

# Autoanticuerpos séricos en pacientes con prostatitis crónica/ síndrome de dolor pélvico crónico

Paola Virginia Ferrero<sup>1</sup>, Rubén Darío Motrich<sup>2</sup>, Virginia Elena Rivero<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología, Hospital Nacional de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

## **AUTOANTIBODIES IN SERUM OF PATIENTS WITH CHRONIC PROSTATITIS/CHRONIC PELVIC PAIN SYNDROME**

Recibido: 14 Octubre 2008

Aceptado: 19 Noviembre 2008

### RESUMEN

**Introducción:** La prostatitis crónica/síndrome de dolor pélvico crónico (CP/CPPS) se presenta como una inflamación de la próstata sin evidencia de infección del tracto urinario. Algunos autores postulan a la respuesta autoinmune como causa de esta patología. Aunque se ha demostrado la presencia de respuesta inmune celular específica contra antígenos prostáticos, poco se conoce acerca de la respuesta inmune humoral. Es por ello que decidimos estudiar la presencia de autoanticuerpos séricos específicos de antígenos prostáticos, expresados en la línea celular prostática humana DU-145, y de otros autoanticuerpos séricos marcadores de diferentes patologías autoinmunes en un grupo de pacientes con diagnóstico clínico de CP/CPPS.

**Materiales y métodos:** Se estudiaron 25 pacientes con CP/CPPS y 13 controles normales a los que se les realizó la determinación de anticuerpos anti-células DU-145, Factor Reumatoideo, anticuerpos anti-Tiroperoxidasa, anti-Tirotoglobulina, anti-células de los islotes, anti-nucleares, anti-mitochondriales, anti-músculo liso, anti-microsomas de hígado y riñón, y anti-células parietales a partir de muestras de suero.

**Resultados:** no hubo diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles para los anticuerpos anti-DU-145 ( $p=0,71$ ). Factor Reumatoideo fue positivo en 36% de los pacientes y en 0% de los controles ( $p=0,016$ ). Anticuerpos anti-Tiroperoxidasa se detectaron en 3 pacientes y en ningún control normal ( $p=0,54$ ). Un paciente y 1 control normal presentaron anticuerpos anti-células de los islotes pancreáticos ( $p=0,99$ ). Para los demás auto-anticuerpos ensayados ni pacientes ni controles normales arrojaron resultados positivos.

**Conclusión:** Estos resultados demuestran una asociación entre un marcador inflamatorio autoinmunitario como el Factor Reumatoideo con la CP/CPPS. Para el resto de los autoanticuerpos estudiados no se observaron diferencias significativas, aunque sí una tendencia a una mayor incidencia positiva en los pacientes con respecto a los controles. Estudios adicionales y con mayor número de pacientes son necesarios para dilucidar el rol de la inmunidad humoral en esta patología.

**PALABRAS CLAVE:** Prostatitis crónica/Síndrome de dolor pélvico crónico/ Autoinmunidad/ Autoanticuerpos.

### ABSTRACT

**Introduction:** Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS) is an inflammatory condition that affects the prostate gland without evidence of infection in the urinary tract. Evidence reported during last decade supports a role for an autoimmune response to prostate antigens as a cause of this pathology. In fact, the presence of a specific cellular immune response against prostate antigens was demonstrated in CP/CPPS patients, but little is known about the humoral immune response. Therefore, we decided to study the presence of serum specific antibodies to prostate antigens, expressed in the human prostatic cell line DU-145, and other serum autoantibodies that are markers of different autoimmune diseases.

**Materials and Methods:** 25 patients with CP/CPPS and 13 normal controls were studied and underwent the determination of serum antibodies anti-DU-145 cells, Rheumatoid Factor, anti-Thiroperoxidase, anti-Thirotoglobuline, anti-islet cells, anti-nuclear, anti-smooth muscle, anti-liver and kidney microsomes, and anti-parietal cell antibodies.

**Results:** There were non significant differences between controls and patients for anti-DU-145 antibodies ( $p=0,71$ ). Thirty-six percent of the patients and 0% of the controls showed positive levels of Rheumatoid Factor ( $p=0,016$ ). Three patients but none of the normal controls were positive for anti-Tiroperoxidase antibodies ( $p=0,54$ ). One patient and one normal control presented anti-islet cell antibodies ( $p=0,99$ ). No positive results were observed, either in patients or in controls, for the remaining autoantibodies assayed.

**Conclusion:** These results show an association between the inflammatory autoimmune marker Rheumatoid Factor and CP/CPPS. Although no significant differences in the remaining assayed autoantibodies were observed, a tendency to higher positive incidence in patients compared with controls was seen. Additional studies with an enlarged population of patients are needed to elucidate the exact role of the humoral autoimmune response in CP/CPPS.

