

Tesis Doctoral

# Estudio de las moléculas de adhesión celular y quemoquinas involucradas en el tráfico leucocitario en un cuadro de orquitis autoinmune experimental

Guazzone, Vanesa Anabella

2006

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Guazzone, Vanesa Anabella. (2006). Estudio de las moléculas de adhesión celular y quemoquinas involucradas en el tráfico leucocitario en un cuadro de orquitis autoinmune experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Guazzone, Vanesa Anabella. "Estudio de las moléculas de adhesión celular y quemoquinas involucradas en el tráfico leucocitario en un cuadro de orquitis autoinmune experimental". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2006.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudio de las moléculas de  
adhesión celular y quemoquinas  
involucradas en el tráfico leucocitario  
en un cuadro de orquitis autoinmune  
experimental**

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área de Ciencia Biológicas.

**Autor:** Vanesa Anabella Guazzone.

**Director de tesis:** Dra. Livia Lustig.

**Lugar de trabajo:** Centro de Investigaciones  
en Reproducción.  
Facultad de Medicina. UBA.

Buenos Aires, 2006

**Estudio de las moléculas de adhesión celular y  
quemoquinas involucradas en el tráfico leucocitario  
en un cuadro de orquitis autoinmune experimental**

**Resumen**

**Estudio de las moléculas de adhesión celular y quemoquinas involucradas en el tráfico leucocitario en un cuadro de orquitis autoinmune experimental**

Los cuadros de inflamación e infección del aparato reproductor masculino constituyen una de las principales causas de infertilidad. La orquitis autoinmune experimental (OAE) fue inducida por inmunización activa, en la rata, con antígenos espermáticos y adyuvantes y constituye un modelo útil para estudiar inflamación testicular y autoinmunidad específica de órgano. La OAE se caracteriza por la presencia de un infiltrado linfomonocitario intersticial y lesión de los túbulos seminíferos con células germinales que sufren apoptosis y descamación. Nos propusimos estudiar, en la OAE, las principales quemoquinas y moléculas de adhesión involucradas en la migración y extravasación de linfomonocitos. Mediante técnicas de ELISA se detectó, en las ratas con orquitis, respecto de controles, un aumento en la concentración testicular de MIP-1 $\alpha$  durante el período de inmunización mientras que MCP-1 aumentó durante el desarrollo completo del cuadro incluyendo el período de lesión severa. Se observó un aumento en el número de linfomonocitos testiculares que expresan los receptores específicos de dichas quemoquinas, CCR2 y CCR5. Por citometría de flujo, se detectó una disminución en el número linfomonocitos CD44<sup>+</sup> en sangre periférica, simultánea a un aumento de dichas células en el intersticio testicular. A nivel del endotelio testicular, aumentó el número de células PECAM-1<sup>+</sup> que expresan VCAM-1.

Los resultados sugieren que las quemoquinas y moléculas de adhesión estudiadas constituyen un componente del circuito de amplificación de la respuesta inmune, esencial para el reclutamiento linfomonocitario y la inducción de una orquitis autoinmune severa, en el contexto de una inflamación crónica.

**Palabras Claves:** quemoquinas, moléculas de adhesión, orquitis autoinmune, testículo, interacción leucocito-endotelio

**Summary**

**Expression of cell adhesion molecules and chemokines involved in leucocyte traffic in rats undergoing autoimmune orchitis**

Inflammation and infection of the genital tract is one of the leading causes of male infertility. We have developed an experimental model of autoimmune orchitis (EAO) in rats by active immunization with spermatid antigens and adjuvants, a useful model to study organ specific autoimmunity and to analyze testis inflammation. This disease is characterized by interstitial lymphomononuclear cell infiltrates and severe damage of seminiferous tubules with apoptosis and sloughing of germ cells. The aim of this work was to detect the main chemokines and cell adhesion molecules involved in leukocyte extravasation in this model. By ELISA we detected in rats with EAO an increase in the testicular content of MIP-1 $\alpha$  during the immunization period and of MCP-1 during the development of the disease including the period of severe testicular damage. We also observed an increase in the number of testicular cells CCR2 $^+$  or CCR5 $^+$ , specific chemokine receptors. By flow cytometry we detected a decrease in the number of CD44 $^+$  lymphomonocytes from peripheral blood concomitant with an increase of these cells in the testicular interstitium. Rats with EAO showed a significant increase in the number of PECAM-1 $^+$  testicular endothelial cells that express VCAM-1.

Results suggest that the chemokines and cell adhesion molecules analyzed constitute part of an amplification circuit of the immune cell response essential, for leukocyte recruitment and induction of severe autoimmune orchitis, in the context of a chronic testicular inflammation.

**Keywords:** chemokines, adhesion molecules, autoimmune orchitis, testis, leukocyte-endothelial interactions

**Dedicatoria**



*A Mariel y a Malena.*

*Ya todos aquellos que en forma directa o indirecta me extendieron su mano  
para que pudiera dar este paso tan anhelado.*

**Indice**

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
INMUNOBIOLOGÍA DEL TESTÍCULO .....	15
<i>Posibles mecanismos de inmunoregulación testicular.....</i>	15
<i>Células del sistema inmune en el testículo .....</i>	17
<i>El rol dual de las citoquinas en el testículo .....</i>	19
INFLAMACIÓN TESTICULAR.....	21
<i>Inflamación testicular en el hombre .....</i>	21
<i>Orquitis experimental.....</i>	23
<i>El modelo de OAE en la rata.....</i>	24
MECANISMOS MOLECULARES QUE CONTROLAN LA EXTRAVASACIÓN DE LEUCOCITOS .....	26
<i>La familia de las quemoquinas.....</i>	28
<i>Selectinas .....</i>	30
<i>CD44 .....</i>	31
<i>Superfamilia de las inmunoglobulinas .....</i>	32
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
OBJETIVO GENERAL .....	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
HISTOPATOLOGÍA .....	52
QUEMOQUINAS.....	55
<i>Determinación de MCP-1.....</i>	55
<i>¿Qué células del testículo expresan MCP-1?.....</i>	57
<i>Expresión de CCR2, receptor de la quemoquina MCP-1 .....</i>	61
<i>Quimiotaxis de linfomonocitos en respuesta a MCP-1.....</i>	63
<i>Determinación de MIP-1? .....</i>	64
<i>¿Qué células expresan los receptores de la quemoquina MIP 1? ?.....</i>	67
MOLÉCULAS DE ADHESIÓN .....	74
<i>Expresión de L-selectina en linfomonocitos de sangre periférica y ganglios linfáticos .....</i>	74
<i>Expresión de CD44 en linfomonocitos de sangre periférica y de ganglios linfáticos .....</i>	76
<i>Los linfomonocitos de sangre periférica y de ganglio linfático se adhieren al ácido hialurónico.....</i>	78
<i>Los linfomonocitos de sangre periférica y de ganglio linfático se adhieren al ácido hialurónico.....</i>	79
<i>Se modifica el número de células CD44+ en el testículo durante el desarrollo de la OAE?.....</i>	81
<i>Expresión de PECAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales testiculares.....</i>	84
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>87</b>

QUEMOQUINAS.....	88
MOLÉCULAS DE ADHESIÓN LEUCOCITARIA.....	95
MOLÉCULAS DE ADHESIÓN ENDOTELIAL.....	99
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>102</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>107</b>

**Abreviaturas**

<b>AFC</b>	Adyuvante de Freund completo
<b>AH</b>	Acido hialurónico
<b>BSA</b>	Albúmina bovina sérica
<b>C</b>	Control (grupo de ratas controles)
<b>CCR1</b>	Receptor de MCP-1
<b>CCR2</b>	Receptor de MIP-1?
<b>CCR5</b>	Receptor de MIP-1?
<b>CD62L</b>	L-selectina
<b>CMH</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>E</b>	Experimental (grupo de ratas experimentales)
<b>EDTA</b>	Acido etilendiamino tetra-acético
<b>Fig.</b>	Figura
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FT</b>	Fluido testicular
<b>h</b>	Hora
<b>HT</b>	Homogenado testicular
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido bacteriano
<b>MCM</b>	Medio condicionado de macrófagos
<b>MCP-1 (CCL2)</b>	Proteína quimioattractante de monocitos-1
<b>Min.</b>	Minutos
<b>MIP-1? (CCL3)</b>	Proteína inflamatoria de macrófagos-1 ?
<b>MIP-1? (CCL4)</b>	Proteína inflamatoria de macrófagos-1 ?
<b>N</b>	Normal (grupo de ratas normales)
<b>OAE</b>	Orquitis autoinmune experimental
<b>PBS</b>	Solución salina buffereada
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PECAM-1 (CD 31)</b>	Molécula de adhesión plaquetaria y endotelial-1
<b>PE-Cy5</b>	Ficoeritrina R acoplado a cianina
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minutos
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>VCAM-1 (CD 106)</b>	Molécula de adhesión vascular-1
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante
<b>T<sub>reg</sub></b>	Linfocitos T regulatorios

**Introducción**

El testículo, a pesar de ser un órgano inmunoprivilegiado, sufre procesos inflamatorios que desencadenan esterilidad. El concepto de “inmunoprivilegio” está asociado a un sitio anatómico en el cual un aloinjerto sobrevive un período de tiempo mayor que en la mayoría de los otros órganos. Se postula que los sitios inmunoprivilegiados se han desarrollado, a lo largo de la evolución, como un mecanismo protector de órganos altamente especializados en los cuales una respuesta inmune podría alterar la función normal de los mismos (por ejemplo, la espermatogénesis en el testículo). En efecto, se demostró que aloinjertos de distintos tejidos sobrevivían en el testículo, sin signos de rechazo, por períodos extensos de tiempo (Maddocks y col., 1990). Este “inmunoprivilegio” es evidente en la pubertad, período en el cual se inicia la espermatogénesis con la expresión de nuevos antígenos que, sin embargo, no generan normalmente una respuesta de autoinmunidad testicular.

### **Inmunobiología del testículo**

#### **Posibles mecanismos de inmunoregulación testicular**

La prevención de respuestas autoinmunes específicas contra las células germinales en el testículo adulto ha sido explicada, durante muchos años, sobre la base de que los autoantígenos expresados por las células germinales están “secuestrados” dentro de los túbulos seminíferos. La barrera hemato-testicular separa el compartimento basal del epitelio seminífero que contiene espermatogonias y espermatocitos preleptoténicos del compartimento adluminal, donde la espermatogénesis comienza a partir de la pubertad. Morfológicamente, la barrera hemato-testicular está formada por las uniones estrechas (“tight junctions”) de las células de Sertoli adyacentes haciendo que



los espacios intercelulares se vuelvan impermeables aún a moléculas pequeñas. De este modo, el compartimento adluminal se halla aislado del sistema vascular y de las células del sistema inmune (Pelletier y col., 1992). Aunque esta barrera tisular es importante, no es suficiente para proteger a las células germinales del ataque inmunológico. Existen suficientes evidencias que indican que múltiples mecanismos inmunoregulatorios estarían involucrados en mantener el inmunoprivilegio en el testículo adulto normal. Mientras que la delección clonal de linfocitos T autoreactivos a través de la selección tímica durante la vida perinatal no controla la autoreactividad contra las células germinales, mecanismos de tolerancia periférica tales como anergia clonal de células T jugarían un papel clave. Los linfocitos T vírgenes permanecen refractarios a la activación antigénica cuando encuentran células presentadoras de antígenos en asociación a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) pero sin señales co-estimuladoras. En concordancia con este concepto, se ha demostrado que las células del intersticio testicular expresan constitutivamente moléculas del CMH pero no expresan las moléculas co-estimuladoras B7 (CD80/CD86) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1, CD54) (Sainio-Pollanen y col., 1996).

Los linfocitos T regulatorios ( $T_{reg}$ ) también estarían involucrados en el fenómeno de inmunosupresión. Se ha postulado que la interleuquina (IL)-10 y el factor de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ ) producidos por los linfocitos  $T_{reg}$  controlarían la inflamación *in vivo* (O'Garra y col., 2004). Además, experimentos recientes realizados con sangre periférica de donadores sanos mostraron que la expansión de linfocitos T autoreactivos contra antígenos

testiculares puede ser suprimida por células  $T_{reg}$  CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (Danke y col., 2004). Sin embargo, hasta el momento no se han hecho estudios in vivo que clarifiquen la presencia y posible papel funcional de estas células en el testículo.

Otro nivel de protección inmunológica ocurre a través de la apoptosis de los linfocitos T que ingresan al testículo. Resultados recientes obtenidos en un modelo de trasplante alogeneico murino indican que los linfocitos T de memoria CD8<sup>+</sup> son capaces de migrar al testículo e iniciar una respuesta inmune contra injertos de tejido foráneo pero presentan una tasa de apoptosis elevada por sobreexpresión de Fas (CD95) y CD30 sobre su superficie (Dai y col., 2005). A su vez, la expresión del ligando de Fas (FasL) en las células de Sertoli ha sido postulada como un mecanismo que mantiene el privilegio inmune testicular. Sin embargo, esta hipótesis es muy controvertida, ya que varios trabajos demuestran que las células de Sertoli no expresan FasL (Allison y col., 1997).

Finalmente, ha sido descrito que ciertas citoquinas de perfil inmunosupresor producidas en el tracto genital masculino jugarían un papel clave en la prevención de la activación de la respuesta inmune y subsecuente inflamación testicular.

### **Células del sistema inmune en el testículo**

El testículo a pesar de ser un órgano inmunológicamente privilegiado no se está aislado del sistema inmune. Bajo condiciones fisiológicas, macrófagos, mastocitos, linfocitos, células NK (“natural killer”) y células dendríticas se

encuentran en el intersticio testicular de mamíferos, incluyendo el hombre (Hedger, 1997).

En el testículo de rata fueron identificados macrófagos provenientes de la circulación y macrófagos residentes siendo estos últimos el tipo celular más abundante del intersticio luego de las células de Leydig. El número de macrófagos se incrementa durante la pubertad y su número depende de la interacción con las células de Leydig (Hedger, 2002). Se ha demostrado que en el testículo adulto, los macrófagos están involucrados en la esteroidogénesis y en la activación de la respuesta inmune innata. Sin embargo, la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  es reducida en macrófagos aislados de testículo normal de ratas en comparación con macrófagos peritoneales (Kern y col., 1995). A su vez los macrófagos testiculares sintetizan TGF- $\beta$  y otros factores que inhiben la respuesta inmune, postulándose entonces que ejercerían una función inmunosupresora.

Los mastocitos, que en el testículo normal de rata se localizan en la zona subalbugínea cercanos a los vasos sanguíneos, estarían involucrados en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa siendo capaces de liberar una amplia variedad de mediadores inflamatorios tales como triptasas, histamina, leucotrienos, prostaglandinas y numerosas citoquinas (Hedger, 1997).

Los linfocitos representan un 15% de las células del sistema inmune en el testículo normal de una rata adulta. La mayoría de ellos expresan marcadores de células T predominando los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, mientras que no

se han detectado células B (Hedger, 1997). En relación al testículo humano, los estudios son escasos y solamente se han publicado resultados cualitativos que revelan algunos linfocitos (CD8+ ? CD4+) en el tejido testicular periférico subalbugíneo y en el tejido conectivo intertubular de la rete testis. Al igual que en las ratas no se observan células B (Pollanen y col., 1987).

Mediante los marcadores CD11c y OX-62 hemos demostrado la presencia de células dendríticas en el intersticio testicular de ratas normales de las cepas Sprague-Dawley y Wistar (Rival y col., 2006).

### **El rol dual de las citoquinas en el testículo**

La regulación de la espermatogénesis y la esteroidogénesis en el testículo está bajo control hormonal pero también depende de numerosos mediadores autocrinos y paracrinos incluyendo factores de crecimiento y citoquinas. Este aparente solapamiento de las funciones inmunes y testiculares de las citoquinas podría ser la clave para comprender el fenómeno de privilegio inmune y los procesos que conducen a lesiones testiculares por causas inflamatorias.

La citoquina pro-inflamatoria IL-1 es secretada por macrófagos activados pero también es inducible en otros tipos celulares. En el testículo de rata, la isoforma IL-1 $\beta$  es producida y secretada bajo condiciones fisiológicas por las células de Sertoli (Gérard y col., 1991), espermatocitos y espermátidas (Haugen y col., 1994). Receptores de alta afinidad para IL-1 así como mRNA para el receptor de transducción de señal de IL-1 han sido encontrados en la mayoría de las células del epitelio de los túbulos seminíferos y en el intersticio

testicular (Gomez y col., 1999). La IL-1 testicular coordinaría el desarrollo de las células de Sertoli y las células germinales así como también controlaría la esteroidogénesis. La IL-1 generalmente inhibe la producción de testosterona estimulada por la hormona luteinizante (LH) pero puede estimular la esteroidogénesis en cultivos primarios de células de Leydig (Svechnikov y col., 2001). Por el contrario, la IL-1 no es producida en cantidades significativas en el testículo normal (Hedger y col., 2003). Sin embargo, el antagonista del receptor de IL-1 es producido por las células de Sertoli murinas (Zeyse y col., 2000).

En el testículo normal murino, TNF- $\alpha$  se expresa en espermatocitos paquiténicos y espermátidas redondas (De y col., 1993). Además es producido *in vitro* por macrófagos testiculares activados (Xiong y col., 1993). Similar a la IL-1, el TNF- $\alpha$  modula la esteroidogénesis y su localización en células germinales postmeióticas indica su posible rol durante la espermatogénesis. De hecho, estudios realizados en el testículo humano sugieren que el TNF- $\alpha$  tendría un papel regulador de la espermatogénesis (Pentikainen y col., 2001).

El factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF) es una proteína pleiotrópica que participa durante la respuesta inmune y actúa como contraregulador de la supresión inmune inducida por glucocorticoides. En el testículo de la rata, MIF es expresado por las células de Leydig (Meinhardt y col., 1996), reduce la secreción de inhibina en células de Sertoli en cultivo e induce un incremento transitorio de calcio en células peritubulares. Estos resultados indican que MIF participa en la regulación paracrina de las interacciones célula de Leydig-túbulo seminífero (Wennemuth y col., 2000).

Los miembros de la familia TGF- $\beta$  son citoquinas diméricas con actividad predominantemente inmunosupresora y anti-inflamatoria. Hay tres isoformas de TGF- $\beta$  en mamíferos que son expresadas por las células de Sertoli, Leydig y peritubulares en testículos fetales e inmaduros pero su producción disminuye en la postpubertad (Mullaney y col., 1993). En el testículo adulto, aún no se ha establecido el preciso rol de TGF- $\beta$  aunque ha sido propuesta como una citoquina inmunosupresora involucrada en el inmunoprivilegio (Filippini y col., 2001).

### **Inflamación testicular**

#### **Inflamación testicular en el hombre**

Las infecciones e inflamaciones del aparato reproductor masculino pueden causar infertilidad. La inflamación del testículo (orquitis) clínicamente puede cursar como una patología sintomática, aguda o como una inflamación asintomática, subaguda o crónica. La orquitis sintomática está asociada con infecciones sistémicas o locales mientras que la asintomática es de origen no infeccioso, difícil de diagnosticar y por lo tanto muchas veces desatendida (Schuppe y col., 2005).

Dentro de la orquitis infecciosa, la mayoría de los casos reportados están asociados al virus de la parotiditis y al virus de inmunodeficiencia humana. Recientemente un nuevo trabajo indica que la orquitis es también una complicación asociada al virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) (Xu y col., 2006). Mientras que en los varones adolescentes la infección con el virus de la parotiditis se limita a causar inflamación de las glándulas salivales,

en los hombres adultos está asociado en un 5-37% de los casos con un cuadro de orquitis. Esta se caracteriza por un infiltrado intersticial de linfomonocitos y oligospermia con atrofia y fibrosis de los túbulos seminíferos. La esterilidad causada por la pérdida del epitelio germinal puede ser definitiva o transitoria (Dejucq y col., 2001). Los pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) frecuentemente sufren de orquitis, hipogonadismo, oligospermia o azoospermia. Alrededor del 50% de los pacientes con SIDA presentan un infiltrado intersticial de células mononucleares y descamación del epitelio germinal. Además presentan bajos niveles de testosterona debido, probablemente al número reducido de células de Leydig (Chabon y col., 1987).

Con respecto a las inflamaciones no infecciosas del testículo, la orquitis granulomatosa es la patología mejor estudiada. Se caracteriza por la formación de granulomas, acumulación de mastocitos, macrófagos y células gigantes multinucleadas además de la pérdida de células germinales. La orquitis granulomatosa puede ocurrir en un principio como una enfermedad crónica e indolora de etiología desconocida o como una rara manifestación de sarcoidosis (Lustig y col., 2006). Traumatismos testiculares así como torsión del cordón espermático pueden causar reacciones de inflamación crónica en el testículo contralateral que han sido clasificadas como orquitis autoinmune (Suominen y col., 1995).

Hasta el momento, unos pocos estudios analizaron fenómenos inflamatorios a nivel del testículo en hombres infértiles. 4.8-16.6% de las biopsias testiculares de pacientes infértiles presentaban infiltraciones inflamatorias con predominio de linfocitos (Jahnukainen y col., 1995;

Suominen y col., 1982). En una reciente re-evaluación de muestras de tejidos obtenidas de 260 pacientes asintomáticos con problemas de fertilidad, se registró que en el 56.3% de los casos había una infiltrado de linfocitos en el testículo. Además el grado de infiltración linfocítica correlacionaba con el grado de daño del epitelio germinal, engrosamiento de la lámina propia y fibrosis tubular. La población linfocítica está compuesta principalmente por linfocitos T CD4+ y CD8+ acompañada de macrófagos no residentes CD68+ y mastocitos. Estos 2 últimos tipos celulares modifican su localización desde el intersticio hacia los túbulos asociándose este hecho con la remodelación del tejido y la fibrosis (Meineke y col., 2000; Schuppe y col., 2005). En el hombre, la inflamación crónica que sigue a la orquitis aguda presenta características morfológicas típicas de la orquitis autoinmune experimental (OAE).

### **Orquitis experimental**

El estudio de la OAE facilita la comprensión los mecanismos involucrados en las patologías autoinmunes específicas de órgano así como la regulación sistémica que normalmente previene la enfermedad. Este cuadro puede ser inducido por a) inmunización activa con antígenos espermáticos incluyendo homogenado testicular, células germinales y espermatozoides de epidídimo, b) transferencia pasiva de linfocitos testiculares sensibilizados o c) timectomía realizada al tercer día de nacimiento. Inicialmente, la orquitis autoinmune se estudió en el cobayo y luego en el ratón. Más adelante, se estudiaron modelos experimentales en monos y conejos. En especies con ciclos estacionales, como el visón, se observó una orquitis autoinmune espontánea que cursa con



esterilidad en el período de regresión testicular. En nuestro laboratorio se desarrolló un cuadro de OAE en ratas por inmunización activa con antígenos espermáticos o con antígenos de membrana basal (Doncel y col., 1989; Lustig y col., 1987).

### **El modelo de OAE en la rata**

En el modelo de OAE inducido en ratas por inmunización activa con homogenado testicular y adyuvantes (Doncel y col., 1989) se observó que la orquitis se inicia a los 50 días con la presencia de escasos infiltrados linfomonocíticos en el intersticio testicular y focos de túbulos seminíferos con lesiones del epitelio germinal. A los 80-100 días de la primera inmunización aumenta la densidad del infiltrado intersticial y la lesión de los túbulos seminíferos se extiende a todo el órgano. Las células del epitelio germinal, fundamentalmente espermatoцитos y espermátidas, mueren por apoptosis y se descaman provocando la atrofia del mismo. Los receptores de muerte Fas y el receptor del factor de necrosis tumoral alfa de tipo 1 (TNFR1) expresados por las células germinales activan la vía apoptótica externa que conduce a la muerte de las mismas (Theas y col., 2003; Suescun y col., 2003; Theas y col., 2006). La célula de Sertoli sufre alteraciones estructurales y funcionales tardíamente, cuando la lesión del epitelio seminífero es severa.

A diferencia de lo observado en cobayos y ratones, en la rata no se observa la penetración de células linfomononucleares al interior del túbulo seminífero aún en los animales con un cuadro severo de orquitis. Ocasionalmente, existen granulomas con necrosis del epitelio germinal. No se

observan cambios patológicos en la rete testis ni en los conductos deferentes, en cambio sí una leve epididimitis.

La reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) contra el homogenado testicular utilizada como parámetro de inmunidad celular específica indicó una reacción positiva en el 74% de los animales a los 50 días, manteniéndose este porcentaje a los 80 días de la primera inmunización.

