

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

*Estudio de las células presentadoras de antígeno en
el testículo normal y durante el desarrollo de la
orquitis autoinmune experimental*

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

Autor: **Claudia Rival**

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

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

Buenos Aires, 2006

*Estudio de las células presentadoras de antígeno en
el testículo normal y durante el desarrollo de la
orquitis autoinmune experimental*

Todos los estudios realizados en el modelo experimental de rata incluidos en este trabajo de tesis fueron desarrollados en el Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA, bajo la dirección de la Dra. L. Lustig, mientras que los realizados en ratón fueron llevados a cabo en el Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Virginia (EEUU), bajo la dirección del Dr. K. Tung, lugar donde realicé dos pasantías de tres meses cada una.

Quisiera agradecer al Dr. Tung por todo el conocimiento que me transmitió y por permitirme incluir los resultados que obtuve en su laboratorio en este trabajo de tesis.

Resumen

Resumen

A pesar de que el testículo es un "órgano inmunoprivilegiado", pueden generarse reacciones inflamatorias que alteran su función y pueden inducir infertilidad. Un modelo útil para estudiar autoinmunidad específica de órgano e inflamación testicular es la orquitis autoinmune experimental (OAE) que se caracteriza por la presencia de un infiltrado linfomonocitario intersticial y daño de las células germinales que sufren apoptosis y descamación. Nuestro objetivo fue estudiar las características fenotípicas y funcionales de las células presentadoras de antígeno (CPA) en el testículo normal y durante la OAE. En este cuadro, se observó un incremento en el número de macrófagos (residentes y no residentes) y de células dendríticas en el intersticio testicular. Mediante experimentos *in vivo*, utilizando liposomas conteniendo clodronato, demostramos que los macrófagos desempeñan un importante papel patogénico en la OAE. Detectamos que los macrófagos testiculares secretan un mayor nivel de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IFN γ y TNF α) durante la orquitis. Utilizando ratones deficientes en la expresión de TNFR1, demostramos, *in vivo*, que esta molécula está involucrada en el desarrollo de la OAE. Observamos que la IL-6 es capaz de inducir, *in vitro*, la apoptosis de las células germinales y detectamos, *in vivo*, un aumento significativo en el número de células germinales IL6R+ en las ratas con orquitis. A su vez, observamos variaciones en la expresión de moléculas del CMH II y co-estimuladoras (CD80 y CD86) en las CPA testiculares.

Concluimos que las CPA testiculares están fuertemente involucradas en el desarrollo de la OAE, a través de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y de la presentación antigénica a los linfocitos T.

Palabras claves: macrófagos, células dendríticas, testículo, orquitis autoinmune experimental, citoquinas, moléculas co-estimuladoras.

Summary

Summary

Testicular inflammation with subfertility or infertility can occur despite the fact that the testis is considered an immunoprivileged organ. Experimental autoimmune orchitis (EAO) is a useful model to study organ-specific autoimmunity and testicular inflammation. EAO is characterized by an interstitial inflammatory cell infiltrate and damage of germ cells that undergo apoptosis and sloughing. The aim of this work was to study the phenotype and functions of antigen presenting cells (APC) in the normal testis and during EAO. We observed an increased number of resident and non-resident macrophages and dendritic cells in the testicular interstitium of animals with orchitis. By experiments using liposomes containing clodronate, we showed, *in vivo*, a pathogenic role for macrophages in EAO. By ELISA, we detected an increased production of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IFN γ and TNF α) by testicular macrophages from rats with EAO. TNFR1 deficient mice showed that this molecule is involved in the pathogenesis of EAO. We observed that IL-6 was able to induce germ cell apoptosis *in vitro*, while an increased number of IL-6R+ germ cells was detected *in vivo* in EAO. By immunohistochemistry and flow cytometry we detected variations in the expression of MHC II and costimulatory (CD80 and CD86) molecules on testicular APC.

We conclude that testicular APC are strongly involved in the development of EAO through the production of pro-inflammatory cytokines and antigen presentation to T cells.

Key words: macrophages, dendritic cells, testis, experimental autoimmune orchitis, cytokines, costimulatory molecules.

A Juan Pablo,
a mi familia,
a mis amigas del alma,
y a los que, de alguna forma,
ya no están aquí.

A Livia, por transmitirme sus conocimientos, por compartir el trabajo de mesada, por brindarme todo su apoyo y por abrirme las posibilidades laborales que hoy en día tengo. Porque además de ser mi directora, Livia siempre estuvo (y está) atenta a los problemas personales de cada uno de los integrantes del laboratorio, ofreciendo toda su ayuda.

A Susana, porque me ayudó a crecer, porque realmente aprendí mucho de ella, por las charlas (y catarsis) que compartimos y por revisar esta tesis exhaustivamente.

A las chicas del laboratorio, especialmente a Vanesa y Patricia, con quienes compartí muchos experimentos, por la ayuda que siempre me brindaron, especialmente en los últimos meses, y por las “pilas” que pusieron para revisar esta tesis. También a Sabrina y a Cristian, con quienes disfrutamos charlas y tardes en el laboratorio.

A las chicas del laboratorio 11 y 17, por compartir los pasillos, la mejor buena onda y a modo de “sucursal”, también compartimos los reactivos.

A Laurita, por recibirme siempre con una sonrisa, a pesar de que le esperaban pilas de material cada día.

Al Dr. Kenneth Tung por abrir mi cabeza al mundo de la ciencia, por su reconocimiento y por su constante (y contagioso) interés por la investigación. También a su equipo, especialmente a Hui, por su amabilidad infinita y a Liesbeth, por haberme enseñado tanto de citometría de flujo casi sin que me diera cuenta.

A Marcos, por su paciencia y experiencia en el citómetro.

A mi familia, especialmente a mis padres y a mis hermanos, por ayudarme a ser quien soy.

A mis amigas, especialmente a Sandra, Sol y Lía, por la comprensión y el apoyo “estratégico”, por compartir la vida, y sin quienes esto no habría sido posible.

A Juan Pablo, por comprender mis largos días de trabajo, por su amor y por su energía e inspiración.

A Atila (por qué no?). Porque es mi cable a tierra cuando me preocupo demasiado porque no salió un experimento.

Y a todos los que me crucé en la vida que me enseñaron a superar mis obstáculos y a conocerme un poco más.

Indice

| | |
|---|------------|
| ABREVIATURAS..... | 1 |
| INTRODUCCION..... | 3 |
| Inmunoregulación del testículo normal y patológico..... | 3 |
| Células del sistema inmune presentes en el testículo..... | 6 |
| Orquitis autoinmune experimental (OAE)..... | 8 |
| Células presentadoras de antígeno..... | 11 |
| Moléculas co-estimuladoras..... | 12 |
| Macrófagos..... | 16 |
| Macrófagos presentes en el testículo..... | 17 |
| Células dendríticas..... | 21 |
| Células dendríticas en el testículo..... | 24 |
| Citoquinas..... | 24 |
| Citoquinas en el testículo..... | 27 |
| OBJETIVOS..... | 29 |
| MATERIALES y METODOS..... | 32 |
| DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS..... | 50 |
| La OAE: histopatología..... | 50 |
| El número de macrófagos testiculares aumenta durante el desarrollo de la OAE..... | 57 |
| Los macrófagos testiculares expresan las moléculas CD80, CD86 y del CMH II..... | 69 |
| Los macrófagos testiculares son capaces de estimular una respuesta alogeneica..... | 77 |
| Los macrófagos testiculares son necesarios para el desarrollo de la OAE..... | 79 |
| Expresión de citoquinas en el testículo..... | 82 |
| IL-6..... | 83 |
| INF γ | 90 |
| IL10, GM-CSF y TGF β | 90 |
| TNF α | 91 |
| Las células dendríticas en el testículo normal y en la OAE..... | 92 |
| Las células dendríticas testiculares expresan las moléculas CD80 y CD86 y del CMH II..... | 97 |
| DISCUSION..... | 100 |
| La orquitis autoinmune: modelos experimentales utilizados..... | 100 |
| Macrófagos testiculares..... | 101 |
| Citoquinas..... | 108 |
| Células dendríticas..... | 114 |
| Efecto adyuvantes..... | 119 |
| CONCLUSIONES..... | 123 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 128 |

Abreviaturas

| | |
|--------------|---|
| AFC | Adyuvante de Freund completo |
| Bp | <i>Bordetella pertussis</i> |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| C | Control (grupo de ratas o ratones inyectados con solución salina y adyuvantes) |
| CD | Células dendríticas |
| CMH II | Complejo mayor de histocompatibilidad clase II |
| CPA | Célula presentadora de antígenos |
| E | Experimental (grupo de ratas o ratones inyectados con homogenado testicular y adyuvantes) |
| ESM | Error estándar de la media |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| Fig. | Figura |
| g | Gramos |
| GM-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos |
| h / hs | Hora / horas |
| HT | Homogenado testicular |
| H&E | Hematoxilina y eosina |
| IL | Interleuquina |
| IFN γ | Interferón γ |
| MCM | Medio condicionado de macrófagos |
| min | Minutos |
| N | Normal (grupo de ratas o ratones no tratados) |
| Nro. | Número |
| OAE | Orquitis autoinmune experimental |
| PBS | Buffer fosfato salina |
| PE | Ficoeritrina R |
| seg | Segundos |
| SFB | Suero fetal bovino |
| STS | Segmentos de túbulos seminíferos |
| TGF β | Factor de crecimiento transformante β |
| TNF α | Factor de necrosis tumoral α |
| TNFR1 | Receptor tipo 1 del TNF α |
| TS | Túbulos seminíferos |

1. Introducción

1. Introducción

Durante muchos años, las investigaciones en fisiología y patología testicular se centraron en el estudio de la espermatogénesis y la esteroidogénesis. Sin embargo, otro aspecto sumamente interesante, es el análisis de las interacciones entre las células del sistema inmune presentes en el testículo y las células germinales. De esta manera, surge la siguiente pregunta: ¿las células germinales pueden ser dañadas a través de mecanismos inmunológicos a pesar que el testículo ha sido considerado como un órgano inmunológicamente privilegiado?

En este contexto, nos interesó estudiar las características y funciones de las células presentadoras de antígeno presentes en el testículo bajo condiciones normales y de inflamación.

1.1. Inmunoregulación del testículo normal y patológico

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 dicho órgano (por ej. 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 Setchell, 1990). Este “inmunoprivilegio” es evidente en la pubertad, período en el cual se inicia la espermatogénesis y comienzan a expresarse nuevos antígenos. A pesar de que estos antígenos aparecen luego de la selección tímica, cuando se eliminan gran parte de los linfocitos autoreactivos, estos antígenos no generan una respuesta de autoinmunidad testicular. Se postula que esta falta de respuesta se debe al estado de inmunosupresión que prevalece en el testículo normal.

Dicho microambiente inmunosupresor respondería a distintos factores y a varios mecanismos que probablemente operan simultáneamente, a saber: **a)** la existencia de una barrera hemato-testicular, **b)** la escasez de células presentadoras de antígeno funcionales, **c)** la baja expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en las células germinales, **d)** el número reducido de

linfocitos testiculares y la alta proporción relativa de linfocitos T supresores, e) la secreción de sustancias inmunosupresoras por parte de las células de Sertoli, de Leydig, macrófagos y otras células del testículo y f) la apoptosis que sufren los linfocitos que arriban al testículo.

Barrera hemato-testicular

Durante la pubertad, se expresan nuevos antígenos altamente inmunogénicos a nivel de las células del compartimento adluminal del túbulo seminífero. Es en este período que se desarrolla la "barrera hemato-testicular" (BHT), que está constituida por las uniones especializadas de las células de Sertoli que impiden el pasaje de macromoléculas a la luz del túbulo seminífero. Dichas uniones especializadas que mantienen unidas a las células de Sertoli entre sí, dividen al túbulo seminífero en un compartimento basal que contiene espermatogonias y espermatocitos pre-leptoténicos y un compartimento adluminal con espermatocitos paquiténicos, espermátides y espermatozoides (Fawcett y col., 1970). Actualmente se considera que el endotelio vascular y las células miodes peritubulares también forman parte de la BHT. El endotelio de los capilares testiculares es continuo pero presenta uniones en hendidura que forman canales intercelulares permeables. Dichas células, así como el endotelio de los vasos epididimarios juegan un activo papel, que se hace más evidente a partir de la pubertad, en la regulación del pasaje de inmunoglobulinas y de otras proteínas al tejido conectivo intersticial de esos órganos (Pollanen y Cooper, 1994). Durante mucho tiempo se pensó que los antígenos espermáticos estaban totalmente "secuestrados" en la región adluminal del túbulo seminífero. Sin embargo, recientemente se ha descrito que, en animales con ciclo reproductivo estacional, las Ig pueden atravesar la BHT (Pelletier, 2001). Por otra parte, las células de la rete testis y de los conductillos eferentes son permeables a las inmunoglobulinas, por lo que ciertos antígenos espermáticos se vuelcan a la sangre a través de estas estructuras en las cuales no existe una verdadera barrera. La liberación de pequeñas dosis de antígenos espermáticos desensibilizaría al sistema inmune reclutando linfocitos supresores e induciendo tolerancia.