**KEY WORDS:** Chronic prostatitis/ Chronic pelvic pain syndrome/ Autoimmunity/ Autoantibodies.

## INTRODUCCIÓN

El término prostatitis indica un estado de inflamación de la glándula prostática y comprende varios síndromes<sup>(1)</sup>. Los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (National Institutes of Health, NIH) han propuesto una clasificación de síndromes de prostatitis en cuatro categorías: prostatitis bacteriana aguda (categoría I), prostatitis bacteriana crónica (categoría II), prostatitis crónica/síndrome de dolor pélvico crónico o CP/CPPS (categoría III), la cual a su vez se subdivide en inflamatoria (categoría IIIA) y no-inflamatoria (categoría IIIB); y prostatitis inflamatoria asintomática (categoría IV)<sup>(2)</sup>. Desde la década pasada ha habido un resurgimiento del interés y nuevas investigaciones sobre prostatitis crónica y síndromes relacionados, principalmente debido a que estos síndromes han sido reconocidos como un importante problema de salud en todo el mundo<sup>(3)</sup>. La CP/CPPS afecta principalmente a hombres jóvenes, activos, menores de 50 años de edad y la misma se presenta como una inflamación de la próstata con síntomas locales de dolor pélvico, suprapúbico, perineal, peneano, testicular y rectal, sin evidencia de infección del tracto urinario. Además, este dolor se acompaña de disuria, poliaquiuria, nicturia y alteraciones en la eyaculación<sup>(2)</sup>. Los síntomas usualmente son crónicos, con leves mejorías y recaídas a lo largo del tiempo, pero algunos hombres tienen grandes fluctuaciones en la severidad de los mismos que afectan notablemente su calidad de vida<sup>(3)</sup>.

Mientras que la prostatitis aguda es comúnmente causada por una infección bacteriana, la CP/CPPS se caracteriza por presentarse como una inflamación prostática en ausencia de infección. Además, en muchos pacientes asintomáticos se detecta prostatitis crónica no infecciosa al realizarles una biopsia, como consecuencia de la detección de niveles séricos elevados de PSA y un probable diagnóstico de cáncer prostático<sup>(2)</sup>. Los pacientes presentan inflamación prostática, con signos y síntomas localizados, sin una causa aparente. Los factores que complican aún más el manejo de esta condición incluyen su etio-patogénesis [probablemente multifactorial<sup>(4,5)</sup>], la falta de un ensayo diagnóstico estándar confiable<sup>(4)</sup>, y las limitaciones metodológicas de muchos estudios sobre eficacia de tratamiento. En consecuencia, las estrategias para el tratamiento son empíricas y se han enfocado principalmente en el alivio de los síntomas más que a atacar la causa subyacente, resultando ineficaces en la mayoría de los casos<sup>(4,5)</sup>. Dentro de las causas de este síndrome se proponen una serie de hipótesis<sup>(6-9)</sup>; algunos investigadores sostienen que microorganismos clásicamente no cultivables podrían cumplir un rol en la patogénesis<sup>(9,10)</sup>. Esta hipótesis puede ser aplicada sólo a una cierta fracción de pacientes que comprende entre el 6 y 30% para algunos

autores<sup>(11)</sup>. No obstante, la porción restante de pacientes representa una fracción significativa donde no se encuentra ningún agente infeccioso como responsable de la patología. Es interesante destacar que el análisis de células en secreción prostática obtenida luego de masaje prostático en estos pacientes, ha evidenciado la presencia de granulocitos, macrófagos, linfocitos T y linfocitos B<sup>(12)</sup>; además, se detectaron niveles elevados de citocinas en plasma seminal y secreciones prostáticas de los mismos, lo que sugiere la presencia de un proceso inflamatorio activo en el tracto genital masculino en ausencia de infección<sup>(13-15)</sup>. Estos hallazgos apoyan la hipótesis que sostiene que esta inflamación sería mediada por una respuesta inmune adaptativa, contra antígenos propios del tracto genital, en el marco de un proceso autoinmune. Ciertamente, resultados reportados por otros autores y por nuestro grupo de trabajo han demostrado la presencia de linfocitos T específicos contra antígenos prostáticos en un importante número de pacientes con CP/CPPS<sup>(16-18)</sup>.

Es bien conocido que múltiples factores están involucrados en el desencadenamiento de una enfermedad autoinmune, entre los que podemos citar factores genéticos, ambientales y hormonales<sup>(19)</sup>. Tanto en pacientes que presentan enfermedades autoinmunes órgano-específicas como en modelos animales de estas enfermedades, se han descrito asociaciones de enfermedades autoinmunes<sup>(20-26)</sup>. Este es el caso de la alta frecuencia de tiroiditis de Hashimoto en pacientes con diabetes autoinmune<sup>(22)</sup> o la mayor susceptibilidad a desarrollar distintas enfermedades autoinmunes órgano-específicas que presenta la cepa de ratones no obesos diabéticos que espontáneamente desarrolla diabetes autoinmune<sup>(24)</sup>. Estos hallazgos sugieren la existencia de un fondo genético que predispone al desarrollo de autoinmunidad.

Una característica de esta asociación es el hecho de que diferentes enfermedades autoinmunes frecuentemente comparten o tienen elementos (autoanticuerpos y/o células autorreactivas) en común. En el presente trabajo, además de estudiar los anticuerpos anti-células DU-145 (una línea de células prostáticas humanas), se compararon pacientes con CP/CPPS y controles normales en cuanto a la presencia de diferentes autoanticuerpos típicos de distintas enfermedades autoinmunes, con el objetivo de avanzar en el estudio de una posible causa autoinmune en esta patología. Estos anticuerpos incluyen: Factor Reumatoideo (FR), anticuerpos anti-nucleares (ANA), anti-microsomas de hígado y riñón (LKM), anti-músculo liso (ASMA), anti-mitocondriales (AMA), anti-peroxidasa tiroidea (TPO), anti-tirotoglobulina (Tg), y anti-células de los islotes pancreáticos (ICA).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Pacientes y controles

