawley < Wistar < Copenhagen < Lewis) con un pico de incidencia a 20 semanas de edad. Infiltración prostática de PMN y MN.
INFECCIOSO	Wistar, Sprague-Dawley	PL PV PD	La inoculación intraprostática o transuretral de <i>E. coli</i> produce un modelo agudo (100 %), autolimitado en 50% y crónico en el resto. Ofrece la posibilidad de estudiar la influencia real de varios factores en el desarrollo de la infección. La inoculación de <i>Chlamydia trachomatis</i> en el conducto deferente puede generar prostatitis aguda en el 80 % de los animales.
INDUCIDO POR Ag PROSTÁTICOS	Wistar, Lewis, Copenhagen	PV PL PD	Inmunización simple/múltiple de homogenato de glándulas sexuales de rata, próstata de rata, PAP humana o PBP murina con CFA, que induce la acumulación de anticuerpos circulantes contra Ag prostáticos y prostatitis histológicamente (MN) detectada por 1-2 meses.
HORMONAL	Wistar, Lewis	PL PD PL	Prostatitis específica de cepa y lóbulo prostático. El 17β-estradiol produce un incremento en la incidencia y severidad de la prostatitis espontánea, que puede ser atenuada por testosterona, pero no por DHT. Testosterona induce inflamación sólo en ratas con tratamiento neonatal de estrógeno; este modelo cursa con hiperprolactinemia y acumulación de células autoreactivas en la próstata inflamada.
DEBIDO A ESTRÉS	Sprague-Dawley	PL PV PD	Estímulos de estrés (baja temperatura, cajas pequeñas, inanición) por largo tiempo (10 días) inducen inflamación prostática
POR IRRITANTES	Sprague-Dawley	PV	La Instilación transuretral de <i>etanol/ácido dinitrobenzenesulfónico (DNBS)</i> resulta en prostatitis aguda, con los hallazgos más notorios entre 24 y 48 hs. post-tratamiento.
ALTERACIÓN DE LA DIETA	Sprague-Dawley	PL PD	La administración de extractos de soja por 9 semanas o una dieta libre de soja por 11 semanas provocan prostatitis en PL/PD en el 80% de los animales, sugiriendo un rol del balance estrógenos/andrógenos en la iniciación de la inflamación.
MECÁNICO	Wistar	PV	Prostatitis producida por obstrucción parcial de la uretra, con edema e infiltración de PMN y MN, más prominentemente al tercer día, debida probablemente a reflujo urinario intraprostático.

Figura 10: Principales modelos de prostatitis desarrollados en rata. En algunos de ellos (como el infeccioso), el agente causal es único y bien definido, mientras que en otros (hormonal, espontáneo y por estrés entre otros) la etiología es multifactorial y relacionado a la especie y cepa de animal. PMN: células polimorfonucleares; MN: células mononucleares; PL: próstata lateral; PV: próstata ventral; PD: próstata dorsal; CFA: Adyuvante Completo de Freund.

inflamación prostática, donde no existe un único elemento causal, sino que la edad avanzada junto con otros factores serían los responsables de la enfermedad en estos animales (12).

El estudio de modelos animales tiene ciertas limitaciones, como el análisis de mecanismos moleculares, los cuales son investigados frecuentemente en condiciones *in vitro*. En este sentido, aproximadamente 30 líneas tumorales humanas, que representan varios grados de cáncer prostático, han sido descritas y usadas como poderosas herramientas en estudios *in vitro* para resolver numerosas incógnitas (139). Sin embargo, la prostatitis es una entidad inflamatoria, no neoplásica; en consecuencia, los cultivos celulares de próstatas normales o inflamadas tienen un valor limitado debido a la restringida vida media que poseen las células prostáticas no tumorales (140).

1.5 Rol de las células residentes en el desarrollo y control de la inflamación

La inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector cuyo objetivo final es liberar al organismo de la causa inicial de lesiones celulares. Clásicamente, este proceso ha sido caracterizado por medio del estudio de células inmunes que infiltran el tejido dañado. De este modo, la inflamación ha estado siempre asociada al análisis de células profesionales como macrófagos, polimorfonucleares y linfocitos que arriban al sitio de injuria. Evidencias recientes han demostrado que los agentes invasores contactan primero con las células residentes o parenquimatosas de los órganos; en consecuencia, es indudable que existe un fluido diálogo entre estas células (principalmente epiteliales) y los elementos del sistema inmune innato que inician la respuesta inflamatoria. Esta hipótesis ha sido confirmada en los sistemas respiratorio, digestivos y, en menor medida, en el tracto genitourinario; quedando aún por esclarecer numerosos mecanismos y regulaciones de moléculas implicadas en la reacción inflamatoria de estos tractos y de otros sitios del organismo.

1.5.1 Generalidades del Sistema Inmune Innato

Los mamíferos en general son capaces de sobrevivir a múltiples desafíos infecciosos en ausencia de elementos inmunes específicos preexistentes debido a la efectividad de un conjunto de mecanismos protectores que no dependen del reconocimiento antigénico específico. Estos mecanismos antígeno-independientes

constituyen la inmunidad innata y se caracterizan, entre otras cosas, por no desarrollar memoria inmunológica y ser de rápida respuesta. Tanto la importancia como la eficiencia del sistema inmune innato radican en tres funciones principales (141, 142):

- a) Reconocimiento o detección de microorganismos patogénicos
- b) Eliminación de los patógenos una vez reconocidos
- c) Preservación de los tejidos del huésped (tolerando antígenos propios)

Para cumplir con estos roles, el sistema inmune está preparado con dos tipos de “armas”: las **aférentes** o de reconocimiento y las **eférentes** o efectoras; las primeras para percibir la infección y las segundas para erradicarla.

Por otro lado, los componentes de la inmunidad innata incluyen elementos celulares y humorales o solubles, ambos provistos con “armas” aferentes y eferentes como lo muestra la **Figura 11**. En general, el grupo de moléculas implicadas en estos procesos se conoce frecuentemente como *proteínas de defensa del huésped* (en inglés *Host Defense Proteins*).

Mecanismos aferentes o de detección: la estrategia principal de la inmunidad innata radica en que un número limitado de receptores reconozcan patrones moleculares microbianos conservados y compartidos por el enorme grupo de agentes infecciosos (141). Las moléculas blanco son componentes indispensables de los microorganismos,

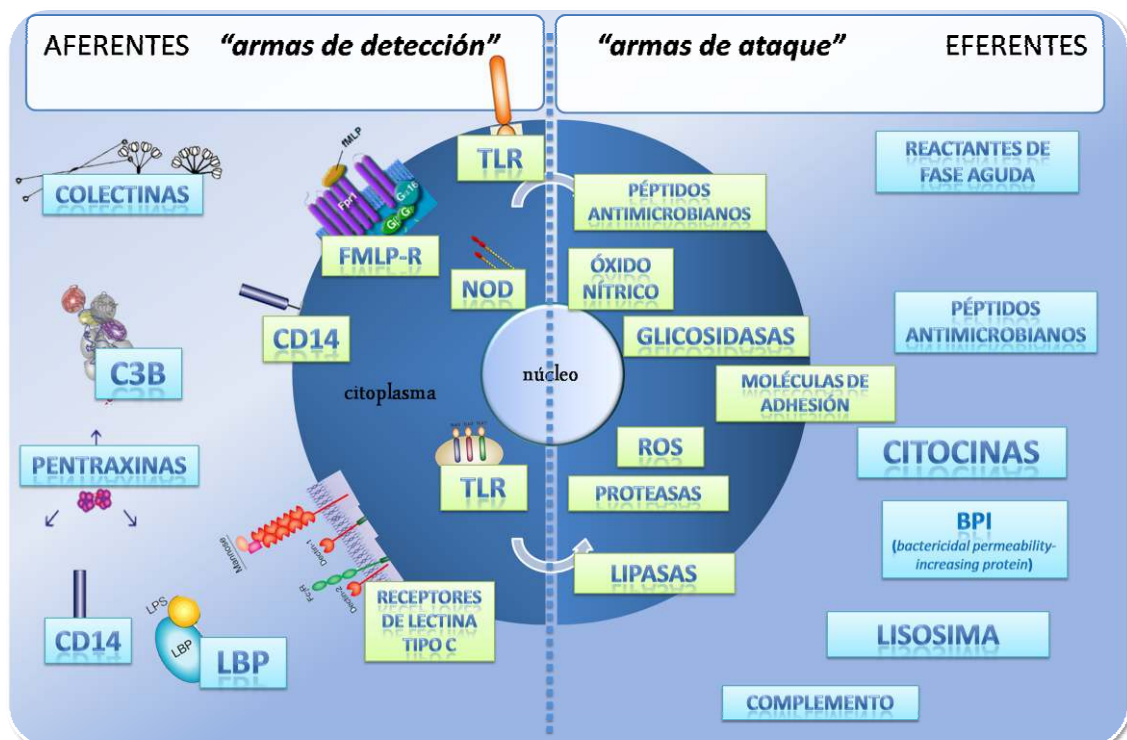


Figura 11: Mecanismos aferentes y eferentes del sistema inmune innato para la defensa del huésped. Algunas moléculas son intracelulares o ancladas a membranas, mientras que otras cumplen roles solubles o humorales, tanto en el reconocimiento como en la eliminación de patógenos.

por lo que no pueden alterarse rápidamente por mutación y selección. Por otro lado, estos receptores sólo detectan patrones de agentes extraños, siendo indiferentes a componentes propios del huésped, lo cual constituye la base de la discriminación entre lo propio y lo extraño por parte del sistema inmune innato. A partir de la última década, se emplea la sigla **PRRs** para nombrar a las moléculas capaces de reconocer agentes infecciosos; mientras que se designan como **PAMPs** aquellas características estructuras microbianas que son detectadas (143).

Los receptores tipo Toll (**TLRs**, del inglés *Toll-like Receptors*) desempeñan un rol único y esencial en el reconocimiento de patógenos y señales de daño tisular. Los TLRs comprenden una familia de receptores integrales de membrana, caracterizados por un dominio extracelular rico en leucinas y un dominio intracelular TIR (Toll/IL-1 receptor) similar al del receptor de IL1 (17). Hasta el momento se han descrito 10 clases de TLRs en humanos (TLR1-10), mientras que los TLR11, TLR12 y TLR13 se encontraron sólo en ratones (141). La activación de estos receptores desencadena una cascada de señales intracelulares que culmina con la translocación nuclear del **factor de transcripción NF- κ B**, activando genes implicados en la respuesta inmune como IL1 β , TNF α , IL6 y péptidos antimicrobianos (**Figura 12**). Por otro lado, la capacidad de los TLRs para inducir la maduración de células dendríticas e iniciar una respuesta inmune específica los convierte en las puertas de entrada al sistema inmunológico.

TLR4 es el PRR más estudiado, siendo el primer TLR clonado en mamíferos (144). TLR4 reconoce específicamente el LPS presente en la pared celular de bacterias Gram negativas como *E. coli*. Además, TLR4 posee otros activadores de origen bacteriano y una serie de ligandos endógenos que incluyen Hsp60 (*Heat Shock Protein 60*) y otras señales de daño liberadas por células muertas (145). TLR4 se expresa en muchos tipos celulares, predominantemente en células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. TLR4 también se encuentra en numerosas células no hematopoyéticas incluyendo endoteliales, fibroblastos, células epiteliales y musculares.

Otro grupo de PRRs está conformado por moléculas solubles, secretadas por células del sistema inmune, que reconocen PAMPs al igual que los TLRs, pero con funciones de defensa diferentes. Algunas de estas sustancias, como LBP y CD14, son necesarias para la activación de PRRs anclados a membranas (146-148). Los dos roles fisiológicos principales de los PRR secretados son la activación del complemento y la

opsonización de microbios para su posterior fagocitosis. Además, muchas de estas moléculas tienen funciones bactericidas o antimicrobianas directas.

Las **colectinas** forman un conjunto de PRRs solubles estructuralmente relacionadas y caracterizadas por la presencia de un dominio lectina tipo C, encargado de la detección de carbohidratos microbianos, y un dominio colágeno encargado de las funciones efectoras como la activación de la cascada del complemento (149, 150). Las **proteínas surfactantes A y D (SP-A y SP-D)** son colectinas descritas originalmente en pulmón, donde son secretadas al fluido alveolar (151). Posteriormente, se encontró que SP-D también se expresa en otras superficies mucosas como la del tracto genital masculino y la del femenino (152). Tanto SP-A como SP-D interactúan con una amplia variedad de patógenos, desde bacterias hasta virus y hongos, reconociendo residuos monosa terminal, fucosa y N-acetilglucosamina presente en la superficie de estos patógenos. La principal función de SP-D es la opsonización de microbios, con la subsecuente fagocitosis; para ello, esta colectina se fija a receptores Gp340 expresados en macrófagos y células epiteliales. Por otro lado, SP-D posee funciones antimicrobianas directas interrumpiendo la continuidad de las membranas de patógenos (153).

Mecanismos eferentes o efectores: las proteínas del **complemento**, **lisosima** y **lactoferrina** son las sustancias clásicamente citadas en este campo. La lisosima, descubierta por Alexander Fleming en sus propias secreciones nasales (154), se encuentra en muchas secreciones corporales y destruye la pared celular tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas a través de mecanismos enzimáticos (154). Sin embargo, estos compuestos son sólo una escasa muestra de la sorprendente capacidad bactericida de nuestras defensas. El sistema inmune innato posee una amplia variedad de mecanismos efectores encargados de destruir agentes infecciosos que difieren en su inducibilidad, mecanismo de acción, sitio de expresión y actividad contra diferentes clases de patógenos. Estos mecanismos antimicrobianos pueden ser clasificados en (155, 156):

- **Enzimas que hidrolizan** componentes de la pared celular microbiana (lisosima, quitinasas, fosfolipasa A2).
- **Péptidos y proteínas antimicrobianas** que rompen la integridad de la pared bacteriana (defensinas, catelicidinas, complemento, proteína cationica de los eosinófilos).
- **Serin proteasas microbicidas** (familia de serprocidinas).

- **Proteínas que secuestran iones** hierro y zinc (lactoferrina, calprotectina).
- **Enzimas que generan ROS** -especies reactivas de oxígeno- y derivados nitrogenados tóxicos (mieloperoxidasa, oxido sintasa, oxidasa).

El principal sitio de expresión de estas moléculas son los granulocitos (en especial neutrófilos), macrófagos y superficies epiteliales. Es importante recalcar que la actividad antimicrobiana de la mayoría de estos efectores fue demostrada *in vitro*; mientras que el rol fisiológico *in vivo* de estas proteínas de defensa ha sido establecido sólo para algunos de estos productos (157).

Las **defensinas** son pequeños péptidos catiónicos con un amplio espectro de actividad antimicrobiana (154). Las defensinas matan microorganismos mediante la formación de poros dependientes de voltaje en sus membranas. La selectiva toxicidad de estos péptidos para células procariontas se explica por las diferencias en la composición fosfolipídica entre las membranas celulares de microbios y las del huésped y por la ausencia de colesterol en las membranas de las células microbianas. En mamíferos se han descrito tres familias de estos péptidos: α , β y θ defensinas. Las α -

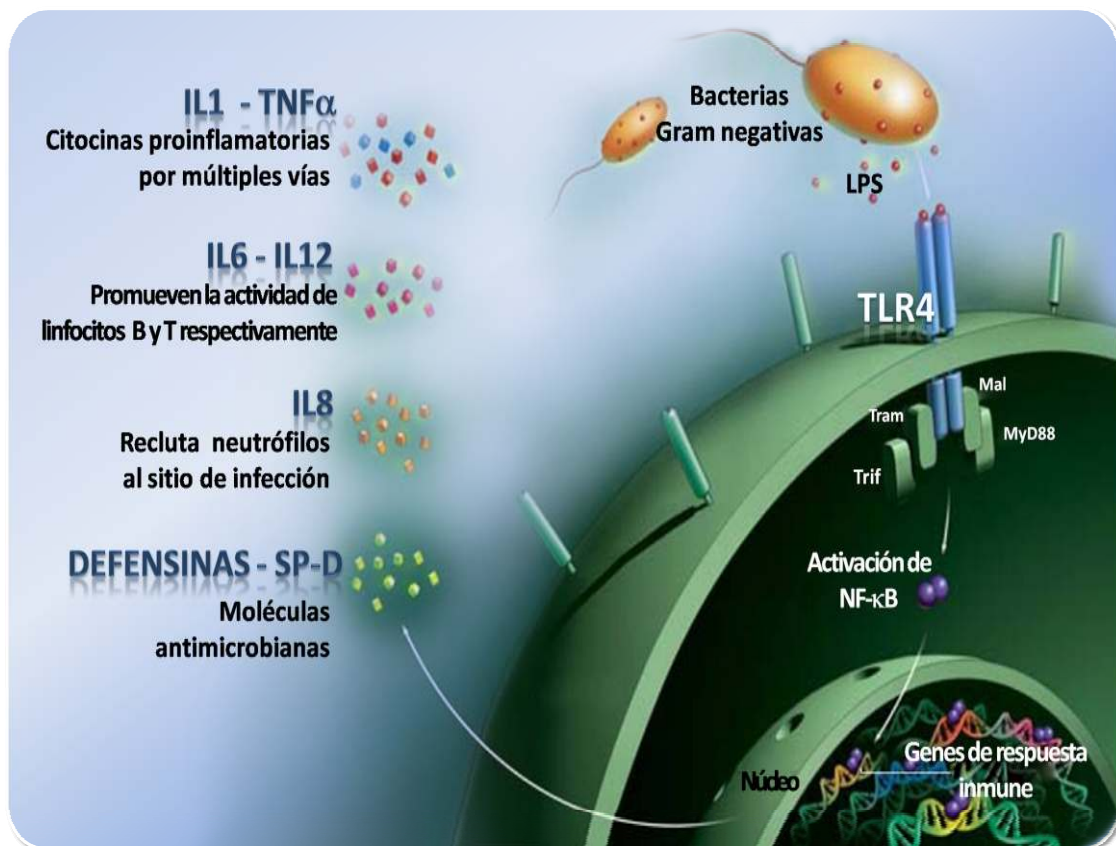


Figura 12: Esquema de la respuesta inmune innata desencadenada por bacterias Gram negativas. El reconocimiento del LPS bacteriano por TLR4 culmina en la translocación nuclear de NF- κ B con la consiguiente activación de genes de la inmunidad innata.

defensinas generalmente se almacenan presintetizadas en gránulos de neutrófilos y en las células intestinales de Paneth (154). Por el contrario, las ***β-defensinas*** son producidas por células epiteliales y, en la mayoría de los casos, no almacenadas en gránulos citoplasmáticos. Las β-defensinas son controladas principalmente a nivel transcripcional y son inducibles por productos microbianos (a través de TLRs) y por citocinas proinflamatorias (141, 154, 158-161).

Células del sistema inmune innato: a diferencia de los receptores antigénicos de la inmunidad adaptativa que se encuentran exclusivamente en linfocitos, los componentes de la inmunidad innata se expresan en varios tipos celulares. De hecho, algunos receptores intracelulares, como los implicados en la detección de virus, se localizan en casi todos los tipos celulares estudiados. En este sentido, los mecanismos innatos de defensa no son la función única de un reducido número de células especializadas; por lo contrario, variados tipos celulares cumplen roles específicos en la respuesta inmune innata además de sus funciones específicas no relacionadas al sistema inmunológico. Entre estas células se encuentran las epiteliales y fibroblásticas que, junto con macrófagos, neutrófilos, células NK y dendríticas, basófilos, eosinófilos y células cebadas, cubren el espectro de componentes celulares del sistema inmune innato (161, 162).

1.5.2 Las células epiteliales como elementos del sistema inmune innato

Todas las superficies expuestas del cuerpo humano, incluidas la piel y los tractos digestivos, respiratorios y genitourinarios, están recubiertas por células epiteliales fuertemente unidas entre sí, formando una importante barrera física que separa los tejidos estériles del huésped del medio exterior plagado de agentes infecciosos. En la superficie de algunas de estas células se expresa también mucina, que previene el contacto directo de patógenos con el epitelio, evitando a su vez la invasión microbiana. En consecuencia, las células epiteliales ocupan una posición estratégica, que las convierte en las principales candidatas para iniciar y orquestar la respuesta inmune a través de una variedad de moléculas protectoras para la mucosa, ya que son los primeros componentes del huésped que contactan con los agentes invasores.

Las células epiteliales son capaces de detectar una amplia variedad de patógenos ya que expresan numerosos receptores de reconocimiento como ***TLRs*** y los de la familia ***NOD-like receptors*** (NLRs) (155, 156, 163, 164). Una vez activados, estos receptores desencadenan una cascada de señales que finaliza con la sobreexpresión de

genes que participan en la respuesta inmune innata (**Figura 12**). Básicamente, las células epiteliales invadidas por microorganismos se defienden mediante tres mecanismos efectores, que pueden ocurrir en forma progresiva o simultánea, dependiendo del agente, de la célula y del tiempo de exposición: 1) secreción de sustancias antimicrobianas al lumen en el caso de las diferentes mucosas; 2) liberación de citocinas y quemocinas hacia la submucosa, lo que lleva a la activación de mecanismos inflamatorios específicos; 3) muerte de la célula infectada mediante procesos apoptóticos. De este modo, la reacción inflamatoria es iniciada por las células epiteliales e incluye posteriormente la llegada de células fagocíticas que remueven los microorganismos remanentes así como los restos de la muerte celular (156). Además, la activación de células dendríticas asegura el inicio de la respuesta inmune específica.

La secreción de sustancias antimicrobianas es uno de los mecanismos efectores más eficientes de las células epiteliales en la defensa del huésped. En los últimos años se han descrito una gran variedad de proteínas, péptidos, iones metálicos y otras sustancias con potente actividad microbicida que, en la mayoría de los casos, son liberadas en forma constitutiva hacia las secreciones (165). La familia de las *defensinas* se encuentra principalmente en células epiteliales del aparato respiratorio y digestivo, donde además pueden incrementar sus niveles luego de la invasión bacteriana. La *βdefensina-1* (*βDEF-1*) tiene un amplio espectro bactericida incluyendo bacterias Gram positivas y negativas y se expresa en forma constitutiva en los queratinocitos de la piel y en numerosas células epiteliales a nivel del tracto gastrointestinal, respiratorio y urogenital (165). Tanto la forma natural como la recombinante de β DEF-1 tienen una potente actividad antimicrobiana contra varias cepas de *E. coli* a concentraciones micromolares, efecto que no es modificado por pH ácido (147). En consecuencia, este péptido tendría una importancia fundamental en los mecanismos de defensa de la orina (166). El *SP-D* es una proteína relacionada al surfactante pulmonar, con importantes propiedades microbicidas en el pulmón (167); se reportó además que SP-D tiene importantes funciones de defensa en el tracto reproductor femenino ya que inhibe la infección por *Chlamydia* en células epiteliales de este sitio (158, 159, 168). Una particularidad de las defensinas y SP-D es que tienen la capacidad de unirse a TLRs (158, 169, 170), modulando la respuesta inmune innata además de sus efectos antibióticos propios. Estudios actuales sugieren que los compuestos antimicrobianos pueden expresarse en la mayoría de las superficies epiteliales, cumpliendo además roles diferentes a los descritos, específicos para el sitio de expresión (171-173).

La señalización proinflamatoria a través de *citocinas* y *quemocinas* por parte de los epitelios es indispensable para reclutar y activar células fagocíticas al sitio de infección. La secreción epitelial de *IL8* provoca la rápida llegada de neutrófilos al lugar de la infección; mientras que las citocinas *IL6*, *IL1 β* y *TNF α* , entre otras, aseguran la activación de otras células inmunes, lo que favorece la propagación de la reacción inmune (174). Se ha demostrado que las células epiteliales también expresan *las citocinas antiinflamatorias IL10* y *TGF β 1* para resolver el proceso flogótico (56, 175), evitando los efectos dañinos de la inflamación a los tejidos; esto es particularmente útil en sitios como el testículo, placenta o el globo ocular, donde los efectos deletéreos de la inflamación son similares o superiores al producido por el agente invasor. Además de estas citocinas, los epitelios sintetizan otras proteínas con propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras; una de las más caracterizadas es la familia de las *secretoglobinas*, la cual está compuesta por varios miembros que se expresan en las células epiteliales del tracto genital femenino, pulmón y vías urinarias entre otras (176). *Uteroglobina*, principal miembro de esta familia, inhibe la actividad de fosfolipasa A₂ e impide la quimiotaxis de neutrófilos, su expresión aumenta en procesos inflamatorios y se postula que cumple importantes roles en la implantación embrionaria en el útero (177-179). Otro grupo de proteínas con actividad inmunomoduladora está constituido por las *galectinas*, cuyo rango de expresión incluye las células macrófagicas, linfocitos y células epiteliales de sitios inmunoprivilegiados, donde normalmente las respuestas inmunes están suprimidas (180). *Galectina-1 (GAL-1)* es una proteína que ha sido involucrada en múltiples fenómenos de inmunomodulación, adhesión celular, regulación del crecimiento, inflamación, embriogénesis, reproducción, proliferación y metástasis celular (177). Particularmente, GAL-1 produce apoptosis de células T y tiene una localización preferencial en sitios inmunológicamente privilegiados del organismo, donde opera para asegurar una rápida eliminación de células inflamatorias (162, 181). Además, esta proteína es capaz de inhibir específicamente los signos inflamatorios generados por metabolitos del ácido araquidónico (182, 183).

Recientes evidencias de varios laboratorios indican que la reacción epitelial inicial a la injuria repercute fuertemente en la inmunidad antígeno-específica, sugiriendo que la respuesta inmune lograda por el huésped depende principalmente de las señales definidas por el microambiente local. En este sentido, se considera que las células epiteliales tienen la capacidad incluso de instruir la activación de células presentadoras de antígenos y regular las respuestas inmunes tanto T_{H1} como T_{H2} (184).

En consecuencia, el estudio de las células epiteliales como elementos del sistema inmune innato tiene importantes implicancias en la regulación de las homeostasis de las mucosas durante los procesos infecciosos e inflamatorios.

1.5.3 Moléculas protectoras en el sistema reproductor masculino

El aparato urogenital representa un sistema abierto al exterior, vulnerable a la invasión por parte de microorganismos y con la presencia, en algunos sitios, de flora bacteriana normal (185). El resurgimiento de las enfermedades venéreas, particularmente el SIDA, hace suponer que el análisis de la interacción inicial patógeno-huésped y la reacción inflamatoria posterior sean campos de investigación actuales y prósperos, ya que el tracto genital constituye la principal vía de infección. Sin embargo, el estudio de la inmunidad innata en este sitio es escaso y limitado a algunos hallazgos aislados, principalmente en epidídimo y uretra. El efecto **antibacteriano del semen** es un concepto clásico (186) que no se caracterizó completamente por mucho tiempo; el origen, naturaleza y regulación de la/s sustancia/s responsables de esta función aún no se conocen en forma exacta. Se ha reportado un importante número de moléculas con este efecto que incluyen péptidos catiónicos como *defensinas* y *catelicidinas*, secretadas principalmente por el epidídimo (187). Recientemente, la familia de las *semenogelinas*, moléculas encargadas de lizar el coagulo seminal, ha sido también implicada en potentes respuestas antibacterianas (188). En cuanto al aporte de la próstata a la actividad antimicrobiana del semen, se conoce que el zinc secretado por las células epiteliales cumple roles antibacterianos y es modulados durante las inflamaciones prostáticas.

Por tratarse del aparato genital masculino, es inevitable que todas estas moléculas estén subordinadas al control por parte de las hormonas androgénicas; sin embargo, se encuentran escasos trabajos que mencionen este tipo de regulación en cualquiera de los órganos. Por otro lado, cabe recalcar que el término *moléculas protectoras* hace referencia, en este caso, al rol ejercido básicamente sobre el espermatozoide, ya que la función primordial del sistema reproductor es entregar adecuadas gametas para la fecundación y, por consiguiente, la perpetuación de la especie.

Considerando los mecanismos de reconocimiento bacteriano, el sistema urogenital expresa **LBP** en epidídimo (189), mientras que el ARNm de varios **TLRs** se encuentra en todo su trayecto (190, 191), aunque la regulación y la funcionalidad de

estos receptores son poco conocidas en el tracto reproductor; es probable que además de las funciones inmunológicas propias, los *TLRs* cumplan importantes roles en la reproducción ya que se encuentran ampliamente expresados en ambos sistemas genitales (30).

La protección antimicrobiana para el espermatozoide es una de las funciones fundamentales del sistema reproductor; sin embargo, la gameta masculina haploide constituye un elemento extraño para los tejidos del huésped, por lo que el tracto genital se encarga también de protegerla “enmascarándola” de posibles reacciones inmunes. En términos generales, esto se logra manteniendo un tono inmunosupresor en el líquido seminal y limitando las respuestas inflamatorias. Para ejecutar estas funciones, las células epiteliales del sistema reproductor secretan sustancias *inmunomoduladoras* e *inmunosupresores*. Si bien se han reportado numerosas sustancias con estas propiedades en el semen, los mecanismos son poco conocidos. Entre los miembros de las secretoglobinas, *uteroglobina* se encuentra en el semen humano (57, 58), pero su sitio de síntesis aún no está esclarecido; otro componente de la familia, *PBP*, se sintetiza en las células prostáticas y representa la principal proteína de las secreciones prostáticas (176, 192). Como se dijo anteriormente, PBP tiene potente actividad antiinflamatoria inhibiendo la fagocitosis y la síntesis de citocinas proinflamatorias (46). Otra proteína inmunomoduladora que se encuentra en el tracto genital es *galectina-1 (Gal-1)*, que tiene una expresión altamente regulada en testículo y próstata (133). Si bien no hay reportes acerca de sus funciones exactas en la reproducción, es innegable que el rol inmunomodulador de Gal-1 le garantizaría al espermatozoide un adecuado tránsito a través del tracto, eludiendo reacciones inmunes adversas.

La gran mayoría de los estudios se centraron en la importancia de las células inflamatorias, dejando a un segundo plano las alteraciones de las células residentes del tejido prostático, por lo que el rol de las células epiteliales y estromales prostáticas en la inflamación constituye un área aún no esclarecida

1.6 Particularidades de la inflamación prostática que fundamentan los Objetivos Planteados

La próstata es el sitio del tracto genital masculino más propenso a desarrollar procesos inflamatorios y alteraciones del crecimiento celular. Es notable que otras estructuras semejantes (las vesículas seminales por ejemplo), sometidas a los mismos antígenos y bajo control hormonal similar al de la próstata, no manifiesten patologías

del mismo modo ni en la frecuencia que ésta lo hace. Los investigadores han desarrollado ciertas hipótesis que pueden explicar algunos aspectos de la glándula; se ha indicado por ejemplo que la próstata representa un sitio de inmunoprivilegio, donde las respuestas inmunes están normalmente suprimidas. Esta teoría está además avalada por la alta secreción de inmunosupresores y por la presencia de una barrera hemato-prostática que restringe el libre tráfico de sustancias y células inmunes. En este ámbito, las lesiones prostáticas se desarrollarían sin la vigilancia estricta del sistema inmune que controle las alteraciones en etapas tempranas. Sin embargo, hay que destacar que muchos de estos postulados no están confirmados completamente; por el contrario, un estudio reciente incluye a la próstata entre los sitios con tejido linfoide asociado, similar a la mucosa intestinal y respiratoria (193). Este mismo estudio sugiere que mediadores provenientes de las células epiteliales prostáticas regularían la población de linfocitos y resalta la importancia de las células estromales en la formación de folículos linfáticos en la próstata normal. Aunque la inmunología de la próstata se ha convertido ahora en una nueva área de investigación en urología, no se conoce aún el rol que desempeñan las células parenquimatosas de la glándula en la respuesta inmune.

Las prostatitis, síndrome clínico que experimentan los pacientes con inflamación de la próstata, constituyen una importante causa de deterioro en la calidad de vida en hombres de todas las edades. Si bien son muchos los elementos implicados en el mantenimiento del proceso inflamatorio, se acepta que las infecciones y/u obstrucciones con reflujo intraprostático son los factores que desencadenan inicialmente las prostatitis. Considerando que las células epiteliales serían las primeras en contactar con bacterias o químicos irritantes de la orina, es de fundamental importancia el análisis de la respuesta temprana de las células parenquimatosas a estos estímulos lumbinales. Por otro lado, se ha propuesto una estrecha vinculación entre la inflamación y el crecimiento anómalo de la glándula. Básicamente, se postula que la activación constante de las cascadas inflamatorias llevaría a daño celular, incluyendo la mutación del ADN y la pérdida del control normal del ciclo celular. En este sentido, se conoce poco acerca de las consecuencias del infiltrado inflamatorio sobre las células prostáticas o el papel que podría desempeñar el epitelio en el control de la inflamación.

Numerosos estudios realizados en ratón (98, 194, 195), perro (196), rata (197) e incluso en humanos (198) han indicado que la inflamación prostática está, al menos en parte, bajo influencia hormonal y puede ser causada por un descenso en el nivel de andrógenos y un incremento simultáneo de estrógenos. Teniendo en cuenta el fuerte

control hormonal de todas las funciones prostáticas, resulta particularmente interesante el estudio de la modulación hormonal de moléculas de defensa y el rol desempeñado por los andrógenos en el curso de los procesos inflamatorios prostáticos.

El objetivo general del presente trabajo de tesis es analizar el rol de la glándula prostática en la defensa frente a diferentes injurias que comprometen la homeostasis tisular.

Como objetivos específicos, se plantea:

- Describir los cambios morfológicos de las células epiteliales y estromales de la glándula prostática y su cinética en prostatitis agudas experimentales de etiología bacteriana y no bacteriana.

- Estudiar el patrón de expresión de las moléculas de defensa TLR4, SP-D, β DEF-1, Gal-1 y PBP en condiciones normales y su modulación por la inflamación prostática.

- Determinar la influencia de testosterona en el perfil de la respuesta a la inflamación en animales castrados o tratados con dosis altas de testosterona.

- Analizar la expresión de TLR4, Gal-1 y UG en muestras de próstata humana.

CAPÍTULO

2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales y diseños experimentales

Con el propósito de cumplir con los objetivos planteados, se utilizaron ratas machos adultos (3 meses de edad) de la cepa Wistar, exocriadas, de 250-350 g de peso corporal aproximado. Los animales fueron criados en un bioterio con fotoperíodo (11 h de oscuridad y 13 h de luz) y temperatura ($25 \pm 2^\circ \text{C}$) controlados, con libre acceso a agua corriente y alimento balanceado. Todos los procedimientos experimentales siguieron las especificaciones establecidas internacionalmente para el uso y cuidado de animales de laboratorio, basados en *Guide for the care and use of laboratory animals – (1996) National Academy of Science Animal Welfare Regulations (1985)* y *The National Institute of Health Guidelines for the care and use of Laboratory Animals (131)*.

El análisis de los cambios morfológicos y de moléculas de defensa se realizó comparativamente en dos **modelos de prostatitis aguda**: un modelo infeccioso, en el cual se utilizó la bacteria *Escherichia coli* como agente causal; mientras que el segundo modelo consistió en una prostatitis no bacteriana desencadenada por obstrucción parcial de la uretra.

Para el estudio de la influencia androgénica sobre la expresión de proteínas de defensa, se emplearon ratas castradas o tratadas con dosis alta de testosterona. Finalmente, el modelo de prostatitis bacteriana se realizó en animales con diferentes niveles de testosterona con el fin de examinar si esta hormona altera el curso de la inflamación prostática.

2.1.1 Prostatitis bacteriana (Grupo PB)

Una cepa de *Escherichia coli* uropatógena (provista por el Prof. Dr. Oscar Pessah de la Cátedra de Bacteriología y Virología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba), aislada de un paciente con infección urinaria complicada fue conservada a -20°C y cultivada a 37°C por 16 h en agar tripticasa-soja previo a las inoculaciones. Las bacterias fueron luego centrifugadas y lavadas tres veces y posteriormente resuspendidas en buffer fosfato salino (PBS), llevando a una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml.

El modelo de prostatitis bacteriana se basó en un protocolo publicado por Fulmer y Turner (192) con algunas modificaciones. Los animales fueron anestesiados

mediante inhalación de éter etílico y sometidos a laparotomía baja para exponer la próstata ventral. La infección prostática fue inducida por una inyección directa de 200 μ l de una solución bacteriana que contenía 10^8 UFC/ml (100 μ l en cada lóbulo ventral). La inoculación se realizó directamente debajo de la cápsula prostática de cada lóbulo usando una aguja de 30 Ga como se muestra en la **Figura 13**. Luego de reubicar los órganos abdominales, el peritoneo, los músculos y la piel de la zona fueron cerrados usando una sutura simple con hilo crómico. Como controles de este grupo se utilizaron ratas sometidas al mismo procedimiento quirúrgico descrito, siendo reemplazada la solución bacteriana por PBS. Los animales, tanto infectados como controles, fueron sacrificados a las 24, 48 y 72 h posteriores a la inoculación. Los experimentos se repitieron tres veces, utilizándose un total de 15 animales por cada periodo de tiempo evaluado (n=15 por cada tiempo). La infección de la glándula fue confirmada mediante cultivos bacterianos cualitativos de tejido prostático en placas que contenían agar McConkey (Sigma), las cuales fueron incubadas a 37°C. Luego de 24 h, las bacterias aisladas fueron identificadas por medio de la coloración convencional de Gram. Se consideraron estériles los cultivos que no desarrollaron colonias hasta 48 h posteriores a la incubación.

La próstata ventral de cada animal fue extraída para su estudio morfológico y para determinar la expresión de proteínas de interés. Otras estructuras del complejo prostático, así como las vesículas seminales y epidídimo, fueron también extirpadas para evaluar la extensión del proceso infeccioso.

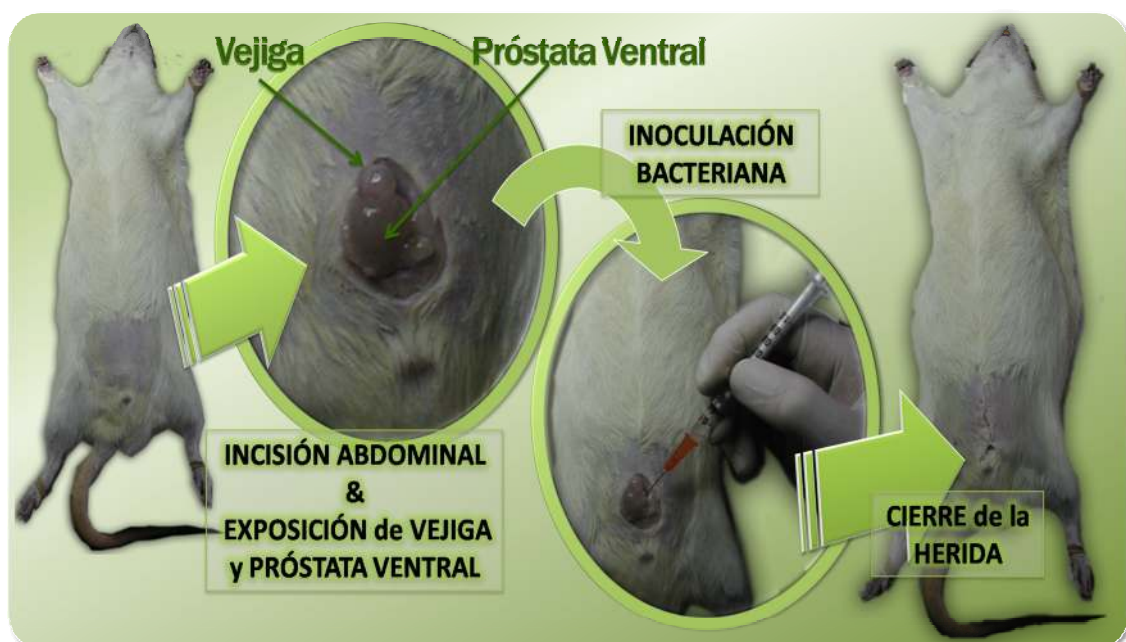


Figura 13: Desarrollo de prostatitis bacteriana mediante inyección intraprostática de *E. coli*. 3

2.1.2 Prostatitis por obstrucción parcial de la uretra (Grupo OPU)

El modelo de prostatitis no bacteriana por obstrucción parcial de la uretra reproduce algunas de las condiciones fisiopatogénicas de los pacientes con obstrucciones del tracto urinario inferior, tales como el incremento de la presión intersticial intraprostática y el reflujo de orina hacia los acinos glandulares. Este modelo fue desarrollado a partir del protocolo publicado por Takechi *et al.* (199). Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral y luego de la antisepsia se realizó una pequeña incisión perineal para exponer la uretra en su trayecto medio (prostático). Luego de visualizarla y disecarla, se colocó en forma paralela un tubo de goma (diámetro externo de 3mm) sobre la superficie uretral y se procedió a realizar un nudo con nylon 4.0, que incluía la uretra proximal junto con el tubo. Posteriormente, se ató la ligadura y se extrajo el tubo, con lo que quedó conformada una obstrucción parcial del flujo urinario, procediéndose luego al cierre quirúrgico. Los animales fueron sacrificados a las 6, 24, 48 y 72 h posteriores a la ligadura y sus próstatas ventrales extraídas para el análisis morfológico y de la expresión de proteínas de interés. El mismo procedimiento se repitió dos veces, usándose cinco animales por cada tiempo evaluado (n= 10 por cada periodo de tiempo). Como controles de este modelo experimental, se usaron ratas a las que se les realizó la manipulación quirúrgica sin la ligadura, que fueron sacrificadas al mismo tiempo que los animales con obstrucción.

2.1.3 Manipulación del estatus androgénico

Para evaluar la influencia de los andrógenos sobre la expresión de moléculas de defensa, se establecieron tres categorías de acuerdo al estatus androgénico, dividiendo los animales (n=10 por grupo experimental) en los siguientes grupos:

- Grupo orquiectomizado, con baja testosterona (grupo OX)
- Grupo de ratas intactas, con niveles normales de testosterona (grupo IN)
- Animales castrados y tratados con altas dosis de testosterona (grupo TT)

Para el grupo OX, ratas de la cepa Wistar fueron anestesiadas por inhalación de éter etílico y castradas por vía escrotal; el epidídimo y la grasa que rodea el cordón espermático fueron también extraídos durante el mismo procedimiento. Los animales fueron sacrificados 10 días posteriores a la castración y la próstata ventral fue extirpada para análisis morfológico y expresión proteica. Como controles intragrupo, se usaron

ratas con manipulación quirúrgica pero sin orquiectomía, las cuales fueron estudiadas en forma paralela a las del grupo OX.

En el grupo TT, las ratas fueron castradas para quitar los andrógenos endógenos y tratadas diariamente con inyecciones subcutáneas de testosterona a niveles suprafisiológicos (Sustanon, Organon; 10mg/kg/día, diluida en aceite de girasol) por 10 días, comenzando el día posterior a la castración. Luego de finalizado el tratamiento, los animales fueron sacrificados y sus próstatas ventrales fueron extraídas, procesadas y sometidas al análisis morfológico y bioquímico. Como control intragrupo, otras ratas fueron castradas e inyectadas diariamente con aceite de girasol por 10 días.

Para confirmar el estatus androgénico de estos tres grupos y sus controles respectivos, se extrajo suero de los animales de cada grupo mediante punción cardíaca y se procesó para analizar los niveles de testosterona como se explica más adelante.

2.1.4 Prostatitis bacteriana en animales con diferentes niveles de testosterona

Con el objeto de examinar la influencia de la testosterona en el desarrollo y progresión de la infección prostática bacteriana, se usó el modelo de prostatitis bacteriana, descrito previamente, en animales con diferentes niveles de testosterona (alto, normal y bajo), siguiendo lo expresado en el punto 2.1.3 y de acuerdo al esquema que indica la **Figura 14**. El modelo de prostatitis bacteriana (PB) se llevó a cabo mediante inyección intraprostática de *E. coli*, siguiendo el protocolo enunciado anteriormente, en animales previamente orquiectomizados (PB+OX) u orquiectomizados y tratados inmediatamente con dosis altas de testosterona (PB+TT) como se explicó en el apartado anterior.

Además de estos grupos, se incluyeron ratas intactas (IN), ratas sin manipulación androgénica e infectadas (PB) y animales que fueron castrados, tratados inmediatamente con dosis fisiológicas de testosterona (Sustanon, Organon, 3 mg/kg/día) e infectados con *E. coli* (grupo PB+T). Los animales pertenecientes a cada grupo fueron sacrificados a las 48 h y 5 días posteriores a la inoculación bacteriana (**Figura 14**) y se extrajo la próstata ventral para su análisis morfológico, inmunocitoquímico y bioquímico. Se usaron 6 animales por grupo y tiempo experimental y el procedimiento fue reiterado dos veces (n=48 por cada periodo de tiempo evaluado).

