



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSTGRADO

“EFECTO DIFERENCIAL DE *Lepidium meyenii* (MACA ROJA) Y FINASTERIDE SOBRE LOS PROCESOS INFLAMATORIOS EN LA HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA INDUCIDA CON ENANTATO DE TESTOSTERONA EN RATAS DE LA CEPA HOLTZMAN”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN FISILOGIA

GASCO TANTACHUCO MANUEL ENRIQUE

LIMA – PERÚ

2014

MIEMBROS DEL JURADO

Dra. Patricia Herrera Velit	PRESIDENTA
Dra. María Rivera Chira	VOCAL
Dr. Luis Aguilar Mendoza	VOCAL
Dr. Francisco Villafuerte Castrillón	SECRETARIO

ASESOR

Dr. Gustavo Gonzales Rengifo

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico con todo mi amor a la persona que no sólo me dio la vida sino que también luchó toda su vida por mí, aquella persona que hizo hasta lo imposible mientras tenía fuerzas para que yo saliera adelante, aquella persona que me cuidó desde siempre y que incluso ya había escogido entre ella y yo (durante mi nacimiento), quien debería vivir, ya que su vida corría peligro, sin embargo ella sobrevivió para darme lo mejor y hacerme feliz, a ella le entrego esta tesis realizada con mucho esfuerzo y amor. Sé que en el cielo, ella está satisfecha y feliz por este gran triunfo, aquella persona es mi madre... para ti mamá Raquel, tu hijo:

Mañuco

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la vida, salud y fuerzas para continuar haciendo las actividades que me fascinan, que son la investigación y la docencia.

Agradezco a mi Padre y a mis Hermanos por haberme otorgado su apoyo incondicional para que yo pudiera estudiar en la universidad líder en investigación en el Perú como es la Universidad Peruana Cayetano Heredia, siempre les estaré agradecidos.

Agradezco al CONCYTEC por otorgarme la beca para poder realizar mis estudios de Doctorado en esta prestigiosa universidad, la misma en la que me formé no solo en el pre-grado sino también en la maestría.

Un agradecimiento especial a mi maestro, amigo y gran persona, al Dr. Gustavo Gonzales Rengifo, que gracias a sus guías y enseñanzas se pudo lograr este trabajo de investigación; siempre voy a aprender algo nuevo al lado del maestro.

De igual forma agradezco al Instituto de Investigaciones de la Altura por abrirme las puertas para hacer esta investigación, al igual que al Laboratorio de Endocrinología y Reproducción de la Facultad de Ciencias y Filosofía, al cual considero mi segunda casa.

Deseo agradecer también a mi colega y amigo, el magíster Ivan Lozada por apoyarme en los análisis de las citoquinas evaluadas en esta tesis.

INDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I- INTRODUCCION.....	10
II- GLANDULA PROSTATICA.....	12
2.1 PROSTATA HUMANA.....	12
2.2 PROSTATA DE LA RATA.....	16
III- VESICULAS SEMINALES.....	18
IV- HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA.....	19
V- MODELO DE INDUCCION DE HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA.....	22
VI- HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA E INFLAMACION.....	23
VII- HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA Y PRODUCTOS NATURALES.....	26
VIII- JUSTIFICACION.....	28
IX- PREGUNTAS DE INVESTIGACION.....	28
9.1 PREGUNTA CENTRAL.....	28
9.1 PREGUNTAS SECUNDARIAS.....	28
X- OBJETIVO GENERAL.....	29
10.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	29
XI- HIPOTESIS CENTRAL.....	31
XII- METODOLOGIA.....	31
12.1 Preparación del extracto hidroalcohólico.....	32
12.2 Animales de experimentación.....	32
12.3 Diseño experimental.....	33
12.4 Medición de testosterona y estradiol intraprostáticos.....	34
12.5 Evaluación histológica y conteo de células inflamatorias.....	35
12.6 Determinación de Citoquinas en homogenizados de próstata y vesículas seminales.....	36
12.7 Análisis estadísticos.....	37
XIII- RESULTADOS.....	39
13.1 Determinación del peso de la próstata y de las vesículas seminales luego de la administración de enantato de testosterona en ratas inducidas a HPB.....	39
13.2 Evaluación histológica.....	41
13.2.1 Histología de la glándula prostática.....	41
13.2.2 Histología de las vesículas seminales.....	43
13.3 Determinación del efecto del enantato de testosterona sobre el conteo de células inflamatorias en la próstata y en las vesículas seminales.....	45
13.4 Determinación de la asociación entre el peso de la próstata y de las vesículas seminales con la inflamación y evaluación del efecto de los tratamientos con finasteride y el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja.....	50
13.5 Determinación del efecto del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja y el finasteride sobre el conteo de células inflamatorias en la próstata y en las vesículas seminales de ratas con HPB ante el estímulo con enantato de testosterona.....	57

13.6 Determinación de la asociación entre los niveles de testosterona sérica y TNF- α , IL-4 e INF- γ en próstata y vesículas seminales de los grupos control y tratado con enantato de testosterona.....	60
13.7 Determinación del efecto del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja y el finasteride sobre los niveles de TNF- α , IL-4 e INF- γ en próstata y vesículas seminales de ratas con HPB ante el estímulo con enantato de testosterona.....	63
13.8 Evaluación de los cambios de testosterona y estradiol en próstata en ratas con HPB ante el estímulo del enantato de testosterona y tratadas con finasteride y el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja.....	66
13.9 Determinación de la correlación o asociación entre células inflamatorias y citoquinas en próstata y vesículas seminales estimulada con enantato de testosterona.....	68
XIV- DISCUSION.....	84
14.1 HPB Y EL PROCESO INFLAMATORIO.....	84
14.1.1 Asociación entre testosterona, células inflamatorias y citoquinas.....	84
14.2 EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON FINASTERIDE Y MACA ROJA.....	88
14.3 HORMONAS SEXUALES Y LOS EFECTOS DEL FINASTERIDE Y EL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE MACA ROJA.....	91
14.4 CONSIDERACIONES FINALES.....	93
XV- CONCLUSIONES.....	95
XVI- RECOMENDACIONES.....	96
XVII- APROXIMACION A LOS MECANISMOS DE ACCION DEL DESARROLLO DE LA HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA PRODUCIDA POR EVENTOS INFLAMATORIOS.....	97
XVIII- APROXIMACION AL MECANISMO DE ACCION DEL FINASTERIDE Y DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO ATOMIZADO DE MACA ROJA EN LA HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA PRODUCIDA POR EVENTOS INFLAMATORIOS.....	98
XIX- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	100
XX- ANEXOS.....	121

RESUMEN

El objetivo central de esta tesis fue evaluar si existen mecanismos de acción diferenciales en próstata (P) y vesículas seminales (VS) del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja (MR) y el finasteride (F) en ratas inducidas a Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) ocasionado por el enantato de testosterona (ET). Se formaron 5 grupos de animales, un grupo control, con ET, con ET más F y dos grupos con ET más MR. Luego de los tratamientos se evaluaron las citoquinas: TNF- α , IL-4 e INF- γ en P y VS. Se evaluó testosterona y estradiol intraprostáticos. Se cuantificó el número de células inflamatorias en P y VS. Se realizaron análisis de regresión para determinar la relación que hay entre T e inflamación y el efecto de los tratamientos. Se demostró que la HPB causada por el ET estuvo asociada directamente a un incremento en el conteo de células inflamatorias y a un incremento del TNF- α , y a una disminución en los niveles de IL-4 e INF- γ en P. Los tratamientos con finasteride y maca roja disminuyeron la inflamación en próstata, inhibiendo TNF- α pero diferencialmente finasteride aumenta principalmente IL-4 y maca roja lo hace con INF- γ , similares efectos se obtuvieron con finasteride en vesículas seminales. El enantato de testosterona se asocia directamente a TNF- α e inversamente a IL-4 en vesículas seminales, mas no a INF- γ . La Testosterona y el Estradiol se incrementaron con finasteride pero no con maca roja. En conclusión, estos resultados se aproximan a los mecanismos de acción diferenciales entre finasteride y maca roja sobre la HPB, finasteride actuaría sobre la respuesta Th2, al incrementar IL-4, mientras que maca roja lo haría favoreciendo la respuesta Th1 mediada por INF- γ .

Palabras clave: maca roja, citoquinas, células inflamatorias, hormonas sexuales.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate if there are differential action mechanisms in prostate and seminal vesicles (VS) of atomized hydroalcoholic red maca (MR) and finasteride (F) in rats induced to Benign Prostatic Hyperplasia (HPB) caused by testosterone enanthate (ET). Five groups of animals were formed, control, ET, ET plus F and two groups of ET plus MR. After of treatments, TNF- α , IL-4 and INF- γ , as well as testosterone and estradiol were evaluated in prostate and seminal vesicle (SV). Inflammatory cells count in prostate and SV were quantified. Regression analyses were made in order to determine the association between testosterone and inflammation and treatment effects. It was demonstrated that HPB caused by ET was directly associated to inflammatory cells count and TNF- α , and inversely to IL-4 and INF- γ in prostate. Red maca and finasteride treatments decreased inflammation in prostate, inhibiting TNF- α but differentially finasteride increased mainly IL-4 and MR increased INF- γ , similar effects with finasteride in seminal vesicles were obtained. Testosterone enanthate was directly associated to TNF- α and inversely to IL-4 in seminal vesicles, but not to INF- γ . Testosterone and Estradiol increased with finasteride but not with red maca. In conclusion, these results indicate an approach to differential action mechanisms of finasteride and red maca on BPH, finasteride acting on Th2 response to increase IL-4, while red maca might act stimulating Th1 response mediated by INF- γ .

Keywords: red maca, cytokines, inflammatory cells, sexual steroids.

I- INTRODUCCION

La hiperplasia benigna de próstata es una enfermedad que afecta a la mayoría de hombres en edad avanzada. Incluso ya a partir de los 40 años se ha encontrado que el 16% de sujetos presentan síntomas moderados a severos en el tracto urinario bajo asociados a hiperplasia benigna de próstata (HPB). En sujetos mayores a 60 años se ha reportado que el 50% padece de esta enfermedad, elevándose a 90% en sujetos mayores de 85 años (Zaman y col, 2014). Los diversos síntomas que aparecen en los hombres que padecen de HPB alteran la calidad de vida de estos, presentando reducción del flujo urinario, nicturia, y disfunción del almacenamiento de orina en la vejiga (Jhang y col, 2014).

La inflamación prostática puede contribuir a la aparición de cambios hiperplásicos en este órgano, en próstatas de sujetos con HPB se encuentran siempre infiltrados inflamatorios (Chughtai y col, 2011). Los infiltrados consisten predominantemente de linfocitos T CD4(+) activados, expresión de citoquinas proinflamatorias producidas por el músculo liso y linfocitos T (Kramer y col, 2004, 2006). Estos procesos inflamatorios activarían una respuesta inmunológica y contribuiría a la patogénesis de la HPB.

Entre los tratamientos para contrarrestar la HPB se encuentran las terapias quirúrgicas y farmacológicas. Por ejemplo la resección transuretral de la próstata (TURP). Sin embargo al ser este procedimiento invasivo puede producir efectos colaterales como es disfunción sexual e incontinencia que son los síntomas más comunes después de la

cirugía (Favilla y col, 2013). Las terapias farmacológicas están dirigidas a disminuir los 2 componentes de la HPB, el estático (el crecimiento de la próstata) y el dinámico (el tono del músculo liso). Para inhibir el componente estático se utilizan inhibidores de andrógenos, como el finasteride y dutasteride; estas drogas inhiben la acción de 5α -reductasa, la cual cataliza la conversión de testosterona a dihidrotestosterona (andrógeno 10 veces más potente que la testosterona) (Carson y col, 2003). Esta hormona provoca la expresión de factores de crecimiento y citoquinas que provocarían la patogénesis de la HPB.

Para suprimir el componente dinámico se utilizan antagonistas de los adrenoreceptores- $\alpha 1$ como el tamsulosin y alfuzocin. Estas drogas disminuyen el tono del músculo liso, aliviando así la obstrucción uretral y por consiguiente los molestos síntomas durante la micción (Cohen y Parson, 2012; Yuan y col, 2013). Todos estos tratamientos presentan efectos colaterales; los anti andrógenos pueden disminuir la libido, producir impotencia sexual y eyaculaciones anormales, mientras que los antagonistas de los receptores adrenérgicos pueden producir efectos vasodilatadores y anormalidades eyaculatorias (Yoshimura y col, 2013). Se ha investigado con diferentes drogas que presentan efectos inhibitorios sobre el tono muscular sin que aparezcan efectos secundarios; sin embargo, aún están en evaluación, muchos de ellos en animales de laboratorio por lo que se requieren más estudios para dilucidar sus efectos y llevarlos a estudios clínicos (Tatemichi y col, 2012).

Diversos estudios han demostrado el efecto benéfico de los extractos de maca roja sobre la HPB en animales experimentales ya sea en ratas (Gonzales y col, 2005;

2007; Gonzales C, 2007; Gonzales C y col, 2012; Gasco, 2005; Gasco y col, 2007a) o en ratones (Gonzales y col, 2008), sin esclarecer aun los mecanismos fisiológicos por los que la maca roja inhibe el desarrollo de la HPB. El modelo experimental utilizado en estos estudios para inducir HPB será el mismo que se va a utilizar en esta tesis, es decir la HPB será inducida a los animales con enantato de testosterona.

Todos los experimentos donde se ha administrado enantato de testosterona a ratas machos adultas han producido HPB, sin embargo esto nunca se ha asociado a un proceso inflamatorio. En esta tesis se va a evaluar si este andrógeno, administrado exógenamente puede modificar el microambiente de la próstata y de las vesículas seminales y producir también inflamación, reflejado en la invasión de células inflamatorias y citoquinas. Luego, determinar si el tratamiento con finasteride o el extracto hidroalcohólico de maca revierte este efecto inflamatorio.

II- LA GLANDULA PROSTATICA

2.1 PROSTATA HUMANA

La glándula prostática es un órgano glandular fibromuscular que en condiciones normales pesa aproximadamente 20 gramos en el humano. Está localizada en el suelo pélvico, debajo de la vejiga urinaria (Figura 1). La uretra la atraviesa longitudinalmente y es ésta la razón por la que cualquier crecimiento producido en

este órgano, se traduce frecuentemente en una obstrucción urinaria que origina el síndrome de prostatismo.

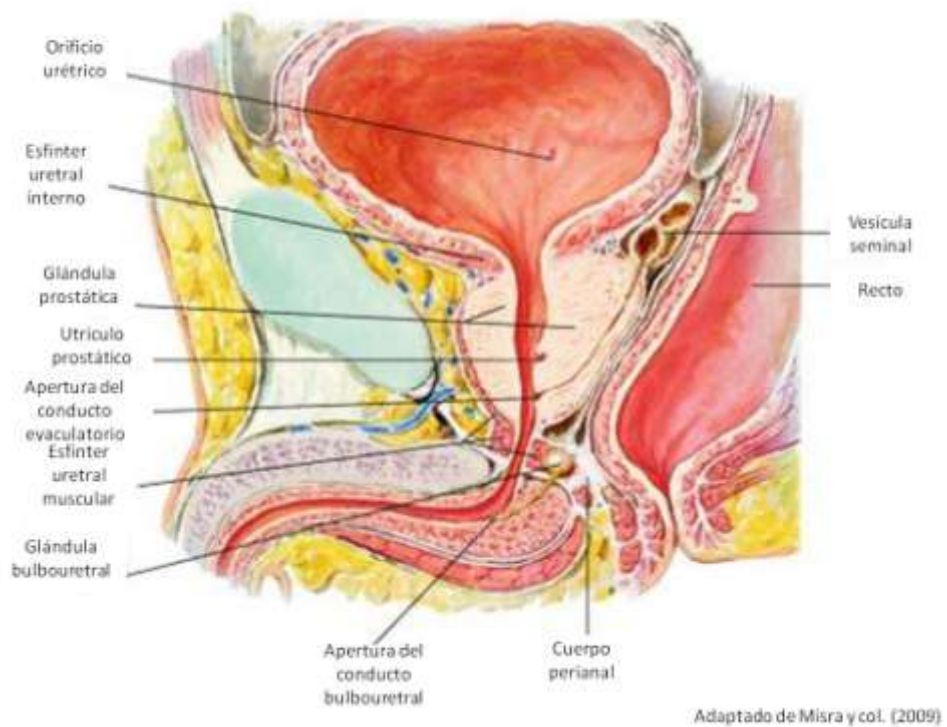


Figura 1. Presentación anatómica del aparato genital masculino donde se observa la ubicación de la próstata y las vesículas seminales en el humano y otras estructuras.

Desde el punto de vista anatómico, la próstata humana puede diferenciarse en tres zonas: la zona periférica (PZ), la zona central (CZ) y la zona de transición (TZ) (Figura 2).

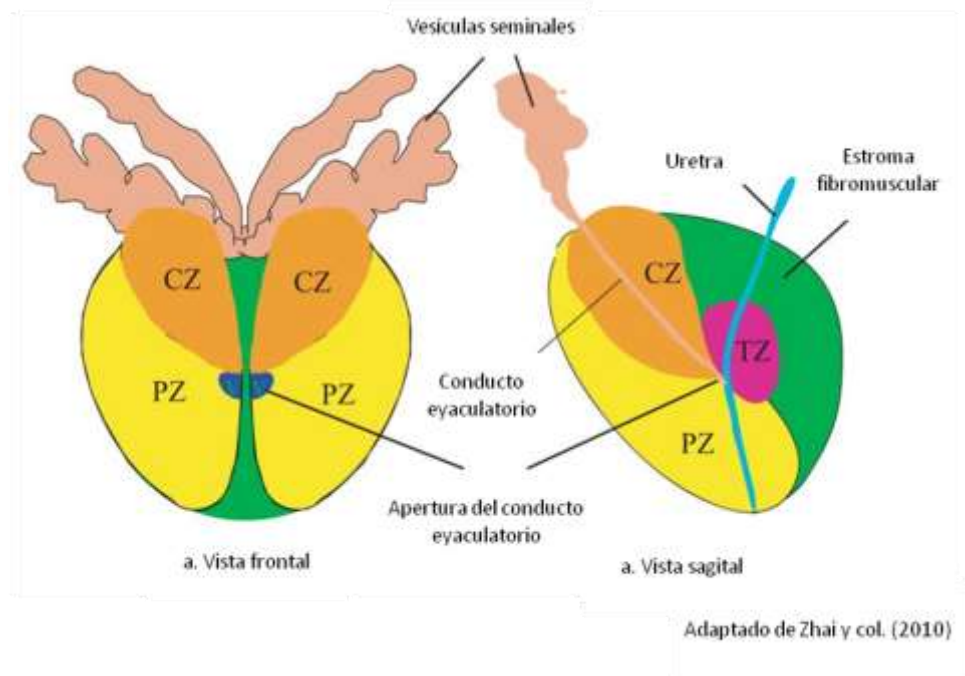


Figura 2. Zonas o subdivisiones de la próstata en el humano donde se aprecia la zona central, la zona de transición y la zona periférica.

La zona periférica es la subdivisión anatómica de mayor tamaño. Esta se encuentra compuesta por tejido secretor, contiene un 75% del tejido glandular. Corresponde a la región donde generalmente se desarrolla la neoplasia intraperitoneal (PIN) y el

carcinoma prostático. En la rata, el equivalente a esta zona son los lóbulos prostáticos dorsales y laterales, aquí se ha encontrado un perfil de expresión genética muy similar a la zona periférica en el humano donde predomina la neoplasia (Siler y col, 2005). En esta zona se ha determinado que la expresión del RNAm del gen *hepsin* está elevada en muestras de cáncer de próstata comparadas con una mínima expresión en muestras con HPB (Luo y col, 2001), lo que indica una discriminación de genes sobre las malignidades prostáticas, principalmente en la zona periférica.

La zona central, que constituye el 25% de la masa glandular total de la próstata se encuentra rodeando a los conductos eyaculadores. Se diferencia de la zona periférica y de transición por sus características glandulares tanto morfológicas como histológicas. Esta zona presenta mayor longitud de sus conductos que el resto de las áreas y el citoplasma de las células secretoras es mucho más granular y oscuro.

La zona de transición que corresponde al 5% restante de la próstata, está formada por un pequeño conjunto de conductos que proceden de un mismo punto en la unión entre los segmentos proximal y distal de la uretra. Esta es la principal región donde se origina la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB). En esta región de la próstata se han encontrado genes como el JM27, cuya sobreexpresión puede estar involucrada en la progresión de la HPB (Prakash y col, 2002). Otro estudio señala que existen genes expresados diferencialmente entre la zona de transición y la zona periférica, los mismos que pueden explicar el diferente comportamiento biológico de esas zonas (Sun y col, 2005).

2.2 PROSTATA DE LA RATA

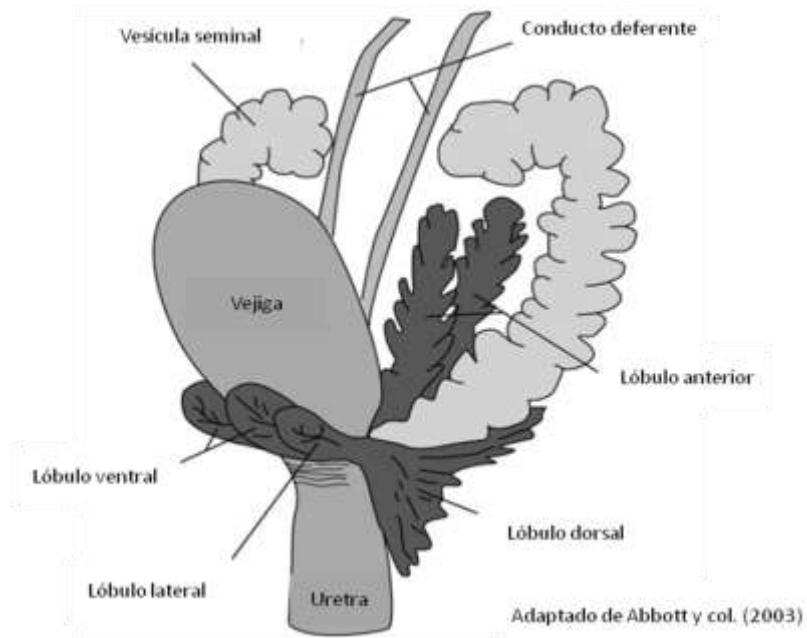


Figura 3. Lóbulos de la próstata de rata: Lóbulo ventral, anterior, dorsal y lateral.

La próstata de ratas y ratones está comprendida por cuatro lóbulos: ventral, anterior (llamada también glándula coagulante), dorsal y lateral (Figura 3), estos lóbulos están dispuestos circunferencialmente alrededor de la uretra y muestra patrones característicos de ramificación ductal y producción de proteína secretoras (Jesik y col, 1982). En contraste, la próstata humana carece de una arquitectura lobular definida, está organizada en zonas (Figura 1) con distintas predisposiciones a enfermedades; el carcinoma, en el humano, se desarrolla principalmente en la zona periférica y la hiperplasia benigna principalmente se produce en la zona de transición (McNeal, 1981). Se ha sugerido que la zona periférica humana es análoga a la del lóbulo

dorsolateral del roedor basada en la observación de que los tumores inducidos en próstatas de roedores se localizan en este lóbulo (Greenberg y col, 1995, Van Coppennolle, y col 2001, Berteaux y col, 2004).

La histología de la próstata comprende un componente glandular y otro componente no glandular (Figura 4), ambos fusionados y contenidos dentro de la cápsula prostática. La estrecha e íntima conexión entre estos dos componentes dificulta e imposibilita su disección por separado. La interacción entre estos dos componentes es importante en el proceso de la morfogénesis, diferenciación y respuesta hormonal en la próstata normal o neoplásica (Amalinei, 2006).

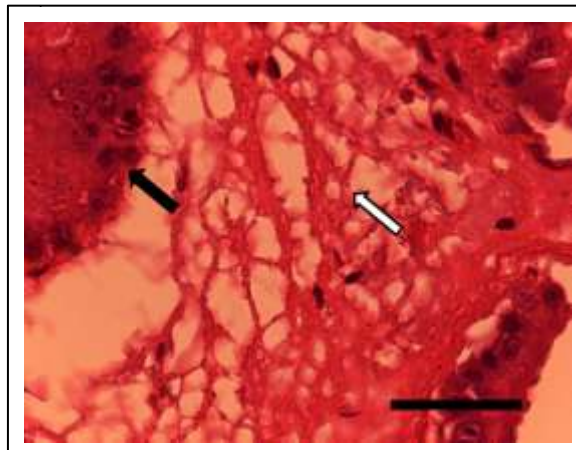


Figura 4. Corte histológico de próstata de rata, se observa el epitelio pseudoestratificado basal y glandular (flecha negra) y el estroma (flecha blanca). Tinción H y E. La escala de la barra negra es de 20 μ m y una magnificación de 400X.

III- VESICULAS SEMINALES

Las vesículas seminales son glándulas sexuales accesorias que juegan un papel muy importante en la fertilidad masculina, sus secreciones favorecen la coagulación del líquido seminal, además de promover su movilidad, incremento de la estabilidad de la cromatina y de suprimir la respuesta inmune en el tracto reproductivo masculino femenino (Zhang y col, 2007). La estructura histológica de las vesículas seminales comprende un epitelio prismático secretor y tejido muscular liso (Figura 5).

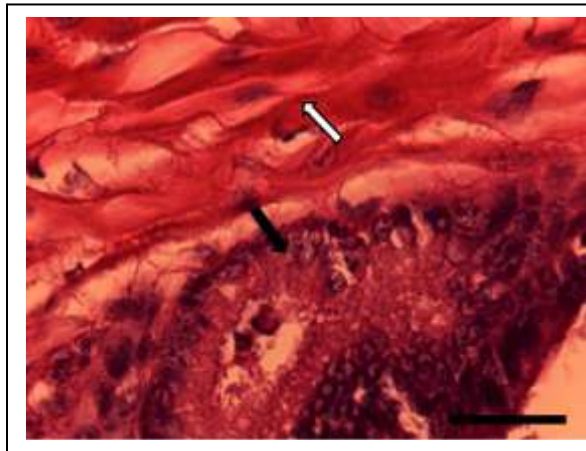


Figura 5. Corte histológico de vesículas seminales de rata, se observa el epitelio prismático secretor (Flecha negra) y el tejido muscular liso (Flecha blanca). Tinción H y E. La escala de la barra negra es de 20 μ m y una magnificación de 400X.

A diferencia de las que ocurren en la próstata, las enfermedades de las vesículas seminales, tanto la hiperplasia como el cáncer, son poco frecuentes, (Kinjo y col, 2013). Sin embargo los individuos con carcinoma de vesículas seminales tienen pronóstico muy pobre y mueren a los pocos meses después del diagnóstico (Gong, 2011 y col; Mizuno y col, 2012). Esto podría deberse a los efectos diferenciales de los andrógenos en próstata y vesículas seminales, regulados por enzimas relacionadas a la glicosilación de proteínas denominadas fucosiltransferasas (Wang y col, 2013).

IV- HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA (HPB)

En el humano, la HPB es el agrandamiento de la glándula prostática, que puede llegar a alcanzar el tamaño de una manzana (de 20 a 60 -80 g). Conforme se agranda, comprime la uretra, obstruyendo el flujo de la orina. A nivel microscópico, se observa un proceso progresivo de alargamiento de las estructuras fibromusculares y epiteliales; esta enfermedad puede ser tan seria como para requerir un procedimiento de cirugía. (Patel y col, 2014).

La medicación se ha vuelto en la opción mayormente utilizada para el tratamiento de la HPB (Chapple , 2004). La terapia con antagonistas de los receptores alfa adrenérgicos son los comúnmente utilizados, estos tiene la función de relajar al músculo liso prostático con efectos anti angiogénicos y antiproliferativos, principalmente en el cáncer de próstata (Tahmatzopoulos y Kyprianou, 2004). Otra opción para disminuir los síntomas de HPB son los inhibidores de la enzima que convierte testosterona a dihidrotestosterona, la 5 alfa reductasa antes mencionados

aunque con diferentes respuestas en pacientes tratados con finasteride (Habib y col, 1997).

Los inhibidores de 5α -reductasa, reducen el tamaño prostático en un 20 a 30%, como consecuencia de la inhibición de la formación de DHT, se induce apoptosis y se inhibe el número de vasos sanguíneos en la próstata debido a una reducción del factor de crecimiento endotelial vascular (Steers, 2001). Se ha demostrado que un inhibidor selectivo de la isoenzima tipo 2 de la 5α -reductasa, denominado finasteride, es capaz de disminuir la DHT sérica hasta un 70% y se ha convertido hoy en día en el fármaco de elección para el tratamiento de la HPB (Gormley y col, 1992; Clark y col, 2004; Arena, 2013; Han y col, 2014).

Se han determinado diversos genes sobreexpresados en muestras de HPB, predominantemente en células fibroblásticas comparadas con las células epiteliales. La HPB y el cáncer de próstata se caracterizan por un crecimiento descontrolado de las células epiteliales, sin embargo el cáncer está frecuentemente asociado a numerosas anormalidades genéticas. La comparación de cambios en la expresión de genes entre HPB y cáncer nos provee una luz de cómo se da el proceso de estas patologías. Se ha demostrado que los genes sobreexpresados se encuentran frecuentemente en HPB, mientras que en cáncer existe una menor expresión de genes. Por ejemplo, podemos mencionar genes involucrados en el metabolismo hormonal como el receptor de progesterona (Fromont y col, 2004). Este perfil diferencial de la

expresión genética entre HPB y cáncer de próstata otorga las diferencias fundamentales entre el sobre crecimiento benigno y maligno de la próstata.

Se han realizado estudios en células epiteliales de próstata ventral de rata Con andrógenos sintéticos como el R1881, con efectos similares a DHT y que se une con gran afinidad a receptores de andrógeno de próstatas hiperplásicas, donde se han identificado diversos genes dependientes de andrógenos (Id1, Id3, IL-6, IGF-binding protein-2 y -3 y JunB), genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria (Asirvatham y col, 2006); la pérdida de la regulación de estos genes puede tener importantes consecuencias en la transformación celular. También se ha observado en próstata ventral, que DHT reprime la expresión de diversos inhibidores del ciclo celular, mientras que en líneas celulares cancerígenas inhibe la expresión de p53 (Nantermet y col, 2004); este es un gen supresor tumoral que desempeña una función importante en la apoptosis y el control del ciclo celular.

Bauman y col, (2006) señalan que la DHT puede metabolizarse a 3α -diol y a 3β -diol, siendo el primero un metabolito inerte y que este proceso de convertir DHT a 3α -diol es el principal o el que se da normalmente durante la etapa temprana de la vida del hombre. Sin embargo, a partir de los 50 años se da el proceso de conversión de DHT a 3β -diol con lo cual activarían los receptores a estrógenos tipo beta y por lo tanto aumentaría la proliferación celular a nivel epitelial causando cáncer de próstata, mientras que los receptores de andrógenos estarían ligados a HPB a nivel del estroma prostático.

Los estrógenos pueden ser elaborados también en el estroma prostático (Farnsworth y col, 1999), ya sea por la aromatasas o la enzima llamada 17β - hidroxisteroideshidrogenasa que fácilmente reduce a un estradiol más activo dentro del estroma prostático (Levine y col, 1997). En estudios *in vitro* Se ha determinado, que el receptor de estrógenos tipo alfa ($ER-\alpha$) activa el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en próstata (Stege y col, 1992), indicando una iniciación del proceso denominado angiogenesis mediado por el HIF-1 α (Lekas, 2006; Li, 2010). Es más, se ha determinado experimentalmente que el crecimiento de la próstata inducido con testosterona puede ser dirigido por el HIF-1 α para elevar los niveles de VEGF (Rudolfsson y Bergh, 2008).

Se ha relacionado la metilación del gen que codifica a los receptores alfa de estrógeno con el desarrollo de cáncer prostático y con el crecimiento de células epiteliales malignas. Este proceso ocurre en el 50 % de los individuos mayores de 60 años (Karas y col, 1998); esto es importante cuando se demuestra, en ratones, que los niveles de receptores alfa se incrementan a medida que el individuo envejece (Li y col, 2004). Debido a esto, las terapias con inhibidores de la metilación de los genes que expresan andrógenos se han vuelto promisorias (Fialova y col, 2013).

V- MODELO DE INDUCCION DE HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA

La inducción de la Hiperplasia prostática benigna en animales experimentales se realiza principalmente con la administración de andrógenos exógenos como el propionato de testosterona (Shin y col, 2012), que va a favorecer el incremento del

volumen prostático, a nivel macroscópico y el aumento del estroma prostático, a nivel microscópico. El modelo original para producir HPB en animales experimentales es la castración, esta cirugía se hace para disminuir los niveles intrínsecos de testosterona de los animales y luego de se les administra testosterona exógena para producir HPB (Jin y col, 2010, Chen y col, 2012, Lee y col, 2012).

En nuestro laboratorio hemos implementado un modelo para producir HPB sin necesidad de castrar a los animales, este modelo evita el estrés que produce la cirugía y se pueden obtener resultados fehacientes del desarrollo de HPB en solo 14 días de tratamiento, luego de la administración de enantato de testosterona (83 mg/kg) en los días 1 y 7 de tratamiento: estas dosis ya han sido establecidas tanto para ratas como para ratones (Gonzales y col, 2005, 2007, 2008; Gasco y col, 2007; Gonzales C, 2007; Gonzales C, 2012). Un objetivo sustancial en la presente investigación será evaluar si la HPB producida por el enantato de testosterona está asociada a inflamación, impacto que no ha sido evaluado en ratas Holtzman por ningún investigador.

VI- HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA E INFLAMACION

La Hiperplasia Benigna de Próstata (HPB), una patología muy común en varones mayores de 60 años y se caracteriza clínicamente por un incremento del tamaño de la próstata y síntomas en el tracto urinario bajo (LUTS). Esta enfermedad se convierte en una carga para la salud pública. Su patogénesis no está completamente entendida y puede conducir a disfunción eréctil (Park y col, 2013). Los cambios hormonales locales y sistémicos relacionados a la edad y los cambios vasculares aparecen como

representantes de los mecanismos predominantes para el desarrollo de la HPB. Sin embargo un gran número de evidencias sugiere que la inflamación puede jugar un rol importante en el desarrollo y progresión de la enfermedad y los síntomas del tracto urinario bajo (Ficarra, 2013; Wong y col, 2014). Clínicamente, diversos estudios han propuesto que existe una relación entre la presencia de infiltrados o citoquinas inflamatorias y un aumento del volumen de la próstata. Di Silverio y col (2003) reportaron una correlación positiva entre el incremento de la inflamación crónica y un aumento del volumen de la próstata, de 9% en próstatas de 30 – 39 ml y a más de 60% en próstatas de 80 – 89 ml. Una menor correlación fue observada entre la presencia de inflamación crónica y síntomas del tracto urinario bajo en varones que participaron en un ensayo para probar una droga llamada dutasteride, un inhibidor de la 5- α reductasa (Nickel y col, 2008).