Previo a comenzar el trabajo, el comité de ética institucional aprobó este estudio y se obtuvieron los consentimientos por escrito de todos los pacientes y controles, quienes estuvieron de acuerdo en donar muestras de sangre y semen y no recibieron tratamiento de antibióticos o anti-inflamatorios durante 4 semanas previas a la toma de muestras. Se incluyeron 25 pacientes (mediana= 42,  $P_{25-75}=35-47$ ) y 13 controles voluntarios (mediana= 30,  $P_{25-75}=28-32$ ). El diagnóstico de prostatitis crónica no infecciosa se realizó en individuos con historia sintomática característica de esta enfermedad de 3 meses o más de duración y ausencia de microorganismos convencionales y no convencionales (*Ureaplasma spp.*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma spp.*) en muestras de semen y orina. Pacientes con prostatitis crónica infecciosa o voluntarios que hubieran sido sometidos a vasectomía fueron excluidos de este estudio. Los controles normales fueron sometidos a los mismos estudios que los pacientes, respondieron un cuestionario y no presentaron historia previa de síntomas genitourinarios.

Todas las determinaciones que se detallan a continuación fueron realizadas a ciegas por el mismo operador para evitar subjetividad en la lectura de los resultados.

### Determinación de anticuerpos anti-células DU-145

Se realizó inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre células DU-145 que fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10%, L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina 100 U/ml, en estufa de cultivo a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en placa de poliestireno de 24 reservorios. En cada reservorio fue colocado un cubreobjetos de vidrio circular (impronta) sobre el cual crecieron las células hasta una confluencia del 60%. Luego, se retiró el medio de cultivo y se congeló la placa por un período inferior a dos semanas. Se probaron las improntas sin fijador, con etanol y con metanol. Se decidió no utilizar fijador para evitar la desnaturalización de cualquier antígeno cuya detección pudiera ser relevante en nuestros estudios, puesto que las células se encontraban en estado óptimo. Para establecer la dilución óptima con la que se debían ensayar los sueros, se utilizaron sueros de dos controles normales de 23 y 43 años sin signos ni síntomas compatibles con prostatitis de ninguna índole y no relacionados a los controles del estudio. La dilución 1/20 en tampón fosfato salino (PBS, pH= 7,2-7,4) fue considerada la óptima por poseer mínimo fondo de fluorescencia inespecífica y mayor sensibilidad. Todos los pacientes y

controles fueron ensayados por duplicado y en caso de hallar discordancia en los resultados, los sueros fueron reensayados. Simultáneamente se procesaron los dos controles negativos utilizados para determinar el título de corte. La primera incubación con los sueros diluidos 1/20 en PBS se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS y se procedió a colocar el antisuero de cabra anti-IgG humano marcado con isotiocianato de fluoresceína diluido 1/150 (Biocientífica S.A, Buenos Aires, Argentina). Se incubó 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad y se volvió a lavar 3 veces. Se montaron los vidrios, se observó el patrón de fluorescencia y se utilizó una valoración cualitativa para medir la intensidad de la misma, a saber: fluorescencia leve, moderada y fuerte [Microscopio de fluorescencia Olympus (BH-2), Japón].

### Determinación de Factor Reumatoideo (FR)

La determinación de FR se realizó mediante aglutinación indirecta de partículas inertes de látex sensibilizadas con la fracción II de Cohn ( $\gamma$  globulina humana) (Artritest directo Wiener laboratorios S.A.I.C., Rosario, Argentina). El "screening" se realizó con los sueros sin diluir, y para aquellas muestras que daban positivas se procedió a la determinación del título final partiendo de una dilución 1/10 y siguiendo con diluciones seriadas al medio.

### Determinación de anticuerpos anti-tiroideos (ATA), anti-peroxidasa tiroidea (anti-TPO) y anti-tirotoglobulina (anti-Tg)

Se realizó mediante IFI sobre cortes de tiroides de conejo fijados (Biocientífica S.A.). Las muestras se ensayaron diluidas 1/20 siguiendo especificaciones del fabricante. Se consideraron positivas para anti-TPO (anteriormente conocidos como microsomas tiroideos) aquellas muestras que mostraron tinción fluorescente en el citoplasma de las células epiteliales del folículo tiroideo y para anti-Tg las que mostraron fluorescencia en forma de flóculos en la sustancia coloide del folículo. Conjuntamente se procesó un control anti-TPO positivo y un control negativo.

### Determinación de anticuerpos anti-células de los islotes pancreáticos (ICA)

Se realizó por IFI sobre improntas sensibilizadas con cortes de páncreas de mono (BioSystems S.A., Barcelona, España). Los sueros de 13 pacientes y 7 controles normales, y los controles positivo y negativo diluidos 1/5, se sembraron e incubaron toda la noche (18 hs) a 37°C. Este tiempo de incubación, comparado a 30 minutos, aumenta la sensibilidad aproximadamente 8 veces<sup>(27)</sup>. Se lavó 3 veces con PBS, se

colocó antisuero anti-IgG humano marcado con isotiocianato de fluoresceína diluido 1/100 (Biocientífica S.A) y se volvió a incubar 1 hora a 37°C. Se realizaron los últimos 3 lavados con PBS, se montó y se observó en microscopio de fluorescencia. Se consideraron positivas las muestras que presentaron tinción fluorescente de los islotes pancreáticos.