Expresión de antígenos del CMH

La expresión de antígenos del CMH en las células germinales es baja o nula (Anderson y col., 1985), fenómeno que dificulta la destrucción de estas células por los linfocitos T. Por otra parte, las células de Sertoli, que sintetizan factores inmunosupresores, expresan antígenos del CMH de clase I (Turek y col., 1996) mientras que las células de Leydig expresan antígenos del CMH de clase I y II (Philpott y col., 1995; Haas y col., 1988).

Las características relacionadas a las células del sistema inmune presentes en el testículo se tratan en las siguientes secciones.

Secreción de factores inmunosupresores en el testículo

Distintas células del testículo sintetizan factores inmunosupresores. Las células de Leydig a través de la secreción de péptidos inmunoregulatorios como la hormona adrenocorticotropina (ACTH), la hormona estimulante de melanocitos α (MSH α), la β -endorfina y la met-enkefalina, entre otros, ejercen una acción supresora de la proliferación linfocitaria activada por mitógenos y una inhibición de la síntesis de IL-1 en los macrófagos (Pollanen y Uksila, 1990). A su vez, las células de Leydig expresan una isoforma diferente de la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) que promueve la adhesión de linfocitos presentes en el intersticio testicular y de esta manera, los linfocitos serían inactivados (Sainio-Pollanen y col., 1997). Los macrófagos testiculares sintetizan factores inmunosupresores como el factor de crecimiento transformante β (TGF β) y el antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1) (Hales y col., 1999; Hedger y col., 1998; Bryniarski y col., 2004). Las células de Sertoli también sintetizan péptidos como el factor de crecimiento de tipo insulina -1 (IGF-1), TGF β -1, inhibina, activina y otros factores que inhiben la proliferación y diferenciación de linfocitos T y B y la secreción de IL-2 (Hedger y col., 1998; De Cesaris y col., 1992; Hedger y Meinhardt, 2003). También, las células peritubulares son secretoras de IGF-1 y de TGF β 1 y 2 (Muller y col., 2005). Otra fuente de TGF β en el testículo son las células germinales (Haagmans y col., 2003). De esta manera, las diferentes poblaciones celulares del testículo contribuyen para la secreción de citoquinas y factores inmunosupresores.

Apoptosis linfocitaria

La presencia de linfocitos T y de células efectoras del sistema inmune en el testículo normal sugiere, que el estado de inmunoprivilegio se debe a mecanismos locales que inhiben o destruyen dichas células. Bellgrau y col. (1995) postularon que el inmunoprivilegio testicular depende del Fas L expresado por las células de Sertoli que induce la apoptosis de los linfocitos que llegan al testículo. Por otra parte, Riccioli y col. (2000) postularon que el balance entre las formas solubles y de membrana del Fas L es crítico en cuanto puede inhibir o favorecer la apoptosis linfocitaria. Sin embargo, trabajos recientes indican que las células de Sertoli no expresan Fas L (D'Alessio y col., 2001). Por otra parte, Allison y col. (1997) mostraron que injertos de testículo realizados debajo de la cápsula renal eran rechazados independientemente de la expresión de Fas L, indicando que esta molécula no estaría involucrada en la mayor sobrevivencia de aloinjertos en el testículo. Otras moléculas, como la galectina-1 cuya expresión fue detectada en el testículo (Dettin y col., 2003), podrían también estar involucradas en los fenómenos de apoptosis de los linfocitos testiculares.

1.2. Células del sistema inmune presentes en el testículo

Macrófagos

Como hemos mencionado anteriormente se ha postulado que el perfil del macrófago en el testículo normal es más inmunosupresor que pro-inflamatorio. Las características y funciones de los macrófagos se tratarán en una sección aparte ya que su estudio constituye el objetivo principal de esta tesis.

Linfocitos

El número de linfocitos T del testículo normal está determinado por los mecanismos normales de recirculación T, por episodios inflamatorios previos y por mecanismos de regulación local en los cuales las células de Leydig y los macrófagos residentes participarían activamente induciendo una acumulación preferencial de linfocitos T CD8⁺ (Hedger y Meinhardt, 2000). En efecto, en el testículo normal humano los linfocitos son escasos, predominando los linfocitos T supresores CD8⁺ y

las células NK (“natural killer”), sugiriendo que este órgano posee inmunoprotección innata, lo que limitaría el desarrollo de tumores y eventuales infecciones (Hedger, 1997). Estas células también predominan en el resto del tracto genital masculino y en particular, en el semen de hombres normales fértiles en el cual los 2/3 de los linfocitos del eyaculado corresponden a linfocitos T supresores/citotóxicos. En las secreciones del tracto genital masculino existen altos niveles de prostaglandina (Pg) E que inducen una expansión selectiva de linfocitos T supresores. Además, la Pg H2 sintasa, que promueve la producción de Pg, ha sido localizada en las células epiteliales de la rete testis y del epidídimo (Tarter y Ablin, 1992). En el niño, las recidivas de leucemia linfoblástica en el testículo son muy frecuentes. Se ha sugerido que este fenómeno, se debería a la falta de maduración de las células de Leydig que serían incapaces de inhibir la proliferación linfocitaria, como ocurre en el testículo del adulto (Janhnukainen y col., 1993).

Mastocitos

En la mayoría de las especies los mastocitos testiculares son escasos y están localizados en la zona subalbugínea y alrededor de los vasos, aunque en el hombre también se encuentran en el parénquima testicular. Existen mecanismos regulatorios comunes involucrados en el desarrollo de las células de Leydig y de los mastocitos. A nivel experimental, hemos descrito el aumento en el número de mastocitos testiculares que expresan el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y el factor de crecimiento neuronal β (NGF β) en la orquitis autoinmune en la rata (Ozu, 2001). A nivel clínico, en cuadros de patología testicular con infertilidad, distintos autores detectaron un aumento del número de mastocitos intersticiales y peritubulares (Meineke y col., 2000; Yamanaka y col., 2000). Los mastocitos sintetizan triptasa y citoquinas que estimulan la producción de colágeno en los fibroblastos, por lo tanto, los mastocitos podrían participar en la perpetuación del estado de inflamación crónica y en el desarrollo de la fibrosis presente en las etapas finales de dichas patologías testiculares (Frungeri y col., 2002; Iosub y col., 2006; Rodríguez y col., 2006).

1.3. Patología testicular mediada por mecanismos inmunológicos

Cuando los mecanismos de inmunorregulación fallan puede instalarse un cuadro de autoinmunidad. Se ha comprobado que, el hombre, así como distintas especies animales, puede desarrollar cuadros de autoinmunidad testicular por la liberación de antígenos espermáticos como resultado de infecciones del testículo, traumatismos e hipoespermatogénesis.

1.3.1. *Orquitis autoinmune experimental (OAE)*

El conocimiento de los factores inmunológicos involucrados en la falla gonadal provino, en gran medida, del estudio de distintos modelos de OAE, patología especialmente útil para el estudio de la autoinmunidad específica de órgano. La OAE puede inducirse por inmunización con antígenos espermáticos con o sin adyuvantes, la transferencia pasiva con linfocitos sensibilizados con antígenos espermáticos y manipulaciones del sistema inmune como la timentomía realizada 3 días después del nacimiento o la depleción de células T regulatorias (CD4+ CD25+) (Tung, 1998).

La OAE es una enfermedad mediada por los linfocitos T, regulada por factores locales, genéticos e inmunológicos. Los anticuerpos anti-espermáticos confieren mayor severidad al cuadro, pero no son suficientes para desencadenarlo (Lustig y Tung, 2006). El acrosoma del espermatozoide constituye la fuente de los más potentes antígenos espermáticos, aunque otros componentes de las células germinales y proteínas de la membrana basal del túbulo seminífero también poseen capacidad antigénica. Los signos tempranos de la enfermedad son la infiltración intersticial, perivascular y peritubular de macrófagos y linfocitos T CD4+ (Lustig y col., 1993). Las células germinales son el blanco del ataque inmunológico: los espermatocitos y espermátides mueren por apoptosis y se descaman del epitelio germinal, provocando aspermatogénesis e infertilidad. Durante la OAE, se observa una hiperplasia de las células de Leydig, pero estas células mantienen su morfología y función (Suescun y col., 1997). En cambio, las células de Sertoli sufren daños morfológico-funcionales en los últimos períodos del cuadro (Doncel y col., 1989; Suescun y col., 2001).

La OAE se estudió inicialmente en el cobayo (Voisin y col., 1951), en el ratón (Khono y col., 1983) y nuestro laboratorio desarrolló el cuadro en la rata (Doncel y col., 1989).

1.3.2. Cuadros autoinmunes en patología testicular humana

En patología humana se describieron las siguientes entidades clínicas: a) hipo o aspermatogénesis asociada a complejos inmunes, b) cuadros de orquitis autoinmune o de orquitis asociada a infecciones virales o bacterianas, c) orquitis granulomatosa de origen no infeccioso y d) orquitis inducidas por otras causas.

a) En biopsias de testículo de pacientes oligozoospermicos, se observaron alteraciones de la espermatogénesis y la presencia de infiltrados linfocitarios focales o generalizados y/o de depósitos de inmunoglobulina G, componente C3 del complemento (Salomon y col., 1982; Lehman y col., 1987) o inmunocomplejos en las membranas basales de los túbulos seminíferos como se observó también experimentalmente (Denduchis y Lustig, 1981; Lustig y col., 2000, Tung y col., 1981).

b) La mayor parte de las orqui-epididimitis son de origen infeccioso viral o bacteriano y la principal puerta de entrada es la propagación retrógrada por el conducto deferente (revisiones de Chan y col., 2002 y Delavierre, 2003). *Chlamydia trachomatis* y *Escherichia coli* son bacterias que comúnmente producen epidídimo-orquitis secundarias a una epididimitis. En relación a las orquitis asociadas a infección viral, se detectó, en algunos casos, el agente etiológico viral en el testículo pero, en general, se cree que el patógeno induce orquitis al alterar el estado de inmunoprivilegio y no por un efecto citopatógeno directo. El virus de la parotiditis se replica en las células de Leydig e inhibe la secreción de testosterona *in vitro*. El 5-37% de los hombres con parotiditis desarrollan orquitis uni o bilateral y el 50% de estos últimos sufre una atrofia testicular bilateral (Werner, 1950). El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) fue detectado en los macrófagos testiculares y en las células germinales, lo que provoca alteraciones de la espermatogénesis, atrofia y fibrosis de los túbulos seminíferos (Nuovo y col., 1994). La presencia de moléculas del tipo CD4 en la superficie de las células germinales facilitarían la internalización del HIV.

c) La orquitis granulomatosa puede estar asociada a epididimitis y vasitis y puede deberse a una respuesta autoinmune a espermatozoides extravasados. Puede ser espontánea y de etiología desconocida o, ser consecuencia de sarcoidosis, defectos congénitos, traumatismos, vasectomía, infecciones epididimarias o sistémicas como por ej.: tuberculosis, lepra, brucelosis, entre otras.

d) Otras causas de la orquitis autoinmune pueden ser: criptorquidia, tumores testiculares o como manifestación de una enfermedad sistémica autoinmune como la poliarteritis nodosa, síndrome de Sjögren, etc. También, como consecuencia de una obstrucción unilateral del conducto deferente post-cirugía puede desarrollarse autoinmunidad testicular. En el caso de los tumores testiculares, como el seminoma o el carcinoma *in situ*, estos se acompañan generalmente de infiltrados inflamatorios (con predominancia de linfocitos T CD8+), lo que sugiere la existencia de una respuesta inmunológica inducida por el proceso neoplásico.

Existen cuadros de infertilidad, sin patología testicular, que cursan con niveles altos de anticuerpos anti-espermáticos y que responden a infecciones, traumatismos y obstrucciones de los conductos excretores, a vasectomía o a la ausencia congénita del conducto deferente por fibrosis quística. En estos casos, los espermatozoides se acumulan, luego son degradados y la reabsorción de sus productos induce la formación de anticuerpos anti-espermáticos. Se ha comprobado que el 50-70% de los pacientes vasectomizados desarrolla anticuerpos anti-espermáticos y que esta respuesta está fuertemente relacionada con la constitución del CMH del individuo. Asociaciones como una alta frecuencia del "human leukocyte antigen" A28 (HLA-A28) y HLA-B40 con azoospermia o una alta incidencia de HLA-B7 en parejas infértiles con niveles altos de anticuerpos anti-espermáticos, sugieren que los factores genéticos juegan un papel en el control de la respuesta inmune a antígenos espermáticos (Person y col., 1992). El nivel y localización de estos anticuerpos explica la infertilidad persistente de muchos pacientes vaso-vasostomizados. Por otra parte, se ha descrito la presencia de anticuerpos anti-espermáticos circulantes en el 63% de los pacientes adultos con fibrosis quística (Bronson y col., 1992). Los anticuerpos anti-espermáticos pueden ejercer su acción en el tracto genital masculino, inhibiendo la motilidad de los espermatozoides e induciendo su aglutinación o en el tracto genital femenino, interfiriendo el proceso de migración de los espermatozoides o eventos pre y/o post-fecundación.