Anticuerpos circulantes específicos (anti-HT) detectados por ELISA, están presentes a los 30, 50 y 80 días, con títulos máximos a los 80 días, en aproximadamente la mitad de los animales del grupo experimental. La fracción más antigénica del homogenado testicular resultó ser el acrosoma ya que datos de inmunofluorescencia indican que los anticuerpos de ratas con OAE reaccionan intensamente con la cabeza del espermatozoide a nivel del acrosoma. No existe una correlación entre el grado de severidad de la lesión testicular y la inmunidad humoral, fenómeno que si ocurre con la inmunidad celular.

La caracterización fenotípica de las poblaciones celulares de linfocitos y macrófagos de los ganglios linfáticos drenantes de los sitios de inmunización y del testículo, estudiada por inmunohistoquímica, demostró que a partir del inicio de la lesión testicular el número de células linfomonocitarias disminuye en los ganglios linfáticos y aumenta en el intersticio del testículo (fundamentalmente linfocitos CD4+) (Lustig y col., 1993).

## **Mecanismos moleculares que controlan la extravasación de leucocitos**

La orquitis autoinmune se caracteriza por la presencia de un infiltrado de linfocitos y monocitos del intersticio testicular. El reclutamiento de leucocitos dentro de los tejidos está regulado por una serie de interacciones entre los leucocitos circulantes y las células endoteliales. El mecanismo de migración de los leucocitos comprende una secuencia de eventos denominada cascada de adhesión. La primera fase de esta cascada es la adhesión transitoria (“rolling”), en la cual se produce una unión reversible del leucocito al endotelio vascular. La misma es seguida por la fase de activación leucocitaria (“triggering”) cuya consecuencia da lugar a la tercera fase de este proceso denominado adhesión firme. Por último ocurre la fase de transmigración o diapedesis, en donde el leucocito atraviesa el endotelio. Este proceso migratorio es regulado por dos mecanismos, uno mediado por quemoquinas y otros factores quimiotácticos y el otro por moléculas de adhesión expresadas en la superficie del leucocito y del endotelio vascular. Las principales moléculas de adhesión involucradas en la adhesión endotelial corresponden a la familia de las selectinas, integrinas e inmunoglobulinas (Carlos y col., 1994). La adhesión transitoria es mediada por la E-, P- y L-selectinas que reconocen ligandos que presentan sobre su superficie tetrasacáridos fucosilados sialyl Lewis o ligandos específicos del tipo de las mucinas. En un cuadro de inflamación, la molécula de adhesión CD44 expresada por leucocitos activados es también responsable de esta etapa al unirse al ácido hialurónico (AH) presentado en la superficie del endotelio (DeGrendele y col., 1997a). Los leucocitos rodando sobre la superficie

endotelial son capaces de sensar, a través de los receptores de quemoquinas, señales que los estimulan a unirse firmemente al endotelio. Tales señales son impartidas por quemoquinas presentadas e inmovilizadas por proteoglicanos sobre el endotelio. La molécula de adhesión plaquetaria y endotelial PECAM-1 (CD31), perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas y el factor activador de plaquetas (PAF) soluble también participarían en esta etapa necesaria para que la adhesión sea firme. Dicha activación leucocitaria induce la expresión de integrinas que se unen a miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas expresados por el endotelio. Dependiendo del estímulo recibido (por ejemplo citoquinas tales como IL-1, TNF- $\alpha$  o IL-4) y del tipo de endotelio, diferentes ligandos de integrinas son expresados en las células endoteliales (Proost y col., 1996). Las principales integrinas involucradas en esta etapa son el antígeno asociado a la función leucocitaria LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) y el antígeno de "activación muy tardía" VLA-4 (CD49d/CD29) las cuales se unen a la molécula de adhesión intercelular ICAM-1 (CD54) y a la molécula de adhesión vascular VCAM-1 (CD106). Finalmente ocurre la etapa de trans migración en donde intervienen principalmente LFA-1 y VLA-4 interactuando con ICAM-1 y VCAM-1, respectivamente. Otras moléculas descritas para esta fase de la cascada de adhesión son ICAM-2 y PECAM-1 (Butcher, 1991; Ebnet y col., 1999).

### **La familia de las quemoquinas**

Las quemoquinas, junto con las moléculas de adhesión y citoquinas, son esenciales para la migración dirigida de leucocitos durante procesos normales e inflamatorios.

Las quemoquinas son proteínas de bajo peso molecular (6-14 KDa) caracterizadas por la presencia de cuatro residuos conservados de cisteína que forman dos puentes disulfuro. La posición de las dos primeras cisteínas del extremo NH<sub>2</sub>-terminal divide a la familia de las quemoquinas en cuatro subfamilias, C, CC, CXC y CX3C (en donde "C" representa un residuo de cisteína y "X" un aminoácido no conservado). Las subfamilias CC y CXC se caracterizan por la presencia de dos residuos de cisteína adyacentes (CC) o separados por un aminoácido (CXC). La subfamilia CX3C se caracteriza por poseer tres aminoácidos separando las cisteínas del extremo NH<sub>2</sub>-terminal y hasta el presente incluye un solo miembro denominado fractalquina. Esta quemoquina, a diferencia de las otras, está unida a la membrana celular a través de un largo dominio tipo mucina e interviene en procesos de quimiotaxis y adhesión de linfocitos T y monocitos. La subfamilia C que incluye también un único miembro, la linfotactina, posee un solo residuo de cisteína (Rottman, 1999). La función principal de las quemoquinas es la quimioatracción de leucocitos y la regulación del tráfico leucocitario. Aunque otras funciones de las mismas son: la proliferación y movilización de células progenitoras hematopoyéticas, regulación de la angiogénesis y la activación de leucocitos (Kim y col., 1999). La mayoría de las quemoquinas pertenecen a la subfamilia CXC, que atrae fundamentalmente granulocitos o a la subfamilia CC que atrae

principalmente monocitos, macrófagos y linfocitos. La proteína quimioattractante de monocitos-1 (MCP-1), la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  (también denominadas CCL2, CCL3 y CCL4 respectivamente, de acuerdo a la nueva nomenclatura) son miembros de esta última subfamilia (Zlotnik y col., 2000). Las quemoquinas ejercen su acción interactuando con receptores de membrana acoplados a proteínas G. Estos receptores se caracterizan por presentar siete dominios transmembrana y al igual que a sus ligandos se los ha clasificado en cuatro grupos: CR, CCR, CXCR y CX3CR. Algunos de ellos se expresan en un solo tipo celular (por ejemplo, CXCR1 es expresado predominantemente por los neutrófilos) mientras que otros lo hacen sobre más de una población leucocitaria. Además se ha descrito que se expresan en neuronas, astrocitos, células epiteliales y endoteliales. MCP-1 se une exclusivamente al receptor CCR2, MIP-1 $\alpha$  se une a CCR1 y CCR5 y MIP-1 $\beta$  a CCR5. La unión de estas quemoquinas a sus respectivos receptores produce un aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular y activación de la fosfolipasa A2 induciendo la liberación de ácido araquidónico necesario para la quimiotaxis de los monocitos (Rottman, 1999).

En relación a la presencia de quemoquinas en el testículo, recientemente Aubry y col. (2000) demostraron la producción *in vitro* de MCP-1 en células peritubulares y de Leydig aisladas de testículo normal de rata. Esta expresión aumentaba al estimular las células con citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) y lipopolisacárido bacteriano (LPS). En cambio, MIP-1 $\alpha$  no fue detectada en ningún tipo celular. También ha sido demostrado que el virus Sendai induce la producción *in vitro* de MCP-1 en las células peritubulares y de

Leydig (Le Goffic y col., 2002). Por último, Gerdprasert y col. (2002 a, b) sugirieron que el aumento del número de macrófagos intratesticulares estaba estimulado por MCP-1 en un modelo inflamatorio inducido por LPS.

### **Selectinas**

Esta familia compuesta por tres proteínas está involucrada en la primera fase de la cascada de adhesión. La L-selectina es expresada por la mayoría de los leucocitos, la E-selectina es específica de células endoteliales y la P-selectina se presenta en el endotelio y en las plaquetas.

En un primer momento, la L-selectina (CD62L) se describió como un receptor expresado por los linfocitos e involucrado en la adhesión transitoria de los mismos al endotelio alto de las vénulas post-capilares de los ganglios linfáticos (Gallatin y col., 1983). Más tarde, se descubrió que se expresa también en neutrófilos y monocitos y participa en el ingreso de leucocitos a tejidos inflamados. La Eselectina se expresa en endotelio y es inducible por citoquinas proinflamatorias (Bevilacqua y col., 1987) y la P-selectina se identificó por primera vez en plaquetas y más tarde en la superficie del endotelio (Hsu-Lin y col., 1984; McEver y col., 1984).

Estructuralmente presentan un extremo NH<sub>2</sub>-terminal de tipo lectina o CRD (dominio de reconocimiento de carbohidratos), seguido de un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico, un número variable de repeticiones de secuencias consenso (similares a las halladas en proteínas regulatorias del complemento), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta.

Una característica que diferencia a la L-selectina de las otras moléculas de adhesión es que sufre un clivaje proteolítico en el dominio próximo a la membrana, dando como resultado un fragmento de L-selectina activo (Khan y col., 2003).

### **CD44**

La molécula de adhesión CD44 está involucrada en las interacciones célula-célula y célula-matriz. La familia de CD44 comprende a glicoproteínas de transmembrana de 85-200 KDa expresadas en una amplia variedad de tipos celulares, leucocitos, fibroblastos, células epiteliales, queratinocitos y algunas células endoteliales (Gee y col., 2004). CD44 funciona como receptor para el AH y aunque la mayoría de las células expresan CD44, pocas son capaces de reconocerlo (Lesley y col., 1993). La estimulación *in vitro* o *in vivo* de linfocitos T normales a través del receptor T induce la forma activada de CD44 y consecuentemente la adhesión al endotelio o al AH (DeGrendele y col., 1997b). La molécula CD44 adquiriría la capacidad de unir AH por cambios estructurales de su dominio extracelular, oligomerización de CD44 sobre la membrana celular, fosforilación de su dominio citoplasmático o por alteraciones de su patrón de glicosilación (Gee y col., 2003). Además, ha sido reportado que el LPS y el TNF- $\alpha$  regulan positivamente la expresión de isoformas de CD44 capaces de unir AH en monocitos estimulados por LPS (Levesque y col., 1996, 1997). Los linfocitos activados se unen al AH presente en el endotelio y esta unión específica facilita el "rolling" y extravasación de los leucocitos dentro de tejidos inflamados. Además, un reciente trabajo de Nandi y col. (2004)



demonstró que la interacción selectiva y cooperativa entre CD44 y la integrina VLA-4 es requerida para la extravasación de linfocitos T.

### **Superfamilia de las inmunoglobulinas**

La superfamilia de las inmunoglobulinas (Igs) comprende un número importante de moléculas, involucradas no sólo en la adhesión celular sino también en el reconocimiento antigénico y múltiples funciones inmunes. Estructuralmente todas las moléculas de la familia se presentan con uno o más dominios de Ig, compuestos por dos láminas  $\beta$ . La estructura se encuentra estabilizada por aminoácidos hidrofóbicos en las cadenas  $\beta$  y puentes disulfuro intercatenarios.

El ligando o contrareceptor puede ser otra molécula perteneciente a la misma familia (homofílica) u otra familia (heterofílica). Entre los miembros más representativos que intervienen en el tráfico celular encontramos a ICAM-1 y -2, VCAM-1 y PECAM-1. Describiremos con más detalle VCAM-1 y PECAM-1 por tratarse de las moléculas estudiadas en este trabajo de Tesis.

VCAM-1 es una proteína de transmembrana de 110 KDa, con seis o siete dominios de Ig ("splicing" alternativo del dominio 4). VCAM-1 se une a linfocitos y monocitos que expresan las integrinas VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ),  $\alpha_4\beta_7$ , y el péptido CS-1 de la molécula fibronectina. La interacción de VCAM-1 con su ligando media la adhesión y la transmigración de linfocitos y monocitos a través del endotelio vascular durante procesos fisiológicos y patológicos. VCAM-1 es expresado en el endotelio de los ganglios linfáticos y es inducido en el endotelio en tejidos inflamados. Se expresa en el endotelio activado por IL-1, TNF- $\alpha$  y LPS (Cook-Mills, 2002).

En testículo de ratón y humano se observó que VCAM-1 es también expresado por las células de Leydig y es capaz de unir leucocitos, sugiriendo que prevendría la respuesta inmune contra células germinales (Verajankorva, 2002).

PECAM-1 es una glicoproteína de 130 KDa con seis dominios Ig. La proteína está compuesta por un dominio extracelular de 574 aminoácidos, una región transmembrana de 19 residuos hidrofóbicos y un dominio citoplasmático de 118 aminoácidos. En el dominio extracelular existen 9 sitios de N-glicosilación y los carbohidratos constituyen el 40% de la masa de la proteína. PECAM-1 es expresada por plaquetas, células endoteliales, monocitos, neutrófilos, células madre de la médula ósea y linfocitos T CD8+. Durante el desarrollo embrionario, PECAM-1 es expresado tempranamente en el blastocisto, en angioblastos del embrión e islotes sanguíneos del saco vitelino y su expresión persiste durante todo el desarrollo embrionario. En el adulto, PECAM-1 es expresado en las células endoteliales de los vasos linfáticos y sanguíneos existentes y en formación, característica que lo define como marcador de células endoteliales. PECAM-1 se puede unir en forma homofílica a otra molécula de PECAM-1, en forma heterofílica a un proteoglicano que contiene heparina o sulfato de condroitina y a la integrina  $\alpha_v\beta_3$ . PECAM-1 cumple un rol fundamental en el proceso de migración de leucocitos a través del endotelio vascular y en la unión intercelular en células endoteliales (Ilan, 2003).

**Objetivos**

### **Objetivo General**

Las infecciones e inflamaciones del aparato reproductor masculino constituyen las principales causas de infertilidad. La orquitis autoinmune experimental (OAE) es un modelo útil para comprender estos procesos inflamatorios en el testículo. Este cuadro, inducido en la rata por inmunización activa con homogenado testicular más adyuvantes, se caracteriza por la presencia de un infiltrado linfomonocitario en el intersticio testicular y un daño de los túbulos seminíferos, inicialmente focal y luego extendido a todo el órgano. Interesados en comprender los mecanismos por los cuales los linfomonocitos migran desde la sangre al testículo, nos propusimos estudiar las principales quemoquinas y moléculas de adhesión involucradas en la extravasación leucocitaria.

### **Objetivos específicos**

**A)** Estudiar los principales factores que facilitan la migración de linfomonocitos al intersticio testicular.

- Evaluar las concentraciones de las siguientes quemoquinas de la subfamilia CC: MCP-1 (CCL2) y MIP-1 $\alpha$  (CCL3) en suero, fluído testicular y medio condicionado de macrófagos testiculares.

- Identificar las distintas poblaciones celulares del testículo que expresan dichas quemoquinas y sus receptores específicos (CCR2, CCR1 y CCR5).

- Determinar la actividad quimioattractante de MCP-1 y MIP-1 $\alpha$  sobre los leucocitos aislados de sangre y ganglios linfáticos.

**B)** Estudiar las moléculas de adhesión involucradas en la migración y extravasación leucocitaria.

- Estudiar la expresión de las moléculas de adhesión L-selectina (CD62L) y CD44 en Infomonocitos de sangre periférica y ganglios linfáticos drenantes del sitio de inmunización.

- Estudiar la funcionalidad de la molécula de adhesión CD44 y su expresión en el testículo.

- Estudiar la expresión de las moléculas de adhesión PECAM-1 (CD31) y VCAM-1 (CD106) en células endoteliales testiculares.

## **Materiales y Métodos**

### **Animales**

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de 50-60 días de edad, mantenidas a 22 °C con un esquema de 14 h de luz y 10 h de oscuridad, alimentadas con comida estándar y agua *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados según las indicaciones de la Guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio del National Institutes of Health.

### **Esquema de inmunización**

Las ratas del grupo experimental (E) fueron inmunizadas con una emulsión de homogenado testicular (HT) y adyuvante de Freund completo (AFC) preparado como previamente se describe (Doncel y col., 1989). Brevemente, testículos de ratas adultas jóvenes fueron decapsulados, diluidos en igual volumen de solución salina buffereada (PBS) y homogenizados en un Omni mixer por 30 s. La concentración final fue 500 mg/ml peso húmedo. Las ratas del grupo E fueron inyectadas 3 veces con 0,4 ml de HT (200 mg)/ dosis/rata cada 14 días emulsionado con 0,4 ml de AFC. La inmunización se realizó por vía intradérmica en las almohadillas plantares y en múltiples sitios cercanos a las regiones ganglionares inguinales y cervicales. Se utilizó como coadyuvante *Bordetella Pertussis* (Bp) (cepa 10536, Instituto Nacional de Microbiología "C. Malbrán"), inyectándose  $10^{10}$  microorganismos por vía intravenosa en las 2 primeras inmunizaciones y  $5 \times 10^9$  microorganismos por vía intraperitoneal en la tercera inmunización. Las ratas del grupo control (C) se inmunizaron en las mismas condiciones que las del grupo E reemplazando el HT por solución fisiológica. Las ratas del grupo E, C y normales (N) sin tratar

fueron sacrificadas en diferentes días (7, 30, 50 y 100 días) posteriores a la primera inmunización. La sangre fue recogida y el suero almacenado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso o fue procesada para el aislamiento de células mononucleares periféricas. Los testículos fueron fijados en una solución de Bouin e incluidos en parafina, congelados para realizar cortes de crióstato o procesados para aislar macrófagos y células endoteliales o para obtener fluido testicular. Los ganglios poplíteos fueron procesados para aislar linfomonocitos.

### **Histopatología Testicular**

La histopatología testicular se estudió en cortes de parafina obtenidos en tres diferentes niveles, teñidos con hematoxilina-eosina.

### **Obtención de fluido testicular**

Los fluidos testiculares (FT) fueron recogidos de acuerdo a la metodología descrita por Sharpe y col. (1984). Brevemente, los testículos fueron decapsulados y el FT drenante fue recogido en presencia de los inhibidores de proteasas, aprotinina y PMSF (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos) después de 16 h a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Aislamiento y cultivo de macrófagos testiculares**

El método de aislamiento fue similar al descrito por Yee y Hutson (1983) con pequeñas modificaciones (Suescun y col., 2000). Brevemente, las ratas de los grupos N, C y E fueron perfundidas con solución salina estéril y fría hasta que los tejidos estuvieran pálidos. Los testículos decapsulados fueron



incubados con colagenasa (0.3 mg/ml, Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ, Estados Unidos) en PBS conteniendo 0.1% de albúmina bovina (BSA, Sigma Chemical Co.) durante 15 min. en un baño a 34 °C con agitación. La colagenasa fue inactivada con PBS frío, se permitió que los túbulos seminíferos sedimenten y el sobrenadante recogido fue centrifugado a 300 x g durante 5 min. a 4 °C. Las células intersticiales obtenidas fueron sembradas sobre placas de Petri de 35mm de diámetro e incubadas a 34 °C durante 2 h. Después de varios lavados con PBS, las células adheridas fueron cultivadas en Medio 199 (M199, Sigma Chemical Co.) conteniendo una solución antibiótica-antimitótica (100 U/ml penicilina G; 100 g/ml estreptomicina; 0.25 g/ml anfotericina B, Gibco, Carlsbad, CA, Estados Unidos) por 20 h a 34 °C en una atmósfera húmeda conteniendo 5 % de CO<sub>2</sub>. La pureza de la suspensión de macrófagos fue 90-95 %, evaluada contando el número de macrófagos testiculares que incorporaron azul tripán o bolitas de látex (0,81 μm de diámetro, Difco lab., Detroit, MI, Estados Unidos) después de 1 h de incubación a 34 °C.

#### **Obtención de medio condicionado de macrófagos**

Los medios condicionados de macrófagos (MCM) fueron recogidos en condiciones estériles a partir de cultivos de 20 h de macrófagos testiculares. Fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 min. y almacenados a -70 °C hasta la determinación de MCP-1 y MIP-1 $\beta$  por ELISA. El número total de células adherentes/ placa fue calculado realizando un recuento con azul tripán.

### **Inmunoensayo para MCP-1 (ELISA)**

Un kit de ELISA para MCP-1 de rata (Biosource Int., Camarillo, CA, Estados Unidos) fue empleado para determinar la concentración de MCP-1 en sueros, FT y MCM testiculares provenientes de ratas pertenecientes a los grupos N, C y E. La mínima concentración de MCP-1 detectable con el ensayo fue menor de 8 pg /ml.

### **Inmunohistoquímica**

Se utilizó la técnica de inmunoperoxidasa indirecta amplificada en cortes de testículo obtenidos en crióstato (6  $\mu$ m de espesor) y fijados con acetona fría. Los cortes fueron lavados con PBS e incubados con 5% de leche descremada, 0.01 % de Tritón X-100 (para los antisueros MCP-1, CCR1, CCR2 y CCR5) o suero normal de caballo (para el antisuero CD44) y luego incubados con una solución de bloqueo avidina- biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos). Luego de la incubación con los anticuerpos primarios anti-CD44 de rata obtenido en ratón (2,5  $\mu$ g/ml) (BD Pharmingen, San Diego, CA, Estados Unidos), anti-CCR5 de rata (10  $\mu$ g/ml), anti-MCP-1, CCR1, CCR2 obtenidos en cabra (5  $\mu$ g/ml) (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, Estados Unidos), los cortes fueron incubados con un anticuerpo anti-ratón o anti-cabra biotinilado según la especie del anticuerpo primario (Vector Lab.). La actividad de peroxidasa endógena fue bloqueada incubando los cortes con 0.3 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol durante 30 min. Luego la reacción fue amplificada mediante el kit ABC Vectastain (Vector Lab.) utilizando 3´diaminobenzidina- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sustrato DAB, Vector Lab.) como sustrato de la peroxidasa. Los cortes fueron

contrateñidos con hematoxilina. Los controles negativos fueron obtenidos incubando los cortes con PBS en lugar del anticuerpo primario o con el anticuerpo MCP-1 combinado con un exceso de la proteína recombinante MCP-1 (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Excepcionalmente los cortes de crióstato fueron sometidos a microondas (5 min. a 370 W) en un buffer citrato de sodio 10mM, pH 6, luego enfriados rápidamente en PBS e incubados con anti-MCP-1 en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. El recuento de las células CD44+, CCR1+, CCR2+ o CCR5+ fue realizado usando un objetivo de 40x y un ocular (12.5x) acoplado a una grilla cuadrática con un área total de 36100  $\mu\text{m}^2$ . El número total de campos contados por cada corte fueron 40 en 3 animales/ grupo/ día posterior a la primera inmunización. El número de células por unidad de volumen testicular (Nv) fue calculado empleando la ecuación de Floderus (Floderus, 1944):  $Nv = Na / (D + T - 2h)$ , siendo Na el número de células contadas por superficie, D el diámetro nuclear promedio, T el espesor de los cortes de crióstato y h un factor de corrección para calcular el diámetro nuclear. El número total de células CD44+, CCR1+, CCR2+ o CCR5+ por testículo fue calculado multiplicando Nv por el volumen testicular. Este último fue calculado como previamente se describe (Suescun y col., 1994).

#### **Técnica de co-localización por inmunofluorescencia en macrófagos testiculares**

Una técnica de doble inmunofluorescencia fue empleada para detectar MCP-1, CCR2, CCR5 en macrófagos testiculares ED1+ o ED2+. Los anticuerpos monoclonales ED1 y ED2 que reconocen un antígeno citoplasmático en

monocitos, macrófagos y células dendríticas de ratas (ED1) y un antígeno de membrana de los macrófagos de tejido (ED2), fueron utilizados para identificar macrófagos circulantes y residentes, respectivamente. Los macrófagos aislados del testículo fueron sembrados sobre cubreobjetos, fijados en 2 % de formaldehído durante 10 min. y permeabilizados con 0.1 % Tritón-X 100 en PBS. Las células fueron lavadas tres veces con PBS, repitiéndose este paso después de cada incubación. Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados tratando las células con 5 % de suero normal de cabra en 3 % BSA en PBS durante 30 min. a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-rata MCP-1, anti-rata CCR2 o anti-rata CCR5 (10 µg/ml) y luego con un anticuerpo anti-cabra conjugado con rodamina (1:100) (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Posteriormente, para identificar las subpoblaciones de macrófagos, las células fueron incubadas con los anticuerpos ED1 (10 µg/ml) (BD Pharmingen) o ED2 (5 µg/ml) (BD Pharmingen) en 0.1 M PBS con 0.03 % Tritón-X 100 y 5 % de suero normal de rata y luego el anticuerpo anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:50) (Vector Lab.) en 0.1 M PBS con 0.03 % Tritón-X 100 y 5 % de suero normal de rata. En los controles se reemplazó el anticuerpo primario con PBS o con una IgG del mismo isotipo que el anticuerpo primario. Los cubreobjetos fueron montados con 90 % de glicerina en PBS. El porcentaje de macrófagos ED1+ MCP-1+ o ED2+ MCP-1+ fue obtenido usando un microscopio de epifluorescencia (objetivo 100X).