#### Determinación de anticuerpos anti-nucleares (ANA)

Se realizó mediante IFI sobre improntas sensibilizadas con células Hep-2 (BioSystems S.A.). Los sueros fueron diluidos 1/10 en PBS e incubados 30 minutos a 37°C. Se practicaron 3 lavados con PBS y se incubó otros 30 minutos a 37°C con el anticuerpo de cabra anti-IgG humano marcado con isotiocianato de fluoresceína (Biocientífica S.A.). Se lavaron las improntas, se montaron y se observaron en microscopio de fluorescencia.

Se consideraron positivas las muestras que presentaron algún patrón de fluorescencia a la dilución practicada la cual fue elegida para aumentar la sensibilidad de la técnica.

#### Determinación de anticuerpos anti-músculo liso (ASMA), anti-mitocondriales (AMA), anti-microsomas de hígado y riñón (anti-LKM) y anti-células parietales gástricas (APCA)

La determinación de estos autoanticuerpos se realizó por IFI sobre cortes de hígado, estómago y riñón de rata (Biocientífica S.A.). Las muestras se ensayaron diluidas 1/20 siguiendo especificaciones del fabricante. Conjuntamente se procesó un control AMA positivo y un control negativo. Positivas para AMA fueron consideradas aquellas muestras que mostraron fluorescencia granular en las mitocondrias del citoplasma de las células gástricas, células de Kupffer, hepatocitos y las células de los túbulos renales. Los ASMA tiñen las capas musculares del estómago; los ASMA F-actina tiñen las muscularis mucosa interglandulares, fibras de actina y la capa muscular de los vasos sanguíneos. Con los LKM se observa tinción homogénea del citoplasma de los hepatocitos y de los túbulos renales proximales; los túbulos distales no se tiñen. Los APCA tiñen el citoplasma de las células en las glándulas mucosas del estómago de rata.

#### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Graph Pad Instat. El análisis de las variables categóricas se realizó mediante los Tests Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) o Exacto de Fisher, según corresponda. En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS

La determinación de anticuerpos anti-células prostáticas humanas, mediante IFI sobre células DU-145, no arrojó diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los pacientes con CP/CPPS y los controles normales ( $p=0,71$ ). La mayoría de los sueros que arrojaron resultados positivos lo hicieron con fluorescencia débil y tinción granular citoplasmática. Hubo excepciones, como un paciente que presentó moderada fluorescencia citoplasmática, otro paciente con fuerte fluorescencia citoplasmática y 1 control normal con débil tinción en el nucleolo de las células (Tabla I).

Al realizar la determinación de FR, se observó un resultado positivo en 9/25 pacientes (36,0%) con CCPS y en 0/13 (0%) controles normales, encontrándose diferencias estadísticamente significativas,  $p=0,016$  (Tabla I).

En la determinación de anticuerpos anti-TPO y anti-Tg, 3 pacientes con CP/CPPS resultaron positivos para anti-TPO y ninguno para anti-Tg. Ningún individuo del grupo control evidenció resultado positivo para estos dos anticuerpos anti-tiroideos. Para los anti-TPO el  $p$  fue de 0,54, y en consecuencia no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos en estudio (Tabla I).

En el caso de la determinación de ICA, la prueba resultó positiva para 1 paciente con CP/CPPS y para uno de los individuos control ( $p=0,99$ ) (Tabla I).

Para ANA, ASMA, AMA, LKM, APCA ninguno de los pacientes analizados y ningún control normal, arrojaron valores positivos a la dilución ensayada en el estudio (Tabla I).

## DISCUSIÓN

La prostatitis es una patología muy común en el consultorio urológico que muchos facultativos encuentran difícil de tratar. A su vez, representa el 10% de las consultas urológicas, y se ha estimado que más de la mitad de los hombres sufren síntomas de prostatitis en algún momento de sus vidas<sup>(1,2)</sup>. El diagnóstico de prostatitis bacteriana aguda por métodos microbiológicos es reproducible y fácil de llevar a cabo en el laboratorio. Por el contrario, el diagnóstico microbiológico de CP/CPPS representa un desafío importante. La mayoría de las CP/CPPS, que da cuenta del 90% de los casos totales de prostatitis, son determinadas fundamentalmente de acuerdo a un diagnóstico clínico, y por ende la terapia instaurada es empírica, resultando en un fracaso terapéutico en la mayoría de los casos<sup>(1,4)</sup>.