Investigaciones recientes sobre la patogénesis de la HPB señalan una marcada expresión diferencial de citoquinas y factores de crecimiento en tejidos con HPB sugiriendo un rol para la inflamación y propagación de la HPB (Lee y col, 2004; Untergasser y col, 2005; Bouraoui y col, 2008; Penna y col, 2009; Fibbi y col, 2010). Un estudio documentado por Kramer y col (2006) señala el gran impacto de la inflamación sobre la patogénesis de la HPB. Los infiltrados inflamatorios crónicos, principalmente compuestos por marcadores como células T CD4, CD8 y CD20 activados correlacionan con la expresión de andrógenos (Wu y col, 2012), esto puede contribuir con el desarrollo de la HPB.

La migración de células T en el área estromal prostática está acompañada por un incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias entre la que destaca el TNF- α (Handisurya y col, 2001; Kramer y col, 2006; Steiner y col, 1994, 2002, 2003; Ponomareva y col, 2013), además se han realizado estudios histológicos de próstatas hiperplásicas, donde frecuentemente se encuentran infiltraciones inflamatorias crónicas, compuestas principalmente de células T y macrófagos (Manzarbeitia y col, 2010).

Un estudio realizado en muestras de tejidos provenientes de hiperplasia benigna de próstata de sujetos senescentes, demostró alteración en los niveles de IL-4 (Vital y col, 2014), un desbalance en los niveles séricos de esta citoquina fue evaluado también en sujetos con cáncer prostático (Tazaki y col, 2011). Otro estudio demostró que los niveles intracelulares de IL-4 en linfocitos de sujetos con HPB y con cáncer de próstata se alteran con respecto a sujetos sanos (Sotosek y col, 2011), estas evidencias señalan la importancia de evaluar esta citoquina y determinar su rol en la inflamación ejercida por un andrógeno aplicado exógenamente para producir HPB.

La patogénesis de la HPB aun es incierta, sin embargo los estudios señalados anteriormente sugieren un papel importante de la inflamación en la progresión de la enfermedad. A pesar que se conocen las causas de la HPB, se sabe que el efecto final de la inflamación crónica es un entorno anormal rico en citoquinas, las cuales pueden conducir a alteraciones en el microambiente, daño repetitivo crónico y producir el desarrollo de HPB (Kramer y col, 2006; Manzarbeitia y col, 2010). Otras

investigaciones son necesarias para dilucidar el mecanismo de la respuesta inmune sobre la generación de la HPB.

VII- HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA Y PRODUCTOS NATURALES

Si bien es cierto aun no se conoce exactamente la patogénesis de la enfermedad, en los últimos tiempos se viene dando una alternativa para aliviar los síntomas de la HPB mediante el uso de plantas medicinales. Incluso en la literatura científica encontramos una gama de reportes que refuerzan el conocimiento tradicional del uso de las plantas sobre la HPB (Mitra y col, 1999; Wilt y col, 2000; Chinni y col, 2001; Mc Connell, 2002; Wu y col, 2002, 2003, 2004; Martinez-Caballero y col, 2004; Schleich y col, 2006; Dedhia y col, 2008; Steinbrecher y col, 2010; Chen y col, 2012; Aggarwal y col, 2014).

En diversos estudios realizados en nuestro Laboratorio de Endocrinología y Reproducción de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, se ha determinado que la maca roja inhibe la HPB en animales experimentales (Gasco, 2005; Gasco y col, 2006, 2007; Gonzales y col, 2005, 2006, 2008; Gonzales C, 2007; Gonzales C y col, 2012). En estos trabajos se demuestra los efectos benéficos sobre la próstata de la maca en su variedad roja, planta netamente peruana. Los diversos estudios experimentales en animales inducidos a HPB realizados en nuestro laboratorio, confirman los resultados iniciales, incluyendo el efecto dosis-respuesta (Gasco y col, 2007) de maca roja sobre la HPB. En este trabajo

se observó además que el finasteride reduce el peso de la próstata y de las vesículas seminales, efecto que no se observó con la maca roja. Este solo afecta a la glándula prostática lo que se sugiere un probable mecanismo de acción de la planta sobre la HPB, simulando un efecto diferencial entre la próstata y las vesículas seminales. En otro trabajo de diseño similar se ha determinado que hay una correlación directa entre la concentración de glucosinolatos en el extracto hidroalcohólico de maca roja y la disminución del peso de próstatas con HPB (Gonzales y col, 2006). En este estudio se confirma el efecto inhibitorio de la maca roja sobre el crecimiento patológico prostático mas no de las vesículas seminales, a diferencia del finasteride, fármaco utilizado como control positivo.

Debido a estos hallazgos, se plantea evaluar si el efecto hiperplásico que causa el enantato de testosterona está asociado a la inflamación, tanto en próstata como en vesículas seminales, lo cual se verá reflejado en el número de células inflamatorias y la citoquina proinflamatoria TNF- α . Luego determinar si el tratamiento con finasteride y el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja revierten el efecto inflamatorio producido por el enantato de testosterona y de esta manera dilucidar un mecanismo fisiológicos de la acción inhibitoria del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja sobre la HPB.

VIII- JUSTIFICACIÓN

El estudio se justifica en la necesidad de aproximarnos al o los mecanismos de acción que tiene la maca roja sobre la hiperplasia prostática benigna; particularmente si tiene acción sobre el proceso inflamatorio inducido por la administración de testosterona exógena y tratar de encontrar las razones por la cual la maca roja tiene un efecto diferencial al del inhibidor de la 5 alfa reductasa (Finasteride), el cual actúa tanto en próstata como en vesículas seminales.

IX- PREGUNTAS DE INVESTIGACION

9.1 PREGUNTA CENTRAL

¿Existen acciones diferenciales del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja y el finasteride en la inflamación causada por el enantato de testosterona al inducir a Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) en ratas?

9.2 PREGUNTAS SECUNDARIAS

- 1- ¿Qué efecto tiene el enantato de testosterona sobre el conteo de células inflamatorias en la próstata y en las vesículas seminales?
- 2- ¿Existe asociación entre el peso de la próstata y la inflamación?
- 3- ¿Qué efecto tiene el extracto hidroalcohólico de maca roja y el finasteride sobre el conteo de células inflamatorias en la próstata de ratas con HPB ante el estímulo con enantato de testosterona?

- 4- ¿Qué efecto tiene el enantato de testosterona sobre los niveles de TNF- α , IL-4 e INF- γ en próstata y vesículas seminales de ratas con HPB y cual es el efecto de los tratamientos con finasteride y maca roja?
- 5- ¿Cómo se modifican los niveles de testosterona y estradiol en próstata de los grupos control, tratado con enantato de testosterona, finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja.
- 6- ¿Cómo es la correlación o asociación entre células inflamatorias y citoquinas en próstata y vesículas seminales estimulados con enantato de testosterona y tratados con finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja?

X- OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos diferenciales en próstata y vesículas seminales del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja y el finasteride en la inflamación ocasionada por el enantato de testosterona (ET) al inducir Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) en ratas adultas de la cepa Holtzman.

10.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Comprobar que ha ocurrido HPB, mediante la evaluación de los pesos, el área del estroma y el conteo de células inflamatorias.

- 2- Determinar la asociación entre el peso de la próstata y de las vesículas seminales con la inflamación y evaluar el efecto de los tratamientos con finasteride y el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja.
- 3- Determinar el efecto del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja y el finasteride sobre el conteo de células inflamatorias en la próstata y en las vesículas seminales de ratas con HPB ante el estímulo con enantato de testosterona.
- 4- Determinar la asociación entre los niveles de testosterona y TNF- α , IL-4 e INF- γ en próstata y vesículas seminales de los grupos control y tratado con enantato de testosterona.
- 5- Determinar el efecto del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja y el finasteride sobre los niveles de TNF- α , IL-4 e INF- γ en próstata y vesículas seminales de ratas con HPB ante el estímulo con enantato de testosterona.
- 6- Evaluar los cambios de testosterona y estradiol en próstata de los grupos control, tratado con enantato de testosterona, finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja.
- 7- Determinar la correlación o asociación entre células inflamatorias y citoquinas en próstata y vesículas seminales estimulados con enantato de testosterona y tratados con finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja.

XI- HIPÓTESIS CENTRAL

“El extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja disminuye la Hiperplasia Prostática Benigna a través de la inhibición del proceso inflamatorio inducido por el enantato de testosterona, asociado a la disminución de células inflamatorias y a la modulación de citoquinas.

XII-METODOLOGÍA

12.1 Preparación del extracto hidroalcohólico

La maca roja seca fue obtenida de su lugar de origen en la ciudad de Junín (4100 msnm), esta fue evaluada previamente por una botánica del Departamento de Ciencias Biológicas y Fisiológicas de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Dra. Irma Fernandez, el voucher designado fue el IFV 1885.

Un kilogramo de hipocótilos secos de maca roja fue molido y luego macerados en etanol al 70% durante 72 horas, posteriormente todo este macerado fue filtrado y el líquido o extracto fue sometido a un proceso de secado por atomización, que mantiene las propiedades físico-químicas de cualquier producto natural. El rendimiento fue de 0.3 kilogramos de extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja, a partir de aquí se realizaron las preparaciones de las dosis a ser administradas a los animales de experimentación.

12.2 Animales de experimentación

La especie animal utilizada en este trabajo de investigación fue *Rattus norvegicus* de la cepa Holtzman de 3 meses de edad. Estas fueron obtenidas del bioterio central de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y mantenidos en un número de 6 animales por jaula; las horas de luz y oscuridad fueron programadas de 12 horas para cada período, el ambiente estuvo a una temperatura constante de 22 °C, el alimento

balanceado fue obtenido de la Fábrica Purina (Papeadito Super Premium), el mismo que fue consumido en forma *ad-libitum* al igual que el agua en bebederos, el estudio experimental se llevó a cabo durante los meses de Junio a Setiembre. Tanto el mantenimiento de los animales como la eutanasia (método de decapitación) y los diferentes procedimientos realizados en esta tesis contaron con la aprobación del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales - CIEA de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código SIDISI: 00059655). El cuidado de los mismos se realizó de acuerdo a la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (National Research Council, 1996).

12.3 Diseño experimental

Se formaron 5 grupos de experimentación, de 6 animales cada uno (n=30 en total), cuyos pesos corporales fluctuaron entre 300 y 350 gramos:

Grupo 1 (CONTROL): se le administró agua como el vehículo del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja vía oral y propelinglicol, el vehículo de la testosterona, vía intramuscular

Grupo 2 (ET): se le administró Enantato de testosterona (ET) (®Testoviron, BAYER) en dos dosis de 83 mg/kg vía i.m. (Gasco y col, 2007) y agua destilada por vía oral en forma simultánea como vehículo del finasteride y del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja.

Grupo 3 (ET+F): se le administró ET en dos dosis de 83 mg/kg vía i.m. más finasteride (®Fasterid, MEDROCK) vía oral en una dosis diaria de 0.6 mg/kg en forma simultánea.

Grupo 4 (ET+MR40): se le administró ET en dos dosis de 83 mg/kg vía i.m. más extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja vía oral en una dosis diaria de 133 mg/kg en forma simultánea.

Grupo 5 (ET+MR80): se le administró ET en dos dosis de 83 mg/kg vía i.m. más extracto hidroalcohólico atomizado maca roja vía oral en una dosis diaria de 266 mg/kg en forma simultánea.

El tratamiento con finasteride y con extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja fue durante 84 días, las dosis de ET solo se dieron los días 1 y 7 para causar la HPB, en el día 85 se evaluó el peso de la próstata y vesículas seminales.

12.4 Medición de Testosterona y Estradiol intraprostáticos.

Las mediciones hormonales de T y E2 intraprostáticos en todos los grupos de experimentación fueron determinadas por el método descrito por Kubota y col. (2003) con algunas modificaciones. Un lóbulo de la próstata ventral, luego de registrar su peso, fue homogenizado en un tubo de vidrio con 5 ml de solución fisiológica (NaCl al 0.9%, pH=7.4), luego se colocó el homogenizado en un sonicador durante 30 minutos a 37°C para facilitar la rotura de las membranas

celulares. Se centrifugó el homogenizado durante 25 minutos a 1000g, posteriormente 2 ml del sobrenadante fueron separados y colocados en un frasco para ser mezclado con 2 ml de eter dietílico, se vertió en un tubo de ensayo y esta solución fue agitada en un mezclador (Scientific products, Illinois-USA) durante 2 minutos.

Se formaron 2 fases, una acuosa y otra insoluble u orgánica. Esta última contenía los compuestos esteroideos; y fue colocada en otro vial con ayuda de una micropipeta, el vial se cubrió con papel filtro y sulfato de sodio para evitar que pase alguna sustancia de la fase acuosa o polar. El vial que contenía la fase lipofílica filtrada fue colocado en un calentador eléctrico a 50 °C para evaporar el solvente y dejar en las paredes del vial a las sustancias esteroideas.

Las sustancias lipofílicas fueron resuspendidas en 1 ml de buffer incluido en el Kit para la medición hormonal por radioinmunoensayo, los siguientes procedimientos se realizaron de acuerdo a las especificaciones del Kit (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, USA), Los valores de testosterona fueron expresados en ng/próstata y los niveles de estradiol fueron expresados en pg/próstata. Los coeficientes de variación intraensayo no excedieron el 10% para ninguna de las hormonas.

12.5 Evaluación histológica y conteo de células inflamatorias

Para la realización de la evaluación histológica se realizó lo siguiente: se extrajo uno de los dos lóbulos de la próstata ventral y una mitad de la vesícula seminal, luego de pesarlos, fueron colocados en solución Bouin (cada órgano en un vial diferente)

durante 24 horas. Posterior a este tiempo, la solución fue retirada y fue reemplazada por etanol al 70%; se prepararon diversos bloques de tejidos de 5 μm de espesor, la tinción fue realizada con Hematoxilina y Eosina (H&E), este procedimiento fue realizado en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

El análisis de las láminas fue realizado a ciegas, es decir que todo el material estaba codificado de tal manera que no se sabía a que grupo de tratamiento pertenecían las láminas. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico (Leica DM1000) a diferentes aumentos, tanto de 400X para observar estructuras y de 1000X para observar los diferentes tipos de células estructurales e inflamatorias. Las imágenes de las diferentes estructuras y tipos de células fueron capturadas con la ayuda de una cámara incorporada (Leica ICC50 HD, Richmond, BC, Canada) al microscopio y a un computador donde se observaron estas imágenes.

Se realizó el estudio cuantitativo de las células inflamatorias como neutrófilos, linfocitos y mastocitos tanto en próstata como en vesículas seminales, se valoraron 60 secciones o áreas escogidas al azar por cada grupo de tratamiento, los conteos fueron expresados como: número de células inflamatorias $\times 10^3 \mu\text{m}^2$.

12.6 Determinaciones de Citoquinas en homogenizados de próstata y vesículas seminales

Los niveles de citoquinas fueron evaluados de acuerdo a Tsunemori (2011) y se siguió el procedimiento de acuerdo a los manuales de los diferentes Kits comerciales

de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para ratas utilizados para cada una de las citoquinas, TNF- α (RAT TNF BD OptEIA™), IL-4 (RAT IL-4 BD OptEIA™) e INF- γ (RAT INF- γ BD OptEIA™). Los homogenizados de las próstatas y las vesículas seminales se realizaron respetando la cadena de frío (4 °C) desde que fueron extraídas del animal hasta la homogenización en un buffer conteniendo PBS 0.5%, Triton X-100, un inhibidor de proteasas (13 ul/ml) y suero fetal de bovino (a pH=7.2). Se centrifugó este homogenizado a 3000 rpm por 15 min, luego el sobrenadante fue recolectado y almacenado a -70 °C hasta su evaluación. Las lecturas de todas las placas de ELISA se realizaron en un espectrofotómetro ELX 800UV Universal Microplate Reader – Biotec Instruments INC. Se corrigieron los valores de los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de los homogenizados de órganos por la cantidad total de proteínas encontradas en los mismos, el método utilizado fue el de Lowry y finalmente se corrigió por el peso de la próstata y las vesículas seminales.

12.7 Análisis Estadísticos

Para los análisis estadísticos se tuvo en cuenta las variables independientes que corresponde a los diferentes tratamientos (Control, ET, ET+F, ET+MR40 y ET+MR80) y las variables dependientes (T, E2, TNF- α , INF- γ e IL-4).

Los datos fueron ingresados a una base de Excel y posteriormente se evaluó en el programa estadístico SPSS versión 15.0. Los resultados son presentados como media \pm error estándar. Se evaluó la homogeneidad de varianzas mediante el test de

Bartlett. Si las varianzas fueron homogéneas, las diferencias entre los grupos fueron analizadas mediante el test de ANOVA (Análisis de varianza). Si el valor F en la prueba de ANOVA es significativa, la diferencia entre las medias fue medida por el test de Scheffé, esta es una prueba de comparaciones múltiples que evita el error tipo I y compara todos los pares de medias donde hay distintos grupos de investigación. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados significantes.

Para la realización de las correlaciones y regresiones entre distintas variables cuantitativas para demostrar el efecto de la testosterona en la inflamación se utilizó el paquete estadístico STATA, versión 10.0, así como también el análisis multivariado para determinar si hay efecto del tratamiento en el número de células inflamatorias, controlado por niveles de testosterona.

XIII- RESULTADOS

13.1 Determinación del peso de la próstata y de las vesículas seminales luego de la administración de enantato de testosterona en ratas inducidas a HPB.

En la figura 6 se observan los valores del peso de la próstata ventral y de las vesículas seminales en animales tratados durante 84 días con el vehículo (control) o con enantato de testosterona (ET) (Día 1 y día 14). El peso de la próstata ($P<0.05$) y de las vesículas seminales ($P<0.05$) fueron mayores en los animales tratados con ET que en aquellos que recibieron el vehículo. Cuando el peso del órgano es corregido por el peso corporal del animal se observa la misma respuesta, el peso de la próstata (mg/Kg peso corporal) ($P<0.05$) y el de vesículas seminales (mg/Kg peso corporal) ($P<0.05$) es mayor con el tratamiento de ET comparado con el observado con el vehículo (grupo control) (Figura 7).

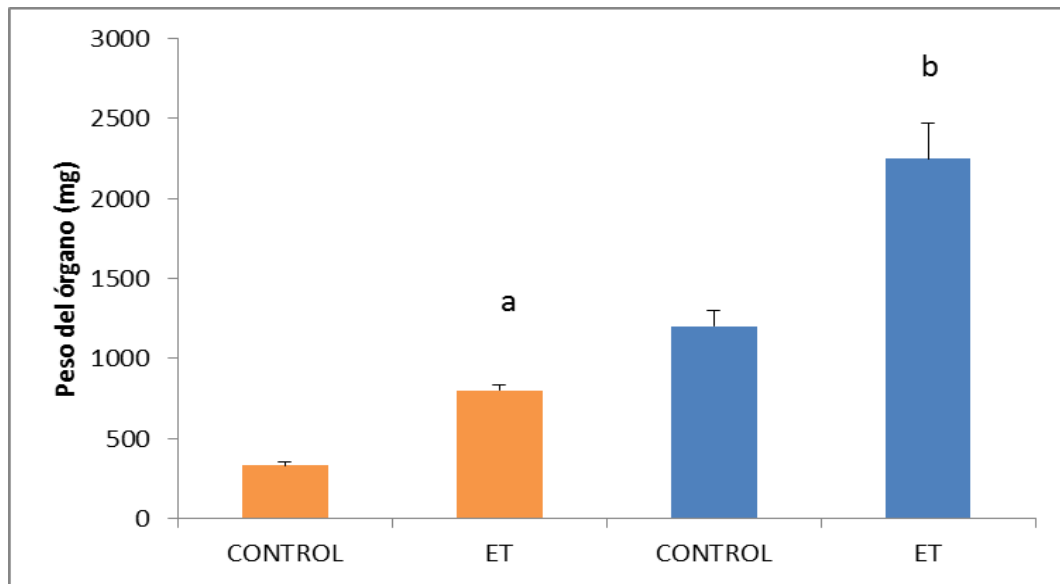


Figura 6. Peso prostático (mg) (en naranja) y de las Vesículas Seminales (mg) (en azul) de ratas luego de 84 días de tratamiento con el vehículo (Control) o con enantato de testosterona (ET). Los valores están expresados como medias y sus errores estándar. ^aP<0.05 respecto al peso control de la próstata. ^bP<0.05 respecto al peso control de las vesículas seminales.

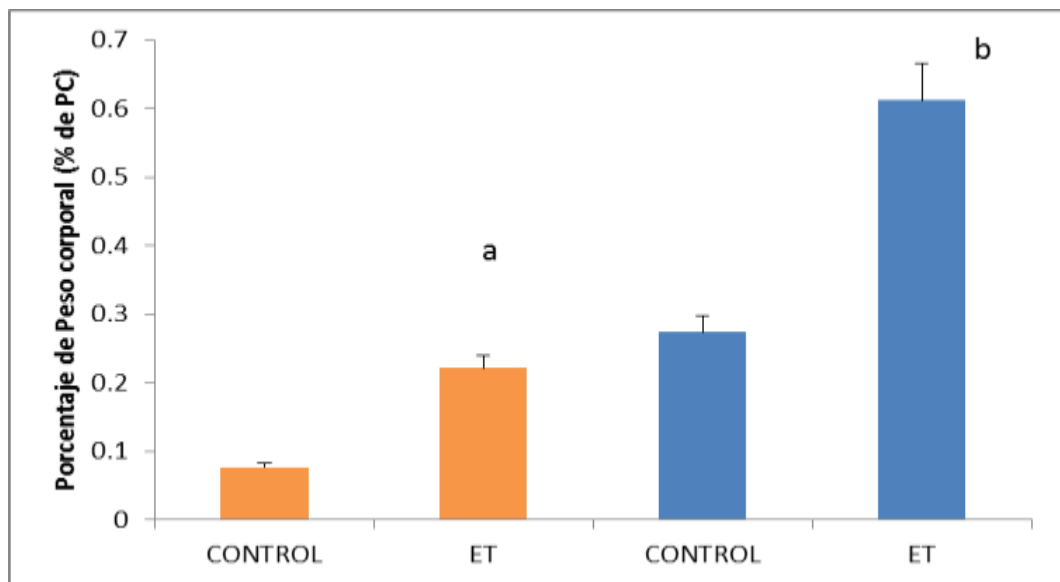


Figura 7. Peso prostático y de las vesículas seminales corregidos por el peso corporal de ratas luego de 84 días de tratamiento con el vehículo (Control) o con enantato de testosterona (ET). Los valores están expresados como medias y sus errores estándar. ^aP<0.05 respecto al peso control de la próstata. ^bP<0.05 respecto al peso control de las vesículas seminales.

13.2 Evaluación histológica

13.2.1 Histología de la glándula prostática

Se pudo observar en las muestras de próstata: el estroma y el epitelio pseudoestratificado glandular que forma parte de los acinos prostáticos. En el grupo tratado con ET se pudo reconocer la presencia de células inflamatorias en el estroma prostático como neutrófilos, linfocitos y mastocitos, los mismos que no se observaron en las muestras de los grupos tratados con ET más finasteride y ET más extracto hidroalcohólico de maca roja en sus dos dosis (Figura 8). El incremento del área estromal es el mejor marcador histológico para certificar que se ha producido Hiperplasia Prostática Benigna (Shen y col, 2012; Funahashi, 2014).

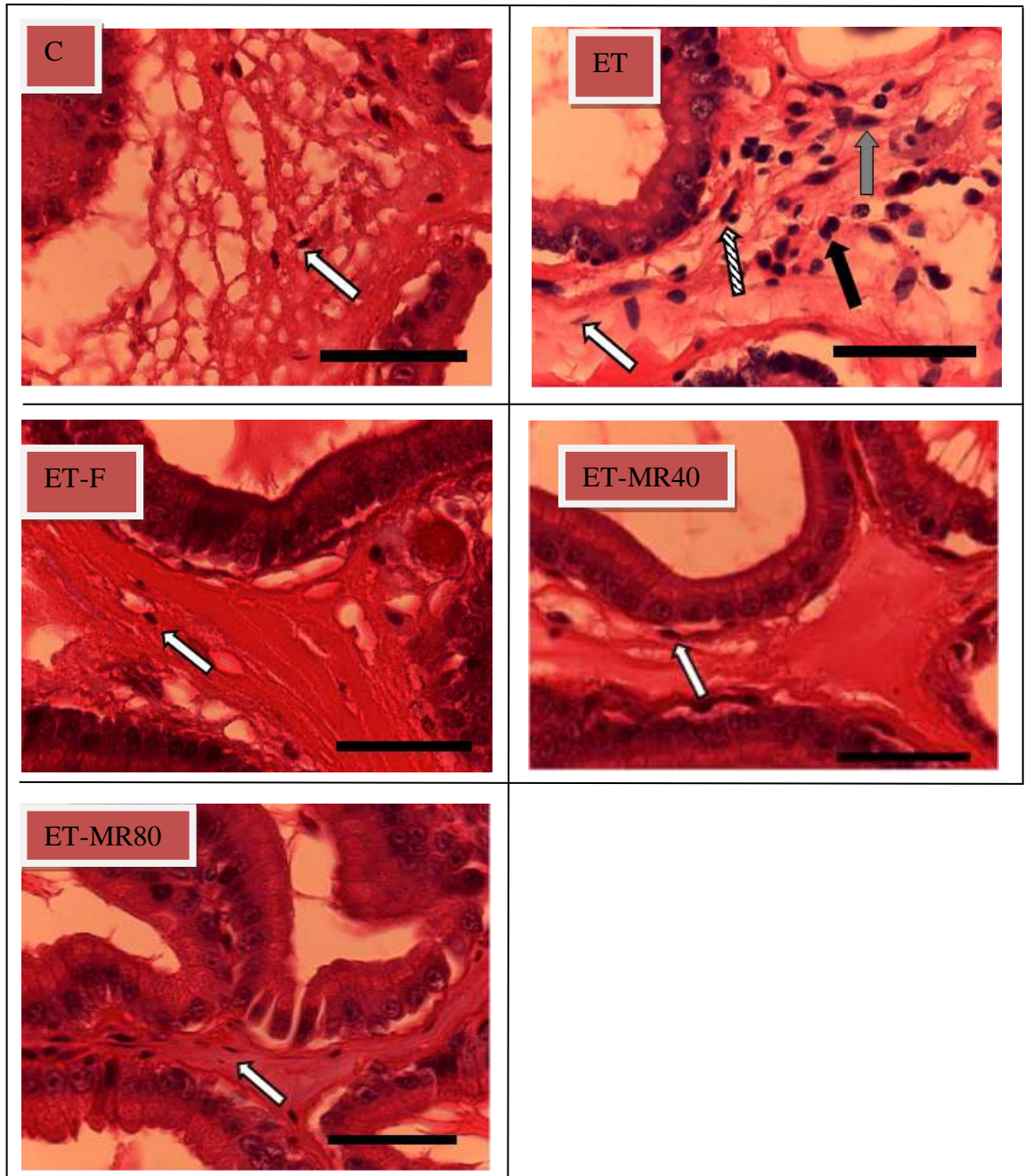


Figura 8. Microfotografías de tejido prostático, la flecha blanca señala el núcleo de la célula muscular lisa del estroma prostático, las flecha negra indica la presencia de neutrófilos, la flecha con rayas diagonales señala la presencia de linfocitos y la flecha ploma indica la presencia de mastocitos. Tinción H y E. La escala de la barra negra es de 20 μ m y una magnificación de 400X. C: Control, ET: Enantato de testosterona, ET-F: Enantato de testosterona más Finasteride, ET-MR40: Enantato de testosterona más maca roja (133 mg/kg) y ET-MR80: Enantato de testosterona más maca roja (266 mg/kg).

13.2.2 Histología de las vesículas seminales

En las muestras de Vesículas seminales Se pudo observar, la capa muscular rodeando al epitelio poliestratificado glandular. En el grupo tratado con ET se pudo reconocer la presencia de células inflamatorias en el estroma como neutrófilos, linfocitos y mastocitos, estos se observaron en menor magnitud en las muestras de los grupos tratados con ET más finasteride. En los grupos tratados con ET y el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja en sus dos dosis se observó la presencia también de células inflamatorias de forma similar el grupo ET (Figura 9).

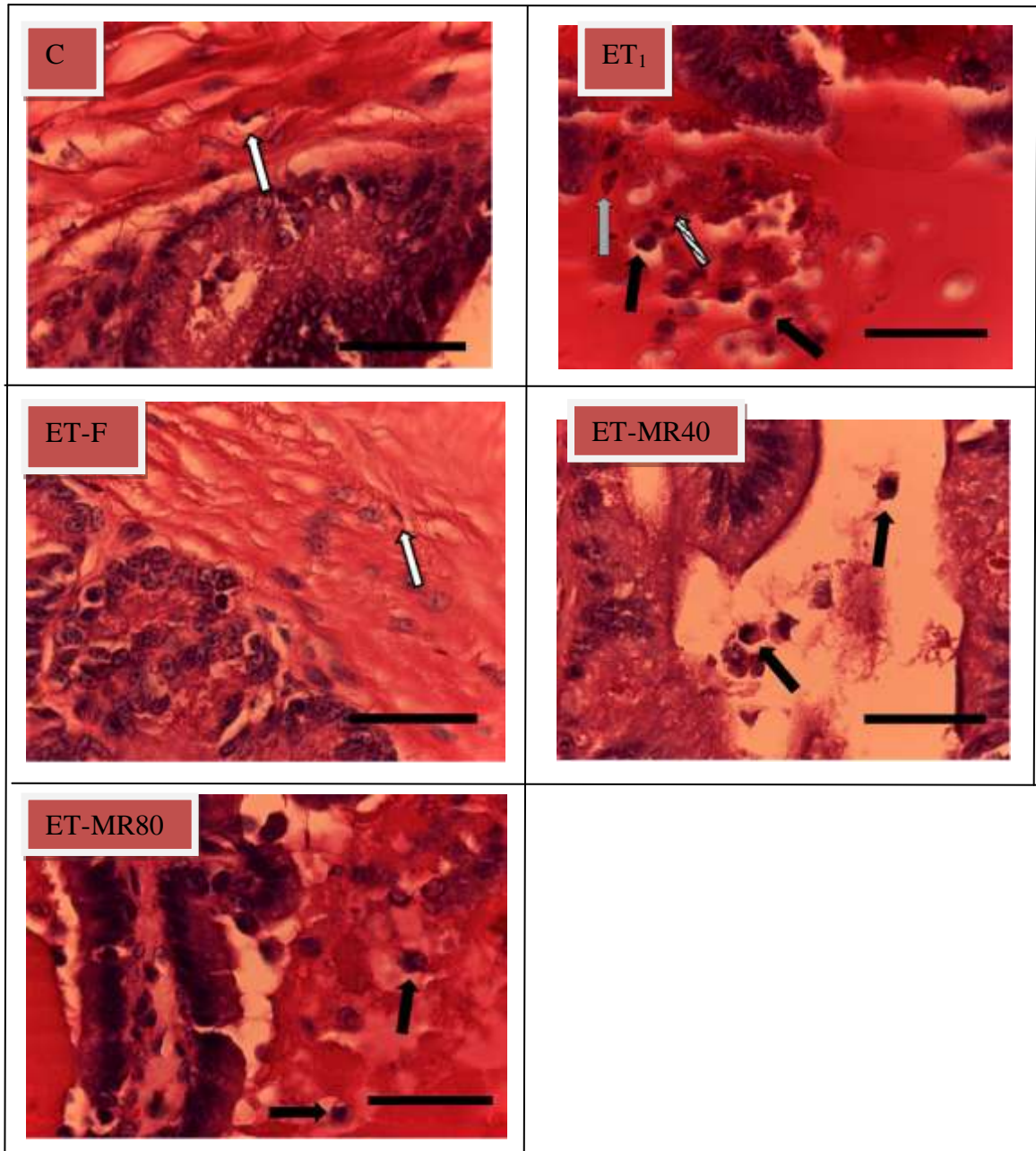


Figura 9. Microfotografías de tejido de Vesículas seminales, la flecha blanca señala el núcleo de la célula muscular lisa situada fuera del epitelio prismático secretor, la flecha negra indica la presencia de neutrófilos, la flecha con rayas diagonales señala la presencia de linfocitos y la flecha ploma indica la presencia de mastocitos. Tinción H y E. La escala de la barra negra es de 20 μ m. La magnificación es de 400X. C: Control, ET: Enantato de testosterona, ET-F: Enantato de testosterona más Finasteride, ET-MR40: Enantato de testosterona más maca roja (133 mg/kg) y ET-MR80: Enantato de testosterona más maca roja (266 mg/kg).

13.3 Determinación del efecto del enantato de testosterona sobre el conteo de células inflamatorias en la próstata y en las vesículas seminales.

Los resultados del conteo de células inflamatorias en próstata y vesículas seminales en el grupo control y en los que recibieron enantato de testosterona se encuentran en las Figuras 10 al 17.

El tratamiento con ET aumenta el número de células inflamatorias ($P < 0.05$) respecto al grupo tratado con vehículo o control tanto en próstata (Figura 10) como en vesículas seminales (Figura 14). Se observó una correlación positiva entre los niveles de testosterona y el número de neutrófilos ($P < 0.01$) (Figura 11), linfocitos ($P < 0.01$) (Figura 12) y mastocitos ($P < 0.05$) (Figura 13) en la próstata. En las vesículas seminales también se observaron correlaciones positivas entre los niveles de testosterona y el número neutrófilos ($P < 0.01$) (Figura 15), linfocitos ($P < 0.01$) (Figura 16) y mastocitos ($P < 0.01$) (Figura 17).

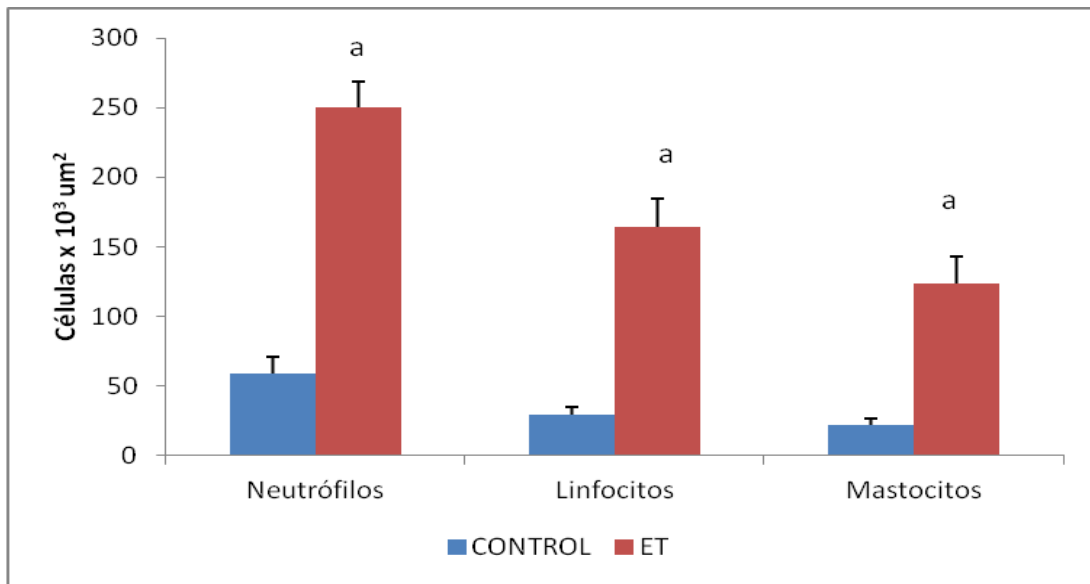


Figura 10. Conteo de células inflamatorias, neutrófilos, linfocitos y mastocitos, en próstata, en grupo vehículo (Control) y tratados con enantato de testosterona (ET). Los valores son expresados como medias y error estandar. ^aP<0.05 respecto al control.