En conclusión, los resultados experimentales y las observaciones clínicas sugieren que distintos factores inflamatorios, traumáticos, endócrinos y genéticos pueden alterar el normal microambiente inmunosupresor del testículo, induciendo alteraciones en la espermatogénesis y en la esteroidogénesis que afectan la función

reproductiva de la gónada (revisiones Lustig y Tung, 2006; Lustig y col., 2004; Schuppe y Meinhardt, 2005).

Para entender los mecanismos involucrados en el mantenimiento del microambiente inmunosupresor existente en el testículo normal y los cambios que ocurren durante la inflamación testicular, es importante conocer las características de las células presentadoras de antígeno de este órgano.

1.4. Células presentadoras de antígeno

Las células presentadoras de antígeno (CPA) como los macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, osteoclastos, linfocitos B, entre otras, presentan antígenos a los linfocitos T que responden activándose y proliferando. La mayoría de las CPA se originan de los monocitos circulantes que provienen de una célula madre de la médula ósea de linaje mieloide (Gordon y Taylor, 2005).

En 1939, Ebert y Florey describieron que los monocitos que circulan en sangre periférica durante varios días, migran desde los vasos sanguíneos a los tejidos convirtiéndose en macrófagos y células dendríticas con características propias de cada tejido. El flujo de monocitos hacia los diferentes tejidos se incrementa por estímulos pro-inflamatorios como la secreción de citoquinas y quemoquinas y la expresión de moléculas de adhesión celular en el endotelio vascular. Los monocitos presentan una gran heterogeneidad en su fenotipo y pueden identificarse con los marcadores CD14 (humano), F4/80 y CD11b (ratón) y CD43 (rata).

Las CPA se caracterizan por su capacidad fagocítica. Esto les permite fagocitar antígenos, degradarlos intracelularmente para generar péptidos que se unen a moléculas del CMH y presentarlos en la superficie celular para su reconocimiento por las células T. Los péptidos que se unen a moléculas del CMH clase I provienen de proteínas sintetizadas en forma endógena que son degradadas por el proteasoma en el citoplasma, transportadas a la luz del retículo endoplasmático, donde se unen a heterodímeros del CMH clase I y exportadas hacia la membrana plasmática para ser presentadas a los linfocitos T CD8+. Los péptidos que se unen a las moléculas del CMH clase II derivan de proteínas provenientes de fuentes extracelulares, que luego de ser ingeridas por fagocitosis o capturadas por receptores presentes en la superficie celular, son degradadas en compartimientos vesiculares intracelulares

para transformarse en ligandos apropiados para las moléculas del CMH clase II y así ser reconocidas por los linfocitos T CD4+. De esta manera, las CPA pueden iniciar una respuesta inmunológica presentado antígenos en un contexto de moléculas del CMH clase II a los linfocitos T "helper" CD4+ o junto con moléculas del CMH clase I a los linfocitos T citotóxicos CD8+.

1.4.1. Moléculas co-estimuladoras

Para una óptima activación de los linfocitos T "helper", es necesario que el receptor T reconozca específicamente al antígeno presentado en un contexto de moléculas del CMH clase II y también, es necesaria una segunda señal, que no es antígeno específica, dada por moléculas co-estimuladoras presentes en la superficie de las CPA. En ausencia de la señal 2, los linfocitos no se activan, no proliferan ni producen citoquinas y permanecen en un estado de anergia, incapaces de responder a un nuevo estímulo (Sharpe y Freeman, 2002). Sin embargo, se ha reportado que en caso de que la señal a través del receptor T sea muy fuerte, puede existir activación de las células T en ausencia de la señal 2 (Sharpe y Freeman, 2002).

Dependiendo de las moléculas co-estimuladoras y sus receptores, esta segunda señal puede ser positiva o negativa, y de esta manera, promover la activación de las células T o inducir tolerancia, respectivamente.

Aunque este modelo de las 2 señales fue desarrollado inicialmente para linfocitos vírgenes, las señales co-estimuladoras también pueden actuar sobre células T sensibilizadas o previamente activadas. Algunos de los estímulos que inducen la expresión de estas moléculas co-estimuladoras son productos microbianos, como el LPS; citoquinas pro-inflamatorias, como el IFN γ ; y la interacción con las células T a través de la unión CD40-CD40L (Lenschow y col., 1996).

En los últimos años el número de miembros de la familia de moléculas co-estimuladoras o familia B7 ha crecido notablemente. En la Tabla 1 se resumen las características y los receptores de estas moléculas. B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) fueron las primeras moléculas descritas y por lo tanto, de las cuales se dispone de una mayor información. Ratones deficientes para estas moléculas, presentan severas anomalías en la respuesta inmune humoral y celular, revelando la importancia de las mismas (Borriello y col., 1997). El papel crucial de CD80 y CD86 en la activación de las células T y en la tolerancia, ha sido descrito en varios estudios

(Karandikar y col., 1998; Oosterwegel y col., 1999; Salomon y Bluestone, 2001; Sansom, 2000; Chambers y col., 2001).

La expresión de CD80 y CD86 está restringida, casi exclusivamente, a tejidos linfoides. CD80 es expresado en células B y T activadas, células dendríticas y macrófagos activados, mientras que CD86 está presente constitutivamente en monocitos en reposo y también es expresado en células B, T y CPA activadas (Azuma y col., 1993). La expresión de CD80 y CD86 es inducida luego de la activación celular pero, con diferentes cinéticas y en respuesta a una gran variedad de estímulos (Chambers, 2001). En la mayoría de las CPA, CD86 es expresada constitutivamente en bajos niveles y luego de la activación, sus niveles aumentan rápidamente, mientras que CD80 es expresada más tardíamente (Freeman y col., 1993; Hathcock y col., 1994). Aunque las funciones de CD80 y CD86 se superponen, la expresión más temprana de CD86 indicaría que esta molécula es la más importante para iniciar una respuesta inmunológica (McAdam y col., 1998). Sin embargo, datos funcionales indicarían que CD80 es el ligando más potente para CD28 en términos de activación (Sansom, 2000).

CD80 y CD86 proveen importantes señales co-estimuladoras que aumentan y sostienen la respuesta de las células T a través de su receptor CD28, que es expresado constitutivamente en estas células. La unión de CD28 a su ligando aumenta la magnitud y la duración de la respuesta de las células T ya que reduce significativamente el número necesario de interacciones receptor T - antígeno para una activación linfocitaria efectiva. También induce la expresión del gen anti-apoptótico Bcl-xL, promoviendo la supervivencia de las células T; aumenta la producción de citoquinas, en particular, de IL-2, estimulando la expansión linfocitaria; aumenta la adhesión celular facilitando la reorganización de la membrana plasmática del linfocito T luego de la interacción con la CPA y previene la anergia de los linfocitos (Lenschow y col., 1996; Lanzavecchia y col., 1999).

Otro receptor para las moléculas co-estimuladoras es el CTLA-4 ("cytotoxic T lymphocyte antigen-4" o CD152), cuya interacción resulta en señales negativas para las células T, inhibiendo la transducción de la señal de la vía activada por el receptor T y por CD28. La expresión de CTLA-4 es inducida en células T activadas mientras que no es detectable en células T vírgenes (Chambers y col., 2001). CTLA-4 inhibe la síntesis de IL-2 y la progresión a través del ciclo celular, terminando con la respuesta

de las células T (Walunas y col., 1994 y 1996; Krummel y col., 1995; Brunner y col., 1999; Greenwald y col., 2001). Los ratones deficientes para la expresión de CTLA-4 desarrollan una enfermedad linfoproliferativa fatal, lo que sugiere un papel crucial de CTLA-4 en la regulación de la tolerancia periférica de las células T (Greenwald y col., 2001; Mandelbrot y col., 1999; Perez y col., 1997).

La expresión basal y constitutiva de las moléculas co-estimuladoras B7 sería importante también, como mecanismo de tolerancia periférica a través del mantenimiento de la población de células T regulatorias (Lohr y col., 2003).

De esta manera, el balance entre la activación, mediada por CD28, y la inhibición, mediada por CTLA-4, de las células T, determina el tipo de respuesta inmune a desarrollarse.

Otros miembros de la familia B7 son: ICOSL (ICOS "Ligand" o B7h), que interactúa con su receptor ICOS ("inducible costimulator") y los ligandos del receptor PD-1 ("programmed death-1"): PD-L1 y PD-L2. ICOSL, es expresado por células hematopoyéticas y, a diferencia de CD80 y CD86, también por otros tipos celulares (Sharpe y Freeman, 2002). ICOSL es expresado en bajos niveles en las CPA como linfocitos B en reposo, macrófagos y células dendríticas. Algunos estímulos como el interferón γ (IFN γ), el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y el TNF α , inducen la expresión de ICOSL. Mientras que CD28 es importante para la activación de linfocitos vírgenes, ICOS parece ser más importante en la regulación de la producción de citoquinas de los linfocitos efectores o de aquellos recientemente activados (Hutloff y col., 1999; Coyle y col., 2000).

De forma similar a ICOSL, PD-L1 y PD-L2 son expresados en órganos linfáticos y no linfáticos, pero a diferencia de ICOSL, la interacción de estas moléculas con su receptor, transmite señales negativas al linfocito T. Altos niveles de PD-L1 se detectaron en el sincitiotrofoblasto de la placenta, sugiriendo un papel importante en la relación materno-fetal (Latchman y col., 2001). En contraste con CD28 y CTLA-4, PD-1 es expresado por un mayor número de células: linfocitos T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ activados, células B y células mieloides (Agata y col., 1996).

Otros miembros de la familia B7 recientemente descritos son B7-H3 y las butirofilinas de los cuales no se dispone de mucha información hasta el momento (Sharpe y Freeman, 2002).

Tabla 1 (Carreno y Collins, 2003)

| LIGANDOS | | RECEPTORES | | | |
|------------------|---|---------------|-------------------|-------------------------------|---|
| <i>Nombre</i> | <i>Expresión</i> | <i>Nombre</i> | <i>Expresión</i> | <i>Función</i> | |
| B7-1 (CD80) | CD, B, monocitos (inducida) | } { | CD28 | T (constitutiva) | + |
| B7-2 (CD86) | CD, B, monocitos (constitutiva) | | CTLA-4 (CD152) | T (inducida) | - |
| ICOSL (B7h) | CD, B, monocitos, NL (constitutiva) | ↔ | ICOS | T (inducida) | + |
| PD-L1 (B7-H1) | CD, B, monocitos, T, NL (inducida) | } { | PD-1 | T, B, monocitos (inducida) | - |
| PD-L2 (B7-DC) | CD, B, monocitos, NL (inducida) | | | | |
| B7-H3 | CD, monocitos, T, NL (inducida) | | ? | ? | + |

B: linfocitos B, CD: células dendríticas, NL: tejido no linfático, T: linfocitos T, ?: desconocido. Función: estimuladora (+) o inhibitoria (-).

1.4.2. Moléculas co-estimuladoras en el testículo

Sainio-Pollanen y col. (1996) describieron, por inmunohistoquímica, que en el testículo normal de ratones no existe expresión de CD80 y CD86, mientras que en ratones diabéticos no obesos (NOD) de 14-22 semanas de edad, observaron células CD80+ y CD86+ en el intersticio testicular. Sin embargo, sólo algunas pocas células CD86+ también eran CD11b+, marcador de monocitos/macrófagos. Estos autores proponen que en el testículo normal, la ausencia de moléculas co-estimuladoras induciría anergia en los linfocitos que arriban al mismo, constituyendo otro mecanismo involucrado en el inmunoprivilegio testicular. En cuanto a la expresión de otras moléculas co-estimuladoras en el testículo, Ling y col. (2000) detectaron por Northern blot, el RNA de B7h en varios tejidos humanos, entre ellos, el testículo.

1.4.1. Macrófagos

Los macrófagos tisulares tienen un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos a través de la eliminación (“clearance”) de las células en degeneración y en la remodelación y reparación de los tejidos luego de respuestas inflamatorias agudas y crónicas. Los macrófagos derivan de los monocitos circulantes y también poseen un alto grado de heterogeneidad, característica que refleja la especialización funcional que adoptan las distintas poblaciones en un sitio anatómico determinado y en cada microambiente particular. Así, los macrófagos alveolares presentan una alta expresión de los receptores de “basura” (“scavenger receptors”), necesarios para la limpieza de microorganismos, virus y otras partículas presentes en el pulmón (Palecanda y Kobzik, 2001). La lámina propia del intestino es, a su vez, muy rica en macrófagos que se caracterizan por su alta capacidad fagocítica y bactericida y una pobre capacidad de sintetizar citoquinas pro-inflamatorias (Smith y col., 2005). Los datos de la bibliografía indican que el microambiente tisular puede inducir cambios en el fenotipo de los macrófagos residentes.

En cada tejido, en condiciones fisiológicas, la población de macrófagos se mantendría estable por el continuo reclutamiento de monocitos circulantes así como por la proliferación local de los macrófagos residentes.