### **Técnica de co-localización por inmunofluorescencia en cortes de crióstato**

Una técnica de doble inmunofluorescencia fue empleada para detectar MCP-1 y CCR2 en células dendríticas OX-62+. El anticuerpo monoclonal OX-62 reconoce la integrina E2 expresada por las células dendríticas y linfocitos T ?? de rata. Cortes de testículo obtenidos en crióstato (6 ?m de espesor) y fijados con etanol fueron lavados con PBS y bloqueados los sitios de unión inespecífica con 5% BSA en PBS. Luego fueron incubados con un anticuerpo anti-rata MCP-1 o anti-rata CCR2 (10 ?g/ml) y luego con un anticuerpo anti-cabra conjugado con rodamina (1:100) (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Posteriormente, para identificar las células dendríticas, los cortes fueron incubados con el anticuerpo OX-62 (Serotec, Oxford, Reino Unido) (dilución 1:75 en 10 % BSA) y luego el anticuerpo anti-ratón conjugado con FITC (1:50) (Vector Lab.) en 0.1 M PBS con 0.03 % Tritón-X 100 y 5 % de suero normal de rata. En los controles se reemplazó el anticuerpo primario con PBS o con una IgG del mismo isotipo que el anticuerpo primario. Todas las incubaciones fueron realizadas durante 30 min. a temperatura ambiente.

### **Ensayo de quimiotaxis**

El ensayo de quimiotaxis empleando el sistema de transwells (Corning Incorporated, Acton, MA, Estados Unidos) fue realizado para medir la migración de los linfomonocitos en respuesta a determinadas quemoquinas. Las cámaras superior e inferior fueron separadas por una membrana de policarbonato conteniendo poros de 5 ?m. Los linfomonocitos ( $2 \times 10^6$ /0.1ml

medio) obtenidos de sangre periférica o de ganglio poplíteo de ratas con orquitis fueron sembrados por duplicado en la cámara superior mientras que la cámara inferior contenía 0.6 ml de la quemoquina MCP-1 o MIP-1 $\alpha$  (100 ng/ml) o medio (M 199:RPMI 1640 (1:1), 0.5% BSA). Luego de 4 horas de incubación a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, los linfomonocitos migrados fueron recogidos de la cámara inferior y contados con azul trypan. Los resultados fueron expresados como células migradas por acción de la quemoquina/células migradas por acción del medio solo (índice de migración).

#### **Inmunoensayo para MIP-1 $\alpha$ (ELISA)**

La concentración de MIP-1 $\alpha$  en MCM testiculares, FT y suero de rata obtenidos en diferentes días posteriores a la primera inmunización fue determinada mediante un ensayo de ELISA amplificado. Una microplaca de 96 hoyos con fondo plano (Immulon 2HB, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, Estados Unidos) fue cubierta con 100  $\mu$ l de las muestras a ensayar (dilución al medio en buffer carbonato 50 mM, pH=9, suero fetal bovino (SFB) 0.5% inactivado) durante 16 horas a 4 °C. Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con 1% BSA en PBS durante 90 min. a temperatura ambiente y posteriormente se realizó un lavado con PBS 0.02% azida. Luego de 90 min. de incubación a temperatura ambiente con 100  $\mu$ l del anticuerpo anti-MIP-1 $\alpha$  de rata obtenido en conejo (1:100 en PBS 1% BSA) (Biosource Int.), los hoyos fueron lavados 3 veces con PBS 0.05% Tween (buffer de lavado) y 100  $\mu$ l del anticuerpo anti-conejo biotinilado (10  $\mu$ g/ml en PBS 1% BSA , 0.1% Tween) (Vector Lab.) fueron agregados. Finalizado el tiempo de

incubación (90 min. a temperatura ambiente) y lavado, los hoyos fueron incubados durante 60 min. con 100  $\mu$ l de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Vector Lab.) (1:200 en 10 mM Hepes, 0.15 M NaCl, 0.1mg/ml BSA). Por último y luego del lavado correspondiente el sustrato de la fosfatasa (p-nitrofenil fosfato, Sigma Chemical Co.) fue agregado dejando desarrollar la reacción durante 30 min. en oscuridad. La misma fue bloqueada adicionando 100  $\mu$ l de EDTA (0.1M, pH= 7.5) y la absorbancia fue medida a 405 nm en un lector de placa de ELISA (Bio-Rad, CA, Estados Unidos). Una curva de calibración (25 ng/ml-0.2 ng/ml) fue realizada para cada ensayo empleando diluciones al medio de la proteína recombinante MIP-1 $\alpha$  de rata (Biosource Int.) preparada en buffer carbonato.

#### **Aislamiento de linfomonocitos a partir de ganglios linfáticos**

Los ganglios poplíteos fueron colocados en PBS conteniendo 0,03% de azida sódica y 10% de SFB, cortados en pequeños fragmentos y pasados a través de una malla de acero inoxidable. Luego la suspensión celular fue rápidamente pasada a través de una jeringa con lana de nylon (Scrubbed Nylon<sup>TM</sup> Fibers, ZeptoMetrix Corporation, Buffalo, NY, Estados Unidos) con el objetivo de enriquecer la suspensión en linfomonocitos y eliminar las células muertas y el tejido adiposo. La viabilidad celular fue evaluada con azul tripán y cuantificada en una cámara de Neubauer.

### **Aislamiento de linfomonocitos a partir de sangre periférica**

Las células mononucleares de sangre periférica fueron purificadas mediante centrifugación en un gradiente Histopaque<sup>®</sup>-1077 (Sigma Chemical Co.) de densidad 1,077 g/ml preparado según especificaciones del fabricante. La viabilidad celular fue evaluada con azul tripán y cuantificada en una cámara de Neubauer.

### **Técnica de citometría de flujo**

La expresión de CD44 y L-selectina (CD62L) en linfomonocitos de sangre periférica y de ganglios linfáticos fue estudiada por citometría de flujo.  $2 \times 10^6$  células de ambas muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-CD44 de rata obtenido en ratón (IgG<sub>2A</sub>,?, BD Pharmingen) o anti-rata CD62L (L-selectina) (IgG<sub>1</sub>,?, BD Pharmingen) durante 30 min. Luego de ser lavadas con PBS conteniendo 0.03% azida sódica y 10% de SFB (PBS/SFB), las células fueron incubadas con un segundo anticuerpo anti-ratón conjugado con FITC (1:50) (Vector Lab.) durante 30 min. y luego nuevamente lavadas con PBS/SFB. Todo el procedimiento se realizó a 4 °C. Las células marcadas fueron evaluadas por citometría de flujo usando un equipo Ortho Diagnostic System Cytoron Absolute (Johnson ? Johnson) del Servicio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas “José de San Martín”. Una región (gate) de exclusión de yoduro de propidio fue pre-seteado para asegurar que sólo se adquirieran células viables. El análisis fue realizado sobre la fracción de linfomonocitos totales. Como control negativo se empleó una inmunoglobulina irrelevante de ratón (IgG<sub>2A</sub>,?, IgG<sub>1</sub>,?, BD Pharmingen) y como control positivo un



anticuerpo anti-rata linfocitos W3/13 (Accurate Chemical Science Co., Westbury, NY, Estados Unidos).

### **Ensayo de adhesión de PBMC y linfomonocitos de ganglio linfático a ácido hialurónico**

Una microplaca de 96 hoyos con fondo plano (Maxisorp, Nunc, Rochester, NY, Estados Unidos) fue cubierta con 1 mg/ml/hoyo de ácido hialurónico (AH) (obtenido de cresta de gallo, Sigma Chemical Co.) disuelto en PBS. Luego de 16 h de incubación a 4 °C, la microplaca fue lavada dos veces con PBS y  $2,5 \times 10^5$  células fueron sembradas en cada hoyo. Transcurrida una hora de incubación a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, las células adheridas fueron lavadas y cuantificadas con CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, Estados Unidos). La absorbancia fue leída a una longitud de onda de 490 nm en un lector de placa para ELISA (Bio-Rad). En otro experimento, hialuronidasa de testículo bovino (Sigma Chemical Co.) en una concentración de 900 U/ml (90 U/hoyo) fue agregada a la microplaca cubierta con AH. Después de 30 min. de incubación (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), las microplacas fueron lavadas y  $2,5 \times 10^5$  células fueron sembradas en cada hoyo. También se estudió la adhesión celular a hoyos sin cubrir (plástico). El porcentaje de adhesión celular fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación: (absorbancia de las células adheridas por hoyo/ absorbancia máxima correspondiente a  $2,5 \times 10^5$  células) x 100.

### **Aislamiento de células endoteliales del testículo por inmunoseparación magnética**

Testículos provenientes de ratas N, C y E fueron digeridos con colagenasa (0.3 mg/ml en PBS 0.1% BSA) durante 15 min. a 34 °C en agitación. Las células intersticiales obtenidas fueron filtradas a través de una malla de nylon de 30 µm, centrifugadas a 300 x g durante 10 min. e incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-PECAM-1 (CD31) de rata conjugado con ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen) durante 15 min. a 4 °C en oscuridad. Luego las células fueron lavadas con PBS suplementado con 0.5% BSA y 2 mM EDTA, centrifugadas y finalmente incubadas con perlas (beads) magnéticas conjugadas con el anticuerpo anti-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) durante 15 min. a 4 °C. Por último las células PECAM-1+ fueron seleccionadas utilizando un sistema de columna y magneto de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y empleadas posteriormente para estudios de citometría de flujo.

### **Caracterización de las células endoteliales testiculares por citometría de flujo**

La fracción celular del intersticio testicular PECAM-1+ fue incubada con el anticuerpo primario monoclonal anti-VCAM-1 (CD106) de rata obtenido en ratón (1 µg/millón de células) (BD Pharmingen), luego fue lavada con PBS/SFB y nuevamente incubada con un segundo anticuerpo anti-ratón conjugado con FITC (1:50). Por último fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-antígeno común leucocitario (CD45) de rata conjugado con PE-Cy5 (0.5

$1 \times 10^6$  de células) (BD Pharmingen). Todas las incubaciones se realizaron a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  y durante 30 min. Como controles negativos se emplearon inmunoglobulinas irrelevantes de ratón (IgG1, BD Pharmingen) sin marcar o marcadas con PE o PE-Cy5 según corresponda. El análisis de la expresión de VCAM-1 fue realizado sobre la subpoblación PECAM-1+ CD45-.

### **Análisis estadístico**

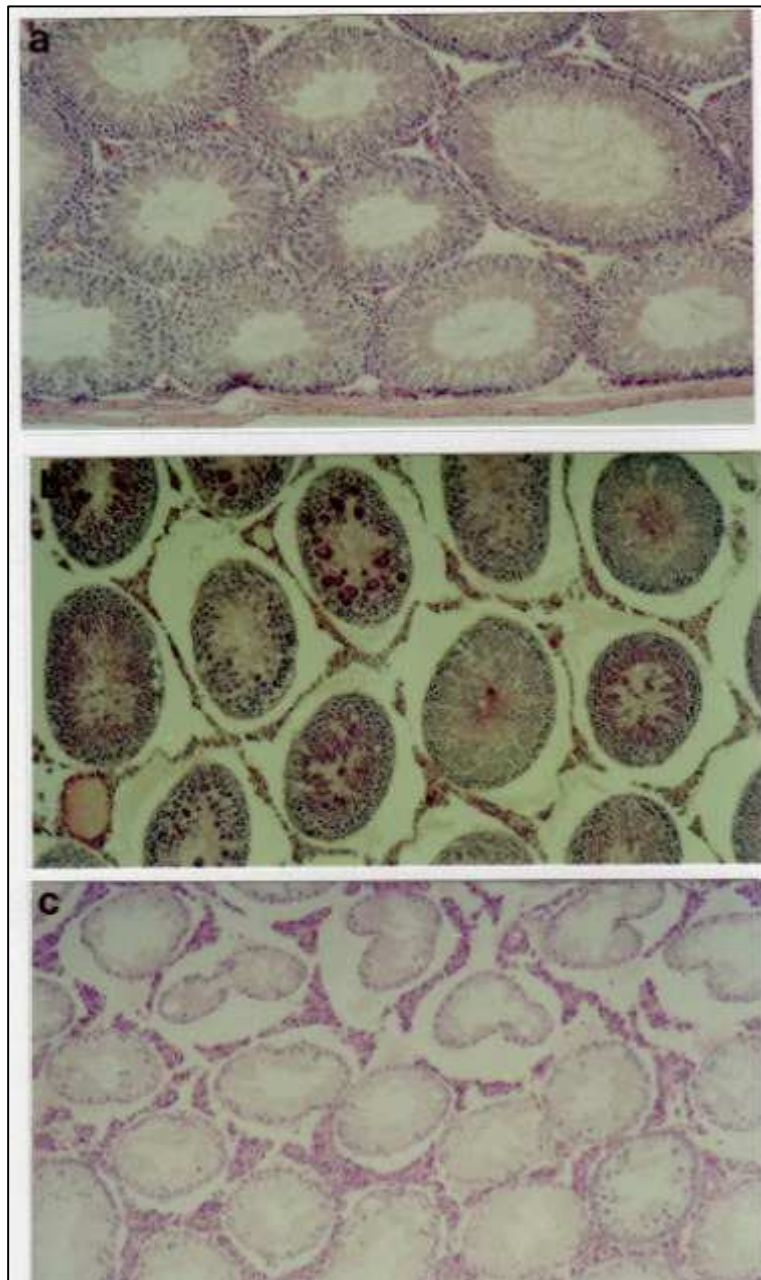
Las evaluaciones estadísticas fueron realizadas empleando el test no paramétrico Mann-Whitney rank test para comparar dos muestras o Kruskal Wallis (ANOVA de un factor) para comparar más de dos muestras. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo.

**Resultados**

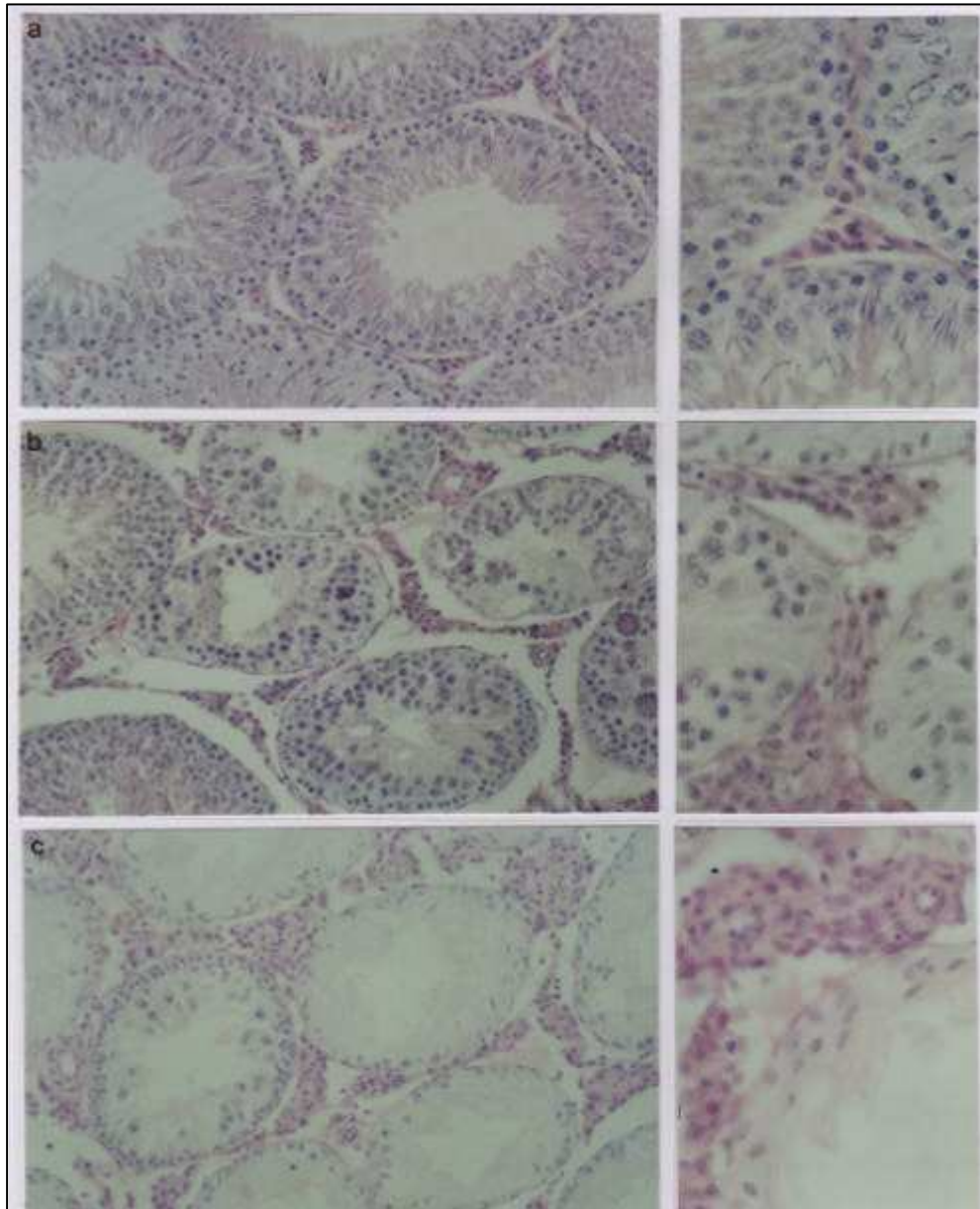
### **Histopatología**

El 90% de las ratas del grupo experimental (E) desarrollaron orquitis autoinmune, caracterizada por un infiltrado intersticial de linfocitos y fundamentalmente monocitos y lesiones de los túbulos seminíferos que presentaban distintos grados de descamación de espermatidas y espermatocitos. La orquitis se inició a los 50 días de la primera inmunización observándose focos de lesión con un número reducido de túbulos seminíferos dañados (Fig. 1b y 2b). A los 100 días el grado de lesión testicular fue severo, observándose grandes áreas de túbulos seminíferos aspermatogénicos que sólo contenían espermatogonias y células de Sertoli (Fig. 1c y 2c). Ninguna de las ratas del grupo normal (N) y control (C) (Fig. 1a y 2a) mostraron alteraciones patológicas de los testículos.

De acuerdo a las observaciones histopatológicas, los animales fueron agrupados en 7-30 días (sin daño testicular), 50 días (orquitis focal) y 100 días (orquitis severa). Las ratas del grupo E que no desarrollaron orquitis después de los 50 días no fueron estudiadas.



**Fig. 1. Histopatología testicular.** Cortes de testículo de rata de los grupos control (a), experimental de 50 días (b) y experimental de 100 días (c). En la rata del grupo control se observan túbulos seminíferos con espermatogénesis normal. Iniciada la lesión (50 días), algunos túbulos seminíferos mantienen el epitelio germinal intacto mientras que otros ya han comenzado a sufrir descamación de las células germinales y formación de células gigantes multinucleadas. Finalmente a los 100 días, la totalidad de los túbulos seminíferos están dañados, sólo se observan células de Sertoli, espermatogonias y escasos espermatozoides. A igual aumento, los diámetros de los túbulos seminíferos de la rata del grupo experimental son menores a los de la rata del grupo control debido a la pérdida de células germinales y atrofia de los túbulos seminíferos. Hematoxilina-eosina X100.



**Fig. 2. Histopatología testicular.** Cortes de testículo de rata de los grupos control (a), experimental de 50 días (b) y de 100 días (c). Se observa un importante infiltrado intersticial de linfomonocitos entre células de Leydig en las ratas del grupo experimental, moderado a los 50 días y abundante a los 100 días. Hematoxilina-eosina, figuras de la izquierda: X200 , figuras de la derecha: X400.

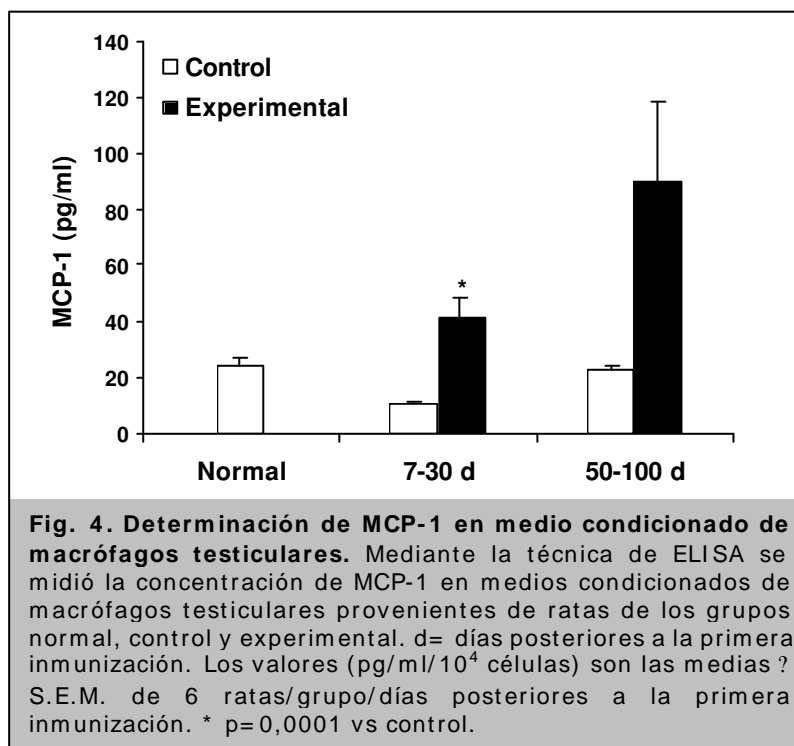
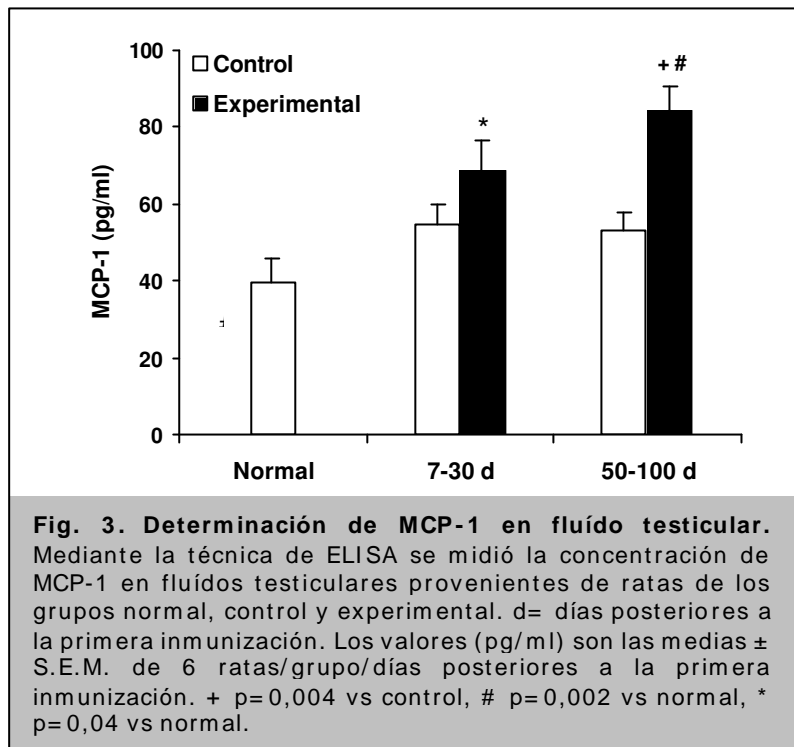
## **Quemoquinas**

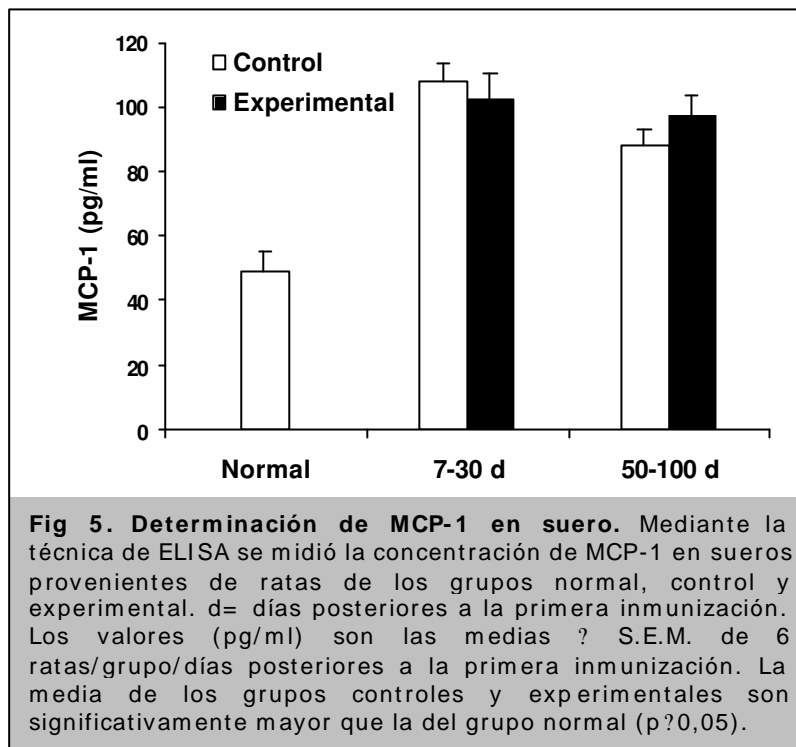
Interesados en conocer algunos de los mecanismos involucrados en la atracción de linfocitos y monocitos al intersticio testicular durante el desarrollo de la orquitis, estudiamos el papel de las quemoquinas MCP-1 y MIP-1?. En primer término se presentarán los resultados correspondientes a MCP-1 y luego los correspondientes a MIP-1?.