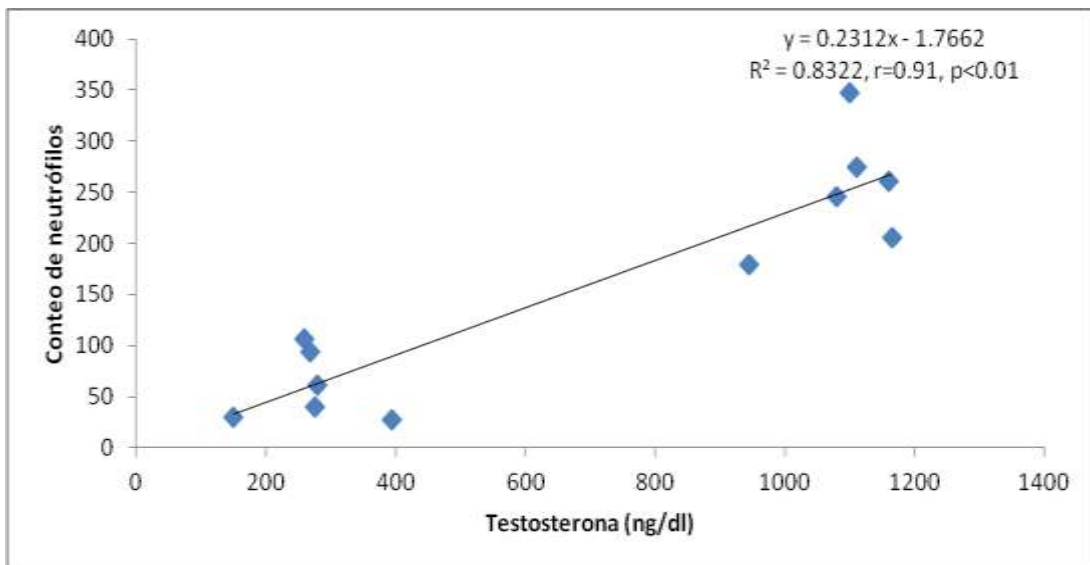


Figura 11. Análisis de correlación entre los niveles de testosterona y el conteo de neutrófilos prostáticos de los grupos control y tratados con enantato de testosterona, luego de 84 días.

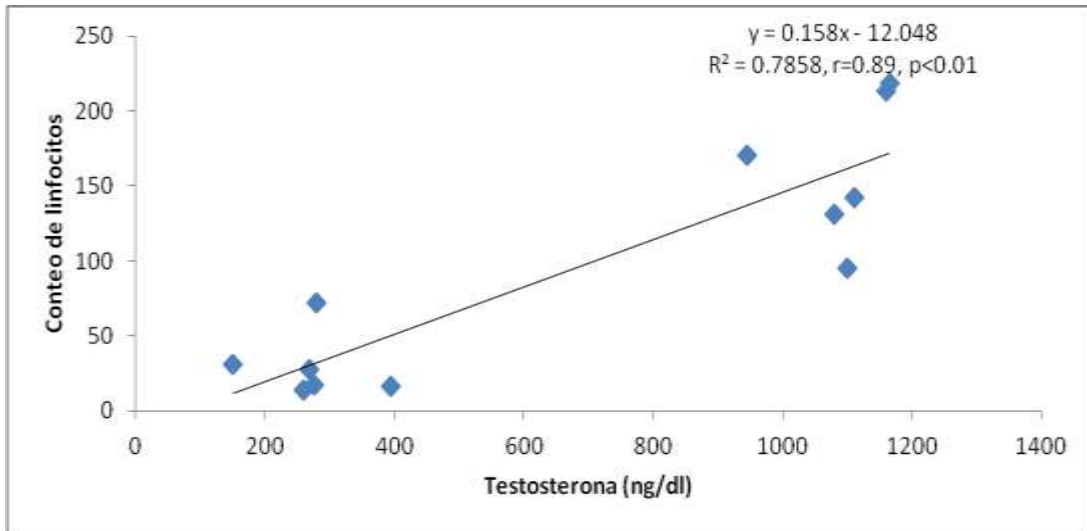


Figura 12. Análisis de correlación entre los niveles de testosterona y el conteo de linfocitos prostáticos de los grupos control y tratados con enantato de testosterona, luego de 84 días.

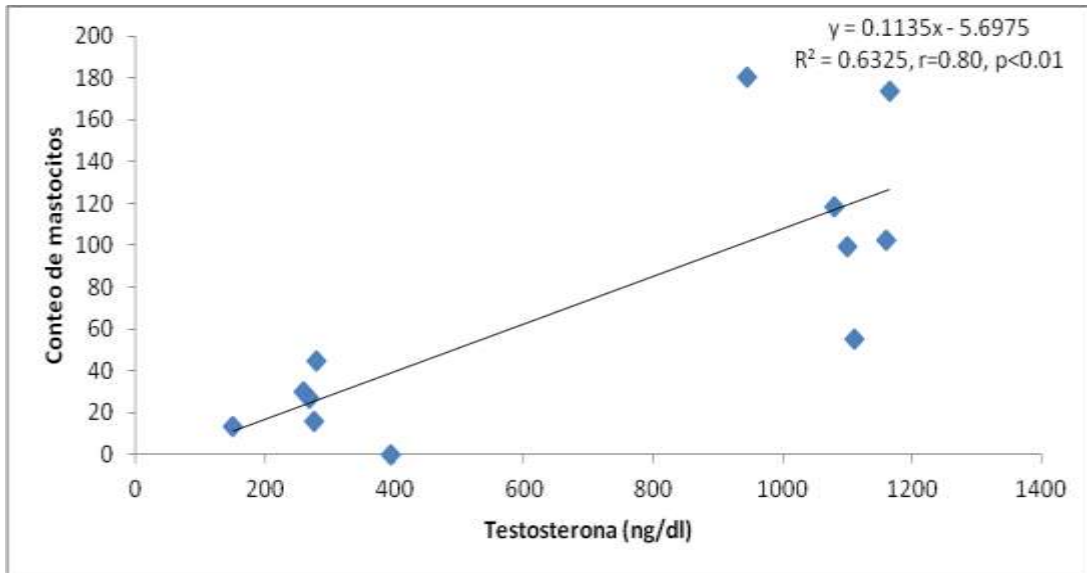


Figura 13. Análisis de correlación entre los niveles de testosterona y el conteo de mastocitos prostáticos de los grupos control y tratados con enantato de testosterona, luego de 84 días.

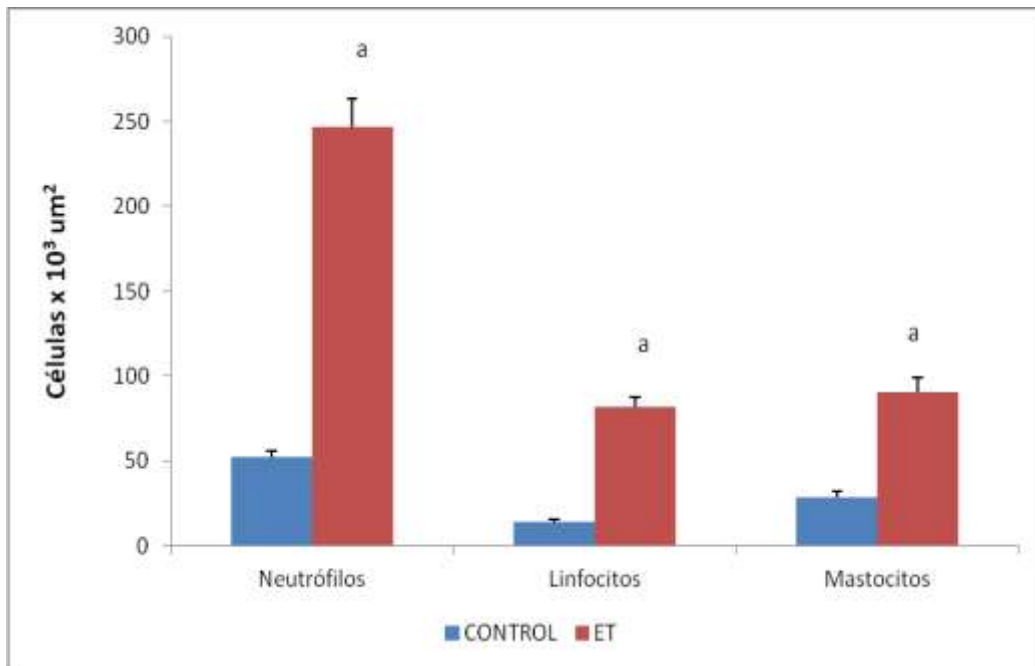


Figura 14. Conteo de células inflamatorias en vesículas seminales, neutrófilos, linfocitos y mastocitos en grupo vehículo (Control) y tratados con enantato de testosterona (ET). Los valores son expresados como medias y error estandar. ^aP<0.05 respecto al control.

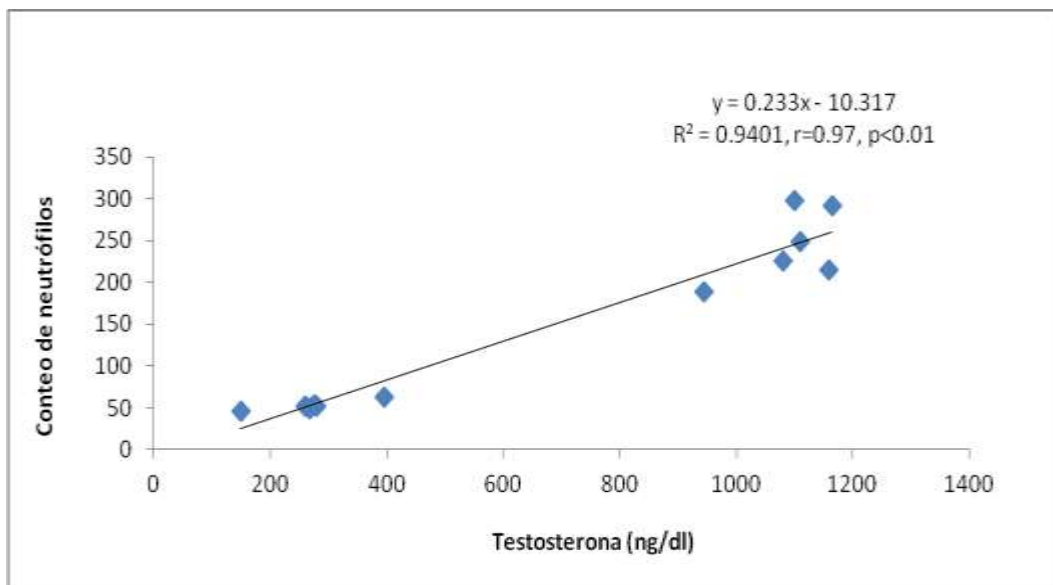


Figura 15. Análisis de correlación entre los niveles de testosterona y el conteo de neutrófilos de las vesículas seminales de los grupos control y tratados con enantato de testosterona, luego de 84 días.

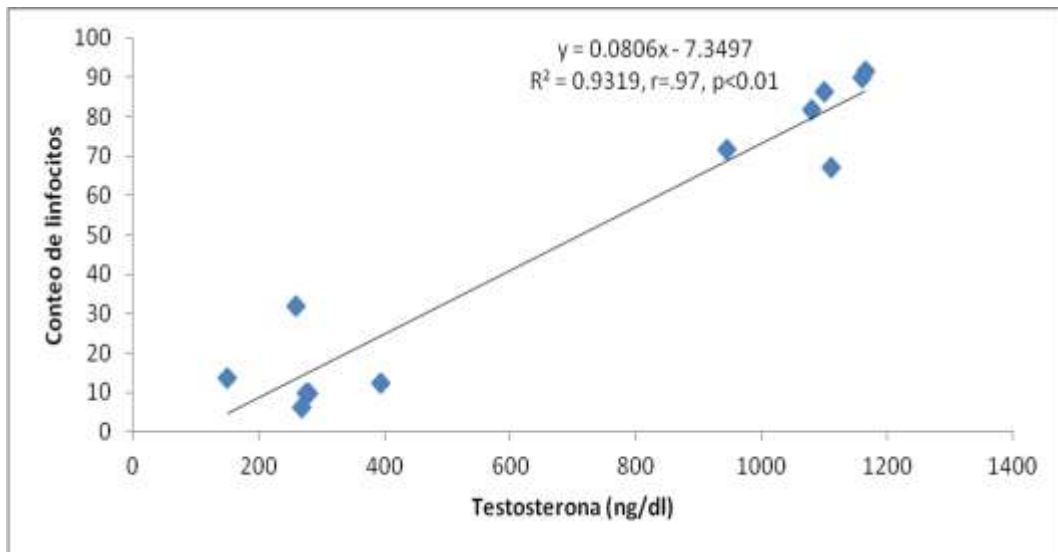


Figura 16. Análisis de correlación entre los niveles de testosterona y el conteo de linfocitos de las vesículas seminales de los grupos control y tratados con enantato de testosterona, luego de 84 días.

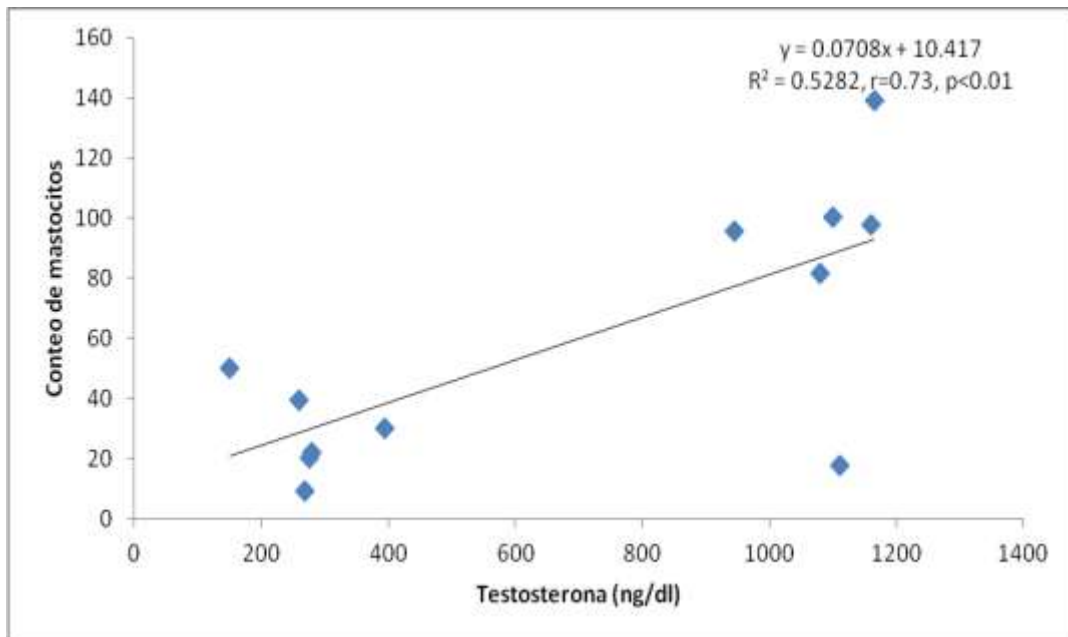


Figura 17. Análisis de correlación entre los niveles de testosterona y el conteo de mastocitos de las vesículas seminales de los grupos control y tratados con enantato de testosterona, luego de 84 días.

13.4 Determinación de la asociación entre el peso de la próstata y de las vesículas seminales con la inflamación y evaluación del efecto de los tratamientos con finasteride y el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja.

Los análisis de regresión entre el número de células inflamatorias y el peso prostático de los grupos control y tratados con enantato de testosterona indican que hay una relación directa entre el peso de la próstata y el conteo de neutrófilos ($P<0.01$) (Figura 18), linfocitos ($P<0.01$) (Figura 19) y mastocitos ($P<0.01$) (Figura 20). En el análisis de regresión realizado entre las células inflamatorias y el peso de las vesículas seminales se observaron relaciones directas de la misma forma que en la próstata, ya sea en neutrófilos ($P<0.01$) (Figura 21), linfocitos ($P<0.01$) (Figura 22) y mastocitos ($P<0.01$) (Figura 23).

Los análisis de regresión entre el número de células inflamatorias y el peso prostático de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, finasteride y el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja indican que hay una relación directa entre el peso de la próstata y el conteo de neutrófilos ($P<0.01$) (Figura 24), linfocitos ($P<0.01$) (Figura 25) y mastocitos ($P<0.01$) (Figura 26). En el análisis de regresión realizado entre las células inflamatorias y el peso de las vesículas seminales de los grupos: control, tratados con enantato de testosterona, finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja se observaron relaciones directas entre el peso de las vesículas seminales y el conteo de neutrófilos ($P<0.01$) (Figura 27), linfocitos ($P<0.01$) (Figura 28) y mastocitos ($P<0.01$) (Figura 29).

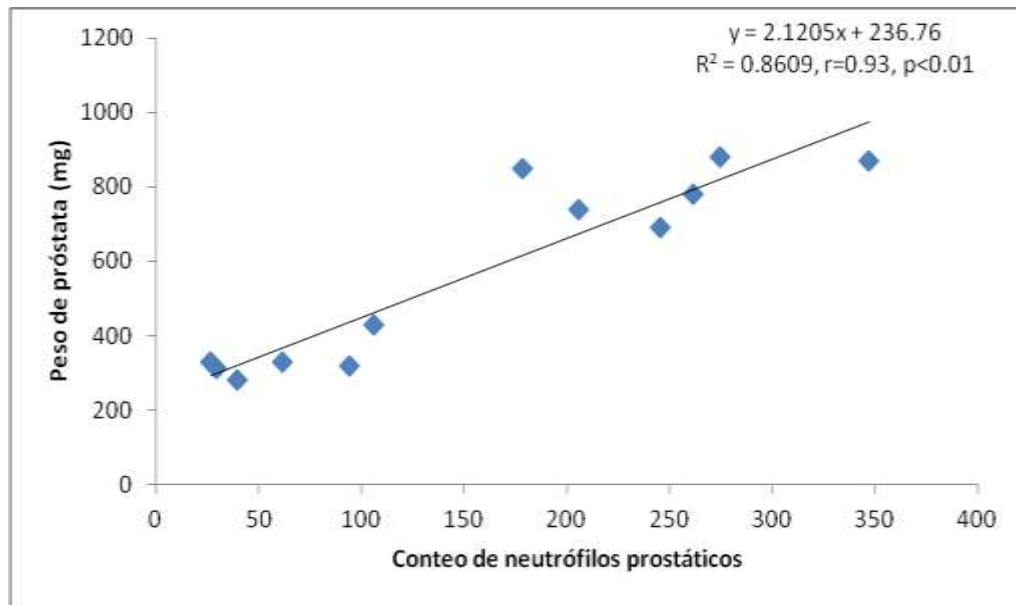


Figura 18. Análisis de correlación entre el conteo de neutrófilos prostáticos y el peso de de la próstata de los grupos control y tratados con enantato de testosterona, luego de 84 días.

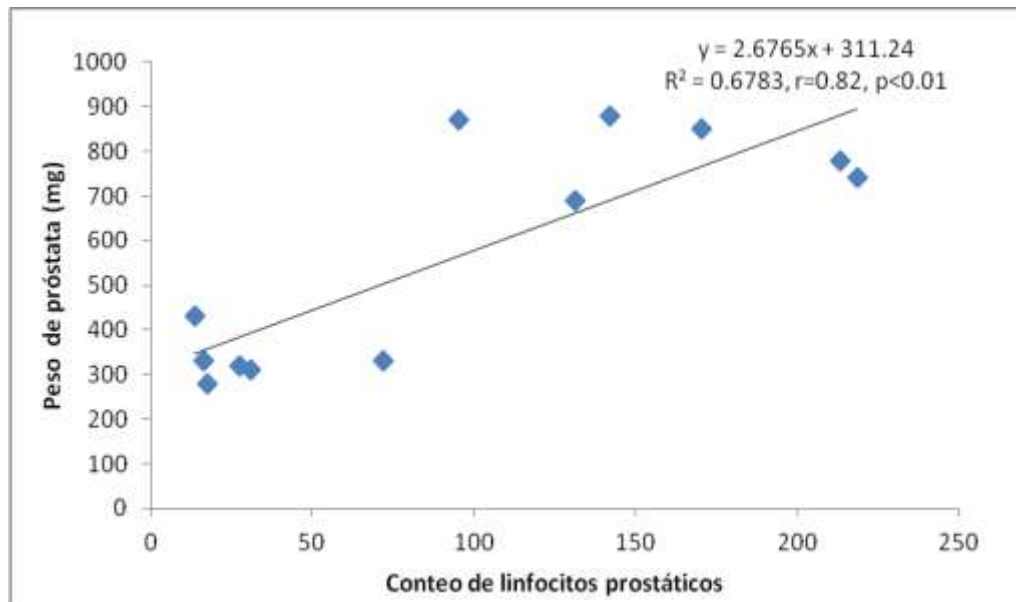


Figura 19. Análisis de correlación entre el conteo de linfocitos prostáticos y el peso de de la próstata de los grupos control y tratados con enantato de testosterona, luego de 84 días.

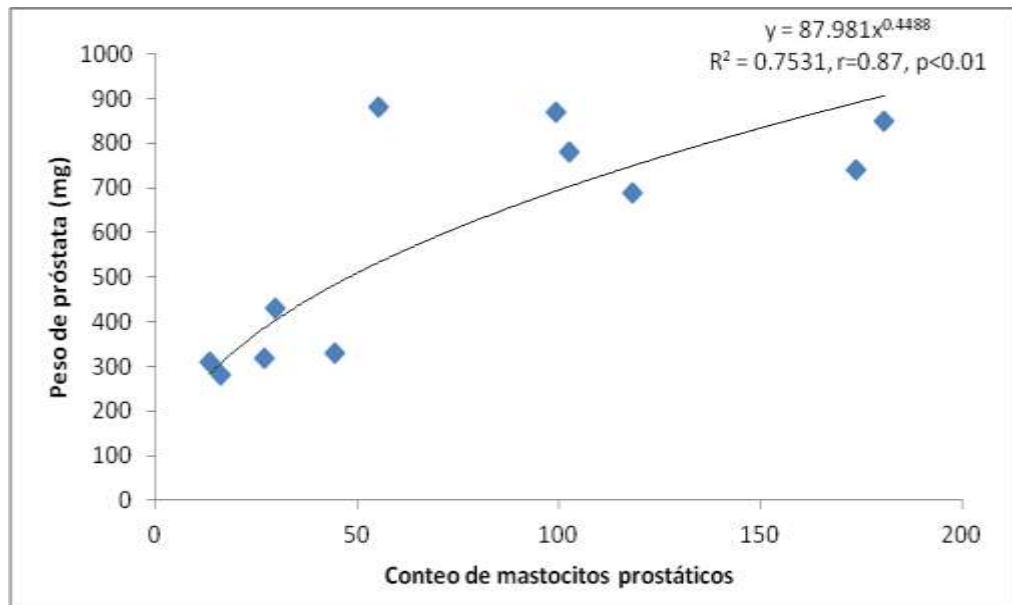


Figura 20. Análisis de correlación entre el conteo de mastocitos prostáticos y el peso de de la próstata de los grupos control y tratados con enantato de testosterona, luego de 84 días.

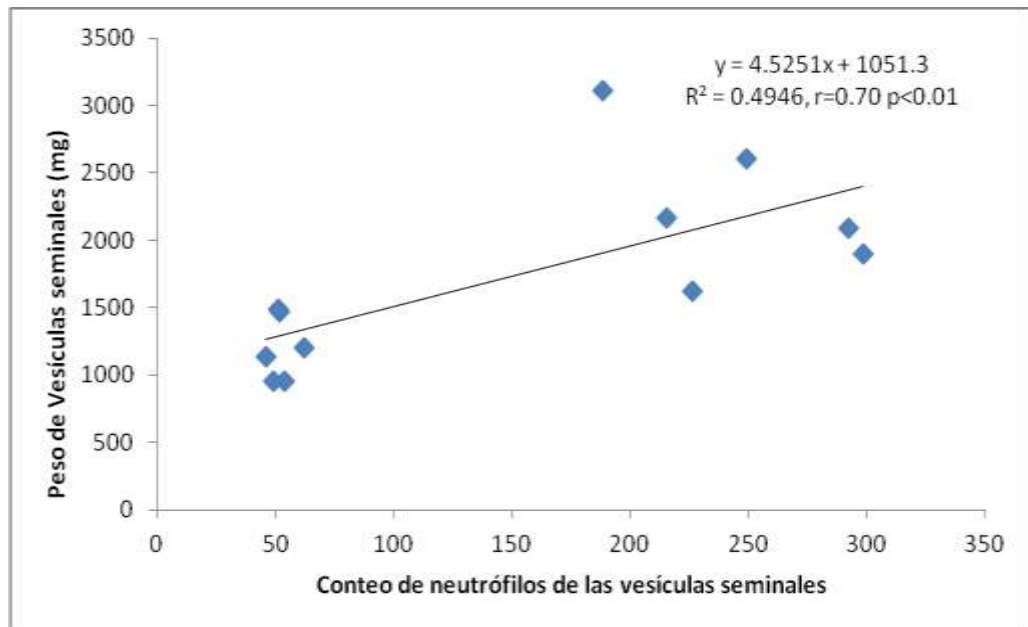


Figura 21. Análisis de correlación entre el conteo de neutrófilos de las vesículas seminales y el peso de las vesículas seminales de los grupos control y tratados con enantato de testosterona, luego de 84 días.

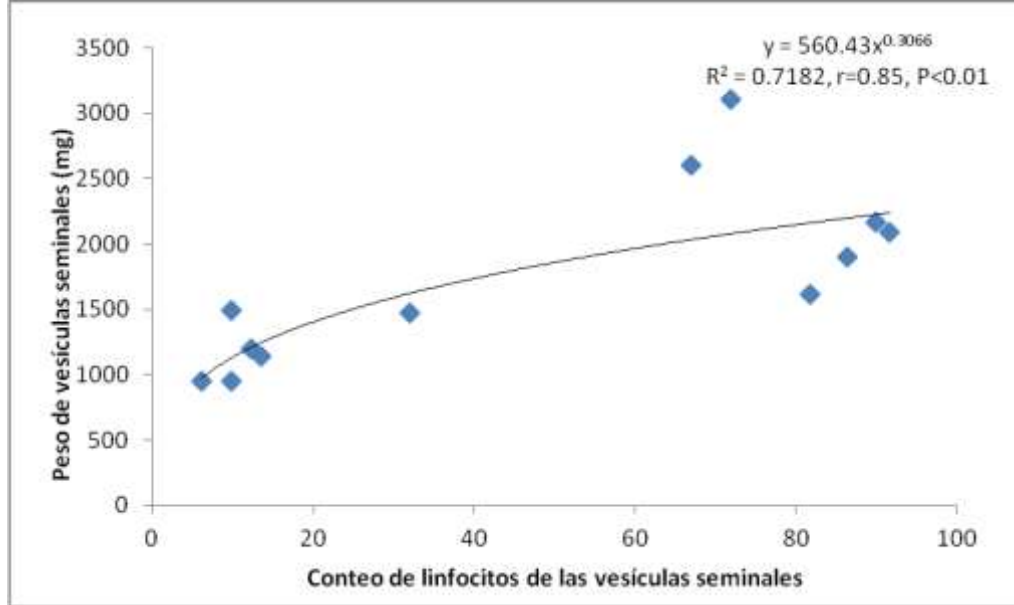


Figura 22. Análisis de correlación entre el conteo de linfocitos de las vesículas seminales y el peso de las vesículas seminales de los grupos control y tratados con enantato de testosterona, luego de 84 días.

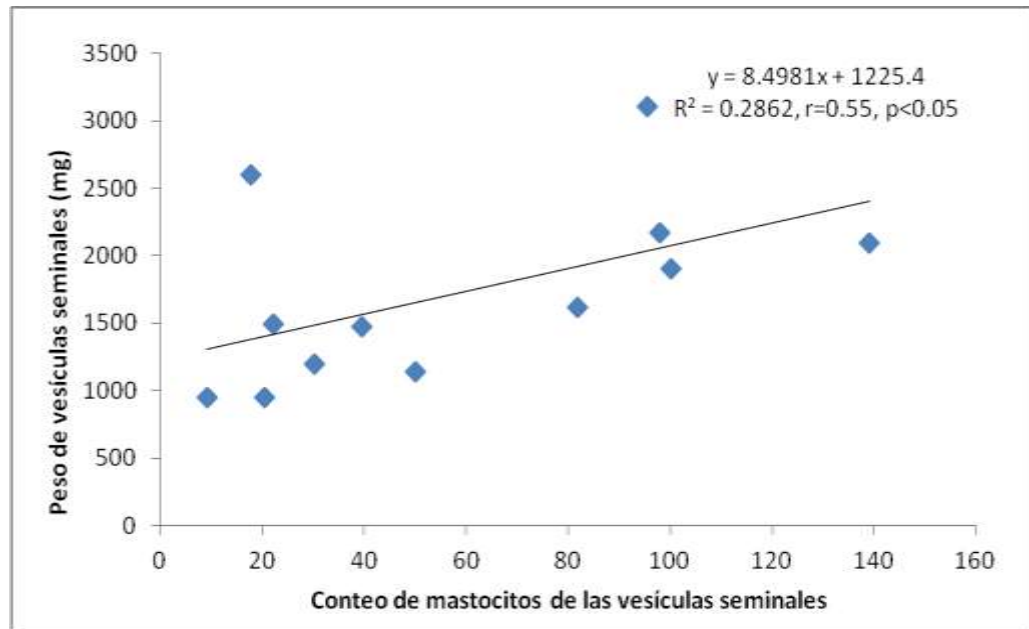


Figura 23. Análisis de correlación entre el conteo de mastocitos de las vesículas seminales y el peso de las vesículas seminales de los grupos control y tratados con enantato de testosterona, luego de 84 días.

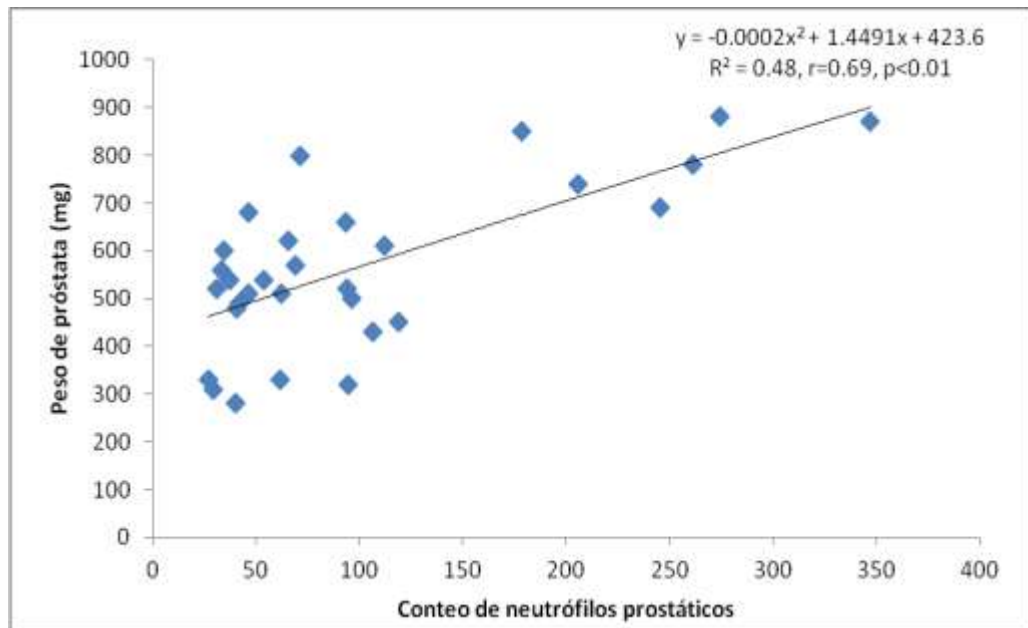


Figura 24. Análisis de correlación entre el conteo de neutrófilos prostáticos y el peso de la próstata de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y con extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja, luego de 84 días.

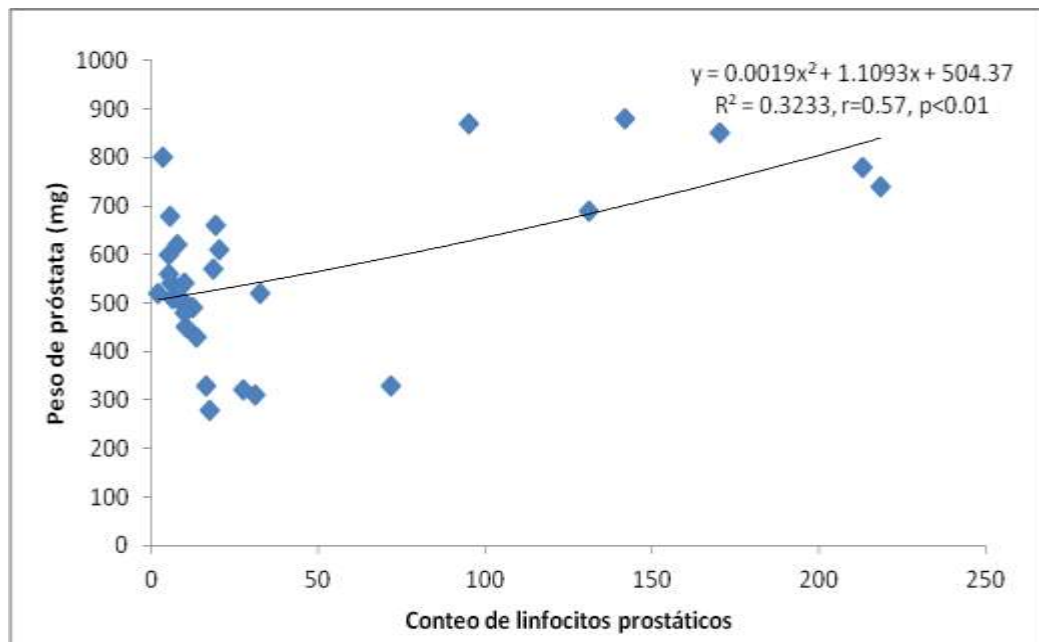


Figura 25. Análisis de correlación entre el conteo de linfocitos prostáticos y el peso de la próstata de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y con extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja, luego de 84 días.