2.1.5 Extracción y procesamiento de las muestras para análisis morfológico y expresión de proteínas en estudio

Para el análisis morfológico y ultraestructural, tres animales de cada grupo experimental fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de hidrato de cloral al 30 % (Merck) y sus tejidos fijados por perfusión. Para ello, las ratas fueron sujetas a una incisión longitudinal toracoabdominal y sus órganos torácicos expuestos. Luego, se realizó un corte en la aurícula derecha para exanguinar y se introdujo un catéter en el nacimiento de la aorta a través de una pequeña incisión en la cavidad ventricular izquierda. Posteriormente, se conectó la punta del catéter al sistema de perfusión, cuyas soluciones lavadoras y fijadoras se ubicaban a 120 cm de altura. Como lavador se utilizó solución fisiológica, mientras que el fijador consistió en una mezcla de aldehídos a una concentración final de formol al 4% y glutaraldehído al 1% diluidos en PBS pH 7.2. El procedimiento se inició con el pasaje de la solución lavadora por

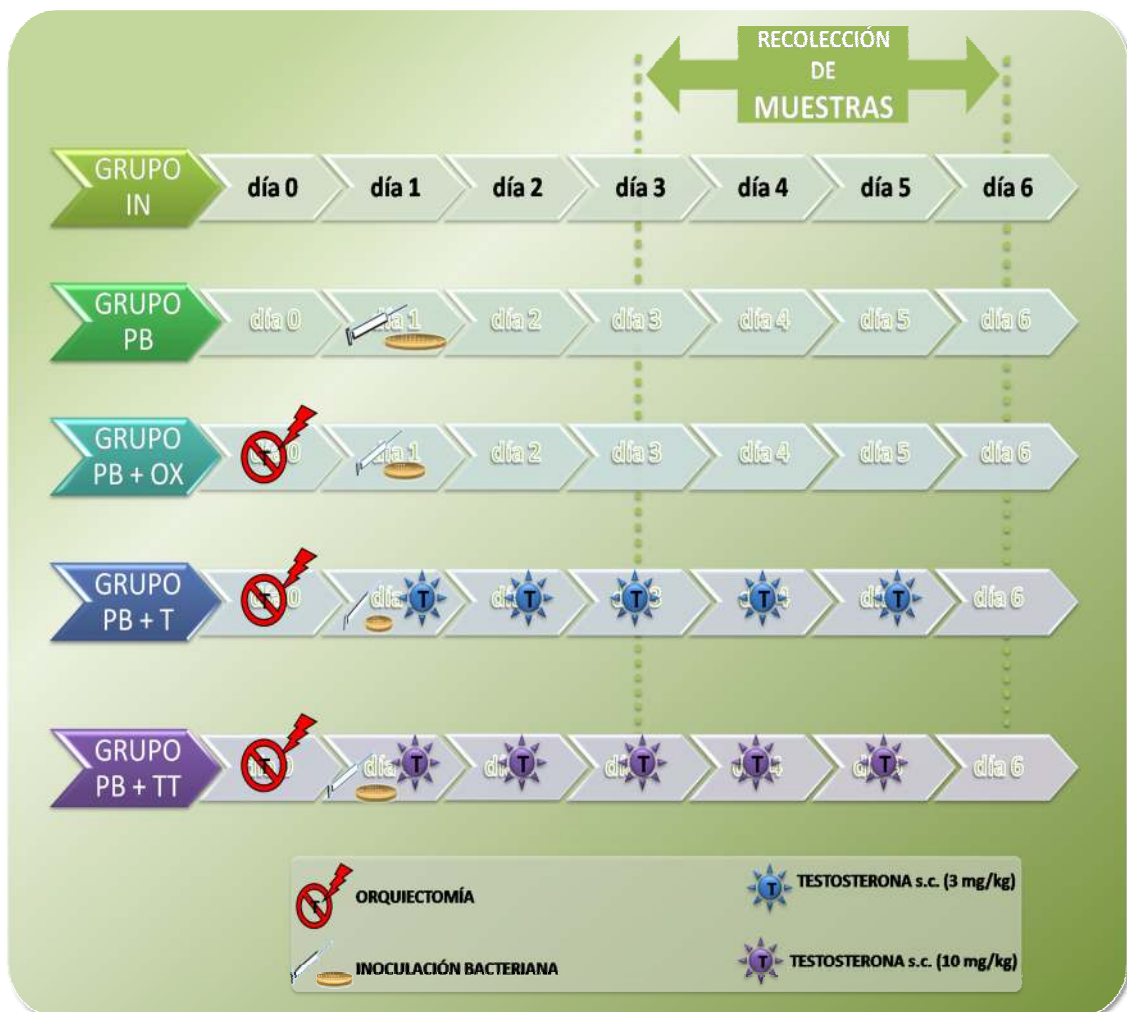


Figura 14: Diagrama que muestra los tratamientos recibidos por los diferentes grupos experimentales con el fin de examinar la influencia de testosterona en la prostatitis bacteriana aguda.

aproximadamente un minuto, luego se hizo circular el fijador hasta constatar el endurecimiento y cambio de color de los tejidos ya fijados. Consiguientemente y con el objeto de evaluar la extensión del proceso inflamatorio en los animales infectados, se extirparon el complejo prostático, vesículas seminales, vejiga y epidídimo, los cuales fueron sumergidos en formol al 4% por 6 h y procesados para microscopía fotónica o en solución de Karnovsky para estudios ultraestructurales por microscopía electrónica.

La obtención de las muestras para western blot fue realizada a partir de próstatas ventrales, obtenidas de animales sin perfundir y las cuales fueron homogenizadas mediante el siguiente protocolo:

- Lavado con PBS
- Agregado de 0,5 ml de buffer de extracción por cada 1 mg de tejido:
 - Tris Cl pH 7.4.....25 nM
 - Na Cl..... 150 nM
 - IGEPAL.....1.25%
 - EDTA1mM
 - PMSF.....2 mM
 - Leupeptina.....10 µg/ml de buffer
 - Aprotinina.....10 µg/ml de buffer
- Procesamiento con homogeneizador de vidrio esmerilado a 4 °C
- Transferencia a tubo de centrifuga y reposo en hielo durante 30 min
- Centrifugación a 36200X g por 30 min a 4 °C
- Separación del sobrenadante

Los sobrenadantes fueron debidamente rotulados y congelados a -70 °C hasta su procesamiento posterior por western blot.

Para obtener secreción prostática, un lóbulo intacto de cada próstata ventral fue lavado repetidas veces con PBS a 4 °C, secado en papel de filtro y seccionado en trozos de 1x1 mm. Este material se recolectó para extraer la secreción prostática en tubos de centrifuga agregando 1 ml de PBS, luego se centrifugó a 15,000X g por 20 minutos. Finalmente, se recolectó el sobrenadante, el cual fue diluido en buffer de extracción (detallado previamente) y congelado a -70 °C hasta su procesamiento. Esta fracción obtenida de la secreción prostática se utilizó para realizar análisis de dot blot.

2.2 Muestras de próstata humana

Para analizar la expresión TLR4, UG y GAL-1 en próstata humana, se utilizaron *microarrays* de tejido prostático humano incluido en parafina (obtenidos de la compañía Ambion, Inc, USA, en colaboración con la Prof. Dra. Mariana Maccioni -CIBICI-CONICET-, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba), los cuales contenían 46 especímenes de próstatas con crecimiento benigno y 70 adenocarcinomas con sus respectivos controles sin tumor. Para cada muestra, la estadificación tumoral, edad del paciente y tipo de cirugía fueron suministradas por el laboratorio proveedor. Las muestras fueron sometidas a la técnica de inmunocitoquímica como se explica más adelante.

2.3 Estudio morfológico

Luego de ser fijadas por perfusión, las muestras de tejidos fueron procesadas para el análisis morfológico. Particularmente, las próstatas ventrales de animales de todos los grupos experimentales fueron divididas en dos segmentos: la parte izquierda fue procesada para microscopía fotónica mientras que el área derecha fue cuidadosamente disecada y la región intermedia de la próstata fue procesada para análisis ultraestructural por microscopía electrónica.

2.3.1 Microscopía fotónica

Muestras del complejo prostático, vejiga, vesícula seminal y epidídimo fueron fijadas en formol al 4%, deshidratadas en una serie creciente de alcoholes e incluidas en parafina usando técnicas histológicas de rutina. Para el análisis morfológico se utilizaron cortes de 4 μm de espesor, obtenidos por medio de un micrótomos tipo Minot y coloreados con hematoxilina-eosina (HE) siguiendo protocolos habituales.

2.3.2 Microscopía óptica de alta resolución (MOAR) y electrónica

La MOAR consiste en el análisis de cortes semifinos (inferior de 1 μm de espesor) al microscopio de luz, lo que mejora ampliamente el estudio de la morfología celular en relación a las técnicas habituales de observación. Para realizar estos cortes semifinos es preciso un estricto protocolo de fijación, deshidratación, inclusión en resinas y corte. En el presente trabajo de tesis, las muestras de tejido prostático, fijadas previamente por perfusión, se dejaron 24 h a 4°C sumergidas en solución de Karnovsky

(formaldehído 4% y glutaraldehído 2% en solución buffer de cacodilato pH 7.4). El glutaraldehído fue previamente purificado por destilación y el formaldehído preparado por despolimerización de paraformaldehído en solución acuosa a 80 °C con ligera alcalinización. Posteriormente se obtuvieron pequeñas porciones de la región intermedia de la próstata ventral, las que fueron lavadas con buffer cacodilato y se post-fijaron con una solución de tetróxido de osmio al 1 % en buffer cacodilato pH 7.4. Posteriormente, las porciones de tejido fueron lavadas con buffer cacodilato y deshidratadas con soluciones de acetona (Merck, Argentina) de concentraciones crecientes (50%, 70%, 90% y 100%) para ser incluidas en resinas epoxi hidrofóbicas con la siguiente composición:

- Araldita 506 (48.5%)
- Anhídrido dodecenilsuccínico (DDSA) (48.5%)
- Dibutilftalato (DBP) (0.5%)
- Acelerador dimetilaminobenceno (BDMA) (2.5%)

La polimerización de la resina se llevó a cabo colocando el material incluido en estufa durante 24 h a 60 °C. Sobre este material se obtuvieron cortes semifinos (500 nm de espesor) con un ultramicrotomo Jeol JUM-7 provisto de cuchilla de diamante. Las secciones fueron coloreadas con azul de toluidina (ATO 1% en bórax al 1%) y observadas con microscopio fotónico. Los cortes también se utilizaron para identificar la zona de interés y finalmente obtener cortes finos (100 nm de espesor), los cuales fueron montados en grillas de níquel, contrastados con citrato de plomo y acetato de uranilo y posteriormente observados y fotografiados en un microscopio electrónico Siemens 101 A o en el Zeiss LEO906E.

2.3.3 Coloración de metenamina-plata

Para identificar la presencia de componentes glicoproteicos, colágeno y membrana basal, se colorearon cortes semifinos de próstata incluida en resinas (Araldita o LR-White) utilizando una técnica basada en el empleo de sales de plata. Esta coloración aplicada a secciones de materiales incluidos en resinas hidrofílicas es similar al método de PAS (ácido periódico de Schiff) empleado en cortes de parafina. Este método provee además una mejor resolución e identificación de los componentes celulares. Se usó el siguiente protocolo:

- Incubación con ácido periódico 3% (HIO₄) 15 min a temperatura ambiente (TA)

- Incubación con solución de metenamina-plata (100 ml de hexametilentetramina 3 %, 5 ml de nitrato de plata [AgNO₃] 5 %, 100 ml de buffer borato pH 9): 1 min a potencia máxima (800 W) en microondas. El portaobjetos con los cortes histológicos se colocó en posición invertida sobre la solución
- Lavado con agua destilada
- Incubación con solución de tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃) 5 %: 10 min a TA
- Lavado con agua destilada
- Secado en estufa a 60 °C
- Montaje con entellan (Merck, USA)

Posteriormente, los especímenes fueron observados en un microscopio fotónico y fotografiados a magnificaciones de 20X, 40X, 100X través de un sistema digital de adquisición de imágenes.

2.4 Dosaje de testosterona

Para evaluar los niveles de testosterona sérica en los animales de los grupos OX, TT y sus respectivos controles, presentados en el punto 4.1.3, se extrajo sangre de las ratas por punción intracardiaca previo al sacrificio de los animales y se separó el suero. La determinación de los niveles de testosterona se realizó mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL), usando un analizador Roche Elecsys E170 (Roche Diagnostics, Switzerland).

2.5 Detección de apoptosis *in situ* por TUNEL

La valoración de la apoptosis por el método de marcaje *in situ* del DNA fragmentado o técnica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labelling*) tiene su fundamento en la detección de la rotura del DNA internucleosomal, típica de la apoptosis, en secciones de tejido incluidas en parafina. Se pone de manifiesto los extremos 3'-OH libres que se generan en la fragmentación de ADN, incorporando nucleótidos marcados a dichos extremos mediante la acción de la enzima transferasa terminal (TdT).

Para llevarlo a cabo, se utilizaron secciones parafinadas de 5 µm de próstata ventral del modelo PB, montadas en portaobjetos tratados con poli-L-lisina. Los cortes

fueron desparafinizados con xilol e hidratadas con una serie decreciente de alcoholes, procediéndose al ensayo usando un kit disponible comercialmente (In situ Cell Death Detection kit, POD; Roche Molecular Biochemicals, Germany), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las muestras fueron preincubadas con 20 µg/ml de proteinasa K por 15 min a temperatura ambiente. Luego del lavado, las secciones fueron incubadas por 2 h en el buffer de reacción (TdT, dATP, fluorescein-11-dUTP). Posteriormente, la reacción fue detenida con el buffer de bloqueo por 30 min a 37°C y se procedió a incubar con un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con peroxidasa (disponible con el kit). Finalmente, los inmunocomplejos fueron revelados con diaminobenzidina (DAB, Sigma, USA) 0,05 % y H₂O₂ 0,05% en PBS. Las secciones fueron deshidratadas y montadas para ser visualizadas al microscopio fotónico.

Los controles positivos se realizaron con muestras de próstata ventral de ratas castradas por 48 h y los controles negativos resultaron de practicar el ensayo en ausencia de la enzima TdT.

2.6 Detección de la expresión de proteínas en estudio

Para determinar la expresión de las diferentes proteínas en estudio, se utilizaron técnicas *in situ* (inmunocitoquímica a nivel fotónico y ultraestructural) y metodologías usando fracciones solubles de homogenatos tisulares y secreción prostática (western blot y dot blot). Los anticuerpos usados en las diferentes técnicas de inmunodetección proteica así como su procedencia y dilución de trabajo se mencionan en la **Figura 15**.

2.6.1 Inmunocitoquímica a nivel de microscopía fotónica

La localización e intensidad de la expresión proteica *in situ* fueron examinadas mediante inmunocitoquímica (ICQ), para lo cual se utilizaron especímenes de próstata ventral, provenientes de los diferentes modelos experimentales, incluidos en parafina. Las muestras fueron cortadas con un espesor de 4 µm, montadas en portaobjetos pre-tratados con silano y procesadas de la siguiente manera:

- Desparafinización e hidratación
- Recuperación antigénica en buffer citrato pH 6.0 en microondas de 750 W
 - 3 min en microondas al 100% de potencia (750 W)
 - 14 min en microondas al 20% de potencia

- 20 min en microondas apagado
- Lavado con PBS
- Bloqueo de la peroxidasa endógena con H₂O₂ 3% en metanol por 15 min
- Bloqueo de uniones no específicas
 - Para anticuerpos primarios de conejo o ratón: suero normal de cabra 1:20 diluido en PBS-leche por 20 min a TA en cámara húmeda
 - Para anticuerpos primarios desarrollados en cabra: PBS-BSA al 1 % por 30 min a TA en cámara húmeda
- Incubación con anticuerpo primario (ver especificaciones en **Figura 15**)
 - Incubación por 1 h a TA y posteriormente toda la noche a 4 °C en cámara húmeda
 - Lavados con PBS, 3 veces por 5 min cada uno
- Sistema de amplificación
 - Anticuerpo secundario conjugado con biotina (IgG *anti-mouse* o IgG *anti-rabbit*, Amersham Pharmacia, USA) 1:130 durante 30 min a TA en cámara húmeda
 - Lavados con PBS
 - Las muestras se incubaron luego con el complejo avidina-biotina (Vectastain ABC complex, Vector, USA) por 30 min a TA y se lavaron posteriormente con PBS
- Revelado
 - Incubación con diaminobenzidina/H₂O₂ (DAB, Sigma, USA) diluido en PBS por 10 min en oscuridad a TA
 - Lavado con agua destilada
- Deshidratación y montaje con entellán (Merck, USA)

Los controles negativos de las reacciones inmunocitoquímicas incluyeron la sustitución del anticuerpo primario por fracción purificada de IgG o suero normal de la misma especie en la que se desarrolló el anticuerpo.

2.6.2 Inmunocitoquímica a nivel de microscopía electrónica

Con el objeto de evidenciar la localización ultraestructural de las proteínas PBP, TLR4, NF-κB, αSMA y VIM, se utilizaron cortes ultrafinos de próstatas incluidas en la

resina hidrofílica LR-White y montados sobre grillas de níquel. Como primer paso de la técnica, la fijación del tejido prostático se realizó por inmersión en una mezcla de formaldehído 2% y glutaraldehído 0,5% por 12 h a 4°C y se procedió posteriormente de la siguiente manera:

- Inclusión en LR-White:
 - Deshidratación en series de concentraciones crecientes de etanol
 - Incubación en mezcla de partes iguales de etanol y LR-White (London Resin Corporation, UK) 2 h a TA
 - Incubación en LR-white puro a 4 °C durante 12 h
 - Inclusión en cápsulas de gelatina con plástico puro a 50 °C durante 48 h
- Corte ultrafino y montaje en grillas de níquel
- Bloqueo de uniones no específicas
 - o PBS-BSA al 1 % a TA por 30 min
- Incubación con anticuerpo primario (ver diluciones en **Figura 15**)
 - o 1 h a temperatura ambiente y posteriormente toda la noche a 4 °C
 - o Lavados con PBS, 3 veces por 5 min cada uno
 - o Bloqueo con PBS-BSA al 1 %, durante 15 min a TA
- Sistema de revelado
 - o Anticuerpo secundario anti-cabra o anti-conejo acoplado a oro coloidal de 16 nm (Electron Microscopy Sciences, USA) 1:15, 1 h a 37 °C
 - o Lavados con agua bidestilada
- Contraste
 - o Tinción con solución saturada de acetato de uranilo en agua 1 min
 - o Lavado con agua bidestilada

Los controles negativos consistieron en reemplazo del anticuerpo primario por PBS-BSA 1 % o suero normal de la especie en la que se generó el anticuerpo primario. Adicionalmente, el control negativo de anticuerpo anti-TLR4 incluyó la absorción previa con su péptido de bloqueo (Santa Cruz Biotech, USA).

2.6.3 Dot blot

Esta técnica fue utilizada con la finalidad de detectar los niveles PBP y Gal-1 en secreción prostática de los animales de los diferentes modelos de experimentación. Las

proteínas totales de estas fracciones solubles se midieron usando el reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, USA). Luego de igualar la cantidad de

PROTEÍNA o ANTÍGENO	ESPECIFICACIONES del ANTICUERPO	TÉCNICAS de USO y DILUCIÓN de TRABAJO
UTEROGLOBINA (UG)	IgG policlonal de conejo (H-75 sc-25554, Santa Cruz Biotech., USA)	ICQ = 1:200
PROSTATIC BINDING PROTEIN (PBP)	Suero total de conejo (Dra. Mariana Maccioni, CIBICI, Argentina) Monoclonal de ratón (Dra. Maccioni)	ICQ = 1:1000 Dot Blot= 1:4000 ICQ = 1:250
GALECTINA-1(GAL-1)	Policlonal de conejo (Dr. Gabriel Rabinovich, IBYME, Argentina)	ICQ = 1:1000 Dot blot= 1:1000
ALFA ACTINA DE MUSCULO LISO (αSMA)	IgG2a monoclonal de ratón (NCL-SMA α sm-1, Novocastra, UK)	ICQ = 1:50 WB=1:200
VIMENTINA (VIM)	IgG1 monoclonal de ratón (NCL-L-VIM-V9, Novocastra, UK)	ICQ = 1:100
RECEPTOR TIPO TOLL 4 (TLR4)	IgG purificada policlonal de cabra (L-14 sc-16240, Santa Cruz Biotech., USA)	ICQ = 1:400 WB=1:500
FACTOR NUCLEAR KAPPA B (NF-kB)	Fracción IgG de conejo anti-NFkB p65 (ab7970, Abcam plc., USA)	ICQ = 1:2000
BETA DEFENSINA 1 (βDEF-1)	IgG policlonal de conejo (M-69 sc-25573, Santa Cruz Biotech., USA)	ICQ = 1:60
PROTEÍNA SURFACTANTE D (SP-D)	Suero total de conejo (AB3434, Chemicon. USA)	ICQ = 1:1000 WB=1:1000
FACTOR TRANSFORMANTE BETA 1 (TGFβ1)	IgG policlonal de conejo (V sc-146-Santa Cruz Biotech., USA)	WB=1:250
FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNFα)	IgG policlonal de conejo (Dr. Andreas Doll, Marburg University, Germany)	ICQ = 1:1000
INTERLEUCINA 1β (IL1β)	IgG policlonal de conejo (Dr. Andreas Doll)	ICQ = 1:1000
INTERLEUCINA 6 (IL6)	IgG policlonal de conejo (Dr. Andreas Doll)	ICQ = 1:600
ESCHERICHIA COLI	Fracción IgG policlonal de conejo (PA1-25636 Affinity Bioreagents, USA)	ICQ = 1:900
BETA ACTINA	IgG monoclonal de ratón (AC-15 A1978 Sigma-Aldrich, USA)	WB=1:5000

Figura 15: Especificaciones de los diferentes anticuerpos usados en el presente trabajo de tesis para la detección de proteínas y péptidos. ICQ: Inmunocitoquímica WB: western blot.

proteínas en la totalidad de muestras, se empleó el siguiente protocolo:

- Siembra de 5 μ l de secreción prostática (0,5 μ g de proteínas totales) en membrana de nitrocelulosa
- Bloqueo de sitios de unión no específica con PBS-Tween 20 (0,1%)-leche 5% (buffer de bloqueo), 20 min en agitación a TA
- Incubación con anticuerpo primario (anti-PBP policlonal 1:4000 o anti-gall 1:1000) diluido en buffer de bloqueo durante 3 h en agitación a TA
- Lavado con PBS-Tween 20 0,1% durante 30 min con recambio de solución cada 5 min
- Incubación con anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma–Aldrich, USA) diluido en solución de lavado 1:3000 durante 1 h en agitación a TA
- Lavado durante 30 min con recambio de solución cada 5 min
- Revelado con comprimidos de azul nitro tetrazolio (BCIP/NBT SigmaFast, Sigma–Aldrich, USA) preparado de acuerdo las indicaciones del fabricante e incubando durante 7 min en agitación a TA
- Lavado con PBS-Tween 20 0,1% durante 5 minutos en agitación a TA

Luego de secar la membrana, la imagen se digitalizó y las densidades de los *spots* correspondientes a cada muestra fueron analizados con el programa Scion Image versión Beta 4.0.2 adaptado para PC.

2.6.4 Western blot

La técnica de western blot fue aplicada con el fin de determinar los niveles del receptor TLR4, el antimicrobiano SP-D, la citocina TGF β 1 y la proteína α SMA. Como control de cantidad de proteínas sembradas, se determinó la expresión de β actina en los sobrenadantes de homogenatos prostáticos. Como primer paso, se midió la concentración de proteínas totales presentes en los homogenatos con el reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, USA) y se procedió luego a la separación electroforética, transferencia y posterior inmunodetección y revelado.

A- Separación electroforética de proteínas del sobrenadante de homogenatos

Las muestras fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturizantes empleando geles de poliacrilamida 15 % (SDS-PAGE). Las dimensiones de los geles fueron 8.2 cm x 5 cm x 1 mm (Miniprotean II y III, Bio Rad), sembrándose 100 µg de proteínas por carril. Antes de sembrar, las muestras se prepararon de acuerdo a la siguiente técnica: 100 µl de sobrenadante de homogenato se mezclaron con 20 µl de Buffer de muestra (Tris-ClH 0.35 M pH 6.8; glicerol 30 %, SDS al 10 %; DTT 9.3 %, azul de bromofenol 0.12 mg/ml). Las muestras luego se calentaron a 95 °C durante 5 min.

Las corridas electroforéticas se realizaron a 40 mA utilizando una fuente de poder Bio-Rad Power-Pack 200 durante 2 h. Para verificar el peso molecular de las proteínas de interés se utilizó una mezcla de proteínas de peso molecular conocido (Full Range Rainbow molecular weight marker, Amersham Pharmacia Biotech, USA). Para cada corrida se sembraron 3 muestras por grupo experimental.

B- Transferencia e inmovilización de proteínas a un soporte sólido.

Completada la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas. Una porción de membrana de nitrocelulosa (0.2 µm de poro, Hybond ECL Amershan, UK) de una dimensión similar al gel, se equilibró durante 15 min en una solución compuesta por 25 mM Tris, 192 mM de Glicina y 20 % de metanol. Posteriormente se pusieron en contacto la membrana de nitrocelulosa con el gel de poliacrilamida y en una cuba (Bio-Rad, USA) de 3000 ml de capacidad se efectuó la transferencia durante 1 h a 300 mA, en agitación constante y con refrigeración.

C- Inmunodetección y revelado

Se realizaron los siguientes pasos:

- Bloqueo de sitios de unión no específica: con PBS-Tween 20 (0,1%)-leche 5% (solución de bloqueo), 1 h en agitación a TA
- Incubación con anticuerpos primarios (ver **Figura 15**) diluidos en solución de bloqueo durante 3 h, en agitación a TA
- Lavado con PBS-Tween-20 0,1% por 30 min, en agitación a TA
- Incubación por 45 min con los respectivos anticuerpos secundarios:
 - o cabra anti-conejo unido a peroxidasa diluido 1:5000 en solución de bloqueo (Jackson Immunoresearch Labs Inc, USA)

- conejo anti-cabra unido a peroxidasa diluido 1:2500 en solución de bloqueo (Santa Cruz Biotech, USA)
- cabra anti-ratón unido a peroxidasa diluido 1:5000 en solución de bloqueo (Jackson Immunoresearch Labs Inc, USA)
- Lavado con PBS-Tween-20 por 30 min, en agitación a TA
- Incubación con agente de detección quimioluminiscente (Kit ECL Amersham) durante 1 min
- Exposición de la membrana a una placa fotográfica (Hyperfilm ECL Amersham) para la detección de las señales quimioluminiscentes procedentes de las bandas de las proteínas transferidas durante 10 min
- Revelado y fijación de la placa fotográfica con reactivos especiales (revelador y fijador Kodak GBX, Kodak Brasileira com, Brasil)

Las bandas correspondientes a las proteínas estudiadas obtenidas mediante western blot fueron digitalizadas y analizadas por densitometría con el programa Scion Image versión Beta 4.0.2. A los fines estadísticos al menos 3 placas fueron cuantificadas densitométricamente por grupo experimental.

2.7 Análisis estadístico

Para validar los resultados obtenidos en los estudios se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos obtenidos para cada grupo. Se estableció la media \pm Error Estándar de la Media para cada parámetro evaluado y los valores fueron procesados estadísticamente utilizando ANOVA-Tukey aplicando el programa informático InfoStat 1,5. (Grupo InfoStat. Facultad Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba). Las diferencias entre los grupos fueron comparadas por este programa, aceptando como significativo un valor de $p < 0,05$. Para evaluar diferencias en la detección de β actina por western blot, se utilizó el método de FISHER para el análisis estadístico, considerando como significativo un valor de $p < 0,05$.

CAPÍTULO
3

RESULTADOS

3.1 Caracterización de la prostatitis bacteriana en la rata (grupo PB)

La infección del lóbulo ventral de la glándula prostática fue confirmada mediante cultivos de trozos de tejido proveniente de animales inyectados con *E. coli* en agar McConkey, los que arrojaron resultados positivos para enterobacterias tanto a las 24 como a las 72 h posteriores a la inoculación bacteriana. Además, el análisis histológico de los especímenes mostró un típico infiltrado inflamatorio agudo, caracterizado principalmente por la presencia de polimorfonucleares y macrófagos.

Con el propósito de determinar la extensión del proceso infeccioso a otros sitios del tracto genital masculino, se analizó la histología de las vesículas seminales, vejiga y epidídimo de los animales inoculados con la bacteria, los cuales mostraron escasos signos de inflamación, como edema y vasodilatación en vejiga, principalmente a las 24 h posteriores a la infección. Por otro lado, la próstata dorsolateral exhibió un moderado infiltrado inflamatorio y cultivos positivos para *E. coli*. Sin embargo, los cambios inflamatorios en este lóbulo fueron sólo notorios en las etapas tempranas, con resolución del proceso hacia las 72 h postinoculación.

3.1.1 Progresión del infiltrado inflamatorio

La próstata ventral de ratas controles, inoculadas con PBS, exhibió un epitelio cilíndrico simple secretorio y una estroma con escasos elementos celulares, sin signos de alteración en su arquitectura normal. La inyección intraprostática de *E. coli* produjo cambios inflamatorios en la próstata ventral, que se hicieron más pronunciados hacia el tercer día posterior a la inoculación (**Figura 16**).

El análisis del compartimiento intersticial a las 24 h postinoculación evidenció un notable infiltrado inflamatorio de distribución difusa que comprometió todo el lóbulo ventral, conformado por numerosos polimorfonucleares neutrófilos (PMNN) y macrófagos. En el sitio de inoculación, se observaron infiltrados focales de linfocitos, neutrófilos, macrófagos y, más raramente, formación de pequeños abscesos. Los signos inflamatorios fueron aún más notables a las 48 h posteriores a la infección, con intenso edema, reducción de las luces acinares y ausencia de secreción prostática luminal. Algunos de los acinos prostáticos analizados en este tiempo mostraron invasión por parte de las células inflamatorias, sin embargo, esta observación fue lo más característico de los acinos prostáticos a las 72 h postinoculación (**Figura 16**). En este

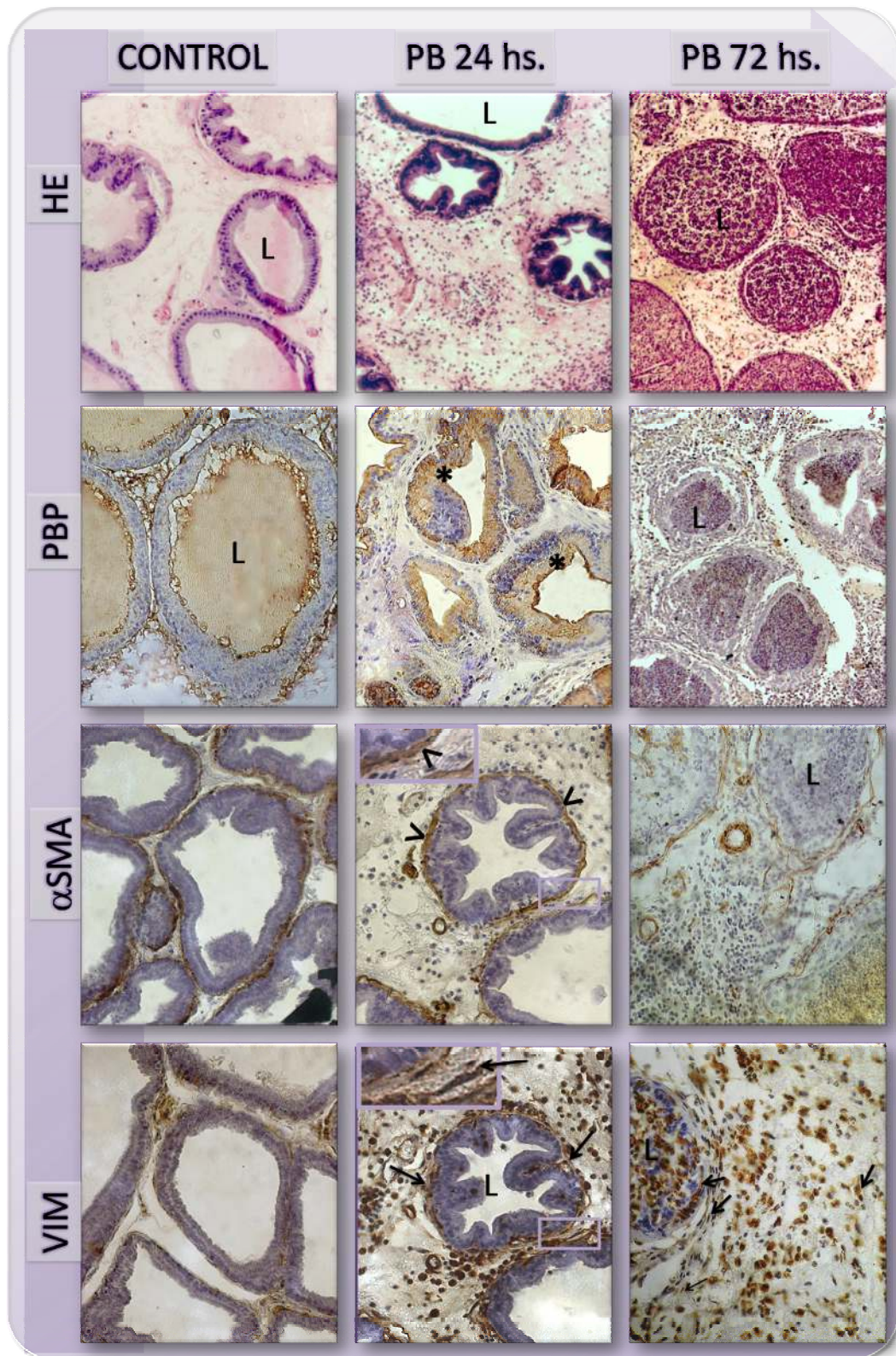


Figura 16: Secciones de próstata ventral que muestran las consecuencias tempranas de la prostatitis bacteriana. A las 24 h postinfección, se observó infiltrado inflamatorio intersticial, con incremento en la expresión epitelial de PBP (*) y engrosamiento de la capa estromal periacinar, manifestado por la elevada inmunomarcación de α SMA (>) y la formación de una banda continua doble de fibroblastos positivos para VIM (flechas). La infección bacteriana por 72 h provocó profundas alteraciones histológicas, incluyendo la invasión de las luces acinares por células inflamatorias, ruptura parcial de la capa de α SMA y la desorganización de los fibroblastos periacinares, quedando células fusiformes VIM-positivas aisladas (flechas). Nótese que las células inflamatorias también expresan VIM. L: luz acinar

tiempo, hubo una marcada alteración de la histoarquitectura tisular, con gran cantidad de células inflamatorias invadiendo el compartimiento epitelial, lo que provocó una obliteración de los acinos prostáticos y atrofia de las células epiteliales. Todos los animales del grupo PB mostraron similares hallazgos histológicos, consistentes con prostatitis bacteriana aguda.

3.1.2 Alteraciones morfofuncionales del compartimiento epitelial

Las características morfológicas de las células epiteliales prostáticas luego de la infección bacteriana se pueden dividir entre las observadas tempranamente (24 h) y aquellas de las etapas más tardías (72 h postinoculación). Sin bien las técnicas de rutina como hematoxilina-eosina (HE) en secciones de parafina permitieron tener un contexto general del proceso inflamatorio, las alteraciones morfológicas específicas de las células epiteliales fueron mejor evidenciadas en cortes semifinos de próstata incluidos en resinas. En este caso fue especialmente útil la técnica de metenamina-plata, que mostró hipertrofia del epitelio prostático, con aumento del citoplasma apical e incremento de los gránulos secretorios en muestras provenientes de animales con 24 h de infección bacteriana (**Figura 17**). Todos estos signos de estimulación celular se acompañaron de una intensa inmunomarcación de PBP (**Figura 16**), considerada como un marcador de la función secretoria prostática.

Los hallazgos al microscopio electrónico reforzaron y ampliaron las observaciones realizadas en cortes semifinos a 24 h postinoculación. Los principales signos ultraestructurales de estimulación epitelial consistieron en un gran desarrollo del complejo de Golgi, presencia de abundante retículo endoplasmático rugoso (RER), formando frecuentemente por membranas lamelares concéntricas y de un gran número de gránulos secretorios electrodensos maduros, positivos para PBP, en la región apical de las células epiteliales (**Figuras 17 y 18**). Otros cambios en la membrana apical incluyeron el aumento en el número y tamaño de las microvellosidades.

A diferencia de la gran estimulación temprana, el epitelio prostático de animales infectados por 72 h exhibió signos de atrofia celular, los que se correlacionaron con la invasión de neutrófilos a este compartimiento (**Figura 16**). En este tiempo, las células epiteliales perdieron su típica apariencia cilíndrica, mostrándose cuboidales o redondeadas en las secciones coloreadas con metenamina-plata (**Figura 19**). Estos datos fueron corroborados por microscopía electrónica, observándose un escaso desarrollo de

las organelas proteinopoiéticas. Por otro lado, la inmunomarcación para PBP fue débil, incluso ausente en algunos acinos prostáticos (**Figura 16**).

La técnica de metenamina-plata en cortes semifinos de tejido incluido en Araldita mostró una importante cantidad de figuras apoptóticas en el compartimiento epitelial a las 24 h, aunque fue principalmente notorio a las 48 h posteriores a la inoculación bacteriana (**Figura 20**). Este proceso de muerte celular fue confirmado

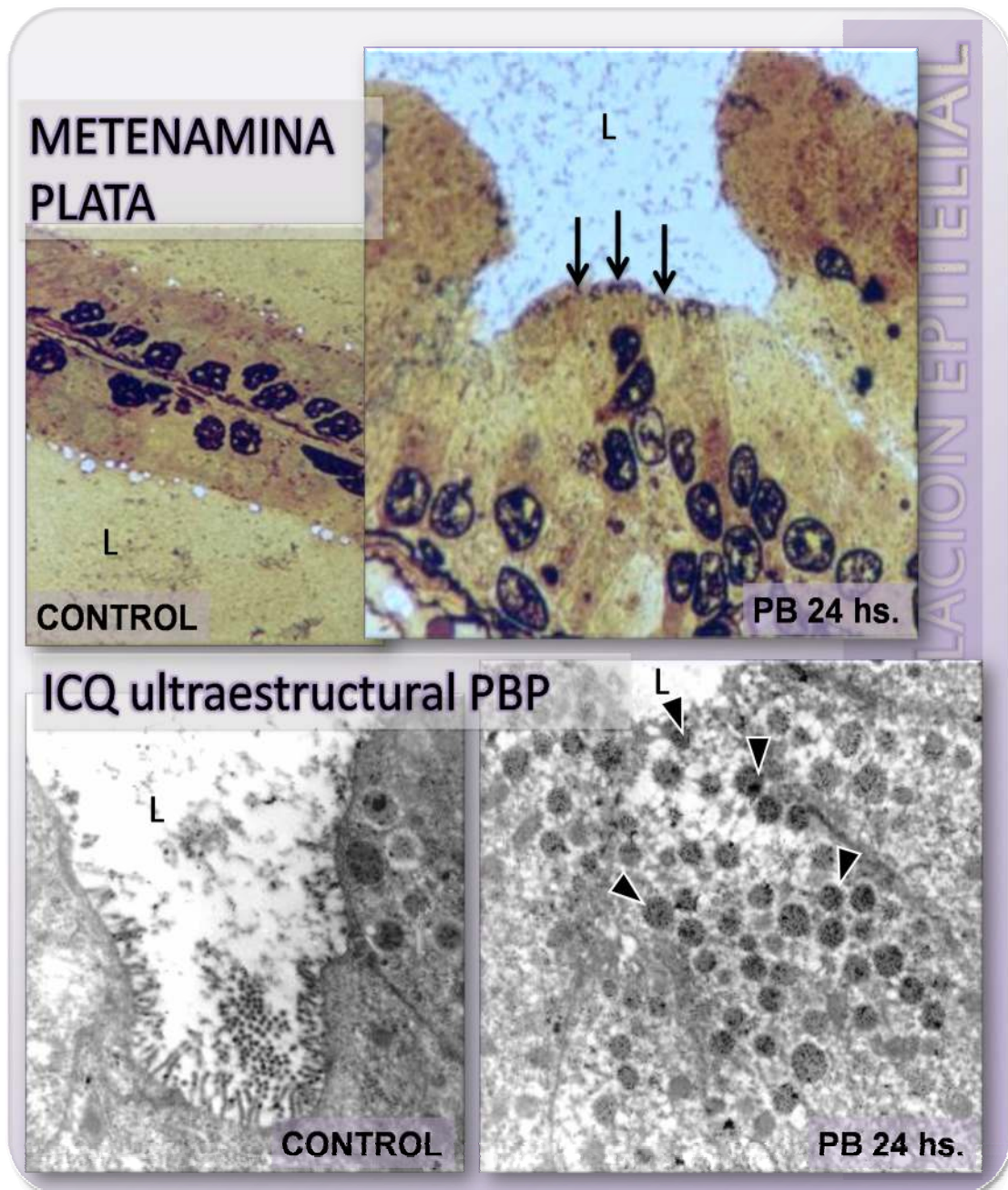


Figura 17: Secciones de próstata incluidas en Lr-White indicando la presencia de numerosos gránulos secretorios apicales (flechas) luego de la infección bacteriana, que fueron positivos para PBP mediante la técnica de oro coloidal (cabezas de flechas). L: luz acinar.

mediante la técnica de TUNEL y por microscopía electrónica, donde se observó la fragmentación de la cromatina como la clásica condensación nuclear electrodensa en

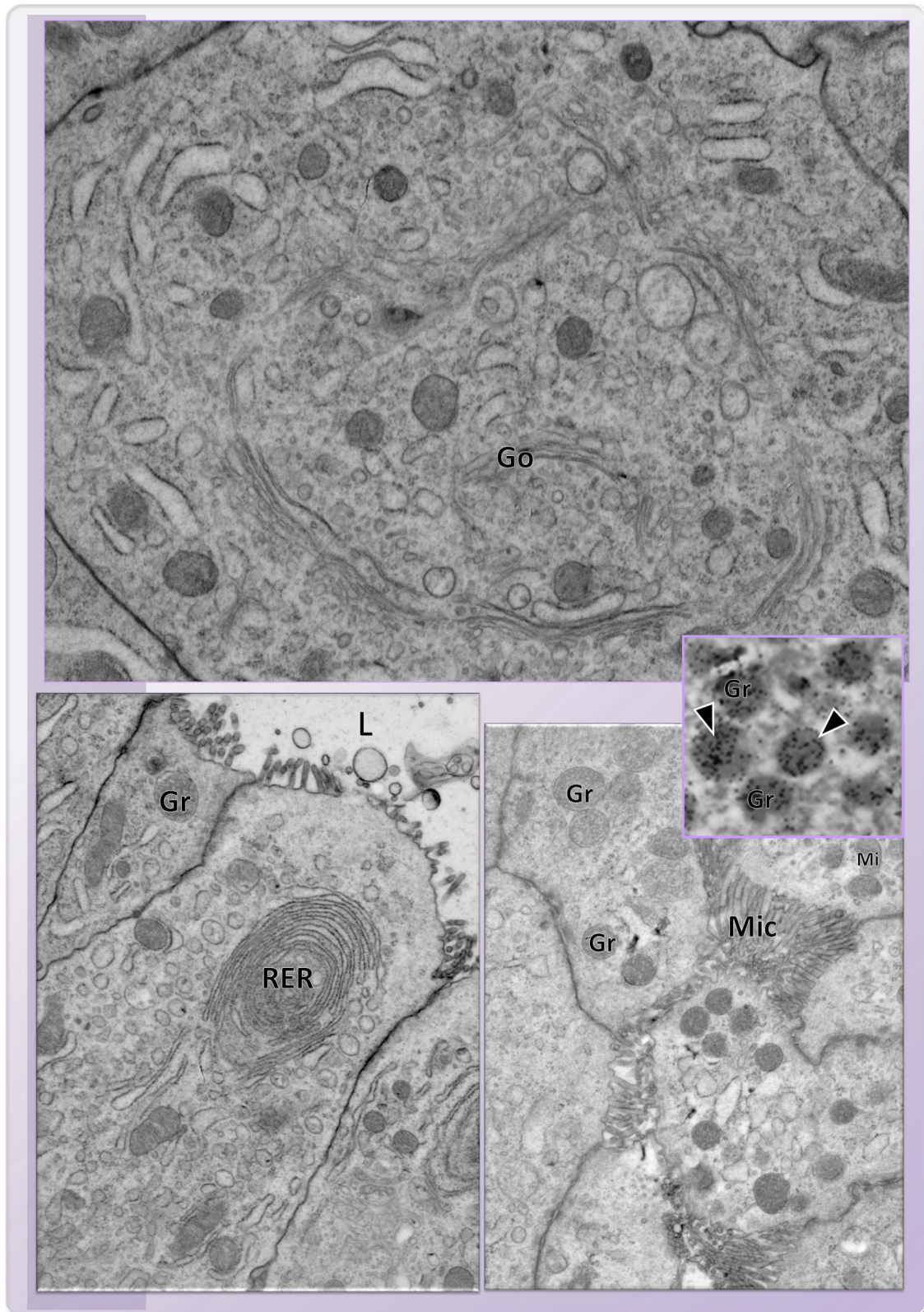


Figura 18: Micrografías electrónicas mostrando signos de estimulación celular en el epitelio prostático luego de 24 h de infección bacteriana. Las cabezas de flechas exponen los granulos secretorios positivos para PBP. Go: aparato de Golgi; L: luz acinar; Gr: gránulos; RER: retículo endoplasmático rugoso; Mic: Microvellosidades; Mi: mitocondria.

fragmentación de la cromatina como la clásica condensación nuclear electrodensa en forma de medialunas y la presencia de restos celulares fagocitados por macrófagos y células epiteliales vecinas (**Figura 20**).