1.4.2. Polarización de los macrófagos

Para los monocitos/macrófagos se ha propuesto un modelo similar al de la polarización de los linfocitos T en Th1 y Th2. De forma simplista, los macrófagos pueden diferenciarse en dos fenotipos: M1 y M2, sin embargo, es bueno recordar que estos fenotipos representan los puntos extremos de un continuo gradiente de diferenciación (Mantovani y col., 2004). Cuando los macrófagos son activados por el IFN γ solo o en combinación con otras citoquinas o productos microbianos, la vía de activación se denomina “clásica” y está caracterizada por un fenotipo de macrófagos con alta capacidad para presentar antígenos, elevada producción de especies reactivas del oxígeno y elevada producción de IL-12 e IL-23 con la subsiguiente polarización de los linfocitos al perfil Th1 (Verreck y col., 2004). Estos macrófagos, activados por la vía clásica, se denominan macrófagos M1. Los macrófagos M2 pueden activarse por estímulos como la IL-4, IL-13, complejos inmunes y el lipopolisacárido (LPS) bacteriano, entre otros. Este tipo de macrófagos se

caracteriza por una alta producción de IL-10 y baja secreción de IL-12 (Mosser y col., 2003).

Luego de la activación, los macrófagos M1 expresan receptores para la opsonización como por ej., el CD16. En contraste, los macrófagos M2 se caracterizan por elevados niveles de receptores de tipo "no opsonizantes" como por ejemplo, el receptor de manosa. Los macrófagos M1 y M2 también se diferencian por las citoquinas que secretan: altos niveles de IL-12 y bajos de IL-10 son producidos por los macrófagos M1, mientras que en los M2, se observa lo inverso. También, otras citoquinas son diferencialmente secretadas. Los componentes pro y antiinflamatorios del sistema de IL-1 están regulados diferencialmente en poblaciones de macrófagos polarizadas. En general, los macrófagos M2 se caracterizan por una baja producción de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1, el TNF α y la IL-6. En cuanto a las funciones, los macrófagos M1 serían potentes células efectoras integradas en la respuesta Th1. En cambio, los macrófagos M2 estarían relacionados con la eliminación de restos celulares, promoción de la angiogénesis y el remodelamiento tisular. De esta manera, los macrófagos M1 y M2, se diferencian por la expresión de receptores, producción de citoquinas, expresión de quemoquinas y sus receptores y funciones efectoras (Mantovani y col., 2004).

1.4.3. Macrófagos presentes en el testículo

A pesar de que el testículo es un "órgano inmunoprivilegiado", una importante población de macrófagos está presente en el testículo del hombre, de la rata y del ratón. Estas células se localizan en el intersticio testicular, en estrecho contacto con las células de Leydig. En el testículo de la rata se encuentra, aproximadamente, un macrófago cada 3-4 células de Leydig, mientras que pocos linfocitos (CD4+ y CD8+), células NK y mastocitos pueden observarse en el intersticio testicular (Niemi y col., 1986; Hedger, 1997).

Durante el desarrollo embrionario, células con morfología y expresión de marcadores de macrófagos pueden observarse desde períodos muy tempranos en el esbozo gonadal (11.5 días de gestación en el ratón y 7 semanas en el embrión humano) (Mendis-Handagama y col., 1987; Hutson, 1990). En períodos posteriores (16-20 semanas en el embrión humano), dichas células proliferan y comienzan a diferenciarse. La mitosis estaría estimulada por factores endócrinos, ya que se ha

descrito que la gonadotropina coriónica humana (hCG) induce un incremento del índice mitótico de los macrófagos testiculares luego del nacimiento (Raburn y col., 1993). En el adulto, los monocitos circulantes serían la principal fuente de macrófagos tisulares, sin embargo, se ha descrito que los macrófagos residentes mantienen su capacidad proliferativa (Raburn y col., 1993; Schlatt y col., 1999).

Los macrófagos testiculares exhiben varias de las características de los macrófagos de otros tejidos y expresan muchos de los mismos marcadores histoquímicos, inmunológicos y funcionales como ser la fagocitosis mediada por el receptor Fc, la secreción de moléculas citotóxicas y citoquinas (Hedger, 2002).

Es bien conocido el papel relevante que los macrófagos de muchos tejidos juegan en la respuesta inmune como presentadores de antígenos a los linfocitos T; sin embargo, existe poca información acerca de las funciones inmunes de los macrófagos del testículo normal y bajo condiciones de inflamación.

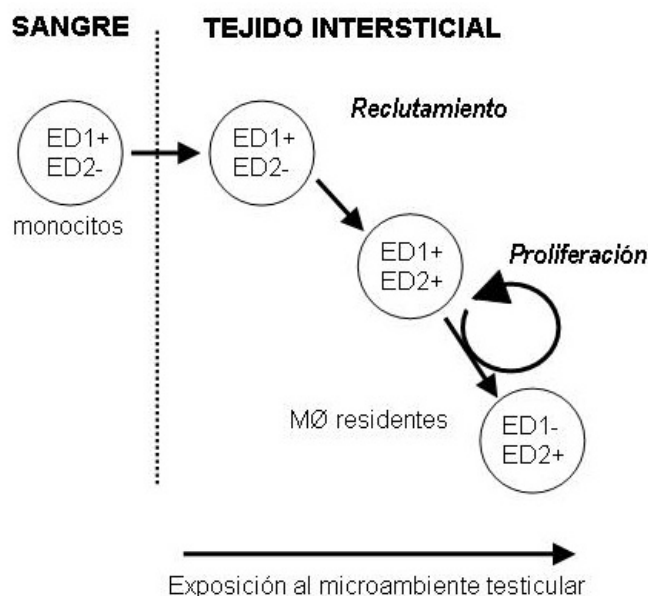
Los macrófagos testiculares tienen capacidad fagocítica y expresan moléculas del CMH de clase II (Hedger, 1997). Sin embargo, algunos autores (Kern y col., 1995; Hales y col., 1999) han sugerido que la función inmunoaccesoria de los macrófagos testiculares es deficiente comparada con la de los macrófagos peritoneales ya que estos últimos secretan mayores niveles de citoquinas en respuesta al LPS. Además, los macrófagos testiculares, secretan factores inmunosupresores como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor de crecimiento transformante β (TFG β) y prostaglandinas, que inhiben la proliferación linfocitaria. Por otra parte, experimentos de depleción de los macrófagos testiculares muestran un incremento en la respuesta inflamatoria en el testículo, sugiriendo un papel anti-inflamatorio de estas células (Bergh y col., 1993). En conjunto, estos resultados dan lugar a la hipótesis de que los macrófagos, en el testículo normal, cumplirían una función con características inmunosupresoras que contribuiría al "inmunoprivilegio testicular".

En rata y ratón, se ha demostrado que la población de macrófagos testiculares es heterogénea. Bryniarski y col. (2004) lograron aislar a través de un gradiente discontinuo de Percoll, dos subpoblaciones de macrófagos del testículo de ratón. La subpoblación de baja densidad presentó una pobre actividad presentadora de antígenos y una alta producción de TGF β mientras que la de alta densidad exhibía una alta capacidad para presentar antígenos y producir anticuerpos y baja secreción

de TGF β . Los autores sugieren que esta heterogeneidad podría estar reflejando distintos grados de diferenciación de un único tipo celular y que, aunque en el testículo existen macrófagos con capacidad para presentar antígenos y eventualmente inducir una respuesta autoinmune, la subpoblación de macrófagos con características inmunosupresoras predominaría en condiciones normales. En la rata, se ha descrito que la población de macrófagos testiculares está compuesta aproximadamente por un 80% de macrófagos residentes que expresan un antígeno de membrana homólogo al CD163 humano y que es reconocido por el anticuerpo ED2, mientras que un 15-20% son macrófagos que llegan al testículo desde la circulación y expresan un antígeno presente en la membrana lisosomal y en menor medida en la membrana plasmática, homólogo al CD68 humano y que es reconocido por el anticuerpo ED1 (Dijkstra y col., 1985; Hedger, 1997; van den Berg y col., 2001). Dado que se han detectado varios marcadores pro-inflamatorios como la expresión de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa y la proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1) principalmente en los macrófagos testiculares ED1+ (Gerdprasert y col., 2002a, 2002b), se ha propuesto que estas células mantendrían el perfil inflamatorio de los monocitos, mientras que los macrófagos residentes ED2+ tendrían una función inmunosupresora. En el testículo normal, los monocitos/macrófagos ED1+ que llegan desde la circulación se diferenciarían a macrófagos residentes ED2+ bajo la influencia del microambiente inmunosupresor testicular (Hedger, 1997) (Esquema 1).

Los macrófagos testiculares, al igual que en otros órganos endocrinos, interaccionan con las células productoras de hormonas. En la gónada masculina, los macrófagos interaccionan con las células de Leydig, a través de factores solubles y contactos directos célula-célula (Hutson, 1994 y 1998).

Como se mencionó previamente, el número de macrófagos testiculares aumenta durante el desarrollo puberal y este evento es, en parte, dependiente de la interacción con las células de Leydig (Hedger, 2002). En el adulto, la depleción transitoria de las células de Leydig mediante la administración de EDS ("ethane dimethanesulfonate"), resulta en una significativa depleción de macrófagos que sólo se recupera cuando el número de células de Leydig se normaliza (Wang y col., 1994).



Esquema 1. Origen de los macrófagos (MØ) testiculares

Por otra parte, los macrófagos residentes ejercen, en el testículo adulto, un efecto trófico sobre las células de Leydig y modulan la esteroideogénesis (Hedger, 2002). Se ha observado que en ratones deficientes en el factor estimulante de colonias (CSF), en los cuales el número de macrófagos está muy reducido, la secreción de testosterona está disminuída lo que induce una alteración de la espermatogénesis (Cohen y col., 1999). Estas interacciones funcionales tienen un sustrato morfológico ya que a nivel ultraestructural se ha descrito la existencia de interdigitaciones, vesículas y especializaciones de la membrana plasmática en las zonas de aposición entre ambos tipos celulares que sugieren un intercambio directo de moléculas (Hutson, 1992). De esta manera, las células de Leydig son importantes en la regulación de las funciones de los macrófagos y viceversa. Los macrófagos testiculares también afectan las funciones de las células de Sertoli y así, regulan, indirectamente, la espermatogénesis (Cohen y col., 1999).

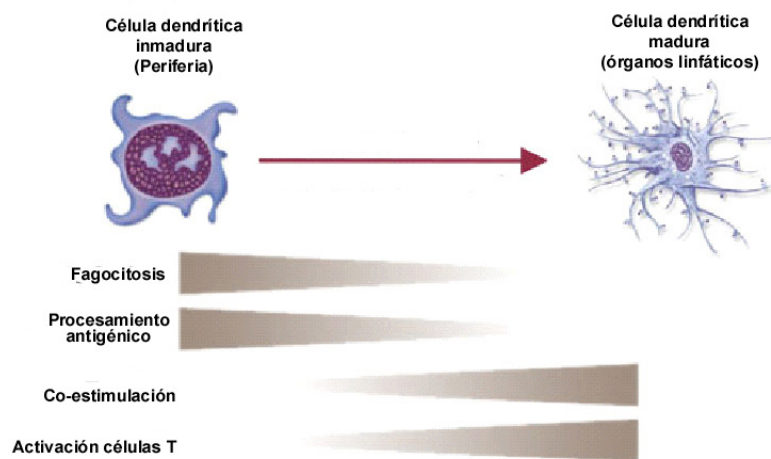
Los macrófagos testiculares secretan un amplio rango de citoquinas como el $TNF\alpha$, la IL-1 y la IL-6 (Hales y col., 1999). Aunque el papel fisiológico de dichas citoquinas en el testículo no está aún aclarado totalmente, distintos autores sugieren que regularían en forma paracrina, procesos como la espermatogénesis y la esteroideogénesis. Se ha demostrado por ejemplo, que la IL-1 y el $TNF\alpha$ modulan la secreción de testosterona en las células de Leydig, aunque este efecto es positivo o

negativo dependiendo de las distintas condiciones experimentales utilizadas (Warren y col., 1990; Calkins y col., 1990). Aparentemente, la interacción sería positiva en condiciones fisiológicas; mientras que en estados de inflamación, con niveles más elevados de estas citoquinas, el efecto sería estimulador sobre la secreción de testosterona (Hales y col., 1999).