Para explicar la etiología de la CP/CPPS se han propuesto numerosas hipótesis como infecciones crípticas

TABLA I. Hallazgos de laboratorio de 25 pacientes con CP/CPPS y 13 controles normales

Sujetos <sup>1</sup>	Edad (años)	anti-DU145 <sup>2</sup>	FR <sup>2</sup>	Anti-TPO <sup>2</sup>	Anti-Tg <sup>2</sup>	ICA <sup>2</sup>	ANA <sup>2</sup>	ASMA <sup>2</sup>	AMA <sup>2</sup>	LKM <sup>2</sup>	APCA <sup>2</sup>
P1	41	Citop (+)	+ (1/20)	(-)	(-)	NR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P2	42	(-)	(-)	(-)	(-)	NR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P3	51	Citop (+++)	(-)	(-)	(-)	NR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P4	29	(-)	+ (1/20)	(-)	(-)	NR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P5	45	Citop (+)	+ (1/10)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P6	51	(-)	+ (1/10)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P7	36	(-)	+ (1/10)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P8	45	Citop (++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P9	47	(-)	(-)	(-)	(-)	NR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P10	38	Citop (+)	+ (1/10)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P11	23	Citop (+)	(-)	(-)	(-)	NR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P12	57	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P13	35	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P14	25	(-)	+ puro	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P15	25	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P16	37	(-)	(-)	(++++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P17	43	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P18	49	(-)	+ puro	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P19	49	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P20	24	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P21	42	Citop (+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P22	58	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P23	46	(-)	+ (1/20)	(-)	(-)	NR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P24	33	(-)	(-)	(-)	(-)	NR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P25	37	Citop (+)	(-)	(-)	(-)	NR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C1	26	(-)	(-)	(-)	(-)	NR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C2	40	(-)	(-)	(-)	(-)	NR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C3	41	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C4	27	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C5	39	(-)	(-)	(-)	(-)	NR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C6	30	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C7	32	Citop (+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C8	40	Citop (+)	(-)	(-)	(-)	NR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C9	28	(-)	(-)	(-)	(-)	NR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C10	30	Nucléolo (+)	(-)	(-)	(-)	NR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C11	27	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C12	30	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C13	28	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

<sup>1</sup>P= paciente; C= Control; <sup>2</sup>Resultado: Positivo= (+), Negativo= (-), Citop= Citoplasma. Intensidad de fluorescencia: Débil (+); moderada (++/+++) fuerte (+++). NR= No realizado.

de difícil identificación o cultivo<sup>(9, 10, 28)</sup>. Ciertos hallazgos sustentan esta hipótesis: algunos pacientes relacionan el comienzo de los síntomas con la actividad sexual, asociada en algunos casos a episodios de uretritis, mientras que otros no indican relación alguna entre el comienzo de la sintomatología y la actividad sexual. El uso de

antimicrobianos puede o no producir un alivio transitorio de los síntomas. Un número importante de microorganismos han sido postulados como causales de este síndrome: *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, micoplasmas genitales, estafilococos, bacterias corineformes y virus genitales<sup>(9)</sup>. Estos datos son muy controvertidos debido

a que muchos otros investigadores, o bien fallaron en demostrar su presencia, o solamente los encontraron en raras circunstancias<sup>(9, 10)</sup>.

Otra de las hipótesis que han sido propuestas durante los últimos años, postula a la autoinmunidad contra antígenos prostáticos como responsable de la inflamación prostática presentada por los pacientes con CP/CPPS<sup>(16-18)</sup>. El sistema inmune ha generado, a lo largo de la evolución, una serie de mecanismos complejos para mantener la tolerancia a lo propio, o “autotolerancia”, y prevenir la autoinmunidad. Últimamente, se ha evidenciado que el repertorio de linfocitos T periféricos específicos hacia algunas secuencias de proteínas propias de cada individuo se encuentra intacto y funcionalmente activo pero mantenidos bajo control por los mecanismos periféricos de autotolerancia<sup>(29)</sup>. No obstante, información aportada por varias investigaciones demuestran que el repertorio de linfocitos T específicos hacia autoantígenos particulares pueden ser potencialmente activados y luego desencadenar una enfermedad autoinmune<sup>(30)</sup>. Aunque las respuestas autoinmunes hacia la mayoría de los tejidos en el organismo han sido extensamente descritas desde décadas atrás, se conoce muy poco respecto a la respuesta autoinmune dirigida contra la próstata. Al respecto, Corman y cols. estudiaron el repertorio de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicos contra antígenos prostáticos típicos en hombres adultos normales. Mediante el uso de líneas celulares de linfocitos T a corto tiempo, estos investigadores demostraron la existencia de linfocitos T específicos contra antígenos prostáticos en individuos normales<sup>(31)</sup>. Estos clones de linfocitos T autorreactivos podrían ser potencialmente activados quebrando el estado fisiológico de autotolerancia y llevando al desarrollo de una prostatitis autoinmune. Recientemente, hemos reportado la presencia de linfocitos capaces de activarse, proliferar y secretar IFN- $\gamma$  de manera específica en respuesta al estímulo con antígenos prostáticos [como Antígeno Prostático Específico (PSA), Fosfatasa Ácida Prostática (FAP), y otros] en un grupo de pacientes con CP/CPPS<sup>(18)</sup>. En este trabajo, se evaluaron antígenos presentes en el plasma seminal (PS), extracto prostático humano normal (EP), PSA y FAP como potenciales antígenos reconocidos por el sistema inmune de los pacientes y se demostró que PS y FAP fueron capaces de inducir una respuesta linfoproliferativa significativa con alta secreción específica de IFN- $\gamma$  en un grupo de pacientes con CP/CPPS. Asimismo, Alexander y cols. reportaron resultados interesantes que demuestran la presencia de una respuesta autoinmune, mediada por células T, hacia antígenos prostáticos en pacientes con prostatitis crónica<sup>(16)</sup>. Ellos presentaron evidencia de la actividad específica de linfocitos T hacia antígenos del plasma seminal en algunos pacientes con