3.1.3 Reacción estromal a la infección

El análisis morfológico del compartimiento estromal de la próstata ventral de animales controles demostró células musculares lisas dispuestas alrededor de los acinos formando una banda o capa simple y continua de células positivas para α SMA (**Figura 16**) y delineada por la membrana basal reticular, la cual fue fuertemente coloreada con la técnica de metenamina-plata (**Figura 19**). Por microscopía electrónica, las células musculares lisas se presentaron con escasas organelas encargadas de la síntesis proteica y un aparato miofibrilar electrodenso, extensamente marcado para α SMA (**Figura 21**). Por otro lado, los fibroblastos fueron observados como elementos escasos y aislados en la estroma interacinar. Estas células fueron positivas para vimentina (VIM) y demostraron un pobre desarrollo citoplasmático y de la maquinaria biosintética. También se encontraron fibroblastos en la estroma periacinar, entre la capa de células musculares y la membrana basal del epitelio prostático.

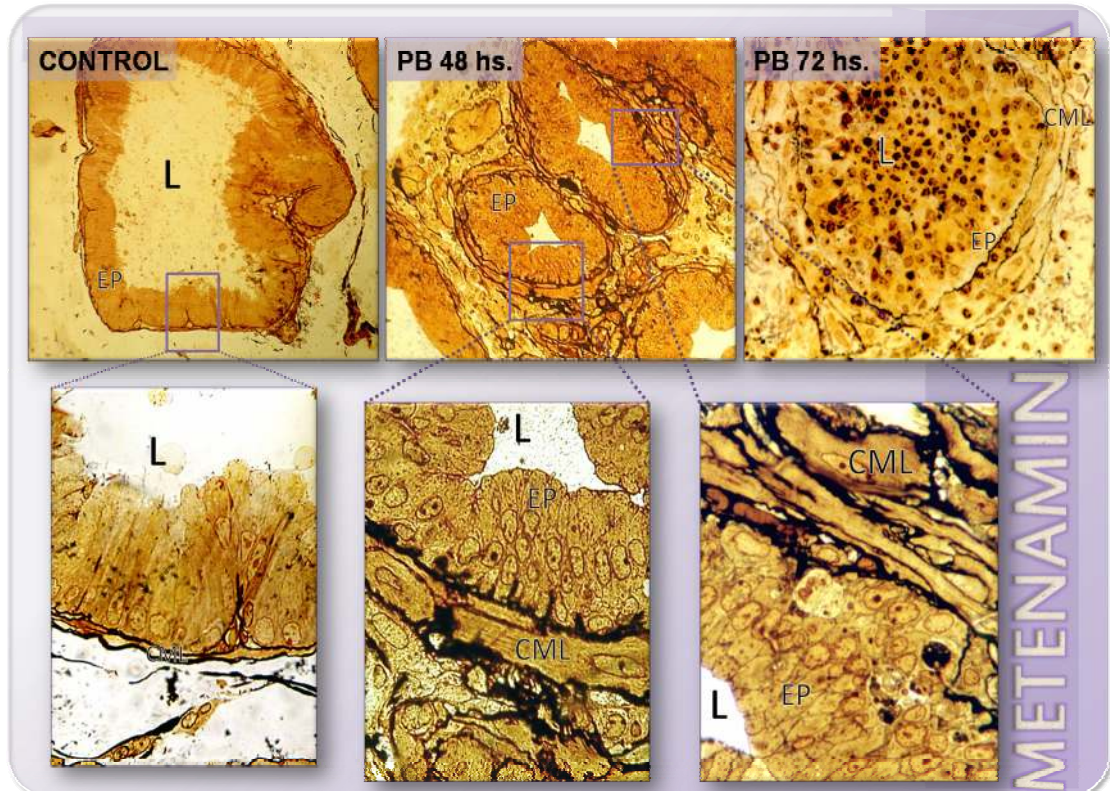


Figura 19: Secciones de próstata ventral incluida en Araldita y coloreadas con metenamina-plata. Se aprecia el gran desarrollo de los componentes epiteliales y estromales a las 48 h postinoculación y la posterior atrofia epitelial con disminución del tamaño de la capa periacinar. L: luz acinar; EP: células epiteliales; CML: células musculares lisas.

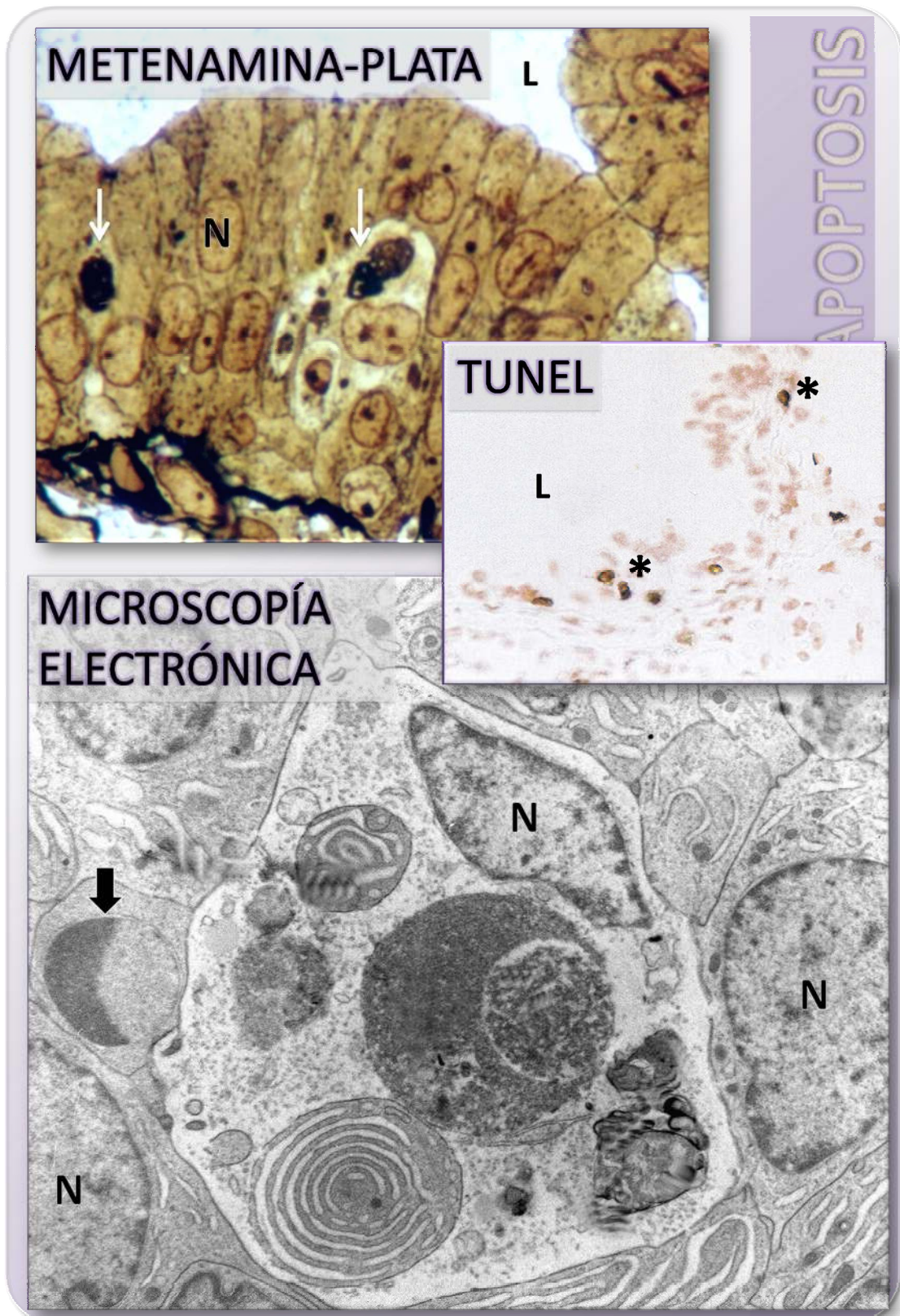


Figura 20: Micrografías del epitelio prostático exhibiendo figuras apoptóticas (flechas blancas) que fueron confirmadas mediante TUNEL (*) en animales infectados por 48 h. Por microscopía electrónica, se observaron frecuentemente núcleos con cromatina fragmentada (flecha) y restos celulares fagocitados. L: luz acinar; N: núcleo.

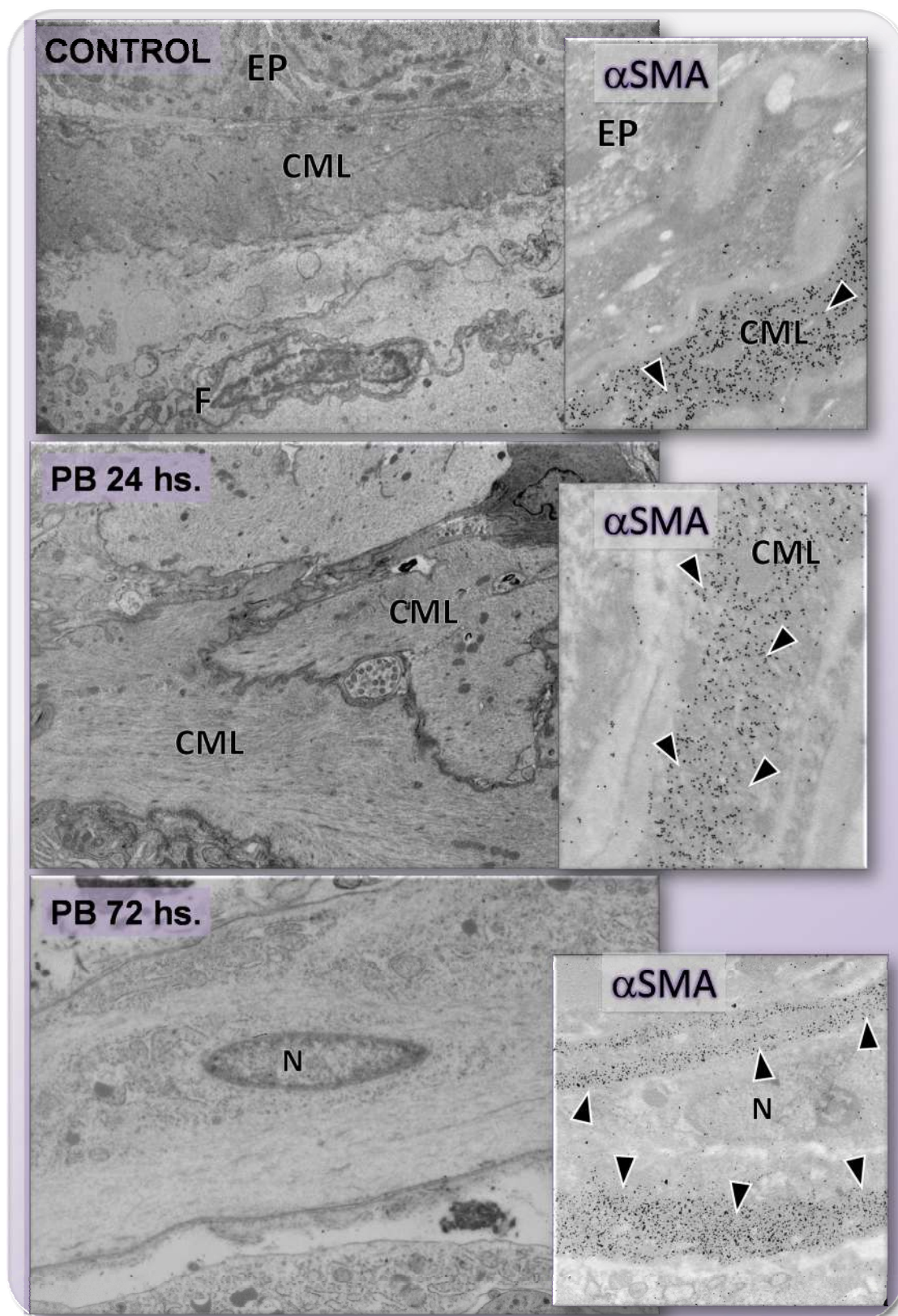


Figura 21: Micrográficas electrónicas mostrando las características ultraestructurales de las células musculares lisas (CML) periacinarias. Se presenta además la innumeración para α SMA (cabezas de flecha), cuya expresión disminuyó a las 72 h postinoculación, permaneciendo en las zonas periféricas de las células musculares. EP: célula epitelial; N: núcleo.

Una marcada hipertrofia de la capa periacinar fue observada a las 24 h postinoculación, asociada a un gran desarrollo de componentes de la matriz extracelular, revelado por la técnica de metenamina-plata (**Figura 19**). El engrosamiento de la estroma periacinar se asoció a un incremento en la inmunomarcación de α SMA (**Figura 16**) y se debió principalmente a hipertrofia de las células musculares lisas. Ocasionalmente, se distinguieron también dos o más células musculares formando la

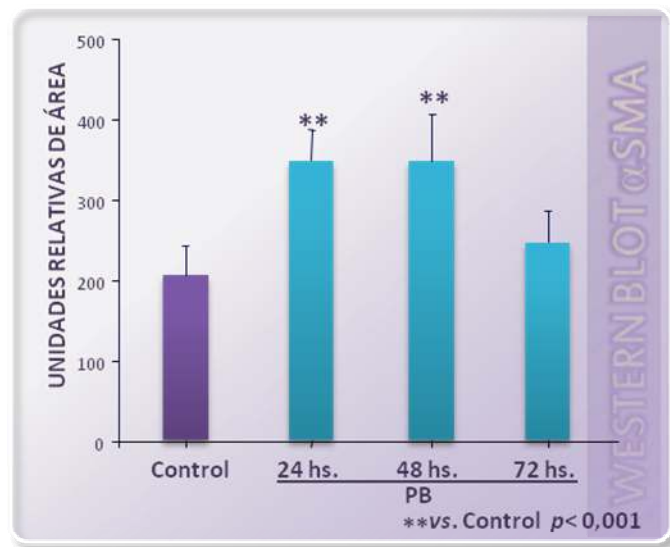


Figura 22: Expresión de α SMA en homogenatos totales de próstata ventral por western blot.

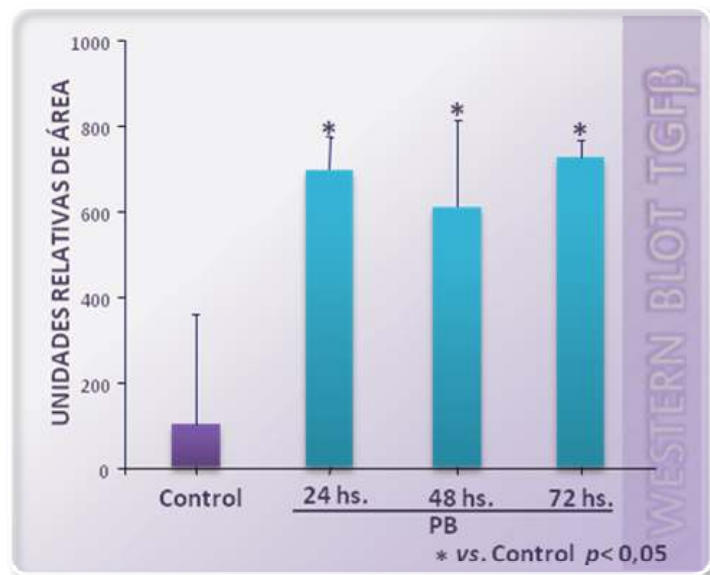


Figura 23: Niveles de TGF β 1 en homogenatos totales de próstata determinados por western blot.

capa periacinar. Las características ultraestructurales de estas células incluyeron un núcleo con prominentes nucléolos y cromatina laxa, abundantes mitocondrias en la región paranuclear y un sistema de miofibrillas fuertemente positivas para α SMA (**Figura 21**). La infección bacteriana por 24 h produjo un aumento en la expresión total de α SMA, evaluada por western blot (**Figura 22**).

A partir de las 48 h postinfección se evidenció una pérdida progresiva de la electrodensidad normal de las células musculares lisas, lo cual fue más pronunciado a las 72 h (**Figura 21**). Esta alteración morfológica se correlacionó con una disminución en la inmunoreactividad de α SMA y un gran desarrollo del sistema de organelas proteinopoiéticas a nivel ultraestructural. La densidad de los filamentos contráctiles se redujo y la expresión de α SMA quedó confinada a áreas cercanas al plasmalema (**Figura 21**), coincidiendo con un descenso en los niveles de expresión α SMA en homogenatos totales, que a las 72 h alcanzaron valores semejantes al control (**Figura 22**). Esto se acompañó de la presencia de numerosas fibras de colágeno en la matriz extracelular rodeando a las células musculares lisas.

Finalmente, los fibroblastos mostraron signos de estimulación celular como un prominente nucléolo y un notable crecimiento del sistema de endomembranas. La inmunodetección de VIM mostró una doble capa continua limitando las células musculares lisas en animales infectados que se mantuvo hasta las 48 h postinfección (**Figura 16**). A las 72 h postinoculación, se observó la disrupción de la capa estromal periacinar. Curiosamente, la inmunomarcación de VIM no se restringió al compartimiento intracelular, sino que fue evidente también en el espacio extracelular como un producto secretorio en los animales infectados.

Teniendo en cuenta que la citocina/factor de crecimiento TGF β 1 desempeña un importante rol en las modificaciones estromales de la próstata frente a diferentes alteraciones del microambiente, los niveles de esta proteína fueron analizados en homogenatos de próstata ventral por la técnica de western blot. Como se observa en la **Figura 23**, los valores de TGF β 1 incrementaron significativamente en el transcurso de la infección prostática, comparado con los animales controles. Los niveles de expresión de esta citocina no evidenciaron diferencias significativas entre los tiempos postinfección.

En conjunto, los datos morfológicos y funcionales permitieron observar una gran estimulación temprana de los compartimientos epitelial y estromal en respuesta a

la infección bacteriana. Hacia las 72 h postinfección se observó un importante daño epitelial con pérdida de su función secretoria.

3.2 Modulación de moléculas de inmunidad innata por *E. coli*

Luego de observar las alteraciones morfológicas producidas por la infección bacteriana en tiempos cortos sobre los compartimientos tisulares de la próstata, se investigó la expresión de proteínas de defensa en las células prostáticas y su regulación por parte de *E. coli*. Se considera que estas moléculas son fundamentales en la etapa inicial del contacto entre el patógeno y los tejidos del huésped, por lo que se examinó primero si en condiciones basales las células prostáticas expresan TLR4, el cual constituye el principal receptor de bacterias Gram negativas. Se evaluó luego la regulación de esta proteína por parte de la infección bacteriana.

3.2.1 Activación del sistema TLR4-NF- κ B en respuesta a la infección

Como se muestra en la Figura 24, la glándula prostática expresa TLR4 en forma constitutiva. El western blot reveló una banda positiva de aproximadamente 90 kDa en todas las condiciones experimentales. El grupo PB exhibió un incremento significativo y progresivo en la expresión de TLR4 en todos los tiempos analizados comparados con animales controles (**Figura 25**).

La localización de TLR4 en la glándula prostática así como los cambios en su expresión fueron luego examinados por inmunocitoquímica (ICQ) a nivel de microscopía fotónica y electrónica. En las ratas controles, la inmunomarcación para TLR4 fue débil tanto en células epiteliales como estromales; mientras que la mayor expresión fue detectada en las paredes de las arteriolas (**Figura 25**). La técnica de oro coloidal para la detección ultraestructural reveló la expresión TLR4 asociada principalmente a membranas del RER, siendo negativa en la membrana plasmática apical (**Figura 26**).

El aumento de TLR4 en animales infectados, determinado por western blot, se correlacionó con una fuerte inmunomarcación en células epiteliales y en las células musculares de la capa periacinar; algunas células inflamatorias también fueron positivas para TLR4 (**Figura 25**). A nivel de microscopía electrónica, la expresión no se restringió a membranas intracelulares, sino que se observó una notable redistribución de la localización del receptor hacia el citoplasma apical, microvellosidades y complejos de unión de las células epiteliales (**Figura 26**), hallazgo más destacado a las 48 h

postinoculación. Las células musculares hipertróficas de los animales infectados también exhibieron una fuerte expresión citoplasmática de TLR4 a nivel ultraestructural (**Figura 27**).

El incremento y redistribución de TLR4 en animales infectados se asoció a translocación nuclear del factor de transcripción NF- κ B en células epiteliales prostáticas, determinado por ICQ a nivel de microscopía fotónica y electrónica (**Figura 28**). La translocación nuclear de NF- κ B fue más notable a las 48 h postinoculación, coincidiendo con el grado mayor de estimulación de las células epiteliales prostáticas.

3.2.2 Expresión de moléculas proinflamatorias y antimicrobianas

Teniendo en cuenta la gran estimulación celular temprana producida por la infección bacteriana sobre las células epiteliales prostáticas, que incluía además un incremento de TLR4 y translocación de NF- κ B al núcleo, se consideró el análisis de mecanismos efectores puesto en marcha por estas células frente a *E. coli*; con este fin se investigó la expresión de dos moléculas antimicrobianas (SP-D y β DEF-1) y de las citocinas proinflamatorias TNF α , IL1 β e IL6 en tejido prostático proveniente de animales del grupo PB y sus controles respectivos.

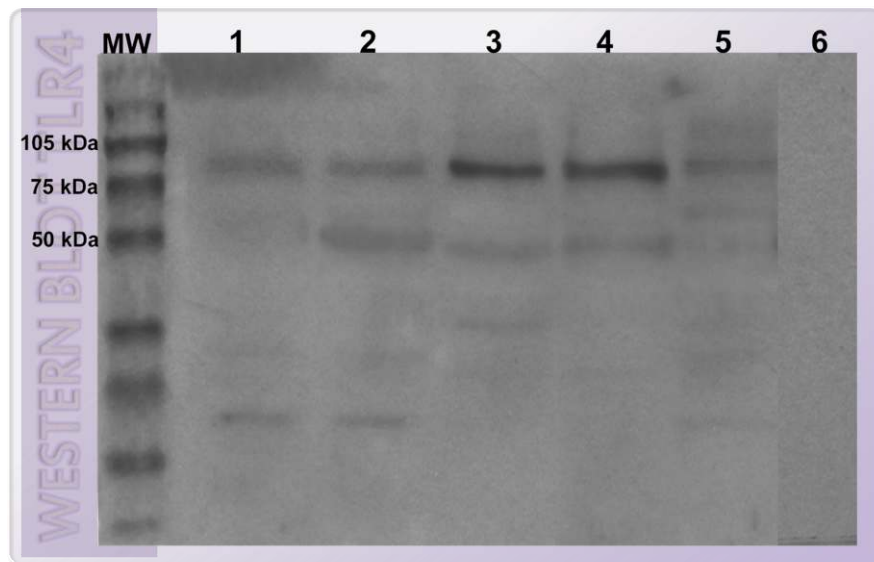


Figura 24: Detección de TLR4 mediante western blot. Se observó una banda inmunoreactiva de aproximadamente 90 kDa. Los carriles 1 y 2 corresponden a muestras de animales intactos; el 3 al grupo BP 48 hs., mientras que en el 4 y 5 se sembraron muestras de OX y TT respectivamente. El carril 6 corresponde a un homogenato de OX, donde el anticuerpo primario fue reemplazado por IgG de cabra purificada. MW: peso molecular.

La inmunomarcación de la proteína SP-D se evidenció en el epitelio prostático de animales controles, principalmente en la porción apical de las células. La intensidad de la expresión epitelial de SP-D fue incrementada en la próstata de animales infectados examinados a las 24 y 48 h postinoculación (**Figura 29**). Algunas células inflamatorias, especialmente neutrófilos presentes en el intersticio y en la luz acinar, fueron también positivas para SP-D. A las 72 h postinoculación, la inmunomarcación de SP-D fue menos intensa que en tiempos anteriores; sin embargo, se mantenía más fuerte al compararla con animales controles. Además, los niveles de SP-D fueron evaluados por western blot en homogenatos prostáticos provenientes del grupo PB. Los ensayos demostraron una banda inmunoreactiva para SP-D de aproximadamente 40 kDa, correspondiente al peso molecular de esta proteína. Los niveles de SP-D aumentaron significativamente en próstatas provenientes de animales infectados por 24 y 48 h, confirmando los hallazgos de la ICQ. Sin embargo, hacia las 72 h postinoculación, la expresión de SP-D declinó, sin mostrar diferencias significativas con los observados en ratas controles (**Figura 30**).

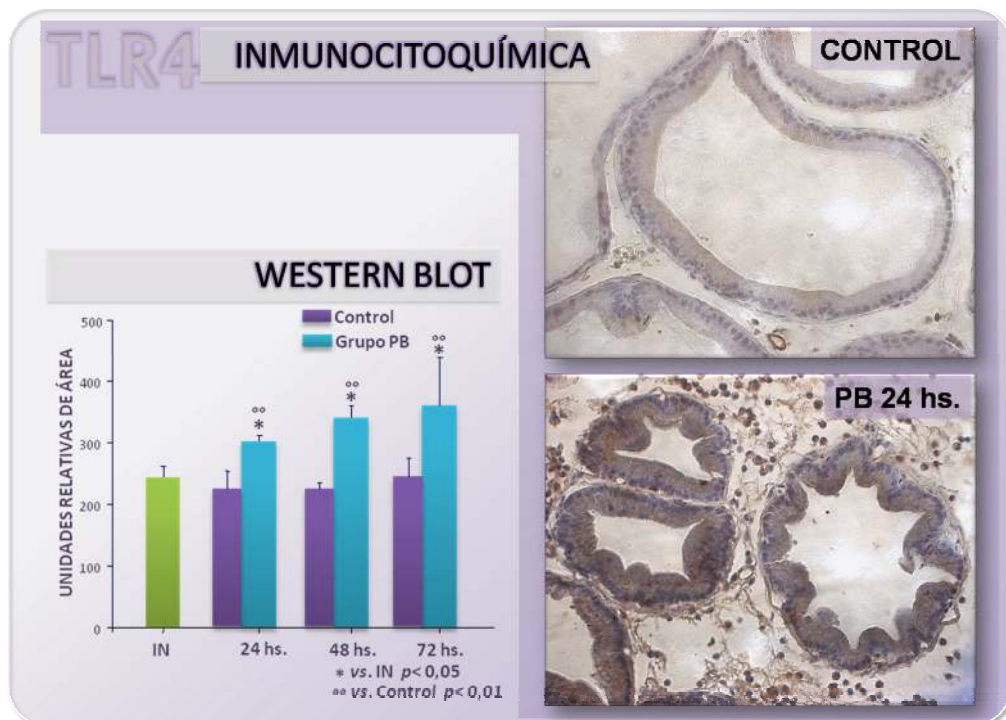


Figura 25: Determinación de la expresión de TLR4 en el grupo PB.

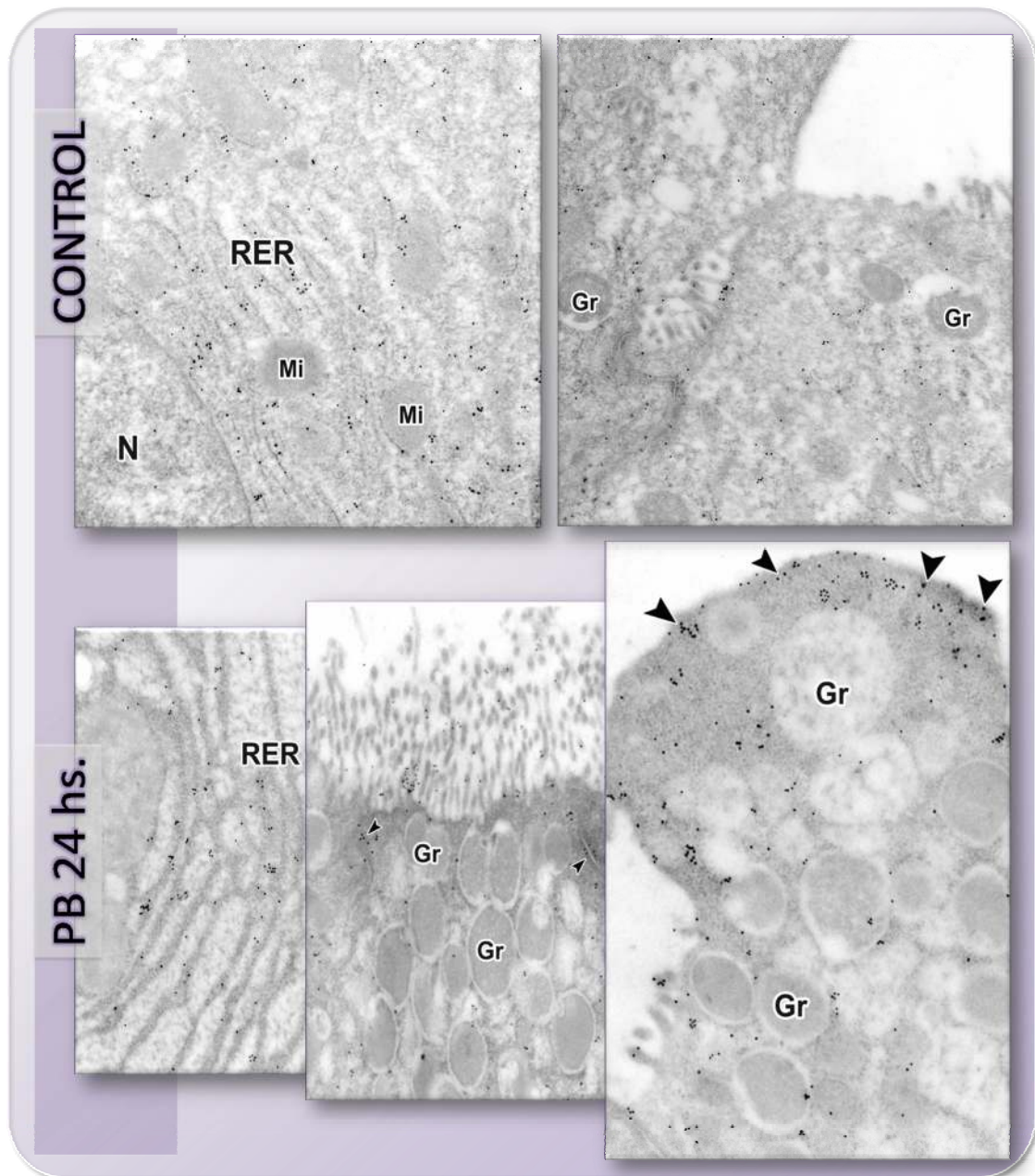


Figura 26: Localización ultraestructural de TLR4 en células epiteliales prostáticas por medio de la técnica de oro coloidal. Luego de la inoculación bacteriana, el receptor se expresa en las zonas cercanas a la membrana celular apical (cabezas de flecha). N: núcleo; Mi: mitocondria; Gr: gránulos; RER: retículo endoplasmático rugoso.

β DEF-1 es un pequeño péptido catiónico con potente actividad antimicrobiana que se expresa ampliamente en las superficies epiteliales del organismo. El epitelio prostático no exhibió inmunoreactividad para este péptido en condiciones normales mediante inmunocitoquímica; sin embargo, la expresión de β DEF-1 fue fuertemente evidenciada en células epiteliales luego de la infección prostática por *E. coli* (**Figura 29**). Este aumento de β DEF-1 fue más notable en los tiempos tempranos

postinoculación, decayendo hacia las 72 h. Asimismo, se evidenció una fuerte expresión de β DEF-1 en células inflamatorias, particularmente en polimorfonucleares neutrófilos.

Aunque la secreción de antimicrobianos por parte de las células epiteliales es un aspecto fundamental de la respuesta innata frente a las infecciones, el reclutamiento de células inmunes profesionales y la activación de la inmunidad adquirida aseguran la rápida eliminación de los patógenos; para ello, los epitelios deben ser capaces de secretar citocinas en respuesta a la invasión bacteriana. Considerando este postulado, se examinó la expresión de las citocinas proinflamatorias $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ e IL6 en el epitelio prostático y su modulación por la infección. Como se muestra en la **Figura 31**, la inmunomarcación epitelial de $\text{TNF}\alpha$ incrementó notablemente luego de la inoculación bacteriana. Es interesante notar que la expresión de $\text{TNF}\alpha$ permaneció elevada aún en el epitelio atrófico de las 72 h postinoculación. A diferencia de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ e IL6 fueron detectadas a partir de las 48 h postinoculación y sus expresiones estuvieron asociadas principalmente a células inflamatorias.

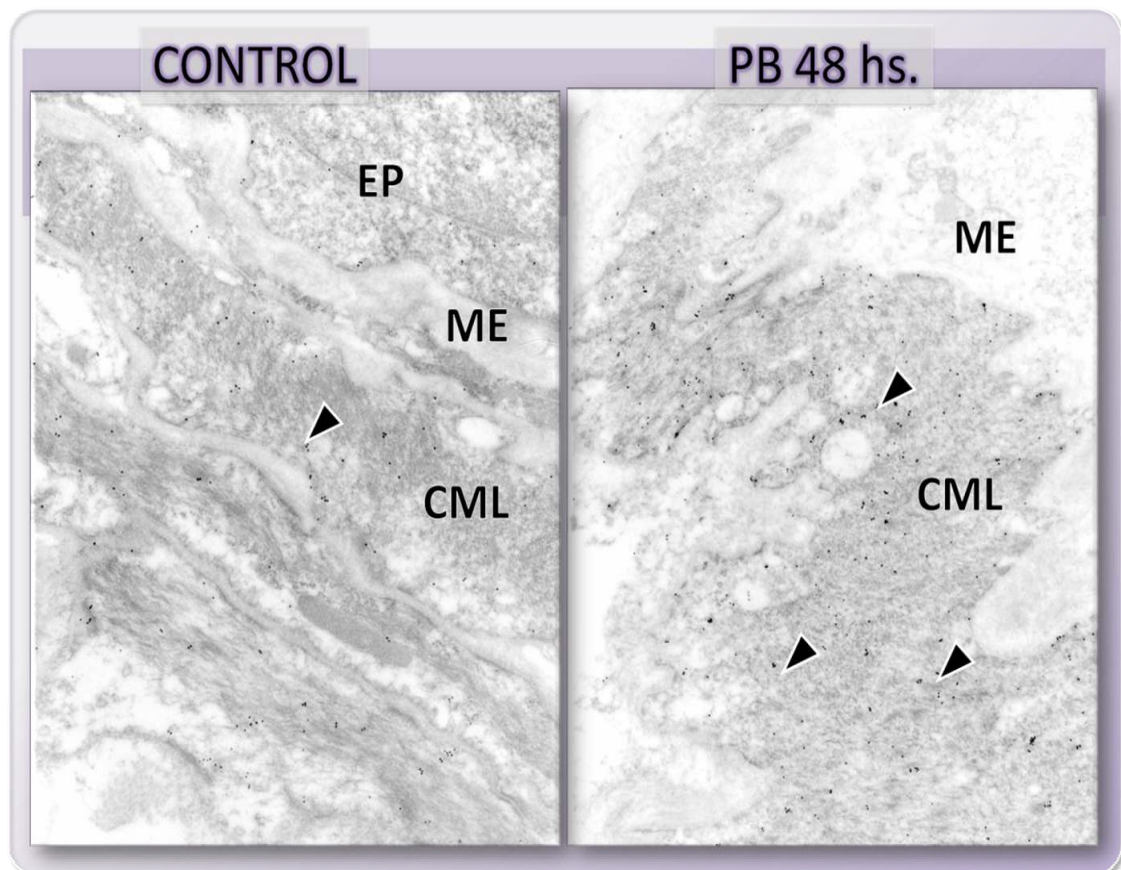


Figura 27: Inmunocitoquímica ultraestructural para TLR4 en células musculares lisas (CML). Las cabezas de flecha indican la localización de este receptor tanto en animales controles como infectados. EP: célula epitelial; ME: matriz extracelular.

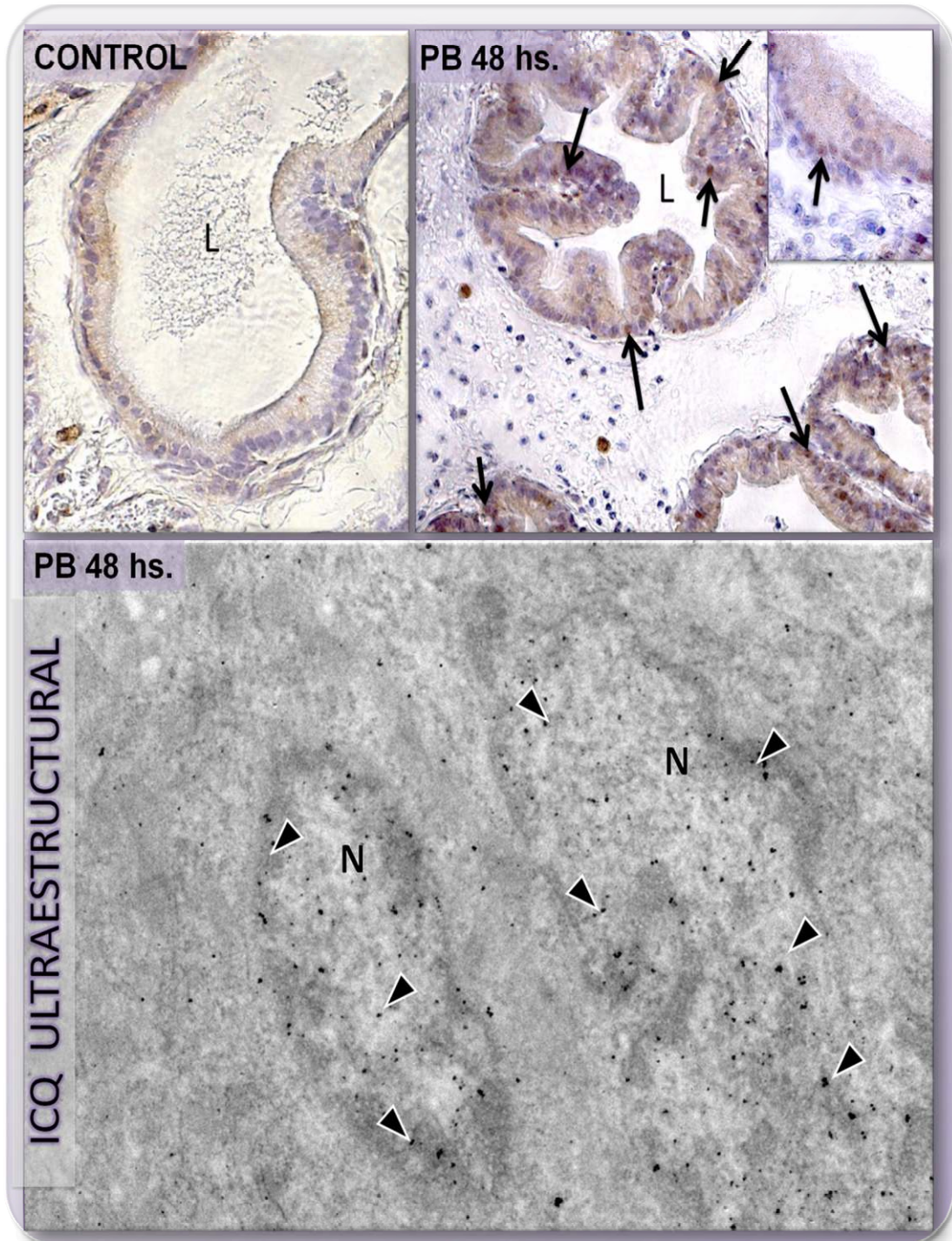


Figura 28: Inmunocitoquímica que revela la translocación nuclear del factor de transcripción NF-κB a nivel de microscopía fotónica (flechas) y electrónica (cabezas de flecha) luego de la inoculación bacteriana.

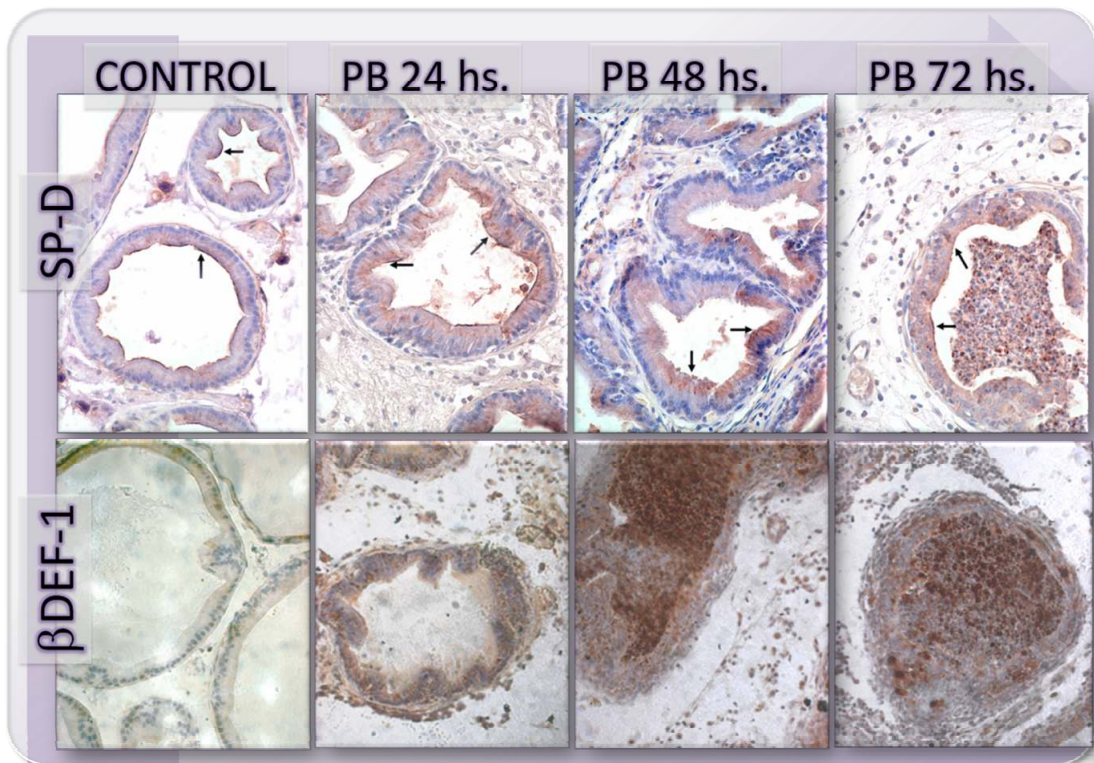


Figura 29: Expresión de moléculas antimicrobianas en la próstata ventral de rata durante la prostatitis bacteriana. SP-D se localiza en el área epitelial apical de animales controles e incrementa en animales infectados (flechas); la bacteria indujo además la expresión epitelial de βDEF-1. Ambos antimicrobianos fueron detectados también en células inflamatorias que invaden la glándula.