1.5. Células Dendríticas

Las células dendríticas fueron identificadas por primera vez en los órganos linfáticos del ratón por Steinman y Cohn en 1973. La mayor parte de las características que hoy se conocen acerca de las células dendríticas surgen de estudios realizados en ratón. Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno más eficientes y, a diferencia de los macrófagos, tienen la capacidad de activar a los linfocitos vírgenes e inducir una respuesta inmune primaria (Banchereau y Steinman, 1998). Estas células, como todas las CPA, no son antígeno-específicas y presentan al linfocito un amplio espectro de moléculas propias y foráneas. Pueden originarse a partir de precursores mieloides o linfoides que una vez en circulación, colonizan distintos órganos. Allí, ejercen funciones de vigilancia inmunológica, ya que su encuentro con patógenos, con productos provenientes del daño tisular o con citoquinas pro-inflamatorias, estimula su migración a los ganglios linfáticos drenantes a través de los vasos linfáticos aferentes. Luego de captar el antígeno, las células dendríticas sufren profundos cambios morfológicos (maduración) que les permiten comenzar su migración a los ganglios linfáticos. Las células dendríticas inmaduras se caracterizan por su gran capacidad fagocítica y de pinocitosis, propiedades que se van perdiendo a medida que las células dendríticas maduran en su camino a los ganglios linfáticos (Chuluyan y col., 2004). En este proceso de maduración, inducido por señales pro-inflamatorias como citoquinas, productos bacterianos y otras (Matzinger, 1994), existe un cambio en la expresión de los receptores de quemoquinas, así como un incremento de la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 y CD40) y de moléculas de adhesión y una redistribución de las moléculas del CMH II que migran a la superficie celular (Esquema 2). Una vez que estos cambios ocurren, las células dendríticas están en condiciones de activar muy eficientemente a los linfocitos T y, el tipo de respuesta que desencadenen dependerá de la subpoblación de células dendríticas involucrada y de

los niveles de IL-12 presentes en el microambiente tisular (Moser y Murphy, 2000). El patrón de expresión de receptores de quemoquinas es diferente en las células dendríticas maduras (que expresan altos niveles de CCR7) respecto de las inmaduras que expresan receptores de quemoquinas inflamatorias (CCR1, CCR2, CCR5, CXCR1). Durante el proceso de maduración las células dendríticas constituyen, a su vez, una fuente importante de quemoquinas (Sozzani, 2005).



Esquema 2. Características de las células dendríticas maduras e inmaduras

La migración de células dendríticas desde la periferia a los ganglios linfáticos no ocurre solamente luego de un estímulo microbiano o inflamatorio sino también, en condiciones fisiológicas. Existe evidencia creciente de una migración permanente de células dendríticas residentes en los tejidos, a los ganglios linfáticos, fenómeno que jugaría un papel importante en la inducción y el mantenimiento de la tolerancia periférica. Se ha sugerido que esta función estaría ejercida por subpoblaciones específicas de células dendríticas (Yrlid y Macpherson, 2003).

Numerosos trabajos sugieren que las células dendríticas tienen un papel patogénico en autoinmunidad ya que son claves para la activación de linfocitos T y B y también, en la presentación de autoantígenos. En efecto, la transferencia de células dendríticas aisladas de animales con cuadros autoinmunes agudos o maduras *in vitro*, generan una fuerte respuesta Th1 que culmina en un cuadro autoinmune (Bayry y col., 2004). Las células dendríticas que presentan autoantígenos pueden, a su vez, inducir cuadros autoinmunes específicos de órgano

como la diabetes tipo I, la miocarditis autoinmune, esclerosis múltiple, artritis reumatoidea y síndrome de Sjögren (Eriksson y col., 2003; Turley y col., 2003).

1.5.1. Marcadores de células dendríticas

En el ratón, el marcador más comunmente utilizado es el CD11c (integrina αx), ya que es expresado por las distintas subpoblaciones de células dendríticas (Banchereau y col., 2000).

En la rata, el estudio de las células dendríticas ha avanzado más lentamente respecto del ratón, por una menor disponibilidad de herramientas experimentales. La identificación de estas células en la rata no es sencilla, ya que no existen anticuerpos que específicamente detecten antígenos presentes en las células dendríticas y ausentes en macrófagos y/o monocitos. A fin de excluir células no dendríticas, se utiliza una combinación de anticuerpos monoclonales (AcMn) que marcan las siguientes moléculas: el CMH clase II; la cadena α de la integrina E2 (AcMn OX62) que se expresa en células dendríticas y linfocitos $T\gamma\delta$ y la integrina αx (Ac Mn CD11c) que identifica células dendríticas y una pequeña población de células mieloides. La expresión de moléculas del CMH II depende del estado de maduración de las células dendríticas y el grado de expresión de las otras moléculas depende fundamentalmente del tejido. A su vez, las células dendríticas constituyen una población heterogénea ya que, con el uso de los marcadores CD4 y SIRP α ("Signal regulatory protein α "), se han identificado, en la rata, dos subpoblaciones: las células dendríticas CD4+/SIRP α - cuya localización se restringe a las áreas T dependientes del bazo y de los ganglios linfáticos, y la subpoblación CD4+/SIRP α + que estaría excluida de esas áreas. La primera tiene capacidad de presentar antígenos provenientes de células apoptóticas e inducir tolerancia a antígenos propios, mientras que la segunda subpoblación sería fuertemente inmunoestimuladora (Yrlid y MacPherson, 2003).

1.5.2. Células dendríticas en el testículo

Existen algunos estudios que sugieren la presencia de células dendríticas en el intersticio del testículo normal en diferentes especies (Derrick y col., 1993; Haas y col., 1988; Head y Billingham, 1985; Hoek y col., 1997; Itoh y col., 1995). Sin embargo, los resultados de dichos trabajos no son concluyentes debido a que los marcadores utilizados también reaccionan con macrófagos y estas células representan una población significativa en el testículo.

Las CPA llevan a cabo muchas de sus funciones a través de la secreción de citoquinas, moléculas que en general presentan bajo peso molecular y que pueden actuar en forma paracrina, autocrina y endocrina.

1.6. Citoquinas

Las citoquinas son producidas por células del linaje hematopoyético y también por muchas células de distintos tejidos. El rol primario de las citoquinas es el control de las respuestas inmune e inflamatoria a través de la regulación de la proliferación, diferenciación y activación celular. Las citoquinas se caracterizan por ser pleiotrópicas, en cierto grado, redundantes y por la capacidad de inducir la secreción de otras citoquinas. Dado lo amplio del tema, describiremos en forma limitada algunas citoquinas y algunas de sus funciones, centrándonos en las que se estudiaron en este trabajo de tesis.

Las citoquinas pueden dividirse en pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, clasificación basada en la función principal o predominante; sin embargo, muchas citoquinas tienen roles ambiguos.

A su vez, las citoquinas pueden clasificarse como Th1 y Th2 dependiendo de la subpoblación de células T CD4+ que las produzcan. Luego de la activación, las células T "helper" CD4+ pueden diferenciarse en, por lo menos, dos subpoblaciones: T "helper" 1 (Th1) y T "helper" 2 (Th2). Una de las principales citoquinas producida por los linfocitos Th1, es el IFN γ , mientras que la IL-4, IL-5 e IL-10 son características del perfil Th2. Sin embargo, existen muchas citoquinas que pueden clasificarse como Th1 y Th2 simultáneamente, por ej. el TNF α , el GM-CSF y la IL-3 (O'Shea y col., 2002).

Por otro lado, las CPA, como los macrófagos y células dendríticas, producen una gran variedad de citoquinas, que promueven la infiltración celular y el daño tisular característicos de la inflamación. La secreción de citoquinas por las CPA aumenta en respuesta a diversos estímulos como la interacción con los linfocitos, la activación de receptores para patrones característicos de diferentes patógenos como por ej. los receptores tipo toll (TLR) (Steinke y Boris, 2005), entre otros.

1.6.1. Citoquinas pro-inflamatorias

Entre las citoquinas proinflamatorias se encuentran el $IFN\gamma$, la IL-1, la IL-6 y el $TNF\alpha$.

El $IFN\gamma$ es una citoquina que define el perfil de diferenciación Th1. Esta citoquina puede inducir la activación y expresión de las moléculas del CMH II en las CPA.

La IL-6 es capaz de estimular la activación y proliferación linfocitaria, inducir la respuesta de fase aguda e incrementar la producción de otras citoquinas pro-inflamatorias en las células T.

Entre las funciones del $TNF\alpha$ se encuentran la activación de macrófagos, de células dendríticas y células endoteliales, la estimulación de la producción de otras citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias y la capacidad de inducir apoptosis. El $TNF\alpha$ también influencia la actividad de las CPA, por ej. aumentando la capacidad de presentación antigénica e induciendo la expresión de las moléculas co-estimuladoras.

1.6.2. Citoquinas anti-inflamatorias

La IL-10 y el $TGF\beta$ tienen la capacidad de suprimir la respuesta inflamatoria. Pueden prevenir la activación y expansión de linfocitos por diferentes mecanismos. Por ej., la IL-10 inhibe la expresión de IL-12, de $TNF\alpha$, del CMH II y moléculas co-estimuladoras en las CPA. La IL-10 también puede inhibir la migración de las células dendríticas a los ganglios linfáticos y la producción de quemoquinas proinflamatorias (Moore y col., 2001; D'Amico y col., 2000). De modo similar que la IL-10, el $TGF\beta$ puede limitar la respuesta de los linfocitos T a través de la inhibición del proceso de maduración en las CPA.

Existen distintas isoformas del $TGF\beta$ ($TGF\beta$ 1-3) que son producidas por una gran variedad de células, en general, en su forma latente. Las células T y los macrófagos

activados producen principalmente la isoforma TGF β 1 (Kehrl y col., 1986). *In vitro*, la forma activa puede ser liberada del complejo latente o LAP ("latency associate peptide") por diferentes tratamientos como la acidificación. Sin embargo, no se conoce con precisión el proceso *in vivo* que lleva a la activación del TGF β , pero se ha postulado que las metaloproteasas podrían estar involucradas en este evento (Prud'homme y Piccirillo, 2000).

El GM-CSF fue caracterizado inicialmente por su capacidad de generar colonias de granulocitos y macrófagos, a partir de células precursoras, a través de la proliferación y diferenciación celular. Cada vez existen más evidencias de que el GM-CSF juega un importante papel durante respuestas inflamatorias y en autoinmunidad. Sin embargo, estudios recientes, sugieren un papel dual para esta citoquina tanto en la estimulación como en la supresión de la respuesta inmune (Serafini y col., 2006).

1.6.3. Citoquinas y autoinmunidad

La destrucción tisular en enfermedades autoinmunes está asociada con la presencia de citoquinas pro-inflamatorias como el IFN γ , el TNF α y la IL-1 (Rabinovitch, 1994; La Cava y Sarvetnick, 1999). Por ej., se ha reportado que en varias enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoidea y la esclerosis múltiple, existe una sobreproducción de TNF α (Kollias y col., 1999; Owens y col., 2001).

De acuerdo a los patrones de citoquinas predominantes, las enfermedades autoinmunes pueden clasificarse en Th1 y Th2 (Barak y Schoenfeld, 1999). El perfil Th1 predomina en patologías como la esclerosis múltiple, la uveoretinitis autoinmune experimental y la tiroiditis de Hashimoto, entre otras. Así, la mayoría de las enfermedades autoinmunes específicas de órgano se desarrollan como consecuencia de linfocitos T CD4+ autoreactivos que presentan un perfil Th1. En cambio, en las enfermedades autoinmunes sistémicas como los desórdenes atópicos y la enfermedad injerto contra huésped, prevalece el perfil Th2. Existen también patologías como la artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico y miastenia gravis, entre otras, donde existen patrones mixtos Th1/Th2.

1.6.4. Citoquinas en el testículo

Existen numerosas evidencias de que las citoquinas juegan un papel regulatorio muy importante en el desarrollo y función testicular (Hales y col., 1999; Hedger y Meinhardt, 2003; O'Bryan y col., 2005). Varias citoquinas son producidas en el testículo normal y las características y funciones de algunas de ellas están resumidas en la Tabla 2.

Tabla 2. Citoquinas producidas en el testículo (Hales y col., 1999; Hedger y Meihardt, 2002)

| Citoquina | Sitio de producción | Función |
|--------------|--|--|
| IFN γ | células de Sertoli, Leydig, peritubulares y macrófagos | (-) esteroidogénesis |
| IL-6 | Células de Sertoli, Leydig, peritubulares y macrófagos | (-) síntesis de DNA meiótico en las CG (+) síntesis de transferrina en las células de Sertoli |
| IL-10 | Macrófagos, otras células ? | Posible papel en el inmunoprivilegio |
| GM-CSF | Macrófagos, otras células ? | Regulación de la esteroidogénesis ? |
| TGF β | Células de Sertoli, Leydig, peritubulares, germinales y macrófagos | (+)desarrollo testicular Posible papel en el inmunoprivilegio (-) esteroidogénesis |
| TNF α | Células Sertoli, germinales y macrófagos | (-)/(+) esteroidogénesis |

Función: (+): estimuladora, (-): inhibitoria, ?: desconocido o postulado; CG: células germinales

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1. OBJETIVO GENERAL

El testículo es considerado un “órgano inmunoprivilegiado”. Sin embargo, existen cuadros de inflamación testicular de distinta etiología, que pueden acompañarse de infertilidad. Estudiar los factores involucrados en la inmunorregulación testicular es, por lo tanto, importante para la comprensión de la fisiología y patología testicular, así como también para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en infertilidad masculina.

Dado que las células presentadoras de antígeno son fundamentales en el desarrollo de una respuesta inmunológica, el objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar el comportamiento de dichas células en el testículo normal y bajo condiciones de inflamación sistémica (administración de adyuvantes) y local (orquitis autoinmune experimental- OAE).