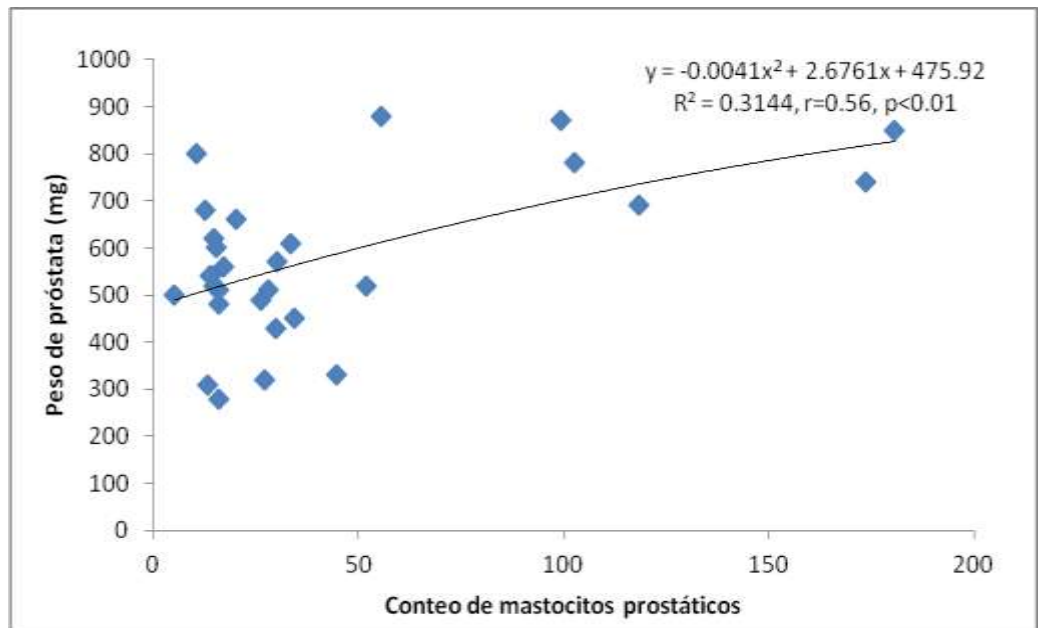


Figura 26. Análisis de correlación entre el conteo de mastocitos prostáticos y el peso de la próstata de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y con extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja, luego de 84 días.

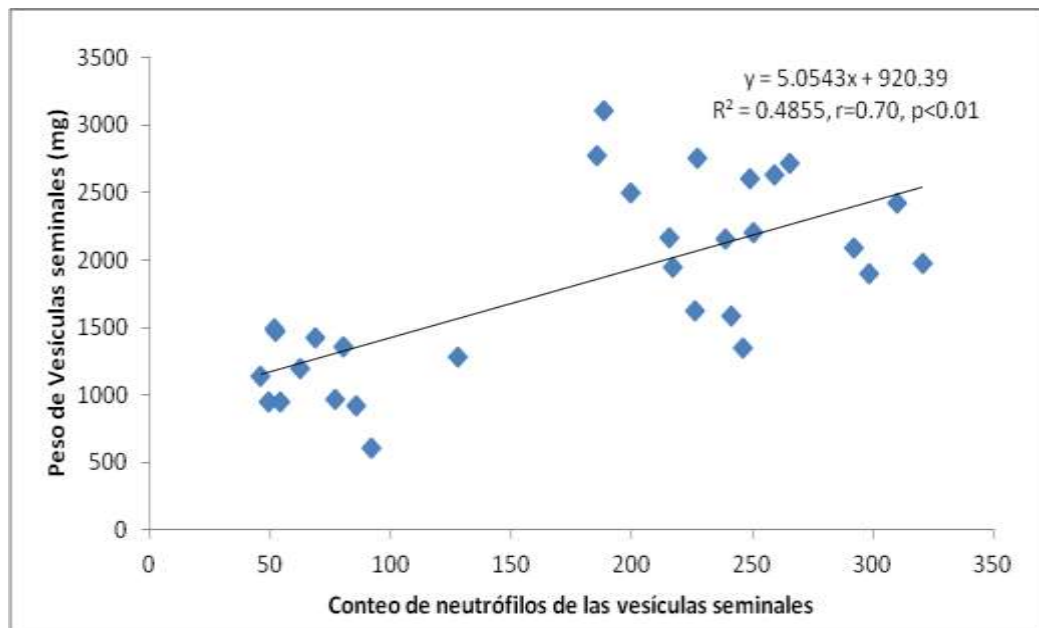


Figura 27. Análisis de correlación entre el conteo de neutrófilos de las vesículas seminales y el peso de las vesículas seminales de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y con extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja, luego de 84 días.

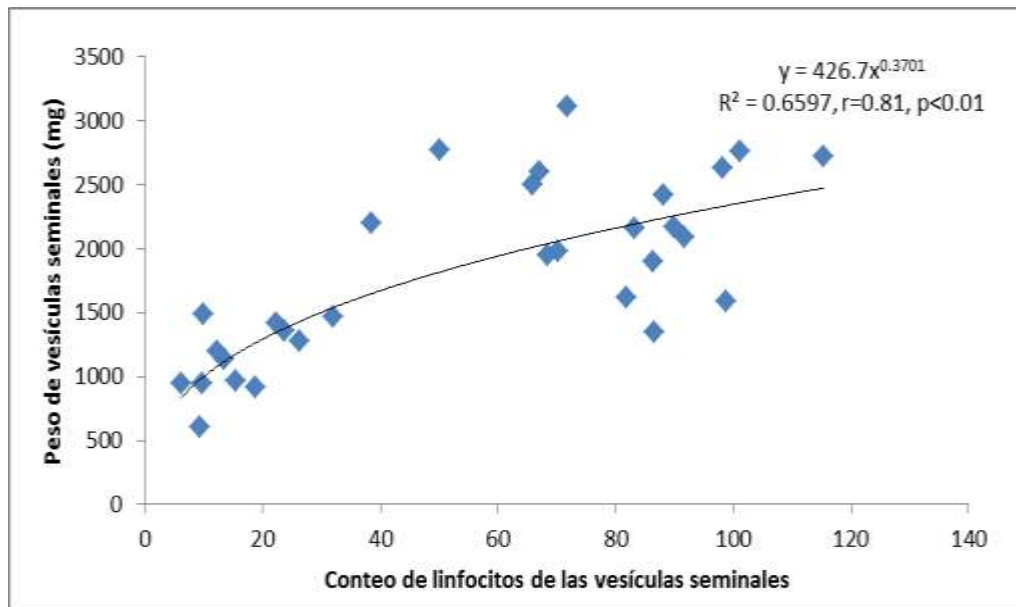


Figura 28. Análisis de correlación entre el conteo de linfocitos de las vesículas seminales y el peso de las vesículas seminales de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y con extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja, luego de 84 días.

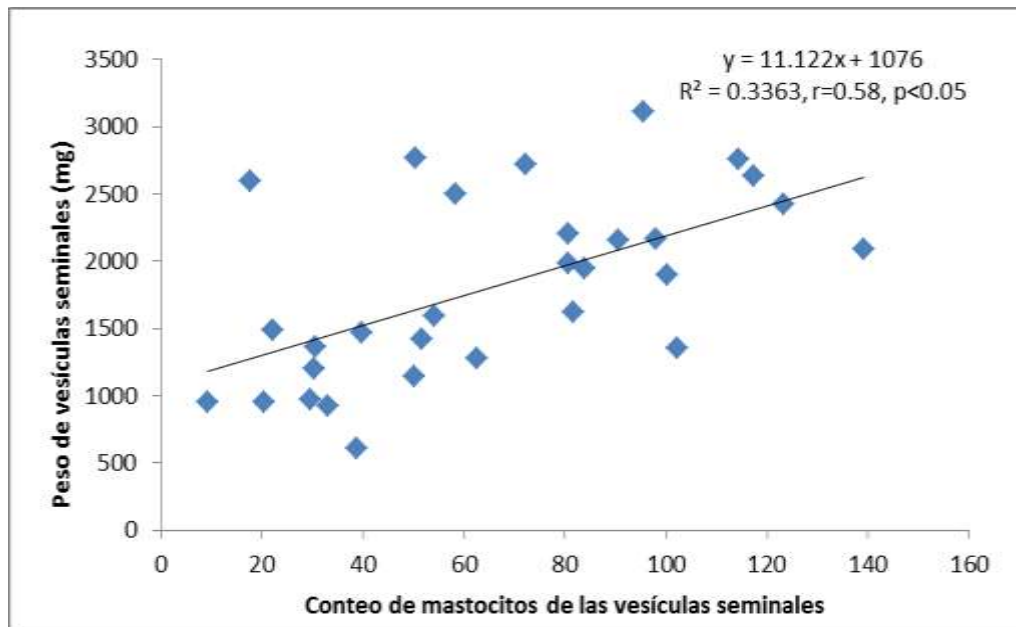


Figura 29. Análisis de correlación entre el conteo de mastocitos de las vesículas seminales y el peso de las vesículas seminales de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y con extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja, luego de 84 días.

13.5 Determinación del efecto del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja y el finasteride sobre el conteo de células inflamatorias en la próstata y en las vesículas seminales de ratas con HPB ante el estímulo con enantato de testosterona.

Se observó que el peso de la próstata disminuyó luego de los tratamientos con enantato de testosterona mas finasteride (ET+F) ($P < 0.05$) y más extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja en las dos dosis (ET+MR40 y ET+MR80) ($P < 0.05$) respecto al grupo tratado solo con enantato de testosterona (ET) (Figura 30), luego de 84 días.

La figura 31 muestra que el conteo de células inflamatorias en los grupos ET+F, ET+MR40 y ET+MR80 disminuyeron ($P < 0.05$) respecto al grupo ET.

En las vesículas seminales se observó que el peso disminuyó luego del tratamiento con enantato de testosterona mas finasteride (ET+F) ($P < 0.05$), el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja en las dos dosis (ET+MR40 y ET+MR80) ($P: NS$) no redujo el peso de este órgano, respecto al grupo tratado solo con enantato de testosterona (ET) (Figura 32), luego de 84 días.

La Figura 33 muestra que el conteo de células inflamatorias disminuyó en el grupo ET+F ($P < 0.05$), en los grupos ET+MR40 y ET+MR80 los valores fueron similares ($P: NS$) respecto al grupo ET.

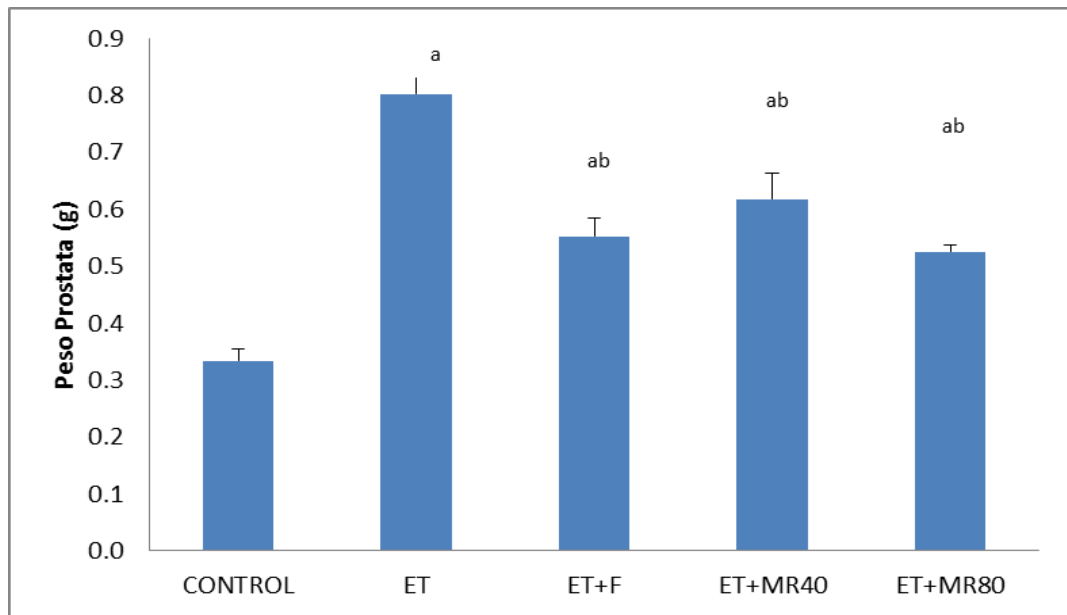


Figura 30. Peso prostático luego de 84 días de tratamiento con enantato de testosterona más finasteride (ET+F) y más extracto hidroalcohólico de maca roja en dos dosis (ET+MR40 y ET+MR80). Los valores están expresados en media y sus errores estándar. ^aP<0.05 respecto al Control y ^bP<0.05 respecto a ET.

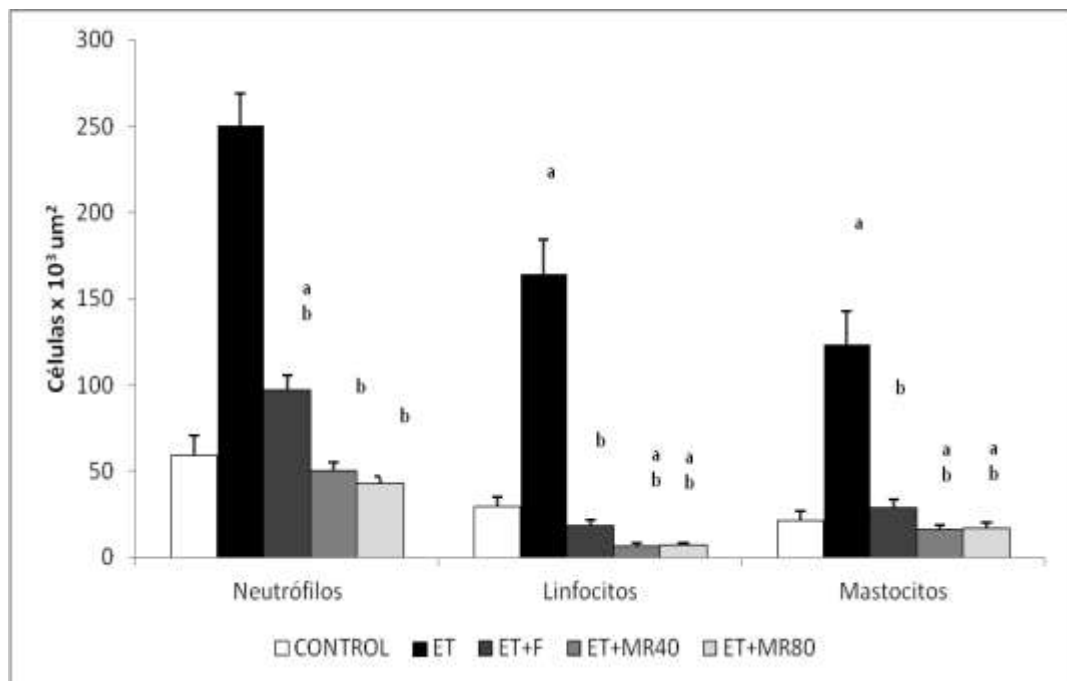


Figura 31. Efecto de los diversos tratamientos sobre el conteo de células inflamatorias (Neutrófilos, linfocitos y mastocitos) en la próstata de ratas con HPB ante el estímulo con enantato de testosterona. ^aP<0.05 respecto al Control y ^bP<0.05 respecto a ET.

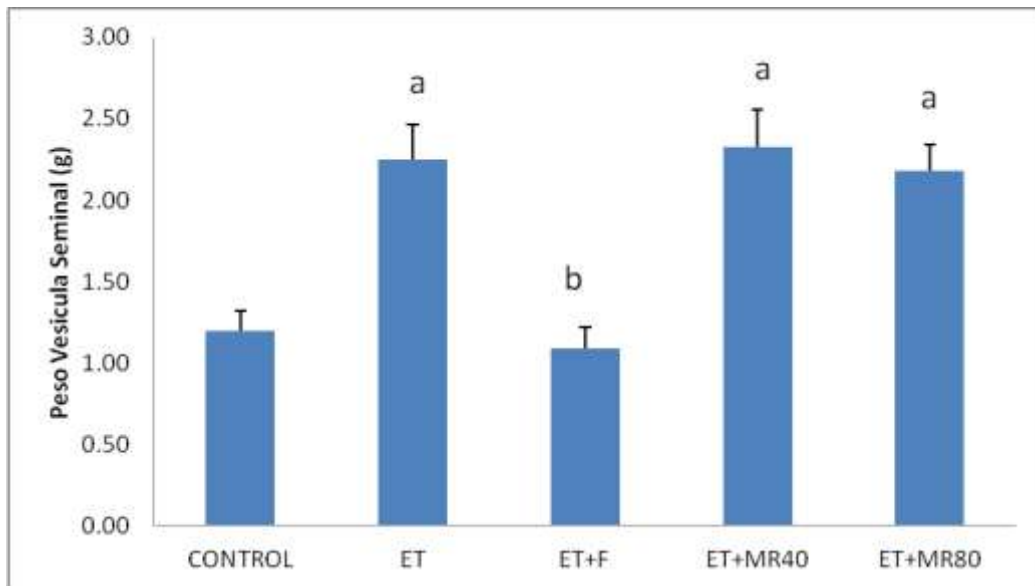


Figura 32. Peso de las vesículas seminales luego de 84 días de tratamiento con enantato de testosterona más finasteride (ET+F) y más extracto hidroalcohólico de maca roja en dos dosis (ET+MR40 y ET+MR80). Los valores están expresados en media y sus errores estándar. ^aP<0.05 respecto al Control y ^bP<0.05 respecto a ET.

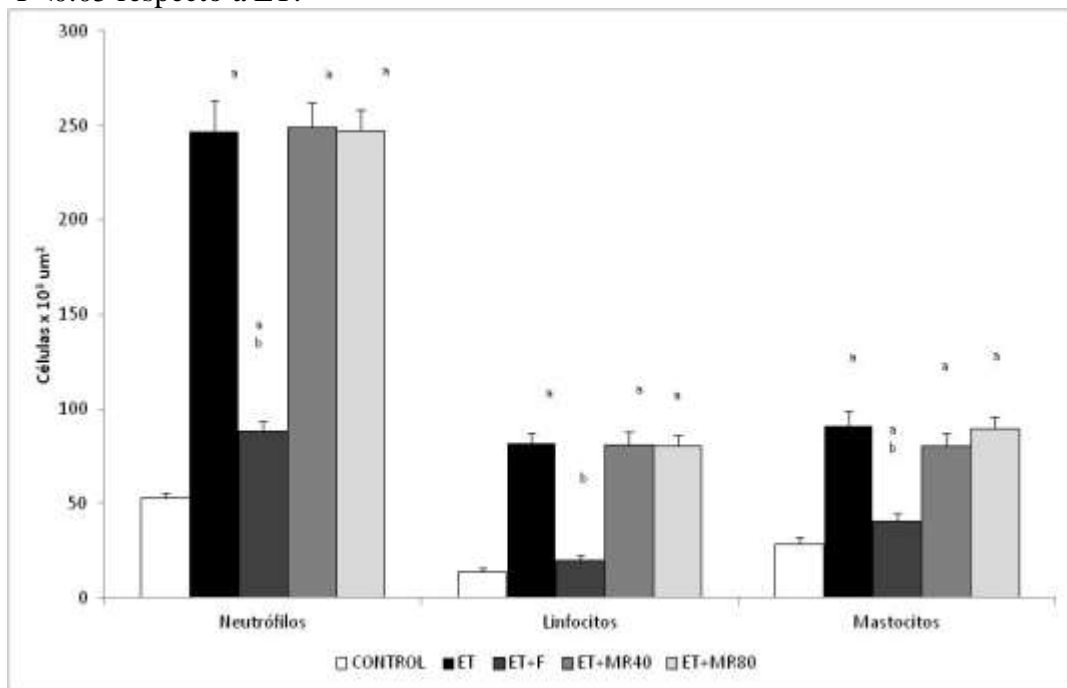


Figura 33. Efecto de los diversos tratamientos sobre el conteo de células inflamatorias (Neutrófilos, linfocitos y mastocitos) en las vesículas seminales de ratas con HPB ante el estímulo con enantato de testosterona. Los valores están expresados en media y sus errores estándar. ^aP<0.05 respecto al Control y ^bP<0.05 respecto a ET.

13.6 Determinación de la asociación entre los niveles de testosterona y TNF- α , IL-4 e INF- γ en próstata y vesículas seminales de los grupos control y tratado con enantato de testosterona.

En las Figuras 34 y 35 se observan las relaciones directas entre los niveles de testosterona y el TNF- α prostático ($P < 0.01$) y de las vesículas seminales ($P < 0.01$). En las Figura 36 se observa la relaciones indirectas entre los niveles de testosterona y el INF- γ prostático ($P < 0.01$) en la próstata, en las vesículas seminales no se observó esta relación ($P: NS$). En las figuras 37 y 38 se observan las relaciones indirectas entre los niveles de testosterona e IL-4 en la próstata ($P < 0.01$) y en las vesículas seminales ($P < 0.01$) de los grupos control y estimulado con enantato de testosterona.

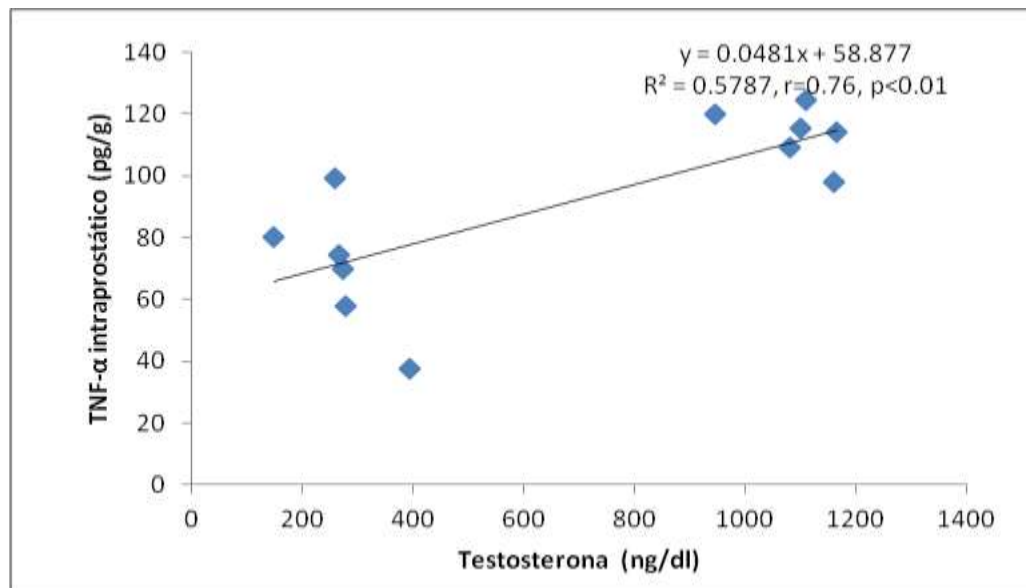


Figura 34. Análisis de correlación entre los niveles de testosterona y el TNF- α de la próstata de los grupos control y tratados con enantato de testosterona, luego de 84 días.

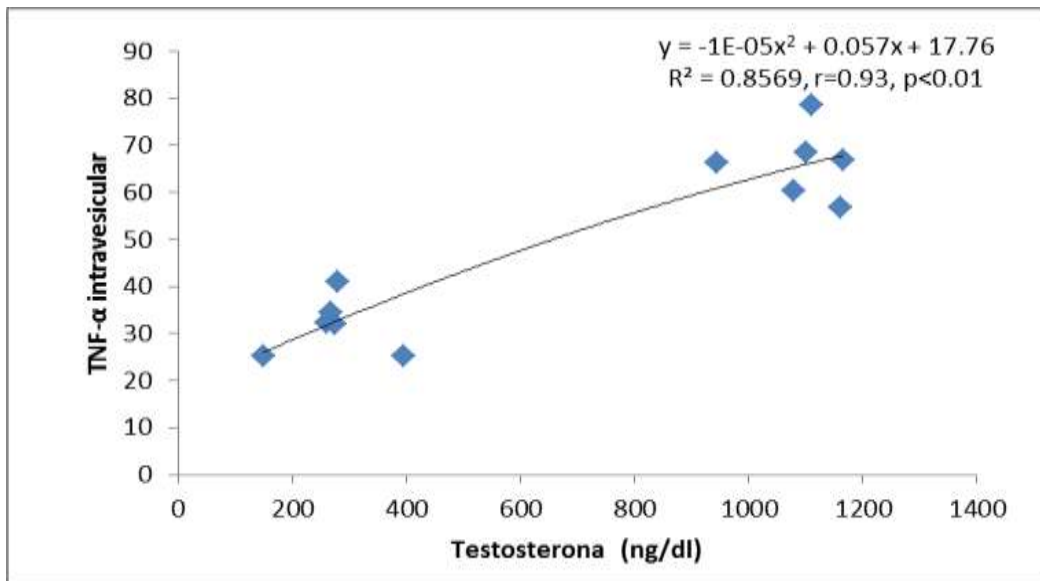


Figura 35. Análisis de correlación entre los niveles de testosterona y el TNF- α de las vesículas seminales de los grupos control y tratados con enantato de testosterona, luego de 84 días.

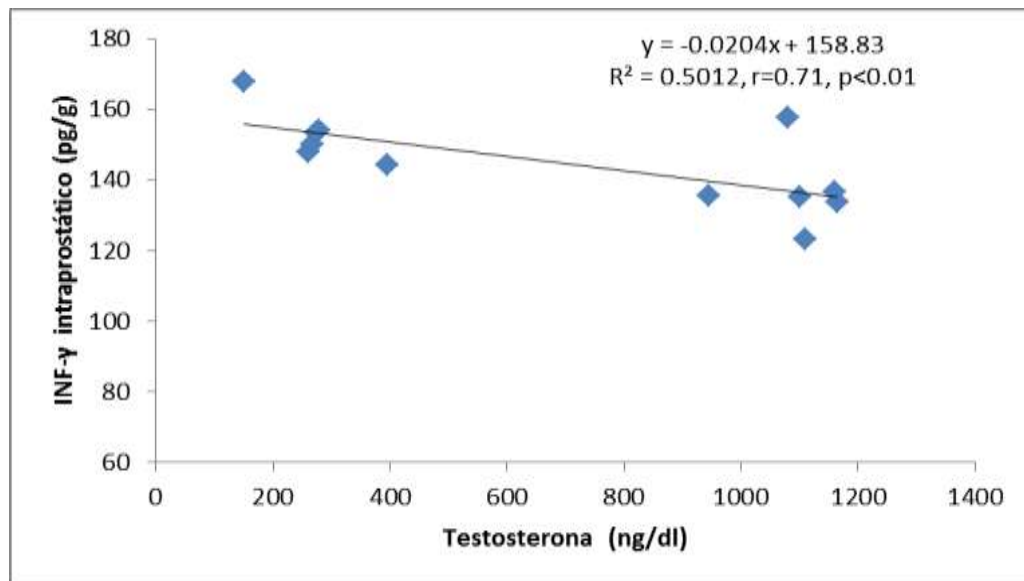


Figura 36. Análisis de correlación entre los niveles de testosterona y el INF- γ de la próstata de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

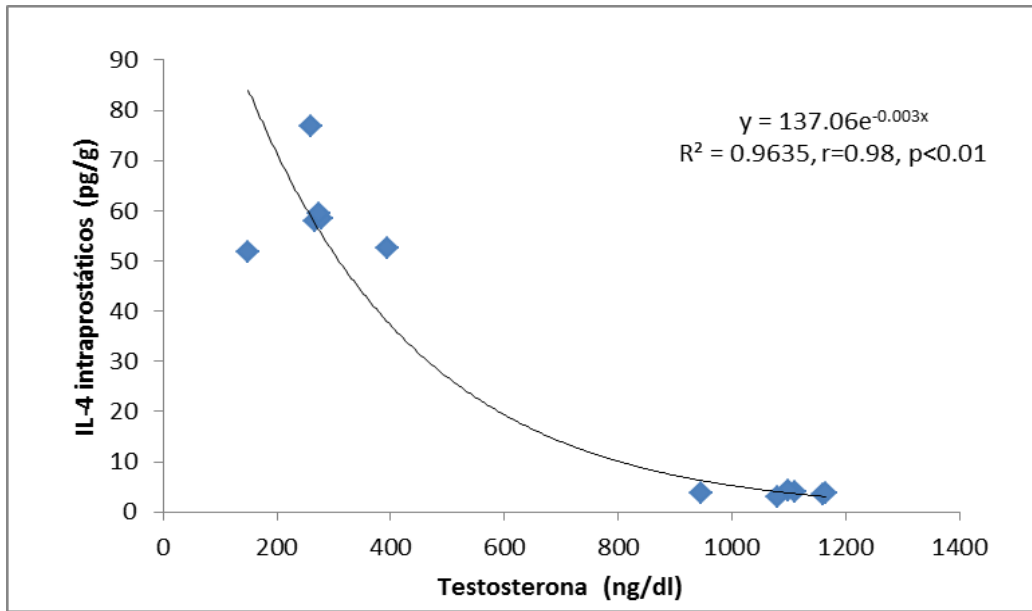


Figura 37. Análisis de correlación entre los niveles de testosterona y la IL-4 prostática de los grupos control y tratados con enantato de testosterona, luego de 84 días.

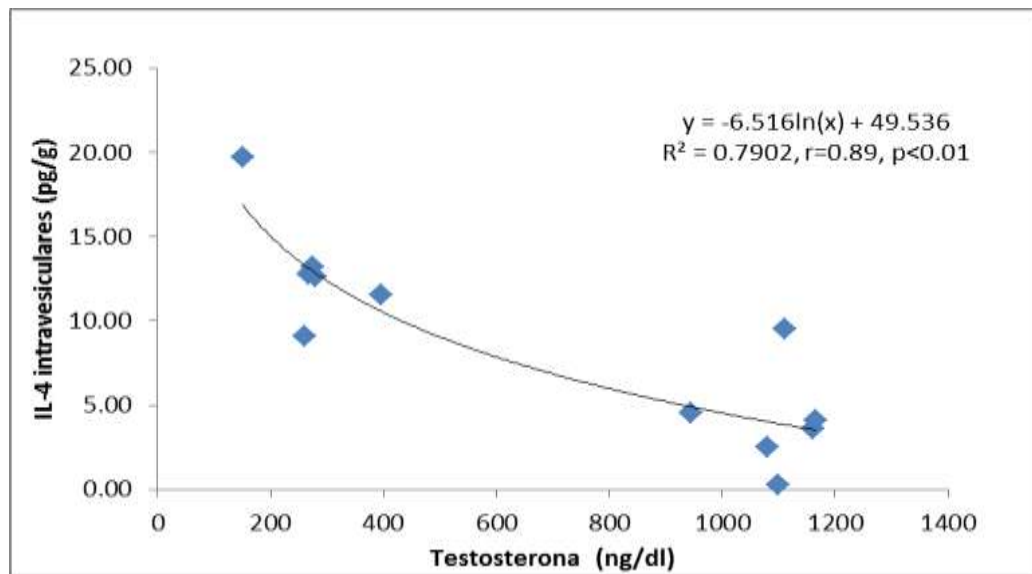


Figura 38. Análisis de correlación entre los niveles de testosterona y la IL-4 de las vesículas seminales de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

13.7 Determinación del efecto del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja y el finasteride sobre los niveles de TNF- α , IL-4 e INF- γ en próstata y vesículas seminales de ratas con HPB ante el estímulo con enantato de testosterona.

En los homogenizados de próstata y vesículas seminales observamos que la IL-4 disminuye en el grupo ET ($P < 0.05$), mientras que finasteride y maca roja la incrementan ($P < 0.05$) (Figura 39). en cuanto a los niveles de IFN- γ , se observó un marcado incremento con los tratamientos con finasteride y maca roja en sus dos dosis tanto en próstata como en vesículas seminales ($P < 0.05$) (Figura 40), en cuanto a los niveles de TNF- α , estos aumentaron con ET ($P < 0.05$) mientras que finasteride y maca roja en sus dos dosis lo disminuyen en próstata ($P < 0.05$) pero no se observó el mismo patrón en vesículas seminales, la maca roja no disminuye esta citoquina proinflamatoria (Figura 41).

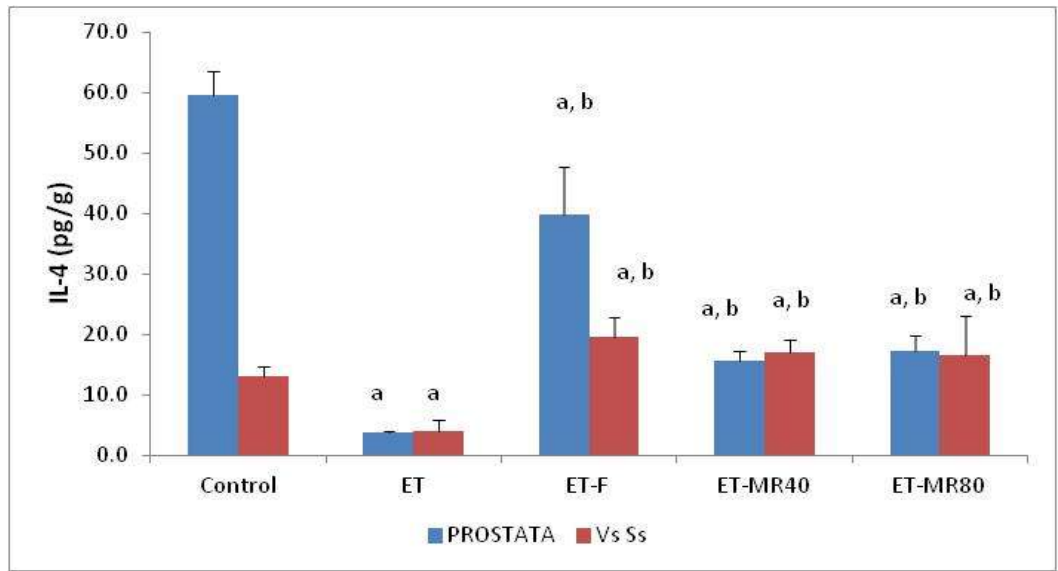


Figura 39. Niveles de IL-4 (pg/g) en homogenizados de próstata y vesículas seminales de todos los grupos de experimentación: Control, ET, ET+F, ET+MR40 y ET+MR80, luego de 84 días de tratamiento. Los valores están expresados en medias y sus errores estándar. ^aP<0.05 respecto al Control y ^bP<0.05 respecto a ET .

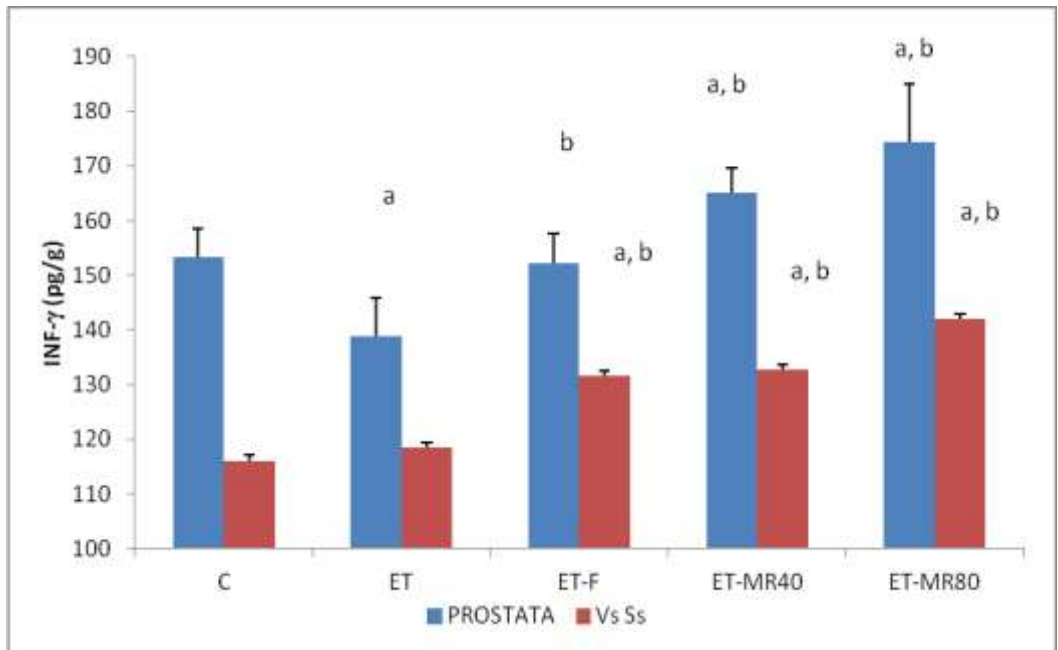


Figura 40. Niveles de INF-γ (pg/g) en homogenizados de próstata y vesículas seminales de todos los grupos de experimentación: Control, ET, ET+F, ET+MR40 y ET+MR80, luego de 84 días de tratamiento. Los valores están expresados en medias y sus errores estándar. ^aP<0.05 respecto al Control y ^bP<0.05 respecto a ET .