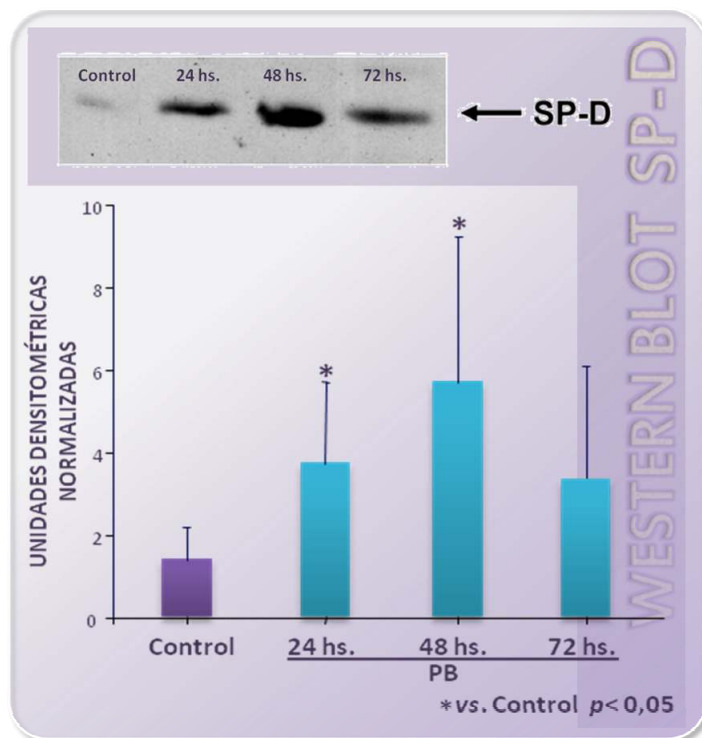


Figura 30: Análisis de la expresión de SP-D por western blot. Se muestra una banda inmunoreactiva de ~40 kDa que aumentó su intensidad en animales con prostatitis bacteriana.

3.2.3 Análisis de proteínas antiinflamatorias

Una vez establecido el proceso inflamatorio, la presencia de sustancias antiinflamatorias e inmunomoduladoras evita los efectos nocivos de la inflamación sobre los tejidos del huésped. Considerando que PBP tiene características inmunosupresoras, se analizó su expresión no sólo como un parámetro de actividad epitelial prostática sino también analizando si la infección bacteriana modula los niveles de esta proteína. Por inmunocitoquímica, PBP se evidenció acumulada principalmente en la secreción prostática de animales controles, mientras que las células epiteliales exhibieron una débil marcación alrededor del núcleo. Luego de la inoculación bacteriana, el citoplasma apical mostró una fuerte expresión de PBP (**Figura 16, 17 y 18**). La inmunomarcación incrementada se localizó tanto en gránulos secretorios como en el compartimiento citosólico (**Figura 17**). Los cortes histológicos demostraron la falta de secreción en los animales infectados, probablemente debido a un efecto contráctil de *E. coli* sobre la capa muscular periácinar, por lo que el contenido luminal

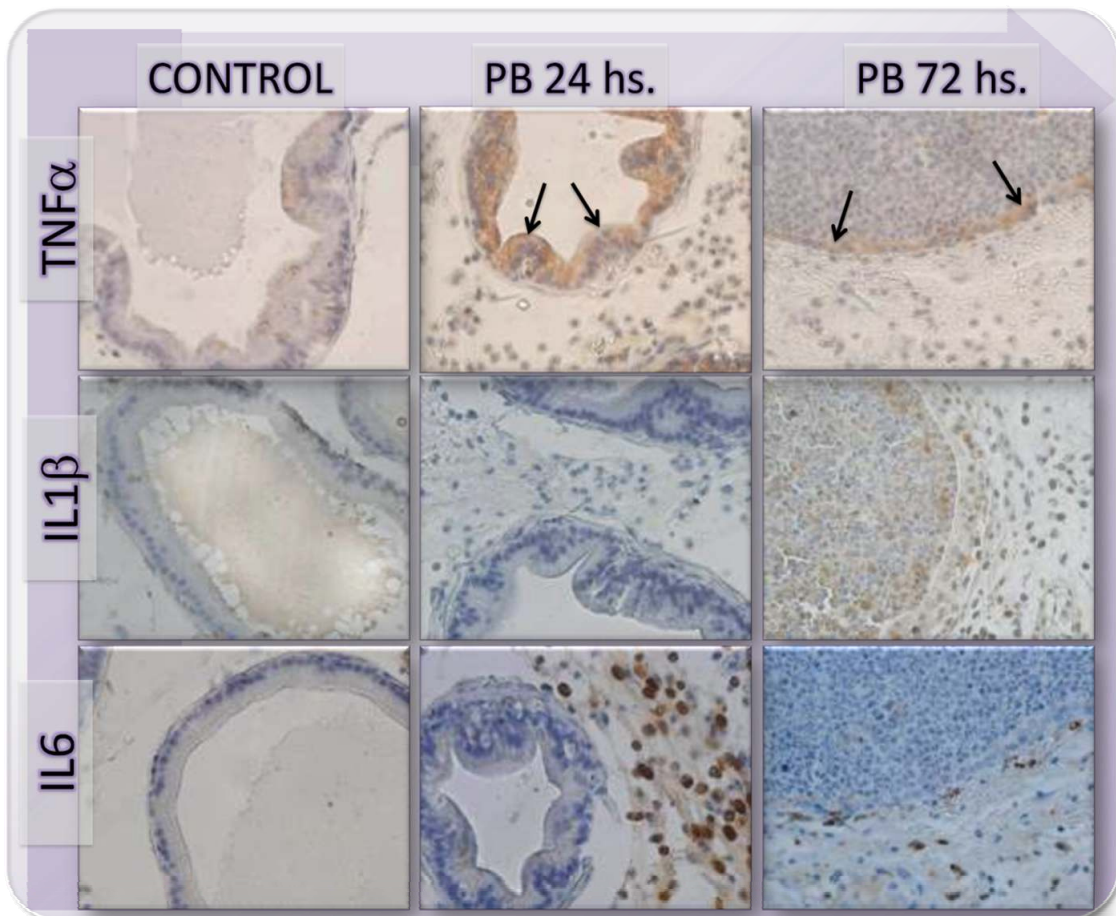


Figura 31: Inmunocitoquímica de las citocinas proinflamatorias TNF α , IL1 β e IL6 en tejido prostático. Sólo TNF α es claramente expresada en el epitelio prostático luego de la inoculación bacteriana (flechas).

de PBP fue difícil de evaluar por ICQ (**Figura 16**). El aumento en la expresión epitelial de PBP se mantuvo hasta las 48 h postinoculación; como se muestra en la **Figura 16**, a las 72 h pocas células epiteliales permanecieron positivas para esta proteína, mientras que el contenido secretorio luminal exhibió inmunoreactividad entre las células inflamatorias que ocupaban la luz glandular. El análisis de dot blot confirmó el

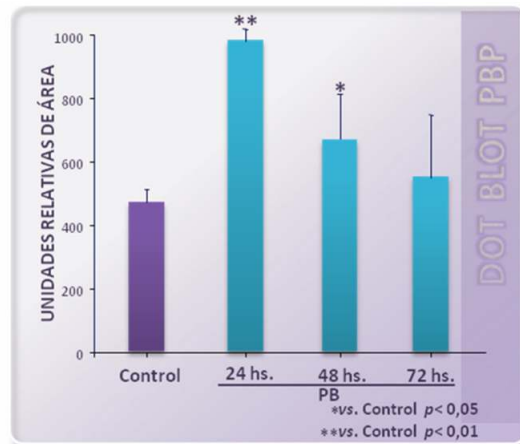


Figura 32: Niveles de PBP en secreción prostática determinados por dot blot y analizados mediante densitometría.

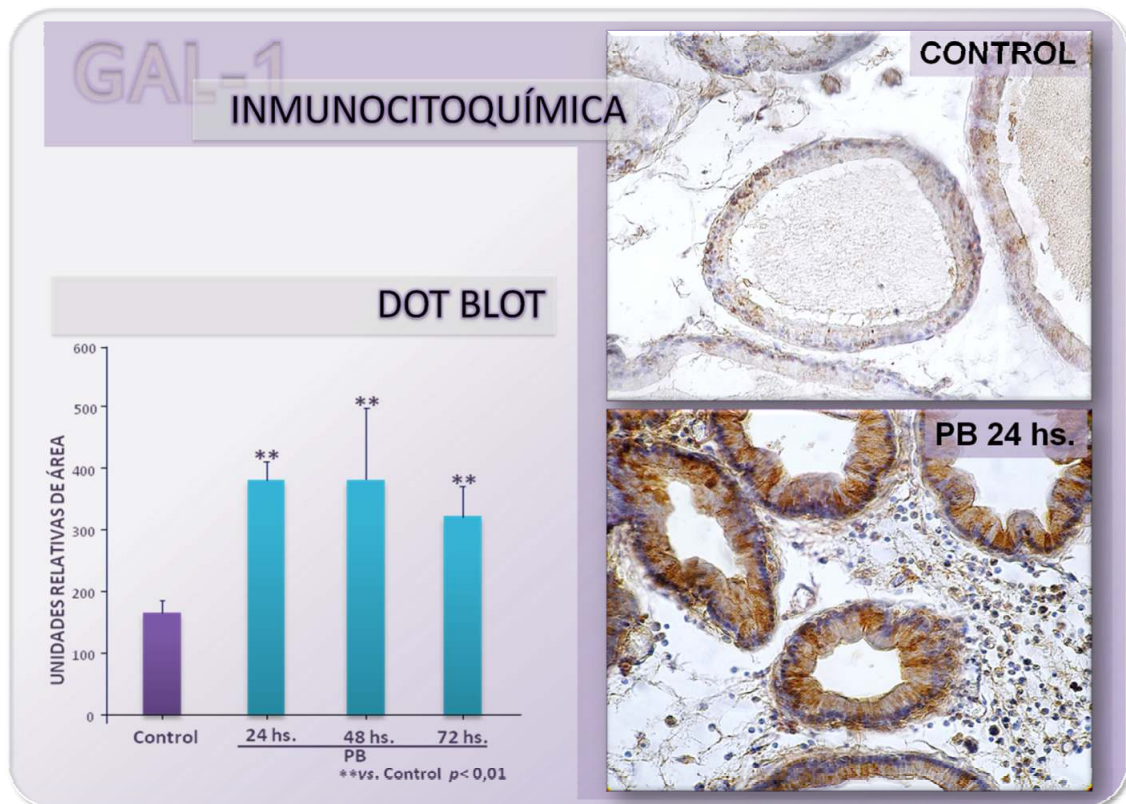


Figura 33: Análisis de la expresión de la proteína antiinflamatoria e inmunomoduladora Gal-1 en secreción prostática por dot blot (izquierda) y en muestras de tejido prostático por inmunocitoquímica (derecha).

incremento en la secreción de PBP, con un pico a las 24 h postinoculación y un descenso posterior, siendo los niveles observados a las 72 h similares a los del control (**Figura 32**).

Gal-1 tiene potentes efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores por varios mecanismos, incluyendo la apoptosis de linfocitos. Gal-1 es una proteína expresada principalmente en células del sistema inmune, aunque también se expresa en algunos epitelios, incluso en próstata humana (102); pero se desconoce si la infección bacteriana modula su expresión en este órgano. Mediante ICQ se demostró que GAL-1 se localiza en el citoplasma del epitelio prostático y su expresión se incrementa durante la prostatitis bacteriana (**Figura 33**). Las células inflamatorias también fueron inmunoreactivas para Gal-1, particularmente mononucleares. A las 24 h postinoculación se notó una fuerte inmunomarcación en las células epiteliales prostáticas, que fue superior a las observadas en tiempos posteriores. El análisis de dot blot confirmó el aumento de esta proteína en animales infectados (**Figura 33**).

En conclusión, la infección por *E. coli* produjo un incremento en la expresión de proteínas de defensa de origen tanto epitelial como estromal. La respuesta a la bacteria incluyó también el aumento de sustancias con actividad inmunomoduladora como PBP y Gal-1 en la próstata.

3.3 Alteraciones morfofuncionales prostáticas secundarias a obstrucción uretral

La obstrucción uretral y el subsecuente reflujo urinario intraprostático constituyen factores centrales en la etiopatogenia de la inflamación prostática. Sin embargo no se conocen completamente los efectos de este tipo de injuria sobre las células prostáticas. Utilizando un modelo de obstrucción parcial de la uretra (OPU), se estudiaron los cambios celulares tempranos y la modulación de TLR4 desencadenados por esta noxa.

3.3.1 Análisis de signos inflamatorios

El análisis macroscópico de los órganos genitourinarios de los animales con OPU mostró una marcada distensión de la vejiga y moderada tumefacción del complejo prostático y las vesículas seminales, y marcada hiperemia en los tejidos; sin embargo, no se observó dilatación del sistema pielocalicial. Estos hallazgos fueron más notorios a las 72 h postobstrucción, tiempo en el cual todos los animales analizados presentaron

estos signos inflamatorios. Los experimentos de obstrucción uretral tuvieron una mortalidad de alrededor del 10%; estos animales murieron en las primeras 24 h posteriores al ensayo, debido principalmente a una complicación de la ligadura, que produjo una obstrucción total del flujo urinario. Estos animales fueron excluidos del modelo experimental (aproximadamente un 5% del total de experimentos) y se examinaron sólo aquellos que no presentaban signos de respuesta inflamatoria generalizada o sepsis tales como disminución de la locomoción, hiperquinesia o irritabilidad.

El análisis microscópico del lóbulo ventral de la próstata evidenció infiltrado

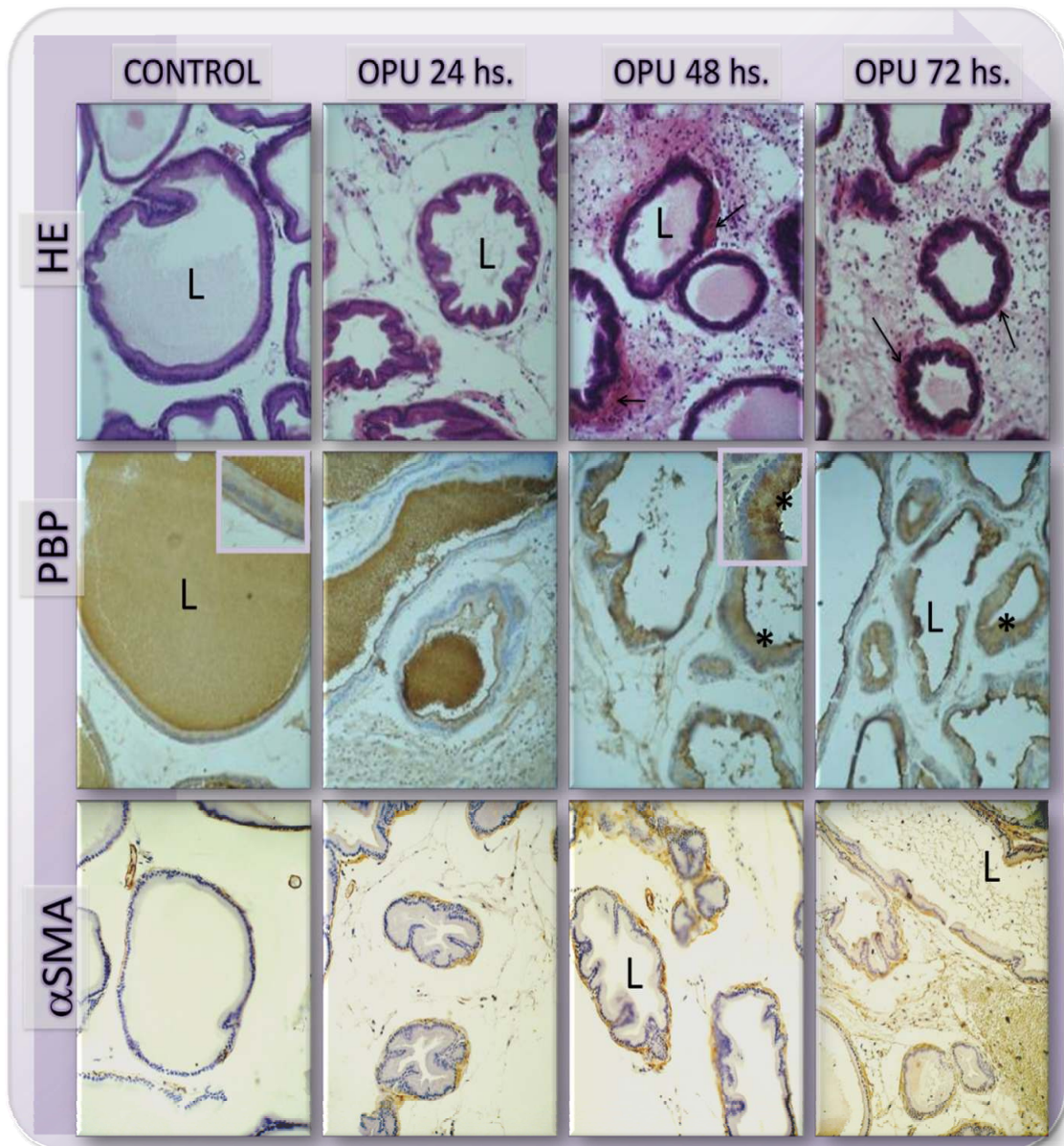


Figura 34: Secciones de próstata ventral de rata que muestran las alteraciones tisulares posteriores a OPU. Además del infiltrado inflamatorio observado en estos animales, el edema y la extravasación de glóbulos rojos forman estructuras eosinofílicas alrededor de los acinos (flechas). El epitelio prostático presenta un incremento de PBP, más evidente a las 48 y 72 h postobstrucción; mientras que la expresión de α SMA se hace menos intensa hacia las 72 h L: luces acinares.

inflamatorio intersticial que progresó gradualmente, alcanzando un pico entre las 48 y 72 h postobstrucción (**Figura 34**). Los cambios inflamatorios observados a las 6 h postobstrucción incluyeron edema, vasodilatación e infiltrado inflamatorio de células mononucleares de distribución pericapilar. A partir de las 24 h, se demostró la presencia de escasos PMNN, los que aumentaron significativamente hacia las 48 y 72 h postobstrucción. En estos últimos periodos de tiempo, la congestión vascular se acompañó de extravasación eritrocitaria, localizada preferentemente a nivel periacinar. Otra observación frecuente en los tiempos más avanzados fue la distensión de las luces acinares de la glándula. El lóbulo dorsal y las glándulas de coagulación exhibieron también signos inflamatorios luego de la obstrucción uretral, consistentes especialmente en moderado edema y leve infiltrado de células mononucleares; sin embargo, las alteraciones en estos sitios no tuvieron la severidad ni la progresión observada en el lóbulo ventral.

3.3.2 Respuesta de las células epiteliales y estromales a la obstrucción uretral

Con el fin de examinar los cambios epiteliales y estromales prostáticos secundarios a la obstrucción parcial de la uretra, se estudiaron cortes de próstata ventral

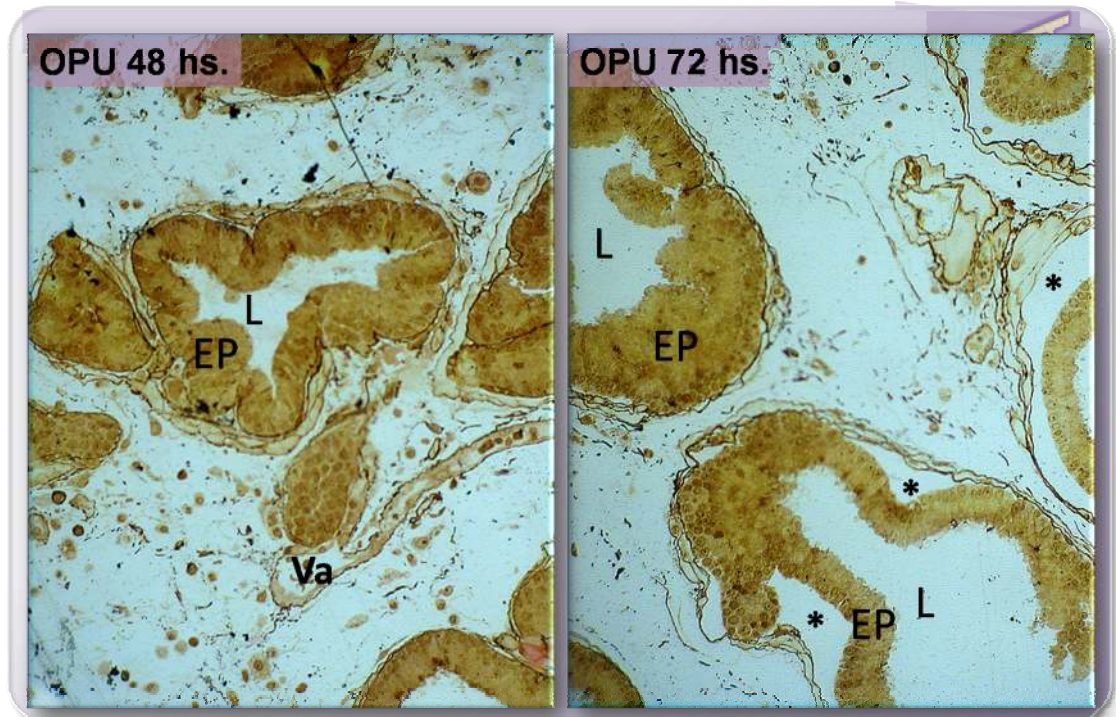


Figura 35: Secciones de Araldita coloreadas con metenamina-plata exhibiendo modificaciones del calibre de vasos sanguíneos (Va) y la separación entre el compartimiento epitelial y la estroma periacinar prostático (*) luego de la obstrucción uretral. L. luz acinar; EP: células epiteliales.

a 6, 24, 48 y 72 h postobstrucción por medio de microscopía óptica y electrónica.

El análisis de secciones incluidas en Araldita demostró una fuerte estimulación de las células epiteliales prostáticas (**Figura 35**), caracterizada principalmente por hipertrofia celular y una gran cantidad de gránulos secretorios, los cuales se observaron con mayor frecuencia en animales de 48 h postobstrucción (**Figura 36**). Estas características se mantuvieron aún a las 72 h postobstrucción, tiempo en el que

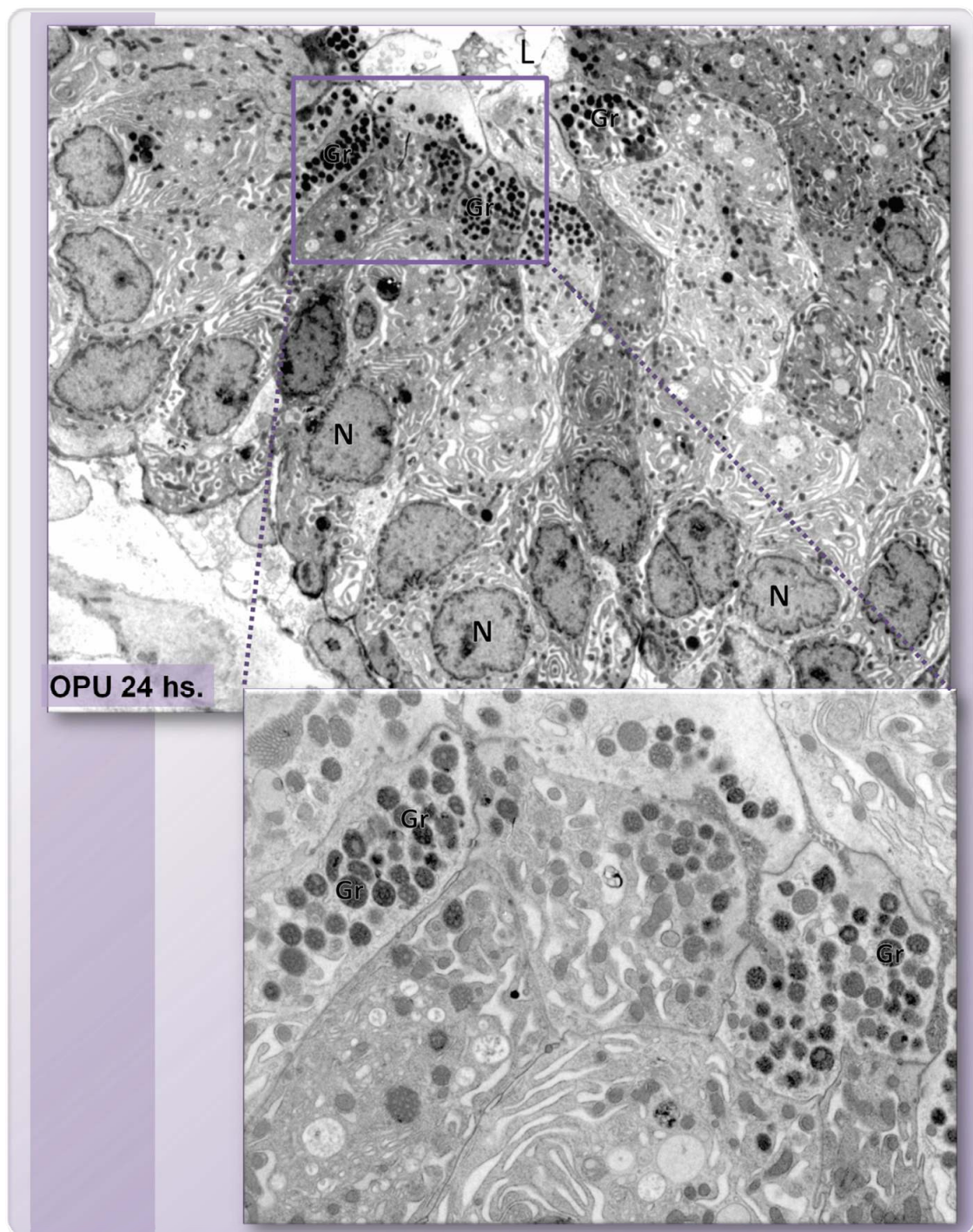


Figura 36: Micrografía electrónica demostrando la presencia de numerosos gránulos secretorios (Gr) en células epiteliales prostáticas luego de la OPU. L: luz acinar; N: núcleo.

infiltrado inflamatorio intersticial fue más intenso. La inmunomarcación de PBP confirmó la estimulación epitelial, mostrando una elevada expresión citoplasmática en los animales con inflamación (**Figura 34**), aún en el periodo más tardío, reflejando la integridad epitelial en este modelo a diferencia de lo observado en el grupo PB.

Además de la vasodilatación observada en animales con obstrucción, se

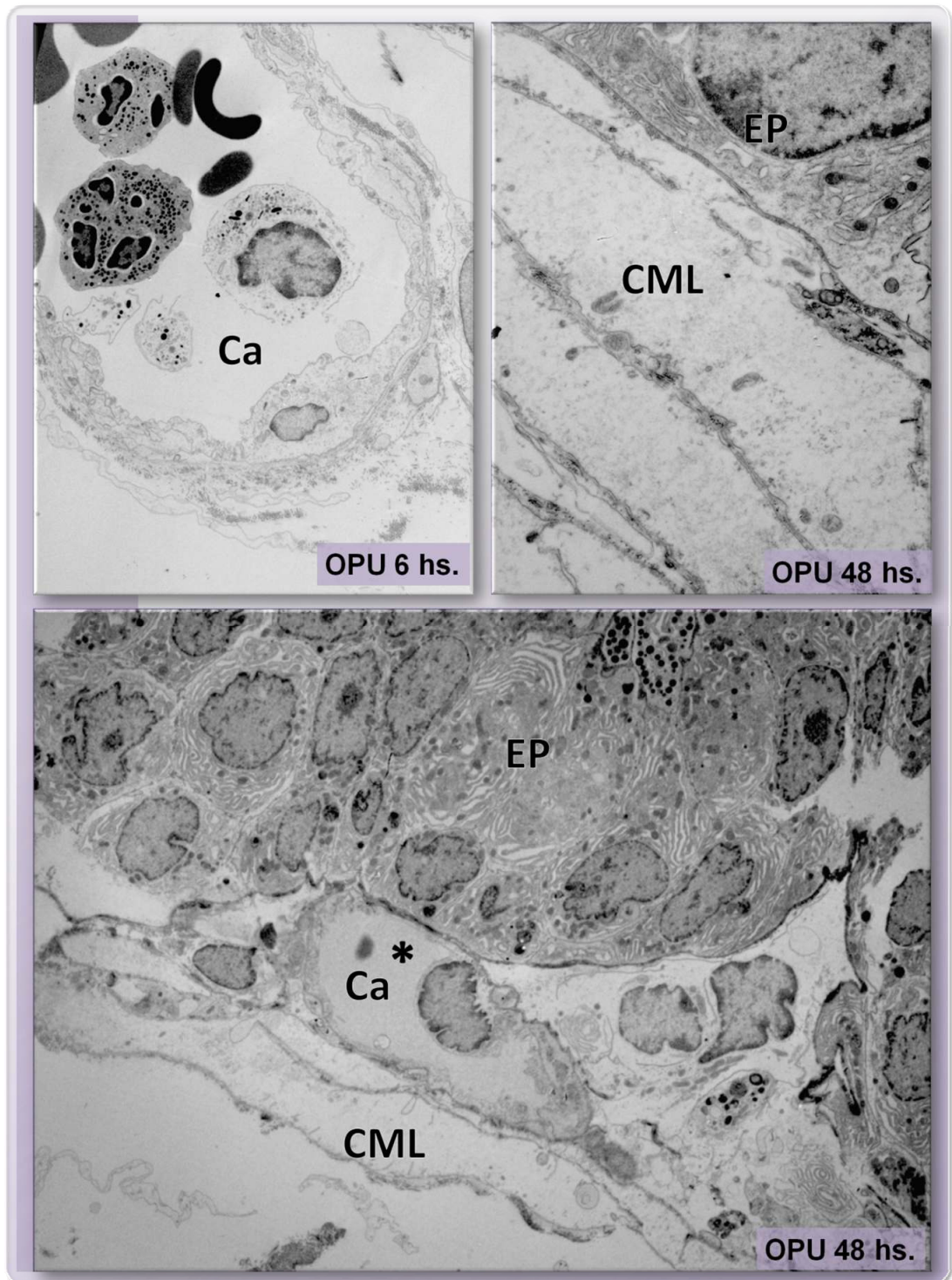


Figura 37: Micrografías electrónicas de secciones de próstata de animales del grupo OPU. Uno de los signos inflamatorios observados más tempranamente fue la intensa dilatación vascular, que se hizo también evidente en capilares ubicados entre el epitelio y las capa muscular periacinar (*). Por otro, se visualizan células musculares lisas (CML) con baja electrodensidad. Ca: capilares; EP: células epiteliales.

evidenció frecuentemente la presencia de dilataciones de capilares periacinares localizados entre la membrana basal epitelial y las células musculares (**Figura 35 y 37**). Estos capilares son difícilmente vistos en la próstata ventral de animales controles.

Por otro lado, las células musculares de la capa periacinar exhibieron un citoplasma claro, con aumento de tamaño, perdiendo su densidad normal de microfilamentos en forma progresiva luego de la obstrucción (**Figura 27**). La débil inmunomarcación de α SMA confirmó la disminución del aparato contráctil en estas células, que a nivel ultraestructural se presentaron con una electrodensidad inferior a la observada en células musculares de animales controles y con discreto edema intracelular (**Figura 37**).

La obstrucción parcial de la uretra resultó en un potente estímulo para el epitelio prostático, el cual se mostró con numerosos signos de actividad secretoria. En forma interesante, en este modelo de prostatitis abacteriana se mantuvo la integridad del compartimiento epitelial hasta las 72 h post obstrucción.

3.4 Respuesta inmune innata en la prostatitis no bacteriana

Luego de observar la reacción inmune desencadenada en la próstata por la infección bacteriana y considerando la gran capacidad de respuesta de las células epiteliales prostáticas, se examinó la expresión de TLR4 y NF- κ B, moléculas claves de la inmunidad innata, en tejido prostático de animales con prostatitis por obstrucción parcial de la uretra. Mediante western blot, se observó la expresión de TLR4, la que aumentó en forma significativa a partir de las 24 h postobstrucción (**Figura 38**). Los niveles de TLR4 se mantuvieron también elevados en los tiempos posteriores analizados. Por ICQ, este receptor se localizó en células inflamatorias; sin embargo, la inmunomarcación más intensa en la próstata postobstrucción correspondió al citoplasma de células epiteliales, especialmente a las 48 y 72 h postobstrucción (**Figura 38**).

Considerando que la vía de activación de TLR4 incluye la translocación del factor de transcripción NF- κ B hacia el núcleo celular, se determinó la localización de NF- κ B en secciones de parafina mediante ICQ. La expresión de este factor incrementó notablemente en el citoplasma de las células epiteliales prostáticas luego de la obstrucción; sin embargo, la translocación de NF- κ B no fue claramente observada en ninguno de los tiempos postobstrucción examinados. Como control positivo, se

utilizaron secciones de próstata infectada con *E. coli* del grupo PB, en las que se había determinado previamente la translocación nuclear de esta proteína.

Finalmente, se analizó la expresión de la citocina TNF α como molécula efectora por parte de las células epiteliales prostáticas. Como se observa en la **Figura 39**, se evidenció una intensa inmunomarcación en el epitelio prostático de animales con OPU, particularmente a las 24 y 72 h posteriores a la obstrucción.

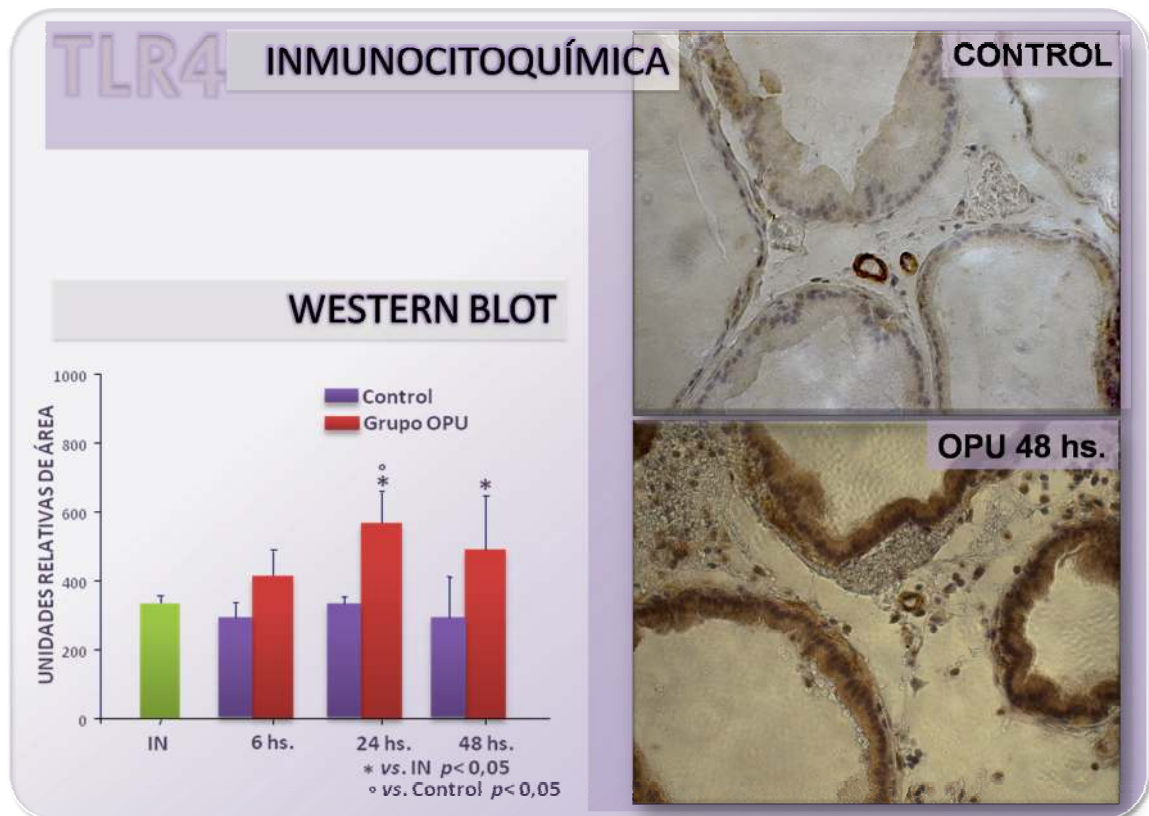


Figura 38: Expresión de TLR4 en animales OPU por western blot e inmunocitoquímica a nivel de microscopia fotónica.

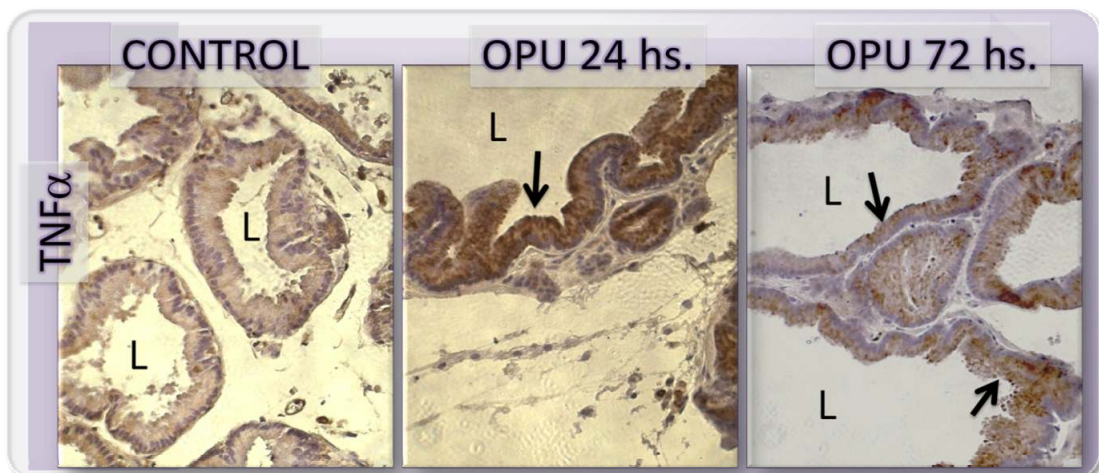


Figura 39: Inmunodetección de TNF α en animales con OPU. Nótese la intensa inmunomarcación en el epitelio prostático (flechas). L: luz acinar.

3.5 Regulación androgénica de mecanismos inmunes innatos en la próstata ventral de rata

Teniendo en cuenta que la integridad morfológica y funcional de la glándula prostática está bajo el estricto control de los andrógenos, es razonable hipotetizar que la expresión de moléculas de inmunidad innata detectadas en la próstata sea regulada por testosterona. Con el propósito de investigar los efectos de esta hormona sobre la expresión de TLR4, SP-D y de las moléculas antiinflamatorias PBP y Gal-1 en la glándula prostática, se usaron animales con estatus androgénicos diferentes. Los niveles de testosterona circulante fueron confirmados mediante ECL y, como se esperaba, fueron significativamente inferiores en los animales castrados, mientras que las ratas tratadas con testosterona mostraron valores alrededor de 10 veces superiores a los de los animales intactos (**Figura 41**).

La morfología de las próstatas ventrales fue analizada por medio de la técnica de metenamina-plata en secciones de Araldita y coincidió con las clásicas observaciones de privación hormonal y tratamiento androgénico. Básicamente, el epitelio prostático en el grupo OX exhibió una importante reducción de la relación núcleo/citoplasma, mientras que la capa fibromuscular periacinar mostró una notable hipertrofia, con intensa inmunomarcación de α SMA y aisladas células positivas para VIM (**Figura 40**). Por otro lado, en los animales del grupo TT, se evidenció un aumento del tamaño glandular con un marcado incremento de las luces acinares y del contenido secretorio. La inmunocitoquímica para α SMA y VIM en estos animales mostró un patrón de expresión similar al observado en animales IN, con una delgada banda positiva para α SMA rodeando los acinos y células inmunoreactivas para VIM aisladas en el intersticio prostático (**Figura 40**).

3.5.1 Expresión de las moléculas de defensa TLR4 y SP-D

La expresión de TLR4, receptor fundamental de componentes bacterianos y activador de la respuesta inmune, fue determinada en animales con diferentes estatus androgénicos por medio de western blot e inmunocitoquímica. Los niveles de TLR4 en homogenatos totales de próstata ventral fueron significativamente superiores en animales del grupo OX con respecto a sus controles y a ratas del grupo IN (**Figura 42**). En contraste, los animales del grupo TT no mostraron diferencias en relación a ratas IN.

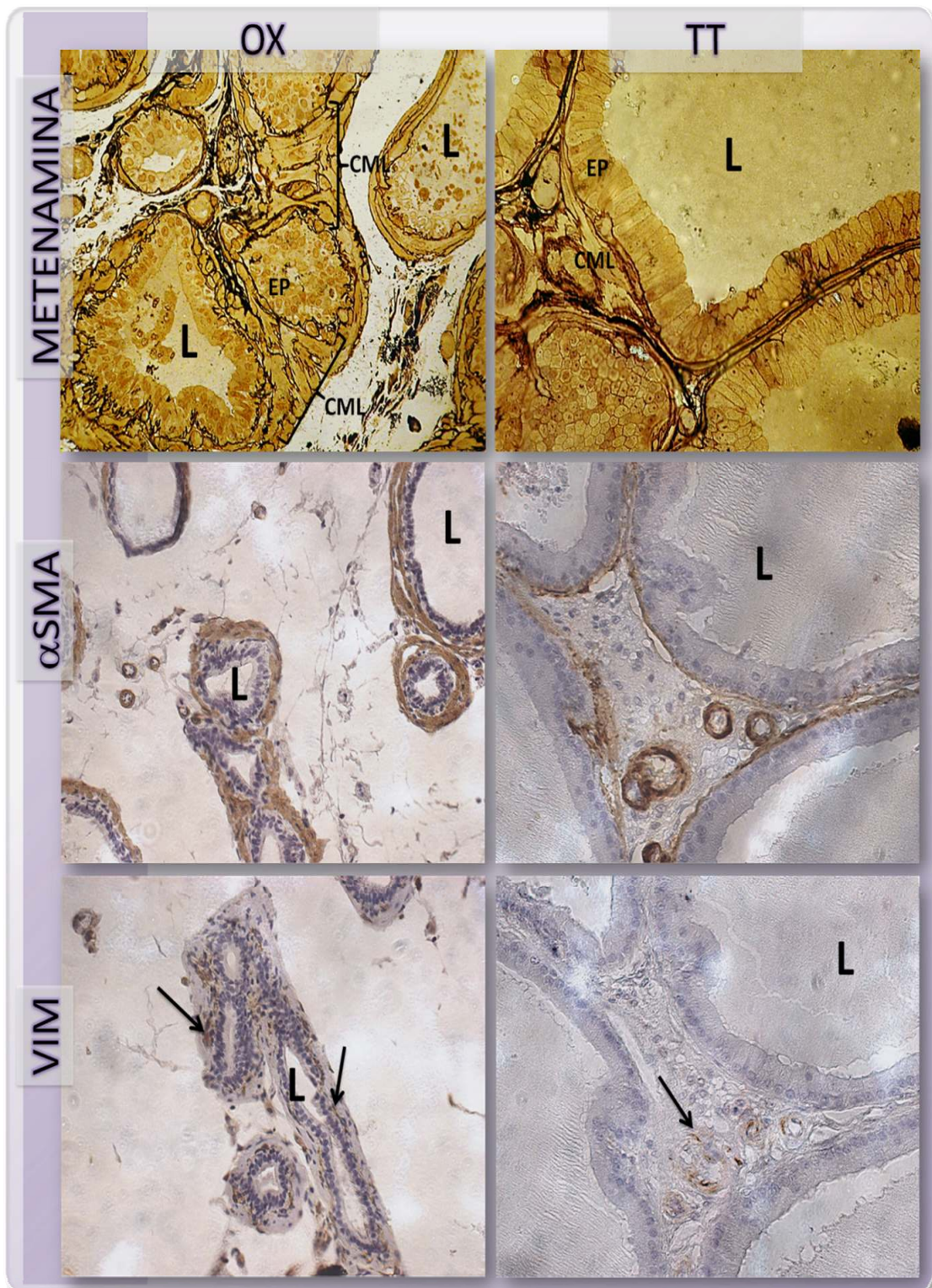


Figura 40: Efectos de la manipulación androgénica sobre la histología de la próstata ventral. La deprivación androgénica produjo reducción de las luces acinares (L), atrofia de células epiteliales (EP) y un gran desarrollo de la estroma periacinar, conformada principalmente por células musculares lisas (CML) y fibroblastos positivos para VIM (flechas).

En correlación al incremento de TLR4 observado por western blot, los animales del grupo OX exhibieron intensa inmunomarcación en células prostáticas tanto

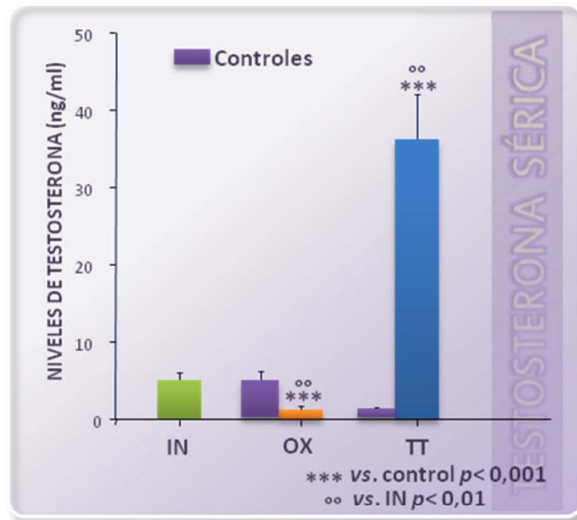


Figura 41: Niveles de testosterona sérica total determinados por ECL en los grupos IN, OX y TT. Los animales controles para OX corresponden a ratas manipuladas quirúrgicamente, mientras que los controles de TT son ratas castradas e inoculadas sólo con el vehículo.