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Las principales células presentadoras de antígeno son los macrófagos y las células dendríticas; por lo tanto, nos propusimos desarrollar los siguientes objetivos, en condiciones fisiológicas y de inflamación:

- ❖ Identificar las subpoblaciones de macrófagos testiculares (residentes y provenientes de la circulación).
- ❖ Evaluar el número de macrófagos testiculares totales y de las subpoblaciones.
- ❖ Caracterizar a los macrófagos testiculares en cuanto a su expresión de moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86) y moléculas del CMH II y a su capacidad de presentar antígenos.
- ❖ Determinar, por experimentos *in vivo*, el papel de los macrófagos en el desarrollo de la OAE.
- ❖ Estudiar la secreción de citoquinas (IFN γ , IL-10, IL-6, GM-CSF y TGF β) por los macrófagos testiculares.
- ❖ Evaluar el papel de la IL-6 en la apoptosis de las células germinales.
- ❖ Estudiar el papel del TNF α en el desarrollo de la OAE.

- ❖ Determinar el número de células dendríticas testiculares y caracterizar a dichas células en cuanto a su expresión de moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 y del CMH II.

El desarrollo de estos objetivos se llevó a cabo en dos modelos experimentales de orquitis: nuestro modelo de OAE en rata, desarrollado en el Centro de Investigaciones en Reproducción (Facultad de Medicina, UBA) y un modelo en ratón desarrollado en la Universidad de Virginia (EEUU), donde realicé dos pasantías. En ambos modelos de OAE, la histopatología testicular final del cuadro es la misma: descamación del epitelio germinal, aspermatogénesis e infertilidad.

3. Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1. *Animales*

Ratas macho adultas (50-60 días de edad) de las cepas Sprague Dawley y Wistar fueron mantenidas a 22°C con ciclos de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad y alimentadas con comida estándar y agua *ad libitum*, en bioterios de Argentina y Alemania, respectivamente. Las ratas fueron sacrificadas según las normas de la Guía para el cuidado y uso de animales experimentales del National Institute of Health (NIH, EEUU).

La mayor parte de los estudios se realizó en ratas de la cepa Sprague-Dawley, con excepción del análisis histopatológico y del estudio de las células dendríticas, realizado en ambas cepas de rata. El estudio de las células dendríticas se realizó en colaboración con un grupo de investigación dirigido por el Dr. Meinhardt (Universidad Justus-Liebig, Giessen, Alemania).

Ratones macho adultos (6-8 semanas de edad) de las cepas B6AF1 (F1 de la cruce C57BL/6 x A/J), B6 (C57BL/6) silvestres y B6 deficientes para TNFR1 fueron obtenidos de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EEUU) y del National Cancer Institute (Frederick, MD, EEUU) o criados en la colonia del laboratorio del Dr. Tung de la Universidad de Virginia (EEUU). Los ratones fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos bajo las guías del Comité de uso y cuidado de animales de la Universidad de Virginia.

3.2. *Inducción de la Orquitis Autoinmune Experimental (OAE) en ratas de las cepas Sprague Dawley y Wistar*

Las ratas fueron separadas aleatoriamente en 3 grupos: Normal (N, ratas no tratadas), Control (C) y Experimental (E). Para la inmunización de las ratas del grupo E se utilizó homogenado testicular (HT), preparado como se describió previamente (Doncel y col., 1989). Brevemente, los testículos de ratas de 50-80 días de edad fueron decapsulados, cortados y diluidos en igual volumen de solución salina fisiológica y homogenizados en un Omni mixer por 30 seg, obteniéndose una concentración final de 500 mg/ml (peso húmedo). Las ratas del grupo E fueron inyectadas 3 veces con intervalos de 14 días con una emulsión de HT (200 mg de HT (peso húmedo) en 0.4 ml / dosis / rata) y adyuvante de Freund Completo

conteniendo 1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (AFC, Sigma Chemical Co., MO, EEUU) (0.4 ml / dosis / rata). Las inmunizaciones se realizaron por vía intradérmica en las almohadillas plantares y en múltiples sitios cercanos a los ganglios poplíteos y cervicales. En las primeras dos inmunizaciones se inyectó por vía intravenosa, 10^{10} microorganismos de *Bordetella pertussis* (Bp) (cepa 10536; Instituto Malbrán, Buenos Aires, Argentina), mientras que en la tercera inmunización, 5×10^9 microorganismos de Bp por vía intraperitoneal. Las ratas del grupo C fueron inyectadas en las mismas condiciones que las ratas del grupo E, reemplazando el HT por solución salina fisiológica. Las ratas fueron sacrificadas en distintos períodos de tiempo posteriores a la primera inmunización (7-35, 50-60, 70-110, 120-150 días) y los testículos fueron obtenidos, pesados y procesados según la técnica a utilizar. En algunos experimentos, se obtuvo suero y también, los epidídimos para su estudio histopatológico.

3.3. Histopatología e índice de OAE (rata)

Los testículos y epidídimos fueron fijados en solución de Bouin, deshidratados e incluidos en parafina. La histopatología testicular fue evaluada en cortes obtenidos a 3 niveles diferentes y teñidos con hematoxilina y eosina (H&E).

La descamación del epitelio germinal (acompañada de un infiltrado linfomonocitario peritubular) es la principal característica de la lesión testicular en la OAE. Cuando estudiamos el porcentaje de túbulos seminíferos (TS) que presentaron células germinales descamadas y/o en degeneración (TS "dañados") en las ratas controles y con OAE, observamos que el porcentaje promedio de TS dañados fue mayor en las ratas con OAE severa (70-100 días luego de la primera inmunización) respecto de los animales con OAE focal (50-60 días) (Fig. 1A). En el período 50-60 días, en el cual las ratas del grupo E comienzan a manifestar los cambios histopatológicos característicos de la OAE, existe una gran variabilidad en el porcentaje de TS dañados. En el testículo de los animales del grupo control sacrificados entre los 50-100 días de la primera inmunización raramente se encontraron TS con lesión del epitelio germinal (% TS dañados: 0.6 ± 0.4). De esta manera, el porcentaje de TS dañados refleja los diferentes grados de lesión testicular.

En la OAE, también observamos una disminución en el peso testicular, por ello, para tener en cuenta la lesión en el contexto de todo el testículo y no puntualmente en los cortes histológicos observados, evaluamos el peso testicular, relativizado al peso total del animal (peso corporal). Observamos una disminución en la relación peso testicular / peso corporal (P_T/P_C) promedio en las ratas con orquitis respecto de las controles (Fig. 1B). Este resultado muestra que dicho parámetro es un buen indicador de la lesión testicular. Una relación P_T/P_C menor a 2.5×10^3 (línea punteada, Fig. 1B) se consideró como presencia de daño testicular.

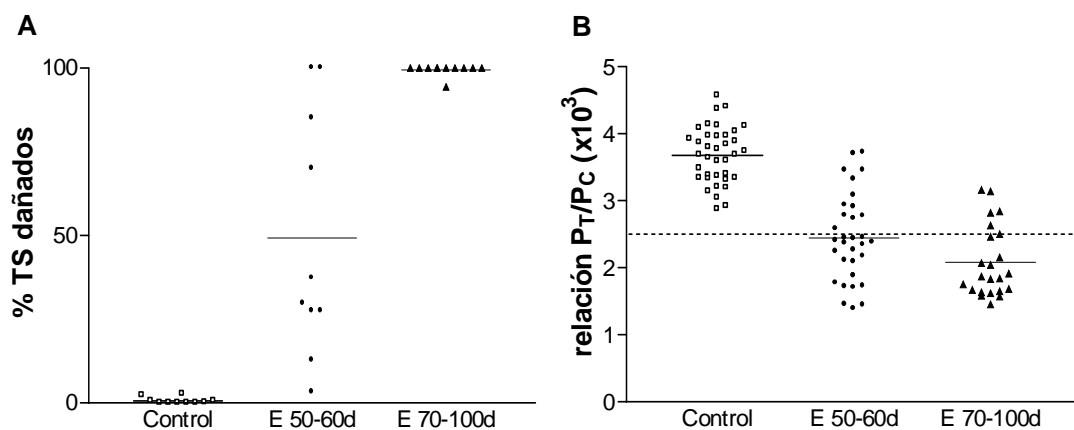


Figura 1. Porcentaje (%) de túbulos seminíferos (TS) dañados (A) y relación peso testicular (P_T) / peso corporal (P_C) (B) en ratas de los grupos Control y Experimental sacrificadas entre los 50-60 ó 70-100 días (d) luego de la primera inmunización. Las líneas horizontales representan el valor promedio. El % de TS dañados fue obtenido cuantificando 100-150 TS/corte, 1-2 cortes/rata y 10 ratas/grupo.

Utilizando los parámetros porcentaje de TS dañados y la relación P_T/P_C , elaboramos un índice de OAE para clasificar los distintos grados de lesión testicular observada en el cuadro de OAE. Este índice fue graduado en una escala del 1 al 10, siendo 10 el máximo daño testicular observado:

$$\text{Índice de OAE} = V + T + P \quad \text{donde,}$$

V es el valor asignado al porcentaje de TS que presentan descamación del epitelio germinal; siendo V = 0 (0-3 %); 1 (3.1-4.9 %); 2 (5-15.9 %); 3 (16-25.9 %); 4 (26-35.9 %); 5 (36-55.9 %); 6 (56-60.9 %); 7 (61-79.9 %); 8 (80-95.9 %) y 9 (96-100 %). T: es un factor que indica la severidad de la lesión del epitelio germinal; vale 0 puntos cuando la descamación es parcial y 0.5 puntos cuando el grado de descamación de

los TS es severo, es decir, cuando solamente células de Sertoli y espermatogonias permanecen adheridas a las paredes de los TS; y P es un factor de 0.5 puntos que se agrega cuando la relación peso testicular / peso corporal es menor que 2.5×10^3 (línea punteada, Fig. 1B).

3.4. Inducción de la OAE en ratón

El HT fue preparado como se describió previamente (Kohno y col., 1983). Brevemente, los testículos de ratones singeneicos fueron decapsulados, homogeneizados, dializados en agua destilada y finalmente liofilizados. Los ratones fueron inmunizados vía subcutánea con una sola dosis de una emulsión de 10 mg de HT (peso seco; hidratado previamente en agua destilada) y AFC (Sigma Chemical Co.) conteniendo 4.5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (DIFCO Laboratories, MI, EEUU). Además, como se describió previamente (Munoz y col., 1982), se inyectó por vía intraperitoneal, 5 μ g de extracto de Bp en el momento de la inmunización y luego de las 24 hs (grupo E). Otro grupo de ratones (grupo C), fue inmunizado con una emulsión de agua destilada y adyuvantes siguiendo el mismo esquema de inmunización utilizado para el grupo E. Ratones normales (N) no tratados también fueron estudiados. Luego de 3 semanas de la inmunización los ratones fueron sacrificados, los testículos removidos y fijados en solución de Bouin para el análisis de la histopatología, o fijados en paraformaldehído al 4% en solución salina fosfato buffereada (PBS) para su posterior congelación y obtención de cortes por crióstato, o procesados para la obtención de las células intersticiales para su análisis por citometría de flujo.

3.5. Histopatología e índice de OAE (ratón)

Los cortes de testículo incluidos en parafina y teñidos con H&E, fueron examinados por el Dr. Tung para la determinación del grado de lesión utilizando el método de doble ciego. El índice de OAE fue graduado en una escala del 1 al 5 como este grupo describió previamente (Mahi-Brown y col., 1989). El grado 1 se asignó cuando se observaron infiltrados linfocitarios focales alrededor de los túbulos rectos; el grado 2 incluyó inflamación moderada que involucra la rete testis y/o los conductos eferentes con o sin dilatación moderada de los túbulos seminíferos. Grado 3 fue asignado cuando la inflamación moderada de la rete testis y/o de los

conductos eferentes estaba acompañada por una dilatación significativa de los túbulos seminíferos. Grado 4 fue caracterizado por severa inflamación de los conductos eferentes y/o rete testis, dilatación de los túbulos seminíferos con o sin orquitis y/o aspermatogénesis. Grado 5 representó la más severa patología incluyendo inflamación severa del testículo con necrosis, dilatación de los túbulos seminíferos y aspermatogénesis.

3.6. Depleción de macrófagos *in vivo*

La eliminación de macrófagos mediante el uso de liposomas que contienen diclorometilfosfonato (clodronato) es una técnica específica y validada que se utiliza desde hace varios años en distintos modelos *in vivo* (van Rooijen y van Kesteren-Hendriks, 2002). Los liposomas son fagocitados por los macrófagos y cuando el clodronato alcanza cierta concentración a nivel intracelular, induce la apoptosis de los macrófagos (Naito y col., 1996; van Rooijen y col., 1996). Los liposomas no atraviesan el endotelio de los vasos sanguíneos, de esta forma, dependiendo de la vía de administración de los mismos, pueden eliminarse selectivamente los macrófagos de diferentes órganos (van Rooijen, 1989). Para descartar el efecto de los liposomas *per se*, se utilizan, como control, liposomas que contienen PBS. Empleamos esta metodología para evaluar el papel de los macrófagos testiculares en el desarrollo de la OAE. Un grupo de ratas Sprague-Dawley fue inmunizado con HT y AFC siguiendo el esquema de inmunización para las ratas E indicado en la sección 3.2. Dichas ratas fueron inyectadas por vía *ip* con 2 ml de una suspensión de liposomas conteniendo clodronato (grupo Clodronato, n=10) o PBS (grupo PBS, n=5), 2 veces por semana desde el día 0 y hasta el día 56 luego de la primera inmunización. En ese momento, se sacrificaron los animales y los testículos fueron obtenidos y pesados. Uno de los testículos fue fijado en solución de Bouin para el análisis de la histopatología como se indica en la sección 3.3. y el otro testículo fue congelado y procesado para inmunohistoquímica a fin de detectar y cuantificar los macrófagos (ED1+ y ED2+) y células dendríticas OX62+, como se describe en las secciones 3.11. y 3.12.