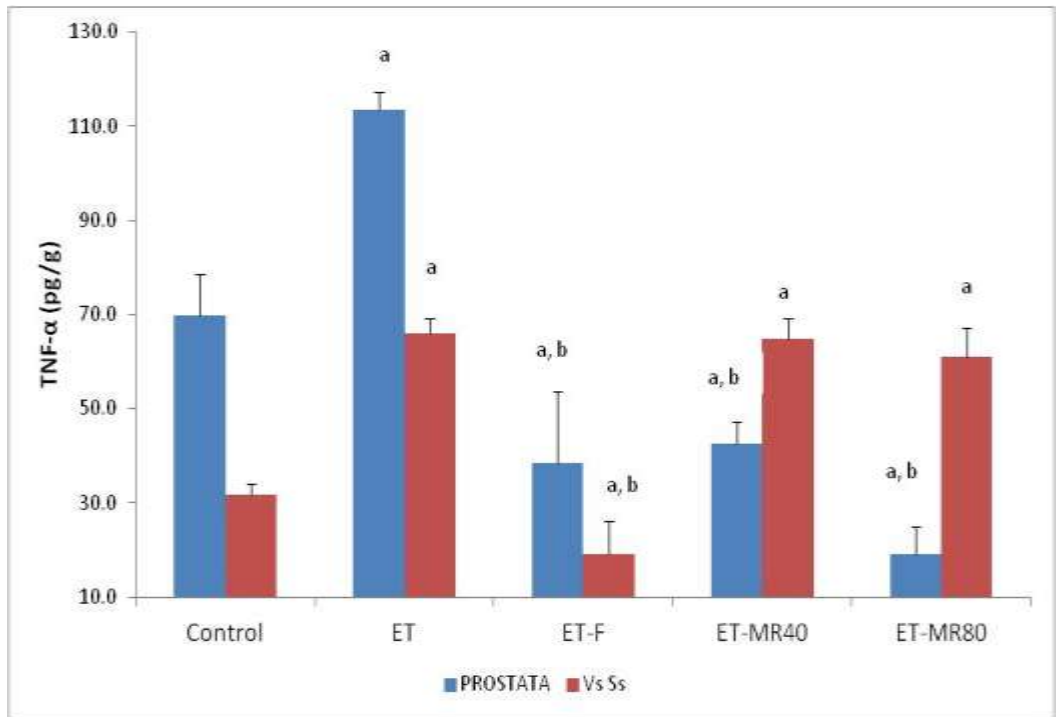


Figura 41. Niveles de TNF- α (pg/g) en homogenizados de próstata y vesículas seminales de todos los grupos de experimentación: Control, ET, ET+F, ET+MR40 y ET+MR80, luego de 84 días de tratamiento. Los valores están expresados en medias y sus errores estándar. ^aP<0.05 respecto al Control y ^bP<0.05 respecto a ET .

13.8 Evaluación de los cambios de testosterona y estradiol intraprostáticos en ratas con HPB ante el estímulo del enantato de testosterona y tratadas con finasteride y el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja.

En las figuras 42 y 43 se observan que los valores de testosterona en próstata se incrementaron en los grupos ET ($P<0.05$), ET+F ($P<0.05$), ET+MR40 ($P<0.05$) y ET+MR80 ($P<0.05$), en el grupo ET+F la testosterona se elevó más que el grupo ET ($P<0.05$). En las figuras 47 y 48 se observan que los valores de estradiol en próstata disminuyeron en los grupos ET ($P<0.05$), ET+F ($P<0.05$), ET+MR40 ($P<0.05$) y ET+MR80 ($P<0.05$), el grupo ET+F el estradiol se elevó más que el grupo ET ($P<0.05$).

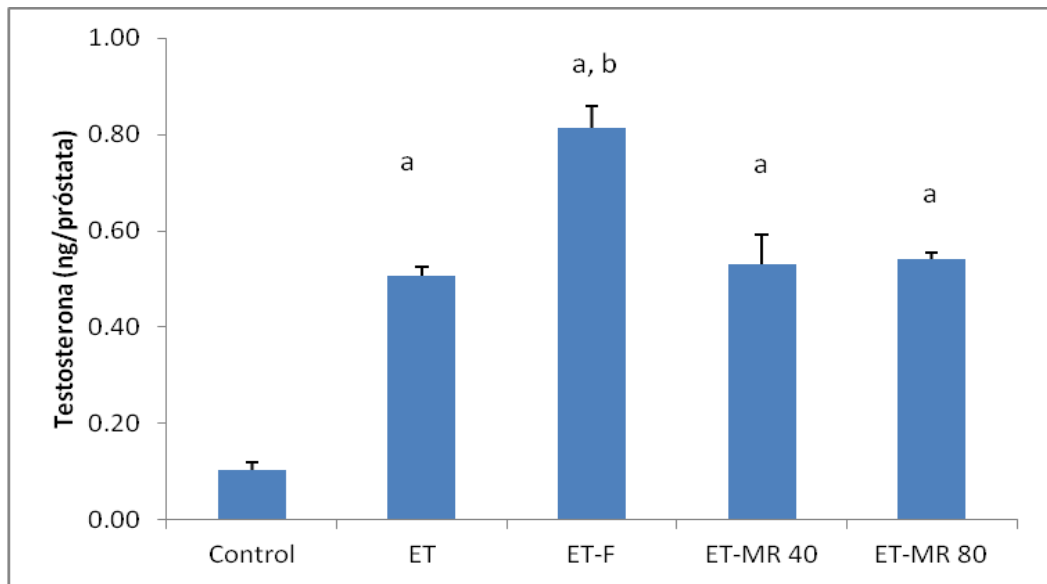


Figura 42. Niveles de testosterona intraprostática en todos los grupos de experimentación: Control, ET, ET+F, ET+MR40 y ET+MR80, luego de 84 días de tratamiento. Los valores están expresados en medias y su errores estándar. ^aP<0.05 respecto al Control y ^bP<0.05 respecto a ET.

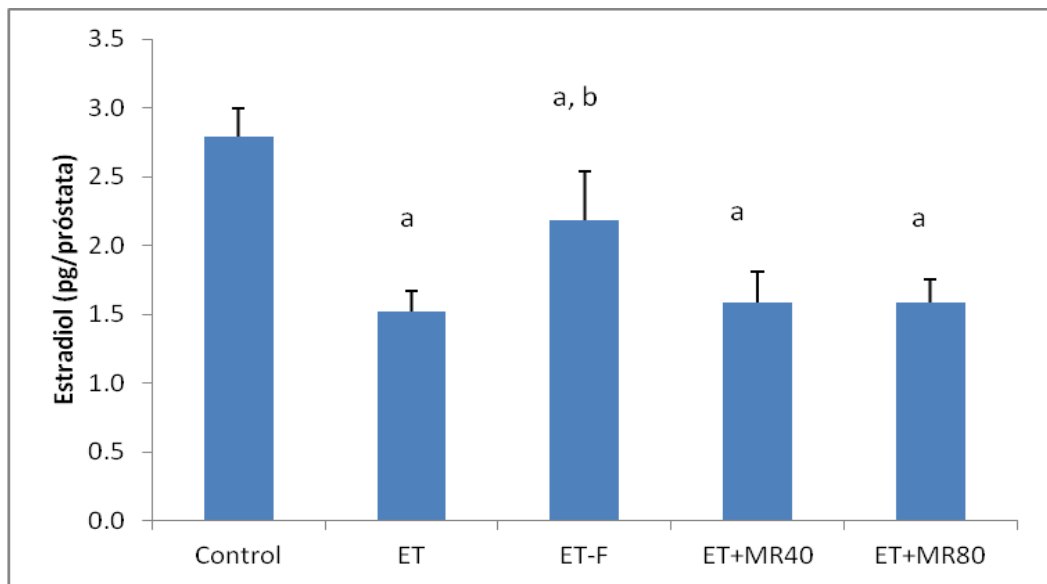


Figura 43. Niveles de estradiol intraprostático en todos los grupos de experimentación: Control, ET, ET+F, ET+MR40 y ET+MR80, luego de 84 días de tratamiento. Los valores están expresados en medias y su errores estándar. ^aP<0.05 respecto al Control y ^bP<0.05 respecto a ET.

13.9 Determinación de la correlación o asociación entre células inflamatorias y citoquinas en próstata y vesículas seminales estimulada con enantato de testosterona.

Las regresiones entre células inflamatorias y citoquinas a nivel de la próstata y vesículas seminales se muestran en las Figuras 44 al 58, de los grupos control y tratados con enantato de testosterona; mientras que el análisis con los grupos: control, tratados con enantato de testosterona, finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja, se muestran en las Figuras 59 al 70.

A nivel de la próstata, se observan en las figuras 44, 47 y 50 las relaciones indirectas entre el conteo de células inflamatorias: neutrófilos ($P < 0.01$), linfocitos ($P < 0.01$) y mastocitos ($P < 0.01$) con los niveles de $\text{INF-}\gamma$, similar comportamiento se ve en los análisis de correlación entre neutrófilos, linfocitos y mastocitos con IL-4 ($P < 0.01$) (Figuras: 46, 49 y 52). Los análisis de de correlación entre células inflamatorias y niveles de $\text{TNF-}\alpha$, reflejaron una asociación directa ($P < 0.01$) (Figuras: 45, 48 y 51). A nivel de las vesículas seminales, no se observó asociación entre el conteo de neutrófilos ($P:\text{NS}$), linfocitos ($P:\text{NS}$) y mastocitos ($P:\text{NS}$) con los niveles de $\text{INF-}\gamma$. El análisis de correlación entre células inflamatorias e IL-4 reflejó una relación indirecta para neutrófilos ($P < 0.01$) (Figura 54), linfocitos ($P < 0.01$) (Figura 56) y mastocitos ($P < 0.01$) (Figura 58). Los análisis de correlación entre células inflamatorias y niveles de $\text{TNF-}\alpha$, reflejaron una importante relación directa

($P < 0.01$) (Figuras: 53, 55 y 57). Todos estos análisis fueron en los grupos control y tratado con enantato de testosterona.

A nivel de la próstata, se observan en las figuras 59, 62 y 65 las correlaciones indirectas entre el conteo de células inflamatorias: neutrófilos ($P < 0.01$), linfocitos ($P < 0.01$) y mastocitos ($P < 0.01$) con los niveles de $\text{INF-}\gamma$, similar comportamiento se ve en los análisis de correlación entre neutrófilos, linfocitos y mastocitos con IL-4 ($P < 0.01$) (Figuras: 61, 64 y 67). Los análisis de correlación entre células inflamatorias y niveles de $\text{TNF-}\alpha$, reflejaron una asociación directa ($P < 0.01$) (Figuras: 60, 63 y 66). A nivel de las vesículas seminales, no se observó asociación entre el conteo de neutrófilos ($P:\text{NS}$), linfocitos ($P:\text{NS}$) y mastocitos ($P:\text{NS}$) con los niveles de $\text{INF-}\gamma$, resultados similares se encontraron para IL-4 ($P:\text{NS}$). Los análisis de correlación entre células inflamatorias y niveles de $\text{TNF-}\alpha$, reflejaron una importante asociación directa ($P < 0.01$) (Figuras: 68, 69 y 70). Todos estos análisis fueron en los grupos control, tratado con enantato de testosterona, con finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja.

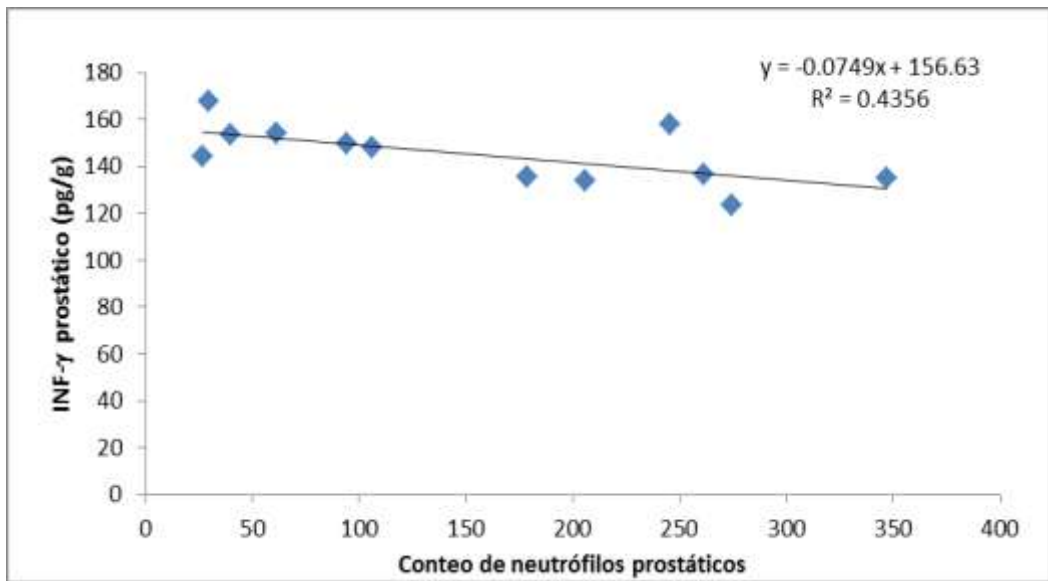


Figura 44. Análisis de correlación entre el conteo de neutrófilos prostáticos y el INF- γ de la próstata de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

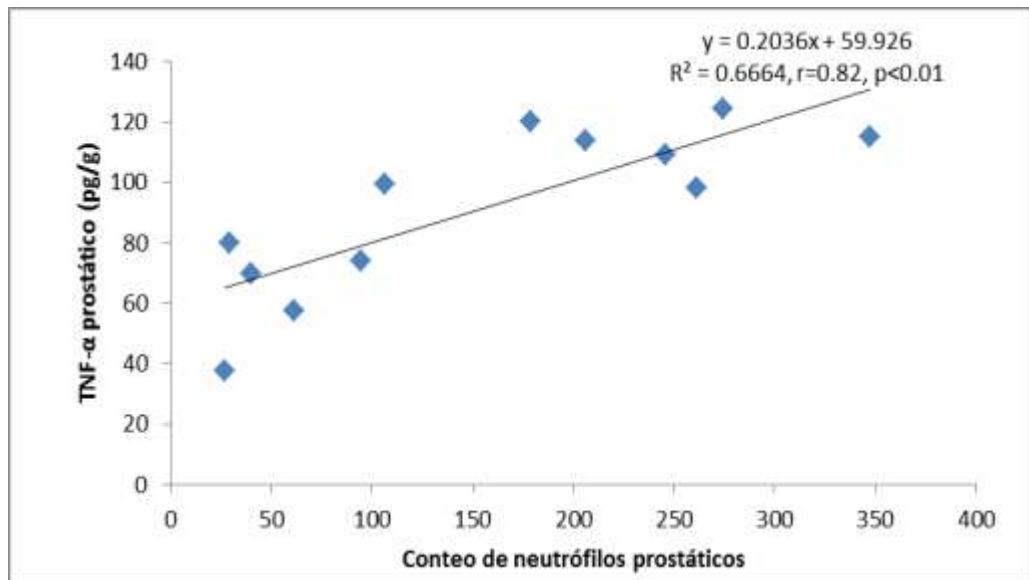


Figura 45. Análisis de correlación entre el conteo de neutrófilos prostáticos y el TNF- α de la próstata de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

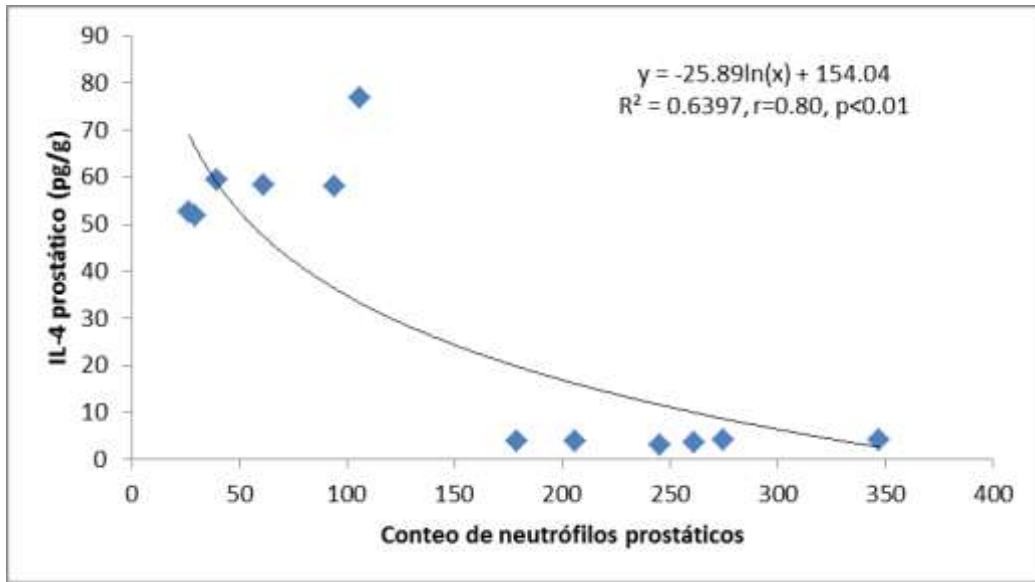


Figura 46. Análisis de correlación entre el conteo de neutrófilos prostáticos e IL-4 de la próstata de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

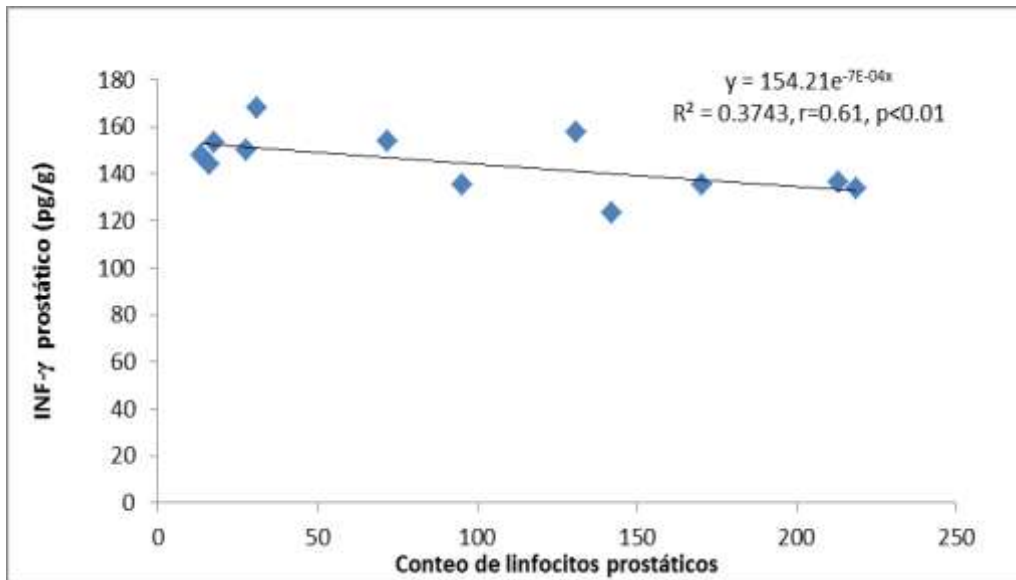


Figura 47. Análisis de correlación entre el conteo de linfocitos prostáticos y el INF- γ de la próstata de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

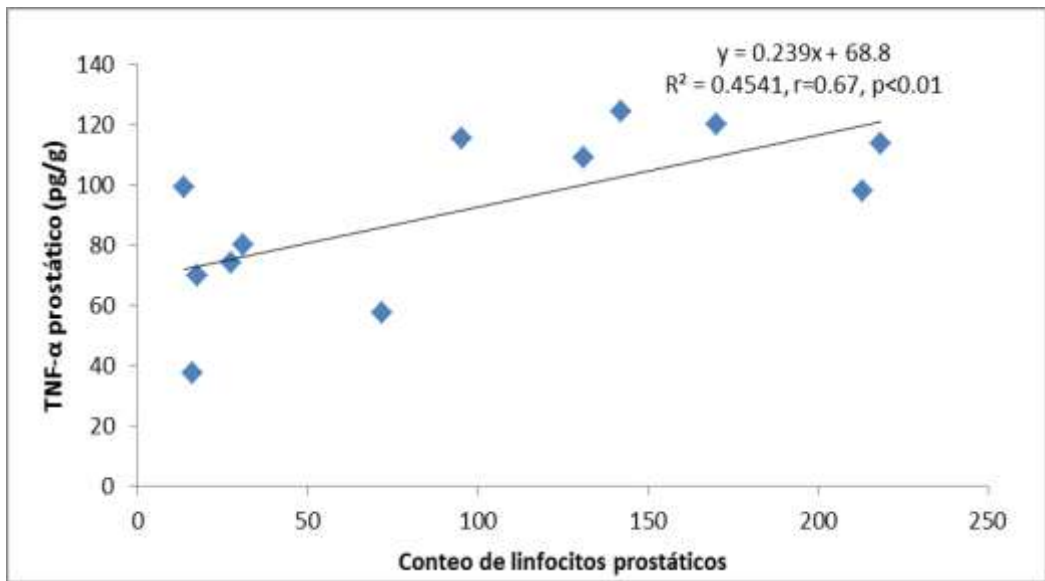


Figura 48. Análisis de correlación entre el conteo de linfocitos prostáticos y el TNF- α de la próstata de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

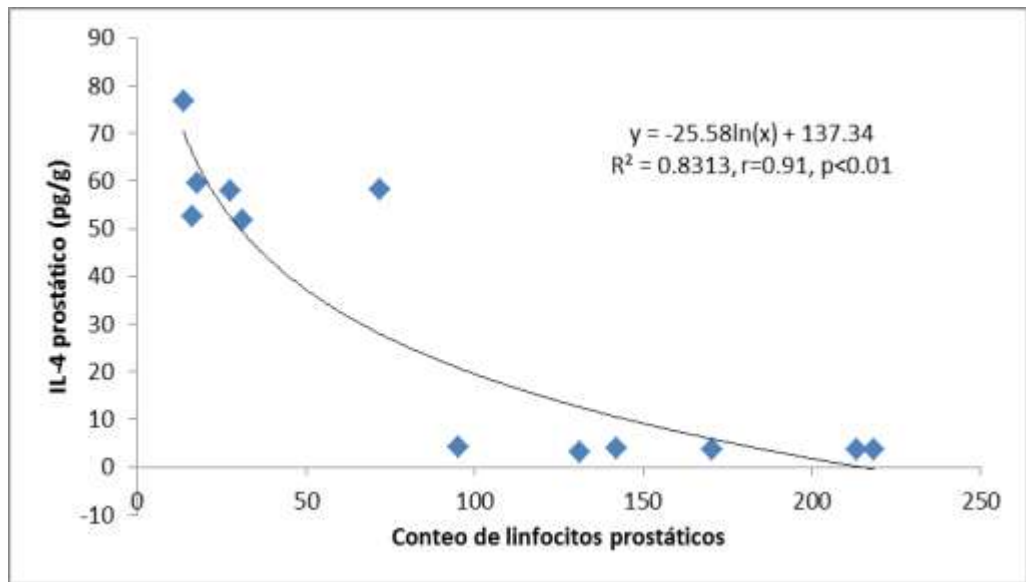


Figura 49. Análisis de correlación entre el conteo de linfocitos prostáticos y la IL-4 de la próstata de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

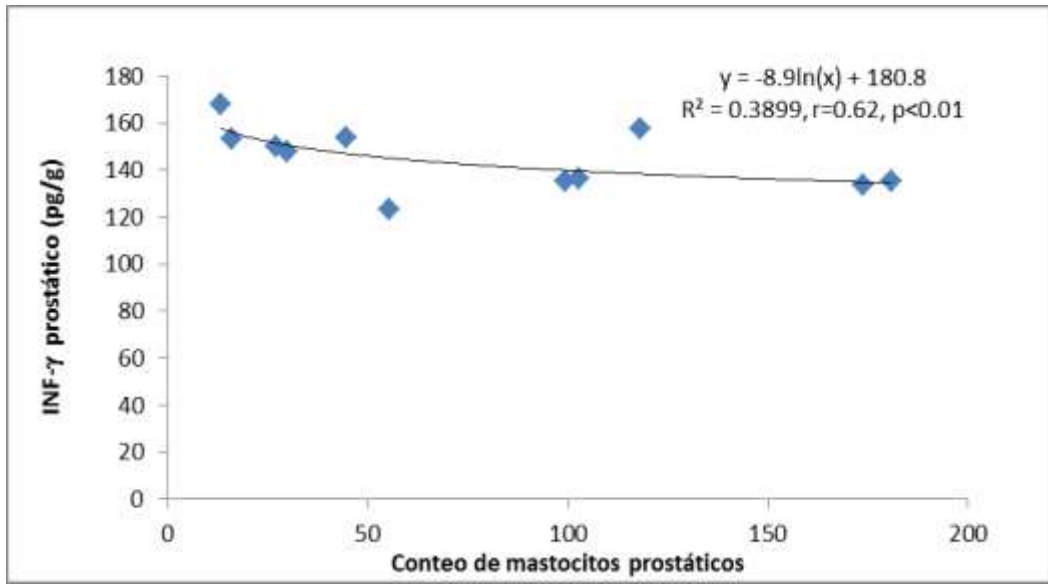


Figura 50. Análisis de correlación entre el conteo de mastocitos prostáticos y el INF- γ de la próstata de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

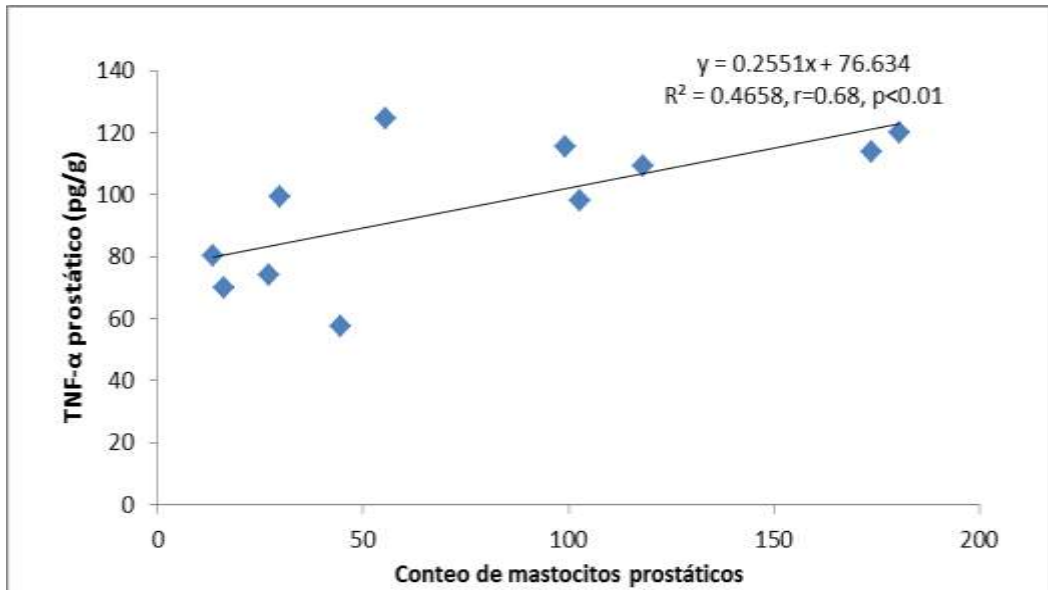


Figura 51. Análisis de correlación entre el conteo de mastocitos prostáticos y el TNF- α de la próstata de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

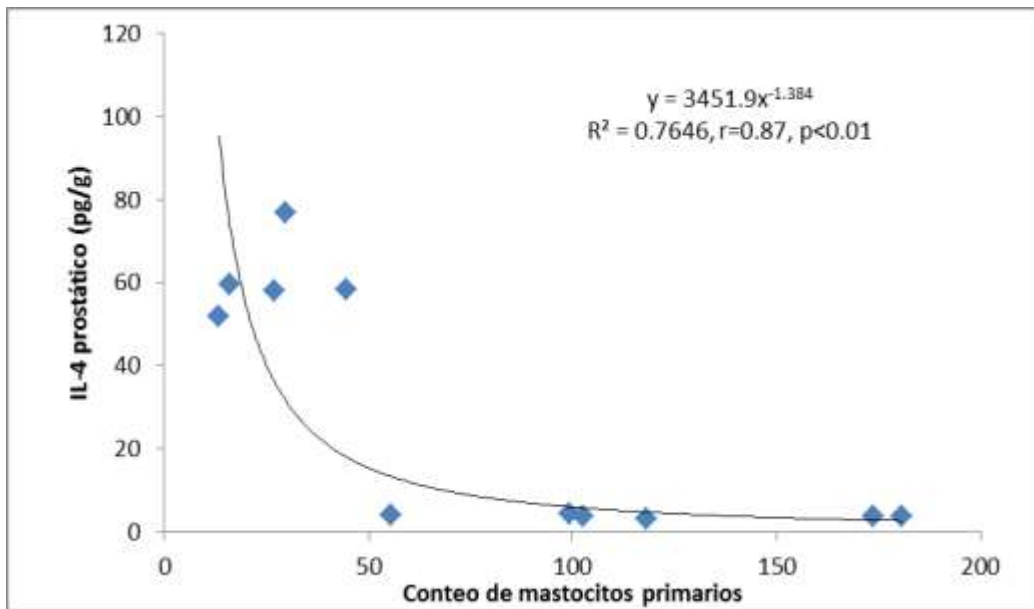


Figura 52. Análisis de correlación entre el conteo de mastocitos prostáticos e IL-4 de la próstata de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

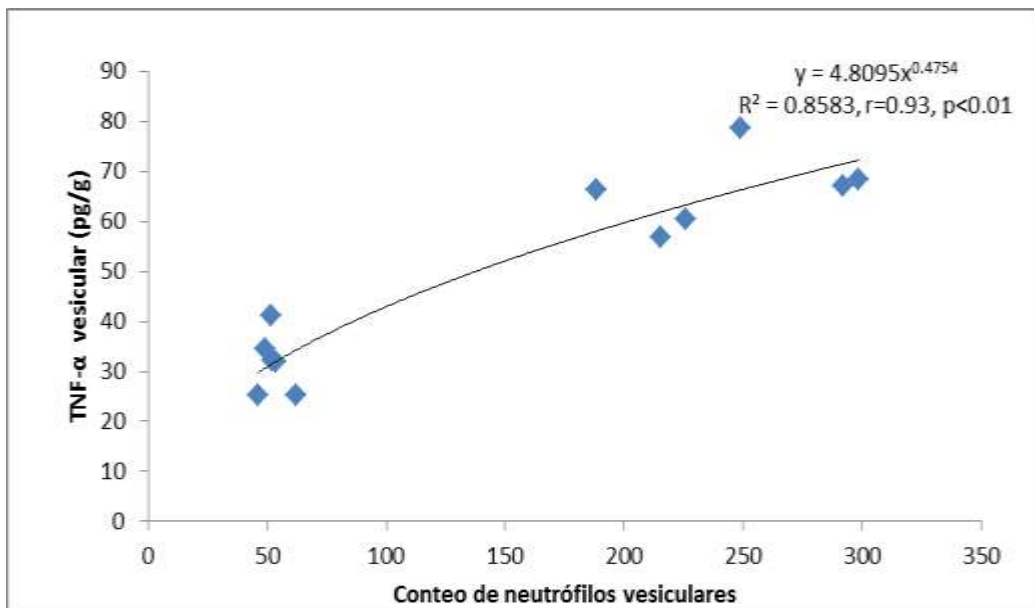


Figura 53. Análisis de correlación entre el conteo de neutrófilos y el TNF-α de las vesículas seminales de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

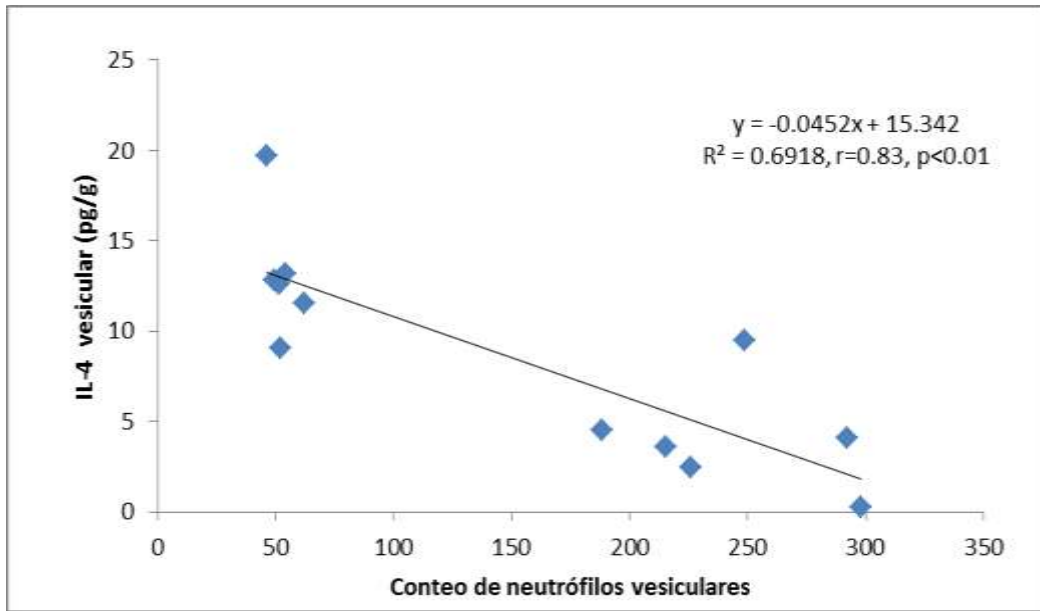


Figura 54. Análisis de correlación entre el conteo de neutrófilos y la IL-4 de las vesículas seminales de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