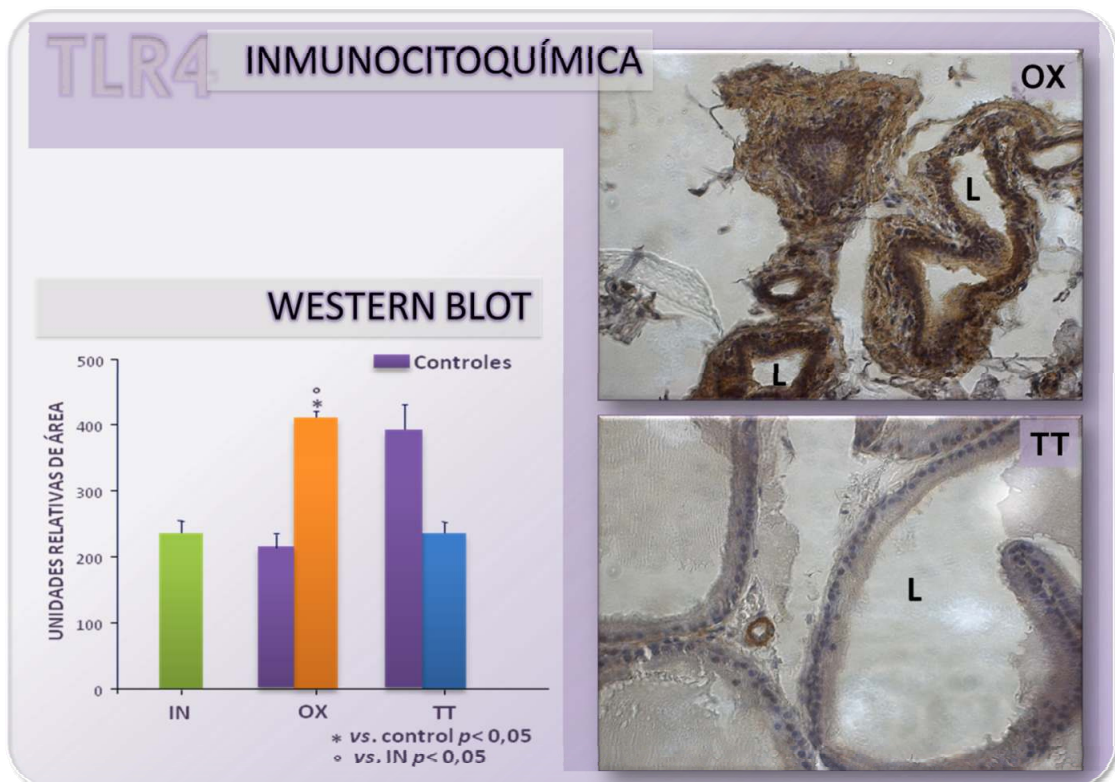


Figura 42: Influencia de la testosterona en la expresión de TLR4 en la glándula prostática.

epiteliales como estromale. TLR4 se encontró expresado en el escaso citoplasma de las células epiteliales remanentes del proceso apoptótico postcastración (**Figura 42**). A nivel ultraestructural, TLR4 mostró una localización heterogénea en el citoplasma, asociada frecuentemente al RER, poco desarrollado de estos animales, o distribuida en las cercanías de membranas laterales y basales, donde las partículas de oro coloidal

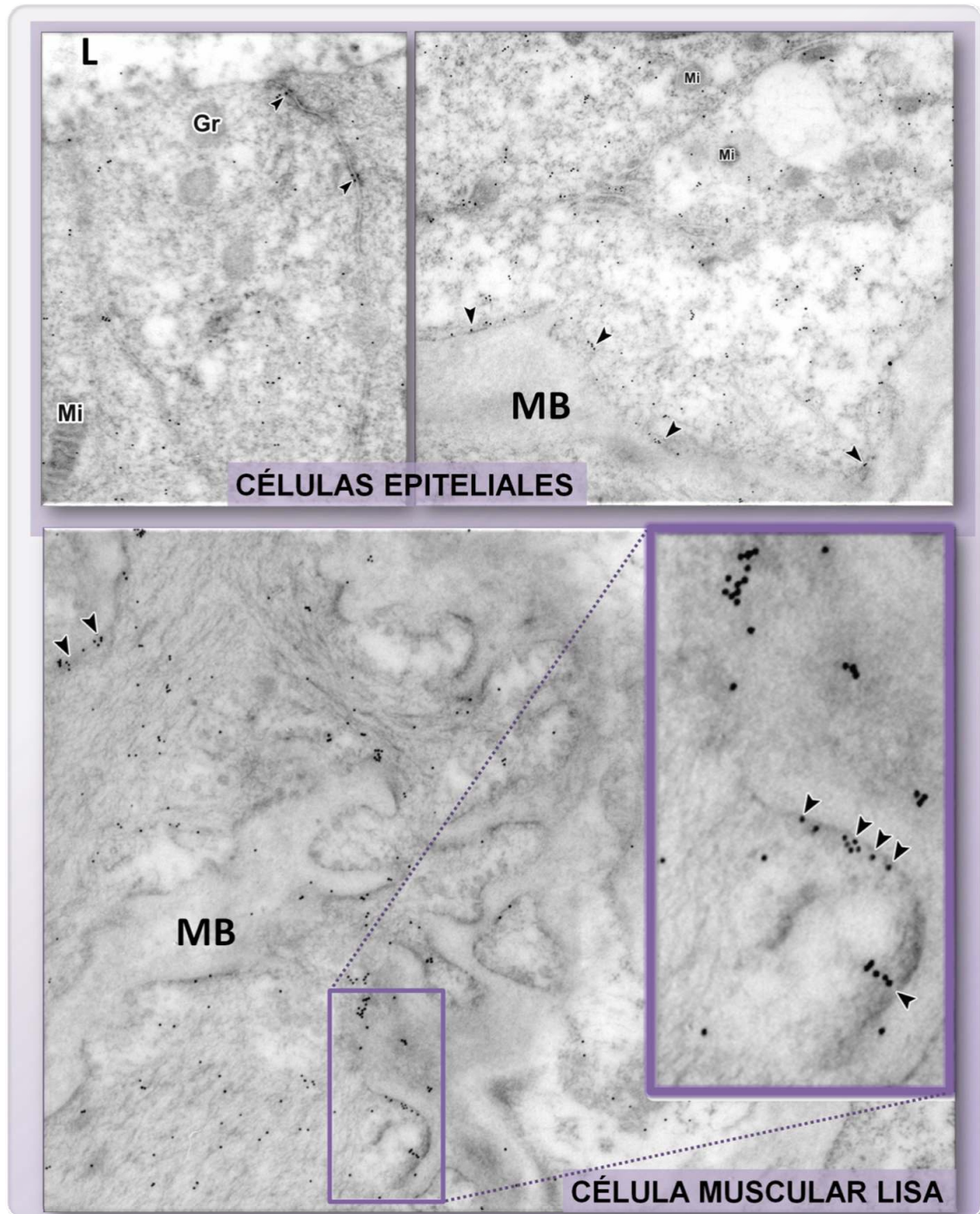


Figura 43: Localización ultraestructural de TLR4 en animales del grupo OX. Las partículas de oro coloidal (cabezas de flecha) se observan próximas a uniones intercelulares y en la región basal de las células epiteliales. En las células musculares lisas, TLR4 se localizó preferentemente en la membrana plasmática. MB: membrana basal.

delineaban una región citoplasmática en contacto con la membrana basal epitelial (**Figura 43**). En el compartimiento estromal, se observó una intensa inmunomarcación en la capa periacinar, especialmente en células musculares, las que exhibieron una fuerte expresión de TLR4 en el plasmalema (**Figura 43**) además de la inmunoreactividad citoplasmática.

Considerando el incremento epitelial de TLR4 en animales OX, se determinó la localización del factor de transcripción NF- κ B por ICQ. Aunque la inmunomarcación epitelial de NF- κ B fue elevada en el citoplasma de células epiteliales de OX al compararla con IN, no se observó translocación de este factor al núcleo celular en células epiteliales del grupo OX.

En el grupo TT, a pesar de gran la estimulación androgénica, la inmunoreactividad para TLR4 en la próstata ventral fue débil y similar a los animales intactos. La ICQ demostró una fuerte expresión de TLR4 sólo en las paredes de vasos sanguíneos en estos animales, característico también de animales intactos.

Para determinar si testosterona regula la expresión del antimicrobiano SP-D en la próstata ventral se utilizaron los grupos OX, TT e IN. Mediante ICQ, se observó primero un incremento de la inmunomarcación epitelial de esta proteína en el grupo OX (**Figura 44**), mientras que TT no mostró diferencias respecto a las ratas del grupo IN. Luego, en un trabajo en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Jeanne Snyder del *Department of Anatomy and Cell Biology, University of Iowa, USA*, se confirmó la modulación androgénica de SP-D, al registrar un incremento del ARNm del antimicrobiano en ratones castrados. Para este estudio, se utilizaron ratones de la cepa Swiss Black castrados por 12 días, mientras que los controles consistieron en ratones manipulados quirúrgicamente sin orquiectomía. En estos animales, se evaluaron los niveles del ARNm de SP-D en próstata ventral y pulmón por la técnica de RT-PCR. Como se observa en la **Figura 44**, la próstata ventral de ratones castrados presentó niveles significativamente superiores de ARNm de SP-D (alrededor de 7 veces) con respecto a ratones controles. Por otro lado, los valores del ARNm del antimicrobiano no exhibieron cambios en pulmón de animales castrados al compararlo con sus controles. Al examinar otros sitios del tracto urogenital como epidídimo y vejiga, no se observaron alteraciones en los niveles del ARNm de SP-D luego de la castración.

3.5.2 Proteínas antiinflamatorias

La expresión de las proteínas PBP y Gal-1 fue determinada en animales de los grupos OX, TT e IN para evaluar la influencia de testosterona sobre estas moléculas. Por ICQ, los animales del grupo IN exhibieron un patrón de inmunomarcación característico de proteínas secretorias para ambas moléculas, localizándose en la secreción prostática y escasamente a nivel de las células epiteliales, similar a lo descrito en las **Figuras 16** (PBP control) y **33** (Gal-1 control). Además, PBP y Gal-1 tuvieron semejanzas en su expresión en los diferentes modelos experimentales. En ratas del grupo OX, se evidenció una débil inmunomarcación de ambas, disminuyendo notablemente con respecto a los animales IN. El dot blot indicó que este descenso fue de alrededor de un 40% con respecto a IN para Gal-1 y del 65% para PBP (**Figura 45**). En animales del grupo TT, las inmunomarcaciones de Gal-1 y PBP aumentaron no sólo en la secreción prostática, sino que fueron notables a nivel citoplasmático en comparación con IN. Mediante la técnica de dot blot, se determinó un incremento significativo de ambas proteínas luego del tratamiento con testosterona, duplicando los niveles de expresión observados en los animales intactos (**Figura 45**).

En conjunto, los hallazgos acerca de la regulación androgénica de moléculas de inmunidad innata demostraron que la testosterona favorece la expresión de PBP y Gal-1; mientras que modula en forma negativa la expresión de TLR4 y el antimicrobiano SP-D.

3.6 Influencia de la testosterona en el desarrollo y resolución de la prostatitis bacteriana

Luego de evidenciar la progresión de la inflamación en el modelo PB, reconocer la modulación de las moléculas de defensa por parte de la infección bacteriana y analizar los cambios en la expresión de proteínas en modelos de manipulación androgénica, el siguiente objetivo estuvo focalizado en examinar el desarrollo y las consecuencias tempranas de la prostatitis bacteriana en animales con el estatus androgénico alterado. Asimismo, se analizó la expresión de TLR4 y los antimicrobianos SP-D y β DEF-1 en estos grupos experimentales.

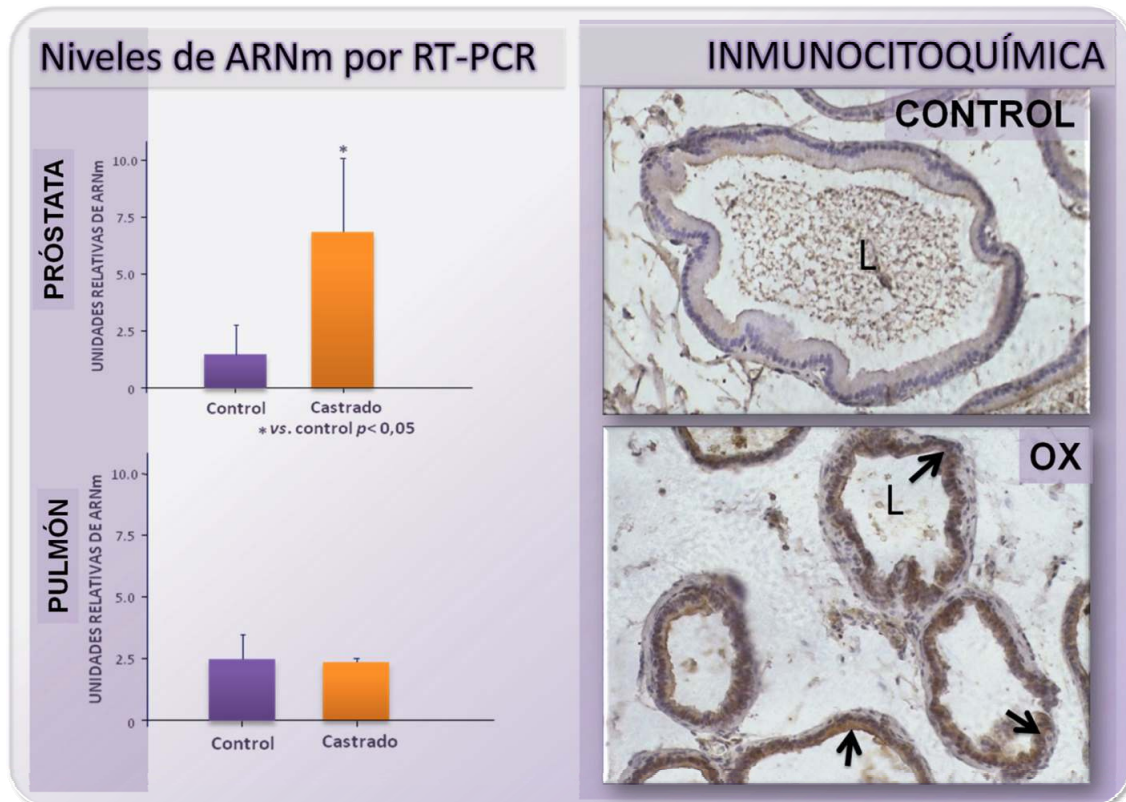


Figura 44: Efecto de la castración sobre SP-D en la próstata ventral mürida. El incremento de la expresión epitelial de SP-D en ratas OX (flechas) fue confirmado con el análisis de los niveles del ARNm en ratones castrados (panel izquierdo). L: luz acinar.

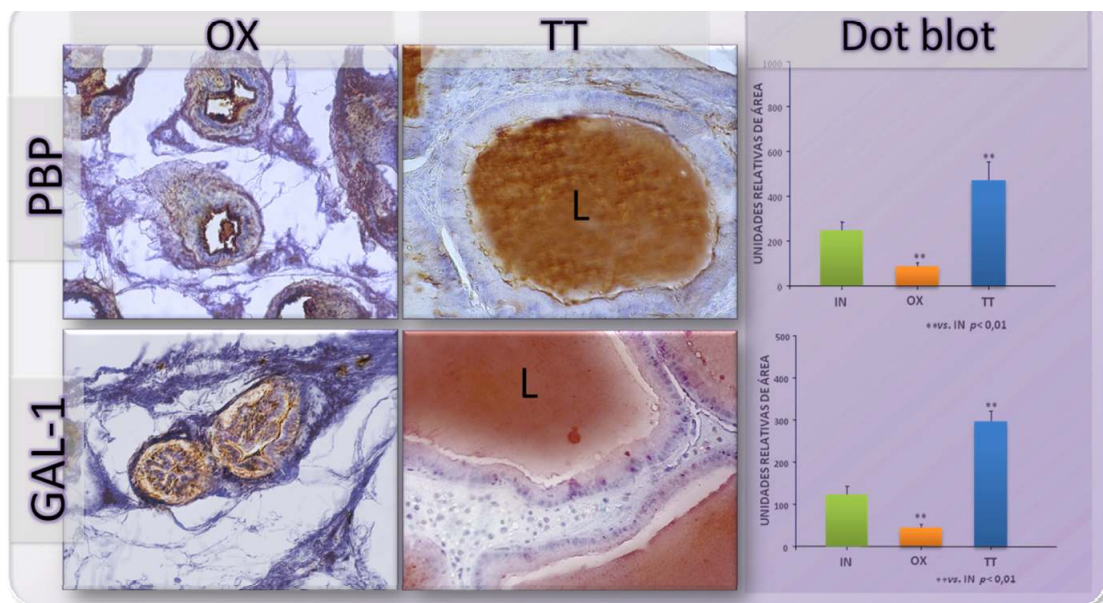


Figura 45: Expresión de las proteínas antiinflamatorias PBP y Gal-1 en tejidos prostáticos por inmunocitoquímica y en secreción prostática por dot blot luego de la manipulación androgénica. La inmunomarcación de ambas incrementa notablemente en la secreción prostática de animales tratados con testosterona. L: luz acinar.

3.6.1 Progresión de la prostatitis en animales con diferente estatus androgénico

Los signos de infección prostática en los grupos PB+OX y PB+TT fueron comparados con los observados en el grupo PB. Para reducir los posibles diferencias en los análisis intergrupales, el grupo PB fue desarrollado nuevamente y en forma paralela usando la misma solución bacteriana inoculada en los grupos PB+OX, PB+TT y PB+T. Las próstatas ventrales fueron examinadas al 2° y 5° días posteriores a la infección bacteriana. Además, se utilizaron animales intactos (IN) e inyectados con los respectivos vehículos como controles negativos de la infección.

Los hallazgos histopatológicos de PB y PB+T fueron similares, reproduciendo las características descritas previamente para los animales infectados (como se aprecia en la **Figura 16**). El intersticio prostático de estos animales exhibió un notable infiltrado de células PMNN, con invasión ocasional de los acinos glandulares al 2° día postinfección. El análisis histológico de los animales PB+OX demostró claras diferencias al compararlos con PB, aún al 2° día. Si bien PB+OX exhibió la presencia de células inflamatorias en el compartimiento estromal, incluyendo PMNN y células mononucleares, no se observaron alteraciones importantes de la histoarquitectura arquitectura epitelial; diferenciándose notablemente de PB, que presentó apoptosis y atrofia epitelial, y de PB+TT, cuyas características histológicas fueron semejantes a PB, exhibiendo un intenso infiltrado inflamatorio intersticial y comprometiendo además en forma frecuente el epitelio prostático al 2° día postinoculación.

En el 5° día posterior a la inoculación bacteriana, las diferencias observadas previamente entre los grupos se intensificaron y definieron un patrón histológico para cada estatus hormonal. Así, mientras PB mostró una notable desorganización de los acinos prostáticos, frecuentemente obliterados con células inflamatorias además del característico infiltrado intersticial, los animales del grupo PB+OX, evidenciaron una mejoría en los signos inflamatorios, presentando escasos infiltrados focales cercanos a vasos sanguíneos y preservación de las células epiteliales (**Figura 46**). Como se observara ya al 2° día, el tratamiento con dosis altas de testosterona (grupo PB+TT) produjo una evolución más agresiva del infiltrado inflamatorio hacia el 5° día, siendo abundante en toda la extensión del lóbulo ventral, produciendo una profusa invasión de las luces acinares (**Figura 46**). El examen ultraestructural de PB+TT evidenció numerosos PMNN, tanto en el intersticio como en las luces acinares, advirtiéndose

frecuente imágenes de bacterias fagocitadas por las células inflamatorias. Se destacó además la presencia de PMNN en diferentes etapas de apoptosis (**Figura 47**).

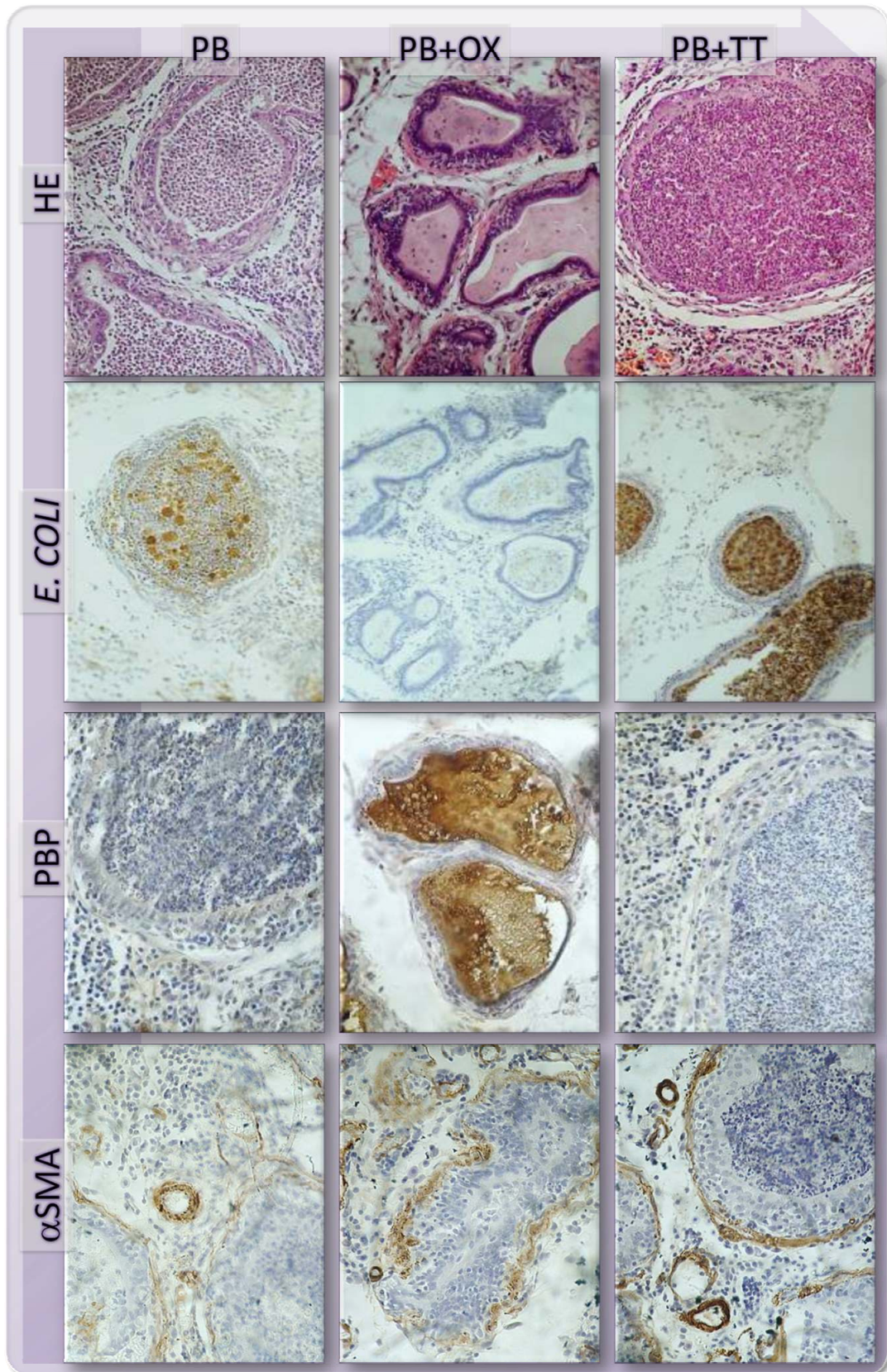


Figura 46: Secciones de próstata ventral que muestran las consecuencias de la infección bacteriana al 5° día postinoculación en animales con diferentes estatus androgénico.

La notable reducción de los signos inflamatorios en los animales del grupo PB+OX con respecto a PB y PB+TT luego de la inoculación bacteriana sugería dos posibles explicaciones: 1) la bacteria estaba presente en tejido prostático pero los mecanismos de respuesta estaban suprimidos o, 2) los animales castrados eliminaban más rápidamente *E. coli* y, por consiguiente, el infiltrado inflamatorio presentaba una resolución más temprana. A los fines de detectar la bacteria, se realizó ICQ para *E. coli*, determinándose la presencia de la bacteria en la próstata ventral, con un patrón similar entre PB, PB+OX, PB+T y PB+TT al 2° postinfección; sin embargo, al 5° postinoculación, la inmunomarcación evidenció claras diferencias entre los grupos experimentales, con una reducción notable de bacterias en el grupo PB+OX con respecto a PB (**Figura 46**). El grupo PB+TT mostró la mayor intensidad de inmunomarcación para *E. coli* en este tiempo; las bacterias fueron también visibles al microscopio electrónico, con mayor frecuencia en PB+TT en la luz acinar o fagocitadas

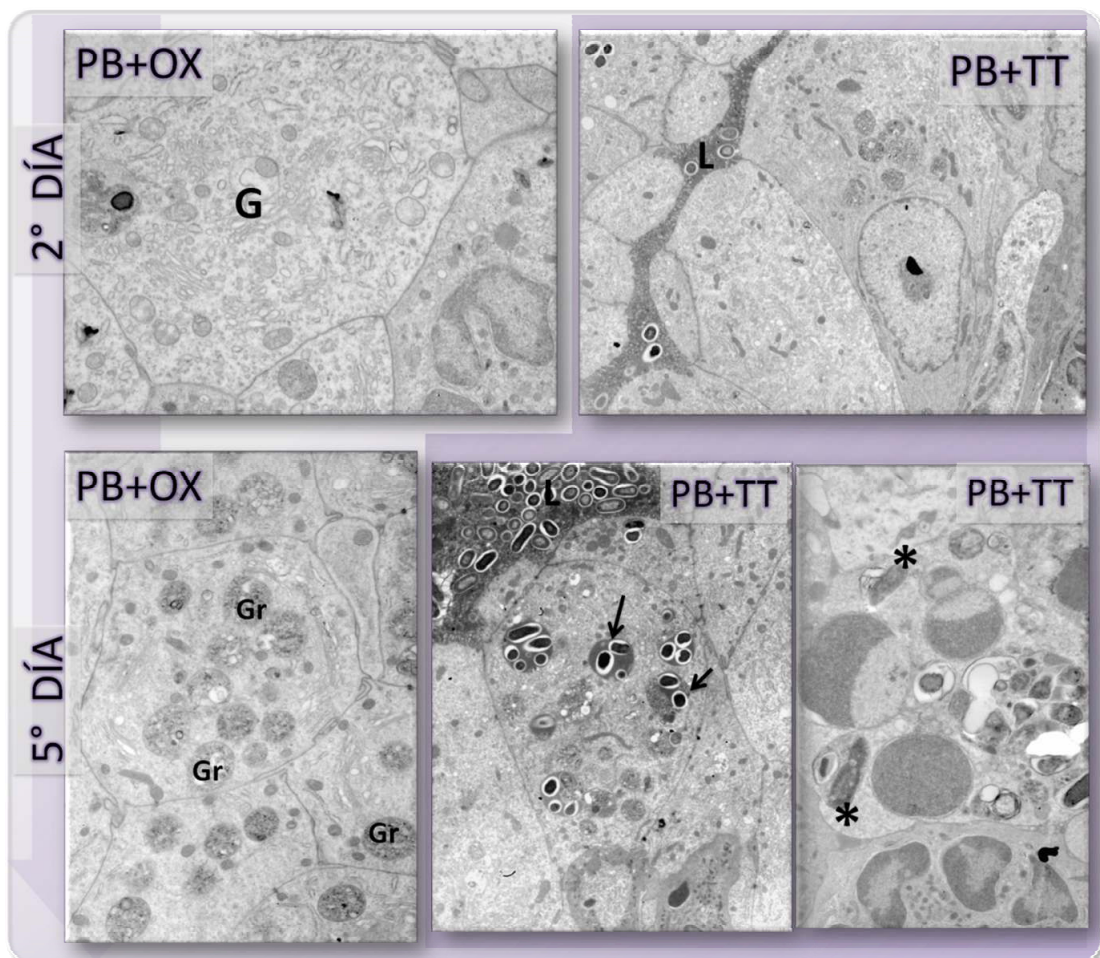


Figura 47: Micrografías electrónicas que evidencian las características ultraestructurales del epitelio prostático luego de la infección bacteriana. Se observan signos de estimulación celular en el grupo PB+OX tales como desarrollo del aparato de Golgi (G) y la presencia de numerosos granulos secretorios (Gr). La presencia de bacterias en las luces acinares (L) y fagocitadas por células epiteliales (flechas) y neutrófilos (*) fue una observación frecuente en el grupo PB+TT.

por macrófagos y células epiteliales (**Figura 47**).

En correlación con los hallazgos iniciales, la microscopía electrónica reveló marcadas diferencias entre las tres condiciones. Como se describió previamente, el epitelio prostático mostró una fuerte estimulación temprana en el grupo PB con una posterior atrofia y reducción de su capacidad secretoria. El análisis del compartimiento epitelial de los animales PB+OX evidenció, al igual que PB, signos de estimulación celular, con desarrollo de organelas proteinopoiéticas y una fuerte inmunomarcación para PBP. Curiosamente, fueron escasas las figuras apoptóticas en este grupo teniendo en cuenta la disminución de testosterona. Al 5° día postinoculación, PB+OX se presentó con un epitelio secretorio conservado, con la presencia de numerosos gránulos de contenido heterogéneo al microscopio electrónico (**Figura 47**). El compartimiento estromal periacinar mostró un incremento en la inmunomarcación de α SMA, que se correlacionó con hipertrofia de células musculares lisas y conservación de la capa periacinar con respecto a PB y PB+TT (**Figura 46**). Más aún, la expresión de α SMA por western blot fue superior en los animales PB+OX al 2° día postinoculación, reafirmando el rol estimulante tanto de la inflamación como de la castración sobre la estroma prostática.

Aunque se observaron signos de estimulación en la actividad secretoria de las células epiteliales de PB+TT al 2° día postinoculación, el análisis microscópico del 5° día demostró disminución en la altura de las células epiteliales prostáticas, que se correlacionó con pérdida de inmunomarcación de PBP y con neutrófilos invadiendo este compartimiento (**Figura 47**).

3.6.2 Expresión de TLR4 y moléculas antimicrobianas

Teniendo en cuenta que tanto la infección bacteriana como los niveles de testosterona modulan la expresión de TLR4 y SP-D en tejido prostático, se investigó la influencia de ambos estímulos simultáneamente sobre la expresión de estas proteínas. Para ello, se estudió la próstata ventral proveniente de los grupos PB+OX y PB+TT, en comparación con PB y animales intactos (IN). Adicionalmente, se determinó la expresión del antimicrobiano β DEF-1 en los diferentes grupos experimentales.

TLR4 se expresó en forma constitutiva en animales intactos e incrementó sus niveles en respuesta a la infección bacteriana. Este hallazgo fue evidente tanto al 2° como al 5° día postinfección (**Figura 49**) y reprodujo los resultados obtenidos en el

modelo PB. La castración mostró un efecto sinérgico con la infección, incrementando los niveles de TLR4 en los animales del grupo PB+OX, que alcanzaron un pico al 5° día postinoculación (**Figura 49**). La expresión de este receptor estuvo principalmente localizada en células epiteliales, observándose una menor intensidad en células musculares e inmunes (**Figura 48**). Los animales del grupo PB+TT exhibieron elevados niveles de TLR4 por western blot en el periodo temprano, decayendo hacia el 5° día, pero significativamente altos cuando se los comparó con animales IN (**Figura 49**).

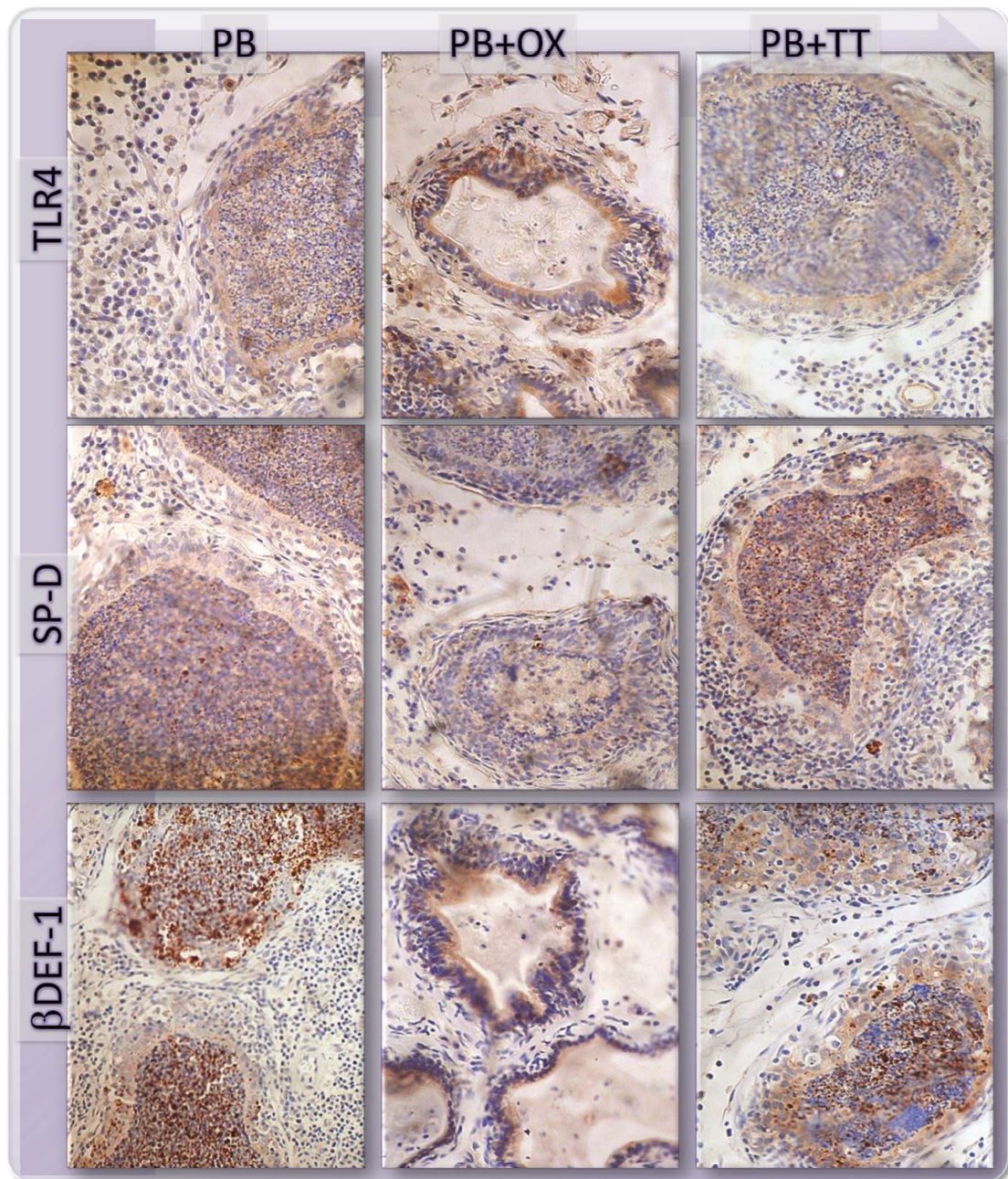


Figura 48: Inmunocitoquímica de TLR4 y de los antimicrobianos SP-D y βDEF-1 en secciones de próstata ventral provenientes de animales de los grupos PB, PB+OX y PB+TT.

Como se muestra en la **Figura 49**, los niveles más elevados del antimicrobiano SP-D se observaron en el grupo PB, en especial al 5° día; mientras que los animales del grupo PB+OX exhibieron escasa inmunomarcación (**Figura 48**) y sus valores de SP-D no difirieron significativamente de IN al 5° día postinoculación.

La inmunomarcación para β DEF-1 evidenció una intensa expresión de este péptido antimicrobiano en respuesta a la infección bacteriana independientemente del estatus androgénico de los animales (**Figura 48**). La inmunotinción de β DEF-1 fue localizada en el epitelio prostático y en PMNN que infiltraron la glándula luego de la inoculación bacteriana.

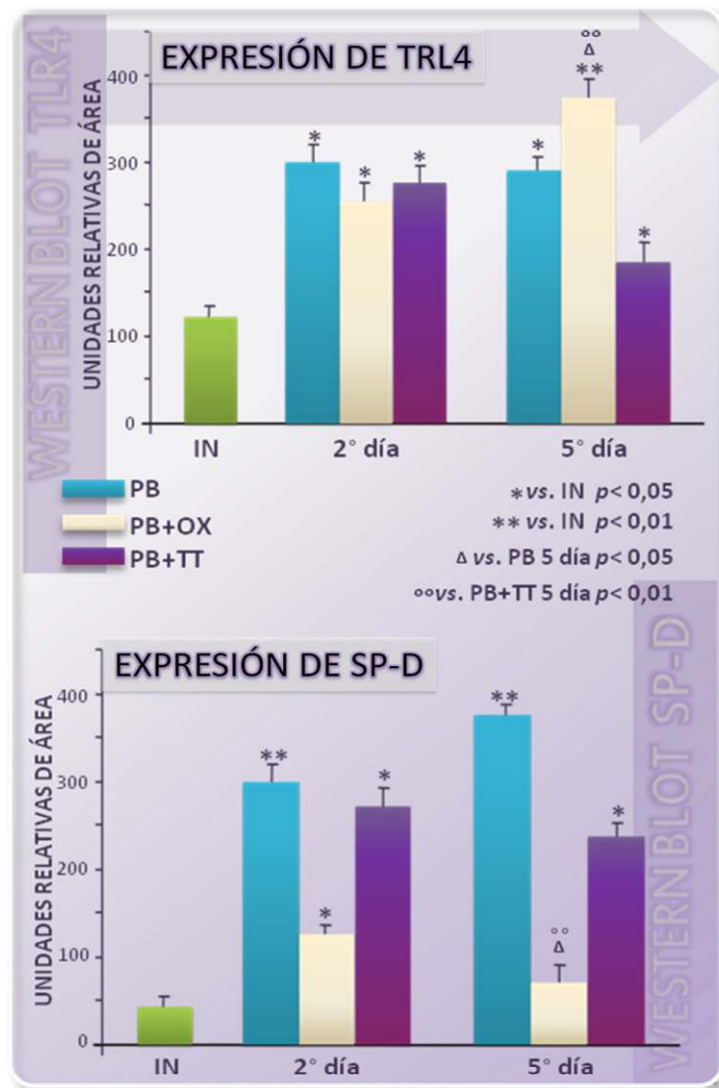


Figura 49: Niveles de TLR4 y SP-D en homogenatos totales de próstata ventral determinados por western blot.

3.7 Expresión de proteínas de defensa en la próstata humana

Con el fin de investigar si la próstata humana expresa el receptor de LPS bacteriano TLR4, clave en la respuesta inmune innata, y las proteínas antiinflamatorias e inmunomoduladoras UG y Gal-1, se analizó la expresión de las mismas mediante ICQ en *microtissue arrays* disponibles comercialmente, que permiten el análisis simultáneo de varias muestras en el mismo portaobjetos evitando los errores intraensayo. Sólo se analizaron las muestras prostáticas con diagnóstico de hiperplasia benigna.

El receptor TLR4 se inmunodetectó tanto en el componente epitelial como en el estromal de la glándula prostática hiperplásica (**Figura 50**). La inmunomarcación epitelial fue débil a moderada en el citoplasma de células secretoras o luminales en la mayoría de las muestras examinadas. Sin embargo, la capa de células epiteliales basales exhibió una intensa expresión de TLR4. En el compartimiento estromal, la presencia de TLR4 estuvo asociada principalmente a células musculares lisas, las que mostraron una fuerte inmunomarcación para esta proteína. También se observó inmunoreactividad para TLR4 en las paredes de vasos sanguíneos de la estroma prostática.

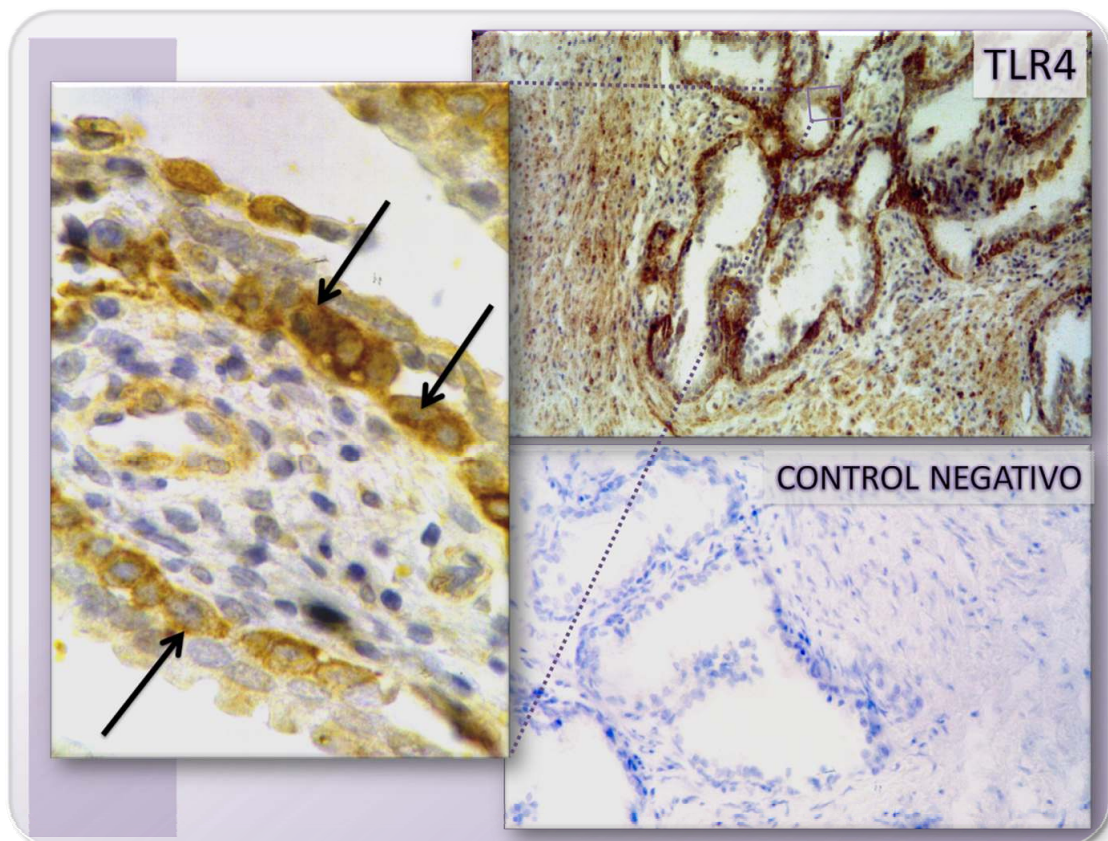


Figura 50: Inmunocitoquímica de TLR4 en secciones de próstata humana, exhibiendo una fuerte expresión en el compartimiento estromal y en células basales del epitelio (flechas). El control negativo se realizó reemplazando el anticuerpo 1° por IgG purificada de cabra.

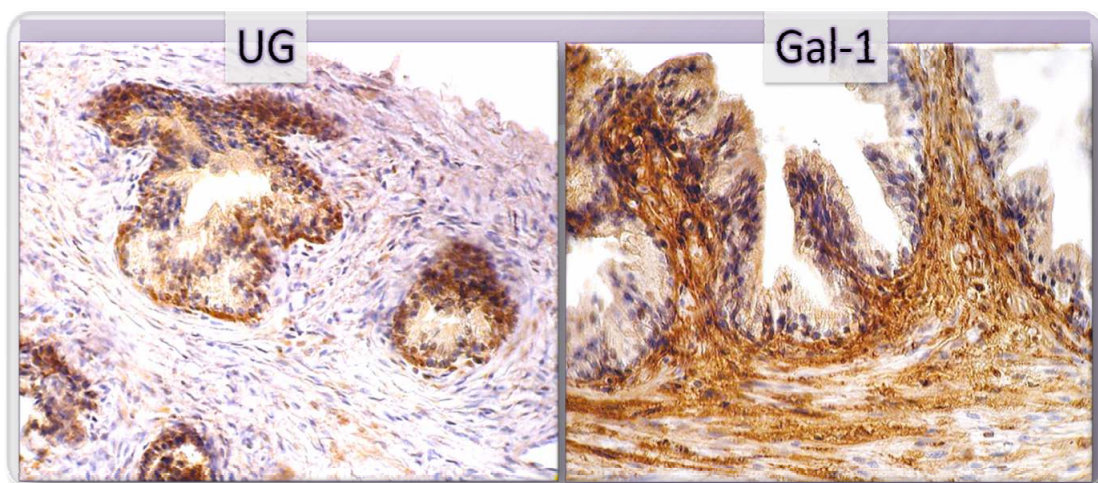


Figura 51: Expresión de las proteínas antiinflamatorias UG y Gal-1 en secciones de próstata humana.