3.7. Aislamiento de macrófagos testiculares y obtención del medio condicionado (MCM)

El método de aislamiento utilizado 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 hasta que los tejidos estuvieran pálidos. Los testículos, previamente decapsulados, fueron incubados con colagenasa tipo I (0.3 mg/ml, Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ, EEUU) en PBS conteniendo albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1% (Sigma Chemical Co.) durante 15 min en un baño a 34°C con agitación. Luego de inactivar la colagenasa por dilución con PBS a 4°C, los túbulos seminíferos sedimentaron y el sobrenadante fue recogido y centrifugado a 300 x g durante 5 min a 4°C. El pellet (conteniendo las células intersticiales) fue resuspendido en PBS y las células fueron sembradas sobre placas de Petri de 35 mm de diámetro o sobre cubreobjetos colocados en placas de 24 hoyos e incubadas durante 2 hs a 34°C en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂. Después de varios lavados con PBS para eliminar las células contaminantes no adheridas (fundamentalmente células de Leydig, germinales, endoteliales y fibroblastos), las células adheridas fueron cultivadas en Medio 199 (M199, Sigma Chemical Co.) suplementado con una solución antibiótica-antimicótica (penicilina G (100 U/ml); estreptomycin (100 g/ml); anfotericina B (0.25 g/ml), Gibco, CA, EEUU) por 20 hs a 34°C en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂ o fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS durante 15 min para técnicas de inmunofluorescencia. La pureza de la suspensión de macrófagos fue del 90-95%, evaluada por el recuento de macrófagos testiculares que incorporaron azul tripán o bolitas de látex (0,81 µm de diámetro, DIFCO Lab.) y por el recuento de macrófagos inmunoreactivos para ED1+ED2 (inmunohistoquímica).

3.8. Aislamiento y cultivo de segmentos de túbulos seminíferos (STS)

Los testículos de ratas normales (50-60 días de edad) fueron decapsulados y colocados en una cápsula de Petri conteniendo Dulbecco's Modified Eagle's Medium-nutrient mixture F12 (DMEM/F12, Gibco), como se describió previamente (Parvinen y Ruokonen, 1982). Utilizando un estereomicroscopio de transiluminación se identificaron y se cortaron los segmentos de túbulos seminíferos (STS) de 2 mm de largo aproximadamente. Luego, los STS fueron transferidos a placas de 96 hoyos en

90 μ l de DMEM/F12 suplementado con L-glutamina (2 mM, Sigma Chemical Co.), insulina, transferrina y selenito A (ITS-A, 1X, Gibco), lactato de sodio (1mM, Sigma Chemical Co.) y una solución antibiótica antimicótica (penicilina G (100 U/ml); estreptomina (100 g/ml); anfotericina B (0.25 g/ml), Gibco). A cada hoyo con 2 STS, se agregaron 90 μ l de DMEM/F12 suplementado solo o conteniendo IL-6 recombinante humana (concentración final: 50 ng/ml, Promega, WI, EEUU). Los STS fueron incubados por 18 hs a 34°C en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂. Luego, las células germinales de los STS fueron obtenidas según el método previamente descrito (Erkkila y col., 1997). Brevemente, los STS fueron aplastados ("squash") sobre un portaobjetos utilizando un cubreobjetos. La viabilidad celular fue evaluada por el método de exclusión de azul tripán y la apoptosis mediante la técnica de TUNEL descrita en la sección 3.17.

3.9. Cultivo de células germinales y evaluación de la viabilidad celular por MTS

Los testículos de ratas normales (50-60 días de edad) fueron decapsulados y tratados con colagenasa tipo I (0.3 mg/ml, Worthington) en PBS conteniendo BSA al 0.1% durante 15 min a 34°C en un baño con agitación. Luego de inactivar la enzima por dilución con PBS, se permitió que los túbulos seminíferos sedimentaran para luego lavarlos 3 veces con medio DMEM/F12. Luego de la dispersión mecánica de los túbulos seminíferos utilizando pipetas Pasteur, los restos celulares fueron eliminados haciendo pasar la suspensión celular a través de una malla fina de acero inoxidable con gaza estéril. Las células germinales aisladas fueron sembradas (100.000 células/hoyo/50 μ l) en placas de 96 hoyos en DMEM/F12 (suplementado como se indica en la sección 3.8.). En cada hoyo, se agregaron 50 μ l de medio suplementado solo o conteniendo IL-6 (concentración final: 50 ng/ml). Las células se incubaron durante 18 hs a 34°C en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂. La viabilidad celular fue evaluada utilizando el ensayo colorimétrico MTS (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, este método se basa en el clivaje de la sal de tetrazolium (bromuro de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-yl]-2,5 difeniltetrazolium) por la actividad deshidrogenasa de varias enzimas mitocondriales de las células vivas obteniéndose un producto de formazán soluble en el medio de cultivo. La cantidad de producto de formazán medido por la cantidad de absorbancia a 490 nm es

directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo. La densidad óptica (DO) fue leída a 490 nm en un lector de placa (BioRad, CA, EEUU).

3.10. *Cultivo mixto leucocitario*

Esta técnica permite evaluar la proliferación de linfocitos T en respuesta a aloantígenos que se encuentran en las células presentadoras de antígeno (CPA) de animales de diferentes cepas.

Para este ensayo obtuvimos CPA (macrófagos testiculares) de ratas Sprague Dawley y linfocitos de ganglios (poplíteos y cervicales) de ratas Wistar. Los macrófagos testiculares fueron obtenidos como se describe en la sección 3.7. con algunas modificaciones. Luego de los lavados para remover las células no adheridas, los macrófagos testiculares fueron despegados de la superficie del plástico por el agregado de EDTA al 0.2 % y extenso pipeteo. Las células fueron lavadas, resuspendidas en medio DMEM/F12 + SFB al 5% e irradiadas a 3500 rad. Luego de un lavado, las células se resuspendieron en medio completo (DMEM/F12 suplementado con suero normal de ratas Wistar al 5%, L-Glutamina (2 mM, Sigma), antibióticos-antimicóticos (Gibco) y 2-β Mercaptoetanol (50 μM, BioRad)) y fueron contadas en cámara de Neubauer en presencia de azul tripán.

Los linfocitos de ganglios poplíteos y cervicales fueron obtenidos presionando los ganglios contra una malla fina de acero inoxidable en presencia de medio DMEM/F12 suplementado con SFB al 5%. La suspensión celular obtenida fue centrifugada y resuspendida en DMEM/F12 suplementado con SFB al 5%, L-glutamina (2mM) y antibióticos-antimicóticos. El número de células viables fue cuantificado en cámara de Neubauer en presencia de azul tripán. Las células fueron enriquecidas en linfocitos T por el pasaje a través de una columna conteniendo lana de vidrio previamente hidratada con medio DMEM/F12 suplementado como se describió previamente (Mahi-Brown y col., 1987) y luego de un lavado, se resuspendieron en medio completo. Se sembraron 10^5 linfocitos y 10^3 - 2×10^4 macrófagos testiculares por hoyo para lograr las siguientes proporciones de CPA:linfocitos: 1:5, 1:50 y 1:100. A su vez, se cultivaron linfocitos y CPA por separado como control de proliferación basal. La proliferación celular fue cuantificada por incorporación de ^3H -timidina (Servicio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas "José de San Martín, Buenos Aires).

3.11. *Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia*

Los anticuerpos empleados para identificar las moléculas estudiadas en el testículo de rata y ratón se describen en las Tablas 3A y 3B, respectivamente. Se utilizó la técnica de inmunoperoxidasa indirecta amplificada mediante el sistema avidina-biotina- peroxidasa (ABC) y la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Brevemente, se utilizaron cortes obtenidos por crióstato (6 ó 7 μm de espesor) o cortes fijados en solución de Bouin e incluidos en parafina según la molécula a identificar (Tabla 3C). Los preparados fueron lavados con PBS e incubados con la solución de bloqueo correspondiente (Tabla 3C) durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, la unión a la biotina endógena fue bloqueada con una solución de avidina-biotina (Vector Lab, CA, EEUU). La incubación con los anticuerpos primarios se realizó en cámara húmeda según los tiempos y concentraciones indicadas en la Tabla 3C. Luego de un lavado en PBS, los cortes fueron incubados con el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado (Tabla 3C) durante 30 min a temperatura ambiente. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada incubando los cortes con H_2O_2 al 0.3 % en metanol durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción fue amplificada mediante el kit ABC elite Vectastain (Vector Lab.) utilizando H_2O_2 como sustrato de la peroxidasa y 3-3´diaminobenzidina (DAB) como cromógeno (Vector Lab.). Los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina o con azul de metileno. Para los marcadores de rata OX62 y CD11c y para los utilizados en ratón, la reacción se intensificó con OsO_4 al 0.05% durante 1 min. La detección de las células dendríticas en los cortes de testículo de ratón mediante el anticuerpo CD11c, fue realizada utilizando el método de amplificación de la Tiramida (Perkin Elmer, MA, EEUU). Brevemente, luego de la reacción con los anticuerpos primarios y secundarios como se indica arriba, los cortes fueron incubados con el complejo estreptoavidina-peroxidasa (1:100) durante 30 min a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados en PBS, se agregó la tiramida biotinilada (1:100) durante 6 min a temperatura ambiente. Finalmente, se utilizó el fluorocromo Cy3 conjugado a la streptoavidina (1:400). Los controles negativos fueron realizados incubando los cortes con PBS en lugar del anticuerpo primario. Como control adicional de la inmunoreacción para IL-6, los cortes de testículo fueron incubados con el anticuerpo anti IL-6 (PeproTech) previamente absorbido con una

concentración 50 veces mayor de IL-6 recombinante humana (Promega) en las mismas condiciones utilizadas para el anticuerpo sin pre-absorción.

Tabla 3A. Anticuerpos utilizados para las técnicas de inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia (rata)

| Nombre | Especificidad | Tipo de anticuerpo | Procedencia |
|-------------|---------------------------------------|--------------------|---------------|
| CD11c | CD y algunas células mieloides | Monoclonal | Serotec |
| CD80 (B7-1) | Molécula co-estimuladora | Policlonal | Santa Cruz |
| CD86 (B7-2) | Molécula co-estimuladora | Monoclonal | BD Pharmingen |
| ED1 | Monocitos/Macrófagos circulantes y CD | Monoclonal | BD Pharmingen |
| ED2 | Macrófagos residentes | Monoclonal | BD Pharmingen |
| IL-6 | Interleuquina-6 | Policlonal | Peptotech |
| IL-6 | Interleuquina-6 | Policlonal | R&D Systems |
| IL-6R | Receptor de la IL-6 | Policlonal | Santa Cruz |
| CMH II | Moléculas del CMH II | Monoclonal | BD Pharmingen |
| OX62 | CD y linfocitos T $\gamma\delta$ | Monoclonal | Serotec |

CD: células dendríticas, CMH II: complejo mayor de histocompatibilidad clase II

Tabla 3B. Anticuerpos utilizados para las técnicas de inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia (ratón)

| Nombre | Especificidad | Tipo de anticuerpo | Procedencia |
|--------|---------------------|--------------------|---------------|
| F4/80 | Macrófagos | monoclonal | Caltag |
| CD11c | Células dendríticas | monoclonal | BD Pharmingen |
| CD3 | Linfocitos T | monoclonal | Cedarlane |

Tabla 3C. Condiciones utilizadas para las técnicas de inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia.