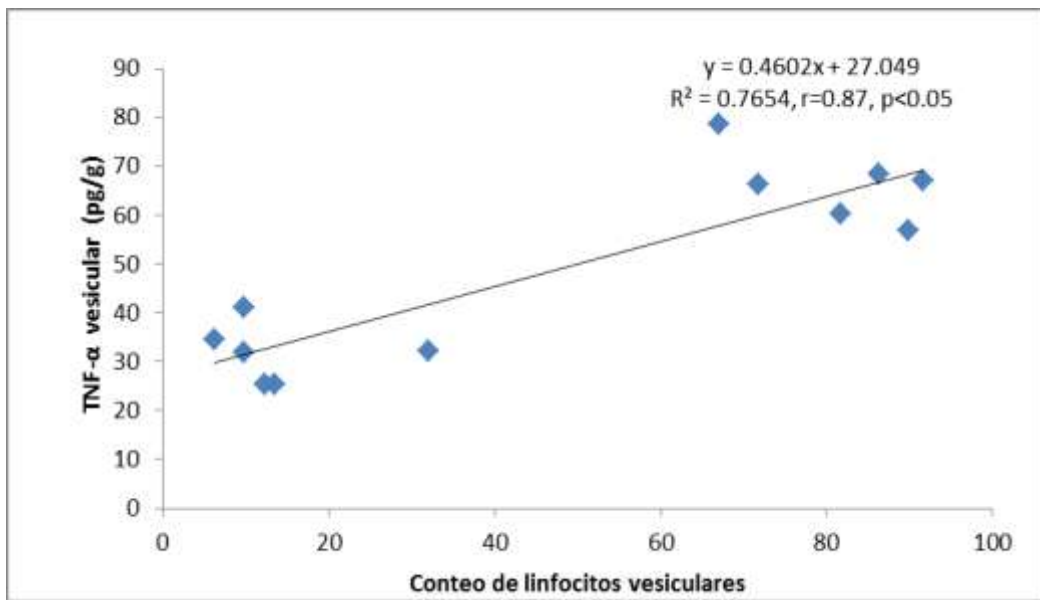


Figura 55. Análisis de correlación entre el conteo de linfocitos y el TNF-α de las vesículas seminales de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

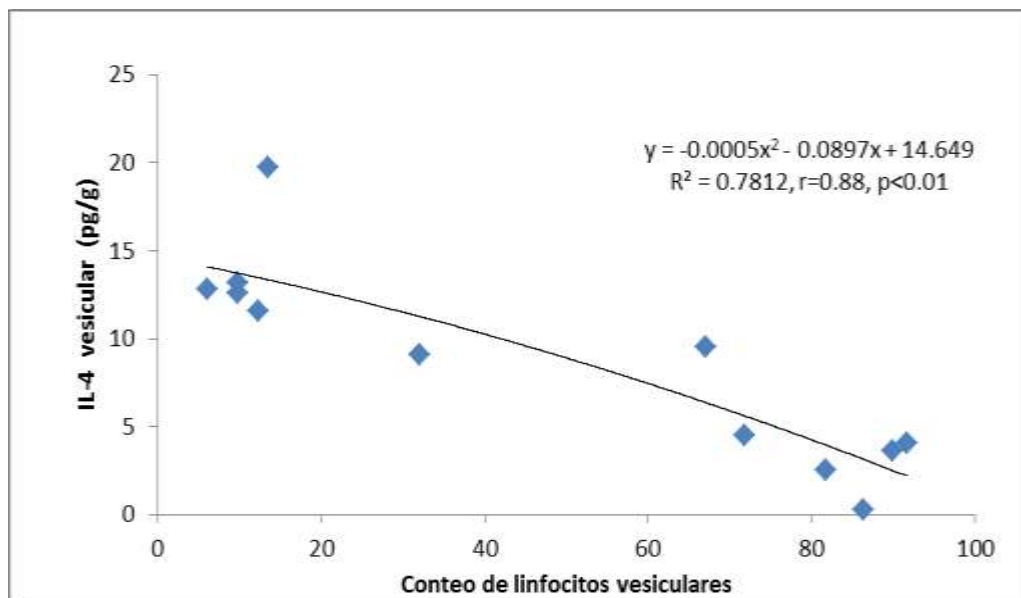


Figura 56. Análisis de correlación entre el conteo de linfocitos y la IL-4 de las vesículas seminales de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

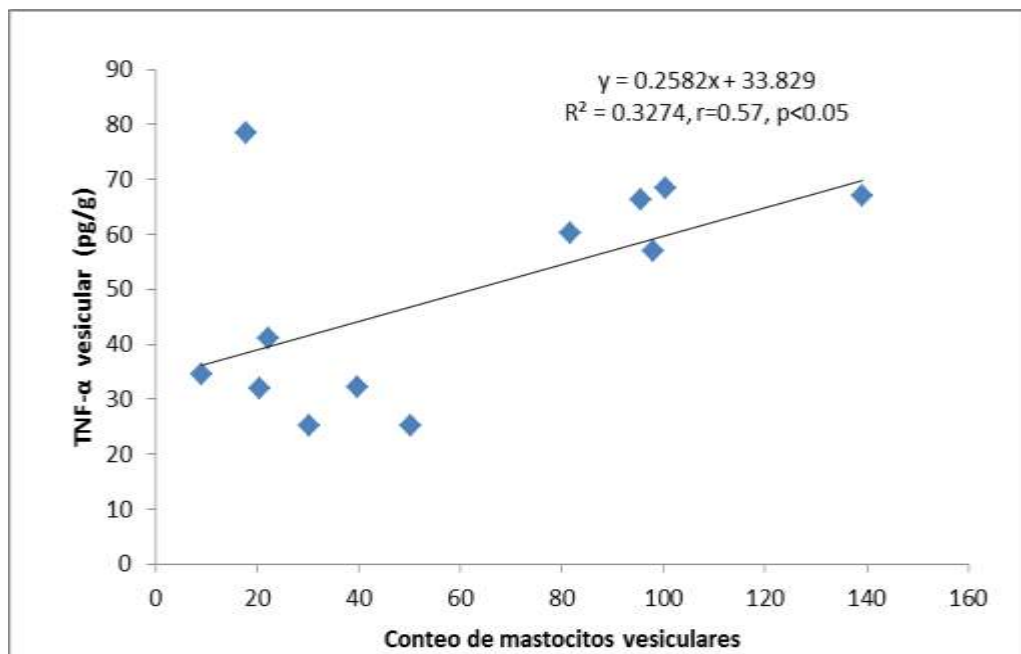


Figura 57. Análisis de correlación entre el conteo de mastocitos y el TNF-α de las vesículas seminales de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

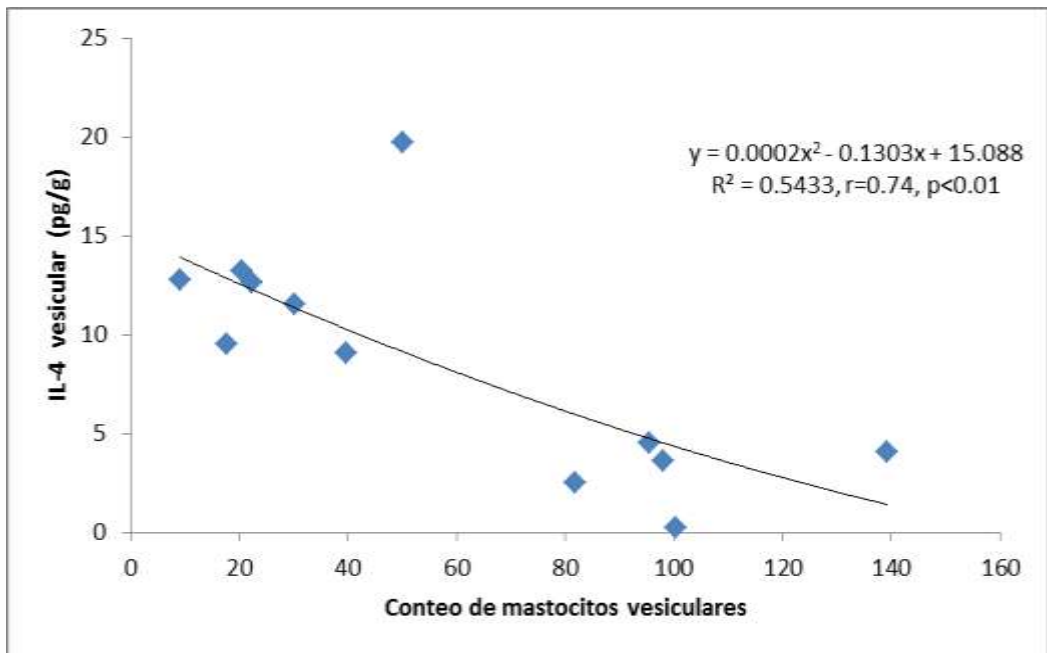


Figura 58. Análisis de correlación entre el conteo de mastocitos y la IL-4 de las vesículas seminales de los grupos control y tratado con enantato de testosterona, luego de 84 días.

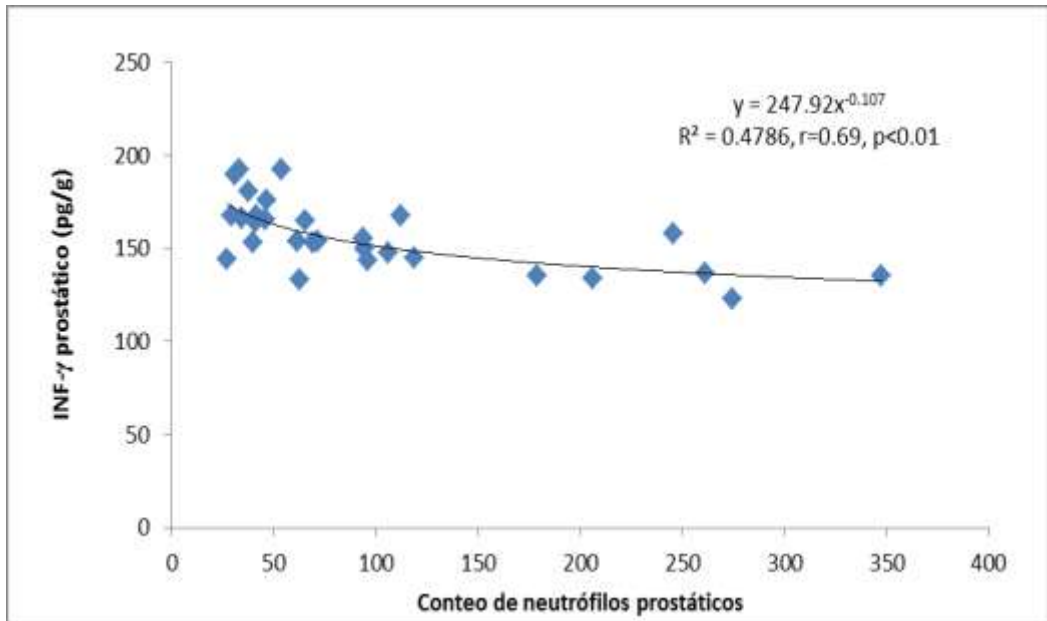


Figura 59. Análisis de correlación entre el conteo de neutrófilos prostáticos y el INF-γ de la próstata de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja, luego de 84 días.

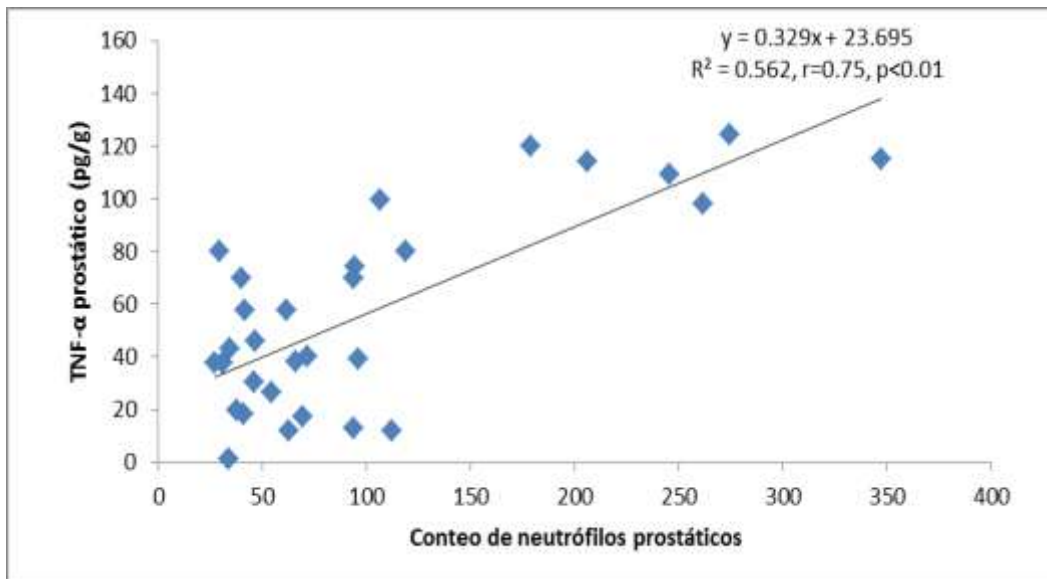


Figura 60. Análisis de correlación entre el conteo de neutrófilos prostáticos y el TNF- α de la próstata de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja, luego de 84 días

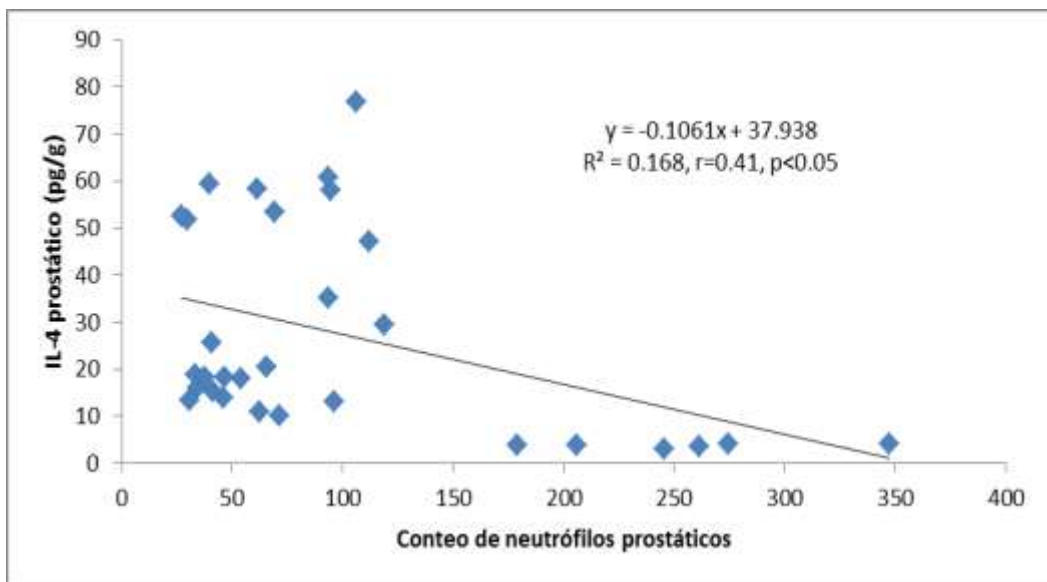


Figura 61. Análisis de correlación entre el conteo de neutrófilos prostáticos e IL-4 de la próstata de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja, luego de 84 días.

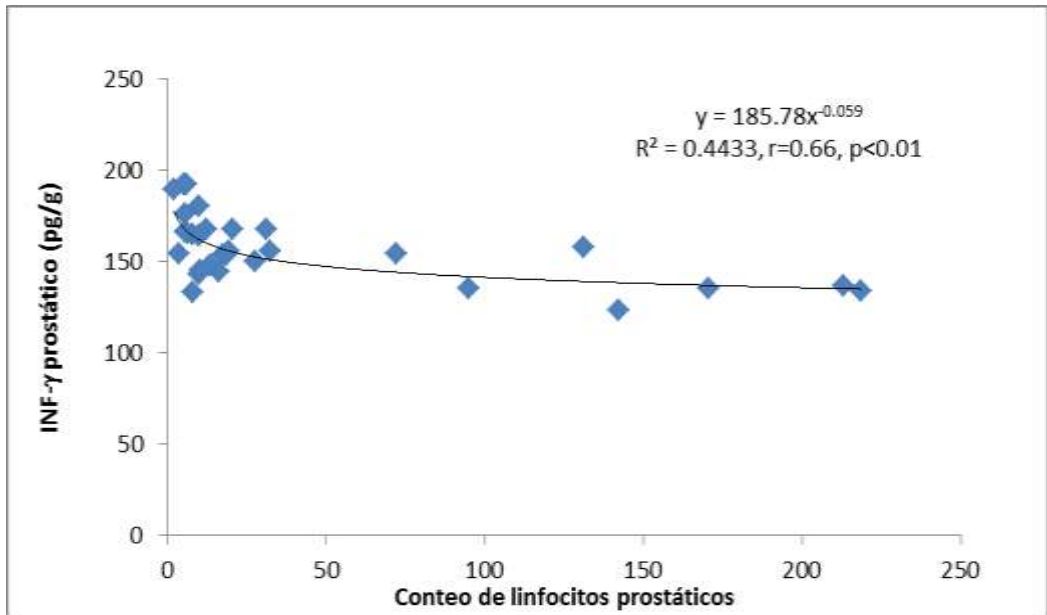


Figura 62. Análisis de correlación entre el conteo de linfocitos y el INF- γ de la próstata de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja, luego de 84 días.

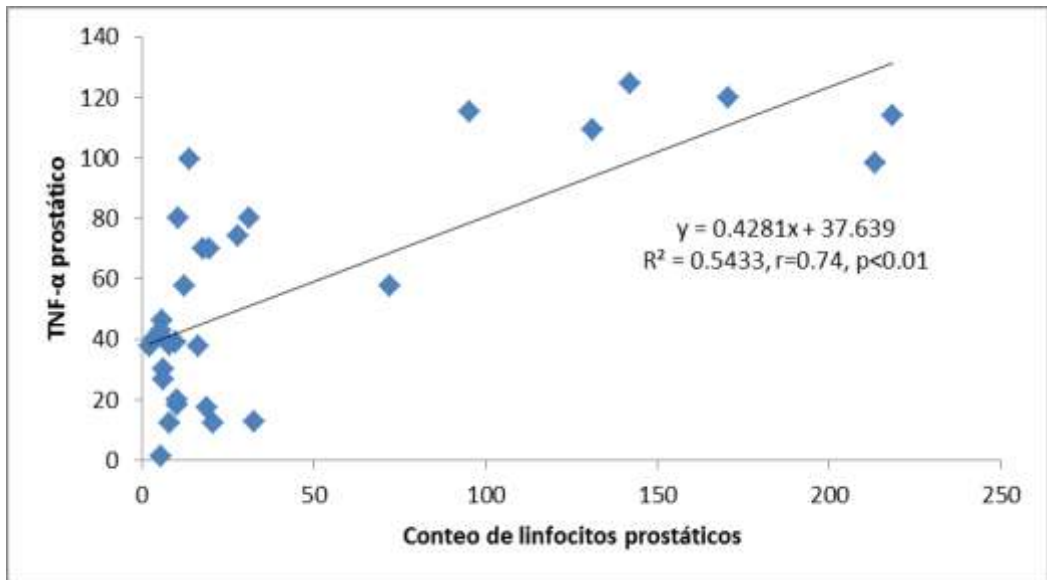


Figura 63. Análisis de correlación entre el conteo de linfocitos prostáticos y el TNF- α de la próstata de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja, luego de 84 días.

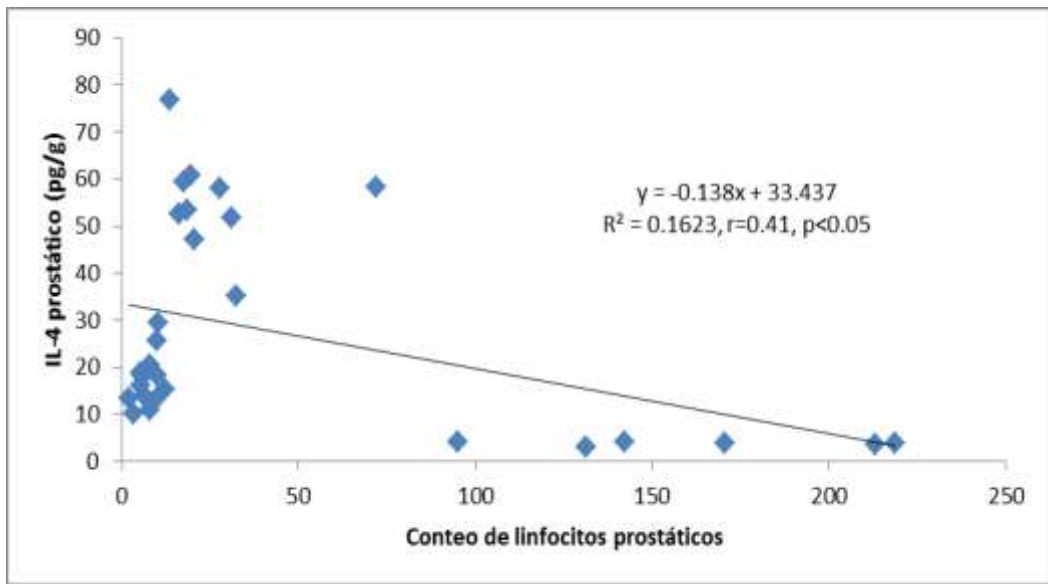


Figura 64. Análisis de correlación entre el conteo de linfocitos prostáticos e IL-4 de la próstata de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja, luego de 84 días.

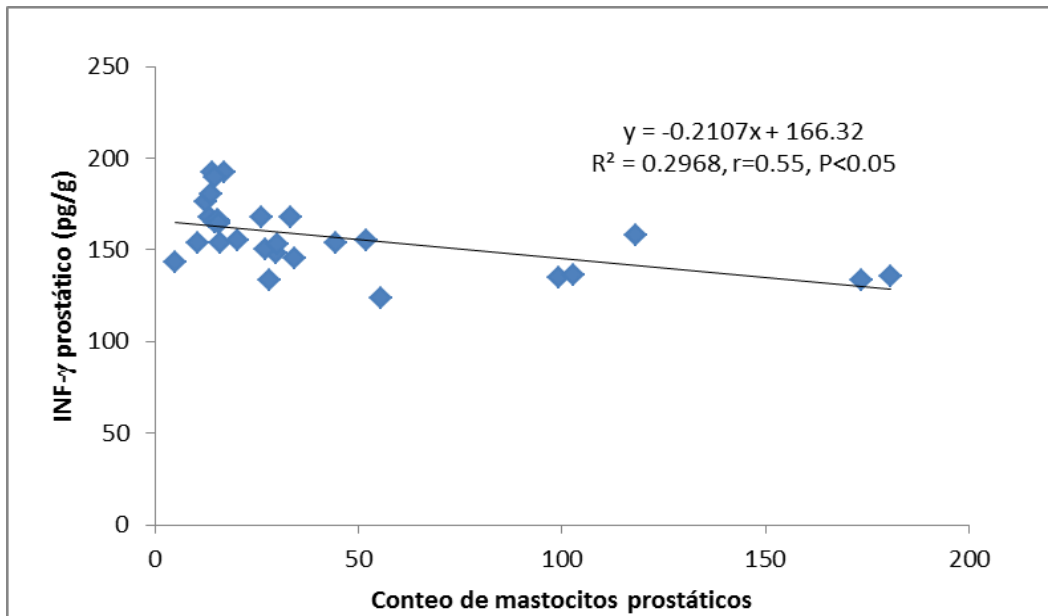


Figura 65. Análisis de correlación entre el conteo de mastocitos prostáticos y el INF- γ de la próstata de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja, luego de 84 días.

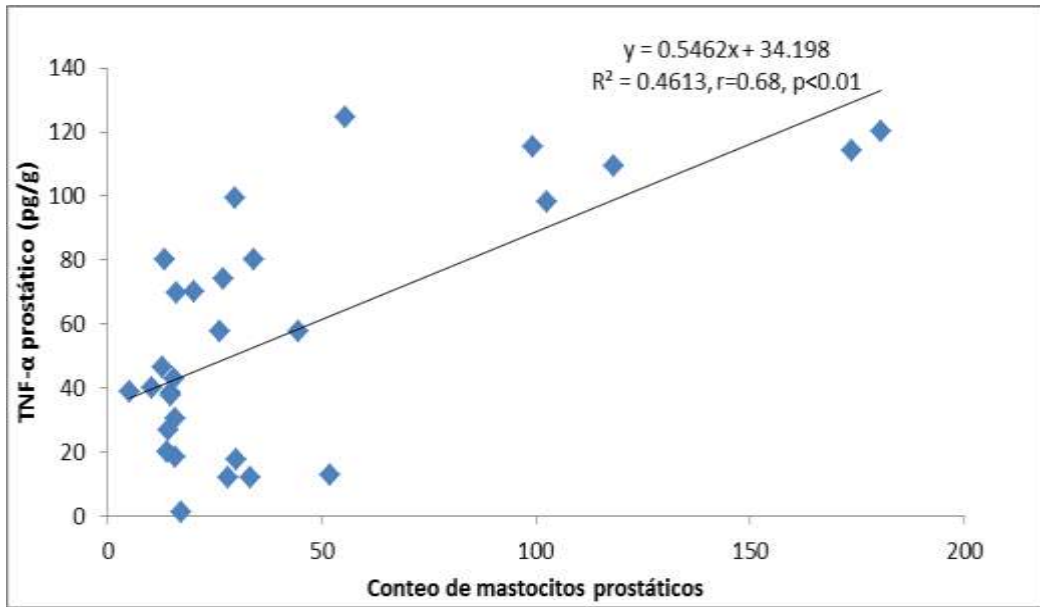


Figura 66. Análisis de correlación entre el conteo de mastocitos prostáticos y el TNF- α de la próstata de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja, luego de 84 días.

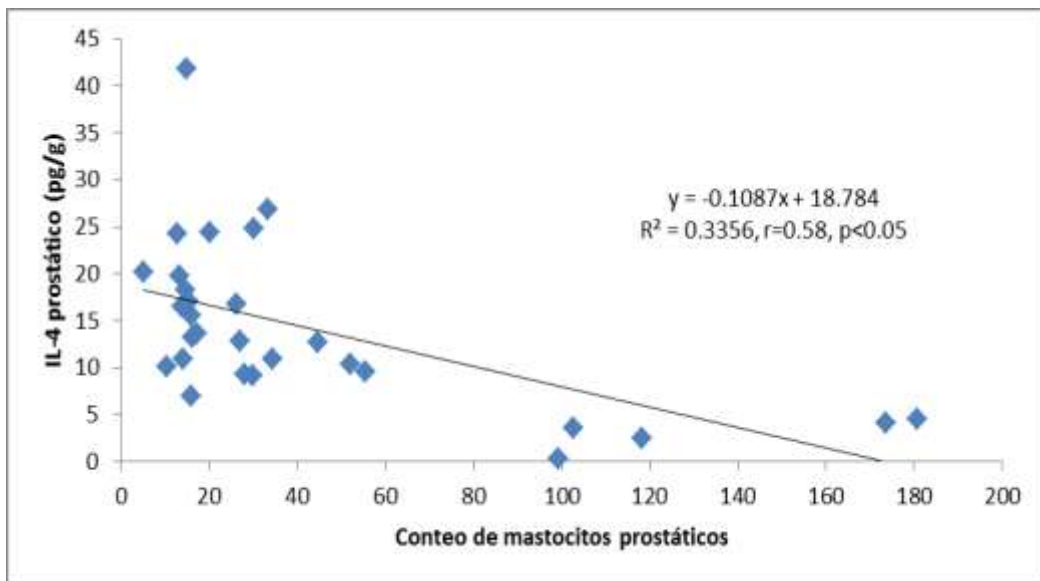


Figura 67. Análisis de correlación entre el conteo de mastocitos prostáticos e IL-4 de la próstata de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja, luego de 84 días.

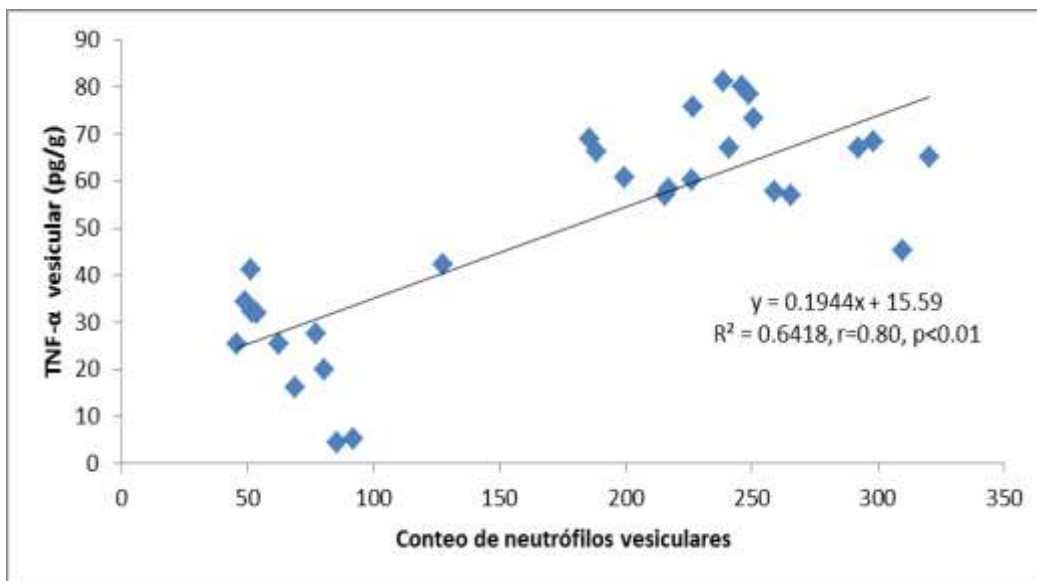


Figura 68. Análisis de correlación entre el conteo de neutrófilos vesiculares y el TNF- α de las vesículas seminales de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja, luego de 84 días.

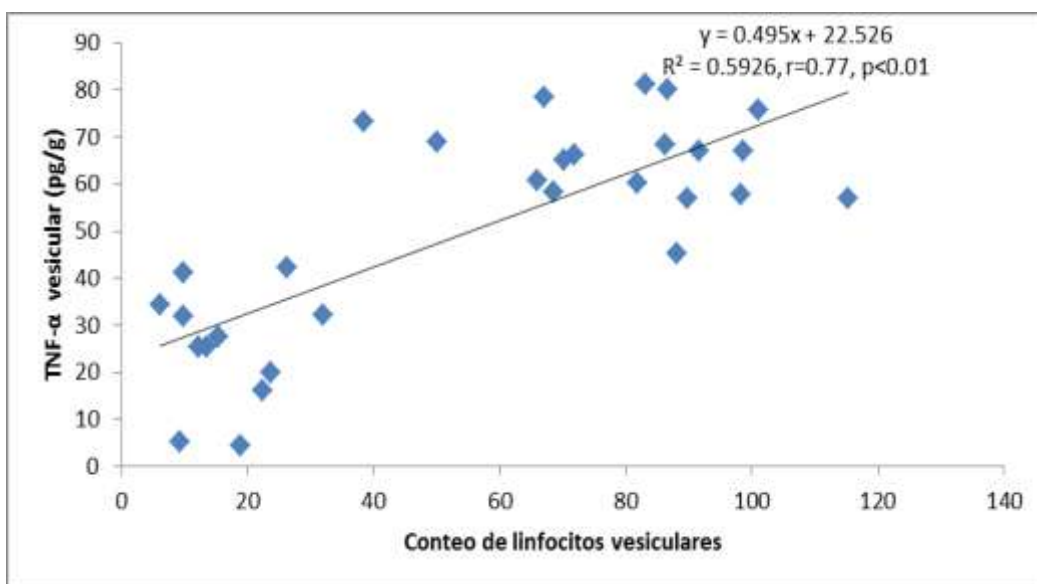


Figura 69. Análisis de correlación entre el conteo de linfocitos vesiculares y el TNF- α de las vesículas seminales de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja, luego de 84 días.

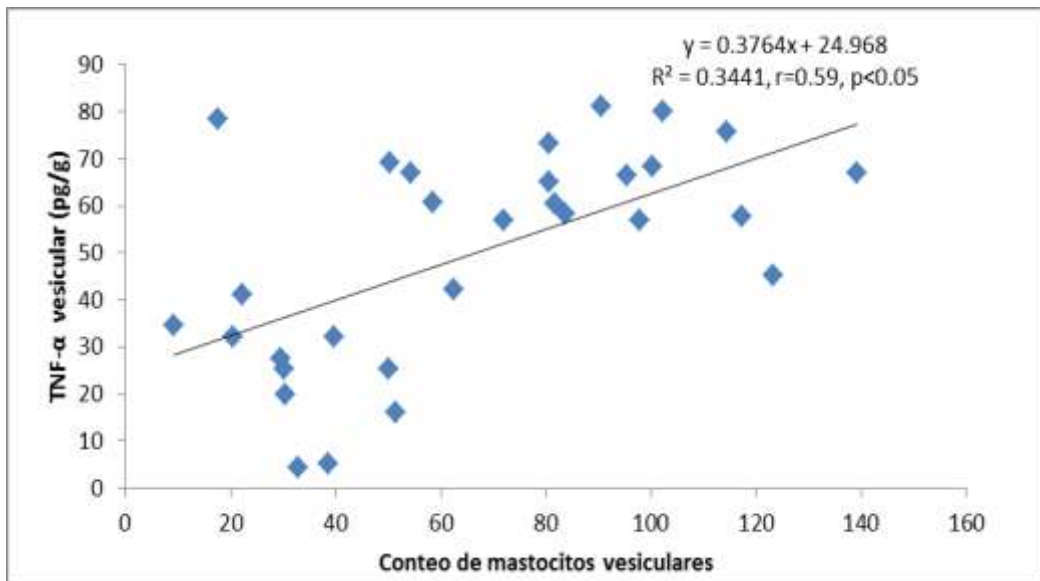


Figura 70. Análisis de correlación entre el conteo de mastocitos vesiculares y el TNF- α de las vesículas seminales de los grupos control, tratados con enantato de testosterona, con finasteride y el extracto hidroalcohólico de maca roja, luego de 84 días.

XIV- DISCUSION

Los mecanismos de acción por los cuales el extracto de maca roja mejora la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) aun no están definidos claramente. Este trabajo de investigación se ha aproximado a identificar estos mecanismos, mediante un modelo de inflamación causado en la próstata de rata mediante un andrógeno administrado exógenamente=

14.1 HPB Y EL PROCESO INFLAMATORIO

14.1.1 Asociación entre testosterona, células inflamatorias y citoquinas

Los resultados del presente estudio han permitido demostrar el efecto inflamatorio que causa la administración exógena del enantato de testosterona (ET) en próstata y vesículas seminales. Otros investigadores estudiando el efecto del ET en próstata han encontrado un aumento importante en el peso de este órgano (Jang y col, 2014); en las vesículas seminales también se ha demostrado que la ET produce un incremento del peso de este órgano (Kaushik, 2012), lo cual es confirmado por nuestros hallazgos.

Se ha reportado que en el desarrollo de la hiperplasia benigna de próstata ocurre una serie de respuestas inmunológicas relacionadas con la inflamación leucocitaria, estas células expresan citoquinas pro-inflamatorias (Steiner y col, 2002; Rick y col, 2011), que van a conllevar al proceso del crecimiento irregular de la próstata sobre todo a nivel del estroma prostático (Funahashi, 2014). Una sobre expresión o incremento de

los niveles de andrógenos, endógenos u exógenos conllevarían a esta patología (Asirvatham y col, 2006) en la próstata.