La expresión de Gal-1, proteína con actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora, estuvo presente en todas las muestras analizadas y se localizó fundamentalmente en la estroma fibromuscular hiperplásica de próstata humana, con escasa inmunomarcación citoplasmática en las células epiteliales secretorias y basales (**Figura 51**). A diferencia de Gal-1, UG se localizó en las células del compartimiento epitelial, mientras que algunas células aisladas de la estroma glandular también fueron positivas (**Figura 51**). La expresión de UG fue heterogénea entre las muestras analizadas, con intensa inmunomarcación en un porcentaje bajo de los casos, mientras que la mayoría exhibió moderada expresión de esta proteína.

CAPÍTULO
4

DISCUSIÓN

La inflamación de la glándula prostática representa un importante problema de salud a nivel internacional. A pesar de esto, las investigaciones de aspectos básicos de la respuesta tisular de la inflamación en la glándula son escasas; esto es particularmente curioso si se tiene en cuenta que las alteraciones celulares producidas por la inflamación prostática están relacionadas fuertemente a patologías de gran impacto en las políticas sanitarias, tales como la infertilidad masculina (112), hiperplasia prostática benigna (200, 201) o cáncer de próstata (158, 185, 202).

En el presente trabajo de tesis, el estudio de las células prostáticas fue abordado mediante la conjunción de diversas metodologías que permitieron realizar un análisis exhaustivo e integral de la capacidad de respuesta de los compartimientos epitelial y estromal frente a estímulos inflamatorios. A continuación, se describen los hallazgos más destacados del estudio de dicha respuesta:

❖ La **infección bacteriana** de la glándula produjo una importante estimulación temprana de las células prostáticas epiteliales y estromales, con incremento en la expresión de moléculas de defensa como TLR4 y los antimicrobianos SP-D y β DEF-1, además de la citocina proinflamatoria TNF α .

❖ El modelo experimental de prostatitis aguda por **obstrucción parcial de la uretra** demostró una respuesta epitelial estimuladora semejante a la del modelo bacteriano, aunque con particularidades propias, como el mantenimiento de la integridad epitelial en el periodo más prolongado y la ausencia de daño evidente en este compartimiento.

❖ Por otro lado, los resultados obtenidos en relación a la **modulación hormonal** indican que la testosterona regula en forma negativa la expresión de mediadores proinflamatorios en la próstata de rata, mientras que PBP y Gal-1 –antiinflamatorias e inmunomoduladoras– están reguladas positivamente por los niveles circulantes de andrógenos. Finalmente, uno de los hallazgos más notorios del presente trabajo fue la disminución en los signos inflamatorios de la prostatitis bacteriana en animales castrados.

Los mecanismos de **defensa del huésped** han sido ampliamente estudiados en las células propias del sistema inmune como dendríticas y macrófagos, ya que clásicamente se consideró a estas células como los elementos centrales de la respuesta inmune innata o inespecífica (185, 203-207). Sin embargo, en los últimos años las investigaciones se extendieron al análisis de las barreras epiteliales, ya que representan la puerta de entrada a patógenos e injurias de diferente índole. De esta forma, se estableció un rol fundamental de las células epiteliales en la regulación del sistema inmune innato en tractos frecuentemente expuestos a injurias externas como el digestivo y respiratorio entre otros (206, 207).

En el **sistema urogenital**, numerosas contribuciones han demostrado la importancia de las proteínas de defensa en los procesos inflamatorios (176, 208). En el tracto genital masculino, las investigaciones se enfocaron particularmente en el epidídimo (185, 206, 209-211) y testículo (187, 188). Se ha reportado por ejemplo que el epidídimo secreta varios péptidos con actividad antimicrobiana, incluyendo cystatin-11, lisosima, lactoferrina y varios miembros de la familia de las defensinas (189). En cuanto a mecanismos de reconocimiento bacteriano, la proteína LBP y varios tipos de TLRs fueron también descritos a lo largo del tracto reproductor masculino (208, 212). Además, el testículo expresa en forma característica numerosas moléculas de defensa tales como TLRs (176), defensinas (200) y la proteína inmunomoduladora Gal-1 (213), entre otras. En contraste con estos hallazgos, los componentes de la inmunidad innata y la respuesta inmune en general están escasamente caracterizados en próstata.

Uno de los pasos iniciales en el presente trabajo de tesis fue investigar si **TLR4** se expresa en la glándula prostática. Esta proteína está implicada en la respuesta inmune innata como receptor de membrana para bacterias Gram negativas y cuya activación genera una cascada inflamatoria mediada por la translocación nuclear del factor de transcripción NF- κ B (214) (**Figura 12**). Asimismo, TLR4 se encuentra ampliamente expresado en epitelios que contactan directamente con el medio exterior como los de la cornea (215), cavidad oral (216), el tracto respiratorio (205), intestino (141, 200) y el

tracto urinario (217), además de las clásicas descripciones en macrófagos y células dendríticas (216). En el actual estudio se determinó la localización de TLR4 en células epiteliales prostáticas humana en muestras de tejido provenientes de pacientes con hiperplasia benigna, especialmente en la capa basal. La expresión de este receptor no se limitó a este compartimiento sino que también fue abundante en células estromales. El estudio de **ratas normales** confirmó la expresión constitutiva de este receptor en la próstata ventral, con débil inmunomarcación intracitoplasmática, asociada principalmente a retículo endoplasmático rugoso.

El **hallazgo intracelular de TLR4** contrasta con la clásica localización de este receptor en la superficie celular de macrófagos y otras células del sistema inmune (182). Hornef *et al.* han localizado TLR4 también en el citoplasma de células epiteliales de la mucosa intestinal (218). La explicación para esta localización parece estar relacionada con la función celular: mientras que las células inmunes deben estar preparadas para iniciar la respuesta inmune en forma rápida, las células epiteliales expuestas a la flora normal deben evitar la interacción entre las bacterias comensales y TLR4 con la consiguiente activación innecesaria de señales inflamatorias. Una situación semejante podría ser requerida en la próstata, ya que se ha descrito la presencia de bacterias comensales en la glándula prostática que podrían constituir una flora normal en este sitio (50, 219, 220). Por otro lado, la distribución intracelular de TLR4 en células prostáticas evitaría su activación innecesaria por ligandos endógenos como ácido hialurónico, heparan sulfato y fibrinógeno (221). Algunas de estas moléculas están normalmente presentes en el plasma seminal (222, 223), pudiendo disparar reacciones inflamatorias indeseadas ya que el semen contacta a menudo con la superficie epitelial de la próstata (224, 225). De este modo, la regulación de la localización de TLR4 en células epiteliales modularía las cascadas inflamatorias iniciadas ya sea por bacterias Gram negativas o por ligandos endógenos de TLR4.

Recientemente, un grupo de investigadores ha reportado la expresión intracelular de TLRs en células epiteliales prostáticas *in vitro* en condiciones basales (61). Asimismo, se ha demostrado la localización de TLR2 y TLR4 en líneas celulares

prostáticas humanas (186), coincidiendo con los datos aquí presentados. Sin embargo, nuestros datos constituyen los primeros reportes acerca de la expresión prostática – epitelial y estromal– de TLR4 *in vivo*.

Se conoce desde hace tiempo que **la próstata es una importante fuente de sustancias antimicrobianas** del líquido seminal que acompaña a la gameta masculina. Clásicamente, se había descrito el “factor antibacteriano prostático”, sustancia que luego fue identificada como una sal de zinc de origen prostático (145, 226), la cual tiene potente actividad bactericida. En la actualidad, se postula que el zinc modularía además la actividad de proteínas con función antimicrobiana, tales como las semenogelinas en semen humano (147, 227). Las familias de defensinas y colectinas se encuentran entre los péptidos endógenos con mayor actividad antimicrobiana en los organismos multicelulares, por lo que han sido ampliamente estudiadas en las superficies que contactan con el medio exterior (228). **SP-D** es una proteína perteneciente a las colectinas, que ejerce un rol primordial en la inmunidad innata del pulmón y de otros órganos (228). En el presente estudio, se expuso la localización de SP-D en el epitelio prostático de **animales normales**, reafirmando la función antimicrobiana de las secreciones prostáticas. En un trabajo en colaboración, se amplió el estudio de SP-D a otros sitios del tracto genital masculino, demostrándose la expresión de esta proteína también en las células epiteliales del epidídimo, conducto deferente e incluso en testículo (222, 229, 230). Debido a que las vesículas seminales expresan escasos niveles de SP-D en condiciones normales (93), la glándula prostática representaría la principal fuente de este antimicrobiano en el aparato genital masculino.

Luego de evidenciar la presencia de TLR4 y del antimicrobiano SP-D en la glándula prostática normal, el siguiente paso consistió en analizar los **efectos de la inflamación** sobre aspectos aspectos morfofuncionales de las células epiteliales y estromales. Asimismo, otra incógnita planteada era verificar si los estados inflamatorios alteran la expresión de moléculas de defensa en la próstata.

La mayoría de los estudios que indagaron previamente la respuesta de células epiteliales prostáticas a antígenos bacterianos ha sido llevada a cabo en sistemas *in vitro* (12), donde las células se aíslan de su entorno natural, sin vasculatura, inervación, ni matriz extracelular nativa. En la próstata en particular, las interacciones epitelio-estromales son fundamentales en el mantenimiento de las características funcionales normales de la glándula, por lo que los sistemas *in vitro* no son totalmente adecuados para el estudio de la respuesta glandular a injurias. Con los antecedentes previamente detallados, se desarrollaron dos **modelos *in vivo* de prostatitis aguda**: un modelo bacteriano por medio de inoculación de *E. coli* y uno abacteriano posterior a obstrucción parcial de la uretra (OPU) (**Figura 52**).

Como agente causal de la prostatitis bacteriana se utilizó *E. coli*, la cual constituye el patógeno más frecuentemente aislado en pacientes (96, 131). La inyección directa de la bacteria en la próstata ventral produjo la infección de la glándula, confirmada por cultivos bacterianos y a nivel histológico por inmunocitoquímica de *E. coli*. Además, las alteraciones histopatológicas correspondieron a un cuadro de prostatitis aguda bacteriana. A diferencia de otros modelos de prostatitis en los cuales la bacteria es inoculada a través de instilación transuretral, en este estudio la distribución de *E. coli* fue controlada, ajustando el inóculo y evitando la contaminación con orina o patógenos provenientes de vejiga y uretra.

Respecto a la **prostatitis abacteriana**, la falta de datos acerca de la etiología cierta de este proceso ha llevado al desarrollo de varios modelos animales para el estudio de teorías puntuales. Los modelos experimentales de prostatitis abacteriana incluyen desde desarrollo espontáneo de inflamación prostática hasta la inducción de prostatitis autoinmune mediante la inoculación de antígenos propios (96) (**Figura 10**). Es ampliamente aceptado que el reflujo intraprostático de orina puede desencadenar una reacción inflamatoria en la glándula (231). El modelo de OPU representa un mecanismo natural de irritación sobre el epitelio prostático que estaría presente en la mayoría de los pacientes con prostatitis (232). En un clásico ensayo, la inyección de partículas de carbono en la vejiga de pacientes con prostatitis abacteriana fue seguida del hallazgo de

tales partículas en macrófagos aislados del fluido prostático a las 72 h posteriores a la inyección (131). Persson y Ronquist luego propusieron que la prostatitis podría representar una respuesta al reflujo intraprostático de uratos (149, 233). Estos investigadores demostraron además que los síntomas de pacientes con prostatitis abacteriana se correlacionan con la concentración de uratos y creatinina en las secreciones prostáticas. En un estudio más reciente, Takechi *et al.* evidenciaron que sólo sustancias de bajo peso molecular –como los uratos– pueden ingresar al espacio intersticial de la próstata, considerándose posibles agentes de las manifestaciones inflamatorias secundarias a OPU (225). En coincidencia con estos autores, nuestros datos señalaron la presencia de un gran edema en tiempos tempranos postobstrucción, lo que permite inferir que la penetración de partículas desde la orina hacia el intersticio tisular altera el equilibrio osmolar, actuando como el factor iniciador de la respuesta inflamatoria.

Estudios anteriores han informado que las células prostáticas y sus productos secretorios participan activamente como moduladores locales en la respuesta temprana frente a bacterias (222); sin embargo, las moléculas implicadas en este proceso no han sido totalmente caracterizadas aún. Recientemente, Takeyama *et al.* (200) y Gatti *et al.* (234, 235) han demostrado que líneas celulares prostáticas secretan citocinas proinflamatorias en respuesta a *M. hominis* y LPS a través de mecanismos mediados por TLR2 y TLR4 respectivamente, sugiriendo que las células epiteliales prostáticas podrían actuar en la primera línea de defensa en la próstata. Considerando la bibliografía concerniente al incremento postinfección de TLR4 en los tractos digestivo y respiratorio (235), uno de los objetivos propuestos fue determinar si *E. coli* reproduce el mismo efecto en la próstata. En el presente trabajo se evidenció un incremento en la expresión epitelial de **TLR4** como parte de la respuesta frente a la **infección bacteriana**. La inmunomarcación ultraestructural exhibió una migración de este receptor desde el sistema de endomembranas hacia las zonas apicales y laterales de las células epiteliales, cercanas a la membrana plasmática, lo que sugiere una translocación

de TLR4 hacia la superficie celular en respuesta a la infección bacteriana. Actualmente, existen numerosas evidencias indicando que TLR4 se expresa a nivel subcelular principalmente en dos compartimientos –el aparato de Golgi y la membrana plasmática– y que sólo una forma altamente glicosilada se localiza en la superficie celular (234). Además, ante la presencia de LPS, TLR4 se recicla rápidamente y en forma continua desde el aparato de Golgi hacia la superficie celular y viceversa (222, 223). Como se dijo anteriormente, la localización citoplasmática de este receptor representaría un mecanismo que evita la activación innecesaria de cascadas inflamatorias en epitelios expuestos a flora bacteriana; de hecho, la expresión de TLR4 en el aparato de Golgi no se relaciona con la respuesta inmune ya que la disrupción de esta organela no impide la respuesta celular desencadenada por LPS a nivel de membrana plasmática (223). Sin embargo, en la línea celular Mat-Lu (originada de un adenocarcinoma prostático de rata) la localización de TLR4 es exclusivamente intracelular y no migra hacia la membrana plasmática celular luego de la estimulación con LPS (224). Curiosamente, la falta de translocación de TLR4 hacia la superficie celular en estos estudios no evita la respuesta inmune dependiente de TLR4, sugiriendo que el reconocimiento de LPS y su receptor junto a la posterior activación de este último se llevarían a cabo en el interior de las células epiteliales prostáticas (200). En contraste, en un estudio reciente se reportó que la línea tumoral prostática humana PC3 expresa TLR4 a nivel de la membrana plasmática y sus niveles se incrementan luego de la estimulación con LPS (141, 200), siendo también responsable de la respuesta inmune desencadenada por el ligando. La totalidad de estos ensayos se desarrollaron *in vitro* y es posible que esta condición no reproduzca totalmente la forma de expresión y modulación de TLR4 *in vivo* observada en nuestro modelo. En este sentido, es interesante remarcar que la expresión del receptor, descrita en esta tesis, incrementó no sólo en las células epiteliales sino también en las estromales, sugiriendo un rol de las interacciones epitelio-estromales en la regulación de TLR4 en la próstata.

La expresión de TLR4 es modulada por una amplia variedad de factores microambientales además de la invasión microbiana (236, 237). El aumento en la

expresión epitelial de **TLR4 en el modelo de prostatitis secundario a OPU** puede ser explicado por la presencia de citocinas proinflamatorias, especialmente TNF α . Esta citocina incrementó notablemente sus niveles en el epitelio prostático de animales con obstrucción uretral y se correlacionó con la alta expresión de TLR4. En este punto, los dos modelos de prostatitis –bacteriano y abacteriano– resultaron en un incremento de TLR4, por lo que posteriormente se investigó la localización nuclear de **NF- κ B**, lo que revelaría la activación de dicho receptor. Como se esperaba, la translocación de este factor de transcripción se evidenció en las células epiteliales de animales con prostatitis bacteriana, principalmente en los tiempos tempranos (24-48 h) postinfección. En contraste, el modelo de OPU no mostró localización nuclear de NF- κ B en el epitelio en ninguno de los tiempos analizados, indicando que TLR4 estaría actuando a través de otra vía de señalización (238), o bien el incremento de TLR4 en este modelo representaría un fenómeno secundario al proceso inflamatorio.

El factor de transcripción NF- κ B regula la expresión de numerosos genes involucrados en la respuesta inmune y en el crecimiento y diferenciación celular, constituyendo la “vía final común” de numerosas vías de señalización intracelular (239). Aunque aún se discute si la activación de este factor es un componente importante en las células tumorales prostáticas (222, 224), se ha postulado que NF- κ B sería uno de los vínculos fundamentales entre la inflamación sostenida y el desarrollo de cáncer en la próstata (240). En este sentido, la demostración de la activación de NF- κ B por *E.coli* brinda un importante dato *in vivo* avalando ese postulado, ya que la mayor parte de la información concerniente a la activación de este factor en células prostáticas provenía de reportes *in vitro* (241).

Los resultados hasta aquí discutidos evidencian claramente que **el epitelio prostático** está provisto de mecanismos de **inmunidad innata aferentes** o de reconocimiento tales como TLR4 (**Figura 53**). Además, posee la capacidad de responder ante estímulos tanto bacterianos como no bacterianos. Con respecto a los mecanismos efectoros o **eferentes de la respuesta inmune**, en el presente trabajo se

demonstró que la **infección prostática** provoca incremento en los niveles epiteliales del antimicrobiano SP-D, de la citocina TNF α e induce la expresión de β DEF-1, perteneciente a la familia de las defensinas. Varios autores han descripto previamente que los niveles de antimicrobianos son aumentados por infección bacteriana.

En nuestro modelo de prostatitis bacteriana, **SP-D** alcanzó un pico de expresión a las 48 h postinfección, coincidiendo con el comienzo de la migración de PMNN al lumen acinar. Otros autores han demostrado que este antimicrobiano incrementa de manera notable en la mucosa gástrica durante la infección con *Helicobacter pylori* (242) y en la inflamación pulmonar por *Pneumocystis carinii* (243). Debido a que SP-D tiene propiedades antiinflamatorias, es razonable pensar que incrementa en los sitios de inflamación para regular el proceso flogótico (148). No obstante, SP-D puede ser también modulado directamente por la presencia del patógeno y actuar como un potente quimiotáctico para células inflamatorias. McIntosh *et al.* demostraron que la instilación de LPS en pulmón estimula la expresión de SP-D (244), por lo tanto, los niveles de expresión elevados de esta colectina durante la prostatitis bacteriana pueden ser inducidos por el LPS presente en la pared de *E. coli*, constituyendo un importante factor benéfico para el huésped ya que SP-D aglutina bacterias, promueve la fagocitosis y posee efectos microbicidas directos sobre ciertas cepas de *E. coli* (149). Asimismo, los niveles séricos de SP-D aumentan en ratones con inflamación aguda y crónica de pulmón (156, 164, 226). En un trabajo reciente, Oberley *et al.* han reportado la localización de SP-D en la próstata humana, con elevada expresión en acinos próximos a focos inflamatorios (165). Este mismo estudio demostró que SP-D inhibe la infección de células prostáticas por *Chlamydia trachomatis*, atribuyéndole un rol fundamental en la inmunidad innata de la glándula.

Se ha documentado que el péptido **β DEF-1** se encuentra distribuido en numerosas superficies del organismo recubiertas por epitelios (209). Tanto la forma nativa como la recombinante de β DEF-1 poseen actividad microbicida a concentraciones micromolares contra varias cepas de *E. coli* (245). Si bien el análisis inmunocitoquímico en el presente trabajo no demostró inmunoreactividad para β DEF-1

en la próstata de animales controles, la infección bacteriana indujo la expresión de este péptido principalmente en células epiteliales, aunque PMNN también fueron inmunoreactivos. En contraste, los niveles de β DEF-1 no se alteran por LPS de *E. coli* en epidídimo (165), sugiriendo un tipo de control particular en la próstata. En el tracto urogenital, este péptido ha sido aislado de hemofiltrados de humanos hace más de una década (209, 211, 246, 247) y luego su localización fue demostrada principalmente en el riñón y en células del sistema reproductor femenino (209). Estudios recientes han descrito la presencia de varios genes con secuencia homóloga a la familia de las β defensinas en el epidídimo de varias especies (248). Palladino *et al.* han reportado la detección del ARNm de β DEF-1 a lo largo del tracto reproductor masculino de ratas, con elevada expresión en epidídimo comparada con riñón u otros sitios de aparato genital (249). Curiosamente, se ha documentado la pérdida de la expresión de β DEF-1 en adenocarcinomas prostáticos (250), indicando además un posible rol de esta molécula en el control del desarrollo y/o crecimiento tumoral. En un trabajo publicado en el último año se ha confirmado esta hipótesis, reportándose una importante actividad citotóxica de β DEF-1 sobre las líneas tumorales prostáticas humanas PC3 y DU145 (251). En consecuencia, este péptido no solo actuaría en la respuesta inmune innata de la próstata frente a patógenos, sino que podría también estar implicado en la detección y destrucción de células tumorales prostáticas.

El análisis de ambos modelos de prostatitis puso de manifiesto la gran capacidad de respuesta del epitelio prostático frente a diferentes injurias (**Figura 52**). Además de la regulación de las moléculas de defensa discutidas más arriba, se observó el incremento en la expresión epitelial de $\text{TNF}\alpha$ en ambos modelos de inflamación prostática, aún en el epitelio atrófico de prostatitis bacteriana a las 72 h postinfección. Es ampliamente aceptado que esta citocina actúa en las fases tempranas de reclutamiento leucocitario (111, 112, 119, 120, 252), por lo que células prostáticas estarían ejerciendo un rol fundamental en el inicio de la reacción inflamatoria. Esta función es particularmente importante en este órgano, ya que la próstata múrida posee escasas células inmunes residentes en la estroma. Más aún, se ha descrito la presencia

de una barrera hemato-prostática que impediría el libre tráfico entre la luz acinar y el compartimiento estromal de la glándula (253, 254). En este contexto, las células

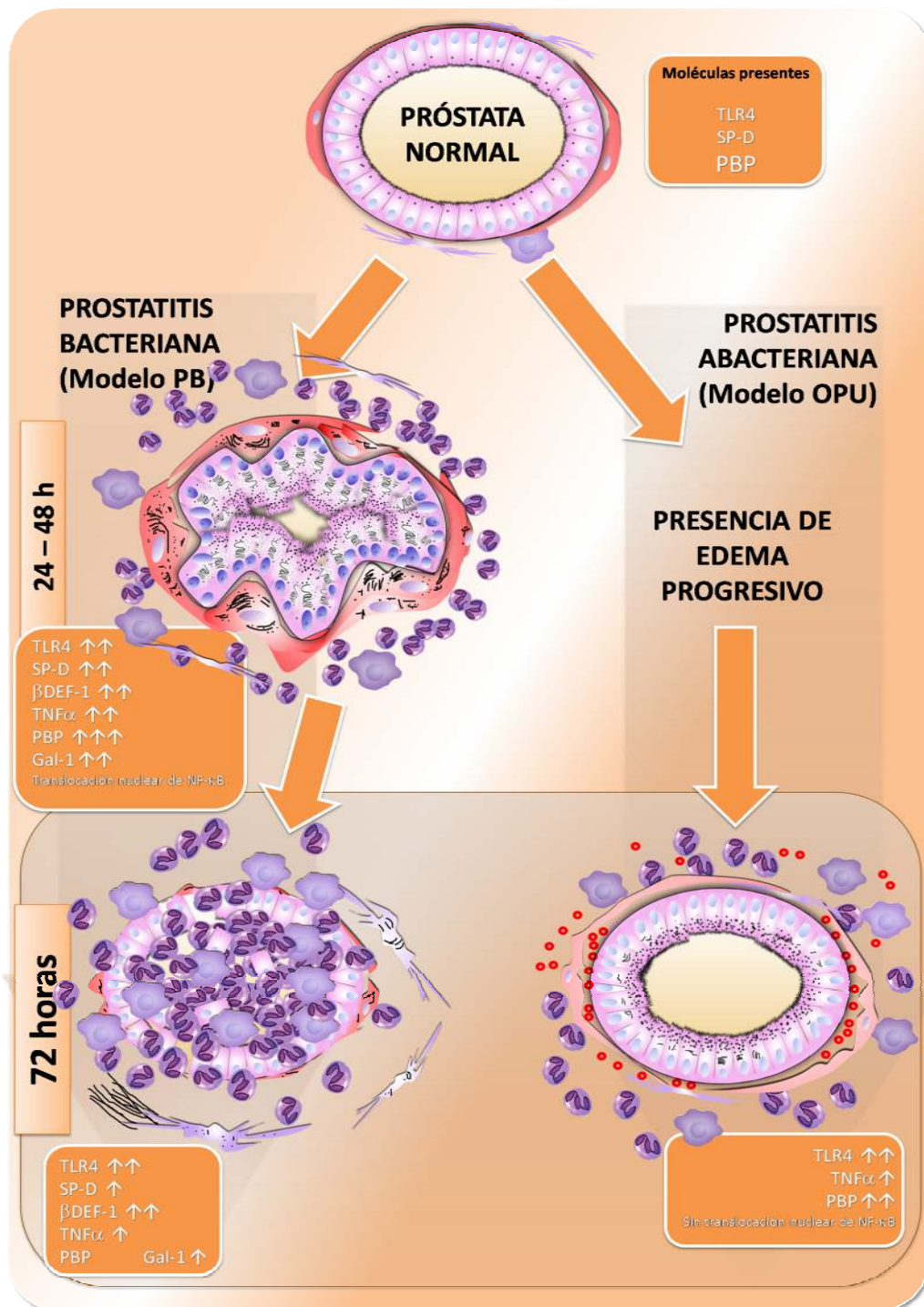


Figura 52: Representación esquemática y comparativa de los principales eventos registrados en los modelos de prostatitis bacteriana y abacteriana. El modelo *bacteriano* presenta dos momentos claves: a) entre las 24 y 48 h, con predominio de una respuesta estimuladora del epitelio y de la capa muscular periacinar que en conjunto determinan la reducción de la luz acinar; el infiltrado inflamatorio se limita al espacio interacinar, b) a las 72 h, en que se destaca la dilatación que experimenta el acino debido a la ruptura de la capa muscular y al ingreso masivo de neutrófilos; el epitelio es bajo y atrófico. El modelo abacteriano en cambio, presentó una estimulación del epitelio que se mantuvo hasta el final del tiempo evaluado; los cambios en la capa muscular no se pudieron registrar debido a la extravasación de líquido y células de capilares interpuestos entre a capa muscular y la membrana basal.

epiteliales prostáticas son las primeras en contactar con los agentes nocivos, debiendo garantizar la correcta detección de injurias y una adecuada comunicación con el sistema inmune. La modulación de moléculas de defensa dentro de la glándula representa un mecanismo clave que garantiza una eliminación efectiva de microorganismos, evitando la progresión de la infección hacia sitios restringidos del sistema reproductor masculino como el epidídimo y el testículo.

La respuesta inflamatoria es un mecanismo complejo utilizado por los organismos multicelulares para protegerse del daño celular producido por una amplia variedad de estímulos o injurias. Sin embargo, la reacción descontrolada y exagerada puede llevar a una condición crónica de deterioro tisular, con pérdida de la función normal de los órganos e incluso desencadenar alteraciones del crecimiento celular (255). En los últimos años hubo un gran auge en investigaciones de mecanismos que controlan la inflamación (256); por ejemplo, se ha propuesto que la resolución de la inflamación es un proceso altamente regulado y puesto en marcha en forma simultánea con las cascadas inflamatorias (257). Existen múltiples niveles para **limitar la respuesta inflamatoria**, incluso desde la misma activación de la respuesta inmune innata (258, 259). La modulación de la inflamación es particularmente crítica en sitios tales como placenta, retina y testículo, donde la respuesta inflamatoria puede resultar aún más dañina que el agente causal. En estos sitios -denominados de inmunoprivilegio-, la respuesta inmune está normalmente suprimida y al producirse una infección, múltiples factores operan para asegurar una rápida eliminación de células inflamatorias. Algunos autores han propuesto a la próstata como un sitio con características de inmunoprivilegio (175, 260); de hecho, **el líquido seminal posee potente actividad antiinflamatoria e inmunosupresora** (261). No obstante, el conocimiento acerca de las proteínas implicadas en este proceso, su origen y su regulación por procesos inflamatorios es limitado. En este contexto, se analizó la expresión de las proteínas UG, PBP -ambas de la familia de las secretoglobinas- y Gal-1 en la glándula prostática normal y luego de la infección bacteriana.

Las **secretoglobinas** se expresan en epitelios del tracto respiratorio y genital, donde son reguladas por hormonas esteroideas (262), mientras que las galectinas se localizan principalmente en células del sistema inmune tales como macrófagos activados y linfocitos (263). En muestras humanas analizadas en el presente trabajo, **UG** se localizó principalmente en células epiteliales, coincidiendo con la localización ya descrita para homólogos de esta proteína en la próstata (190). UG fue descrita por primera vez en útero de conejo y se la relacionó con la inmunosupresión necesaria para la receptividad de embrión (264); luego se demostró que UG suprime la antigenicidad de espermatozoides epididimarios (30, 55), reafirmando el rol fundamental de esta proteína en la biología reproductiva. Posteriormente, la disminución en la expresión de UG en tumores prostáticos derivó en experimentos que demostraron además propiedades antitumorales para esta proteína, tanto *in vivo* como *in vitro* (56).

PBP es la principal proteína citosólica de las células epiteliales de la próstata murina (57, 58). Las cadenas polipeptídicas que forma su estructura molecular tienen una alta homología con las de la UG (265) y al igual que ésta, PBP tiene variadas propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias (266). Desde el aislamiento de UG en el hemofiltrado humano en 1996 (267), investigadores del Centro de Microscopía Electronica de la Facultad de Ciencias Medicas –UNC–, han demostrado que la expresión de esta proteína aumenta en respuesta a estímulos inflamatorios de diferente índole en epitelios del tracto respiratorio y reproductor. Por ejemplo, hemos observado que UG está incrementada en muestras de trompa uterina con salpingitis (268) y en el epitelio bronquiolar en un modelo de asma murina (269). En el presente trabajo ampliamos el estudio de las secretoglobinas a la glándula prostática en condiciones inflamatorias. PBP incrementó sus niveles en el epitelio prostático en las etapas tempranas (24-48 h) de la prostatitis bacteriana como así también en la abacteriana, apoyando los hallazgos observados en otras mucosas. Se ha indicado que citocinas proinflamatorias son las responsables de la inducción de la expresión de secretoglobinas. Particularmente, TNF α estimula la producción de CC10 -homóloga de UG- en células epiteliales bronquiales (270); por lo tanto, es concebible que TNF α esté

también involucrado en el incremento de PBP, ya que la inmunomarcación de esta citocina se intensificó en ambos modelos de inflamación prostática. En contraste, trabajos recientes han reportado la disminución de UG en el epitelio nasal (178, 261, 271) y bronquial (177) luego de la estimulación con LPS. Esta discrepancia puede resultar de los tiempos analizados, ya que las secretoglobinas son de origen epitelial exclusivo y su incremento se mantiene mientras las células epiteliales mantengan su trofismo y funcionalidad. En periodos prolongados, la presencia de PMNN provoca severos daños tisulares; de hecho, a las 72 h postinfección, el epitelio prostático exhibió una notable atrofia con la subsecuente caída en los niveles de PBP.

Gal-1, como se ha demostrado, se expresa principalmente en macrófagos y tiene una localización preferencial en sitios inmunológicamente privilegiados del organismo, tales como placenta, retina y testículo (180, 272, 273), protegiendo a estos órganos del efecto deletéreo de una respuesta inflamatoria. El grupo del Dr. Gabriel Rabinovich (IBYME-CONICET) ha proporcionado las primeras evidencias acerca del rol de la Gal-1 en la inmunidad innata y en la respuesta inflamatoria aguda (192). Esta proteína fue capaz de inhibir específicamente el edema generado por metabolitos del ácido araquidónico luego de la administración de la enzima fosfolipasa A₂ (PLA₂) *in vivo* (test de edema de la pata). Este fenómeno fue evidenciado por reducción en la diapédesis de neutrófilos y disminución marcada de la degranulación de mastocitos. Este efecto antiinflamatorio de Gal-1 fue confirmado a través de ensayos *in vitro*, en los cuales, esta proteína fue capaz de inhibir la movilización de ácido araquidónico y la producción de prostaglandina E₂ de macrófagos activados. Además, Gal-1 posee un amplio rango de mecanismos inmunosupresores, utilizados tanto por células normales como tumorales, que la convierten en una molécula clave del sistema inmune y en un blanco de terapias antitumorales (257). En este estudio, se demostró que en la glándula prostática humana Gal-1 se localiza en células epiteliales, aunque su expresión fue más intensa en el compartimiento estromal, coincidiendo con lo observado en un trabajo previo reportado por Ellerhorst *et al.* (12, 130, 134, 274-276). Por otro lado, el hallazgo de la regulación positiva de esta proteína por la inflamación en la próstata refuerza la hipótesis de

inmunoprivilegio dado a este sitio (198). Es absolutamente razonable que la función principal de la glándula prostática sea resguardar al espermatozoide de agentes infecciosos –secretando SP-D, β DEF-1 y zinc entre otros–; otra forma de protegerlo sería “manteniéndolo oculto” de las reacciones inflamatorias adversas. Para ello cuenta con UG (o PBP en rata) y Gal-1. Además, esta función inmunosupresora y antiinflamatoria es ejercida aún en pleno proceso infeccioso, ya que incrementa la expresión de estas proteínas. Más aún, el aumento en la expresión de SP-D puede también estar relacionado a esta actividad inmunomoduladora, al igual que el incremento de la citocina antiinflamatoria TFG β 1 observado en animales con prostatitis bacteriana.

La estricta modulación de las proteínas de defensa así como de las vías de señalización implicadas en la respuesta inmune innata tiene obviamente consecuencias directas sobre los signos inflamatorios a nivel histológico. Clásicamente, el análisis morfológico de la inflamación prostática se centró en el estudio de las células inflamatorias, tanto en humanos como en modelos animales (198), omitiendo el análisis de las consecuencias del proceso flogótico sobre las células residentes –epiteliales y estromales– de la glándula. De hecho, los hallazgos del presente trabajo constituyen las primeras **evidencias ultraestructurales** de la respuesta de células prostáticas a **estímulos inflamatorios**, observados tanto en el modelo de prostatitis bacteriano como abacteriano. En este sentido, es necesario diferenciar –considerando el tiempo– los cambios ocurridos a las 24 h postestímulo de aquellos observados en tiempos posteriores, cuando los PMNN junto a su sistema degradativo estuvieron presentes dentro los acinos prostáticos. Una de las ventajas que ofrece el modelo de inflamación *in vivo* es poder analizar la respuesta integral de la glándula, ya que ambos compartimientos –epitelial y estromal– se influyen mutuamente mediante comunicaciones de tipo autocrinas, paracrinas y neuroendocrinas (**Figuras 4 y 5**). Ambos modelos de prostatitis resultaron activadores de la maquinaria biosintética del epitelio prostático, con hipertrofia celular a las 24 h posteriores al inicio de la injuria respectiva; los signos de activación incluyeron el desarrollo del sistema de

endomembranas y la presencia de numerosos gránulos secretorios. Un estudio previo había demostrado que la instilación por 24 h de LPS intraprostático produce un incremento en la síntesis y secreción de proteínas por parte del epitelio prostático (277). Nuestros datos corroboran esos resultados y brindan información acerca del incremento de gránulos secretorios positivos para **PBP**, con un nivel elevado de esta proteína en secreción prostática que confirma la estimulación epitelial postinfección. Con respecto a las moléculas implicadas en este proceso de activación celular, el estudio de Fulmer y Turner ha demostrado que el bloqueo de TNF α no altera la respuesta secretoria de las células epiteliales prostáticas a LPS, sugiriendo que podrían ser otros los mediadores involucradas (278). Una de las posibles explicaciones es que *E. coli* actúe en forma directa sobre las células epiteliales a través de TLR4, activando la vía que culmina en la translocación nuclear de NF- κ B y la consiguiente activación celular. Los datos bioquímicos e inmunocitoquímicos aquí obtenidos avalan fuertemente este postulado; de hecho los hallazgos morfológicos y de expresión proteica coinciden en indicar que el epitelio prostático es altamente reactivo frente a la infección bacteriana en las etapas tempranas. Finalmente, se ha reportado recientemente que *E. coli* puede inducir hiperplasia epitelial en las etapas crónicas de la prostatitis bacteriana (131), reafirmando nuevamente la vinculación entre inflamación y crecimiento celular anómalo en la próstata. En el mismo sentido, se ha demostrado que el Adyuvante Completo de Freund (que incluye *M. tuberculosis* inactivado) provoca hiperplasia epitelial prostática luego de 30 días de estimulación (279).

Curiosamente, la estimulación de las células epiteliales secundaria a OPU se mantuvo hasta las 72 h postobstrucción, con un incremento sostenido en la síntesis de PBP. Aunque se considera que este modelo es esencialmente abacteriano (280), es posible que agentes de difícil detección o virus presentes en la orina sean responsables de la activación epitelial. Por otro lado, ya iniciado el proceso inflamatorio, la activación de las células epiteliales podría representar simplemente un fenómeno secundario al microambiente estromal inflamado, en el que las citocinas y factores de

crecimiento inducirían la hipertrofia epitelial observada en el modelo de prostatitis por OPU.

Los pacientes con prostatitis crónica exhiben a menudo alto niveles de citocinas proinflamatorias en secreción prostática (281, 282) y semen (178, 283) que indican el estado inflamatorio del tracto genital. Además, los marcadores de capacidad secretoria prostática, tales como el citrato, están generalmente disminuidos en estos pacientes (283), sugiriendo una importante alteración en la función secretoria secundaria a inflamación. En correlación con estos hallazgos, se observó un descenso en la expresión de PBP en el modelo de prostatitis bacteriana hacia las 72 h, tiempo en el que los PMNN invaden las luces de los acinos, provocando la atrofia del epitelio con pérdida de la función secretoria. Al examinar muestras de tejido prostático provenientes de animales infectados por 5 días, se observaron las mismas características histológicas, indicando que la cronicidad del proceso podría acompañarse de un patrón morfofuncional similar. Curiosamente, la expresión de TNF α se mantuvo con elevada intensidad en este epitelio atrófico, sugiriendo que las células prostáticas mantienen la capacidad de responder al entorno con mecanismos inmunes efectores aún en este estado de baja actividad secretoria.

La apoptosis es un mecanismo fisiológico cuyo objetivo final es lograr la homeostasis en los tejidos del organismo. Actualmente se ha descrito que diversos procesos patológicos surgen por una disfunción de los mecanismos de regulación de la maquinaria apoptótica de las células. La **apoptosis de células epiteliales frente a patógenos** constituye una respuesta evolutivamente conservada a través de los reinos animales y vegetales y puede funcionar para eliminar células infectadas o dañadas y restaurar el crecimiento y función normal de los epitelios, manteniendo su integridad (284). Se ha demostrado que las células intestinales sufren apoptosis luego de la infección por *Salmonella* o *E. coli*, siendo probable también la participación de citocinas proapoptóticas tales como TNF α o mediadores como el óxido nítrico (40, 41, 79, 285-292). En el presente trabajo, se observó apoptosis de células epiteliales

prostáticas en el modelo de prostatitis bacteriana, especialmente en el tiempo previo a la atrofia epitelial (48 h). Es posible que este proceso de muerte favorezca la regeneración epitelial, pero en el caso de epitelio prostático, se observó una caída en la integridad y función secretoria luego del proceso apoptótico. Sin embargo, el proceso apoptótico fue evidente recién a partir de las 48 h postinfección, por lo que las células epiteliales tienen un tiempo suficiente para iniciar señales proinflamatorias para la defensa contra la invasión bacteriana.

En cuanto a los mecanismos responsables de la apoptosis postinfección en la próstata, el incremento de TNF α observado en este modelo hace razonar que esta citocina podría estar implicada. Además, se ha determinado que los TLRs están involucrados tanto en vías de activación celular como de apoptosis (293, 294). La modulación de TLR4 en la próstata infectada sugiere que la activación de estos receptores podría ejercer también un rol proapoptótico sobre células epiteliales prostáticas en presencia de bacterias.

La respuesta de la glándula comprometió también la estructura de las **células estromales prostáticas**. Se ha demostrado ampliamente que el compartimiento estromal prostático posee importantes funciones en el mantenimiento de la homeostasis glandular (295). En particular, las células musculares lisas (CML) de la estroma prostática han sido caracterizadas como elementos altamente respondedores a cambios del microambiente local. Esto fue demostrado en situaciones que alteran fuertemente la glándula, tales como supresión androgénica (230, 291), hiperplasia benigna (296) y adenocarcinoma prostático (293). Sin embargo, se desconoce aún la reacción de las CML a estímulos inflamatorios en la próstata.

Numerosas evidencias sugieren que las células musculares son metabólicamente dinámicas, con capacidad de expresar y secretar numerosas proteínas o factores de señalización en respuesta a diferentes estímulos (297). En el presente trabajo de tesis se determinó que las CML de la estroma prostática reaccionan en forma temprana (24-48 h) a la inflamación con hipertrofia celular e incrementando los niveles de α SMA. Por

otra parte, las CML de la capa periacinar no sólo experimentaron hipertrofia sino también incrementaron significativamente la expresión de TLR4 en respuesta a la infección bacteriana. Si bien es ampliamente aceptado el concepto de que las CML son las responsables de la reorganización estromal luego de la castración (298), los datos aquí informados constituyen las primeras evidencias describiendo una reacción estromal específica a la infección bacteriana, señalando a las CML como componentes activos del sistema inmune innato. En la glándula prostática, el aumento de expresión de TLR4 puede proveer a estas células de moléculas de reconocimiento, necesarias para detectar un amplio rango de señales de daño provenientes del microambiente e inducir rápidamente respuestas innatas de manera similar a las células profesionales del sistema inmune.

La expresión de **TLRs en las células estromales** ha sido reportado en otros sitios, incluyendo el tracto genital femenino (299), sistema respiratorio (300) y en las células musculares de vasos sanguíneos (230, 291, 295). En estos lugares, el compartimiento estromal tiene un rol importante en las enfermedades inflamatorias y se ha postulado que la presencia del sistema de TLR4 contribuye amplificando las señales inflamatorias en procesos patológicos como asma y aterosclerosis (101, 112). En la glándula prostática, las modificaciones de la estroma fibromuscular han sido implicadas en el desarrollo de procesos proliferativos benignos y malignos (301). En consecuencia, es concebible que la expresión de TLR4 en células estromales prostáticas modificadas pueda participar en la extensa vía de señalización involucrada en la carcinogénesis de la próstata. En este sentido, TLR4 podría representar otro de los factores comunes entre la inflamación y el desarrollo tumoral, apoyando el renacimiento de esta vieja hipótesis (302, 303). De hecho, se ha reportado una estrecha asociación entre ciertos polimorfismos del gen de TLR4 y el riesgo de cáncer de próstata (291).