### **Determinación de MCP-1**

La quemoquina MCP-1 fue medida por ELISA en el fluido testicular (FT), medio condicionado de macrófagos (MCM) testiculares y suero de ratas de los grupos N, C y E. Se observó un aumento en la concentración de MCP-1 en las ratas del grupo E en comparación con las del grupo N en los tres tipos de muestras analizadas. En el FT y en el MCM testiculares se registró un aumento progresivo de la concentración de MCP-1 durante el desarrollo de la orquitis. Por otra parte, la concentración de MCP-1 en el FT (Fig. 3) y en el MCM testiculares (Fig. 4) fue significativamente mayor en las ratas de los grupos E (7-30 y 50-100 d) en comparación con las ratas del grupo C. La concentración de MCP-1 fue similar en los sueros provenientes de ratas C y E (Fig. 5).





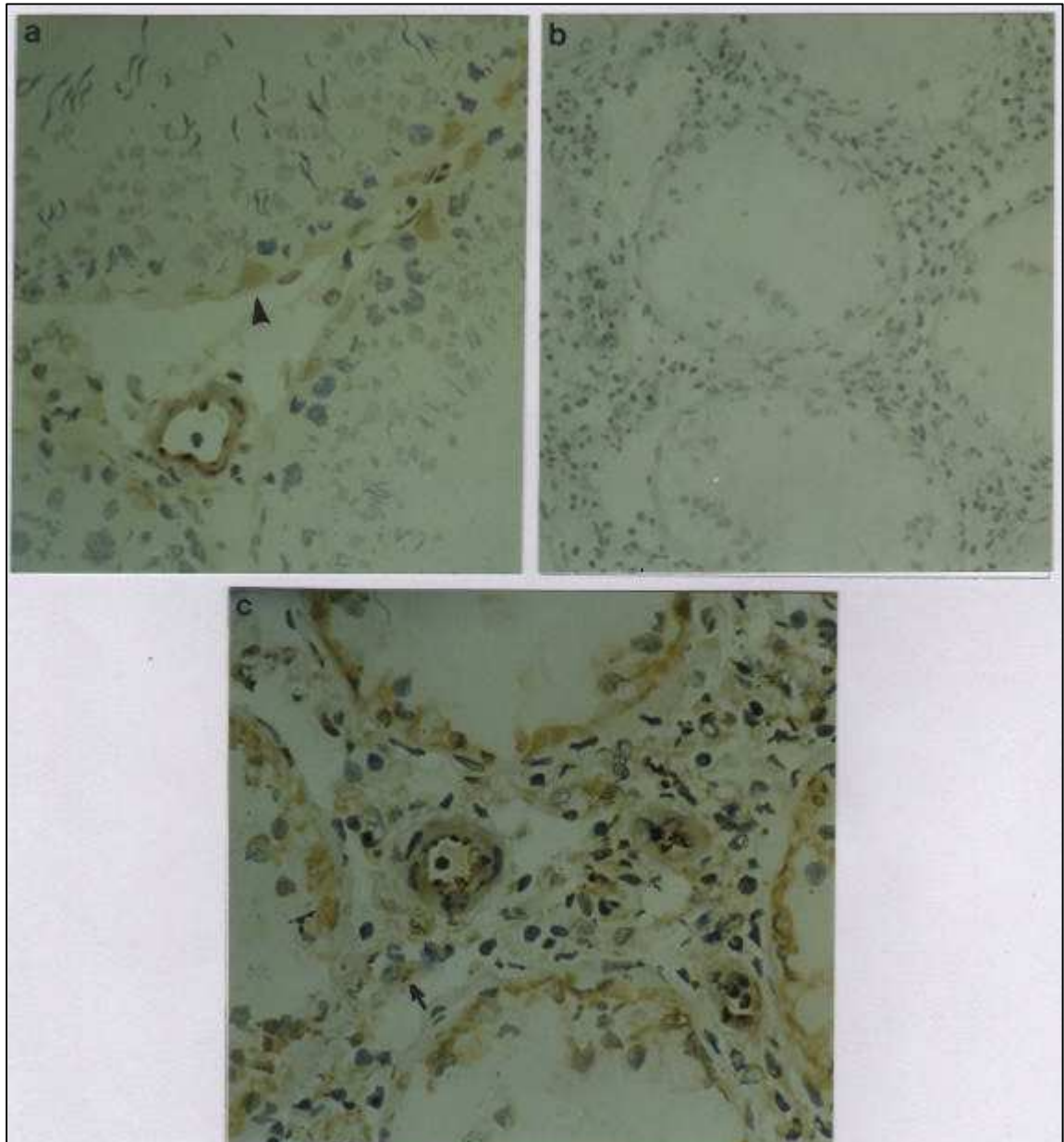


### ¿Qué células del testículo expresan MCP-1 ?

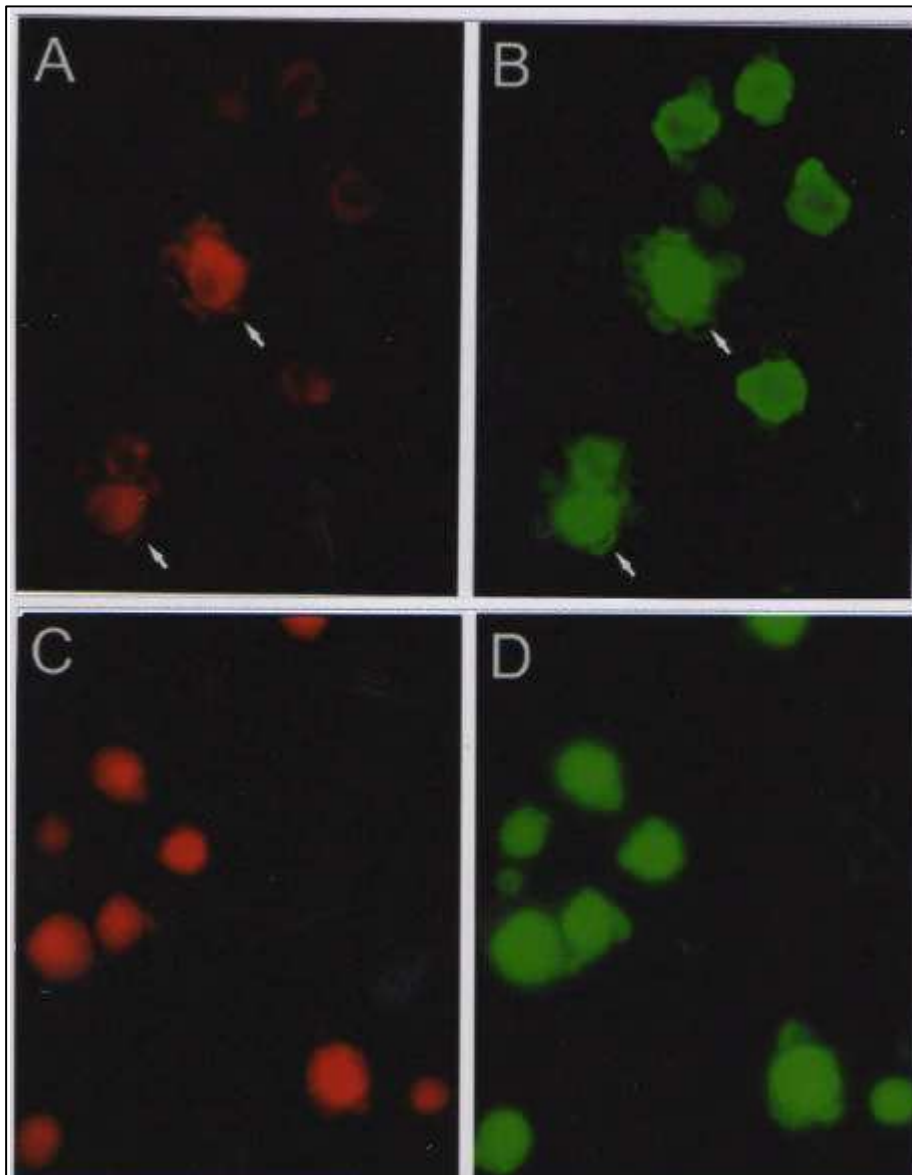
Mediante técnicas inmunohistoquímicas, se estudió la expresión de MCP-1 en cortes de crióstato de testículo de ratas de los grupos N, C y E. La expresión de MCP-1 fue observada en los tres grupos de ratas estudiados aunque la intensidad del producto de reacción fue mayor en las ratas con orquitis. MCP-1 fue detectado en las células de Leydig, endoteliales, peritubulares y mononucleares presentes en el intersticio del testículo (Fig.6). Dicha quemoquina fue también detectada en las células musculares lisas de las paredes de los vasos al tratar los cortes con microondas como método de desenmascaramiento antigénico (resultado no mostrado). En los túbulos seminíferos, MCP-1 se expresa en el citoplasma de las células de Sertoli mientras que las células germinales no expresan la quemoquina. La intensidad

de la reacción fue débil en las células de Sertoli de las ratas N y C (Fig. 6A) y mucho más intensa en las ratas con orquitis severa (Fig. 6B). La tinción inmunohistoquímica fue específica para MCP-1 dado que no se observó inmunoreacción al incubarse los cortes con el anticuerpo anti-MCP-1 previamente absorbido con su ligando específico (Fig. 6C). Idéntico resultado negativo se obtuvo al incubar los cortes de testículo con PBS en reemplazo del anticuerpo primario.

A efectos de identificar las células que expresan MCP-1 dentro de la población de células mononucleares del intersticio testicular se realizó una técnica de inmunofluorescencia doble sobre macrófagos aislados o sobre cortes de testículo de ratas con orquitis. Los macrófagos testiculares fueron identificados utilizando el anticuerpo ED2, específico de macrófagos residentes y ED1 específico de monocitos provenientes de la circulación, macrófagos y células dendríticas (Wang y col., 1994). Alrededor del 60% de los macrófagos ED1+ expresaron MCP-1 en ratas de los grupos C y E mientras que alrededor del 60% de los macrófagos residentes ED2+ fueron negativos para MCP-1. La Fig. 7 ilustra la expresión de MCP-1 en subpoblaciones de macrófagos ED1 o ED2. Por otra parte, las células dendríticas se identificaron en cortes de testículo con el marcador OX62. Previamente describimos (Rival y col., 2006) un aumento significativo de las células dendríticas en el intersticio testicular de ratas con orquitis. En este trabajo demostramos que dichas células presentadoras de antígenos también expresan MCP-1 (resultado no mostrado).



**Fig 6. Expresión de MCP-1 en cortes de testículo.** Expresión débil de MCP-1 en células de Sertoli (punta de flecha) del testículo de rata del grupo control (a). En ratas con orquitis severa (c) se observa mayor intensidad de reacción en la célula de Sertoli (punta de flecha) y célula de Leydig (flecha). Expresión de similar intensidad es observada en las células endoteliales (a y c). No se observa tinción cuando los cortes se trataron con el antisuero anti-MCP-1 absorbido con el péptido bloqueante MCP-1 (b). Técnica de inmunoperoxidasa, a y c: X 330, b: X 165.



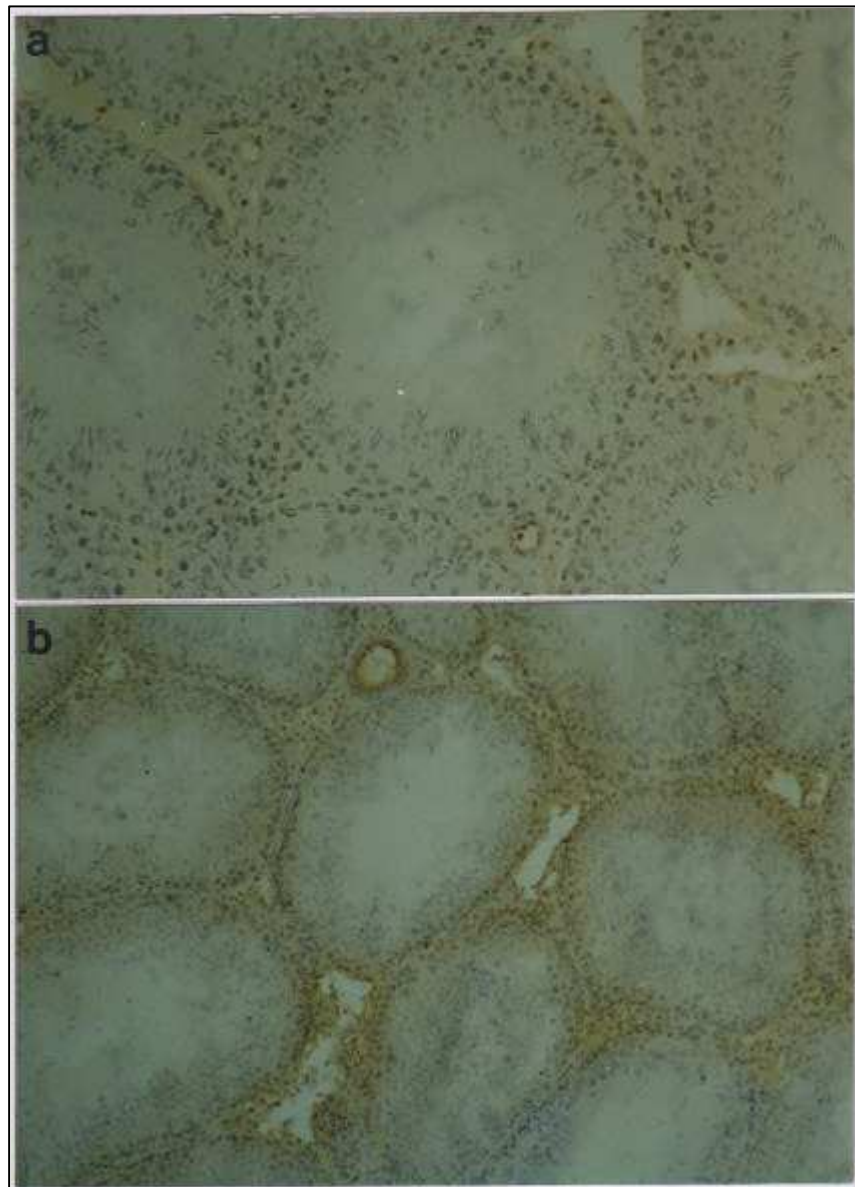
**Fig. 7. Expresión de MCP-1 en macrófagos testiculares.** Un anticuerpo secundario conjugado con FITC fue utilizado para identificar células ED1+ o ED2+ y otro, conjugado con rodamina, para detectar MCP-1. Todos los macrófagos testiculares ED1+ (d) aislados de ratas con orquitis expresan MCP-1 (c) mientras que solamente unas pocas células ED2+ (b) expresan MCP-1 (a). X 825.

### **Expresión de CCR2, receptor de la quemoquina MCP-1**

Dado que MCP-1 es expresada por numerosas células somáticas del testículo y que su concentración aumenta durante el desarrollo de la orquitis, nos preguntamos si las células mononucleares presentes en el intersticio migrarían por acción de dicha quemoquina. Para responder esta pregunta comenzamos por estudiar la expresión de su receptor, CCR2.

Mediante técnicas inmunohistoquímicas, se estudió la expresión de CCR2 en cortes de crióstato de testículo de ratas de los grupos N, C y E. Se observó que CCR2 es expresado por las células mononucleares presentes en el intersticio testicular (Fig. 8). El número de células CCR2+ fue significativamente mayor en ratas con orquitis (50-100 días) en comparación con ratas de los grupos C ( $p = 0,007$ ) y N ( $p \geq 0,0001$ ) (Tabla 1). En el grupo E, el aumento en el número de células CCR2+ fue observado solamente en las ratas con daño testicular. Estos resultados sugieren una correlación entre el grado de severidad de la lesión testicular y la expresión de CCR2.

Para identificar las subpoblaciones de macrófagos testiculares que expresan CCR2 se realizó en muestras de macrófagos aislados una técnica de inmunofluorescencia doble. La subpoblación de macrófagos ED1+ expresa CCR2 mientras que la mayoría de macrófagos de la subpoblación ED2+ es negativa para este receptor. A su vez, identificamos en cortes de testículo células dendríticas (OX62+) que expresan CCR2 (datos no mostrados).



**Fig. 8. Expresión de CCR2 en cortes de testículo.** Una intensa marcación positiva para CCR2 es observada en los linfomonocitos que invaden el intersticio testicular de ratas con orquitis (b), mientras que una intensidad menor se observa en las ratas controles (a). Los túbulos seminíferos dañados de ratas con orquitis muestran un menor diámetro comparado con los controles. Técnica de inmunoperoxidasa. X 165.

Tabla 1. Número de células CCR2+ / testículo ( $\times 10^5$ )

Días*	Normal	Control	Experimental	Lesión Testicular	
				Control	Experimental
	1,86 $\pm$ 0,38			-	-
7-30		1,58 $\pm$ 0,27	1,58 $\pm$ 0,18	-	-
50-100		6,55 $\pm$ 0,64 <sup>d</sup>	11,40 $\pm$ 1,00 <sup>a,b,c</sup>	-	$\pm$ /+/++

El recuento celular fue realizado en cortes de crióstato de testículo de 3 ratas/grupo/días posteriores a la primera inmunización. El daño testicular fue evaluado como -, + y ++ indicando focos aislados, numerosos focos o grandes áreas de túbulos seminíferos con descamación de células germinales, respectivamente. Los valores son las medias  $\pm$  S.E.M. <sup>a</sup> p=0,007 vs control, <sup>b</sup> p $\leq$ 0,0001 vs experimental 7-30 días, <sup>c</sup> p $\leq$ 0,0001 vs normal, <sup>d</sup> p $\leq$ 0,0001 vs normal y control 7-30 días. \* Días posteriores a la primera inmunización.

### Quimiotaxis de linfomonocitos en respuesta a MCP-1

Visto que el número de células mononucleares CCR2+ aumenta durante el desarrollo de la orquitis, nos interesó conocer si los linfomonocitos tienen la capacidad de migrar en respuesta a la acción quimiotáctica de MCP-1. Los resultados del ensayo de quimiotaxis indican que los linfomonocitos provenientes de ganglios linfáticos drenantes del sitio de inmunización o de sangre periférica de ratas del grupo E migran por acción de la quemoquina MCP-1 (Tabla 2).



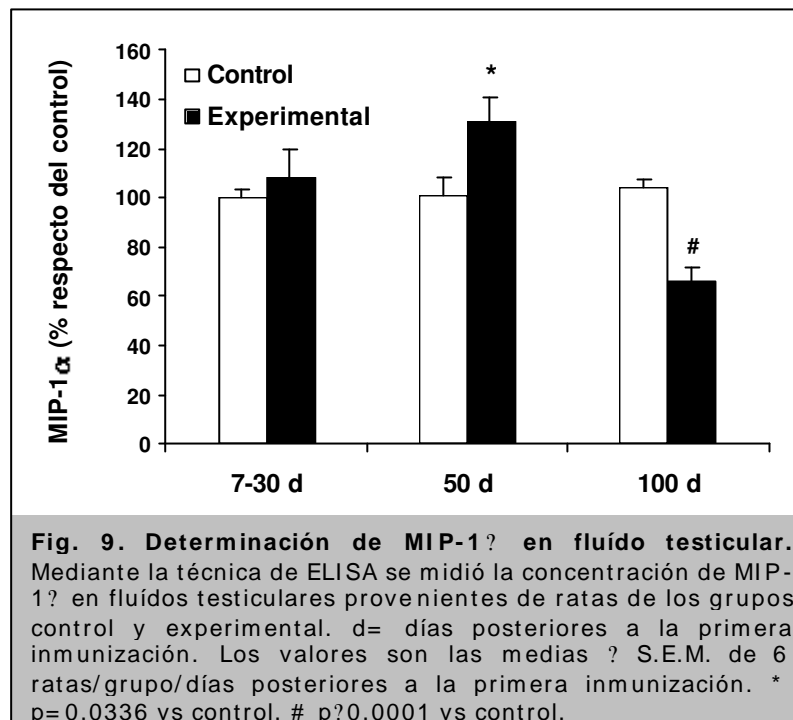
**Tabla 2. Ensayo de quimiotaxis de linfomonocitos de ganglios linfáticos y de sangre periférica**

Días*	Ganglio	Sangre
50	1,42 ± 0,18	1,46 ± 0,18
100	1,85 ± 0,73	2,50 ± 0,71

Los resultados son expresados como un índice de migración = número de células migradas en respuesta a MCP-1 / número de células migradas en respuesta al medio solo. Los valores representan las medias ± S.E.M. de 4 ratas/días posteriores a la primera inmunización. \* Días posteriores a la primera inmunización.

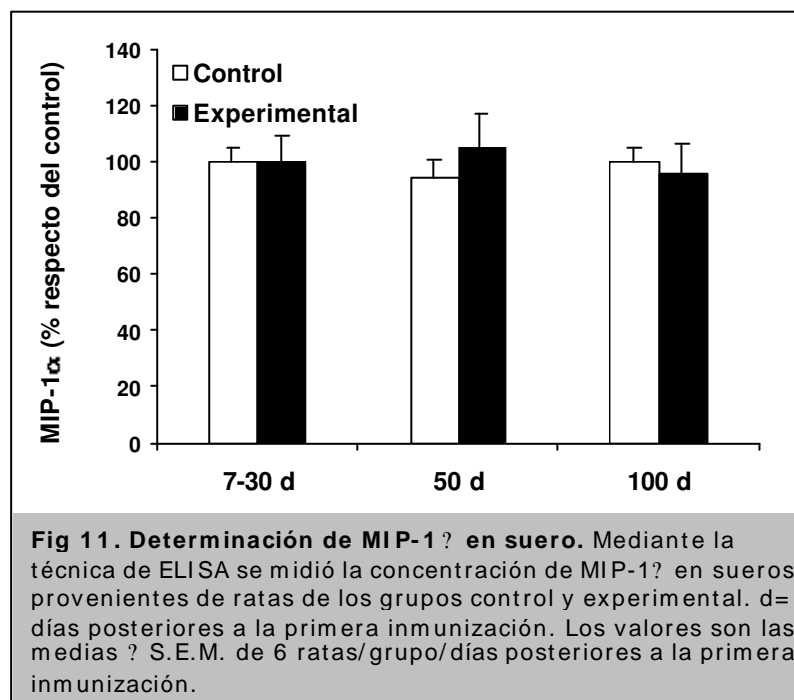
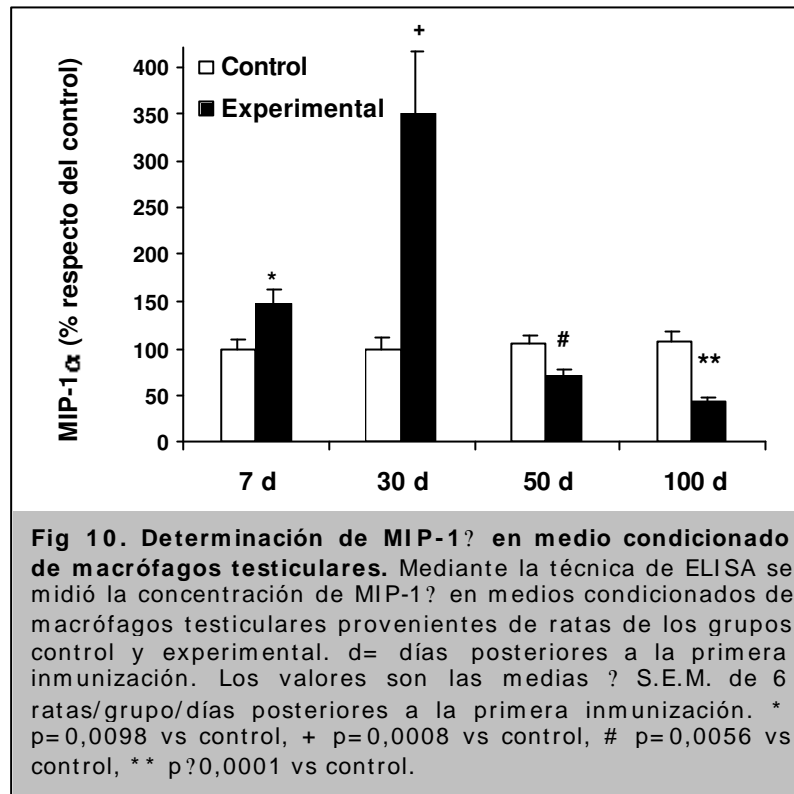
#### **Determinación de MIP-1?**

La concentración de MIP-1? fue medida por ELISA en FT, MCM testiculares y suero de ratas N, C y E. En el FT no se observaron diferencias significativas en la concentración de MIP-1? entre los grupos C y E a los 7-30d posteriores a la primera inmunización. Sin embargo a los 50 d, período en el cual aparecen los primeros túbulos sem iníferos lesionados, la concentración de MIP-1? aumenta en las ratas del grupo E en comparación con las del grupo C. Este aumento no se mantuvo a lo largo del tiempo y a los 100d se volvió a observar una menor concentración de la quemoquina en las ratas del grupo E en comparación con las del grupo C (Fig. 9). La concentración de MIP-1? medida en ratas del grupo N fue similar a la del grupo C (resultado no mostrado).