CP/CPPS, pero no en individuos controles. Posteriormente, y con el objetivo de definir los antígenos potencialmente reconocidos por esta respuesta, encontraron que algunos pacientes con CP/CPPS evidenciaron una respuesta proliferativa específica por parte de linfocitos T CD4<sup>+</sup> hacia PSA<sup>(32)</sup>. Batstone y cols. también analizaron la proliferación de células T en respuesta al estímulo con proteínas de plasma seminal autólogo o heterólogo, y evidenciaron respuestas positivas en 13 de 20 pacientes con prostatitis crónica y en 3 de 20 individuos controles<sup>(17)</sup>. Además, en estos mismos trabajos se demostró que pacientes con CP/CPPS presentaban elevados niveles de citocinas proinflamatorias, como IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , en muestras de plasma seminal, lo que evidenciaba la presencia de inflamación local en ausencia de infección<sup>(14, 33-34)</sup>.

Con respecto al estudio de la respuesta autoinmune humoral, en trabajos previos en los que analizamos la presencia de anticuerpos específicos contra antígenos prostáticos<sup>(18)</sup>, no se detectaron diferencias significativas en los niveles encontrados entre pacientes y controles en las muestras de suero y plasma seminal estudiadas. De igual manera, en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas cuando se evaluó la presencia de anticuerpos anti-células prostáticas humanas DU-145 en la población de pacientes y controles en estudio. Este resultado fue sorprendente, aunque también fue llamativa la casi inexistencia de reportes en literatura científica que aborden este aspecto<sup>(16-17, 35)</sup>. No obstante, ha sido reportada la presencia de niveles incrementados de IgA e IgG total sin especificidad hacia ningún microorganismo en secreciones prostáticas de pacientes con prostatitis crónica no infecciosa<sup>(35)</sup>. Además, también se demostraron depósitos de IgM en tejido periglandular prostático en 34 de 60 pacientes con prostatitis crónica y en 1 de 21 controles<sup>(35)</sup>. Una posibilidad para explicar el hecho de que no se hayan reportado respuestas autoinmunes humorales positivas en estos pacientes, es que se deba a un problema metodológico, ya sea porque la sensibilidad de las metodologías empleadas no son adecuadas para su determinación, o bien podría deberse a una elección equívoca del antígeno a evaluar, lo que estaría impidiendo la detección de autoanticuerpos contra antígenos prostáticos en estos pacientes. No obstante, recientemente se ha reportado la presencia de IgG específica en pacientes con prostatitis crónica<sup>(36)</sup>; estos autores demostraron la presencia de IgG específica contra MAD-PRO-34 en 6 de 67 pacientes con prostatitis crónica y en ninguno de los 71 controles normales utilizando la metodología SEREX (identificación serológica de antígenos por clonado de expresión recombinante). El antígeno MAD-PRO-34, reconocido preferentemente por la respuesta inmune humoral de los pacientes con prostatitis

crónica comparado con controles normales, es un autoantígeno nucleolar que previamente fue identificado como una proteína potencialmente sobreexpresada en carcinoma prostático y reconocido por la respuesta inmune de pacientes con cáncer de próstata<sup>(37)</sup> y cistitis intersticial<sup>(38)</sup>, una patología altamente relacionada con la CP/CPPS. Es importante aclarar que las muestras de suero de los pacientes analizados en el presente estudio fueron previamente analizadas para determinar la presencia de autoanticuerpos anti MAD-PRO-34 y se demostró la presencia de los mismos en 4/40 (10%) pacientes con CP/CPPS y en 0/40 (0%) de los controles normales (observaciones no publicadas). Este resultado concuerda con los previamente reportados por Dunphy y cols.<sup>(36)</sup>.

La autoinmunidad ha sido tradicionalmente dividida en autoinmunidad órgano-específica (anti-páncreas, tiroides, cerebro, tracto gastrointestinal) o no órgano-específica (lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoidea), dependiendo de que la respuesta inmune esté dirigida contra un antígeno confinado en un órgano en particular o contra un antígeno distribuido de manera ubicua en el organismo. No obstante, tanto en pacientes como en modelos animales, una enfermedad órgano-específica está frecuentemente asociada con otra (por ej. diabetes, gastritis, y tiroiditis) y una característica de esta asociación es el hecho de que diferentes enfermedades autoinmunes frecuentemente comparten o tienen elementos (autoanticuerpos y/o células autorreactivas) en común<sup>(20-23, 25-26)</sup>. Debido a esto, en el presente trabajo se investigó si los pacientes con CP/CPPS presentaban autoanticuerpos típicos de diferentes enfermedades autoinmunes. En la población de individuos en estudio, se analizó la presencia de: FR presente en altos títulos en pacientes con artritis reumatoidea (AR) y síndrome de Sjögren; anticuerpos anti-tiroideos: anti-TPO y anti-Tg presentes en pacientes con enfermedades autoinmunes tiroideas; ICA que se detectan en pacientes con diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID) de diagnóstico reciente y que aparecen años antes de la presentación de la DMID en un porcentaje importante de parientes de primer grado de pacientes con DMID; ANA presentes en pacientes con enfermedades del tejido conectivo; ASMA que aparecen en la hepatitis autoinmune de tipo I; AMA característicos de pacientes con cirrosis biliar primaria; anti-LKM marcadores de hepatitis autoinmune de tipo II; o APCA presentes en pacientes con gastritis autoinmune y anemia perniciosa. Se halló una diferencia estadísticamente significativa entre pacientes y controles solamente para FR. Debido a que los títulos hallados fueron bajos y sumado a que los pacientes no presentaban manifestaciones clínicas relacionadas a AR o síndrome de