A partir de las 48 h posteriores a la infección prostática, se observó una **pérdida progresiva de filamentos contráctiles** en las CML periacinares, adquiriendo un gran desarrollo de organelas de síntesis proteica, lo que sugiere un cambio fenotípico de estas células en respuesta a la inflamación hacia un perfil secretorio. Se ha reportado un tipo

celular denominado **miofibroblasto**, con gran actividad sintética y escaso aparato contráctil, que actuaría en la estroma reactiva de numerosas condiciones patológicas,

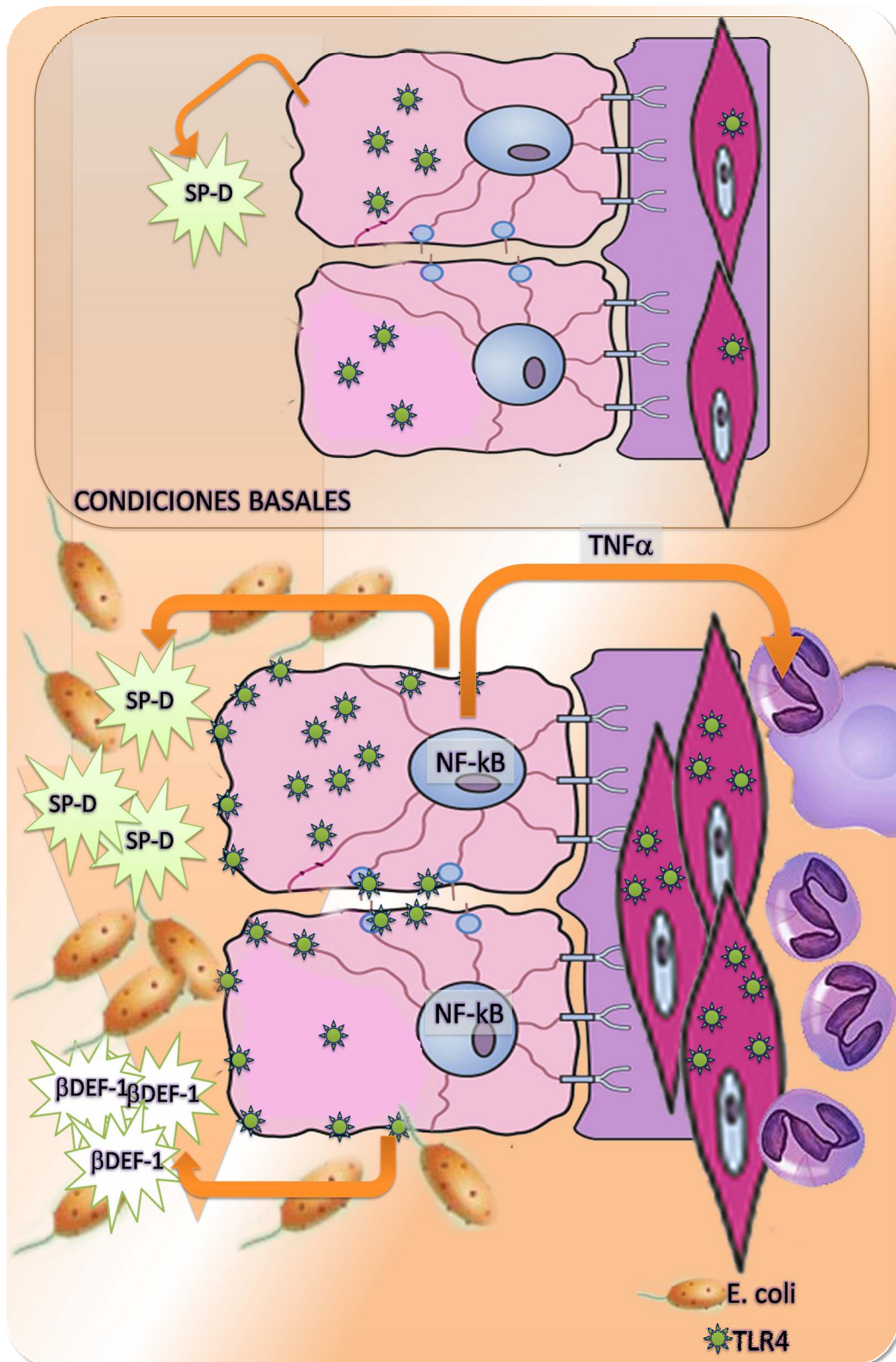


Figura 52: Esquema representativo de la respuesta inmune innata desencadenada por la infección por *E.coli* en la glándula prostática, que incluye la distribución apical de TLR4 en las células epiteliales, translocación nuclear de NF- κ B y la secreción de antimicrobianos SP-D y β DEF-1. Asimismo, secreta citocinas proinflamatorias como TNF α que inducen la activación de sistema inmune específico.

tanto benignas como malignas (304). Este tipo celular ha sido descrito en la reacción estromal presente en los adenocarcinomas prostáticos y se cree que es un factor fundamental en la progresión del cáncer (230). De hecho, se ha demostrado que los efectos antitumorales de ciertos compuestos incluyen la inhibición de la transformación miofibroblástica (305), confirmando el rol fundamental de estas células en el mantenimiento del microambiente tumoral.

En la glándula prostática, la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos requiere la presencia de **TGF β 1** (304), una citocina multifuncional con importantes funciones tróficas sobre la estroma prostática (306). En el presente trabajo se determinó un incremento en los niveles de TGF β 1 durante la prostatitis bacteriana, indicando que este factor podría estar implicado en las alteraciones estromales posteriores a la infección. Recientemente, se reportó además que IL8 proveniente de células epiteliales constituiría otra citocina clave en la inducción de miofibroblastos en la hiperplasia prostática (307, 308). El origen epitelial de los factores que controlan la miodiferenciación estromal refuerza el concepto de las interacciones epitelio-estromales en el control de condiciones fisiológicas y patológicas en la glándula.

Otro hallazgo interesante fue la expresión extracelular del filamento intermedio **vimentina** en el compartimiento estromal de la próstata en los animales infectados. Clásicamente se ha considerado que esta proteína constituye un elemento del citoesqueleto celular, cumpliendo roles netamente mecánicos o de sostén (230). No obstante, un estudio reciente ha reportado que esta proteína puede ser secretada por macrófagos al espacio extracelular, donde actúa como un factor fundamental en la eliminación de patógenos (200). En el presente estudio, se observó inmunomarcación ultraestructural de vimentina alrededor de células fibroblásticas y musculares, pero debido a la gran presencia de células inflamatorias en el modelo de prostatitis bacteriana, es posible que el origen de esta proteína sean también las células macrofágicas.

Los cambios estromales en respuesta a la inflamación fueron más notorios en animales infectados y tratados con dosis altas de testosterona por 5 días.

Particularmente, las CML exhibieron un gran desarrollo del sistema de endomembranas responsables de la síntesis proteica junto a una disminución del aparato de filamentos contráctiles. Como se dijo anteriormente, estos hallazgos son característicos de células miofibroblásticas, típicas de la estroma reactiva. Se ha reportado que los andrógenos producen mioidiferenciación de fibroblastos prostáticos al igual que TGF β 1 (309, 310), resultando en células con perfil de miofibroblastos. No obstante, estas células pueden surgir también de una dediferenciación de CML maduras; por lo que el origen de los miofibroblastos en la estroma reactiva prostática es aún controvertido. De todos modos, queda claro que los andrógenos en conjunto con citocinas y factores de crecimiento provenientes tanto del epitelio como de la estroma interactúan para producir las alteraciones estromales observadas luego de la infección bacteriana.

Está bien establecido que la testosterona es esencial para mantener la integridad tanto estructural como funcional de la próstata. La deprivación de andrógenos por castración lleva a una marcada involución de la glándula con severas alteraciones epiteliales que incluyen disminución en la secreción y pérdida de células epiteliales por apoptosis. Considerando el estricto control que ejercen las hormonas sexuales masculinas sobre la glándula prostática, otro objetivo del presente trabajo de tesis estuvo dirigido a evaluar el **rol de la testosterona en la respuesta prostática a la inflamación**; para ello, se determinó primero la influencia de los andrógenos en la expresión de TLR4, PBP y Gal-1.

Como se discutió anteriormente, la expresión de TLR4 es modulada por una amplia variedad de factores ambientales como invasión microbiana, componentes de patógenos y citocinas (32); sin embargo, existen pocas evidencias que definan el rol de las hormonas sexuales en el control de la **expresión de TLR4**. En nuestros modelos experimentales, los niveles prostáticos de TLR4 incrementaron significativamente en animales castrados. Mediante inmunocitoquímica, se observó que este aumento se debe a dos fuentes diferentes: el epitelio y la estroma prostática. Las células epiteliales no sólo mantuvieron la expresión de TLR4, sino que mostraron una marcación más intensa

en comparación a animales intactos. Las células fuertemente marcadas con TLR4 representarían células basales que probablemente pierden la expresión de este receptor al diferenciarse a células luminales secretorias por acción de la testosterona, ya que se postuló que las células epiteliales prostáticas que sobreviven a la castración corresponden principalmente a células basales (30, 311, 312). En coincidencia, nuestros resultados han demostrado que la capa basal de células epiteliales en la próstata humana expresa los niveles más altos de TLR4. Curiosamente, este tipo celular expresa bajos niveles de AR (179, 313), lo cual sugiere una correlación inversa entre la expresión de AR y TLR4. Por otro lado, la castración produce hipertrofia del compartimiento estromal, contribuyendo significativamente al incremento del contenido de este receptor en la glándula prostática.

Respecto a la **regulación hormonal de moléculas inmunomoduladoras**, nuestros datos demostraron claramente la andrógenodependencia de las proteínas PBP y Gal-1 en la próstata. Previamente varios autores reportaron que los niveles prostáticos de PBP disminuyen notablemente en animales castrados (314, 315); siendo considerados como un importante marcador de la acción androgénica sobre la próstata ventral múrida. Por otro lado, la modulación de Gal-1 por hormonas sexuales es un área poco examinada; de hecho, los datos aquí presentados constituyen las primeras evidencias de un control de esta proteína por parte de testosterona. Previamente, se había demostrado que Gal-1 se expresa en órganos del tracto genital femenino donde desempeñaría un importante rol en la implantación del embrión y en la tolerancia al mismo (316); en estos sitios, Gal-1 estaría fuertemente regulada por progesterona y estrógenos (251).

Los andrógenos en niveles suprafisiológicos son capaces de incrementar la expresión de moléculas antiinflamatorias –PBP y Gal-1–; sin embargo, los valores de TLR4 no se modificaron. Por el contrario, durante la castración se observó un aumento en la expresión de TLR4 tanto en el epitelio como en la estroma modificada, propio de este modelo experimental. De esta manera, se pone en evidencia el potencial de la

testosterona para incrementar moléculas implicadas en regulación de la respuesta inflamatoria.

Los TLRs son considerados factores claves en la estimulación del sistema inmune; por lo tanto el hallazgo de un incremento de TLR4 en la glándula prostática postcastración refuerza el concepto de que testosterona tiene un efecto supresor sobre la respuesta inmune (286). En este sentido, los andrógenos son los responsables de mantener un perfil inmunosupresor en la glándula prostática en condiciones normales, con escasa expresión de mediadores proinflamatorios y altos niveles de factores inmunosupresores (como Gal-1 y PBP). De este modo, la testosterona contribuye al inmunoprivilegio otorgado a la próstata, donde las respuestas inflamatorias están usualmente restringidas o suprimidas (317-320).

La estroma prostática está implicada en la regulación parácrina de la estructura y función del epitelio, a través de la producción de factores críticos responsables de la homeostasis del órgano y de las interacciones epitelio-estromales. (319, 321, 322). En ratas castradas, el incremento de la concentración de TLR4 fue detectado en el plasmalema de las CML. Estas observaciones sugieren que TLR4 podría tener un rol crucial en las interacciones epitelio-estromales luego de la deprivación androgénica.

Luego de establecer el carácter inmunomodulador de los andrógenos sobre la expresión de proteínas de defensa en la próstata, el objetivo siguiente se centró en analizar el efecto de la **testosterona** en el desarrollo de la **prostatitis bacteriana**. Desde hace tiempo, se sabe que las hormonas sexuales influyen fuertemente las respuestas inmunes, resultando en un notable dimorfismo en las enfermedades causadas por las disregulaciones del sistema inmunológico. Se conoce por ejemplo que las mujeres producen una vigorosa inmunidad humoral y celular, siendo más resistentes a las infecciones bacterianas (323). Por otro lado, en el sexo femenino se observa mayor prevalencia de enfermedades autoinmunes como artritis reumatoideas, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis de Hashimoto y esclerosis múltiple (321). En general, los andrógenos determinan un tono supresor sobre la respuesta inmune por múltiples

mecanismos, que incluyen la disminución del número de células T y B por apoptosis, estimulando a su vez la función de los linfocitos T supresores CD8+. En cuanto a la inmunidad innata, se ha investigado poco el rol que ejercen los andrógenos; sin embargo, las primeras evidencias han postulado que los TLRs están diferencialmente expresados en ambos sexos (324, 325). Asimismo, los mecanismos efectores disparados en respuesta a patógenos estarían sometidos a un dimorfismo sexual (326, 327), con una

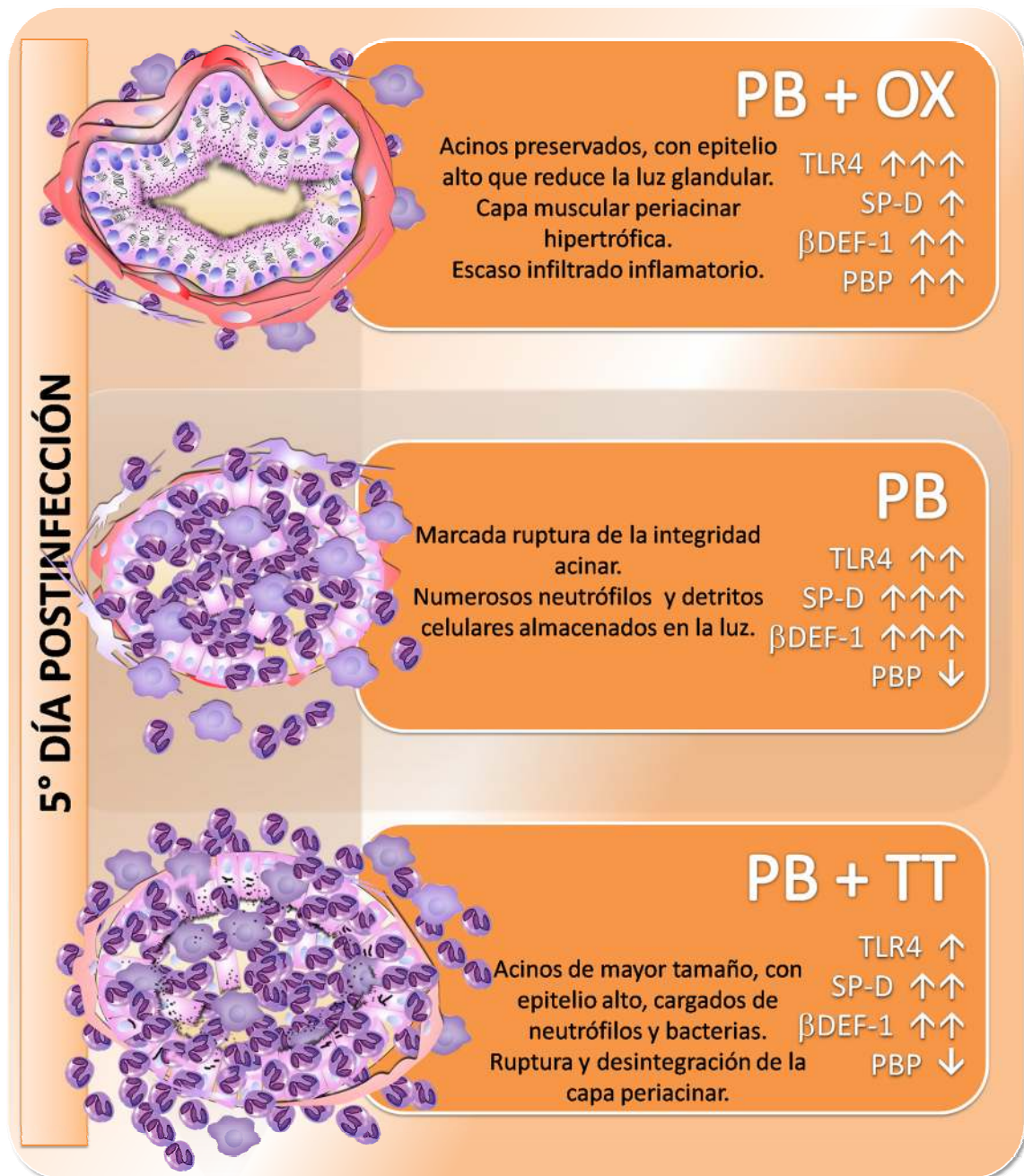


Figura 54: Representación esquemática de las alteraciones morfofuncionales de la próstata desecadenada por infección bacteriana en animales con diferentes estatus androgénico.

mayor secreción de TNF α e IL-1 β en el género masculino.

Los animales castrados exhibieron una notable mejoría en los parámetros inflamatorios al 5° día postinfección prostática, que incluyó la reducción del infiltrado inflamatorio intersticial y la ausencia de inmunotinción para *E. coli* al compararlos con animales infectados con testosterona normal. La reducción de células inflamatorias en los animales orquiectomizados permitió además una conservación en la histoarquitectura prostática, con mantenimiento de la función secretoria. Por el contrario, los animales infectados y tratados con altas dosis de testosterona mostraron una marcada migración de PMNN hacia las luces acinares, que se observaron obliteradas por restos celulares y células inflamatorias.

La mejor resolución de signos inflamatorios en animales castrados, presentados en este trabajo de tesis, confirman hallazgos previos de laboratorios independientes (321, 328-330) indicando que la **deprivación androgénica** podría favorecer el desarrollo de nuevas **terapias antiinflamatorias** para enfermedades de la próstata. En este sentido, se ha establecido que los andrógenos modulan fuertemente la activación de células inmunes como PMMN (331), resultando en un peor pronóstico del shock por endotoxinas para el sexo masculino. Esta activación exagerada de PMNN por testosterona durante la prostatitis bacteriana podría explicar la elevada ocurrencia de estas células en el tejido prostático; sin embargo, la presencia de estas células se acompañó de una elevada inmunomarcación para *E. coli*, sugiriendo que los PMNN en este modelo podrían estar funcionando en forma anómala. También es probable que los niveles elevados de andrógenos en la próstata impidan una correcta activación de los mecanismos inmunes específicos que eliminen en forma eficiente la bacteria. En este sentido, se ha postulado ampliamente y demostrado en muchos experimentos el rol supresor de la testosterona sobre la respuesta inmune específica .

Considerando que la castración provoca un incremento en mediadores proinflamatorios en células prostáticas , es posible que este fenómeno favorezca una eliminación más eficaz del agente bacteriano de la glándula. Por otro lado, es también probable que la testosterona al afectar la fisiología de células fagocíticas, actué

alterando la activación y muerte de PMNN, resultando en una permanencia mayor de estas células en tejido prostático. Aunque los resultados de la regulación inmune por hormonas sexuales en la próstata son promisorios, hace falta un mayor desarrollo de investigaciones en este campo.

Los datos presentados tienen un amplio rango de implicancias para la fisiología de la glándula prostática. Este órgano está provisto de una amplia variedad de moléculas de defensa que son moduladas por andrógenos, los cuales favorecen un perfil inmunosupresor. Además, las células prostáticas funcionan como importantes componentes para la defensa del huésped ya que reconocen y responden a alteraciones en el microambiente de la glándula. Por otro lado, se presentan evidencias de que las células musculares lisas jugarían un rol protagónico en el control de situaciones que comprometen la homeostasis de la glándula prostática. Finalmente, los hallazgos del presente trabajo sugieren que los niveles de testosterona se correlacionan negativamente con la resolución de las prostatitis bacterianas lo que sienta las bases para futuras terapias alternativas.

CONCLUSIONES

- ❖ Tanto en humanos como en ratas, las células residentes –epiteliales y estromales– de la glándula prostática están provistas de **proteínas de defensa** para reconocimiento y eliminación de microorganismos tales como *TLR4*, *SP-D*, *βDEF-1* y *TNFα*, e inmunomoduladoras como *PBP (UG)* y *Gal-1*.
- ❖ En la glándula prostática los mecanismos de detección bacteriana se encuentran normalmente **dentro de la célula**, previniendo activaciones innecesarias de las cascadas inflamatorias.
- ❖ La localización citoplasmática del receptor TLR4 no impide su **translocación a la membrana plasmática** al ser desafiado con bacterias Gram negativas.
- ❖ Tanto las células epiteliales como las estromales demostraron tener un **alto potencial de respuesta frente a injurias**, evidenciada con cambios morfofuncionales.
 - El epitelio prostático, de modo semejante a los epitelios de recubrimiento, participa activamente en la inmunidad innata frente a estímulos **bacterianos y no bacterianos**, modulando la expresión de moléculas de defensa como *TLR4*, *SP-D*, *βDEF-1* y *TNFα*.
 - La respuesta generada comprende también **activación celular** y la modulación de **moléculas antiinflamatorias e inmunomoduladoras** como Gal-1 y PBP, en correlación con su rol en la protección de las células espermáticas.
 - El **cambio fenotípico** de las **células musculares**, y la **expresión de TLR4** frente a infección bacteriana, indican un rol protagónico del compartimiento estromal en la patogénesis del crecimiento anómalo de la próstata.
 - La **apoptosis** y las **alteraciones en la capa muscular**, junto con una **profusa migración de neutrófilos** en el modelo de prostatitis bacteriana, determinan

atrofia del epitelio y desorganización de los acinos prostáticos, lo que contrasta con la sostenida activación epitelial observada en la prostatitis no bacteriana.

- ❖ En condiciones fisiológicas, los *andrógenos modulan la expresión de moléculas de defensa*, manteniendo un perfil inmunosupresor dentro de la glándula como en sus secreciones. Ello evitaría que los espermatozoides -células antigénicamente activas- sufran reacciones inmunes adversas en el tracto genital.
- ❖ La *supresión de andrógenos* promueve una *resolución más eficiente* de la infección prostática, mientras que la sobredosis de testosterona favorece una masiva *migración de neutrófilos y presencia de bacterias en la luz acinar*.
- ❖ La testosterona determina un conjunto de condiciones que *favorecen una inflamación descontrolada*, lo que alienta al estudio de terapias enfocadas a revertir el rol inmunomodulador de los andrógenos en el tratamiento de las prostatitis.

CAPÍTULO
5

BIBLIOGRAFÍA

1. Lawson R (1994). Perspectiva Histórica de las Enfermedades Prostáticas. En: Lepor H & Lawson R (Eds.), *Enfermedades de la Próstata* 1er ed. Editorial Médica Panamericana, Bs. As., Vol pp. 3-7.
2. Freeman ER, Bloom DA & McGuire EJ (2001). A brief history of testosterone. *J Urol* **165**: 371-3.
3. Nickel J (1999). Prostatitis: an historical perspective. En: Nickel J (Ed.), *Textbook of Prostatitis* ed. Isis Medical Media, Oxford, Vol pp. 3-17.
4. Young H, Geraghty J & Stevens A (1906). Chronic prostatitis: An experimental and clinical study with an analysis of 358 cases. *The John Hopkins Hosp Reports* **13**: 271-384.
5. Hitchens AP & Brown CP (1913). The Bacteriology of Chronic Prostatitis. *Am J Public Health (N Y)* **3**: 884-91.
6. von Lackum W (1927). Clinical and experimental data on prostatic infection. *J Urol* **18**: 293-306
7. Nickel A (1930). The bacteriology of chronic prostatitis and seminal vesiculitis and elective localization of the bacteria as isolated. *J Urol* **24**: 343-457
8. Campbell M (1957). The male reproductive tract: the prostate. En: Campbell M (Ed.), *Principles of urology: an introductory text to the disease of the urological tract* ed. WB Saunders, Philadelphia, Vol pp. 311-313.
9. Meares EM & Stamey TA (1968). Bacteriologic localization patterns in bacterial prostatitis and urethritis. *Invest Urol* **5**: 492-518.
10. Drach GW, Fair WR, Meares EM & Stamey TA (1978). Classification of benign diseases associated with prostatic pain: prostatitis or prostatodynia? *J Urol* **120**: 266.
11. Nickel J (2000). Second International Prostatitis Collaborative Network Meeting - Special Report on Prostatitis Initiatives and Future Research. *Rev Urol* **2**: 158-166.
12. Vykhovanets EV, Resnick MI, MacLennan GT & Gupta S (2007). Experimental rodent models of prostatitis: limitations and potential. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **10**: 15-29.
13. Germain RN (2004). An innately interesting decade of research in immunology. *Nat Med* **10**: 1307-20.
14. Janeway CA, Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **54 Pt 1**: 1-13.
15. Matzinger P (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* **12**: 991-1045.
16. Matzinger P (1998). An innate sense of danger. *Seminars in immunology* **10**: 399-415.
17. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P & Janeway CA, Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**: 394-7.
18. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B & Beutler B (1998).

Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**: 2085-8.

19. Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Du X, Thompson P, Chan EK, Ledesma J, Roe B, Clifton S, Vogel SN & Beutler B (1998). Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood cells, molecules & diseases* **24**: 340-55.

20. Veltri R & Rodriguez R (2007). Section XVI – PROSTATE. Chapter 85 – Molecular Biology, Endocrinology, and Physiology of the Prostate and Seminal Vesicles. En: Wein A, Kavoussi L, Novick A, Partin A & Peters C (Eds.), *Campbell-Walsh Urology* 9^o ed. Saunder Elsevier, Philadelphia, Vol 3.

21. McNeal JE (1980). Anatomy of the prostate: an historical survey of divergent views. *Prostate* **1**: 3-13.

22. Jesik CJ, Holland JM & Lee C (1982). An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate* **3**: 81-97.

23. Aumuller G (1983). Morphologic and endocrine aspects of prostatic function. *Prostate* **4**: 195-214.

24. Risbridger GP & Taylor RA (2006). Physiology of the Male Accessory Sex Structures: The Prostate Gland, Seminal Vesicles, and Bulbourethral Glands. En: Neill J (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* ed. Elsevier, San Diego, Vol 1 pp. 1149-1172.

25. Villers A, Steg A & Boccon-Gibod L (1991). Anatomy of the prostate: review of the different models. *Eur Urol* **20**: 261-8.

26. Lee C, Sensibar JA, Dudek SM, Hiipakka RA & Liao ST (1990). Prostatic ductal system in rats: regional variation in morphological and functional activities. *Biology of reproduction* **43**: 1079-86.

27. Janulis L & Lee C (1999). Prostate Gland. En: Knobil E & Neill J (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction* ed. Academic Press, San Diego, Vol 4 pp. 77-85.

28. Coffey DS (1994). *Biología Molecular de la Próstata*. En: Lepor H & Lawson R (Eds.), *Enfermedades de la Próstata* ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Vol pp. 33-68.

29. Wright AS, Thomas LN, Douglas RC, Lazier CB & Rittmaster RS (1996). Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat. *J Clin Invest* **98**: 2558-63.

30. Aumuller G, Seitz J, Heyns W & Flickinger CJ (1982). Intracellular localization of Prostatic Binding Protein (PBP) in rat prostate by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Histochemistry* **76**: 497-516.

31. Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, Norton CR, Gridley T, Cardiff RD, Cunha GR, Abate-Shen C & Shen MM (1999). Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes & development* **13**: 966-77.

32. Mirosevich J, Bentel JM, Zeps N, Redmond SL, D'Antuono MF & Dawkins HJ (1999). Androgen receptor expression of proliferating basal and luminal cells in adult murine ventral prostate. *J Endocrinol* **162**: 341-50.

33. van Leenders GJ, Aalders TW, Hulsbergen-van de Kaa CA, Ruiters DJ & Schalken JA (2001). Expression of basal cell keratins in human prostate cancer metastases and cell lines. *J Pathol* **195**: 563-70.
34. El-Alfy M, Pelletier G, Hermo LS & Labrie F (2000). Unique features of the basal cells of human prostate epithelium. *Microscopy research and technique* **51**: 436-46.
35. Abrahamsson PA (1999). Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocr Relat Cancer* **6**: 503-19.
36. Vashchenko N & Abrahamsson PA (2005). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities. *Eur Urol* **47**: 147-55.
37. Di Sant'agnese PA (1991). Endocrine-paracrine (APUD, neuroendocrine) cells in the normal and pathologic prostate. *Bulletin de l'Association des anatomistes* **75**: 63-7.
38. Abrahamsson PA & di Sant'Agnesse PA (1993). Neuroendocrine cells in the human prostate gland. *Journal of andrology* **14**: 307-9.
39. Aumuller G, Leonhardt M, Janssen M, Konrad L, Bjartell A & Abrahamsson PA (1999). Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology* **53**: 1041-8.
40. Ayala G, Tuxhorn JA, Wheeler TM, Frolov A, Scardino PT, Ohori M, Wheeler M, Spittler J & Rowley DR (2003). Reactive stroma as a predictor of biochemical-free recurrence in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **9**: 4792-801.
41. Bierhoff E, Walljasper U, Hofmann D, Vogel J, Wernert N & Pfeifer U (1997). Morphological analogies of fetal prostate stroma and stromal nodules in BPH. *Prostate* **31**: 234-40.
42. Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS & Cunha GR (1996). Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat (Basel)* **155**: 94-103.
43. Ilio KY, Sensibar JA & Lee C (1995). Effect of TGF-beta 1, TGF-alpha, and EGF on cell proliferation and cell death in rat ventral prostatic epithelial cells in culture. *J Androl* **16**: 482-90.
44. Peehl DM & Sellers RG (1997). Induction of smooth muscle cell phenotype in cultured human prostatic stromal cells. *Exp Cell Res* **232**: 208-15.
45. Flickinger CJ (1972). The fine structure of the interstitial tissue of the rat prostate. *Am J Anat* **134**: 107-25.
46. Di Carlo E, Magnasco S, D'Antuono T, Tenaglia R & Sorrentino C (2007). The prostate-associated lymphoid tissue (PALT) is linked to the expression of homing chemokines CXCL13 and CCL21. *The Prostate* **67**: 1070-80.
47. Vykhovanets EV, Resnick MI & Marengo SR (2005). The healthy rat prostate contains high levels of natural killer-like cells and unique subsets of CD4+ helper-inducer T cells: implications for prostatitis. *J Urol* **173**: 1004-10.
48. Mann T (1974). Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *J Reprod Fertil* **37**: 179-88.

49. Purvis K, Attramadal A & Rui H (1988). Secretory function of the prostate gland. *Scand J Urol Nephrol Suppl* **107**: 46-51.
50. Fung KY, Glode LM, Green S & Duncan MW (2004). A comprehensive characterization of the peptide and protein constituents of human seminal fluid. *Prostate* **61**: 171-81.
51. Aumuller G & Seitz J (1990). Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol* **121**: 127-231.
52. Aumuller G, Seitz J, Lilja H, Abrahamsson PA, von der Kammer H & Scheit KH (1990). Species- and organ-specificity of secretory proteins derived from human prostate and seminal vesicles. *Prostate* **17**: 31-40.
53. Tsai YC, Harrison HH, Lee C, Daufeldt JA, Oliver L & Grayhack JT (1984). Systematic characterization of human prostatic fluid proteins with two-dimensional electrophoresis. *Clin Chem* **30**: 2026-30.
54. Onozawa M, Fukuda K, Watanabe M, Ohtani M, Akaza H, Sugimura T & Wakabayashi K (2001). Detection and cloning of a protein recognized by anti-human prostate-specific antigen (PSA) antibody in the rat ventral prostate. *Jpn J Cancer Res* **92**: 863-8.
55. Aumuller G & Heyns W (1981). Immunocytochemistry of prostatic binding protein in the rat ventral prostate. *Prog Clin Biol Res* **75A**: 409-15.
56. Klug J, Beier HM, Bernard A, Chilton BS, Fleming TP, Lehrer RI, Miele L, Pattabiraman N & Singh G (2000). Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report. *Ann N Y Acad Sci* **923**: 348-54.
57. Maccioni M, Riera CM & Rivero VE (2001). Identification of rat prostatic steroid binding protein (PSBP) as an immunosuppressive factor. *J Reprod Immunol* **50**: 133-49.
58. Maccioni M, Cabezas LE & Rivero VE (2003). Effect of prostatein, the major protein produced by the rat ventral prostate, on phagocytic cell functions. *Am J Reprod Immunol* **50**: 473-80.
59. Kravets FG, Lee J, Singh B, Trocchia A, Pentylala SN & Khan SA (2000). Prostatomes: current concepts. *Prostate* **43**: 169-74.
60. Baumuller A & Madsen PO (1977). Experimental bacterial prostatitis in dogs. *Urol Res* **5**: 211-3.
61. Fair WR, Couch J & Wehner N (1976). Prostatic antibacterial factor. Identity and significance. *Urology* **7**: 169-77.
62. Kawamura H, Kimura M & Ichihara I (1993). The effect of androgen and estrogen on secretory epithelial cells and basal cells of the rat ventral prostate after long-term castration. *Ann Anat* **175**: 569-75.
63. Farnsworth WE & Brown JR (1963). Testosterone Metabolism in the Prostate. *Natl Cancer Inst Monogr* **12**: 323-9.
64. Enderle-Schmitt U, Volck-Badouin E, Schmitt J & Aumuller G (1986). Functional characteristics of nuclear 5 alpha-reductase from rat ventral prostate. *J Steroid Biochem* **25**: 209-17.

65. McPherson SJ, Wang H, Jones ME, Pedersen J, Iismaa TP, Wreford N, Simpson ER & Risbridger GP (2001). Elevated androgens and prolactin in aromatase-deficient mice cause enlargement, but not malignancy, of the prostate gland. *Endocrinology* **142**: 2458-67.
66. Buttyan R, Shabsigh A, Perlman H & Colombel M (1999). Regulation of Apoptosis in the Prostate Gland by Androgenic Steroids. *Trends Endocrinol Metab* **10**: 47-54.
67. Peehl DM (1996). Cellular biology of prostatic growth factors. *Prostate Suppl* **6**: 74-8.
68. Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA & Kurita T (2004). Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **92**: 221-36.
69. Donjacour AA, Thomson AA & Cunha GR (2003). FGF-10 plays an essential role in the growth of the fetal prostate. *Dev Biol* **261**: 39-54.
70. Peehl DM & Sellers RG (1998). Basic FGF, EGF, and PDGF modify TGFbeta-induction of smooth muscle cell phenotype in human prostatic stromal cells. *Prostate* **35**: 125-34.
71. Thomson AA & Cunha GR (1999). Prostatic growth and development are regulated by FGF10. *Development (Cambridge, England)* **126**: 3693-701.
72. Peehl DM, Wong ST & Rubin JS (1996). KGF and EGF differentially regulate the phenotype of prostatic epithelial cells. *Growth Regul* **6**: 22-31.
73. Sugimura Y, Foster BA, Hom YK, Lipschutz JH, Rubin JS, Finch PW, Aaronson SA, Hayashi N, Kawamura J & Cunha GR (1996). Keratinocyte growth factor (KGF) can replace testosterone in the ductal branching morphogenesis of the rat ventral prostate. *Int J Dev Biol* **40**: 941-51.
74. Lee C, Sintich SM, Mathews EP, Shah AH, Kundu SD, Perry KT, Cho JS, Ilio KY, Cronauer MV, Janulis L & Sensibar JA (1999). Transforming growth factor-beta in benign and malignant prostate. *Prostate* **39**: 285-90.
75. Steiner MS (1993). Role of peptide growth factors in the prostate: a review. *Urology* **42**: 99-110.
76. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD & Rowley DR (2002). Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* **8**: 2912-23.
77. Cunha GR (2008). Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. *Differentiation* **76**: 578-86.
78. Matusik RJ, Jin RJ, Sun Q, Wang Y, Yu X, Gupta A, Nandana S, Case TC, Paul M, Mirosevich J, Oottamasathien S & Thomas J (2008). Prostate epithelial cell fate. *Differentiation* **76**: 682-98.
79. Cunha GR, Cooke PS & Kurita T (2004). Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Archives of histology and cytology* **67**: 417-34.
80. Cunha GR, Shannon JM, Taguchi O, Fujii H & Chung LW (1982). Mesenchymal-epithelial interactions in hormone-induced development. *J Anim Sci* **55 Suppl 2**: 14-31.

81. Cunha GR (1996). Growth factors as mediators of androgen action during male urogenital development. *Prostate Suppl* **6**: 22-5.
82. Nemeth JA & Lee C (1996). Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. *Prostate* **28**: 124-8.
83. Thomson AA, Timms BG, Barton L, Cunha GR & Grace OC (2002). The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development* **129**: 1905-12.
84. Thomson AA, Cunha GR & Marker PC (2008). Prostate development and pathogenesis. *Differentiation* **76**: 559-64.
85. Chung LW & Cunha GR (1983). Stromal-epithelial interactions: II. Regulation of prostatic growth by embryonic urogenital sinus mesenchyme. *Prostate* **4**: 503-11.
86. Cunha GR, Chung LW, Shannon JM, Taguchi O & Fujii H (1983). Hormone-induced morphogenesis and growth: role of mesenchymal-epithelial interactions. *Recent Prog Horm Res* **39**: 559-98.
87. Hayward SW, Rosen MA & Cunha GR (1997). Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* **79 Suppl 2**: 18-26.
88. Yang F, Strand DW & Rowley DR (2008). Fibroblast growth factor-2 mediates transforming growth factor-beta action in prostate cancer reactive stroma. *Oncogene* **27**: 450-9.
89. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T & Thun MJ (2008). Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* **58**: 71-96.
90. Krieger JN, Lee SW, Jeon J, Cheah PY, Liong ML & Riley DE (2008). Epidemiology of prostatitis. *Int J Antimicrob Agents* **31 Suppl 1**: S85-90.
91. Wenninger K, Heiman JR, Rothman I, Berghuis JP & Berger RE (1996). Sickness impact of chronic nonbacterial prostatitis and its correlates. *J Urol* **155**: 965-8.
92. Krieger JN, Nyberg L, Jr. & Nickel JC (1999). NIH consensus definition and classification of prostatitis. *Jama* **282**: 236-7.
93. Domingue GJ, Sr. & Hellstrom WJ (1998). Prostatitis. *Clin Microbiol Rev* **11**: 604-13.
94. Krieger JN, Riley DE, Vesella RL, Miner DC, Ross SO & Lange PH (2000). Bacterial dna sequences in prostate tissue from patients with prostate cancer and chronic prostatitis. *J Urol* **164**: 1221-8.
95. Krieger JN & Riley DE (2002). Prostatitis: what is the role of infection. *Int J Antimicrob Agents* **19**: 475-9.
96. Nickel J (2002). Etiology of Prostatitis: What Do We Really Know? En: Nickel JC (Ed.), *The Prostatitis Manual* ed. Blandon Medical Publishing, Oxford, Vol pp. 15-29.
97. Hua VN, Williams DH & Schaeffer AJ (2005). Role of bacteria in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Curr Urol Rep* **6**: 300-6.
98. Seethalakshmi L, Bala RS, Malhotra RK, Austin-Ritchie T, Miller-Graziano C, Menon M & Lubet-Narod J (1996). 17 beta-estradiol induced prostatitis in the rat is an autoimmune disease. *J Urol* **156**: 1838-42.

99. Motrich RD, Maccioni M, Riera CM & Rivero VE (2007). Autoimmune prostatitis: state of the art. *Scand J Immunol* **66**: 217-27.
100. Rivero VE, Motrich RD, Maccioni M & Riera CM (2007). Autoimmune etiology in chronic prostatitis syndrome: an advance in the understanding of this pathology. *Critical reviews in immunology* **27**: 33-46.
101. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB & Nelson WG (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* **7**: 256-69.
102. Kramer G, Mitteregger D & Marberger M (2007). Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? *Eur Urol* **51**: 1202-16.
103. Shoskes DA, Landis JR, Wang Y, Nickel JC, Zeitlin SI & Nadler R (2004). Impact of post-ejaculatory pain in men with category III chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *J Urol* **172**: 542-7.
104. Chung WS, Nehra A, Jacobson DJ, Roberts RO, Rhodes T, Girman CJ, Lieber MM & Jacobsen SJ (2004). Lower urinary tract symptoms and sexual dysfunction in community-dwelling men. *Mayo Clin Proc* **79**: 745-9.
105. Frankel SJ, Donovan JL, Peters TI, Abrams P, Dabhoiwala NF, Osawa D & Lin AT (1998). Sexual dysfunction in men with lower urinary tract symptoms. *Journal of clinical epidemiology* **51**: 677-85.
106. St Sauver JL, Jacobson DJ, McGree ME, Girman CJ, Lieber MM & Jacobsen SJ (2008). Longitudinal association between prostatitis and development of benign prostatic hyperplasia. *Urology* **71**: 475-9; discussion 479.
107. Nickel JC (2008). Inflammation and benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am* **35**: 109-15; vii.
108. Lee KL & Peehl DM (2004). Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* **172**: 1784-91.
109. Steiner GE, Stix U, Handisurya A, Willheim M, Haitel A, Reithmayr F, Paikl D, Ecker RC, Hrachowitz K, Kramer G, Lee C & Marberger M (2003). Cytokine expression pattern in benign prostatic hyperplasia infiltrating T cells and impact of lymphocytic infiltration on cytokine mRNA profile in prostatic tissue. *Lab Invest* **83**: 1131-46.
110. Hennenfent B (1997). Prostatitis and benign prostatic hyperplasia: emerging infectious diseases? *Emerg Infect Dis* **3**: 77-8.
111. Balkwill F & Mantovani A (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* **357**: 539-545.
112. De Marzo AM, Nakai Y & Nelson WG (2007). Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol* **25**: 398-400.
113. Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL & Isaacs WB (2004). The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J Urol* **172**: S6-11; discussion S11-2.
114. Platz EA & De Marzo AM (2004). Epidemiology of inflammation and prostate cancer. *J Urol* **171**: S36-40.

115. Roberts RO, Bergstralh EJ, Bass SE, Lieber MM & Jacobsen SJ (2004). Prostatitis as a risk factor for prostate cancer. *Epidemiology* **15**: 93-9.
116. Bernoulli J, Yarkin E, Laakso A, Anttinen M, Bosland M, Vega K, Kallajoki M, Santti R & Pylkkanen L (2008). Histopathological evidence for an association of inflammation with ductal pin-like lesions but not with ductal adenocarcinoma in the prostate of the noble rat. *Prostate* **68**: 728-39.
117. Okamoto T, Sanda T & Asamitsu K (2007). NF-kappa B signaling and carcinogenesis. *Curr Pharm Des* **13**: 447-62.
118. Tsan MF (2005). Toll-like receptors, inflammation and cancer. *Semin Cancer Biol*
119. Ames BN, Gold LS & Willett WC (1995). The causes and prevention of cancer. *PNAS* **92**: 5258-5265.
120. Coussens LM & Werb Z (2002). Inflammation and cancer. *Nature* **420**: 860-867.
121. de Visser KE, Eichten A & Coussens LM (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* **6**: 24-37.
122. Talmadge JE, Donkor M & Scholar E (2007). Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev* **26**: 373-400.
123. Maini A, Archer C, Wang CY & Haas GP (1997). Comparative pathology of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *In Vivo* **11**: 293-9.
124. Waters DJ, Sakr WA, Hayden DW, Lang CM, McKinney L, Murphy GP, Radinsky R, Ramoner R, Richardson RC & Tindall DJ (1998). Workgroup 4: spontaneous prostate carcinoma in dogs and nonhuman primates. *Prostate* **36**: 64-7.
125. Kassouf W, Brown GA, Shetty A, Hazle JD, Stafford RJ, Rosser CJ, Stephens C, Tinkey PT & Pisters LL (2007). An in vivo orthotopic canine model to evaluate distribution of intraprostatic injectate: implications for gene therapy and drug delivery for prostate cancer. *Urology* **70**: 822-5.
126. Madsen PO & Aagaard J (1991). Pharmacokinetics of quinolone derivatives in the prostate. *Infection* **19 Suppl 3**: S154-6.
127. Baumuller A & Madsen PO (1982). Antimicrobial substances in secretion, interstitial fluid, and tissue of normal and infected canine prostate glands. *Urological research* **10**: 31-5.
128. Nielsen OS, Frimodt-Moeller N, Maigaard S, Hoyme U, Baumuller A & Madsen PO (1980). Penicillanic acid derivatives in the canine prostate. *The Prostate* **1**: 79-85.
129. Neal DE, Jr., Dilworth JP, Kaack MB, Didier P & Roberts JA (1990). Experimental prostatitis in nonhuman primates: II. Ascending acute prostatitis. *Prostate* **17**: 233-9.
130. Nickel JC, Olson ME & Costerton JW (1991). Rat model of experimental bacterial prostatitis. *Infection* **19 Suppl 3**: S126-30.
131. Takechi S, Yokoyama M, Tanji N, Nishio S & Araki N (1999). Nonbacterial prostatitis caused by partial urethral obstruction in the rat. *Urol Res* **27**: 346-50.
132. Naslund MJ, Strandberg JD & Coffey DS (1988). The role of androgens and estrogens in the pathogenesis of experimental nonbacterial prostatitis. *J Urol* **140**: 1049-53.