La concentración de MIP-1 $\alpha$  en MCM testiculares fue significativamente mayor en ratas del grupo E sacrificadas a los 7 y 30d en comparación con las ratas del grupo C ( $p=0,0098$  y  $p=0,0008$ , respectivamente). Por el contrario, a los 50 y 100d la concentración de MIP-1 $\alpha$  fue significativamente menor en las ratas del grupo E en comparación con las del grupo C ( $p=0,0056$  y  $p>0,0001$ , respectivamente) (Fig.10).

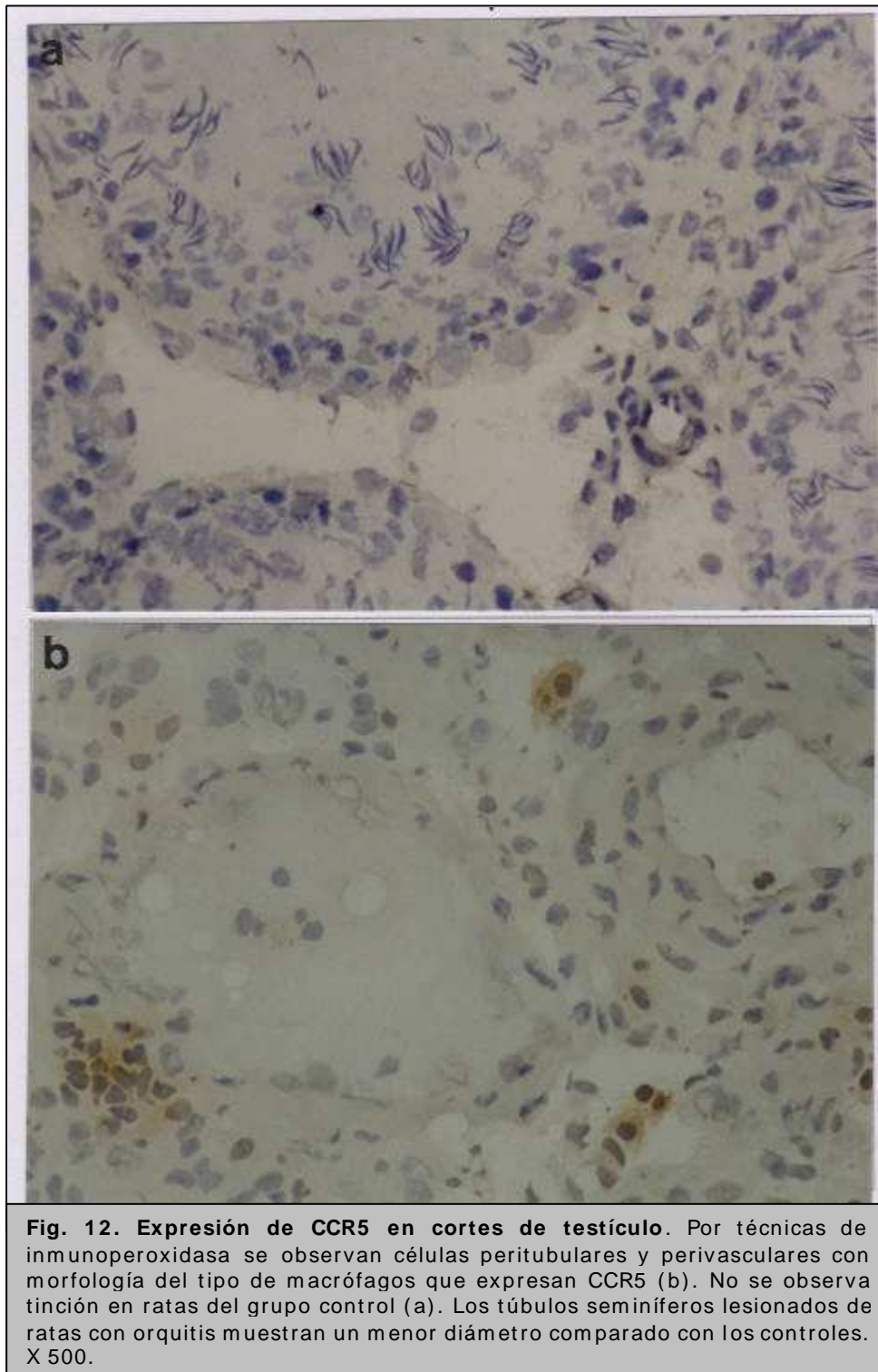
La concentración de MIP-1 $\alpha$  fue similar en los sueros provenientes de ratas C, E (Fig. 11) y N.



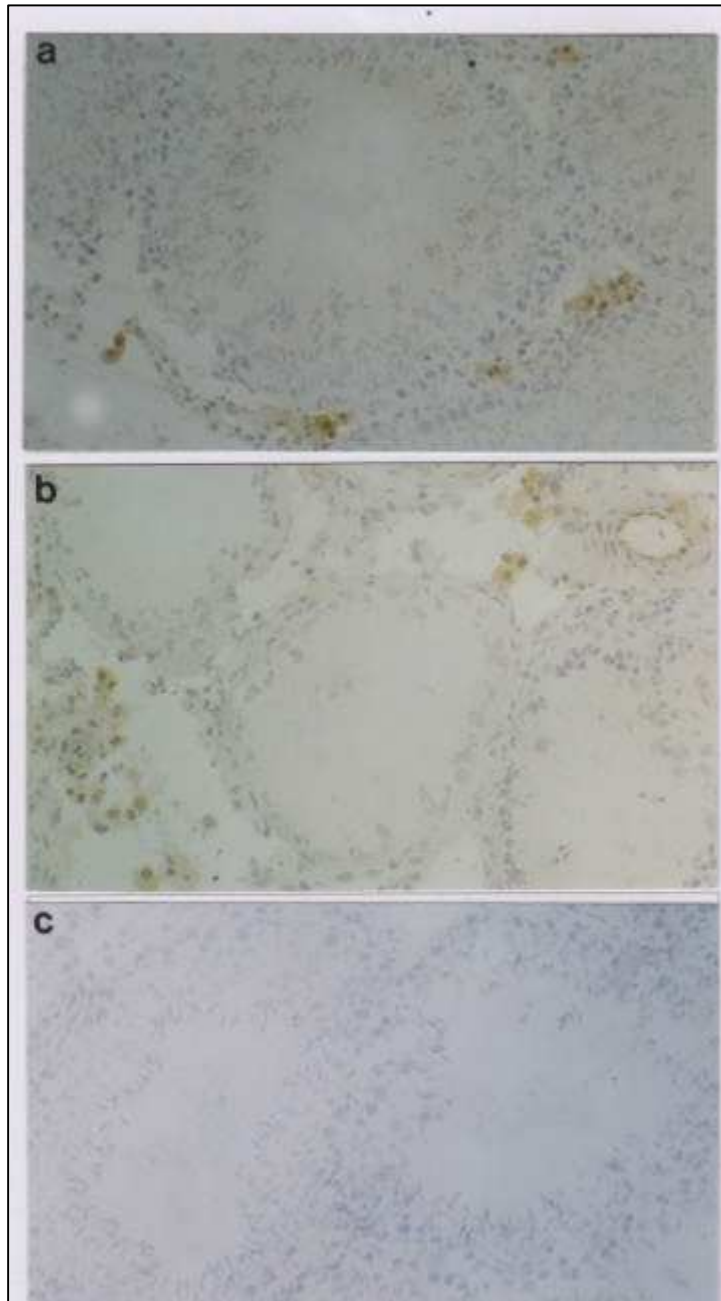
**¿Qué células expresan los receptores de la quemoquina MIP-1??**

CCR5 y CCR1 son los receptores de la quemoquina MIP-1?. Mediante técnicas inmunohistoquímicas, se estudió su expresión en cortes de crióstato de testículo de ratas de los grupos N, C y E. Los receptores CCR5 y CCR1 son expresados por células con morfología tipo macrófago presentes en el intersticio testicular (Fig. 12 y 13). Los controles realizados incubando los cortes con PBS o con una IgG normal en lugar del anticuerpo primario resultaron negativos.

El número de células CCR5+ de las ratas del grupo E aumentó con respecto al grupo control desde el período 7-30d llegando a incrementos significativos a los 50-100d (Tabla 3).



**Fig. 12. Expresión de CCR5 en cortes de testículo.** Por técnicas de inmunoperoxidasa se observan células peritubulares y perivasculares con morfología del tipo de macrófagos que expresan CCR5 (b). No se observa tinción en ratas del grupo control (a). Los túbulos seminíferos lesionados de ratas con orquitis muestran un menor diámetro comparado con los controles. X 500.



**Fig. 13. Expresión de CCR1 en cortes de crióstato de testículo.** Se observa un número similar de células con morfología del tipo de macrófagos que expresan CCR1 en el intersticio testicular de ratas con orquitis (100 d) (b) y de ratas controles (a). No se observó tinción cuando se incubaron los cortes con PBS (c). Técnica de inmunoperoxidasa, X 250.

Tabla 3. Número de células CCR5+/ testículo (x10<sup>6</sup>)

Días*	Normal	Control	Experimental	Lesión Testicular	
				Control	Experimental
	0,58 ± 0,12			-	-
7-30		0,46 ± 0,09	1,53 ± 0,14 <sup>a, b</sup>	-	-
50		0,92 ± 0,25	2,63 ± 0,42 <sup>c, d</sup>	-	±
100		0,88 ± 0,38	4,87 ± 0,24 <sup>e, f</sup>	-	+ / ++

El recuento celular fue realizado en cortes de crióstato de testículo de 4 ratas/grupo/días posteriores a la primera inmunización. El daño testicular fue evaluado como ?, + y ++ indicando focos aislados, numerosos focos o grandes áreas de túbulos seminíferos con descamación de células germinales, respectivamente. Los valores son las medias ± S.E.M. <sup>a</sup> p=0,0008 vs normal, <sup>b</sup> p?0,0001 vs control 7-30 días, <sup>c</sup> p=0,0089 vs control 50 días, <sup>d</sup> p?0,0001 vs normal, <sup>e</sup> p?0,0001 vs control 100 días y normal, <sup>f</sup> p=0,0007 vs experimental 50 días. \* Días posteriores a la primera inmunización.

Por el contrario, no se observan diferencias en el número de células CCR1+ en los diferentes grupos estudiados (Tabla 4).

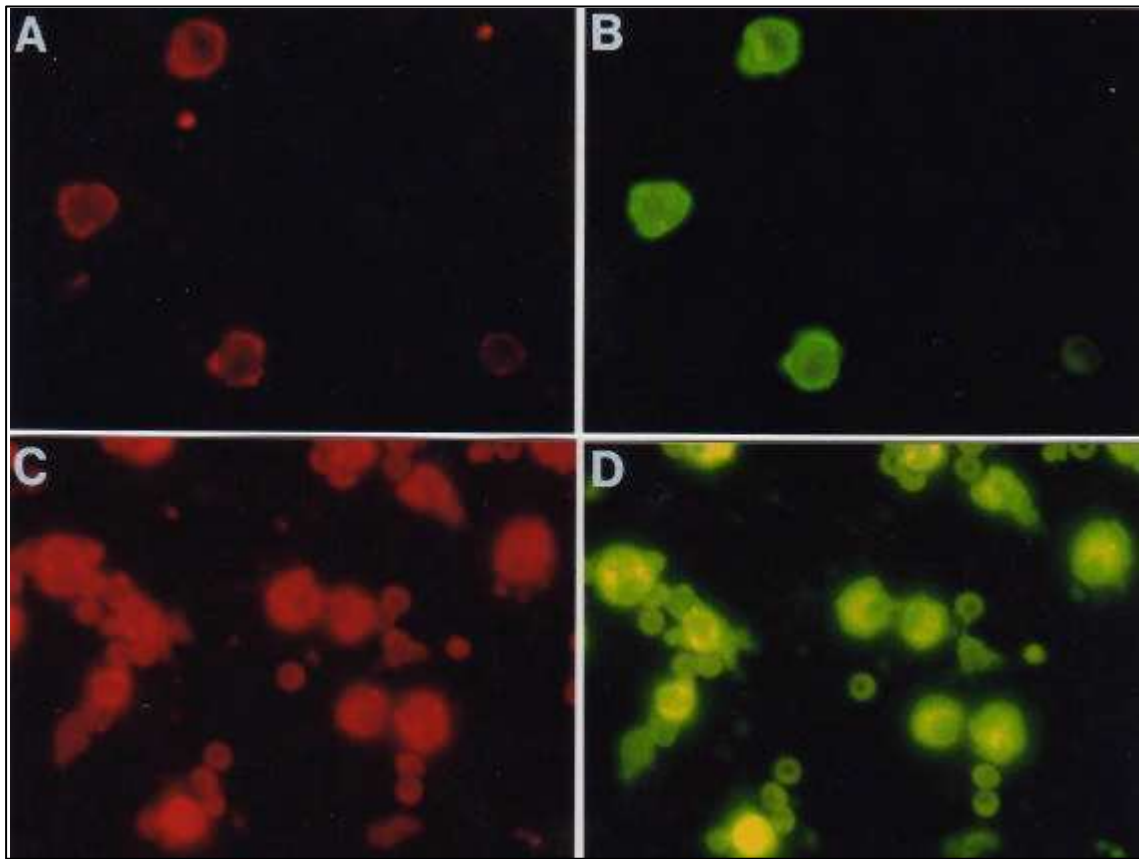
Tabla 4. Número de células CCR1+/ testículo (x10<sup>6</sup>)

Días*	Normal	Control	Experimental	Lesión Testicular	
				Control	Experimental
	2,73 ± 0,24			-	-
7-30		1,77 ± 0,186	1,91 ± 0,21	-	-
50		2,45 ± 0,30	2,10 ± 0,20	-	±
100		3,13 ± 0,33	2,77 ± 0,20	-	+ / ++

El recuento celular fue realizado en cortes de crióstato de testículo de 4 ratas/grupo/días posteriores a la primera inmunización. El daño testicular es evaluado como ?, + y ++ indicando focos aislados, numerosos focos o grandes áreas de túbulos seminíferos con descamación de células germinales, respectivamente. Los valores son las medias ± S.E.M. \* Días posteriores a la primera inmunización.

Para identificar las subpoblaciones de macrófagos testiculares ED1 o ED2 que expresan CCR5 y CCR1 se realizó en muestras de macrófagos aislados una técnica de inmunofluorescencia doble. Se observó que la mayoría de los macrófagos ED1+ o ED2+ expresaban CCR5 (Fig. 14) o CCR1 (datos no mostrados).





**Fig.14. Expresión de CCR5 en macrófagos testiculares.** Técnica de inmunofluorescencia doble: un anticuerpo secundario conjugado con FITC fue utilizado para identificar células ED1+ o ED2+ y otro, conjugado con rodamina, para detectar CCR5. Todos los macrófagos ED1+ (D) o ED2+ (B) aislados de ratas con orquitis autoinmune expresan CCR5 (A, C). X 900.

### Quimiotaxis de linfomonocitos en respuesta a MIP-1?

Los resultados del ensayo de quimiotaxis indican que los linfomonocitos provenientes de ganglios linfáticos drenantes del sitio de inmunización o de sangre periférica de ratas del grupo E migran por acción de la quemoquina MIP-1?. El índice de migración es levemente mayor en las ratas con orquitis severa (100d) en comparación con las ratas con orquitis focal (50d) (Tabla 5).

**Tabla 5. Ensayo de quimiotaxis de linfomonocitos de ganglios linfáticos y de sangre periférica**

Días*	Ganglio	Sangre
50	1,23 ± 0,27	1,51 ± 0,30
100	2,69 ± 0,42	2,19 ± 0,56

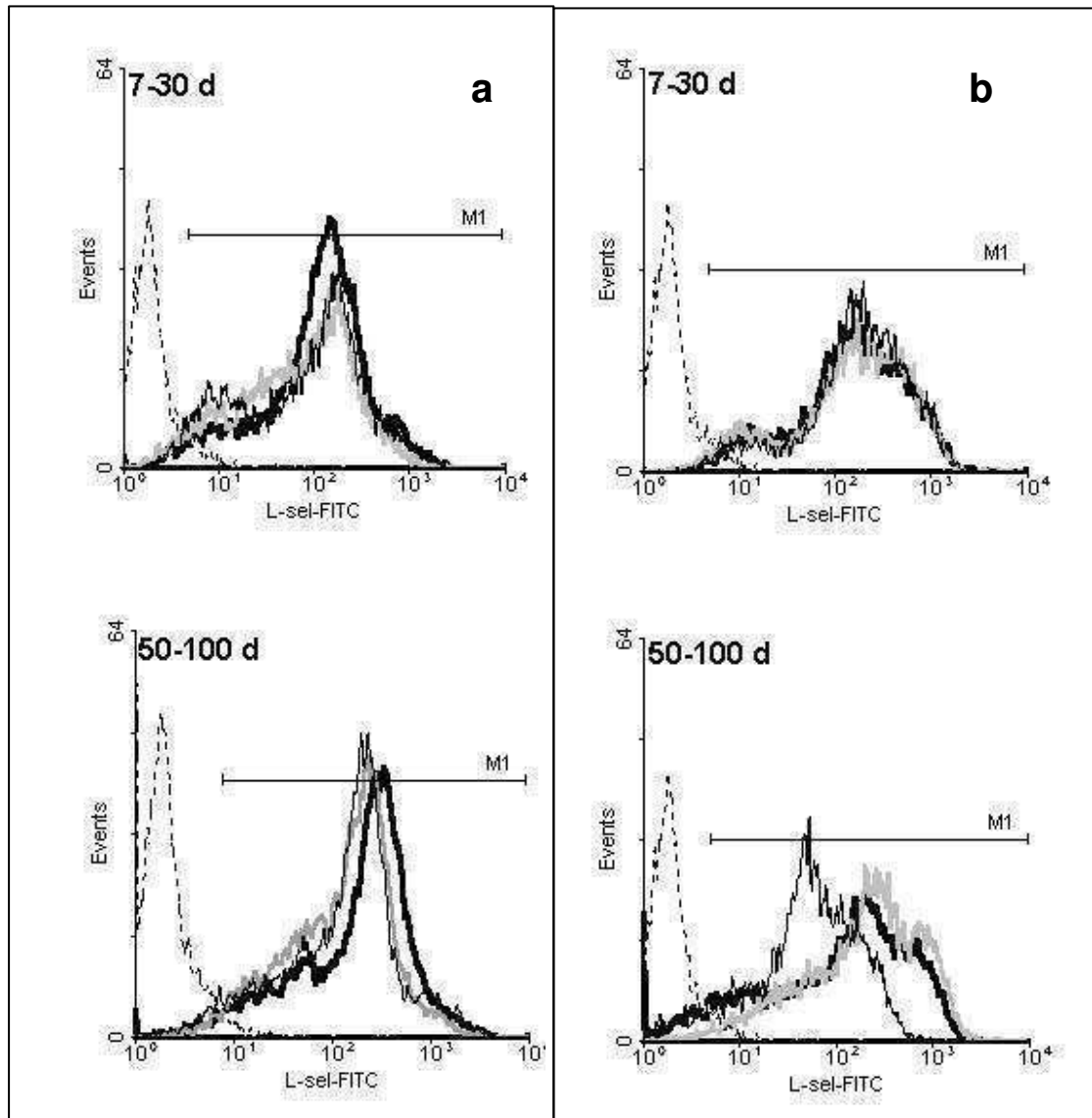
Los resultados son expresados como un índice de migración = número de células migradas en respuesta a MIP-1? / número de células migradas en respuesta al medio solo. Los valores representan las medias ± S.E.M. de 4 ratas/días posteriores a la primera inmunización. \* Días posteriores a la primera inmunización.

### **Moléculas de adhesión**

Las quemoquinas y las moléculas de adhesión juegan un papel importante en el proceso de migración y extravasación leucocitaria durante el desarrollo de un cuadro inflamatorio. La interacción leucocito-endotelio ocurre a través de una cascada de eventos en los cuales distintas familias de moléculas de adhesión están involucradas. Por lo tanto, decidimos estudiar las moléculas L-selectina, CD44, VCAM-1 y PECAM-1.

### **Expresión de L-selectina en linfomonocitos de sangre periférica y ganglios linfáticos**

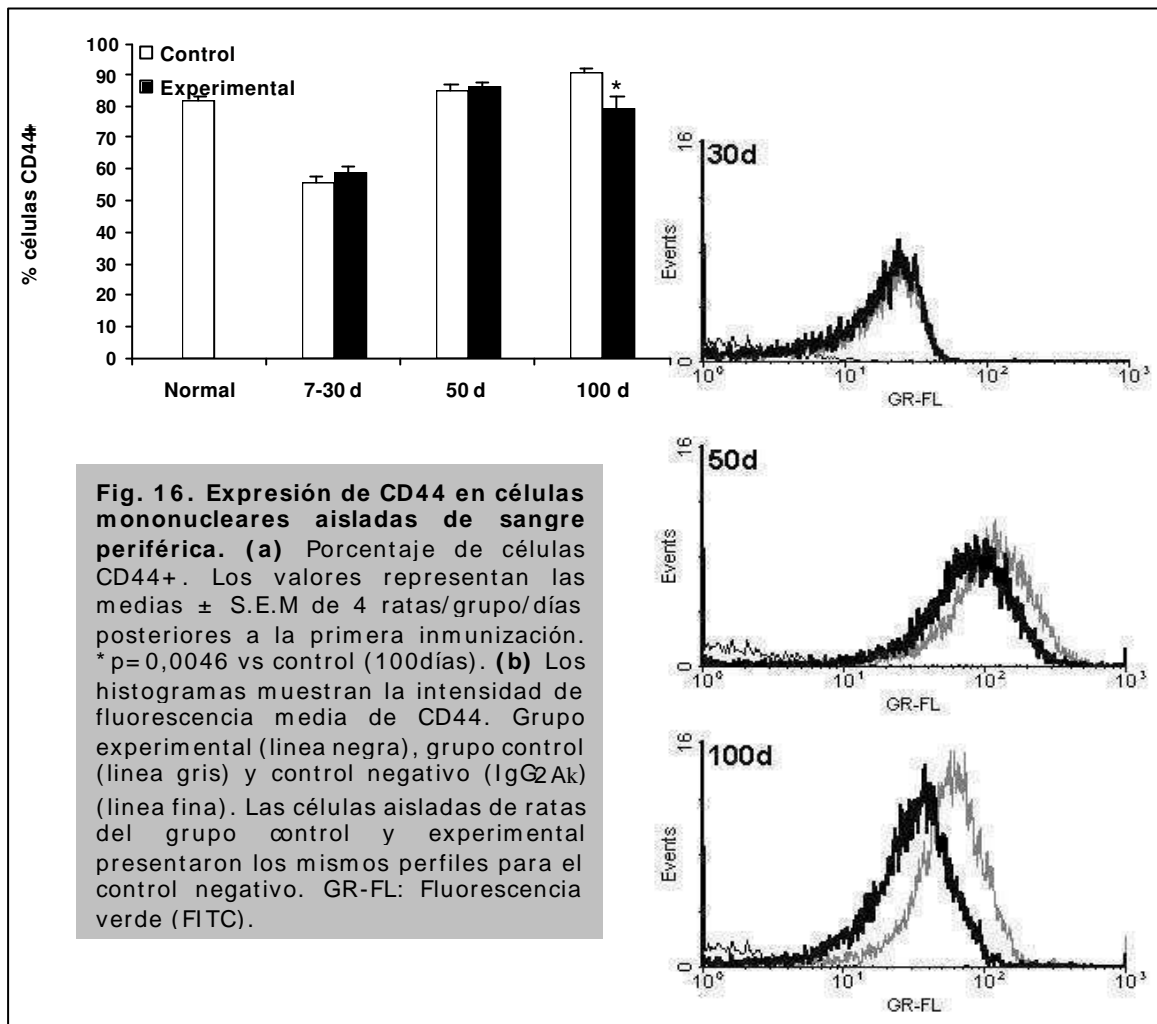
Aproximadamente el 90% de las células mononucleares aisladas de sangre y ganglios linfáticos de ratas de los grupos N, C y E expresan la molécula de adhesión L-selectina. Mediante citometría de flujo, observamos en los linfomonocitos aislados de sangre una similar intensidad de fluorescencia media al comparar los grupos N, C y E. Este mismo resultado se obtuvo tanto al compararse los grupos durante el período de inmunización (7-30 d) como durante el período de orquitis (50-100 d) (Fig. 15a). Similar perfil de expresión de L-selectina se observa en las células aisladas de ganglios linfáticos drenantes del sitio de inmunización (Fig. 15b).