Sjögren, es muy improbable que estos pacientes tengan asociada otra enfermedad autoinmune<sup>(39-40)</sup>. No encontramos diferencias significativas entre pacientes y controles para el resto de los autoanticuerpos analizados. Sin embargo, para el caso de los anti-TPO 3 pacientes presentaron estos autoanticuerpos y ningún control normal, lo que sugiere que quizás aumentando el número de pacientes y controles (n) se podría llegar a detectar una diferencia estadísticamente significativa. Si bien estos resultados ponen de manifiesto una mayor incidencia de un marcador autoinmunitario inflamatorio como lo es el FR en el grupo de pacientes con CP/CPPS, no se observó una diferencia significativa para el resto de los autoanticuerpos estudiados. Esto último concuerda con la falta de reportes en literatura que demuestren la presencia de respuestas autoinmunes humorales en pacientes con CP/CPPS. No obstante, la asociación de un nuevo marcador inflamatorio (FR) a esta enfermedad que constituye una inflamación crónica en ausencia de infección y, sumado a las evidencias previas reportadas en literatura, aporta mayor información que sustenta la hipótesis de la inflamación de origen autoinmune como causa de la misma en un grupo de pacientes con CP/CPPS. Esta respuesta autoinmune sería mediada fundamentalmente por un mecanismo de tipo celular o hipersensibilidad retardada, con un perfil de respuesta de tipo Th1. Los anticuerpos podrían no estar cumpliendo un rol clave en la patogénesis de esta enfermedad, sino que serían secundarios a la generación de la misma, o bien dicho rol podría estar enmascarado por la imposibilidad de demostrarlos debido a un problema metodológico o de una elección errónea del antígeno.

Es necesaria mayor investigación en esta patología que ayude a dilucidar los mecanismos etiopatogénicos involucrados en la misma con el objetivo de lograr, a futuro, terapias más eficientes que ayuden a paliar el importante problema sanitario que esta enfermedad constituye en la actualidad.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra Emilia M. Menso de Ezcurra por la lectura crítica y desinteresada del manuscrito. Este trabajo ha sido realizado con subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FONCyT) PICT 05-38069.

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés financiero.

## CORRESPONDENCIA:

Virginia E. Rivero, PhD  
 Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica  
 Facultad de Ciencias Químicas,  
 Universidad Nacional de Córdoba  
 Haya de la Torre y Medina Allende, Ciudad Universitaria  
 CP: 5016, Córdoba, Argentina  
 E-mail: vrivero@bioclin.fcq.unc.edu.ar