En nuestro estudio, se ha demostrado que la administración de ET causa un incremento importante de los niveles de testosterona en la próstata, lo que ocasionaría el aumento irregular del área estromal prostática e inflamación como ha sido demostrado previamente (Kim y col, 2013). La hiperplasia benigna de próstata inducida por ET se certifica por el aumento del área estromal prostático conforme se ha demostrado en estudios previos (Rick y col, 2011; Chen y col, 2012).

Como consecuencia de lo anteriormente descrito se observa un incremento en los pesos de la próstata y de las vesículas seminales por acción del enantato de testosterona. Esta situación ocurre debido a que ambos órganos son andrógeno-dependientes (Hiort, 2013).

Los resultados de la administración del enantato de testosterona demuestran que el andrógeno aplicado exógenamente ha producido hiperplasia benigna de próstata y de vesículas seminales asociada a un potente estímulo inflamatorio en ambos órganos. En ese sentido, podemos comparar con la administración del enantato de testosterona sobre próstata y vesículas seminales, el efecto contrario del finasteride y del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja.

El enantato de testosterona indujo inflamación en próstata y en vesículas seminales pero de manera diferencial. En efecto, en la próstata generó un aumento de TNF alfa, y disminución de IL-4 e interferon gamma; sin embargo, al inducir inflamación de vesículas seminales no se encontró un efecto sobre los niveles de INF- γ .

Luego, con los estudios histomorfológicos se ha demostrado que la HPB está asociada a la invasión de infiltrados inflamatorios, representado en células como neutrófilos, linfocitos y mastocitos, correlacionando, a su vez, directamente con los niveles de TNF- α , citoquina altamente proinflamatoria, e inversamente con dos citoquinas antinflamatorias que favorecen la respuesta inmunológica como son el INF- γ y la IL-4 (Szymanowski y col, 2013).

El interferon gamma favorece la respuesta inmunológica Th1 o inmunidad celular y la IL-4, la Th2 o inmunidad sistémica. Los cambios en los niveles de citoquinas como el TNF- α , IL-4 e IFN- γ encontrados en este estudio son similares a lo encontrado en ratas por otros investigadores, ante el estímulo de la testosterona (Rick y col, 2011; Kim y col, 2013).

En un estudio *in vitro* realizado en linfocitos provenientes de varones, se demostró que la testosterona regulaba la respuesta inmunológica mediada por linfocitos Th1 y Th2 (Girón-González y col, 2000). Sin embargo, estudios en otros tejidos muestran efectos diferenciales de testosterona. Por ejemplo en testículo, T disminuye TNF alfa, e interferon gamma (Fijak y col, 2011). En nuestro estudio se muestra que en próstata, ET aumenta TNF alfa con disminución de Th1 y Th2 en tanto que en vesículas seminales hay aumento de TNF alfa con solo disminución de Th2 sin afectar Th1.

En un estudio realizado en ratas Wistar inducidas a HPB con enantato de testosterona (Rick y col, 2011) en dosis de 2 mg/día durante 28 días, de manera similar a lo encontrado en la presente investigación se observó, infiltrados inflamatorios en el

estroma prostático, con numerosas células tales como linfocitos y mastocitos, con edema y congestión sanguínea. En este estudio se demostró además que diversas citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento ejercen una acción para desarrollar HPB y que el tratamiento con un antagonista de GnRH como el Cetrorelix puede suprimir la transcripción de estas citoquinas y factores de crecimiento para mejorar o reducir el tamaño de la próstata.

En ratas Sprague-Dawley (Peng y col, 2013), se encontraron resultados similares, en cuanto a la invasión de infiltrados inflamatorios en próstata ante el estímulo con testosterona administrada vía sub cutánea. En este último estudio se determinó el efecto protector de un extracto de hojas de *Gingko biloba*. En la presente investigación se ha demostrado por primera vez el efecto inflamatorio de la aplicación exógena del enantato de testosterona en próstata, así como también en vesículas seminales de ratas de la cepa Holtzman.

Cuando se realizaron las correlaciones entre el número de células inflamatorias y citoquinas en la próstata de los grupos control y estimulados con enantato de testosterona, se encontró que estas células correlacionan directamente con una citoquina que tiene un potente efecto inflamatorio en diversos tejidos, el TNF- α (Aggarwal y col, 2013), e inversamente proporcional con las citoquinas INF- γ e IL-4.

En vesículas seminales la asociación fue similar que en próstata con TNF- α e IL-4, sin embargo al hacer el análisis con INF- γ , la correlación con las células inflamatorias no fue significativa. Este resultado distinto en la próstata y en las vesículas seminales podría deberse a las acciones diferenciales que tienen los andrógenos en los distintos

órganos del tracto reproductor masculino (Wang y col, 2013). La próstata y las vesículas seminales tienen un origen embrionario diferente (Tanaka y col, 2010), y ello puede determinar este efecto diferencial del ET.

Las correlaciones entre células inflamatorias e INF- γ prostático señalan que esta citoquina disminuye a medida que se incrementa el número de células inflamatorias, con lo cual disminuye la activación de la respuesta inmune Th1. Esta tendencia también se muestra en el análisis de correlación entre células inflamatorias e IL-4. Esta citoquina regula la respuesta inmune Th2 (Chen y col, 2014). La inflamación estimulada por la testosterona favorece la acción del TNF- α en la próstata y vesículas seminales; este mecanismo estaría potenciado debido a que la IL-4 regula negativamente a esta citoquina con un alto poder inflamatorio (Albanesi y col, 2007).

14.2 EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON FINASTERIDE Y MACA ROJA

En el presente estudio se ha determinado que el aumento del número de células inflamatorias está asociado directamente al peso de la próstata y de las vesículas seminales, en animales estimulados con enantato de testosterona, con lo que se demuestra que la hiperplasia está asociada a un proceso inflamatorio importante. Esta asociación se mantiene a pesar del tratamiento con finasteride o con extracto atomizado de maca roja, por lo que se puede afirmar entonces, debido a la naturaleza del estudio de tipo intervención, que este resultado es de causa y efecto. Es decir, que

el incremento del número de células inflamatorias explica el incremento del peso de la próstata y de las vesículas seminales.

Cuando se elabora la asociación entre testosterona con células inflamatorias y TNF- α se determina una alta correlación positiva en próstata, sin embargo este proceso inflamatorio disminuye significativamente con el tratamiento con finasteride y el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja. Los resultados indicarían que el aumento de testosterona por el ET favorecería un proceso inflamatorio con incremento de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α . Este proceso inflamatorio se refuerza por la disminución de citoquinas anti-inflamatorias como interferon gamma e IL-4.

Se ha encontrado en un estudio previo que el finasteride disminuye la infiltración de neutrófilos, reduciendo los niveles de TNF- α (Frink y col, 2007), debido a que disminuye DHT. En otro estudio se encontró que el TNF- α disminuye cuando se administra oligonol, un derivado de los polifenoles, a animales experimentales, mejorando la HPB (Dong y col, 2009).

En las imágenes histológicas de las muestras de próstata de animales que habían sido tratados con enantato de testosterona más finasteride (ET-F2) ó con ET más el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja (ET-MR40 y ET-MR80) no se visualizó la invasión de estas células inflamatorias, indicando el efecto anti-inflamatorio tanto del finasteride como del extracto hidroalcohólico atomizado de la maca roja, resultado que no se había determinado o demostrado anteriormente.

Los tratamientos con finasteride y el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja regulan la respuesta inmune inflamatoria y antiinflamatoria en próstata, pero de

manera diferenciada. Ambos disminuyen la citoquina proinflamatoria TNF- α , en tanto que el finasteride actúa preferencialmente favoreciendo la presencia de la citoquina anti-inflamatoria IL-4 y la maca roja lo hace a través de IFN- γ . Esto indica que la maca roja estaría actuando sobre la respuesta a Th1, comandada por el INF- γ , mientras que el finasteride lo haría a través de la respuesta a Th2, comandada por la IL-4.

Un resultado interesante fue la determinación que los niveles de INF- γ aumentaron con los tratamientos con el extracto hidroalcohólico de maca roja, más que con el finasteride. En un estudio anterior realizado por Leiva (2010), demostró en animales experimentales ovariectomizados que el tratamiento con maca roja elevó los niveles de INF- γ sérico, una citoquina involucrada en procesos inflamatorios causados por infecciones intracelulares, sin mayor efecto sobre los niveles de IL-4. El incremento inicial de esta citoquina puede activar la respuesta inmunológica de linfocitos Th1 e inhibir el desarrollo de la enfermedad (Rieber y col, 2011).

En otros experimentos realizados *in vitro* con maca, han indicado el gran poder antiinflamatorio de este producto natural sobre la regeneración celular de cartílago, (Miller y col, 2006; Akhtar y col, 2011), favoreciendo la respuesta inmunológica y mejorando los niveles de factores de crecimiento que van a regenerar este tejido; del mismo modo en un estudio realizado en células de hiperplasia benigna de próstata, se observó que el sulforafano, un isotiocianato derivado de las crucíferas (Familia a la que pertenece la maca), indujo arresto del ciclo celular en estas células, disminuyendo su proliferación (Clarke y col, 2011), además, en un reciente estudio se ha

determinado que el consumo de crucíferas, disminuye los biomarcadores inflamatorios como el TNF- α y la IL-6 (Jiang y col, 2014). Estos resultados podrían sugerir que la maca presenta efectos antiinflamatorios importantes en diversos tejidos. En el presente trabajo de investigación se ha determinado este efecto a nivel de la próstata.

La administración de finasteride redujo los infiltrados inflamatorios en vesículas seminales, de la misma forma que en próstata. Debido a su acción de inhibir 5- α reductasa, el efecto de este fármaco también se da en las vesículas seminales, órgano dependiente de andrógenos. El análisis cuantitativo corroboró este resultado, donde se determinó que este fármaco disminuye el número de células inflamatorias: neutrófilos, linfocitos y mastocitos. En este órgano, el finasteride redujo también el TNF- α , lo que indica que no produce disminución de la inflamación en este órgano, reflejado en la disminución del peso de las vesículas seminales. Los análisis multivariados indicaron que los grupos tratados con enantato de testosterona más finasteride y extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja en próstata presentaron un efecto del tratamiento en el conteo de células inflamatorias.

14.3 HORMONAS SEXUALES Y LOS EFECTOS DEL FINASTERIDE Y EL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE MACA ROJA

Los valores de hormonas sexuales (testosterona y estradiol) en próstata observadas en este trabajo de investigación fueron similares a lo encontrado en un estudio previo realizado en ratas machos (Wu y col, 2009). El hecho de observar que con el

finasteride, los niveles de testosterona intraprostática son mayores que en el grupo con solo ET nos indica que el finasteride al ser un inhibidor de la 5 α -reductasa (Fwu y col, 2013), evita su metabolización, de testosterona a dihidrotestosterona (DHT) y por lo tanto se acumula testosterona en exceso, lo que podría ocasionar que esta se metabolice a estradiol por acción de la aromatasa y por consiguiente se incrementen sus niveles intraprostáticos. Sin embargo esta metabolización de testosterona a estradiol es mucho más lenta que la conversión a dihidrotestosterona, por eso es que se encontró valores aumentados de testosterona en el grupo tratado con finasteride. Similares efectos fueron encontrados en estudios previos realizados en ratas cuando se utilizó un inhibidor de la 5- α reductasa (Borst y col, 2005; Prahalada y col, 1998). El tratamiento con el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja no altera los niveles de testosterona a nivel intraprostático, con lo que se descarta un efecto a nivel hormonal o a nivel de enzimas que regulan el metabolismo de las hormonas; esto sugiere que la maca roja no tiene un efecto sobre los receptores de andrógenos o sobre la metabolización de testosterona a DHT ni a estradiol. La DHT es un andrógeno 10 veces más potente que la testosterona y responsable del crecimiento benigno o maligno de la próstata (Titus y col, 2014). Estudios previos han demostrado que la maca no actúa sobre el receptor de andrógenos (Zenico y col, 2008). En resumen, la maca roja a diferencia de finasteride no inhibe la enzima 5 alfa reductasa.

Los niveles de estradiol intraprostáticos se comportan de una manera similar, en los animales que fueron tratados con enantato de testosterona, es decir los niveles de estradiol disminuyeron en comparación con el grupo control, sin embargo en el grupo

tratado con finasteride los niveles de estradiol tienden a aumentar. En otro estudio el finasteride en una dosis de 5 mg/kg incrementó los niveles de testosterona y estradiol en tejidos ex-plantados de próstata de humanos con HPB (Kumar y col, 2012), indicando que el exceso de testosterona se está metabolizando a estradiol por acción de la aromatasas, enzima que facilita esta conversión (Dickens y col, 2013).

En el presente estudio se encontró niveles altos para testosterona y bajos para estradiol cuando se le administró enantato de testosterona para causar HPB; de forma similar ocurre cuando se le administró a ratas con un inhibidor endocrino (bisfenol A) o propionato de testosterona donde destacan los valores de testosterona más que los de estradiol (Castro y col, 2013, Xiang-Yun y col, 2010).

14.4 CONSIDERACIONES FINALES

El tratamiento con el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja pudo modular la respuesta inmunológica en próstata ante el estímulo inflamatorio producido por el enantato de testosterona. Si bien es cierto no hay estudios que impliquen el efecto antiinflamatorio de la maca sobre la hiperplasia benigna de próstata, si se ha determinado que el consumo de crucíferas, disminuye biomarcadores inflamatorios como el TNF- α y la IL-6 (Jiang y col, 2014). Más aún, en un estudio transversal realizado en los Andes Centrales del Perú, el consumo de maca se asocia a una disminución de IL-6 en suero y del proceso del envejecimiento, corroborado en el puntaje de salud de esas poblaciones (Gonzales y col, 2013). Es más, en estudios realizados en líneas celulares de cáncer de próstata, se observó que los isotiocianatos, metabolitos secundarios de las crucíferas, disminuían el crecimiento de estas células,

inactivando factores de transcripción que favorecían el incremento de citoquinas con alto poder inflamatorio (Nachshon-Kedmi y col, 2003; Gong y col, 2009)

Previamente se ha demostrado, en estudios de ensayos bio-guiados, que no existe un solo metabolito de la maca roja que tenga el efecto de inhibir la HPB; se ha determinado que el extracto hidroalcohólico tiene mejor efecto contra la HPB que las otras fracciones de maca roja, extraídas de acuerdo a la polaridad de diferentes solventes (Gasco y col, 2007b). Esto implica que el buscar un metabolito secundario activo conllevaría a resultados pocos alentadores. Al parecer los metabolitos de la maca roja estarían actuando en una forma sinérgica para dar el efecto biológico, de inhibir la HPB.

XV- CONCLUSIONES

La administración de enantato de testosterona en ratas de la cepa Holtzman está fuertemente asociada a un proceso inflamatorio, tanto en la próstata como en las vesículas seminales.

El efecto inflamatorio de la testosterona en la próstata se da por el incremento de células inflamatorias, que a su vez están asociadas directamente al TNF- α , e inversamente a IL-4 e INF- γ .

En las vesículas seminales, el efecto inflamatorio de la testosterona se da por el incremento de células inflamatorias, que a su vez están asociadas directamente al TNF- α , e inversamente asociadas a la IL-4. No hubo ninguna asociación con el INF- γ .

El proceso inflamatorio ocasionado por el enantato de testosterona en la próstata es contrarrestado por el tratamiento con finasteride y por el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja.

El extracto atomizado de maca roja tiene un efecto preferencial sobre los niveles de interferon gamma intraprostático, en tanto, finasteride actúa sobre IL-4.

XVI- RECOMENDACIONES

Estudios posteriores deberían enfocarse a evaluar HIF-1 α en próstata para dilucidar el efecto de la maca roja en este órgano, un reciente estudio demostró que el HIF-1 α media el crecimiento prostático bajo condiciones inflamatorias, es más, se encontró que TNF- α indujo la expresión de HIF-1 α en tejidos prostáticos de rata inducidos a hiperplasia cuando se les inyectó lipopolisacárido, una potente sustancia proinflamatoria (Kim y col, 2013), sugiriendo que el HIF-1 α debe ser visto como un blanco alentador para bloquear la transición de prostatitis a HPB.

Evaluar por estudios inmunohistoquímicos receptores de andrógenos y estrógenos, de la misma forma marcadores inflamatorios como son las células inflamatorias y factores de transcripción que induzcan la proliferación celular y la respuesta inmune como el STAT-3 y el STAT-5 (Siejka, 2010; Singh, 2012).

Evaluar los efectos del extracto hidroalcohólico de maca roja en cultivo de células de próstata con hiperplasia o cáncer, directamente y/o previamente digeridas con una fracción S9 hepática (Sobrenadante de homogenizado de hígado que contiene enzimas con gran actividad metabólica) (Natsch, 2013), que simularía lo que sucedería en un organismo vivo, donde los metabolitos secundarios de la maca se vuelven activos.

**XVII- APROXIMACION A LOS MECANISMOS DE ACCION DEL
DESARROLLO DE LA HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA
PRODUCIDA POR EVENTOS INFLAMATORIOS**

↑ Testosterona → ↑ DHT → ↑ Células
inflamatorias



↑ TNF- α , ↓ INF- γ , ↓ IL-4



↑ Area del estroma prostático



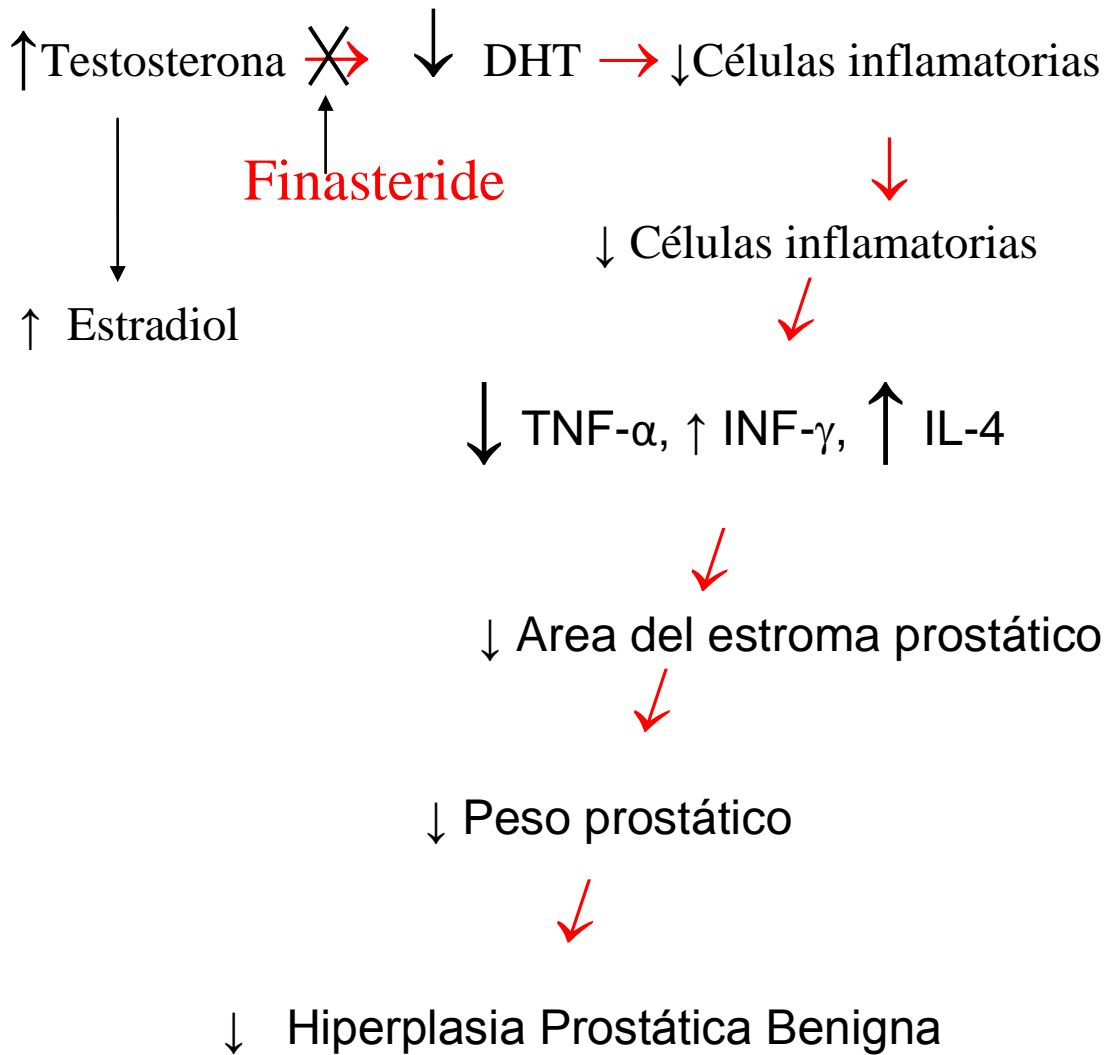
↑ Peso de la próstata



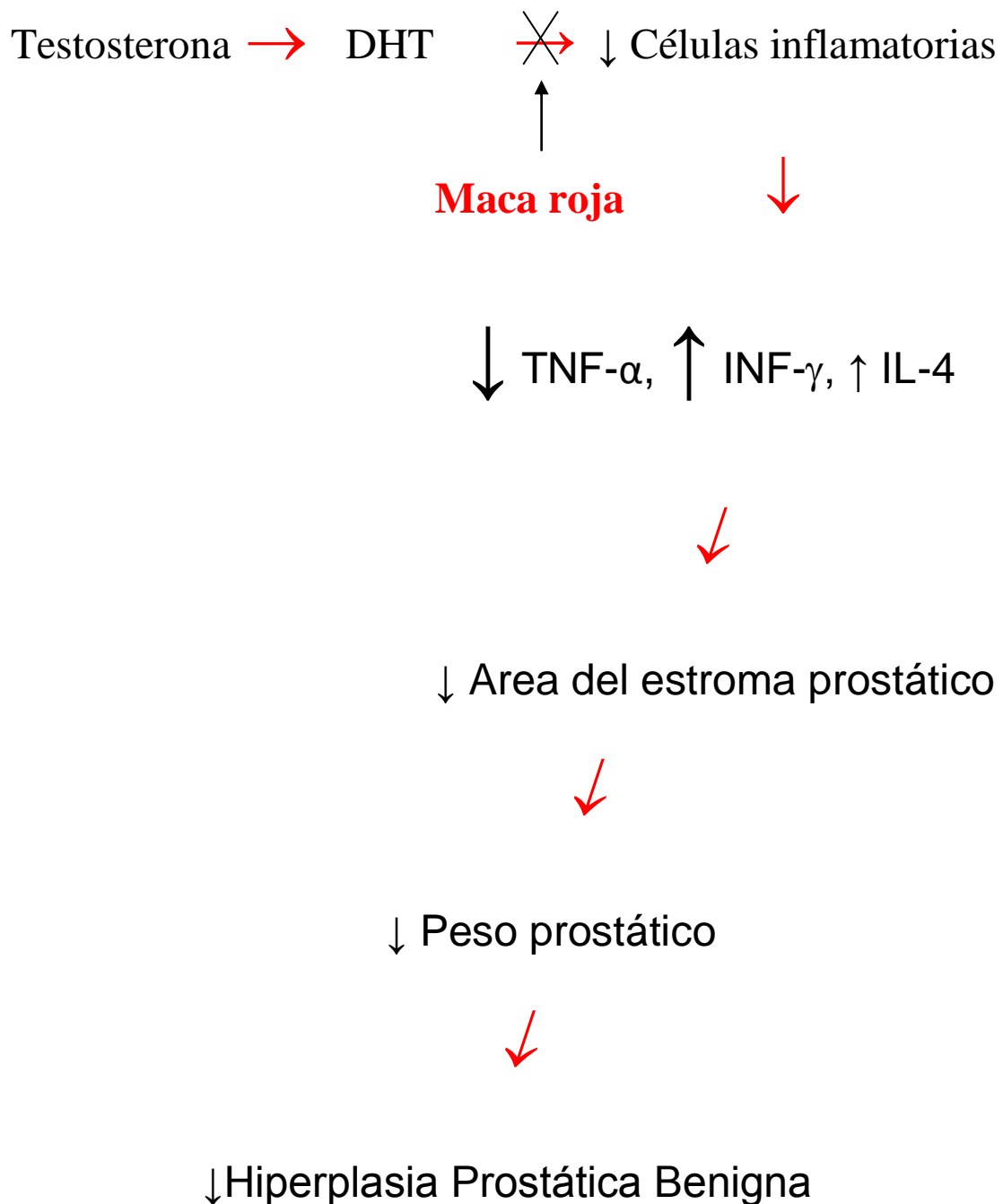
Hiperplasia Prostática Benigna

Esquema 1. Aproximación al mecanismo de acción del desarrollo de la hiperplasia benigna de próstata ocasionado por el proceso inflamatorio estimulado por el enantato de testosterona.

XVIII- APROXIMACION AL MECANISMO DE ACCION DEL FINASTERIDE Y DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO ATOMIZADO DE MACA ROJA EN LOS EVENTOS INFLAMATORIOS DE LA HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA PRODUCIDA POR EL ENANTATO DE TESTOTERONA



Esquema 2. Aproximación al mecanismo de acción del finasteride sobre la inhibición del desarrollo de la hiperplasia prostática benigna ocasionada por el proceso inflamatorio estimulado por el enantato de testosterona.



Esquema 3. Aproximación al mecanismo de acción del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja sobre la inhibición del desarrollo de la hiperplasia prostática benigna ocasionada por el proceso inflamatorio estimulado por el enantato de testosterona.

XIX- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott DE, Pritchard C, Clegg NJ, *et al.* Expressed sequence tag profiling identifies developmental and anatomic partitioning of gene expression in the mouse prostate. *Genome Biol.* 2003;4(12):R79.
2. Aggarwal BB, Gupta SC, Sung B. Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *Br J Pharmacol.* 2013 Aug;169(8):1672-92
3. Aggarwal S, Verma A, Shukla R, *et al.* An Overview of Phytotherapeutic Approaches for the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia. *Mini Rev Med Chem.* 2014 Jan 23
4. Akhtar N1, Miller MJ, Haqqi TM. Effect of an Herbal-Leucine mix on the IL-1 β -induced cartilage degradation and inflammatory gene expression in human chondrocytes. *BMC Complement Altern Med.* 2011 Aug 19;11:66.
5. Albanesi C, Fairchild HR, Madonna S, *et al.* IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J Immunol.* 2007 Jul 15;179(2):984-92.
6. Amălinei C. [Reciprocal epithelio-stromal interactions in normal and neoplastic prostate]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2006 Apr-Jun;110(2):391-8

7. Arena F. Specific antigen prostatic changes during treatment with finasteride or dutasteride for benign prostatic hyperplasia]. *Minerva Urol Nefrol.* 2013 Sep;65(3):211-6.
8. Asirvatham AJ, Schmidt M, Gao B, Chaudhary J. Androgens regulate the immune/inflammatory response and cell survival pathways in rat ventral prostate epithelial cells. *Endocrinology.* 2006 Jan;147(1):257-71.
9. Bauman DR, Steckelbroeck S, Peehl DM, Penning TM. Transcript profiling of the androgen signal in normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostate cancer. *Endocrinology.* 2006 Dec;147(12):5806-16.
10. Benedit Hernandez Patricia. Identificación y caracterización de nuevos genes implicados en el desarrollo del cáncer de próstata. Tesis para optar el grado de Doctor en Bioquímica. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España 2002.
11. Berteaux N, Lottin S, Adriaenssens E, *et al.* Hormonal regulation of H19 gene expression in prostate epithelial cells. *J Endocrinol.* 2004 Oct;183(1):69-78. Erratum in: *J Endocrinol.* 2004 Dec;183(3)
12. Borst SE, Lee JH, Conover CF. Inhibition of 5alpha-reductase blocks prostate effects of testosterone without blocking anabolic effects. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005 Jan;288(1):E222-7.
13. Bouraoui Y, Ricote M, García-Tuñón I, *et al.* Pro-inflammatory cytokines and prostate-specific antigen in hyperplasia and human prostate cancer. *Cancer Detect Prev.* 2008;32(1):23-32.

14. Carson C, Rittmaster R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology*. 2003 Apr;61(4 Suppl 1):2-7.
15. Castro B, Sánchez P, Torres JM, *et al*. Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5 α -reductase isozymes in rat prostate. *PLoS One*. 2013;8(2):e55905.
16. Cha WH, Choi JD, Kim KH, *et al*. Comparison and efficacy of low-dose and standard-dose tamsulosin and alfuzosin in medical expulsive therapy for lower ureteral calculi: prospective, randomized, comparative study. *Korean J Urol*. 2012 May;53(5):349-54
17. Chapple CR. Pharmacological therapy of benign prostatic hyperplasia/lower urinary tract symptoms: an overview for the practising clinician. *BJU Int*. 2004 Nov;46(5):636-40.
18. Chen J, Xiong CM, Song SS, *et al*. Fraction of macroporous resin from *Smilax china* L. inhibits testosterone propionate-induced prostatic hyperplasia in castrated rats. *J Med Food*. 2012 Jul;15(7):646-50
19. Chen Z, Oeser K, Baum W, *et al*. A6.4 Induction of TH2 cells and eosinophil by infection with *nippostrongylus brasiliensis* protects against rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014 Mar 1;73 Suppl 1:A72
20. Chinni SR, Li Y, Upadhyay S, *et al*. Indole-3-Carbonil (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene* 2001 May 24;20(23):2927-36.
21. Chughtai B, Lee R, Te A, Kaplan S. Inflammation and benign prostatic hyperplasia: clinical implications. *Curr Urol Rep*. 2011 Aug;12(4):274-7.

22. Cillari E, Vitale G, Arcoleo F, *et al.* In vivo and in vitro cytokine profiles and mononuclear cell subsets in Sicilian patients with active visceral leishmaniasis. *Cytokine* 1995 Oct;7(7):740-5.
23. Clark RV, Hermann DJ, Cunningham GR, *et al.* Marked suppression of dihydrotestosterone in men with benign prostatic hyperplasia by dutasteride, a dual 5alpha-reductase-inhibitor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 May;89(5):2179-84.
24. Clarke JD1, Hsu A, Yu Z, Dashwood RH, Ho E. Differential effects of sulforaphane on histone deacetylases, cell cycle arrest and apoptosis in normal prostate cells versus hyperplastic and cancerous prostate cells. *Mol Nutr Food Res.* 2011 Jul;55(7):999-1009. doi: 10.1002/mnfr.201000547. Epub 2011 Mar 4.
25. Cohen SA, Parsons JK. Combination pharmacological therapies for the management of benign prostatic hyperplasia. *Drugs Aging.* 2012 Apr 1;29(4):275-84
26. Dedhia RC, McVary KT. Phytotherapy for lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 2008 Jun;179(6):2119-25. Epub 2008 Apr 18.
27. Di Silverio F, Gentile V, De Matteis A, *et al.* Distribution of inflammation, pre-malignant lesions, incidental carcinoma in histologically confirmed benign prostatic hyperplasia: a retrospective analysis. *Eur Urol.* 2003 Feb;43(2):164-75.

28. Dickens MJ, de Bournonville C, Balthazart J, Cornil CA. Relationships between rapid changes in local aromatase activity and estradiol concentrations in male and female quail brain. *Horm Behav.* 2013 Dec 22;65(2):154-164
29. Dong Suk Kim,* Eun Jin Lee,* Kang Su Cho, *et al.* Preventive Effects of Oligomerized Polyphenol on Estradiol-Induced Prostatitis in Rats *Yonsei Med J* 50(3): 391-398, 2009
30. Farnsworth WE. Estrogen in the etiopathogenesis of BPH. *Prostate.* 1999 Dec 1;41(4):263-74.
31. Favilla V, Cimino S, Salamone C, *et al.* Risk factors of sexual dysfunction after transurethral resection of the prostate (TURP): A 12months follow-up. *J Endocrinol Invest.* 2013
32. Fialova B, Smesny Trtkova K, Paskova L, *et al.* Effect of histone deacetylase and DNA methyltransferase inhibitors on the expression of the androgen receptor gene in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Oncol Rep.* 2013 May;29(5):2039-45
33. Fibbi B, Penna G, Morelli A, *et al.* Chronic inflammation in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Int J Androl.*2010 Jun 1;33(3):475-88.
34. Ficarra V. Is chronic prostatic inflammation a new target in the medical therapy of lower urinary tract symptoms (LUTS) due to benign prostate hyperplasia (BPH)? *BJU Int.* 2013 Aug;112(4):421-2
35. Fijak M1, Schneider E, Klug J, *et al.* Testosterone replacement effectively inhibits the development of experimental autoimmune orchitis in rats:

- evidence for a direct role of testosterone on regulatory T cell expansion. *J Immunol.* 2011 May 1;186(9):5162-72.
36. Frink M, Hsieh YC, Hu S, *et al.* Mechanism of salutary effects of finasteride on post-traumatic immune/inflammatory response: upregulation of estradiol synthesis. *Ann Surg.* 2007 Nov;246(5):836-43.
37. Fromont G, Chene L, Latil A, *et al.* Molecular profiling of benign prostatic hyperplasia using a large scale real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction approach. *J Urol.* 2004 Oct;172(4 Pt 1):1382-5.
38. Funahashi Y1, O'Malley KJ, Kawamorita N, *et al.* Upregulation of androgen-responsive genes and transforming growth factor- β 1 cascade genes in a rat model of non-bacterial prostatic inflammation. *Prostate.* 2014 Apr;74(4):337-45.
39. Fwu CW, Eggers PW, Kirkali Z, *et al.* Change in sexual function in men with lower urinary tract symptoms (LUTS)/ benign prostatic hyperplasia (BPH) associated with long-term treatment with doxazosin, finasteride, and combined therapy. *J Urol.* 2013 Dec 13.
40. Gao HG, Fisher PW, Lambi AG, *et al.* Increased serum and musculotendinous fibrogenic proteins following persistent low-grade inflammation in a rat model of long-term upper extremity overuse. *PLoS One.* 2013 Aug 28;8(8):e71875
41. Gasco M, Villegas L, Yucra S, *et al.* Effect dose-response of red maca on benign prostate hyperplasia in male rats. *Phytomedicine.* 2007a Aug;14(7-8):460-4.

42. Gasco M, Yucra S, Gonzales GF. Efecto de las diferentes fracciones de *Lepidium meyenii* (Maca Roja), una planta oriunda de los Andes Peruanos, sobre la Hiperplasia Prostática Benigna inducida en animales experimentales. Acta Andina 2007b. Segunda Epoca Vol 10 N°1.
43. Gasco Tantachuco Manuel. “Efecto de la maca roja sobre la Hiperplasia Prostática Benigna en ratas inducidas experimentalmente con enantato de testosterona” Tesis para optar el grado de Magíster en Fisiología. Escuela de Postgrado Víctor Alzamora Castro. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú 2005.
44. Gerlinger-Romero F, Guimarães-Ferreira L, Giannocco G, Nunes MT. Chronic supplementation of beta-hydroxy-beta methylbutyrate (HMβ) increases the activity of the GH/IGF-I axis and induces hyperinsulinemia in rats. Growth Horm IGF Res. 2011 Apr;21(2):57-62
45. Girón-González JA1, Moral FJ, Elvira J, *et al.* Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women. Eur J Endocrinol. 2000 Jul;143(1):31-6.
46. Gong L, Zheng M, Li Y, *et al.* Seminal vesicle metastasis after partial hepatectomy for hepatocellular carcinoma. BMC Cancer. 2011 Mar 28;11:111
47. Gonzales Arimborgo Carla. Efecto dosis respuesta del extracto hidroalcohólico de maca roja (*lepidium meyenii*) sobre la próstata en ratas tratadas con andrógenos y estrógenos. Tesis para optar el grado de Magíster

en Fisiología. Escuela de Postgrado Víctor Alzamora Castro. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú 2007.