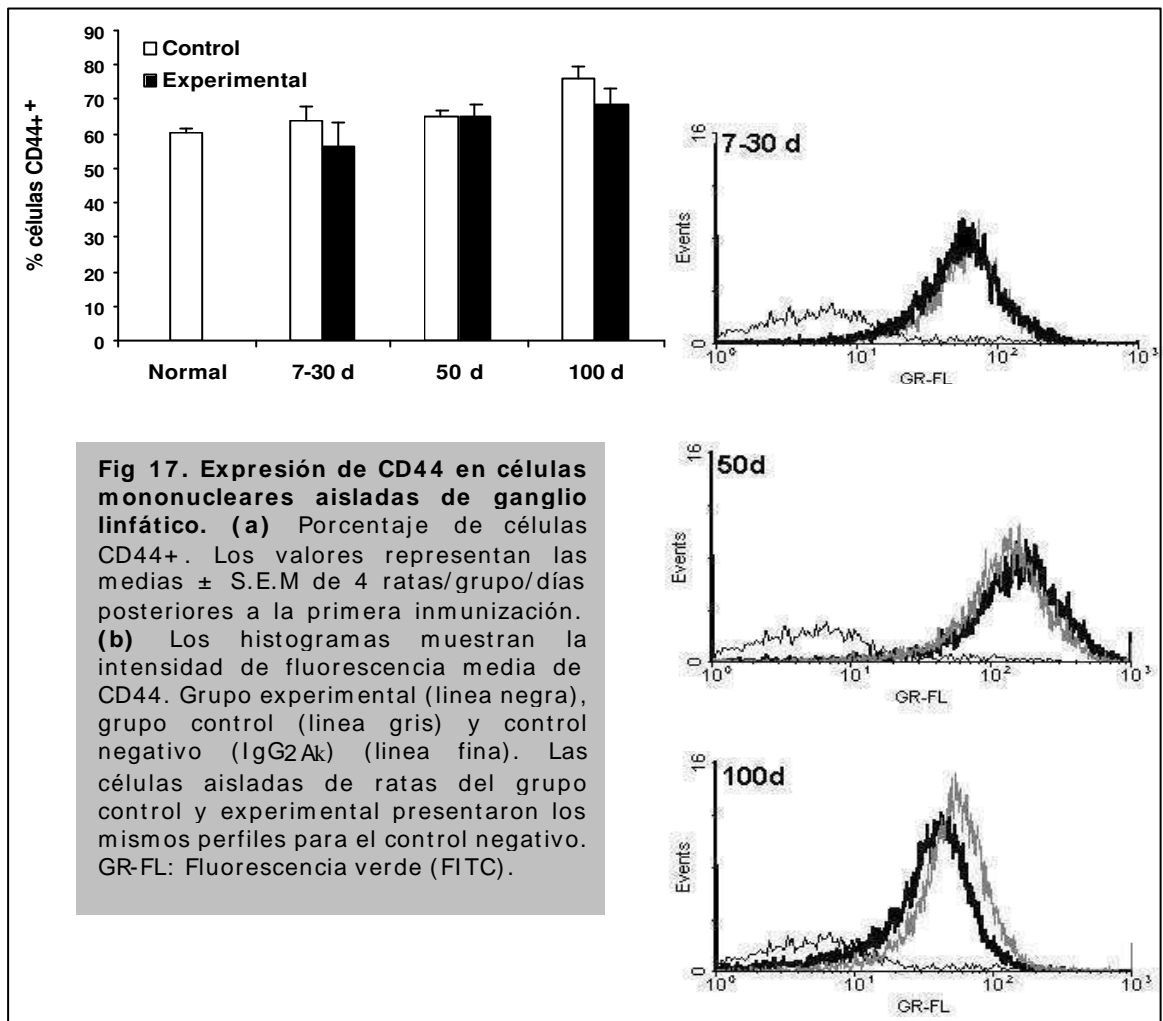


**Fig 15. Expresión de L-selectina por citometría de flujo.** Los histogramas muestran la intensidad de fluorescencia media de L-selectina. Grupo experimental (línea negra), grupo control (línea gris), grupo normal (línea fina) y control negativo (IgG1k) (línea punteada).

### **Expresión de CD44 en linfomonocitos de sangre periférica y de ganglios linfáticos**

Mediante la técnica de citometría de flujo, se estudió la expresión de la molécula CD44 en las células mononucleares de sangre periférica y de ganglios linfáticos drenantes del sitio de inmunización. Como se muestra en la Fig. 16 y 17, la molécula CD44 se expresa sobre la superficie de los linfomonocitos aislados de sangre y de ganglio de ratas N, C y E sacrificadas a diferentes días posteriores a la primera inmunización. Un aumento en la intensidad de la fluorescencia media fue observado en los grupos C y E después de finalizar el período de inmunización y una vez iniciado el daño testicular en comparación con las ratas sacrificadas a los 7-30 días (Fig. 16b y Fig. 17b). Una disminución en el número y en la intensidad de fluorescencia media de los linfomonocitos CD44+ de sangre fue observada en las ratas con orquitis severa en comparación con las ratas del grupo C (Fig. 16a y 17b). El perfil de expresión de CD44 en linfomonocitos aisladas de ganglio linfático fue similar al obtenido en sangre (Fig. 17a y b).



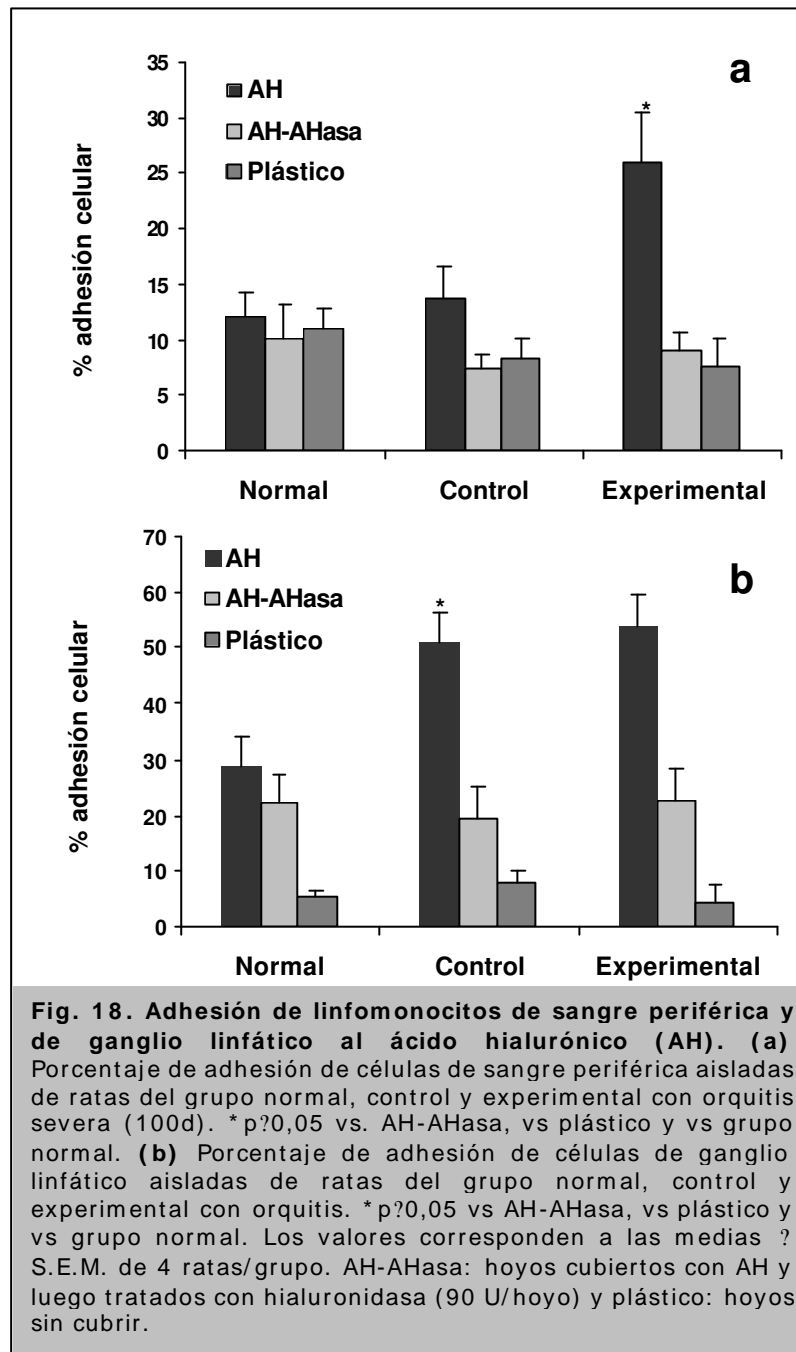


---

### **Los linfomonocitos de sangre periférica y de ganglio linfático se adhieren al ácido hialurónico**

Con el objetivo de investigar la funcionalidad de la molécula CD44 expresada por los linfomonocitos de sangre periférica y de ganglios linfáticos, se analizó la capacidad de dichas células de interactuar con el AH. Los linfomonocitos de sangre y de ganglio linfático de las ratas del grupo E presentaron un mayor porcentaje de adhesión al AH en comparación con las del grupo N ( $p=0,032$  y  $p=0,019$  respectivamente) (Fig. 18). A su vez los linfomonocitos de sangre del grupo E mostraron un mayor porcentaje de adhesión en comparación con los del grupo C (Fig. 18a). Por el contrario, no se observaron diferencias en el porcentaje de adhesión de las células de ganglios linfáticos al comparar el grupo E y C (Fig. 18b). Para determinar la especificidad de dicha unión, se evaluó la capacidad de las células de unirse al AH tratado con hialuronidasa o al plástico sin tratar. Como se muestra en la Fig. 18, la hialuronidasa bloqueó eficientemente la adhesión de las células de los grupo C y E al AH, no así la adhesión de las células del grupo N. Por otra parte, las células del grupo E mostraron una adhesión significativamente mayor al AH en comparación con la adhesión al plástico (sangre:  $p=0,016$  y ganglio:  $p=0,029$ ).





### Se modifica el número de células CD44+ en el testículo durante el desarrollo de la OAE?

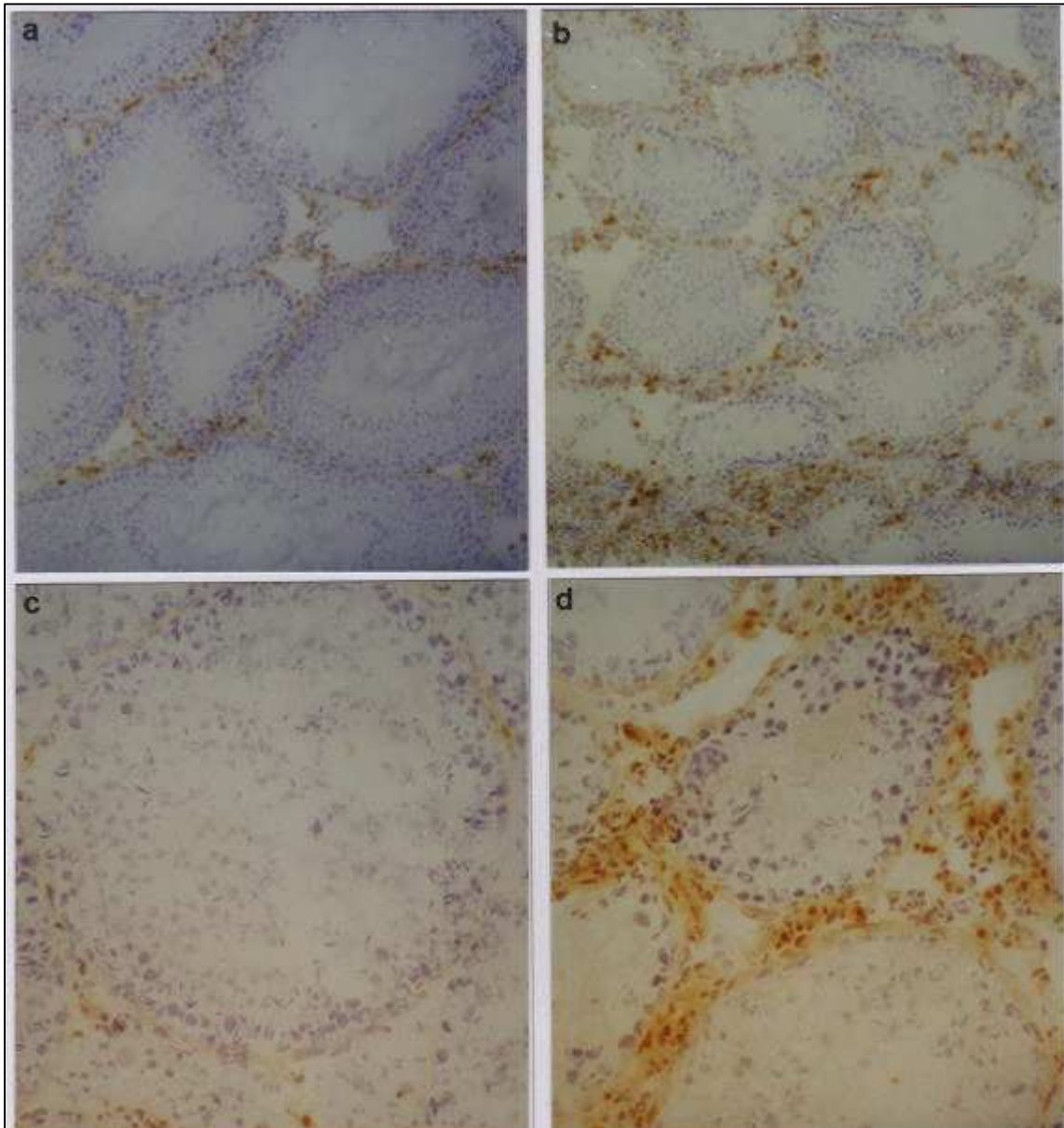
En cortes de testículo, se observaron linfomonocitos CD44+ en el intersticio testicular, en áreas perivasculares o en el lumen de los vasos sanguíneos. No se detectaron células positivas en el interior de los túbulos seminíferos (Fig.19 y 20). Los controles realizados incubando los cortes con PBS o con una IgG de ratón en lugar del anticuerpo primario resultaron negativos.

El recuento de dichas células (Tabla 6), indica que no existen diferencias en el número de células marcadas comparando el grupo N y C. En cambio, el número de células CD44+ observado en las ratas con orquitis severa sacrificadas a los 100 días fue significativamente mayor en comparación con el observado en las ratas C. El aumento en el número de linfomonocitos CD44+ se asocia con un mayor grado de daño testicular.

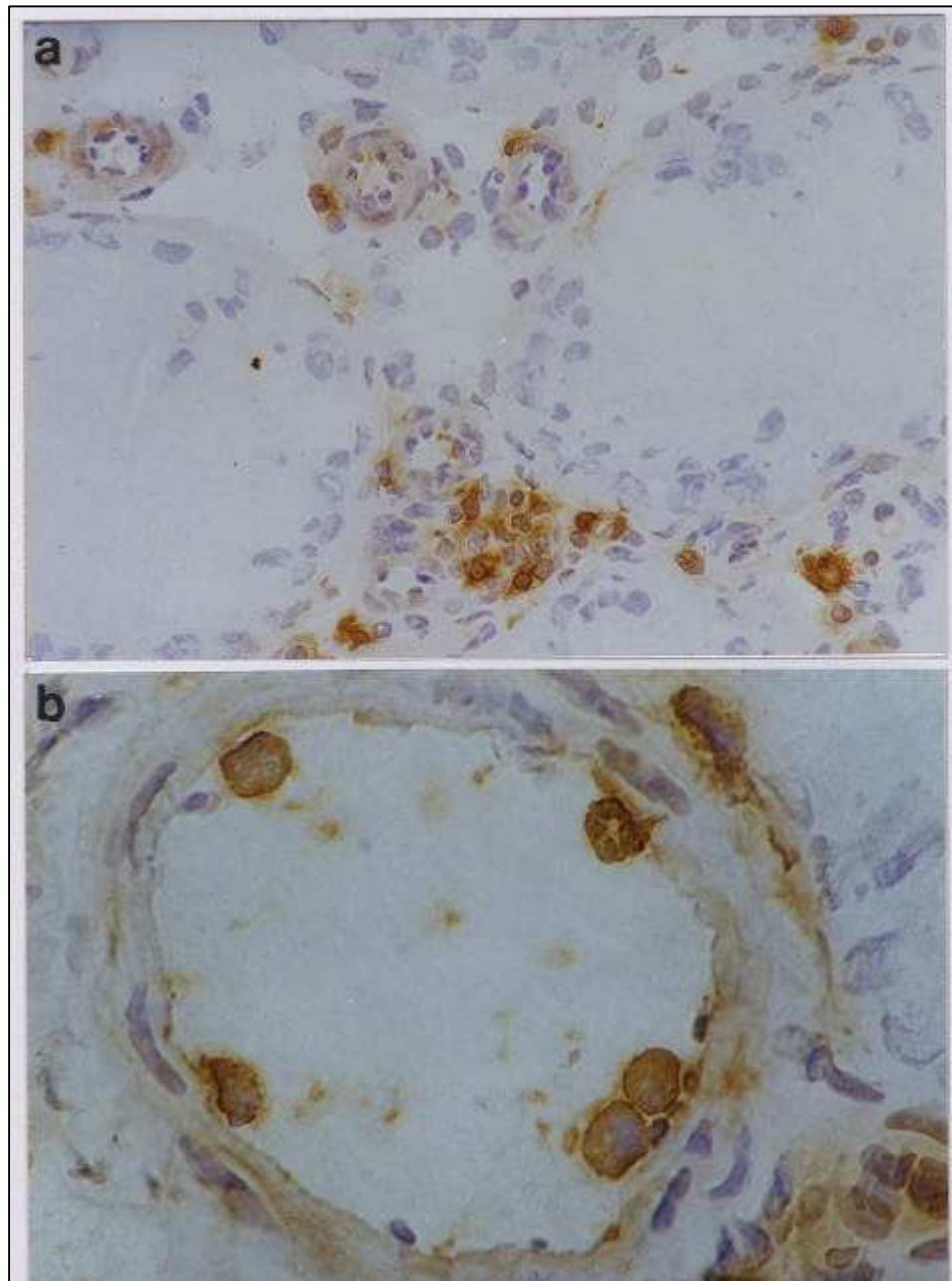
**Tabla 6. Número de células CD44+ / testículo (x 10<sup>6</sup>)**

Días*	Normal	Control	Experimental	Lesión Testicular	
				Control	Experimental
	1,03 ± 0,05			-	-
7-30		0,75 ± 0,22	0,94 ± 0,08	-	-
50		1,13 ± 0,07	1,43 ± 0,11	-	±
100		1,59 ± 0,15	3,54 ± 0,83 <sup>a,b,c</sup>	-	+ / ++

El recuento celular fue realizado en cortes de crióstato de testículo de 3 ratas/grupo/días posteriores a la primera inmunización. El daño testicular es evaluado como ?, + y ++ indicando focos aislados, numerosos focos o grandes áreas de túbulos seminíferos con descamación de células germinales, respectivamente. Los valores representan las medias ± S.E.M. <sup>a</sup>p=0,013 vs control, <sup>b</sup>p=0,0043 vs normal y <sup>c</sup>p?0,005 vs experimental 50 días. \* Días posteriores a la primera inmunización.



**Fig. 19. Expresión de CD44 en cortes de testículo.** Se observa un mayor número de células CD44+ en el intersticio testicular de las ratas del grupo experimental (b y d) en comparación con las ratas del grupo control (a y c) sacrificadas a los 100 días posteriores a la primera inmunización. A igual aumento, los diámetros de los túbulos seminíferos de las ratas del grupo experimental son menores a los de las ratas del grupo control debido a la pérdida de células germinales. Técnica de inmunoperoxidasa. a y b: X 64, c y d: X 130.



**Fig. 20. Expresión de CD44 en cortes de testículo.** Se observan linfomonocitos CD44+ en el intersticio testicular, dentro de los vasos sanguíneos (b) o distribuidos en la zona peritubular y perivascular (a) de ratas del grupo experimental sacrificadas a los 100 días posteriores a la primera inmunización. Técnica de inmunoperoxidasa. a: X 260 y b: X 650.

---

### **Expresión de PECAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales testiculares**

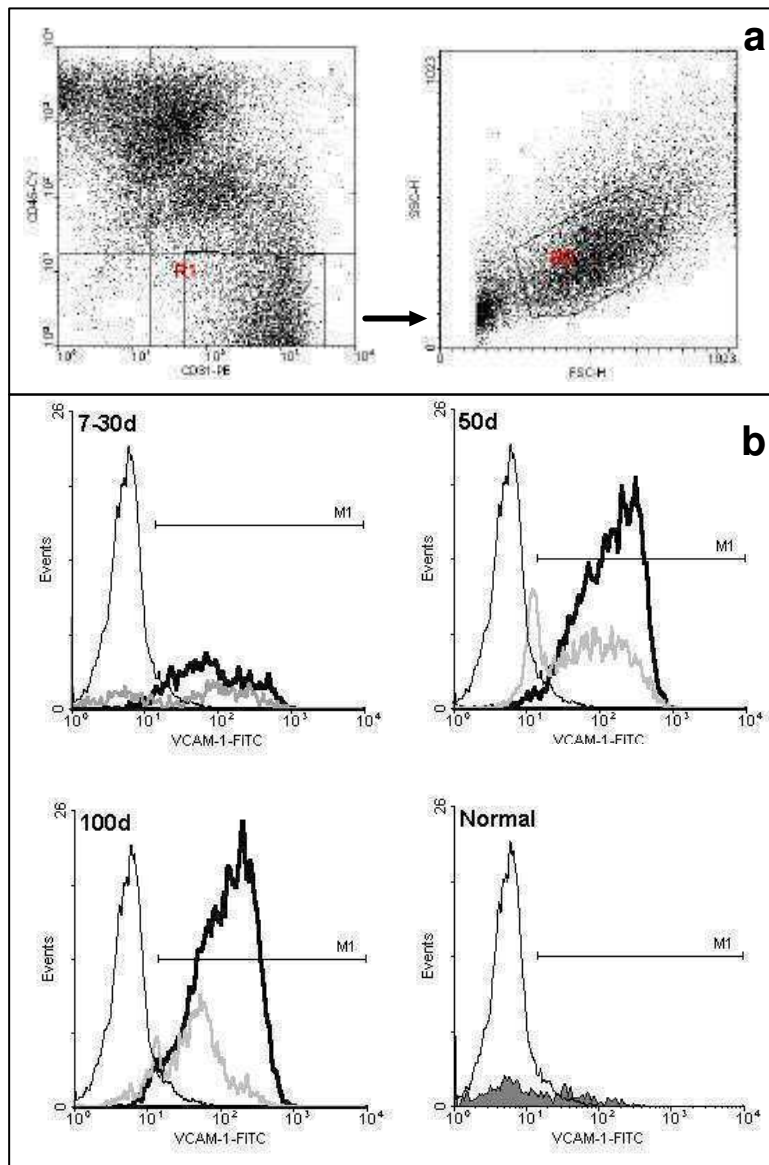
Para que el proceso de migración y extravasación tenga lugar es necesaria la interacción leucocito-endotelio. Una vez estudiados MCP-1 y MIP-1 ? como quimioattractantes de los linfomonocitos que invaden el intersticio testicular y la expresión de la molécula CD44 involucrada en la extravasación de los mismos, resta abordar la participación del endotelio de la microvasculatura testicular. El objetivo fue estudiar la expresión de VCAM-1 y PECAM-1 en las células endoteliales del testículo de los grupos N, C y E a diferentes tiempos posteriores a la primera inmunización.