## BIBLIOGRAFÍA

1. Schaeffer AJ. Clinical practice. Chronic prostatitis and the chronic pelvic pain syndrome. *N Engl J Med* 2006; 355:1690-1698.
2. Krieger JN, Niberg L Jr, Nickkel JC. NIH consensus definition and classification of prostatitis. *J Am Med Assoc* 1999; 282:236-237.
3. Collins MM, Stafford RS, O'Leary MP, Barry MJ. How common is prostatitis? A national survey of physician visits. *J Urol* 1998; 159:1224-1228.
4. McNaughton Collins M, MacDonald R, Wilt TJ. Diagnosis and treatment of chronic abacterial prostatitis: A systematic review. *Ann Intern Med* 2000; 133:367-381.
5. Bjerklund Johansen TE, Weidner W. Understanding chronic pelvic pain syndrome. *Curr Opin Urol* 2002; 12:63-67.
6. Shoskes DA, Katz E. Multimodal therapy for chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Curr Urol Rep* 2005; 6:296-299.
7. Habermacher GM, Chason JT, Schaeffer AJ. Prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Annu Rev Med* 2006; 57:195-206.
8. Wagenlehner FM, Weidner W, Sorgel F, Naber KG. The role of antibiotics in chronic bacterial prostatitis. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26:1-7.
9. Domingue GJ Sr, Hellstrom WJ. Prostatitis. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:604-613.
10. Krieger JN, Riley DE. Bacteria in the chronic prostatitis-chronic pelvic pain syndrome: Molecular approaches to critical research questions. *J Urol* 2002; 167:2574-2583.
11. Mandar R, Raukas E, Turk S, Korrovits P, Punab M. Mycoplasmas in semen of chronic prostatitis patients. Two critical research questions. *J Urol* 2002; 167: 2574-2583.
12. Ludwig M, Steltz C, Huwe P, Schaffer R, Altmannsberger W, Weidner W. Immunocytological analysis of leukocyte subpopulations in urine specimens before and after prostatic massage. *Eur Urol* 2001; 39:277-282.
13. Motrich RD, Cuffini C, Oberti JP, Maccioni M, Rivero VE. Chlamydia trachomatis occurrence and its impact on sperm quality in chronic prostatitis patients. *J Infect* 2006; 53:175-183.
14. Alexander RB, Ponniah S, Hasday J, Hebel JR. Elevated levels of proinflammatory cytokines in the semen of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Urology* 1998; 52:744-749.
15. Khadra A, Fletcher P, Luzzi G, Shattock R, Hay P. Interleukin-8 levels in seminal plasma in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and nonspecific urethritis. *BJU Int* 2006; 97:1043-1046.
16. Alexander RB, Brady F, Ponniah S. Autoimmune prostatitis: Evidence of T cell reactivity with normal prostatic proteins. *Urology* 1997; 50:893-899.
17. Batstone GR, Doble A, Gaston JS. Autoimmune T cell responses to seminal plasma in chronic pelvic pain syndrome (CPPS). *Clin Exp Immunol* 2002; 128:302-307.
18. Motrich RD, Maccioni M, Molina R, Tissera A, Olmedo J, Riera CM, Rivero VE. Presence of INF $\gamma$ -secreting lymphocytes specific to prostate antigens in a group of chronic prostatitis patients. *Clin Immunol* 2005; 116:149-157.
19. Klarekog L, Padyukov L, Rönnelid J, Alfredsson L. Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:650-655.
20. Bárová H, Perusicová J, Hill M, Sterzl I, Vondra K, Masek Z. Anti-GAD-positive patients with type 1 diabetes mellitus have higher prevalence of autoimmune thyroiditis than anti-GAD-negative patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Physiol Res* 2004; 53:279-286.
21. Henderson RD, Bain CJ, Pender MP. The occurrence of autoimmune diseases in patients with multiple sclerosis and their families. *J Clin Neurosci* 2000; 7:434-437.
22. Lam-Tse WK, Batstra MR, Koeleman BP, Roep BO, Bruining MG, Aanstoot HJ, Drexhage HA. The association between autoimmune thyroiditis, autoimmune gastritis and type 1 diabetes. *Pediatr Endocrinol Rev* 2003; 1:22-37.
23. Kawasaki E, Abiru N, Yano M, Uotani S, Matsumoto K, Matsuo H, et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in patients with autoimmune thyroid disease: Relation to competitive insulin autoantibodies. *J Autoimmun* 1995; 8:633-643.
24. Damotte D, Colomb E, Cailleau C, Brousse N, Charreire J, Carnaud C. Analysis of susceptibility of NOD mice to spontaneous and experimentally induced thyroiditis. *Eur J Immunol* 1997; 27:2854-2862.
25. Daneshpazhooh M, Mostofizadeh GM, Behjati J, Akhyani M, Mahmoud Robati R. Anti-thyroid peroxidase antibody and vitiligo: A controlled study. *BMC Dermatology* 2006; 6:3.
26. Atzeni F, Doria A, Ghirardello A, Turiel M, Batticciotto A, Carrabba M, Sarzi-Puttini P. Anti-thyroid antibodies and thyroid dysfunction in rheumatoid arthritis: prevalence and clinical value. *Autoimmunity* 2008; 41:111-115.
27. Bradwell AR, Stokes RP, Johnson GD. *Atlas of Autoantibodies patterns on Tissues*. 1997. The Binging Site, Ltd. Birmingham, UK.
28. Weidner W, Diemer T, Huwe P, Rainer H, Ludwig M. The role of Chlamydia trachomatis in prostatitis. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19:466-470.
29. Ohashi PS, De Franco AL. Making and breaking tolerance. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:744-759.
30. Sercarz EE, Lehmann PV, Ametani A, Benichou G, Miller A, Moudgil K. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:729-766.
31. Corman JM, Sercarz EE, Nanda NK. Recognition of prostate-specific antigenic peptide determinants by human CD4 and CD8 T cells. *Clin Exp Immunol* 1998; 114:66-72.
32. Ponniah S, Arab I, Alexander RB. PSA is a candidate self-antigen in autoimmune chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Prostate* 2000; 44:49-54.

33. Orhan I, Onur R, Ilhan N, Ardicoglu A. Seminal plasma cytokine levels in the diagnosis of chronic pelvic pain syndrome. *Int J Urol* 2001; 8:495-499.
34. Nadler RB, Koch AE, Calhoun EA, Campbell PL, Pruden DL, Bennett CL, et al. IL-1, and TNF- $\alpha$  in prostatic secretions are the indicators in the evaluation of men with chronic prostatitis. *J Urol* 2000; 164:214-218.
35. Doble A, Walker MM, Harris JR, Taylor-Robinson D, Witherow RO. Intraprostatic antibody deposition in chronic abacterial prostatitis. *Br J Urol* 1990; 65:598-605.
36. Dunphy EJ, Eickhoff JC, Muller CH, Berger RE, McNeel DG. Identification of antigen specific IgG in sera from patients with chronic prostatitis. *J Clin Immunol* 2004; 24:492-502.
37. Fossa A, Siebert R, Aasheim HC, Maelandsmo GM, Berner A, Fosså SD, et al. Identification of nucleolar protein No55 as a tumour-associated autoantigen in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 2000; 83:743-749.
38. Ochs RL, Stein TW Jr, Chan EK, Ruutu M, Tan EM. cDNA cloning and characterization of a novel nucleolar protein. *Mol Biol Cell* 1996; 7:1015-1024.
39. Renaudineau Y, Jamin C, Saraux A, Youinou P. Rheumatoid factor on a daily basis. *Autoimmunity* 2005; 38:11-16.
40. Müller K, Manthorpe R, Permin H, Høier-Madsen M, Oxholm P. Circulating IgM rheumatoid factors in patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol Suppl* 1988; 75:265-268.