133. Keetch DW, Humphrey P & Ratliff TL (1994). Development of a mouse model for nonbacterial prostatitis. *J Urol* **152**: 247-50.
134. Diserio GP & Nowotny E (1998). Experimental autoimmune prostatitis: in vivo induction of the autoimmune response to lymphocytic soluble factors. Alterations at the endocrine metabolism level. *Am J Reprod Immunol* **39**: 226-34.
135. Penna G, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Mariani R, Sanvito F, Doglioni C & Adorini L (2006). Treatment of experimental autoimmune prostatitis in nonobese diabetic mice by the vitamin D receptor agonist elocalcitol. *J Immunol* **177**: 8504-11.
136. Rudick CN, Schaeffer AJ & Thumbikat P (2008). Experimental autoimmune prostatitis induces chronic pelvic pain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**: R1268-75.
137. Muntzing J, Sufrin G & Murphy GP (1979). Prostatitis in the rat. *Scand J Urol Nephrol* **13**: 17-22.
138. van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ & Lucia MS (2003). Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* **57**: 205-25.
139. Beutler B (2004). Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* **40**: 845-59.
140. Kimbrell DA & Beutler B (2001). The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* **2**: 256-67.
141. Akira S & Takeda K (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**: 499-511.
142. Medzhitov R (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**: 135-45.
143. Beutler BA (2008). TLRs and innate immunity. *Blood*
144. Tapping RI, Gegner JA, Kravchenko VV & Tobias PS (1998). Roles for LBP and soluble CD14 in cellular uptake of LPS. *Prog Clin Biol Res* **397**: 73-8.
145. Holmskov UL (2000). Collectins and collectin receptors in innate immunity. *APMIS Suppl* **100**: 1-59.
146. Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, Hoffmann PR, Brown KK, Botto M, Walport MJ, Fisher JH, Henson PM & Greene KE (2002). Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol* **169**: 3978-86.
147. Haagsman HP, Hogenkamp A, van Eijk M & Veldhuizen EJ (2008). Surfactant collectins and innate immunity. *Neonatology* **93**: 288-94.
148. Crouch E & Wright JR (2001). Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol* **63**: 521-54.
149. Oberley RE, Goss KL, Dahmouh L, Ault KA, Crouch EC & Snyder JM (2005). A role for surfactant protein D in innate immunity of the human prostate. *The Prostate* **65**: 241-51.

150. Oberley RE, Goss KL, Hoffmann DS, Ault KA, Neff TL, Ramsey KH & Snyder JM (2007). Regulation of surfactant protein D in the mouse female reproductive tract in vivo. *Molecular human reproduction* **13**: 863-8.
151. Wright JR (2005). Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nature reviews* **5**: 58-68.
152. Fleming A (1922). On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **93**: 306–317.
153. Markart P, Faust N, Graf T, Na CL, Weaver TE & Akinbi HT (2004). Comparison of the microbicidal and muramidase activities of mouse lysozyme M and P. *The Biochemical journal* **380**: 385-92.
154. Medzhitov R (2008). The Innate Immune System. En: Paul W (Ed.), *Fundamental Immunology* 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Vol pp. 428-450.
155. Lehrer RI, Lichtenstein AK & Ganz T (1993). Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* **11**: 105-28.
156. Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J & Oppenheim JJ (2004). Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annual review of immunology* **22**: 181-215.
157. Ganz T & Lehrer RI (1997). Antimicrobial peptides of leukocytes. *Current opinion in hematology* **4**: 53-8.
158. Bartlett JA, Fischer AJ & McCray PB, Jr. (2008). Innate immune functions of the airway epithelium. *Contrib Microbiol* **15**: 147-63.
159. Meyer T, Stockfleth E & Christophers E (2007). Immune response profiles in human skin. *Br J Dermatol* **157 Suppl 2**: 1-7.
160. Kufer TA, Banks DJ & Philpott DJ (2006). Innate immune sensing of microbes by Nod proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1072**: 19-27.
161. Philpott DJ, Girardin SE & Sansonetti PJ (2001). Innate immune responses of epithelial cells following infection with bacterial pathogens. *Current opinion in immunology* **13**: 410-6.
162. Fritz JH, Le Bourhis L, Magalhaes JG & Philpott DJ (2008). Innate immune recognition at the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat. *Trends in immunology* **29**: 41-9.
163. Hein M, Valore EV, Helmig RB, Uldbjerg N & Ganz T (2002). Antimicrobial factors in the cervical mucus plug. *Am J Obstet Gynecol* **187**: 137-44.
164. Yang D, Liu ZH, Tewary P, Chen Q, de la Rosa G & Oppenheim JJ (2007). Defensin participation in innate and adaptive immunity. *Curr Pharm Des* **13**: 3131-9.
165. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB, Jr. & Ganz T (1998). Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* **101**: 1633-42.
166. Oberley RE, Goss KL, Ault KA, Crouch EC & Snyder JM (2004). Surfactant protein D is present in the human female reproductive tract and inhibits *Chlamydia trachomatis* infection. *Mol Hum Reprod* **10**: 861-70.

167. Yamada C, Sano H, Shimizu T, Mitsuzawa H, Nishitani C, Himi T & Kuroki Y (2006). Surfactant protein A directly interacts with TLR4 and MD-2 and regulates inflammatory cellular response. Importance of supratrimeric oligomerization. *J Biol Chem* **281**: 21771-80.
168. Diamond G, Beckloff N & Ryan LK (2008). Host Defense Peptides in the Oral Cavity and the Lung: Similarities and Differences. *J Dent Res* **87**: 915-927.
169. Fink J, Steer JH, Joyce DA, McWilliam AS & Stewart GA (2003). Pro-inflammatory effects of *Burkholderia cepacia* on cystic fibrosis respiratory epithelium. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**: 273-82.
170. Muhlebach MS, Reed W & Noah TL (2004). Quantitative cytokine gene expression in CF airway. *Pediatr Pulmonol* **37**: 393-9.
171. Jarry A, Bossard C, Bou-Hanna C, Masson D, Espaze E, Denis MG & Laboisse CL (2008). Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. *J Clin Invest* **118**: 1132-42.
172. Muller B, de Groot EJ, Kortekaas IJ, Fokkens WJ & van Drunen CM (2007). Nasal epithelial cells express IL-10 at levels that negatively correlate with clinical symptoms in patients with house dust mite allergy. *Allergy* **62**: 1014-22.
173. Verajankorva E, Martikainen M & Pollanen P (2001). Cytokines in the BALB/c mouse testis in various conditions. *Asian J Androl* **3**: 9-19.
174. Mukherjee AB, Kundu GC, Mantile-Selvaggi G, Yuan CJ, Mandal AK, Chattopadhyay S, Zheng F, Pattabiraman N & Zhang Z (1999). Uteroglobin: a novel cytokine? *Cell Mol Life Sci* **55**: 771-87.
175. Beier HM (2000). The discovery of uteroglobin and its significance for reproductive biology and endocrinology. *Ann N Y Acad Sci* **923**: 9-24.
176. Dettin L, Rubinstein N, Aoki A, Rabinovich GA & Maldonado CA (2003). Regulated expression and ultrastructural localization of galectin-1, a proapoptotic beta-galactoside-binding lectin, during spermatogenesis in rat testis. *Biol Reprod* **68**: 51-9.
177. Rabinovich GA, Sotomayor CE, Riera CM, Bianco I & Correa SG (2000). Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur J Immunol* **30**: 1331-9.
178. Rabinovich GA (1999). Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ* **6**: 711-21.
179. Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA & Arck PC (2007). A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med* **13**: 1450-7.
180. Rabinovich GA, Liu FT, Hirashima M & Anderson A (2007). An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scandinavian journal of immunology* **66**: 143-58.
181. Schleimer RP, Kato A, Kern R, Kuperman D & Avila PC (2007). Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *The Journal of allergy and clinical immunology* **120**: 1279-84.

182. Willen M, Holst E, Myhre EB & Olsson AM (1996). The bacterial flora of the genitourinary tract in healthy fertile men. *Scand J Urol Nephrol* **30**: 387-93.
183. Montagnini Spaine D, Mamizuka EM, Pereira Cedenho A & Srougi M (2000). Microbiologic aerobic studies on normal male urethra. *Urology* **56**: 207-10.
184. Taylor PW & Morgan HR (1952). Antibacterial substances in human semen and prostatic fluid. *Surgery, gynecology & obstetrics* **94**: 662-8.
185. Hall SH, Hamil KG & French FS (2002). Host defense proteins of the male reproductive tract. *J Androl* **23**: 585-97.
186. Edstrom AM, Malm J, Frohm B, Martellini JA, Giwercman A, Morgelin M, Cole AM & Sorensen OE (2008). The major bactericidal activity of human seminal plasma is zinc-dependent and derived from fragmentation of the semenogelins. *J Immunol* **181**: 3413-21.
187. Malm J, Nordahl EA, Bjartell A, Sorensen OE, Frohm B, Dentener MA & Egesten A (2005). Lipopolysaccharide-binding protein is produced in the epididymis and associated with spermatozoa and prostasomes. *Journal of reproductive immunology* **66**: 33-43.
188. Palladino MA, Johnson TA, Gupta R, Chapman JL & Ojha P (2007). Members of the Toll-like receptor family of innate immunity pattern-recognition receptors are abundant in the male rat reproductive tract. *Biology of reproduction* **76**: 958-64.
189. Girling JE & Hedger MP (2007). Toll-like receptors in the gonads and reproductive tract: emerging roles in reproductive physiology and pathology. *Immunology and cell biology* **85**: 481-9.
190. Mukherjee DC, Agrawal AK, Manjunath R & Mukherjee AB (1983). Suppression of epididymal sperm antigenicity in the rabbit by uteroglobin and transglutaminase in vitro. *Science* **219**: 989-91.
191. Luconi M, Muratori M, Maggi M, Pecchioli P, Peri A, Mancini M, Filimberti E, Forti G & Baldi E (2000). Uteroglobin and transglutaminase modulate human sperm functions. *J Androl* **21**: 676-88.
192. Ellerhorst J, Troncoso P, Xu XC, Lee J & Lotan R (1999). Galectin-1 and galectin-3 expression in human prostate tissue and prostate cancer. *Urol Res* **27**: 362-7.
193. Mahapokai W, van den Ingh TS, van Mil F, van Garderen E, Schalken JA, Mol JA & van Sluijs FJ (2001). Immune response in hormonally-induced prostatic hyperplasia in the dog. *Veterinary immunology and immunopathology* **78**: 297-303.
194. Robinette CL (1988). Sex-hormone-induced inflammation and fibromuscular proliferation in the rat lateral prostate. *Prostate* **12**: 271-86.
195. Harris MT, Feldberg RS, Lau KM, Lazarus NH & Cochrane DE (2000). Expression of proinflammatory genes during estrogen-induced inflammation of the rat prostate. *The Prostate* **44**: 19-25.
196. Mercader M, Bodner BK, Moser MT, Kwon PS, Park ES, Manecke RG, Ellis TM, Wojcik EM, Yang D, Flanigan RC, Waters WB, Kast WM & Kwon ED (2001). T cell infiltration of the prostate induced by androgen withdrawal in patients with prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14565-70.

197. (1985). Laboratory animal welfare: Public Health Service policy on humane care and use of laboratory animals by awardee institutions; notice. Federal register **50**: 19584-5.
198. Fulmer BR & Turner TT (1999). Effect of inflammation on prostatic protein synthesis and luminal secretion in vivo. J Urol **162**: 248-53.
199. Motrich RD, Mackern-Oberti JP, Maccioni M & Rivero VE (2008). Effects of autoimmunity to the prostate on the fertility of the male rat. Fertil Steril
200. Takeda K, Kaisho T & Akira S (2003). Toll-like receptors. Annu Rev Immunol **21**: 335-76.
201. Kaisho T & Akira S (2003). Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. Curr Mol Med **3**: 373-85.
202. Diamond G, Legarda D & Ryan LK (2000). The innate immune response of the respiratory epithelium. Immunol Rev **173**: 27-38.
203. Sun XJ, Wang DN, Zhang WJ & Wu XF (2004). Expression of an antimicrobial peptide identified in the male reproductive system of rats. Mol Biotechnol **28**: 185-9.
204. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA & Shen L (2005). Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. Immunol Rev **206**: 306-35.
205. Samuelsson P, Hang L, Wullt B, Irjala H & Svanborg C (2004). Toll-like receptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa. Infect Immun **72**: 3179-86.
206. Jalkanen J, Huhtaniemi I & Poutanen M (2005). Discovery and characterization of new epididymis-specific beta-defensins in mice. Biochim Biophys Acta **1730**: 22-30.
207. Rao J, Herr JC, Reddi PP, Wolkowicz MJ, Bush LA, Sherman NE, Black M & Flickinger CJ (2003). Cloning and characterization of a novel sperm-associated isoantigen (E-3) with defensin- and lectin-like motifs expressed in rat epididymis. Biol Reprod **68**: 290-301.
208. Grandjean V, Vincent S, Martin L, Rassoulzadegan M & Cuzin F (1997). Antimicrobial protection of the mouse testis: synthesis of defensins of the cryptdin family. Biol Reprod **57**: 1115-22.
209. Palladino MA, Mallonga TA & Mishra MS (2003). Messenger RNA (mRNA) expression for the antimicrobial peptides beta-defensin-1 and beta-defensin-2 in the male rat reproductive tract: beta-defensin-1 mRNA in initial segment and caput epididymidis is regulated by androgens and not bacterial lipopolysaccharides. Biol Reprod **68**: 509-15.
210. von Horsten HH, Derr P & Kirchhoff C (2002). Novel antimicrobial peptide of human epididymal duct origin. Biol Reprod **67**: 804-13.
211. Com E, Bourgeon F, Evrard B, Ganz T, Collet D, Jegou B & Pineau C (2003). Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans. Biol Reprod **68**: 95-104.
212. Sang Y, Ortega MT, Blecha F, Prakash O & Melgarejo T (2005). Molecular cloning and characterization of three beta-defensins from canine testes. Infect Immun **73**: 2611-20.
213. Song PI, Abraham TA, Park Y, Zivony AS, Harten B, Edelhauser HF, Ward SL, Armstrong CA & Ansel JC (2001). The Expression of Functional LPS Receptor Proteins CD14

And Toll-Like Receptor 4 in Human Corneal Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**: 2867-2877.

214. Uehara A, Sugawara S & Takada H (2002). Priming of human oral epithelial cells by interferon-gamma to secrete cytokines in response to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans. *J Med Microbiol* **51**: 626-34.

215. MacRedmond R, Greene C, Taggart C, McElvaney N & O'Neill S (2005). Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of human beta-defensin 2 by lipopolysaccharide. *Respir Res* **6**: 116.

216. Hornef MW, Normark BH, Vandewalle A & Normark S (2003). Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* **198**: 1225-35.

217. Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M & Miyake K (2000). Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* **164**: 3471-5.

218. Beg AA (2002). Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* **23**: 509-12.

219. Park JY, Yoshimura Y, Nozawa S, Umeda T, Akihama S & Matsuda Y (1997). Fibrinogen-like substance and thrombin-like enzyme in seminal plasma: coagulation system of human semen. *Arch Androl* **38**: 29-36.

220. Laudat A, Guechot J, Foucault P, Giboudeau J & Palluel AM (1997). Fibronectin and hyaluronic acid in seminal fluid: relationship with sperm count and percentage of typical forms. *Pathol Biol (Paris)* **45**: 462-6.

221. Nelson G, Culberson DE & Gardner WA, Jr. (1988). Intraprostatic spermatozoa. *Hum Pathol* **19**: 541-4.

222. Gatti G, Rivero V, Motrich RD & Maccioni M (2006). Prostate epithelial cells can act as early sensors of infection by up-regulating TLR4 expression and proinflammatory mediators upon LPS stimulation. *J Leukoc Biol* **79**: 989-98.

223. Mackern-Oberti JP, Maccioni M, Cuffini C, Gatti G & Rivero VE (2006). Susceptibility of prostate epithelial cells to *Chlamydia muridarum* infection and their role in innate immunity by recruitment of intracellular Toll-like receptors 4 and 2 and MyD88 to the inclusion. *Infect Immun* **74**: 6973-81.

224. Pei Z, Lin D, Song X, Li H & Yao H (2008). TLR4 signaling promotes the expression of VEGF and TGFbeta1 in human prostate epithelial PC3 cells induced by lipopolysaccharide. *Cell Immunol* **254**: 20-7.

225. Takeyama K, Mitsuzawa H, Shimizu T, Konishi M, Nishitani C, Sano H, Kunishima Y, Matsukawa M, Takahashi S, Shibata K, Tsukamoto T & Kuroki Y (2006). Prostate cell lines secrete IL-8 in response to mycoplasma hominis through Toll-like receptor 2-mediated mechanism. *Prostate* **66**: 386-91.

226. Ganz T (2004). Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biol* **327**: 539-49.

227. Lawson PR & Reid KB (2000). The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity. *Immunol Rev* **173**: 66-78.

228. Oberley RE, Goss KL, Quintar AA, Maldonado CA & Snyder JM (2007). Regulation of surfactant protein D in the rodent prostate. *Reprod Biol Endocrinol* **5**: 42.
229. Peehl DM (2005). Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer* **12**: 19-47.
230. Gerdes MJ, Larsen M, Dang TD, Ressler SJ, Tuxhorn JA & Rowley DR (2004). Regulation of rat prostate stromal cell myodifferentiation by androgen and TGF-beta1. *Prostate* **58**: 299-307.
231. Kirby RS, Lowe D, Bultitude MI & Shuttleworth KE (1982). Intra-prostatic urinary reflux: an aetiological factor in abacterial prostatitis. *Br J Urol* **54**: 729-31.
232. Persson BE & Ronquist G (1996). Evidence for a mechanistic association between nonbacterial prostatitis and levels of urate and creatinine in expressed prostatic secretion. *J Urol* **155**: 958-60.
233. Ceri H, Schmidt S, Olson ME, Nickel JC & Benediktsson H (1999). Specific mucosal immunity in the pathophysiology of bacterial prostatitis in a rat model. *Can J Microbiol* **45**: 849-55.
234. Latz E, Visintin A, Lien E, Fitzgerald KA, Espevik T & Golenbock DT (2003). The LPS receptor generates inflammatory signals from the cell surface. *J Endotoxin Res* **9**: 375-80.
235. Latz E, Visintin A, Lien E, Fitzgerald KA, Monks BG, Kurt-Jones EA, Golenbock DT & Espevik T (2002). Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol Chem* **277**: 47834-43.
236. Ghosh S, May MJ & Kopp EB (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**: 225-60.
237. Ghosh S & Hayden MS (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* **8**: 837-48.
238. Suh J & Rabson AB (2004). NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem* **91**: 100-17.
239. Haverkamp J, Charbonneau B & Ratliff TL (2008). Prostate inflammation and its potential impact on prostate cancer: a current review. *J Cell Biochem* **103**: 1344-53.
240. Murray E, Khamri W, Walker MM, Eggleton P, Moran AP, Ferris JA, Knapp S, Karim QN, Worku M, Strong P, Reid KB & Thursz MR (2002). Expression of surfactant protein D in the human gastric mucosa and during *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun* **70**: 1481-7.
241. Atochina EN, Beck JM, Scanlon ST, Preston AM & Beers MF (2001). *Pneumocystis carinii* pneumonia alters expression and distribution of lung collectins SP-A and SP-D. *J Lab Clin Med* **137**: 429-39.
242. Fisher JH, Larson J, Cool C & Dow SW (2002). Lymphocyte activation in the lungs of SP-D null mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**: 24-33.
243. McIntosh JC, Swyers AH, Fisher JH & Wright JR (1996). Surfactant proteins A and D increase in response to intratracheal lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**: 509-19.

244. Fujita M, Shannon JM, Ouchi H, Voelker DR, Nakanishi Y & Mason RJ (2005). Serum surfactant protein D is increased in acute and chronic inflammation in mice. *Cytokine* **31**: 25-33.
245. Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P & Forssmann WG (1995). hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* **368**: 331-5.
246. Yenugu S, Hamil KG, French FS & Hall SH (2004). Antimicrobial actions of the human epididymis 2 (HE2) protein isoforms, HE2alpha, HE2beta1 and HE2beta2. *Reprod Biol Endocrinol* **2**: 61.
247. Hall SH, Yenugu S, Radhakrishnan Y, Avellar MC, Petrusz P & French FS (2007). Characterization and functions of beta defensins in the epididymis. *Asian J Androl* **9**: 453-62.
248. Donald CD, Sun CQ, Lim SD, Macoska J, Cohen C, Amin MB, Young AN, Ganz TA, Marshall FF & Petros JA (2003). Cancer-specific loss of beta-defensin 1 in renal and prostatic carcinomas. *Lab Invest* **83**: 501-5.
249. Bullard RS, Gibson W, Bose SK, Belgrave JK, Eaddy AC, Wright CJ, Hazen-Martin DJ, Lage JM, Keane TE, Ganz TA & Donald CD (2008). Functional analysis of the host defense peptide Human Beta Defensin-1: new insight into its potential role in cancer. *Mol Immunol* **45**: 839-48.
250. Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE & Galand P (1991). Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* **138**: 447-53.
251. Fulmer BR & Turner TT (2000). A blood-prostate barrier restricts cell and molecular movement across the rat ventral prostate epithelium. *J Urol* **163**: 1591-4.
252. De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, Luo J, Nakayama M, Platz EA, Isaacs WB & Nelson WG (2003). Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology* **62**: 55-62.
253. Henson PM (2005). Dampening inflammation. *Nat Immunol* **6**: 1179-81.
254. McGillivray G & Bakaletz LO (2008). Innate immune defenses: Finding a new way to calm the storm. *Immunol Cell Biol* **86**: 639-40.
255. Serhan CN & Savill J (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* **6**: 1191-7.
256. Han J & Ulevitch RJ (2005). Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat Immunol* **6**: 1198-205.
257. Whitmore WF & Gittes RF (1977). Studies on the prostate and testis as immunologically privileged sites. *Cancer Treat Rep* **61**: 217-22.
258. Dostal J, Veselsky L, Drahorad J & Jonakova V (1995). Immunosuppressive effect induced by intraperitoneal and rectal administration of boar seminal immunosuppressive factor. *Biol Reprod* **52**: 1209-14.
259. Kelly RW & Critchley HO (1997). Immunomodulation by human seminal plasma: a benefit for spermatozoon and pathogen? *Hum Reprod* **12**: 2200-7.

260. Muller-Schottle F, Classen-Linke I, Alfer J, Krusche C, Beier-Hellwig K, Sterzik K & Beier HM (1999). Expression of uteroglobin in the human endometrium. *Mol Hum Reprod* **5**: 1155-61.
261. Rabinovich GA, Riera CM, Landa CA & Sotomayor CE (1999). Galectins: a key intersection between glycobiology and immunology. *Braz J Med Biol Res* **32**: 383-93.
262. Manyak MJ, Kikukawa T & Mukherjee AB (1988). Expression of a uteroglobin-like protein in human prostate. *J Urol* **140**: 176-82.
263. Beier HM (1968). Uteroglobin: a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochim Biophys Acta* **160**: 289-91.
264. Patierno SR, Manyak MJ, Fernandez PM, Baker A, Weeraratna AT, Chou DS, Szlyk G, Geib KS, Walsh C & Patteras J (2002). Uteroglobin: a potential novel tumor suppressor and molecular therapeutic for prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* **1**: 118-24.
265. Aoki A, Pasolli HA, Raida M, Meyer M, Schulz-Knappe P, Mostafavi H, Schepky AG, Znotka R, Elia J, Hock D, Beier HM & Forssmann WG (1996). Isolation of human uteroglobin from blood filtrate. *Mol Hum Reprod* **2**: 489-97.
266. Quintar AA, Mukdsi JH, del Valle Bonaterra M, Aoki A, Maldonado CA & Perez Alzaa J (2008). Increased expression of uteroglobin associated with tubal inflammation and ectopic pregnancy. *Fertil Steril* **89**: 1613-7.
267. Roth FD, Quintar AA, Uribe Echevarria EM, Torres AI, Aoki A & Maldonado CA (2007). Budesonide effects on Clara cell under normal and allergic inflammatory condition. *Histochem Cell Biol* **127**: 55-68.
268. Yao XL, Levine SJ, Cowan MJ, Logun C & Shelhamer JH (1998). Tumor Necrosis Factor-alpha Stimulates Human Clara Cell Secretory Protein Production by Human Airway Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19**: 629-635.
269. Fransson M, Adner M, Uddman R & Cardell LO (2007). Lipopolysaccharide-induced down-regulation of uteroglobin in the human nose. *Acta Otolaryngol* **127**: 285-91.
270. Arsalane K, Broeckaert F, Knoops B, Wiedig M, Toubeau G & Bernard A (2000). Clara cell specific protein (CC16) expression after acute lung inflammation induced by intratracheal lipopolysaccharide administration. *Am J Respir Crit Care Med* **161**: 1624-30.
271. Yang RY, Rabinovich GA & Liu FT (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* **10**: e17.
272. Rabinovich GA, Gabrilovich D & Sotomayor EM (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* **25**: 267-96.
273. Rabinovich GA (2005). Galectin-1 as a potential cancer target. *Br J Cancer* **92**: 1188-92.
274. Nickel JC, True LD, Krieger JN, Berger RE, Boag AH & Young ID (2001). Consensus development of a histopathological classification system for chronic prostatic inflammation. *BJU international* **87**: 797-805.
275. Nickel JC, Alexander RB, Schaeffer AJ, Landis JR, Knauss JS & Probert KJ (2003). Leukocytes and bacteria in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome compared to asymptomatic controls. *The Journal of urology* **170**: 818-22.

276. Nickel JC, Olson ME, Barabas A, Benediktsson H, Dasgupta MK & Costerton JW (1990). Pathogenesis of chronic bacterial prostatitis in an animal model. *British journal of urology* **66**: 47-54.
277. Elkahwaji JE, Zhong W, Hopkins WJ & Bushman W (2007). Chronic bacterial infection and inflammation incite reactive hyperplasia in a mouse model of chronic prostatitis. *The Prostate* **67**: 14-21.
278. Kessler OJ, Keisari Y, Servadio C & Abramovici A (1998). Role of chronic inflammation in the promotion of prostatic hyperplasia in rats. *J Urol* **159**: 1049-53.
279. Hochreiter WW, Nadler RB, Koch AE, Campbell PL, Ludwig M, Weidner W & Schaeffer AJ (2000). Evaluation of the cytokines interleukin 8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 as indicators of inflammation in prostatic secretions. *Urology* **56**: 1025-9.
280. Alexander RB, Ponniah S, Hasday J & Hebel JR (1998). Elevated levels of proinflammatory cytokines in the semen of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Urology* **52**: 744-9.
281. Zdrodowska-Stefanow B, Ostaszewska-Puchalska I, Badyda J & Galewska Z (2008). The evaluation of markers of prostatic inflammation and function of the prostate gland in patients with chronic prostatitis. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* **56**: 277-82.
282. Chen J, Zhao HF & Xu ZS (2007). The prostate has secretory dysfunction for category IIIA and IIIB prostatitis. *The Journal of urology* **177**: 2166-9; discussion 2169.
283. Kim JM, Eckmann L, Savidge TC, Lowe DC, Witthoft T & Kagnoff MF (1998). Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *J Clin Invest* **102**: 1815-23.
284. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P & Zychlinsky A (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* **285**: 736-9.
285. Bacher M, Rausch U, Goebel HW, Polzar B, Mannherz HG & Aumuller G (1993). Stromal and epithelial cells from rat ventral prostate during androgen deprivation and estrogen treatment--regulation of transcription. *Experimental and clinical endocrinology* **101**: 78-86.
286. Chung LW (1995). The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. *Cancer Surv* **23**: 33-42.
287. Chung LW & Davies R (1996). Prostate epithelial differentiation is dictated by its surrounding stroma. *Molecular biology reports* **23**: 13-9.
288. Chung LW, Huang WC, Sung SY, Wu D, Otero-Marah V, Nomura T, Shigemura K, Miyagi T, Seo S, Shi C, Moliterno J, Elmore J, Anderson C, Isotani S, Edlund M, Hsieh CL, Wang R, Shehata B & Zhau HE (2006). Stromal-epithelial interaction in prostate cancer progression. *Clinical genitourinary cancer* **5**: 162-70.
289. Farnsworth WE (1999). Prostate stroma: physiology. *Prostate* **38**: 60-72.
290. Tomas D & Kruslin B (2004). The potential value of (Myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. *Prostate* **61**: 324-31.

291. Tuxhorn JA, Ayala GE & Rowley DR (2001). Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* **166**: 2472-83.
292. Zechmann CM, Woenne EC, Brix G, Radzwill N, Ilg M, Bachert P, Peschke P, Kirsch S, Kauczor HU, Delorme S, Semmler W & Kiessling F (2007). Impact of stroma on the growth, microcirculation, and metabolism of experimental prostate tumors. *Neoplasia* **9**: 57-67.
293. Antonioli E, Della-Colleta HH & Carvalho HF (2004). Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. *J Androl* **25**: 50-6.
294. Aumuller G, Funke PJ, Hahn A, Hoffbauer G, Tunn U & Neumann F (1982). Phenotypic modulation of the canine prostate after long-term treatment with androgens and estrogens. *Prostate* **3**: 361-73.
295. Schauer IG, Ressler SJ, Tuxhorn JA, Dang TD & Rowley DR (2008). Elevated epithelial expression of interleukin-8 correlates with myofibroblast reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Urology* **72**: 205-13.
296. Singer CA, Salinthon S, Baker KJ & Gerthoffer WT (2004). Synthesis of immune modulators by smooth muscles. *Bioessays* **26**: 646-55.
297. Watari M, Watari H, Nachamkin I & Strauss JF (2000). Lipopolysaccharide induces expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines and the elastin-degrading enzyme, cathepsin S, in human cervical smooth-muscle cells. *J Soc Gynecol Investig* **7**: 190-8.
298. Morris GE, Whyte MK, Martin GF, Jose PJ, Dower SK & Sabroe I (2005). Agonists of Toll-like Receptors 2 and 4 Activate Airway Smooth Muscle via Mononuclear Leukocytes. *Am J Respir Crit Care Med* **171**: 814-22.
299. Yang X, Coriolan D, Murthy V, Schultz K, Golenbock DT & Beasley D (2005). Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: role of efficient Toll-like receptor 4 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**: H1069-76.
300. Loppnow H, Werdan K & Buerke M (2008). Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine- and innate-immunity-related inflammatory mechanisms. *Innate Immun* **14**: 63-87.
301. Chen YC, Giovannucci E, Lazarus R, Kraft P, Ketkar S & Hunter DJ (2005). Sequence variants of Toll-like receptor 4 and susceptibility to prostate cancer. *Cancer Res* **65**: 11771-8.
302. Eyden B (2007). The myofibroblast: a study of normal, reactive and neoplastic tissues, with an emphasis on ultrastructure. *J Submicrosc Cytol Pathol* **7**: 166.
303. Eyden B, Banerjee SS, Shenjere P & Fisher C (2008). The myofibroblast and its tumours: a review. *J Clin Pathol*
304. Sheffer Y, Leon O, Pinthus JH, Nagler A, Mor Y, Genin O, Iluz M, Kawada N, Yoshizato K & Pines M (2007). Inhibition of fibroblast to myofibroblast transition by halofuginone contributes to the chemotherapy-mediated antitumoral effect. *Mol Cancer Ther* **6**: 570-7.
305. Danielpour D (2005). Functions and regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) in the prostate. *Eur J Cancer* **41**: 846-57.
306. Pekny M & Lane EB (2007). Intermediate filaments and stress. *Exp Cell Res* **313**: 2244-54.

307. Mor-Vaknin N, Punturieri A, Sitwala K & Markovitz DM (2003). Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat Cell Biol* **5**: 59-63.
308. Xu B, deWaal RM, Mor-Vaknin N, Hibbard C, Markovitz DM & Kahn ML (2004). The endothelial cell-specific antibody PAL-E identifies a secreted form of vimentin in the blood vasculature. *Mol Cell Biol* **24**: 9198-206.
309. Shidaifat F, Daradka M & Al-Omari R (2004). Effect of androgen ablation on prostatic cell differentiation in dogs. *Endocr Res* **30**: 327-34.
310. English HF, Santen RJ & Isaacs JT (1987). Response of glandular versus basal rat ventral prostatic epithelial cells to androgen withdrawal and replacement. *Prostate* **11**: 229-42.
311. Janulis L, Nemeth JA, Yang T, Lang S & Lee C (2000). Prostatic luminal cell differentiation and prostatic steroid-binding protein (PBP) gene expression are differentially affected by neonatal castration. *Prostate* **43**: 195-204.
312. Heyns W, Van Damme B & De Moor P (1978). Secretion of prostatic binding protein by rat ventral prostate: influence of age and androgen. *Endocrinology* **103**: 1090-5.
313. Gray CA, Adelson DL, Bazer FW, Burghardt RC, Meeusen EN & Spencer TE (2004). Discovery and characterization of an epithelial-specific galectin in the endometrium that forms crystals in the trophectoderm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7982-7.
314. Choe YS, Shim C, Choi D, Lee CS, Lee KK & Kim K (1997). Expression of galectin-1 mRNA in the mouse uterus is under the control of ovarian steroids during blastocyst implantation. *Mol Reprod Dev* **48**: 261-6.
315. Than NG, Romero R, Erez O, Weckle A, Tarca AL, Hotra J, Abbas A, Han YM, Kim SS, Kusanovic JP, Gotsch F, Hou Z, Santolaya-Forgas J, Benirschke K, Papp Z, Grossman LI, Goodman M & Wildman DE (2008). Emergence of hormonal and redox regulation of galectin-1 in placental mammals: implication in maternal-fetal immune tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15819-24.
316. Olsen NJ & Kovacs WJ (1996). Gonadal steroids and immunity. *Endocr Rev* **17**: 369-84.
317. Ahmed SA & Talal N (1990). Sex hormones and the immune system--Part 2. Animal data. *Baillieres Clin Rheumatol* **4**: 13-31.
318. Blazkovec AA, Orsini MW & Maginn PC (1973). Sexual dimorphism in the primary immune response of the Syrian hamster. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **44**: 274-93.
319. Chao TC (1996). Female sex hormones and the immune system. *Changcheng Yi Xue Za Zhi* **19**: 95-106.
320. Druckmann R (2001). Review: female sex hormones, autoimmune diseases and immune response. *Gynecol Endocrinol* **15 Suppl 6**: 69-76.
321. Bouman A, Heineman MJ & Faas MM (2005). Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update* **11**: 411-23.
322. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B & Straub RH (2004). Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus* **13**: 635-8.

323. Marriott I & Huet-Hudson YM (2006). Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. *Immunol Res* **34**: 177-92.
324. Kaplan L, Lee C & Schaeffer AJ (1983). Effect of castration on experimental bacterial prostatitis in rats. *Prostate* **4**: 625-30.
325. Seo SI, Lee SJ, Kim JC, Choi YJ, Sw SW, Hwang TK & Cho YH (2003). Effects of androgen deprivation on chronic bacterial prostatitis in a rat model. *Int J Urol* **10**: 485-91.
326. Deitch EA, Ananthkrishnan P, Cohen DB, Xu da Z, Feketeova E & Hauser CJ (2006). Neutrophil activation is modulated by sex hormones after trauma-hemorrhagic shock and burn injuries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**: H1456-65.
327. Razmara A, Krause DN & Duckles SP (2005). Testosterone augments endotoxin-mediated cerebrovascular inflammation in male rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**: H1843-50.
328. Nunn CL, Lindenfors P, Pursall ER & Rolff J (2009). On sexual dimorphism in immune function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**: 61-9.
329. Spinedi E, Gaillard RC & Chisari A (2002). Sexual dimorphism of neuroendocrine-immune interactions. *Front Horm Res* **29**: 91-107.
330. Cuesta A, Vargas-Chacoff L, Garcia-Lopez A, Arjona FJ, Martinez-Rodriguez G, Meseguer J, Mancera JM & Esteban MA (2007). Effect of sex-steroid hormones, testosterone and estradiol, on humoral immune parameters of gilthead seabream. *Fish Shellfish Immunol* **23**: 693-700.
331. Desai KV, Michalowska AM, Kondaiah P, Ward JM, Shih JH & Green JE (2004). Gene expression profiling identifies a unique androgen-mediated inflammatory/immune signature and a PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)-mediated apoptotic response specific to the rat ventral prostate. *Mol Endocrinol* **18**: 2895-907.

APÉNDICE

Parte de los resultados del presente trabajo de tesis doctoral fueron publicados y presentados en diferentes reuniones científicas locales, nacionales e internacionales.

PUBLICACIONES

Quintar AA, Roth FD, De Paul AL, Aoki A, Maldonado CA. Toll-Like Receptor 4 in Rat Prostate: Modulation by Testosterone and Acute Bacterial Infection in Epithelial and Stromal Cells. *Biol Reprod* 75:664-72; 2006

Oberley R, Goss K, Quintar A, Maldonado C, Snyder J. Regulation of surfactant protein D in the rodent prostate. *Reprod Biol Endocrinol* 5:42, 2007

COMUNICACIONES EN CONGRESOS

Quintar A, Aoki A, Maccioni M & Maldonado C: “Expresión de Prostatic Binding Protein en prostatitis bacteriana aguda”. PÓSTER. XIV JORNADAS CIENTÍFICAS DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CÓRDOBA. Villa General Belgrano. Córdoba, agosto de 2003.

Quintar A, Aoki A, Maccioni M & Maldonado C: “Modulación de Prostatic Binding Protein por infección bacteriana aguda”. COMUNICACIÓN ORAL. IV CONGRESO ARGENTINO DE ANDROLOGÍA. Mar del Plata, septiembre de 2003.

Quintar A, Aoki A, Maccioni M & Maldonado C: “Expresión de Prostatic Binding Protein en prostatitis bacteriana aguda”. COMUNICACIÓN ORAL. REUNIÓN DE LA SOCIEDAD DE UROLOGÍA DE CORDOBA. Córdoba, octubre de 2003.

Quintar A, Aoki A, Maccioni M & Maldonado C: “Expresión de Prostatic Binding Protein en prostatitis bacteriana aguda”. POSTER. IV JORNADAS DE INVESTIGACION CIENTÍFICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS UNC. Córdoba, diciembre de 2003.

Quintar A, Aoki A & Maldonado C: “Early defensive mechanisms of rat prostate exposed by bacterial infection”. POSTER. XII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOLOGÍA CELULAR Y IX CONGRESSO DA SOCIEDADE IBEROAMERICANA DE BIOLOGIA CELULAR. Campinas- SP, Brasil, julio de 2004.

Quintar A, Aoki A & Maldonado C: “Modulación androgénica y bacteriana de moléculas anti-inflamatorias en la próstata”. COMUNICACIÓN ORAL. V

CONGRESO DE LA FEDERACIÓN ARGENTINA DE SOCIEDADES DE ENDOCRINOLOGÍA. Córdoba, noviembre de 2004.

Quintar A, De Paul A, Aoki A & Maldonado C: “Expresión epitelial de Toll-Like Receptor 4 (TLR4) en próstata ventral de rata”. POSTER. CONGRESO CONJUNTO DE SOCIEDADES BIOMÉDICAS. Mar del Plata, noviembre de 2004.

Quintar A, Aoki A & Maldonado C: “Mecanismos defensivos tempranos de la próstata de rata frente a infección bacteriana”. POSTER. V JORNADAS DE INVESTIGACION CIENTÍFICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS UNC. Córdoba, diciembre de 2004.

Quintar A, Doll A, Aoki A & Maldonado CA: “Análisis comparativo de la reacción estromal prostática inducida por castración e inflamación”. COMUNICACIÓN ORAL. XV JORNADAS CIENTÍFICAS DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CÓRDOBA. Villa Giardino. Córdoba, Agosto 2005.

Quintar A, Aoki A & Maldonado CA: “Immunohistochemical localization of Toll-like receptor 4(TLR4) in human prostate”. POSTER. VII LATIN AMERICAN CONGRESS OF IMMUNOLOGY. Córdoba. ARGENTINA, octubre de 2005.

Quintar A, Doll A, Aoki A & Maldonado CA: “Defense mechanisms of the prostate epithelium in an experimental bacterial prostatitis”. POSTER. VII LATIN AMERICAN CONGRESS OF IMMUNOLOGY. Córdoba. ARGENTINA, octubre de 2005.

Quintar A, Doll A, Roth F, Aoki A & Maldonado CA: “Inmunidad innata en la glándula prostática: evidencias de un trascendente rol epitelial en la respuesta frente a bacterias”. POSTER. 50° REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA (SAIC). Mar del Plata. Argentina, diciembre de 2005.

Quintar A, Doll A, Aoki A & Maldonado CA: “Los andrógenos favorecen la expresión de moléculas de defensa con perfil inmunosupresor en el epitelio prostático”. POSTER. REUNIÓN ANUAL DE TRABAJOS CIENTÍFICOS DE LA SOCIEDAD DE ENDOCRINOLOGÍA Y METABOLISMO DE CÓRDOBA (SEMCO). Córdoba, diciembre de 2005.

Quintar A, Leimgruber C, Roth F, Aoki A & Maldonado CA: “Traslocación nuclear de NF-kB en epitelio prostático en prostatitis experimental”. COMUNICACIÓN ORAL: LIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI) – LI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, 8 al 11 de noviembre de 2006

Quintar AA, Leimgruber C, Roth FD, Oberley R, Aoki A & Maldonado CA. “Assessment of the innate immunity in the prostate gland challenged to bacterial

infection”. 13th International Congress of Immunology. Rio de Janeiro. Brasil, agosto de 2007.

Quintar AA, Leimgruber C & Maldonado CA: “E. coli provoca estimulación del epitelio prostático independientemente del estatus androgénico”. COMUNICACIÓN ORAL. XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. Córdoba, Argentina, mayo de 2008.

Quintar AA, Leimgruber C & Maldonado CA: “Testosterona exacerba la respuesta inflamatoria de la glándula prostática en un modelo de prostatitis bacteriana”. COMUNICACIÓN ORAL. LVI Reunion Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología. La Falda, Argentina, octubre de 2008.

Evaluación de la inmunidad innata en la próstata desafiada con infección bacteriana. Quintar AA, Leimgruber C, Roth F, Oberley R, Aoki A, Maldonado CA. POSTER. 9° JORNADAS DE INVESTIGACION CIENTÍFICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS UNC. Córdoba, diciembre de 2008.

El presente trabajo de investigación se ha realizado en el Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, de acuerdo a la reglamentación vigente en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, para optar por el título de Doctor en Medicina y Cirugía.

Durante la ejecución, el autor fue becario de la Fundación Florencio Fiorini (2004) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, 2005-2009). Asimismo, contó con el apoyo financiero de subsidios del FONCyT, CONICET, SECyT y Agencia Córdoba Ciencia, otorgados al Centro de Microscopía Electrónica.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS EMPLEADOS

Unidades

μm = micrómetro

g = gramo

g= gravedad

h = hora

kDa= kilodalton

M = molar

mg/l = miligramo/litro

min = minuto/s

ml = mililitro

°C = grados centígrados

s = segundo/s

Proteínas, citocinas, mediadores y factores de crecimiento

BPI = *bactericidal permeability-increasing protein* = proteína bactericida

CD = *cluster of differentiation* = grupo de diferenciación

EGF= *epidermal growth factor* = factor de crecimiento epidérmico

FGF = *fibroblastic growth factor* = factor de crecimiento fibroblástico

fMLP-R = *Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine receptor* = receptor de fMLP

Gal-1 = galectina 1

GCP= *Granulocyte chemotactic peptide* = péptido quimiotáctico de granulocitos

IFN= interferón

Ig = inmunoglobulina

IGF= *insulin growth factor* =factor de crecimiento tipo insulina

IL= interleucina

LPS= lipopolisacárido

MD-2 = *myeloid differentiation-2* = diferenciación mieloide

MIG = *monokine induced by interferon gamma* = monocina inducida por interferon γ

NF- κ B = *nuclear factor kappa B* = factor nuclear kappa B

NOD = *nucleotide-binding oligomerization domain* = dominio de oligomerización a nucleotidos

PBP = *prostatic binding protein* = proteína prostática fijadora

PLA₂ = fosfolipasa A2

ROS = *reactive oxygen species* = especies reactivas de oxígeno

SP = *surfactant protein* = proteína surfactante

TGF = *transforming growth factor* = factor de crecimiento transformante

TLR = *toll-like receptor* = receptor tipo toll

TNF = *tumor necrosis factor* = factor de necrosis tumoral

UG = uteroglobina

VIM = vimentina

αSMA = *smooth muscle alpha actin* = actina alfa de músculo liso

Otros

a. C. = antes de Cristo

ADN = ácido desoxirribonucleico

ARNm = ácido ribonucleico mensajero

NK = *natural killer*

CP/CPPS = prostatitis crónica/ síndrome pélvico doloroso crónico

d.C. = después de Cristo

DAB = diaminobencidina

et al = *et alii* = y otros

HE = hematoxilina-eosina

PBS = tampón fosfato salino

PBS-BSA = tampón fosfato salino/albúmina bovina

PMNN = poliformonucleares neutrófilos

SDS = dodecil sulfato de sodio

Th1 = T *helper* 1

Th2 = T *helper* 2