Dado que el número de células endoteliales es reducido en comparación con el resto de las células intersticiales, se decidió trabajar con una suspensión celular enriquecida en dichas células mediante la metodología de inmunoseparación magnética. La estrategia empleada fue aislar las células endoteliales por selección positiva ya que las mismas expresan PECAM-1. Al analizar por citometría de flujo la fracción positiva de la inmunoseparación corroboramos que el anticuerpo anti-rata PECAM-1 se unía a linfocitos y monocitos (Fig. 21a), por lo tanto se decidió analizar la expresión de VCAM-1 y PECAM-1 en la subpoblación celular PECAM-1+ CD45- (región R1 de la Fig. 21a).

Se observó que el porcentaje de células PECAM-1+ CD45- es mayor en las ratas del grupo C y E en comparación con las ratas del grupo N en los diferentes tiempos estudiados. Dicho porcentaje es similar entre las ratas del grupo C y E durante el período de inmunización (7-30 d). Por el contrario, las

ratas del grupo E presentan un mayor porcentaje de células endoteliales en comparación con las ratas del grupo C a los 50 d posteriores a la primera inmunización siendo esta diferencia significativamente mayor en el tiempo de orquitis severa (100 d).

Al analizar la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales del intersticio testicular se observó que las ratas con orquitis severa expresan VCAM-1 con una intensidad de fluorescencia media mayor en comparación con las ratas del grupo C. Por el contrario, durante el período de inmunización la expresión de dicha molécula en los grupos C y E es similar. A su vez, la mayoría de células endoteliales provenientes de ratas del grupo N no expresan la molécula de adhesión VCAM-1 (Fig. 21b).



**Fig. 21. Expresión de VCAM-1 en células endoteliales testiculares.** a) Gráfico de puntos que muestra la región R1 correspondiente a la subpoblación PECAM-1+ CD45-. R2 muestra el tamaño vs complejidad celular de la subpoblación R1. b) Los histogramas muestran la intensidad de fluorescencia media de VCAM-1. Grupo experimental (línea negra), grupo control (línea gris) y control negativo (IgG1k) (línea fina).

**Discusión**



La **orquitis autoinmune**, modelo experimental útil para estudiar autoinmunidad específica de órgano, se caracteriza por un infiltrado linfomonocitario en el intersticio testicular y un daño de los túbulos seminíferos, que presentan apoptosis y descamación de las células germinales. La lesión inicialmente focal se extiende a todo el órgano y lleva a la esterilidad.

En este trabajo de Tesis nos propusimos determinar **los factores que facilitan el reclutamiento de los leucocitos al intersticio testicular** durante el desarrollo de la orquitis autoinmune. Con ese fin se estudió el papel de las principales quemoquinas y moléculas de adhesión comprometidas en la migración y extravasación de linfomonocitos al órgano huésped.

Debido que las células predominantes del infiltrado intersticial en la OAE son los monocitos, macrófagos y linfocitos se estudiaron MCP-1 y MIP-1?, quemoquinas de la familia C-C involucradas en la quimiotaxis de estas células. Se conoce que MCP-1 y MIP-1? son eficientes atrayentes de monocitos, macrófagos, linfocitos T CD4+ y CD8+ activados y células dendríticas. Dado que la interacción entre quemoquinas y moléculas de adhesión celular es relevante en el desarrollo de los cuadros inflamatorios, se analizó también el papel de L-selectina, CD44, PECAM-1 y VCAM-1 durante el desarrollo de la orquitis autoinmune.

### **Quemoquinas**

La escasa información existente acerca de la acción de las **quemoquinas** en el testículo proviene fundamentalmente de trabajos *in vitro*, en los cuales se estudia la influencia de quemoquinas sobre el comportamiento

de distintos tipos celulares testiculares, evaluando su acción a tiempos cortos (Aubry y col., 2000 ; Le Goffic y col., 2002). Nos interesaba saber el efecto de las mismas *in vivo* y por largos períodos de tiempo para evaluar su acción en un cuadro de inflamación crónica como es la orquitis autoinmune.

Los resultados indican que los animales del grupo C que recibieron solución salina y adyuvantes presentan un mayor contenido, a nivel sistémico y testicular, de quemoquinas que el grupo de animales N, no tratados. Se ha descrito (Ishii y col., 2005) que distintos tipos de adyuvantes y, en particular el AFC, inducen la expresión de numerosos genes de las células dendríticas que facilitan la presentación antigénica y la liberación de quemoquinas y citoquinas. Comparando los datos de concentración sérica de quemoquinas del grupo C y del grupo E observamos que no hay diferencias. Las quemoquinas ejercen sus efectos atractantes sólo cuando se expresan localmente y en bajas concentraciones. Se ha demostrado que las quemoquinas administradas sistémicamente antagonizan los efectos locales (Rollins, 1997). Los datos obtenidos demuestran que durante el período de inmunización (7-30 días después de la primera inmunización) y hasta los 50 días, hay un aumento de ambas quemoquinas a nivel testicular. Cuando la lesión es severa (80-100 días) existe un comportamiento distinto, mientras el contenido de MCP-1 sigue aumentado respecto del grupo C, hay una disminución en el contenido de MIP-1?. Se interpreta que en la etapa inicial, inductora, son necesarias ambas quemoquinas. Nuestros resultados concuerdan con los de Szekanecz y col. (2001) quienes observaron , en un modelo experimental de artritis en la rata, un aumento inicial de MIP-1? que precede los síntomas clínicos y que está

asociado a los fenómenos inflamatorios tempranos mientras que MCP-1 continúa involucrada en la fase más tardía de la enfermedad. Estos mismos autores describen (2004) que MCP-1 tendría también un papel angiogénico. En el modelo de OAE nosotros hemos observado un incremento de los vasos testiculares de pequeño calibre.

Ciertas citoquinas pro-inflamatorias como la IL-6 y el TNF- $\alpha$  estimulan la síntesis de quemoquinas por parte de macrófagos y monocitos (Aubry y col., 2000). En nuestro laboratorio hemos demostrado que durante el desarrollo de la OAE hay un aumento en el contenido de TNF- $\alpha$  (Suescun y col., 2003) y IL-6 (Rival y col., 2006) en el MCM testiculares. La IL-6 es sintetizada principalmente por los monocitos provenientes de la circulación (macrófagos ED1+), aunque otras células testiculares también expresan dicha citoquina (células de Leydig y células peritubulares).

En forma similar a lo descrito por Hedger y col. (2002b) quienes inducen inflamación testicular con la administración de LPS *in vivo*, en la OAE el reclutamiento de nuevos monocitos y macrófagos en el intersticio testicular altera la composición normal de las subpoblaciones de macrófagos (Suescun y col., 2003). Los macrófagos testiculares constituyen una población heterogénea con distintas funciones. Se ha sugerido que los macrófagos ED1+ mantienen el perfil pro-inflamatorio de los monocitos circulantes mientras que los macrófagos ED2+ dependen del microambiente testicular y exhiben un perfil anti-inflamatorio. Se ha demostrado también que células ED1+ pueden adquirir la inmunoreactividad de ED2 característica de los macrófagos residentes. Se ha sugerido (Wang y col., 1994) y nosotros lo hemos

demostrado también (Suescun y col., 2003) que existen, en el testículo, macrófagos ED1+, ED2+, hecho que indicaría la transformación, en el microambiente testicular, de monocitos circulantes a macrófagos residentes.

Durante el desarrollo de la OAE el número de células ED1+ y ED2+ se incrementa en proporciones similares (Suescun y col., 2003). Los resultados del presente trabajo demuestran que MCP-1 es expresado fundamentalmente por los macrófagos ED1+ mientras que la expresión de dicha quemoquina por las células ED2+ es menor. Estos resultados son similares a los observados por Gerdprasert y col. (2002a) en ratas inyectadas con LPS.

Dado que el anticuerpo ED1 también identifica células dendríticas nos pareció interesante identificar estas células con algún marcador apropiado (OX62) a efectos de determinar, por técnicas de inmunofluorescencia doble, si dichas células expresaban MCP-1 y su receptor. Resultados previos de nuestro laboratorio (Rival y col., 2006) demostraron un significativo aumento del número de células dendríticas en el testículo de ratas con orquitis respecto de ratas del grupo N y C. En este trabajo detectamos que dichas células dendríticas expresan MCP-1 y CCR2. Sozzani y col. (2005) describieron que las células dendríticas son una importante fuente *in vivo* e *in vitro* de quemoquinas y que la producción de las mismas aumenta durante el proceso de maduración celular. La interacción de las células dendríticas con las quemoquinas es vital para su normal funcionamiento. Las células dendríticas inmaduras expresan los receptores CCR1, CCR2, CCR5 y CCR6. El proceso de maduración de las mismas se asocia a una disminución de dichos receptores y un aumento en la expresión de CCR7 (Mantovani y col., 1998).

Además de macrófagos y células dendríticas, hemos observado, por inmunohistoquímica, que MCP-1 se expresa con una intensidad muy baja en otras células somáticas del testículo N como las células endoteliales, peritubulares y de Leydig mientras que las células germinales son negativas. A diferencia de los animales del grupo N, no tratado, y del grupo C, los animales con orquitis mostraron una franca expresión de MCP-1 en células de Leydig y peritubulares. Esto se acompañó de un aumento del contenido de MCP-1 en el MCM testiculares y en el fluido testicular (producto de factores liberados por las células del intersticio). En este último compartimento, según Gerdprasert y col. (2002a), existe una concentración preferencial de MCP-1. Esta quemoquina presente en los animales N podría mantener la población de macrófagos normales. Hemos observado además una fuerte expresión de MCP-1 en la zona perinuclear de las células de Sertoli en los túbulos seminíferos de ratas con OAE. Aubry y col. (2000) detectaron expresión de MCP-1 en células de Sertoli de ratas normales prepúberes, sólo por RT-PCR (y no por Northern blot y ELISA), dato que sugiere que dichas células expresan la quemoquina en muy bajas concentraciones. No sabemos si la expresión de MCP-1 es distinta en ratas prepúberes y adultas. A su vez, Le Goffic y col. (2002) demostraron, por la técnica de ELISA, la presencia de MCP-1 en el medio condicionado de cultivo de células de Sertoli que habían sido expuestas al virus Sendai. Los mismos autores demostraron en experimentos *in vitro*, que luego de la infección viral las células peritubulares fueron las que más sintetizaron MCP-1. Esto indicaría que en dos situaciones experimentales una inducida *in vitro* (virus Sendai) y otra *in vivo* (OAE) habría un incremento de la síntesis de MCP-1 por parte de

las células somáticas (y no de las células germinales). Este aumento de la quemoquina facilitaría el reclutamiento leucocitario en el intersticio testicular.

En relación a MIP-1 $\alpha$ , no pudimos identificar las células testiculares que expresan dicha quemoquina dado que no se comercializa el antisuero específico.

En relación a los **receptores** de MCP-1 (CCR2) y de MIP-1 $\alpha$  (CCR1 y CCR5) observamos que CCR2 se expresa en linfomonocitos mientras que CCR5 y CCR1 en células, con morfología típica de macrófagos, presentes en el intersticio testicular. Se observaron diferencias en el número de células positivas para CCR2 y CCR5 entre los grupos de ratas N, C y E. El número de células CCR2 $^{+}$  o CCR5 $^{+}$  es significativamente mayor en las ratas con orquitis respecto de ratas de los grupos C y N (estos 2 últimos poseen números similares de células marcadas). En cambio, no hay diferencias en el número de células CCR1 $^{+}$  en los 3 grupos de ratas estudiados. No sabemos si el grado de afinidad de MIP-1 $\alpha$  por CCR5 es mayor que para CCR1. Ha sido descrito que CCR5 es también receptor de MIP-1 $\alpha$ . Previamente (Guazzone y col., 2004) hemos demostrado la expresión de MIP-1 $\alpha$  en células de las paredes de los vasos sanguíneos testiculares y en monocitos y macrófagos aislados del testículo. A su vez, detectamos por ELISA un aumento de la concentración de dicha quemoquina en el MCM testiculares y fluido testicular de ratas con OAE. Por lo tanto, consideramos que el aumento del número de células CCR5 $^{+}$  en el testículo de ratas con OAE estaría asociado a la quimiotaxis, vía MIP-1 $\alpha$ .

Analizando los distintos períodos estudiados se observa un aumento creciente a lo largo del tiempo (de 7 a 100 días) del número de células positivas para receptores de quemoquinas en las ratas del grupo E. Durante el desarrollo de la OAE se detecta un mayor número de células CCR2+, la mayor concentración de MCP-1 en el fluido testicular y en el MCM testiculares, así como la mayor densidad celular del infiltrado intersticial y lesión testicular. El aumento del número de células que expresan el receptor asociado al aumento de producción de la quemoquina se interpreta como un signo de funcionalidad de la interacción MCP-1/CCR2.

El **ensayo de quimiotaxis** nos permitió demostrar la funcionalidad de ambas quemoquinas así como la capacidad de linfocitos de sangre y de ganglio linfático de los animales con orquitis de responder a dicho estímulo. No podemos, sin embargo, descartar que haya otras quemoquinas involucradas en la inducción del cuadro. Sin embargo, como menciona Rollins (1997) es posible que aunque muchas quemoquinas induzcan respuestas similares, sólo una o pocas, se expresan, *in vivo*, en un particular microambiente.

En conclusión, podemos especular que MCP-1 y MIP-1? constituyen componentes esenciales de un circuito de amplificación de la respuesta inmune en el contexto de un cuadro de inflamación crónica. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en un modelo experimental de artritis inducida con colágeno en donde se describe un aumento de quemoquinas de la familia CC en las articulaciones durante la fase tardía del cuadro (44 días después de la primera inmunización) (Kasama y col., 1995). Dichos autores demostraron que

la depleción de quemoquinas, inducía una reducción significativa de la incidencia y severidad de la inflamación articular.

Se ha sugerido que los receptores de quemoquinas se expresan en forma selectiva en las células Th polarizadas (Mantovani y col., 2004) y que actúan como reguladores de la respuesta inmune modulando el balance Th1/Th2 (Maurer y col., 2004).

De acuerdo a los datos aportados por Tanaka (2001) y Springer (1994), MCP-1, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  estimularían la expresión de integrinas induciendo la adhesión firme de los linfocitos circulantes a ligandos específicos expresados en el endotelio, facilitando así la extravasación.

### **Moléculas de adhesión leucocitaria**

La interacción entre **moléculas de adhesión celular** y quemoquinas es importante en la iniciación y mantenimiento de un cuadro inflamatorio ya que dichas moléculas están involucradas en la extravasación leucocitaria. La expresión y funcionalidad de las moléculas de adhesión está altamente regulada por señales intracelulares inducidas por estimulación de citoquinas y quemoquinas. A su vez, dichas moléculas transducen información extracelular a las organelas intracelulares, induciendo activación celular y producción de quemo y citoquinas (Tanaka, 2001).

Los resultados obtenidos por citometría de flujo no mostraron diferencias en la expresión de **L-selectina** en los linfomonocitos de sangre y ganglio linfático provenientes de ratas del grupo E y C indicando que no hay una modulación en la expresión de la misma a largo plazo. Los resultados



obtenidos no nos permiten aseverar que la etapa de “rolling” ocurra independientemente de la L-selectina. Resultados similares han sido descriptos en otros cuadros inflamatorios (Waters y col., 2003; Dadfar y col., 2004). Una característica única que distingue a dicha molécula de otras moléculas de adhesión es el rápido clivaje que sufre su dominio extracelular luego de la activación de la célula (Venturi y col., 2003).

De los datos de la bibliografía surge que existen muchos caminos regulados por distintas moléculas de adhesión y quemoquinas, que se desarrollaron como sistemas redundantes garantizando la entrada de células T en una amplia variedad de circunstancias. Por lo tanto, es probable que otras moléculas de adhesión estén involucradas en la primera etapa de la cascada de adhesión. Gee y col. (2004) describieron que, en presencia de citoquinas u otros factores pro-inflamatorios, la expresión celular de L-selectina generalmente disminuye mientras que hay un aumento en la expresión de CD44 y en su capacidad de adherirse al AH.

La **molécula CD44** participa selectivamente en el tráfico de linfocitos activados a los sitios de inflamación y podría constituir un marcador de inflamación crónica en cuadros autoinmunes (Siegelman, 1999).

Estudiando la expresión de CD44 en linfomonocitos de ganglios linfáticos, sangre periférica y testículo de ratas durante el desarrollo de la OAE detectamos la expresión de CD44 en la superficie de linfomonocitos de sangre y ganglios en los 3 grupos de ratas estudiados, N, C y E. Los linfocitos T y B no activados y otras células hematopoyéticas normales que expresan CD44 no se

adhieren al AH, *in vitro* (Lesley y col., 1993). En efecto, las células provenientes de sangre y ganglios de ratas normales no se adhieren en forma específica al AH. A su vez, observamos, un aumento de la intensidad de fluorescencia media en los grupos C y E en el período posterior a la inmunización, indicando una mayor expresión de las moléculas CD44 en la superficie celular. Según Puré y Cuff (2001) la expresión aumentada de CD44 es uno de los mecanismos que producen variantes de la molécula de CD44 con capacidad de unir AH. En efecto, hemos demostrado que linfomonocitos de sangre y ganglio provenientes de ratas del grupo E se adhirieron específicamente a placas cubiertas con AH. Estos resultados sugieren la presencia de CD44 en su forma activa en las células de las ratas con orquitis. El hecho de que un porcentaje similar de células de ganglios linfáticos provenientes de los grupos C y E se adhieran al AH puede deberse a que el adyuvante induzca la forma activa de CD44 (DeGrendele y col., 1996). Sin embargo, el porcentaje de adhesión de las células de sangre del grupo E fue mayor que el del grupo C, probablemente debido al microambiente inflamatorio que regula la migración de estas células desde los ganglios linfáticos a la sangre periférica. El TNF- $\alpha$  y las quemoquinas presentes en la vecindad de las paredes de los vasos sanguíneos o intravasculares, pueden rápidamente activar la molécula CD44 expresada en los linfocitos T (Ariel y col., 2000). Estos factores podrían estar involucrados en la activación de CD44 en los linfomonocitos en la OAE dado que, como ya hemos descrito, existe en este cuadro un aumento de la concentración de TNF- $\alpha$  (Suescun y col., 2003) y de MIP-1 $\alpha$  (Guazzone y col., 2004) en el MCM testiculares de ratas con orquitis

severa. Además, ha sido descrito (Mohamadzadeh y col., 1998) que el TNF- $\alpha$  y la IL- $\beta$  inducen la expresión de AH en las células endoteliales de los pequeños vasos. También demostramos una disminución en el porcentaje células CD44+ asociado a una disminución de la intensidad de fluorescencia media en la sangre de ratas con OAE severa (100 días), con respecto a ratas del grupo C. Simultáneamente, en ese período, se observó un significativo aumento de células CD44+ en el intersticio testicular sugiriendo un tráfico de células CD44+ desde sangre periférica al testículo. El aumento del número de células CD44+ en el testículo se asoció con el grado de severidad de la lesión.

Nuestros resultados concuerdan con el concepto de que la forma activa de la molécula CD44 participa selectivamente en el reclutamiento de linfocitos activados en el órgano blanco y que este evento puede ser un indicador de actividad autoinmune. En pacientes con lupus eritematoso sistémico o con artritis, se observó una estrecha asociación entre la existencia de una subpoblación de células T que expresan CD44 activo y el grado de severidad del cuadro autoinmune (Estess y col., 1998). El papel de la molécula CD44 en la inflamación ha sido también demostrado en otros modelos experimentales de autoinmunidad tales como, artritis (Zeidler y col., 1995; Halloran y col., 1996), encefalomiелitis (Brode y col., 1999) e inflamación cutánea (Camp y col., 1993). Stoop y col. (2001), observaron una significativa reducción de la severidad e incidencia de la artritis inducida por colágeno, en ratones deficientes en CD44. Este cuadro se acompañaba de una alteración en los niveles séricos de AH, expresión reducida de L-selectina y un retardo en la migración y extravasación de linfocitos al tejido sinovial de ratones huésped. A

nivel clínico, también se demostró el papel relevante de la molécula CD44 en pacientes con artritis reumatoidea (Tanaka y col., 2001).

En conclusión, la adhesión específica al AH por parte de los linfomonocitos de la sangre y de los ganglios linfáticos y el aumento del número de células CD44+ en el intersticio testicular de ratas durante el desarrollo de la orquitis autoinmune nos permite especular que esta molécula está involucrada en el reclutamiento linfomonocitario en el órgano blanco jugando un papel clave en la dirección del tráfico leucocitario y en el mantenimiento de la inflamación crónica en el cuadro autoinmune.

### **Moléculas de adhesión endotelial**

En los procesos inflamatorios está involucrada la microvasculatura del órgano blanco. Los estímulos inflamatorios activan a las células endoteliales a expresar moléculas de adhesión y quem oquinas que promueven la adhesión de leucocitos al endotelio.

El número de células endoteliales testiculares **PECAM-1+** es mayor en las ratas con orquitis en comparación con las ratas de los grupos C y N. Este resultado concuerda con el hecho de que las ratas con OAE presentan un mayor número de vasos sanguíneos testiculares de pequeño calibre, según lo observado en la histopatología testicular. Se ha demostrado que PECAM-1 participa en las etapas de firme adhesión y diapedesis de la cascada de adhesión (Jonson-Léger y Imhof, 2003). A nivel clínico, se ha detectado un aumento de la expresión de PECAM-1, en pacientes con artritis reumatoidea y osteoartritis (Szekanecz y col., 2000; Johnson y col., 1993).

Resultados previos del laboratorio (Lustig y col., 1999) demostraron, por Western blot, un aumento significativo de la expresión de **VCAM-1** en extractos testiculares de ratas con OAE (1.8 veces de incremento con respecto al control). Este trabajo de tesis demuestra que dicho aumento de VCAM-1 se debe, en gran parte, al aumento de células endoteliales VCAM-1+.

La expresión de VCAM-1 es inducida en las células endoteliales en respuesta a un número de estímulos inflamatorios incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-1 y LPS. Bajo estas condiciones VCAM-1 es un importante mediador del reclutamiento de linfocitos al sitio de inflamación (Carter y col., 2001; Cook Mills, 2002).

De acuerdo a los resultados obtenidos, las células del endotelio de la microvasculatura testicular de ratas N no expresan VCAM-1. En cambio, las células endoteliales de las ratas C y E, expresan dicha molécula. A su vez, el número de células endoteliales VCAM-1+ es significativamente mayor en las ratas con orquitis en comparación con las del grupo C y está asociado a la severidad de la lesión y abundancia del infiltrado intersticial. Estos resultados concuerdan con datos que demuestran que VCAM-1 está involucrada en la patogenia de otros cuadros autoinmunes como artritis reumatoidea (Carter y col., 2001) y encefalomiелitis alérgica (Baron y col., 1993).

La inflamación involucra una serie de fenómenos como la activación de leucocitos, el aumento de la producción de quemoquinas, citoquinas pro-inflamatorias, prostaglandinas y especies reactivas del O<sub>2</sub>, estimulación de la

expresión de moléculas de adhesión que llevan al aumento de la permeabilidad vascular facilitando el reclutamiento de células del sistema inmune en los sitios blanco de la lesión. En este trabajo se estudió el papel de las principales quemoquinas y moléculas de adhesión involucradas en la quimiotaxis de monocitos, linfocitos y macrófagos en la OAE lográndose determinar la expresión temporal y regional de las mismas a lo largo del desarrollo del cuadro. El conocimiento de la patogenia de la OAE y de las interacciones entre células del sistema inmune y células germinales es relevante para la comprensión de patologías testiculares y de cuadros de esterilidad asociados a mecanismos inmunológicos.

Estos resultados, en conjunto con resultados experimentales obtenidos en otros cuadros autoinmunes permitirán idear estrategias terapéuticas que contemplen el bloqueo secuencial de los factores que facilitan el desarrollo de infiltrados inflamatorios en el tejido blanco.