48. Gonzales C, Leiva-Revilla J, Rubio J, *et al.* Effect of red maca (*Lepidium meyenii*) on prostate zinc levels in rats with testosterone-induced prostatic hyperplasia. *Andrologia*. 2012 May;44 Suppl 1:362-9.
49. Gonzales GF, Gasco M, Malheiros-Pereira A, Gonzales-Castañeda C Antagonistic effect of *Lepidium meyenii* (red maca) on prostatic hyperplasia in adult mice. *Andrologia*. 2008 Jun;40(3):179-85
50. Gonzales GF, Miranda S, Nieto J, *et al.* Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats.. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005 Jan 20;3(1):5.
51. Gonzales GF, Vasquez V, Rodríguez D, *et al.* Effect of two different extracts of red maca (*Lepidium meyenii*) in male rats with testosterone-induced prostatic hyperplasia. *Asian J Androl*. 2007 Mar;9(2):245-51.
52. Gonzales GF, Gasco M, Lozada-Requena I. Role of maca (*Lepidium meyenii*) consumption on serum interleukin-6 levels and health status in populations living in the Peruvian Central Andes over 4000 m of altitude. *Plant Foods Hum Nutr*. 2013 Dec;68(4):347-51.
53. Gormley GJ, Stoner E, Bruskewitz RC, *et al.* The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. The Finasteride Study Group. *N Engl J Med*. 1992 Oct 22;327(17):1185-91
54. Greenberg NM, DeMayo F, Finegold MJ, *et al.* Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:3439-3443.

55. Habib FK, Ross M, Tate R, Chisholm GD. Differential effect of finasteride on the tissue androgen concentrations in benign prostatic hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997 Feb;46(2):137-44
56. Han LC, Kim SP, Gross CP, *et al*. Association of physician specialty and medical therapy for benign prostatic hyperplasia. *Med Care*. 2014 Feb;52(2):128-36
57. Handisurya A, Steiner GE, Stix U, *et al*. Differential expression of interleukin-15, a pro-inflammatory cytokine and T-cell growth factor, and its receptor in human prostate. *Prostate* 2001; 49:251–262.
58. Hiort O. The differential role of androgens in early human sex development. *BMC Med*. 2013 Jun 24;11:152.
59. Jang H, Bae WJ, *et al*. Scoritae extract reduces prostate weight and suppresses prostate cell proliferation in a rat model of benign prostate hyperplasia. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:475876.
60. Jesik CJ, Holland JM, Lee C: An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate* 1982, 3:81-97.
61. Jhang JF, Liao CH, Kuo HC. Severity of LUTS reflects different composition of bladder storage dysfunction and bladder outlet obstruction in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia. *Int J Clin Pract*. 2014 Jan 29.
62. Jiang Y, Wu SH, Shu XO, *et al*. Cruciferous Vegetable Intake Is Inversely Correlated with Circulating Levels of Proinflammatory Markers in Women. *J Acad Nutr Diet*. 2014 Mar 12.

63. Jin P, Wang YH, Peng YG, *et al.*[Effect of PI3K/AKT inhibitor on benign prostate hyperplasia and its mechanism: an experimental study]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2010 Dec;16(12):1068-75.
64. Kaplan SA. Reduction of rat prostate weight by combined quercetin-finasteride treatment is associated with cell cycle deregulation. *J Urol*. 2005 Mar;173(3):914.
65. Karakoyun B, Uslu U, Ercan F, *et al.* The effect of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate on inflammation and apoptosis in rat experimental colitis. *Life Sci*. 2011 Sep 12;89(11-12):402-7.
66. Karas RH, Gauer EA, Bieber HE, *et al.* Growth factor activation of the estrogen receptor in vascular cells occurs via a mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *J Clin Invest*. 1998 Jun 15;101(12):2851-61.
67. Kaushik MC¹, Misro MM, Sehgal N, Nandan D. Testosterone administration to adult rats differentially modulates androgen and oestrogen receptor- α expression in reproductive organs and pituitary. *Andrologia*. 2012 May;44 Suppl 1:312-22.
68. Kim HJ, Park JW, Cho YS, *et al.* Pathogenic role of HIF-1 α in prostate hyperplasia in the presence of chronic inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jan;1832(1):183-94
69. Kinjo T, Nonomura D, Yamamoto Y, *et al.* Primary adenocarcinoma of the seminal vesicle difficult to differentiate from rectal carcinoma : a case report. *Hinyokika Kyo*. 2013 Sep;59(9):597-601

70. Kramer G, Marberger M. Could inflammation be a key component in the progression of benign prostatic hyperplasia? *Curr Opin Urol*. 2006 Jan;16(1):25-9.
71. Kramer G, Mitteregger D, Marberger M. Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease?. *Eur Urol*. 2007 May;51(5):1202-16.
72. Kramer G, Steiner GE, Grobl M, *et al*. Response to sublethal heat treatment of prostatic tumor cells and of prostatic tumor infiltrating T-cells. *Prostate*. 2004 Feb 1;58(2):109-20
73. Kubota K, Ohsako S, Kurosawa S, *et al*. Effects of vinclozolin administration on sperm production and testosterone biosynthetic pathway in adult male rat. *J Reprod Dev*. 2003 49:403-412.
74. Kumar R, Verma V, Sarswat A. Selective estrogen receptor modulators regulate stromal proliferation in human benign prostatic hyperplasia by multiple beneficial mechanisms--action of two new agents. *Invest New Drugs*. 2012 30(2):582-93
75. Lee CB, Ha US, Yim SH, *et al*. Does finasteride have a preventive effect on chronic bacterial prostatitis? Pilot study using an animal model. *Urol Int*. 2011;86(2):204-9.
76. Lee KL, Peehl D. Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 2004; 172:1784–1791.

77. Lee MY, Shin IS, Seo CS, *et al.* Effects of Melandrium firmum methanolic extract on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in Wistar rats. *Asian J Androl.* 2012 Mar;14(2):320-4
78. Lekas AG, Lazaris AC, Chrisofos M, *et al.* Finasteride effects on hypoxia and angiogenetic markers in benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 2006 Aug;68(2):436-41.
79. Leiva Revilla Johanna. Efecto del tratamiento de diferentes concentraciones de extracto de Maca roja (*Lepidium meyenii*) sobre las concentraciones de IFN- γ en ratas ovariectomizadas. Tesis para optar el título de Licenciado en Biología. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú, 2010.
80. Levine AC, Kirschenbaum A, Gabrilove JL. The role of sex steroids in the pathogenesis and maintenance of benign prostatic hyperplasia. *Mt Sinai J Med.* 1997 Jan;64(1):20-5
81. Li LC, Shiina H, Deguchi M, *et al.* Age-dependent methylation of ESR1 gene in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Aug 20;321(2):455-61.
82. Li SH, Ryu JH, Park SE, *et al.* Vitamin C supplementation prevents testosterone-induced hyperplasia of rat prostate by down-regulating HIF-1 α . 2010 Sep;21(9):801-8.
83. Luo J, Duggan DJ, Chen Y, *et al.* Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Res.* 2001 Jun 15;61(12):4683-8.

84. Manzarbeitia F, Vela Navarrete R, Fernández-Aceñero MJ. [Early histopathological aspects of benign prostatic hyperplasia: myxoid-inflammatory nodules]. *Actas Urol Esp.* 2010 Jun;34(6):549-54.
85. Martinez-Caballero S, Carricajo Fernandez C, Perez-Fernandez R. Effect of integral suspension of lepidium latifolium on prostate hyperplasia in rats. *Fitoterapia* 2004, 75:187-191.
86. Mc Connel JD. The long-term effects of medical therapy on the progression in men of BPH: results from the MTOPS trial. *J Urol* 2002;167:264
87. Mc Neal JE: The zonal anatomy of the prostate. *Prostate* 1981,2:35-49.
88. Miller MJ1, Ahmed S, Bobrowski P, Haqqi TM. The chondroprotective actions of a natural product are associated with the activation of IGF-1 production by human chondrocytes despite the presence of IL-1beta. *BMC Complement Altern Med.* 2006 Apr 7;6:13.
89. Misra, SK. J. Macura, K. T. Ramesh, and A. M. Okamura: The Importance of Organ Geometry and Boundary Constraints for Planning of Medical Interventions. *Med Eng Phys.* 2009 March; 31(2): 195–206.
90. Mitra SK, Sundarman R, Moham AR, et al. Protective effect of Prostate in experimental prostatic hyperplasia in rats. *Asian J Androl* 1999 Dec;1(4):175-9.
91. Mizuno N, Fujikawa N, Hayashi N, *et al.* [A case of primary seminal vesicle cancer detected by FDG-PET/CT]. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi.* 2012 Nov;103(6):704-7

92. Nachshon-Kedmi M1, Yannai S, Haj A, Fares FA. Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane induce apoptosis in human prostate cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2003 Jun;41(6):745-52.
93. Nantermet PV, Xu J, Yu Y, *et al.* Identification of genetic pathways activated by the androgen receptor during the induction of proliferation in the ventral prostate gland. *J Biol Chem.* 2004 Jan 9;279(2):1310-22.
94. National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* Washington DC: National Academy DC; 1996.
95. Natsch A, Haupt T. Utility of rat liver S9 fractions to study skin-sensitizing prohaptens in a modified KeratinoSens assay. *Toxicol Sci.* 2013 Oct;135(2):356-68.
96. Nickel JC, Roehrborn CG, O'Leary MP, *et al.* The relationship between prostate inflammation and lower urinary tract symptoms: examination of baseline data from the REDUCE trial. *Eur Urol.* 2008 Dec;54(6):1379-84.
97. Park HJ, Won JE, Sorsaburu S, *et al.* Urinary Tract Symptoms (LUTS) Secondary to Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) and LUTS/BPH with Erectile Dysfunction in Asian Men: A Systematic Review Focusing on Tadalafil. *World J Mens Health.* 2013 Dec;31(3):193-207
98. Patel ND, Parsons JK. Epidemiology and etiology of benign prostatic hyperplasia and bladder outlet obstruction. *Indian J Urol.* 2014 Apr;30(2):170-6.

99. Peng CC, Liu JH, Chang CH, *et al.* Evid Based Complement. Action Mechanism of Ginkgo biloba Leaf Extract Intervened by Exercise Therapy in Treatment of Benign Prostate Hyperplasia. *Alternat Med.* 2013;2013:408734.
100. Penna G, Fibbi B, Amuchastegui S, *et al.* Human benign prostatic hyperplasia stromal cells as inducers and targets of chronic immuno-mediated inflammation. *J Immunol* 2009 Apr 1;182(7):4056-64.
101. Pillai P, Pandya C, Gupta S, *et al.* Biochemical and molecular effects of gestational and lactational coexposure to lead and cadmium on ovarian steroidogenesis are associated with oxidative stress in F1 generation rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2010 Nov-Dec;24(6):384-94.
102. Ponomareva L, Liu H, Duan X, *et al.* AIM2, an IFN-inducible cytosolic DNA sensor, in the development of benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Mol Cancer Res.* 2013 Oct;11(10):1193-202
103. Prahalada S, Rhodes L, Grossman SJ, *et al.* Morphological and hormonal changes in the ventral and dorsolateral prostatic lobes of rats treated with finasteride, a 5-alpha reductase inhibitor. *Prostate.* 1998 May 15;35(3):157-64.
104. Prakash K, Pirozzi G, Elashoff M, *et al.* Symptomatic and asymptomatic benign prostatic hyperplasia: molecular differentiation by using microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 May 28;99(11):7598-603.
105. Rick FG, Schally AV, Block NL, *et al.* LHRH antagonist Cetrorelix reduces prostate size and gene expression of proinflammatory cytokines and growth

factors in a rat model of benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 2011 May 15;71(7):736-47.

106. Rieber N, Graf A, Hartl D, *et al.* Acellular pertussis booster in adolescents induces Th1 and memory CD8+ T cell immune response. *PLoS One*. 2011 Mar 8;6(3):e17271.

107. Rudolfsson SH, Bergh A. Testosterone-stimulated growth of the rat prostate may be driven by tissue hypoxia and hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Endocrinol*. 2008 Jan;196(1):11-9. .

108. Schleich S, Papaioannou M, Baniahmad A, Matusch R. Extracts from *Pygeum africanum* and other ethnobotanical species with antiandrogenic activity. *Planta Med*. 2006 Jul;72(9):807-13.

109. Shen Q, Zhu Z, Zhu L, Yuan M. Benign prostate hyperplasia induced by urogenital sinus implantation in rats: a histomorphological study. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2012 aug;18(8):703-9.

110. Shin IS, Lee MY, Ha HK, Seo CS, Shin HK. Inhibitory effect of Yukmijihwang-tang, a traditional herbal formula against testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats. *BMC Complement Altern Med*. 2012 Apr 20;12:48

111. Siejka A, Schally AV, Block NL, Barabutis N. Mechanisms of inhibition of human benign prostatic hyperplasia in vitro by the luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix. *BJU Int*. 2010 Nov;106(9):1382-8.

112. Siler U, Herzog A, Spitzer V, *et al.* Lycopene effects on rat normal prostate and prostate tumor tissue. *J Nutr*. 2005 Aug;135(8):2050S-2S.

113. Singh N, Hussain S, Bharadwaj M, *et al.* Overexpression of signal transducer and activator of transcription (STAT-3 and STAT-5) transcription factors and alteration of suppressor of cytokine signaling (SOCS-1) protein in prostate cancer. *J Recept Signal Transduct Res.* 2012 Dec;32(6):321-7
114. Smigielska-Kuzia J, Boćkowski L, Sobaniec W. Antiinflammatory plasma cytokines in children and adolescents with Down syndrome. *Folia Histochem Cytobiol.* 2010 48(4):667-70
115. Sotosek S, Sotosek Tokmadzic V, Mrakovcic-Sutic I, *et al.* Comparative study of frequency of different lymphocytes subpopulation in peripheral blood of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Wien Klin Wochenschr.* 2011 Dec;123(23-24):718-25.
116. Stav K, Leibovici D, Goren E, Livshitz A, *et al.* Adverse effects of cystoscopy and its impact on patients' quality of life and sexual performance. *Isr Med Assoc J.* 2004 Aug;6(8):474-8.
117. Steers WD. 5alpha-reductase activity in the prostate. *Urology.* 2001 Dec;58(6 Suppl 1):17-24
118. Stege R, Carlstrom K. Testicular and adrenocortical function in healthy men and in men with benign prostatic hyperplasia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992 May;42(3-4):357-62.
119. Steinbrecher A, Rohrmann S, Timofeeva M, *et al.* Dietary glucosinolate intake, polymorphisms in selected biotransformation enzymes, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Jan;19(1):135-

120. Steiner G, Gessl A, Kramer G, *et al.* Phenotype and function of peripheral and prostatic lymphocytes in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1994; 151:480–484.
121. Steiner G, Stix U, Handisurya A, *et al.* Cytokine expression pattern in benign prostatic hyperplasia infiltrating T cells and impact of lymphocytic infiltration on cytokine mRNA profile in prostatic tissue. *Lab Invest.* 2003 Aug;83(8):1131-46.
122. Steiner GE, Djavan B, Kramer G, *et al.* The Picture of the Prostatic Lymphokine Network Is Becoming Increasingly Complex. *Rev Urol.* 2002 Fall;4(4):171-7.
123. Sun HB, Xia SJ, Tang XD. Expression of different genes in transitional zone and peripheral zone of human normal prostate. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2005 Mar 9;85(9):610-3.
124. Sunar F, Baltaci AK, Ergene N, Mogulkoc R. Zinc deficiency and supplementation in ovariectomized rats: their effect on serum estrogen and progesterone levels and their relation to calcium and phosphorus. *Pak J Pharm Sci.* 2009 Apr;22(2):150-4
125. Szymanowski K, Niepsuj-Biniaś J, Dera-Szymanowska A, *et al.* An influence of immunomodulation on Th1 and th2 immune response in endometriosis in an animal model. *Biomed Res Int.* 2013;2013
126. Tahmatzopoulos A, Kyprianou N. Apoptotic impact of alpha1-blockers on prostate cancer growth: a myth or an inviting reality? *Prostate.* 2004 Apr 1;59(1):91-100.

127. Tanaka ST, Ishii K, Demarco RT, *et al.* Endodermal origin of bladder trigone inferred from mesenchymal-epithelial interaction. *J Urol.* 2010 Jan;183(1):386-91.
128. Tatemichi S, Kobayashi K, Yokoi R, *et al.* Comparison of the effects of four α 1-adrenoceptor antagonists on ejaculatory function in rats. *Urology.* 2012 Aug;80(2):486.e9-16.
129. Tazaki E, Shimizu N, Tanaka R, *et al.* Serum cytokine profiles in patients with prostate carcinoma. *Exp Ther Med.* 2011 Sep;2(5):887-891.
130. Titus MA, Li Y, Kozyreva OG, *et al.* 5 α -reductase type 3 enzyme in benign and malignant prostate. *Prostate.* 2014 Feb;74(3):235-49
131. Tsunemori H, Sugimoto M, Xia Z, Effect of the phytotherapeutic agent Eviprostat on inflammatory changes and cytokine production in a rat model of nonbacterial prostatitis. *Urology.* 2011 77(6):1507.e15-20
132. Untergasser G, Madersbacher S, Berger P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol.* 2005 Mar;40(3):121-8
133. Van Coppennolle F, Slomianny C, Carpentier F, *et al.* Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgen-dependence. *Am. J. Physiology, Endocrinology, and Metabolism.* 2001 280 120–129.
134. Vital P, Castro P, Tsang S, Ittmann M. The Senescence-Associated Secretory Phenotype Promotes Benign Prostatic Hyperplasia. *Am J Pathol.* 2014 Jan 13

135. Wang CM, Hu SG, *et al.* Different effects of androgen on the expression of Fut1, Fut2, Fut4 and Fut9 in male mouse reproductive tract. *Int J Mol Sci.* 2013 Nov 21;14(11):23188-202.
136. Wilt TJ, Ishani A, Rutks I, MacDonald R. Phytoterapy for benign prostatic hyperplasia. *Public Health Nutr* 2000 Dec;3(4A):459-72.
137. Wu D, Gore AC. Sexual experience changes sex hormones but not hypothalamic steroid hormone receptor expression in young and middle-aged male rats. *Horm Behav.* 2009 Sep;56(3):299-308.
138. Wu GX, Lin YX, Ou MR, Tan DF. An experimental study (I) on inhibition of prostatic hyperplasia by extract of seeds of *Brassica alba*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2002 May;28(5):413-7.
139. Wu GX, Lin YX, Ou MR, Tan DF. An experimental study (II) on inhibition of prostatic hyperplasia by extract of seeds of *Brassica alba*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2003 May;28(5):413-7.
140. Wu K, Erdman JW Jr, Schwartz SJ, *et al.* Plasma and dietary carotenoids, and the risk of prostate cancer: a nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:260-9.
141. Wu ZL, Yuan Y, Geng H, Xia SJ. Influence of immune inflammation on androgen receptor expression in benign prostatic hyperplasia tissue. *Asian J Androl.* 2012 Mar;14(2):316-9
142. Xiang-Yun L, Ying-Wen X, Chen-Jing X, *et al.* Possible mechanism of benign prostatic hyperplasia induced by androgen-estrogen ratios in castrated rats *Indian J Pharmacol.* 2010 Oct;42(5):312-7.

143. Yoshimura K, Kadoyama K, Sakaeda T, *et al.* A survey of the FAERS database concerning the adverse event profiles of α 1-adrenoreceptor blockers for lower urinary tract symptoms. *Int J Med Sci.* 2013 May;15(7):864-9.
144. Yuan J, Liu Y, Yang Z, *et al.* The efficacy and safety of alpha-1 blockers for benign prostatic hyperplasia: an overview of 15 systematic reviews. *Curr Med Res Opin.* 2013 Mar;29(3):279-87.
145. Zaman Huri H, Hui Xin C, Sulaiman CZ. Drug-related problems in patients with benign prostatic hyperplasia: a cross sectional retrospective study. *PLoS One.* 2014 Jan 27;9(1):e86215.
146. Zenico T, Cicero AF, Valmorri L, Mercuriali M, Bercovich E. Subjective effects of *Lepidium meyenii* (Maca) extract on well-being and sexual performances in patients with mild erectile dysfunction: a randomised, double-blind clinical trial. *Andrologia.* 2009 Apr;41(2):95-9
147. Zhai L, Polascik TJ, Foo WC, *et al.* Acoustic radiation force impulse imaging of human prostates: initial in vivo demonstration. *Ultrasound Med Biol.* 2012 Jan;38(1):50-61.
148. Zhang XD, Jin BF. [The role of seminal vesicles in male reproduction and sexual function]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2007 Dec;13(12):1113-6.

XX- ANEXOS

20.1 TABLAS DE PESOS DE ORGANOS, NIVELES DE CITOQUINAS Y HORMONAS

Tabla 1. Pesos de próstata y vesículas seminales entre los diversos grupos de experimentación.

Grupo Organo	Control	ET	ET-F	ET-MR40	ET-MR80
Próstata (mg)	334.0±25	801.7±32 ^a	551.7±31 ^{a, b}	616.7±47 ^{a, b}	525.0±11 ^{a, b}
Vesículas seminales (g)	1.20±0.12	2.25±.022 ^a	1.09±0.13 ^b	2.33±0.23 ^a	2.18±0.16 ^a

Los datos son media±error estándar

^aP<0.05 respecto al grupo Control

^bP<0.05 respecto al grupo ET

Tabla 2. Valores de los niveles de TNF- α , INF- γ e IL-4 intraprostáticos e intravesiculares.

Grupo	TNF- α (pg/g)		INF- γ (pg/g)		IL 4 (pg/g)	
	Próstata	Vesículas seminales	Próstata	Vesículas seminales	Próstata	Vesículas seminales
Control	69.82±8.83	31.67±2.53	153.28±5.17	116.08±8.82	59.50±4.13	13.15±1.61
ET	113.47±3.89 ^a	66.09±3.15 ^a	138.77±7.16	118.50±9.33 ^a	3.73±0.15 ^a	4.09±1.70 ^a
ET+F	38.56±15.02 ^{a, b}	19.10±7.16 ^{a, b}	152.10±5.58	131.52±8.64 ^{a, b}	39.86±7.79 ^{a, b}	19.57±3.26 ^{a, b}
ET+MR40	42.55±4.56 ^{a, b}	64.91±4.36	165.00±4.49	132.75±3.66 ^{a, b}	15.62±1.64 ^{a, b}	16.99±2.08 ^{a, b}
ET+MR80	19.25±5.65 ^{a, b}	60.95±6.26	174.44±10.6	141.97±7.75 ^{a, b}	17.35±2.53 ^{a, b}	16.55±6.42 ^{a, b}

Los datos son media±error estándar

^aP<0.05 respecto al grupo Control, ^bP<0.05 respecto al grupo ET

Tabla 3. Niveles de Testosterona y Estradiol intraprostáticos de todos los grupos de experimentación.

Grupo	T (ng/próstata)	E2 (pg/próstata)
Control	0.10±0.02	2.79±0.21
ET	0.51±0.02 ^a	1.52±0.15 ^a
ET+F	0.81±0.05 ^{a, b}	2.18±0.36 ^{a, b}
ET+MR40	0.53±0.08 ^a	1.59±0.22 ^a
ET+MR80	0.54±0.02 ^a	1.59±0.16 ^a

Los datos son media±error estándar

^aP<0.05 respecto al grupo Control

^bP<0.05 respecto al grupo ET

20.2 AREA ESTROMAL PROSTATICA

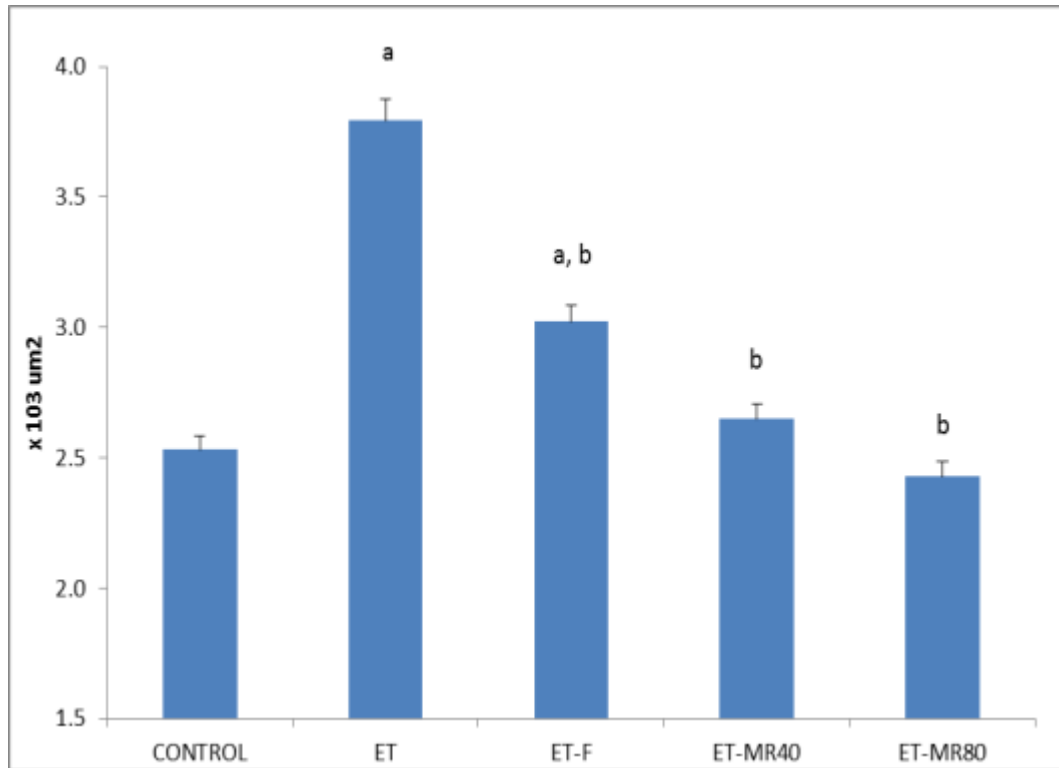


Figura 73. Valores del área estromal prostática en todos los grupos de experimentación. Control, ET, ET+F, ET+MR40 y ET+MR80, luego de 84 días de tratamiento. Los valores están expresados en medias y sus errores estándar. ^aP<0.05 respecto al Control y ^bP<0.05 respecto a ET.

Tabla 4. Valores del área estromal prostática de acuerdo al grupo de experimentación, luego de 84 días de tratamiento.

Grupo	Area estromal de la próstata (x 10 ³ μm ²)
Control	2.53±0.05
ET	3.79±0.08 ^a
ET+F	3.02±0.06 ^{a, b}
ET+MR40	2.65±0.06 ^b
ET+MR80	2.43±0.06 ^b

Los datos son media±error estándar, ^aP<0.05 respecto al grupo Control,

^bP<0.05 respecto al grupo ET

20.3 PESOS CORPORALES Y VALORES DEL HEMATOCRITO

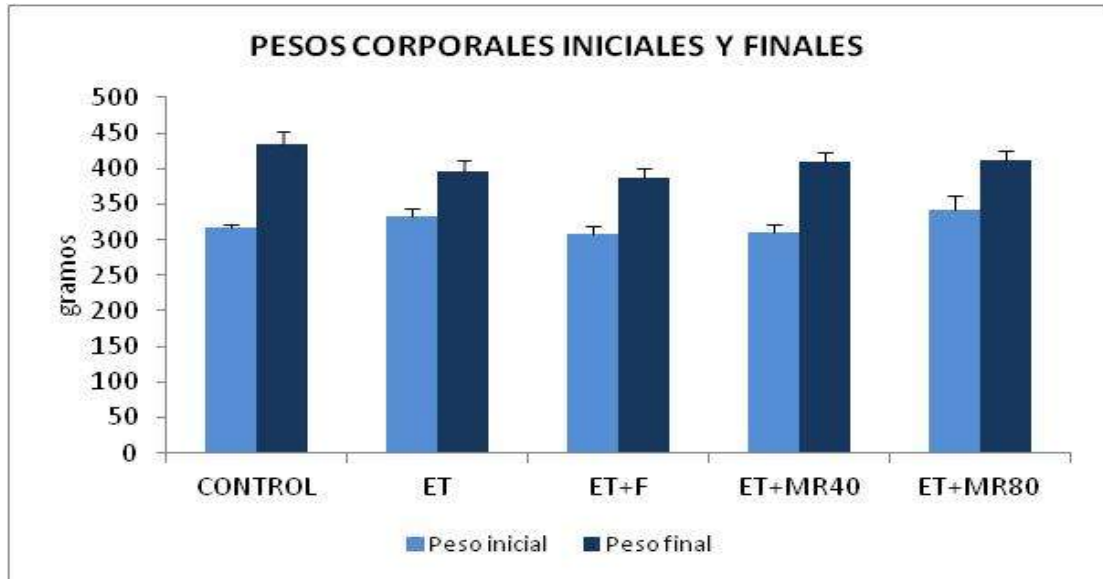


Figura 74. Pesos corporales iniciales y finales de todos los grupos de experimentación: Control, ET, ET+F, ET+MR40 y ET+MR80. Los valores están expresados en medias y su errores estándar. P:NS respecto al Control y respecto a ET.

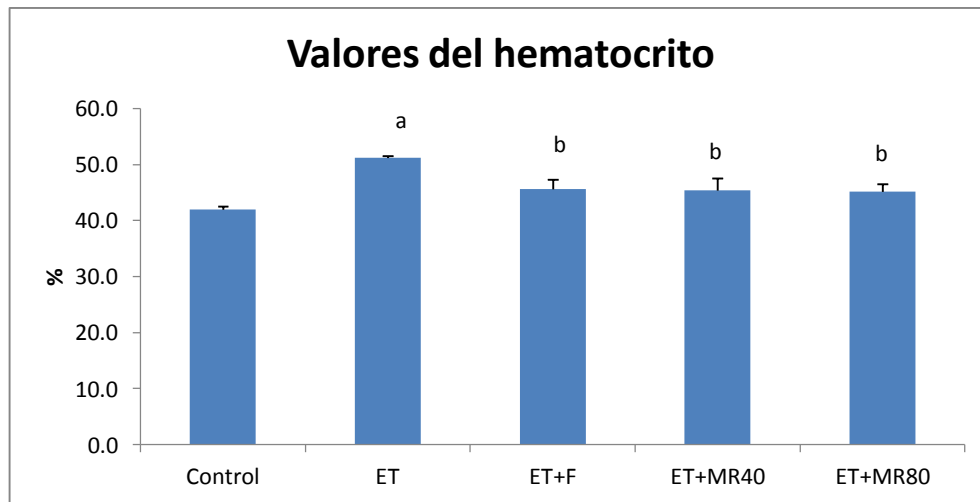


Figura 75. Valores del hematocrito en todos los grupos de experimentación: Control, ET, ET+F, ET+MR40 y ET+MR80, luego de 84 días de tratamiento. Los valores están expresados en medias y su errores estándar. ^aP<0.05 respecto al grupo Control. ^bP<0.05 respecto al grupo ET.

20.4 ANALISIS MULTIVARIADOS

20.4.1 EN PROSTATA

Se observó una asociación entre el conteo de neutrófilos, linfocitos y mastocitos con el grupo ET, controlado por los niveles de testosterona (Tablas 5 al 7).

Tabla 5. Análisis multivariado: Efecto del tratamiento sobre el conteo de neutrófilos, controlado por los niveles de testosterona.

Neutrófilos	Coefficiente Beta	p	IC 95%	
Grupo ET	192.5	0.000*	154.0	231.0
Grupo ET+F	37.55	0.056	-0.9	76.0
Grupo ET+MR40	-8.80	0.642	-47.3	29.7
Grupo ET+MR80	-16.58	0.384	-55.1	21.9
Constante	59.7	0.000	32.4	86.9

*p<0.05

Tabla 6. Análisis multivariado: Efecto del tratamiento sobre el conteo de linfocitos, controlado por los niveles de testosterona.

Linfocitos	Coefficiente Beta	p	IC 95%	
Grupo ET	120.3	0.000*	61.2	179.5
Grupo ET+F	-26.9	0.467	-102.3	48.3
Grupo ET+MR40	-33.3	0.217	-87.1	20.8
Grupo ET+MR80	-33.0	0.215	-86.5	20.5
Constante	25.9	0.057	-0.8	52.5

*p<0.05

Tabla 7. Análisis multivariado: Efecto del tratamiento sobre el conteo de mastocitos, controlado por los niveles de testosterona.

Mastocitos	Coefficiente Beta	p	IC 95%	
Grupo ET	96.9	0.002*	38.2	155.6
Grupo ET+F	3.4	0.926	-71.4	78.1
Grupo ET+MR40	-8.6	0.745	-62.1	45.0
Grupo ET+MR80	-7.1	0.785	-0.06	46.0
Constante	20.7	0.117	-5.7	47.4

*p<0.05

20.4.2 EN VESICULAS SEMINALES

Se observó una asociación entre el conteo de neutrófilos, linfocitos y mastocitos con los grupos ET, ET+MR40 y ET+MR80 controlado por los niveles de testosterona (Tablas 8 al 10).

Tabla 8. Análisis multivariado: Efecto del tratamiento sobre el conteo de neutrófilos, controlado por los niveles de testosterona.

Neutrófilos	Coefficiente Beta	p	IC 95%	
Grupo ET	162.7	0.000*	-79.7	245.8
Grupo ET+F	3.8	0.941	-109.6	101.9
Grupo ET+MR40	167.4	0.000*	91.6	243.2
Grupo ET+MR80	169.0	0.000*	93.8	244.3
Constante	42.7	0.027	5.2	80.2

*p<0.05

Tabla 9. Análisis multivariado: Efecto del tratamiento sobre el conteo de linfocitos, controlado por los niveles de testosterona.

Linfocitos	Coefficiente Beta	p	IC 95%	
Grupo ET	59.1	0.006*	19.1	99.1
Grupo ET+F	-5.9	0.813	-56.85	45.0
Grupo ET+MR40	59.7	0.003*	23.2	96.3
Grupo ET+MR80	58.4	0.003*	22.2	94.7
Constante	11.2	0.215	-6.9	29.2

*p<0.05

Tabla 10. Análisis multivariado: Efecto del tratamiento sobre el conteo de mastocitos, controlado por los niveles de testosterona.

Mastocitos	Coefficiente Beta	p	IC 95%	
Grupo ET	60.08	0.006*	29.8	99.4
Grupo ET+F	12.3	0.412	-18.0	42.6
Grupo ET+MR40	51.6	0.002*	21.2	81.8
Grupo ET+MR80	62.5	0.000*	32.2	92.8
Constante	28.7	0.011	7.2	50.1

*p<0.05