**Conclusiones**

### Quemoquinas

En el modelo de orquitis autoinmune en rata observamos en el grupo experimental en comparación con el grupo control:

- 1) Aumento de quemoquinas a nivel local, testicular y no a nivel sistémico.
- 2) Aumento del contenido testicular de MIP-1 $\alpha$  durante el período de inmunización (7-30 días).
- 3) Aumento de la concentración testicular de MCP-1 durante todo el desarrollo del cuadro de OAE, desde el período de inmunización hasta la lesión testicular severa (7-100 días).
- 4) Variación temporal del contenido testicular de quemoquinas: aumento inicial de MIP-1 $\alpha$ , que precede la lesión testicular; aumento de MCP-1 que se mantiene durante el período de orquitis severa.
- 5) MCP-1 está expresado en las células somáticas del testículo: macrófagos, células dendríticas, células peritubulares, células de Leydig y de Sertoli y no en las células germinales.
- 6) La subpoblación de macrófagos ED1 provenientes de la circulación es la que, mayoritariamente, expresa MCP-1.
- 7) Aumento en el intersticio testicular del número de células que expresan receptores específicos para MCP-1 (CCR2) y para MIP-1 $\alpha$  (CCR5).



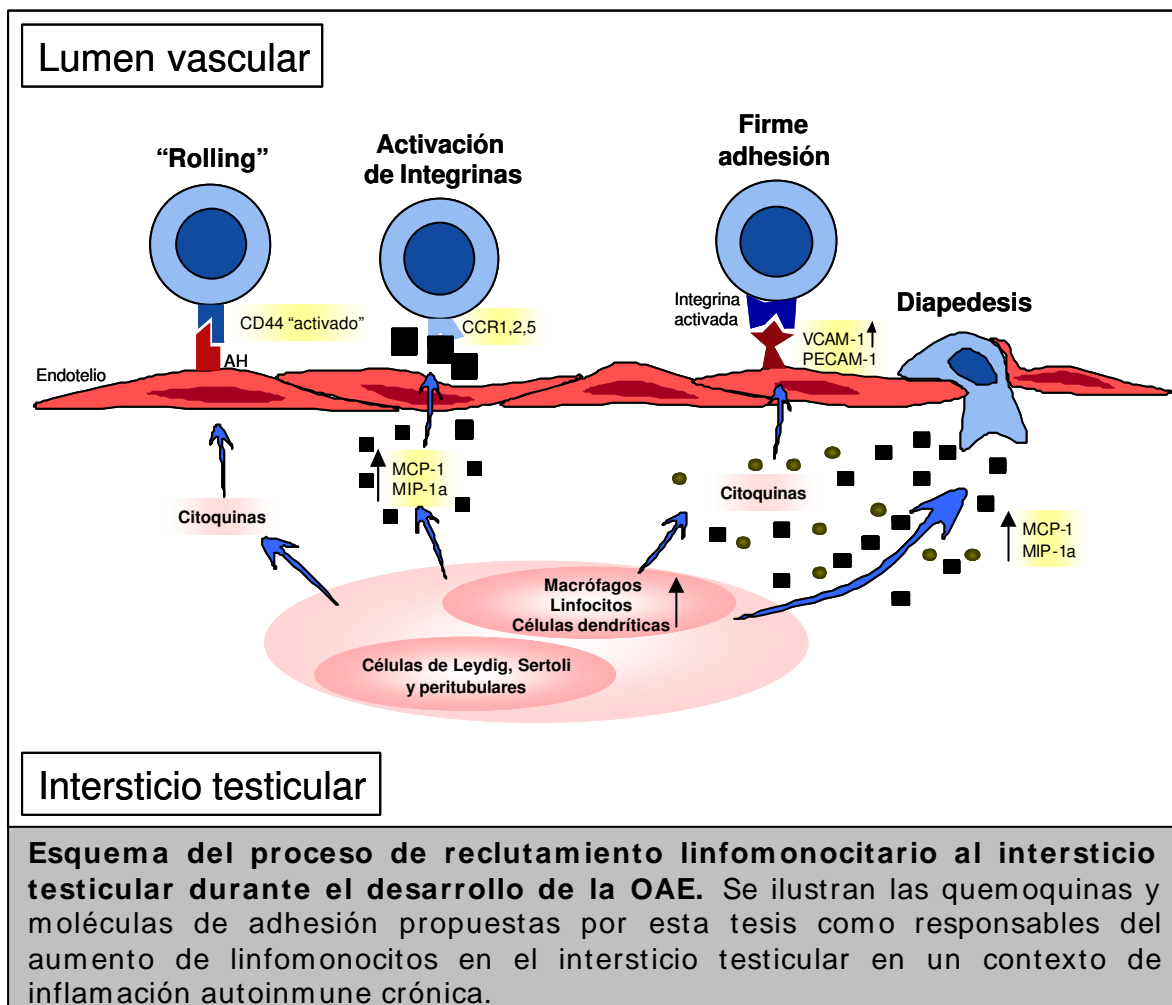
Los linfomonocitos migrarían al intersticio testicular por acción de las quemoquinas MCP-1 y MIP-1? que actuarían principalmente a través de los receptores CCR2 y CCR5.

### **Moléculas de adhesión leucocitarias y endoteliales**

- 1) Disminución en el número de linfomonocitos CD44+ en sangre periférica y aumento de los mismos en el intersticio testicular asociado al grado de severidad de los túbulos seminíferos.
- 2) Aumento de la expresión de CD44 en los linfomonocitos de ganglios linfáticos y sangre.
- 3) Adhesión al ácido hialurónico de los linfomonocitos de sangre y de ganglios linfáticos.
- 4) Aumento del número de células endoteliales PECAM-1+ en el testículo.
- 5) Aumento de la expresión de VCAM-1+ en las células endoteliales del testículo.

La interacción CD44-ácido hialurónico sería la responsable de la primera etapa de la cascada de adhesión celular mientras que VCAM-1 estaría involucrado en los eventos posteriores que permiten la extravasación de los linfomonocitos al intersticio testicular.

Nuestros resultados sugieren que las quemoquinas y moléculas de adhesión estudiadas constituyen un componente esencial del circuito de amplificación de la respuesta inmune en un cuadro de OAE.



**Los resultados de este trabajo de Tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:**

?? Guazzone Vanesa A., Rival Claudia, Denduchis Berta, Lustig Livia.

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in experimental autoimmune orchitis. *Journal of Reproductive Immunology* 60, 143-157. Elsevier Ireland Ltd. Liverpool, UK. 2003.

?? Guazzone Vanesa A., Denduchis Berta, Lustig Livia.

Involvement of CD44 in leukocyte recruitment to the rat testis in experimental autoimmune orchitis. *Reproduction* 129, 603-609. The Society for Reproduction and Fertility. London, UK. 2005.

## **Bibliografía**

- Allison J., Georgiou H.M., Strasser A., Vaux D.L., 1997. Transgenic expression of CD95 ligand on islet beta cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3943-3947.
- Ariel A., Lider O., Brill A., Cahalon L., Savion N., Varon D., HersHKoviz R., 2000. Induction of interactions between CD44 and hyaluronic acid by a short exposure of human T cells to diverse pro-inflammatory mediators. *Immunology* 100, 345-351.
- Aubry F., Habasque C., Satie A.P., Jegou B., Samson M., 2000. Expression and regulation of the CC-chemokine monocyte chemoattractant protein-1 in rat testicular cells in primary cultures. *Biol. Reprod.* 62, 1427-1435.
- Baron J.L., Madri J.A., Ruddle N.H., Hashim G., Janeway Jr., C.A., 1993. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry in brain parenchyma. *J. Exp. Med.* 177, 57-68
- Bevilacqua M.P., Pober J.S., Mendrick D.L., Cotran R.S., Gimbrone M.A. Jr., 1987. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9238-9242.
- Brocke S., Piercy C., Steinman L., Weissman I.L., Veromaa T., 1999. Antibodies to CD44 and integrin alpha4, but not L-selectin, prevent central nervous system inflammation and experimental encephalomyelitis by blocking secondary leukocyte recruitment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 6896-6901.
- Butcher E.C., 1991. Leucocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67, 1033-1036.
- Camp R.L., Scheynius A., Johansson C., Pure E., 1993. CD44 is necessary for optimal contact allergic responses but is not required for normal leukocyte extravasation. *J. Exp. Med.* 178, 497-507.
- Carlos T.M., Harlan J.M., 1994. Leucocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84, 2068-2101.

- Carter R.A., Wicks I.P., 2001. Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106): a multifaceted regulatory of joint inflammation. *Arthritis Reum.* 44, 685-994.
- Chabon A.B., Stenger R.J., Grabstald H., 1987. Histopathology of testis in acquired immune deficiency syndrome. *Urology* 29, 658-663.
- Cook-Mills J.M., 2002. VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species. *Mol. Immunol.* 39, 499-508.
- Dadfar E., Lundahl J., Fernvik E., Nopp A., Hylander B., Jacobson H., 2004. Leukocyte CD11b and CD62l expression in response to interstitial inflammation in CAPD patients. *Perit. Dial. Int.* 24, 28-36.
- Dai Z., Nasr I.W., Reel M., Deng S., Diggs L., Larsen C.P., Rothstein D.M., Lakkis F.G., 2005. Impaired recall of CD8 memory T cells in immunologically privileged tissue. *J. Immunol.* 174, 1165-1170.
- Danke H.A., Koelle D.M., Yee C., Baheray S., Kwok W.W., 2004. Autoreactive T cell in healthy individuals. *J. Immunol.* 172, 5967-5972.
- De S.K., Chen H.L., Pace J.L., Hunt J.S., Terranova P.F., Enders G.C., 1993. Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology* 133, 389-396.
- DeGrendele H.C., Estess P., Picker L.J., Siegelman M.H., 1996. CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J. Exp. Med.* 183, 1119-1130.
- DeGrendele H.C., Estess P., Siegelman M.H., 1997a. Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 278, 627-675.
- DeGrendele H.C., Estess P., Siegelman M.H., 1997b. CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation. *J. Immunology* 159, 2549-2553.
- Dejuqc N., Jégou B., 2001. Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 208-231.

- Doncel G.F., Di Paola J.A., Lustig L., 1989. Sequential study of the histopathology and cellular and humoral immune response during the development of an autoimmune orchitis in Wistar rats. *Am. J. Reprod. Immunol.* 20, 44-51.
- Ebnet K., Vestweber D., 1999. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem. Cell. Biol.* 112, 1-23.
- Estess P., DeGrendele H.C., Pascual V., Siegelman M.H., 1998. Functional activation of lymphocyte CD44 in peripheral blood is a marker of autoimmune disease activity. *J. Clin. Invest.* 102, 1173-1182.
- Filippini A., Riccioli A., Padula F., Lauretti P., D'Alessio A., De Cesaris P., Gandini L., Lenzi A., Ziparo E., 2001. Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen. *Hum. Reprod. Update* 7, 444-449.
- Floderus S., 1944. Untersuchungen über den Bau der menschlichen Hypophyse mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen Verhältnisse. *Acta Pathol. Microbiol. Scan.* 53 (Suppl.), 1-276.
- Gallatin W.M., Weissman I.L., Butcher E.C., 1983. A cell surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 304, 30-34.
- Gee K., Kozlowski M., Kumar A., 2003. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces functionally active hyaluronan-adhesive CD44 by activating sialidase through p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* 278, 37275-37287.
- Gee K., Kryworuchko M., Kumar A., 2004. Recent advances in the regulation of CD44 expression and its role in inflammation and autoimmune diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 52, 13-26.
- Gérard N., Syed V., Bardin W., Genetet N., Jégou B., 1991. Sertoli cells are the site of interleukin-1 $\gamma$  synthesis in rat testis. *Mol. Cell Endocrinol.* 82, R13-16.
- Gerdprasert O., O'Bryan M.K., Nikolic-Paterson D.J., Sebire K., de Kretser D.M., Hedger M.P., 2002a. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and

- macrophage colony- stimulating factor in normal and inflamed rat testis. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 518-524.
- Gerdprasert O., O'Bryan M.K., Muir J.A., Caldwell A.M., Schlatt S., de Kretser D.M., Hedger M.P., 2002b. The response of testicular leucocyte to lipopolysaccharide-induced inflammation: further evidence for heterogeneity of the testicular macrophage population. *Cell Tissue Res.* 308, 277-285.
- Gomez E., Morel G., Cavalier A., Lienard M.O., Haour F., Courtens J.L., Jegou B., 1997. Type I and type II interleukin-1 receptor expression in rat, mouse, and human testes. *Biol. Reprod.* 56, 1513-1526.
- Guazzone V.A, Rival C., Denduchis B., Lustig L., 2004. Variations of Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  expression in the testis of rats undergoing Autoimmune Orchitis. *Resumen. Clinical and Investigative Medicine* 27, 28C.
- Haugen T.B., Landmark B.F., Josefsen G.M., Hansson V., Högset A., 1994. The mature form of interleukin-1 $\beta$  is constitutively expressed in immature male germ cells from rat. *Mol. Cell Endocrinol.* 105, R19-23.
- Hedger M.P., 1997. Testicular leukocytes: what are they doing? *Rev. Reprod.* 2, 38-47.
- Hedger M.P., 2002. Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *J. Reprod. Immunol.* 57, 19-34.
- Hedger M.P., Meinhardt A., 2003. Cytokines and the immune-testicular axis. *J. Reprod. Immunol.* 58, 1-26.
- Hsu-Lin S., Berman C.L., Furie B.C., August D., Furie B., 1984. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. *J. Biol. Chem.* 259, 9121-9126.
- Ilan N., Madri J.A., 2003. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 515-524.
- Ishii K., Kurita-Taniguchi M., Aoki M., Kimura T., Kashiwazaki Y., Matsumoto M., Seya T., 2005. Gene-inducing program of human dendritic cells in response to BCG cell-



- wall skeleton (CWS), which reflects adjuvancy required for tumor immunotherapy. *Immunol. Lett.* 98, 280-290.
- Jahnukainen K., Jörgensen N., Pöllänen P., Giwercman A., Skakkebaek N.E., 1995. Incidence of testicular mononuclear cell infiltrates in normal human males and in patients with germ cell neoplasia. *Int. J. Androl.* 18, 313-320.
- Johnson B., Haines G.K., Harlow L.A., Koch A.E., 1993. Adhesion molecule expression in human synovial tissues. *Arthritis Rheum.* 36, 137-146.
- Johnson-Léger C., Imhof B.A., 2003. Forging the endothelium during inflammation: Pushing at a half-open door?. *Cell Tissue Res.* 314, 93-105.
- Kasama T., Strieter R.M., Lukacs N.W., Lincoln P.M., Burdick M.D., Kunkel S.L., 1995. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. *J Clin Invest.* 95, 2868-2876.
- Kern S., Robertson S.A., Mau V.J., Maddocks S., 1995. Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biol. Reprod.* 53, 1407-1416.
- Khan A.I., Clive Landis R., Malhotra R., 2003. L-selectin ligands in lymphoid tissue and models of inflammation. *Inflammation* 27, 265-280.
- Kim C.H., Broxmeyer E., 1999. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J. Leukocyte Biology* 65, 6-15.
- Le Goffic R., Mouchel T., Aubry F., Patard J.J., Ruffault A., Jegou B., Samson M., 2002. Production of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1, regulated on activation normal T cell expressed and secreted protein, growth-related oncogene, and interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 is induced by Sendai virus in human and rat testicular cells. *Endocrinology* 143, 1434-1440.
- Lesley J., Hyman R., Kincade P.W., 1993. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Advanced Immunology* 54, 271-335.

- Levesque M.C., Haynes B.F., 1996. In vitro culture of human peripheral blood monocytes induces hyaluronan binding and up-regulates monocyte variant CD44 isoform expression. *J. Immunol.* 156, 1557-1565.
- Levesque M.C., Haynes B.F., 1997. Cytokine induction of the ability of human monocyte CD44 to bind hyaluronan is mediated primarily by TNF-alpha and is inhibited by IL-4 and IL-13. *J. Immunol.* 159, 6184-6194.
- Lustig L., Doncel G.F., Berensztein E., Denduchis B., 1987. Testis lesions and cellular and humoral immune responses induced in rats by immunization with laminin. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 14, 123-128.
- Lustig L., Lourtau L., Pérez R., Doncel G.F., 1993. Phenotypic characterization of testicular cell infiltrates in rats undergoing an autoimmune orchitis. *Int. J. Androl.* 16, 279-284.
- Lustig L., Ozu M., Vianello S., Casanova M.B., Díaz E.S., Denduchis B., 1999. Expression of VCAM-1 and E-selectin in leucocytes and endothelial cells of rats undergoing autoimmune orchitis. V Congreso Latinoamericano de Inmunología. Punta del Este. Uruguay (Resumen M151).
- Lustig L., Tung K.S.K., 2006. Autoimmune orchitis and male infertility. En: *The autoimmune diseases*, IV Edición, Elsevier, Mackay I., Rose N., eds. En prensa.
- McEver R.P., Martin M.N., 1984. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J. Biol. Chem.* 259, 9799-9804.
- Maddocks S., Setchell B.P., 1990. Recent advances for immune privilege in the testis. *J. Reprod. Immunol.* 18, 9-18.
- Mantovani A., Allavena P., Vecchy A., Sozzani S., 1998. Chemokines and chemokines receptors during activation and deactivation of monocytes and dendritic cells and in amplification of Th1 vs Th2 responses. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 28, 77-82.

- Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchy A., Locati M., 2004. The chemokines system in diverse forms of macrophages activation and polarization. *TRENDS in Immunology* 25, 677-686.
- Maurer M., von Stebut E., 2004. Macrophages inflammatory protein -1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1882-1886.
- Meineke V., Frungieri M.B., Jessberger B., Vogt H., Mayerhofer A., 2000. Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. *Fertil Steril.* 74, 239-244.
- Meinhardt A., Bacher M., McFarlane J.R., Metz C.N., Seitz J., Hedger M.P., de Krester D.M., Bucala R., 1996. Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig cells: Evidence for a role in the regulation of testicular function. *Endocrinology* 137, 5090-5095.
- Mohamadzadeh M., DeGrendele H., Arizpe H., Estess P., Siegelman M., 1998. Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion. *J. Clin. Invest.* 101, 97-108.
- Mullaney B.P., Skinner M.K., 1993. Transforming growth factor-beta (beta 1, beta 2, and beta 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: Potential role at the onset of spermatogenesis. *Mol. Endocrinol.* 7, 67-76.
- Nandi A., Estess P., Siegelman M., 2004. Bimolecular complex between rolling and firm adhesion receptors required for cell arrest; CD44 association with VLA-4 in T cell extravasation. *Immunity* 20, 455-465.
- O'Garra A., Vieira P., 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat. Med.* 10, 801-805.
- Pelletier R. M., Byers S.W., 1992. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: Structural considerations. *Microsc. Res. Tech.* 20, 3-33.

- Pentikainen V., Erkkila K., Suomalainen L., Ojala M., Pentikainen M.O., Parvinen M., Dunkel L., 2001. TNF $\alpha$  down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4480-4488.
- Pollanen P., Niemi M., 1987. Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. *Int. J. Androl.* 10, 37-42.
- Proost P., Wuyts A., Van Damme J., 1996. The role of chemokines in inflammation. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 26, 211-223.
- Pure E., Cuff C.A., 2001. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol. Med.* 7, 213-221.
- Rival C., Lustig L., Iosub R., Guazzone V.A., Schneider E., Meinhardt A., Fijak M., 2006. Identification of a dendritic cell population in normal testis and in chronically inflamed testis of rats with autoimmune orchitis. *Cell Tissue Res.* En prensa.
- Rollins B.J., 1997. Chemokines. *Blood* 90, 909-928.
- Rottman J.B., 1999. Key role of chemokines and chemokine receptors in inflammation, immunity, neoplasia, and infectious disease. *Vet. Pathol.* 36, 357-367.
- Sainio-Pollanen S., Saari T., Simell O., Pollanen P., 1996. CD28-CD80/CD86 interactions in testicular immunoregulation. *J. Reprod. Immunol.* 31, 145-63.
- Schuppe H.C., Meinhardt A., 2005. Immune privilege and inflammation of the testis. *Chem. Immunol. Allergy* 88, 1-14.
- Sharpe R.M., Cooper I., Doogan D.G., 1984. Increase in Leydig cell responsiveness in the testosterone. *J. Endocrinol.* 102, 319-327.
- Siegelman M.H., DeGrendele H.C., Estess P., 1999. Activation and interaction of CD44 and hyaluronan in immunological systems. *J. Leukoc Biol.* 66, 315-321.
- Szekanecz Z., Haines G.K., Harlow L.A., Shah M.R., Fong T.W., Fu R., Lin S.J., Koch A.E., 1995. Increased synovial expression of the adhesion molecules CD66a, CD66b and CD31 in rheumatoid and osteoarthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 76, 180-186.

- Sozzani S., 2005. Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 581-592.
- Springer T.A., 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 28, 301-314.
- Suescun M.O., Calandra R.S., Lustig L., 2000. Effect of testicular macrophages conditioned media from rats with autoimmune orchitis on Leydig cell function. *Am. J. Reprod. Immunol.* 43, 116-123.
- Suominen J.J., Söderström K.O., 1982. Lymphocyte infiltration in human testicular biopsies. *Int. J. Androl.* 5, 461-466.
- Suominen J.J., 1995. Sympathetic auto-immune orchitis. *Andrología* 27, 213-216.
- Svechnikov K.V., Sultana T., Soder O., 2001. Age-dependent stimulation of Leydig cell steroidogenesis by interleukin-1 isoforms. *Mol. Cell Endocrinol.* 182, 193-201.
- Szekanecz Z., Koch A.E., 2001. Chemokines and angiogenesis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 13, 202-208.
- Szekanecz Z., Koch A.E., 2004. Vascular endothelium and immune responses: implications for inflammation and angiogenesis. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 30, 97-114.
- Tanaka Y., 2001. The role of chemokines and adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Drugs of Today* 37,477-484.
- Theas S., Rival C., Lustig L., 2003. Germ cell apoptosis in autoimmune orchitis: involvement of the Fas- Fas L system. *Am. J. Reprod. Immunol.* 50,166-176.
- Theas M.S., Rival C., Jarazo Dietrich S., Guazzone V.A., Lustig L., 2006. Death receptor and mitochondrial pathways are involved in germ cell apoptosis in an experimental model of autoimmune orchitis. *Hum. Reprod.* En prensa.
- Venturi G.M., Tu L, Kadono T., Khan A.I., Fujimoto Y., Oshel P., Bock C.B., Miller A.S., Albrecht R.M., Kubes P., Steeber D.A., Tedder T.F., 2003. Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity* 19, 713-724.

- Verajankorva E., Laato M., Pollanen P., 2002. CD99 and CD 106 (VCAM-1) in human testis. *Asian J. Androl.* 4, 243-248.
- Wang J., Wreford N.G.M., Lan H.Y., Atkins R. Hedger M.P., 1994. Leucocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants. *Biol. Reprod.* 51, 551-561.
- Waters W.R., Palmner M.V., Whipple D.L., 2003. Expression of L-Selectin (CD62L), CD44, and CD25 on activated bovine T cells. *Infect. Immunol.* 71, 317-326.
- Wennemuth G., Aumüller G., Bacher M., Meinhardt A., 2000. Macrophage migration inhibitory factor-induced  $Ca^{2+}$  response in rat testicular peritubular cells. *Biol. Reprod.* 62, 1632-1639.
- Xiong Y., Hales DB., 1993. Expression, regulation, and production of tumor necrosis factor-alpha in mouse testicular interstitial macrophages in vitro. *Endocrinology* 133, 2568-2573.
- Xu J., Qi L., Chi X., Yang J., Wei X., Gong E., Peh S., Gu J., 2006. Orchitis: A complication of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Biol. Reprod.* 74, 410-416.
- Yee J.B., Hutson J.C., 1983. Testicular macrophages: isolation, characterization and hormonal responsiveness. *Biol. Reprod.* 29, 1319-1326.
- Zeidler A., Brauer R., Thoss K., Bahnsen J., Heinrichs V., Jablonski-Westrich D., Wroblewski M., Rebstock S., Hamann A., 1995. Therapeutic effects of antibodies against adhesion molecules in murine collagen type II-induced arthritis. *Autoimmunity* 21, 245-252.
- Zeyse D., Lunenfeld E., Beck M., Prinsloo I., Huleihel M., 2000. Interleukin-1 receptor antagonist is produced by Sertoli cells in vitro. *Endocrinology* 182, 193-201.
- Zlotnik A., Yoshie O., 2000. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127.