| Nombre | T | Bloqueo | Primer Anticuerpo* | Segundo Anticuerpo |
|-------------|---|---------------|--------------------|---------------------------------|
| CD3 | 2 | BSA 10% | 20 µg/ml (20 hs) | Anti hamster en cabra (7 µg/ml) |
| CD11c | 3 | SNH 5%+BSA 5% | 17 µg/ml (20 hs) | Anti ratón en caballo (4 µg/ml) |
| CD11c** | 2 | BSA 10% | 5 µg/ml (20 hs) | Anti hamster en cabra (7 µg/ml) |
| CD80 | 1 | BSA 10% | 4 µg/ml (20 hs) | Anti cabra en conejo (4 µg/ml) |
| CD86 | 1 | BSA 10% | 4 µg/ml (20 hs) | Anti ratón en caballo (2 µg/ml) |
| ED1 | 1 | SNH 3% | 10 µg/ml (1 h) | Anti ratón en caballo (2 µg/ml) |
| ED2 | 1 | SNH 3% | 5 µg/ml (1 h) | Anti ratón en caballo (2 µg/ml) |
| F4/80 | 2 | BSA 10% | 10 µg/ml (20 hs) | Anti rata en conejo (7 µg/ml) |
| IL-6 | 4 | SNG 1.5% | 1:150 (1 h) | Anti conejo en cabra (4 µg/ml) |
| IL-6R | 4 | SNG 1.5% | 2 µg/ml (1h) | Anti conejo en cabra (4 µg/ml) |
| Neutrófilos | 2 | BSA 10% | 1 µg/ml (20 hs) | Anti rata en conejo (7 µg/ml) |
| OX6 | 1 | BSA 10% | 2 µg/ml (20 hs) | Anti ratón en caballo (2 µg/ml) |
| OX62 | 3 | SNH 5%+BSA 5% | 13 µg/ml (20 hs) | Anti ratón en caballo (4 µg/ml) |

T: tipo de corte utilizado: 1: crióstato, fijado en acetona; 2: crióstato, fijado en paraformaldehído al 4% en PBS; 3: crióstato, fijado en metanol y 4: parafina, fijado en solución de Bouin. *Concentración y tiempo de incubación, **CD11c: anticuerpo anti ratón. SNH: suero normal de caballo, SNG: suero normal de cabra

3.12. Inmunofluorescencia de doble marcación

Esta técnica fue empleada para detectar la expresión de IL-6 en macrófagos testiculares ED1+ y/o ED2+ y para la localización de marcadores leucocitarios (F4/80, CD11c) en cortes de testículo de ratón. Los macrófagos testiculares aislados, como se describe en el punto 3.7, fueron permeabilizados con Tritón X-100 al 0.1% en PBS. Los sitios de unión no específica se bloquearon con suero normal de cabra al 5% en BSA al 3% durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, las células fueron incubadas con el anticuerpo anti IL-6 de rata desarrollado en conejo (1:50, Peprotech) durante 1 h a temperatura ambiente seguido de un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con rodamina (1:100, Chemicon, CA, EEUU) diluido en suero normal de rata al 5% en PBS. Luego, las células fueron incubadas con los anticuerpos

ED1 o ED2 (Tabla 3C) seguidos de un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, 1:50, Vector Lab.). En los cortes de testículo de ratón, los macrófagos fueron identificados mediante el anticuerpo F4/80 y las células dendríticas con el anticuerpo CD11c. Además, se utilizó un anticuerpo anti α -actina, marcador de células del músculo liso y de las células peritubulares del testículo, para la identificación de los túbulos seminíferos. Las condiciones utilizadas para los anticuerpos F4/80 y CD11c se indican en la Tabla 3C. El anticuerpo anti α -actina, conjugado con FITC (1:600, Sigma) fue incubado durante 1 h y revelado con un segundo anticuerpo anti FITC desarrollado en cabra (Vector Lab.). Por último, se utilizó un anticuerpo anti cabra conjugado con FITC (Sigma). Para los controles negativos, los primeros anticuerpos fueron omitidos y reemplazados por PBS. Las células se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Axiophot, Zeiss, Alemania).

3.13. Cuantificación de células inmunoreactivas

Las células germinales IL-6R⁺ fueron contadas por túbulo seminífero utilizando un objetivo de 25x en 100 túbulos seminíferos/corte y en 3 cortes (no seriados) / rata.

El recuento de las células inmunoreactivas para ED1, ED2, OX62 y CD11c fue realizado por técnicas estereoscópicas utilizando un objetivo de 25x y un ocular de 12.5x con una grilla de área conocida ($961000 \mu\text{m}^2$). Se contaron 40-50 grillas por corte y 2-3 cortes por animal. Dada la disminución del peso testicular y el incremento en el número de células intersticiales observado en las ratas con OAE (Suescun y col., 1994), se consideró importante expresar el número de células inmunoreactivas por testículo. Para ello, se utilizó la fórmula de Floderus (Floderus, 1944) con la cual es posible determinar el número de células inmunoreactivas por unidad de volumen testicular (N_v), así: $N_v = N_a / (D + T - 2h)$, donde N_a , es el número de células contadas por superficie, D , el diámetro nuclear promedio, T , el espesor del corte de crióstato y h ($=D/10$), un factor de corrección para el cálculo del diámetro nuclear. Los diámetros nucleares promedio fueron (μm ; media \pm ESM): para **ED1**: N: 5.09 ± 0.20 , C: 4.76 ± 0.31 , E: 5.25 ± 0.20 ; y **ED2**: N: 5.37 ± 0.20 , C: 5.61 ± 0.07 , E: 5.89 ± 0.12 ; y para **OX62** y **CD11c**: N y C: 6.60 ± 0.44 , E: 7.20 ± 0.49 . Luego, se calculó el número de células inmunoreactivas por testículo multiplicando el N_v por el volumen

testicular. El volumen testicular fue obtenido como se describió previamente (Suescun y col., 1994).

3.14. Citometría de flujo

Los testículos de ratas y ratones N, C y E fueron decapsulados y las células intersticiales fueron obtenidas por digestión con colagenasa tipo I (0.3 mg/ml, 15 min en baño a 34°C en agitación). La actividad enzimática fue inhibida por dilución con PBS a 4°C y los túbulos seminíferos se dejaron sedimentar. El sobrenadante (conteniendo las células intersticiales y células germinales contaminantes) fue centrifugado a 300 x g durante 10 min a 4°C. Los glóbulos rojos fueron lisados por incubación con un buffer de lisis (NH₄Cl 0.16 M, Tris-HCl 0.17 M, pH:7.2) durante 5 min a temperatura ambiente. Luego de un lavado con PBS, las células fueron resuspendidas en buffer de citometría de flujo (buffer CF, azida al 0.1%, SFB al 5%, EDTA 2 mM en PBS), contadas en cámara de Neubauer en presencia de azul tripán y sembradas en tubos de citometría (1x10⁶ células/tubo). Todas las incubaciones fueron realizadas a 4°C y los anticuerpos fueron incubados por períodos de 30 min; se realizó luego un lavado con el agregado de 1 ml de buffer CF y posterior centrifugación a 300 x g durante 10 min a 4°C. Los anticuerpos utilizados se indican en las Tablas 4A (rata) y 4B (ratón). Para detectar los anticuerpos ED1, ED2 y OX62 (rata) se utilizó un segundo anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con FITC. Los controles de isotipo, se realizaron con las siguientes inmunoglobulinas (Ig): IgG_{1,k} de ratón, IgG_{1,k} de ratón conjugadas con PE o con PE-Cy5. Luego de la tinción, las células fueron fijadas y mantenidas en paraformaldehído al 2% en PBS hasta el momento de su pasaje por el citómetro. El anticuerpo ED1 identifica un antígeno citoplasmático, por lo tanto se realizó una tinción intracelular. Brevemente, las células se fijaron en paraformaldehído al 2% en PBS durante 15 min a 4°C y luego de un lavado con buffer CF, fueron incubadas con el anticuerpo ED1 diluido en buffer saponina (saponina al 0.1% en PBS) durante 30 min a 4°C. Las incubaciones y lavados subsiguientes fueron realizados en buffer saponina. Se adquirieron 20-30.000 eventos CD45+ utilizando el citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) del Servicio de Inmunogenética (Hospital de Clínicas "José de San Martín", Buenos Aires) o del laboratorio del Dr. Tung (Universidad de Virginia, VA, EEUU). Para el análisis de los datos (mediante los programas informáticos WinMDI y FlowJo), primero se determinó

la región de células CD45+ y luego dentro de esta población celular, se estudiaron los otros marcadores indicados en las Tablas 4A y B.

Tabla 4A. Anticuerpos utilizados para citometría de flujo (rata)

| Nombre | µg/ml ^(§) | Especificidad | Fluorocrom o conjugado | Procedencia |
|--------|----------------------|---------------------------------------|------------------------|------------------|
| CD45 | 0.7 | Antígeno común de leucocitos | PE-Cy5 | BD Pharmingen |
| CD80 | 10.0 | Molécula co-estimuladora | PE | BD Pharmingen |
| CD86 | 10.0 | Molécula co-estimuladora | PE | BD Pharmingen |
| ED1 | 6.3 | Monocitos/Macrófagos circulantes y CD | FITC (*) | BD Pharmingen |
| ED2 | 2.1 | Macrófagos residentes | FITC (*) | BD Pharmingen |
| CMH II | 3.3 | Moléculas del CMH II | PE | BD Pharmingen |
| OX62 | 10.0 | CD y linfocitos T $\gamma\delta$ | FITC (*) | Serotec |

(*) Se utilizó un segundo anticuerpo conjugado con FITC, (§): concentración utilizada para 1×10^6 células/tubo/50 µl). CD: células dendríticas, CMH II: complejo mayor de histocompatibilidad clase II.

Tabla 4B. Anticuerpos utilizados para citometría de flujo (ratón)

| Nombre | $\mu\text{g/ml}^{(\$)}$ | especificidad | Fluorocromo utilizado | Procedencia |
|------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------|---------------|
| CD45 | 0.01 | Antígeno común de leucocitos | Cychrome™ (*) | BD Pharmingen |
| CD11c | 1.0 | CD | PE | BD Pharmingen |
| CD80 | 0.33 | Molécula co-estimuladora | PE | BD Pharmingen |
| CD86 | 0.33 | Molécula co-estimuladora | PE | BD Pharmingen |
| F4/80 | 1.0 | Macrófagos | FITC | Caltag |
| I-A ^k | 0.05 | Moléculas del CMH II | PE | BD Pharmingen |

(*) Se utilizó un anticuerpo anti CD45 biotinilado, seguido del complejo estreptoavidina conjugado con Cychrome™. (§): concentración utilizada para 1×10^6 células/tubo/50 μl). CD: células dendríticas, CMH II: complejo mayor de histocompatibilidad clase II.

3.15. Determinación de $\text{IFN}\gamma$, IL-6, IL-10 y $\text{TGF}\beta$.

Se utilizaron kits comerciales de ELISA tipo "sandwich" (IL-6: R&D Systems (MN, EEUU) y Biosource (CA, EEUU) para las otras citoquinas). Las muestras (suero y MCM testiculares) obtenidas de ratas del grupo C y E sacrificadas a diferentes tiempos luego de la primera inmunización fueron medidas por duplicado. El límite de detección para cada citoquina fue el siguiente: IL-6 <10 pg/ml, IL-10 <5 pg/ml, $\text{IFN}\gamma$ <13 pg/ml y $\text{TGF}\beta$ <15.6 pg/ml. Todos los procedimientos se siguieron según las instrucciones del fabricante.

3.16. Determinación de GM-CSF

Se empleó un ELISA tipo "sandwich". El anticuerpo de captura anti GM-CSF de rata (8 $\mu\text{g/ml}$, BD Pharmingen) diluído en buffer bicarbonato 0.02M (pH: 9.6) fue incubado en una placa de 96 hoyos (Maxisorp, Nunc, Alemania) durante 20 hs a 4°C. Luego de 3 lavados con buffer PBST (Tween 20 al 0.05% en PBS, pH:7), la unión inespecífica fue bloqueada por el agregado de BSA al 1% en PBS durante 2 hs a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados en PBST, los MCM testiculares (100

μl/hoyo) fueron sembrados e incubados durante 20 hs a 4°C. Paralelamente, diluciones seriadas al medio de GM-CSF recombinante de rata (15-2000 pg/ml) fueron incubadas para obtener una curva standard. Luego de 3 lavados con PBST, el anticuerpo de detección biotinilado anti GM-CSF de rata (4 μg/ml, BD Pharmingen) fue incubado durante 2 hs a temperatura ambiente. Posteriormente, luego de 4 lavados, la estreptoavidina conjugada con fosfatasa alcalina (1:200, Vector Lab.) diluída en Hepes 10 mM, NaCl 0.15M, BSA 0.1 mg/ml (pH: 7.5) fue incubada durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de 4 lavados con PBST y un lavado de 3 min con buffer dietanolamida (dietanolamida 1M, MgCl₂ 0.5 mM, pH:9.5), el sustrato (p-Nitrofenil fosfato, Sigma) fue agregado e incubado hasta el desarrollo de color. La reacción fue bloqueada con EDTA 0.1M (pH: 7.5) y la absorbancia fue leída en un lector de placa a 415 nm.

3.17. Determinación de la apoptosis

Los STS fueron obtenidos de las zonas oscuras de los túbulos seminíferos (correspondientes a los estadios del epitelio germinal VII-VIII) como se describe en la sección 3.8. Se utilizó la técnica de TUNEL (“Terminal transferase ddUTP nick end labeling”) para evaluar la apoptosis en las células germinales. Luego del período de cultivo, los STS fueron aplastados y fijados como se describió previamente (Erkkila y col., 1997). Brevemente, luego de aplastar los STS con un cubreobjetos y remover el exceso de líquido con papel de filtro, los “squashes” fueron congelados durante 5 min utilizando hielo seco. Luego de remover el cubreobjeto, las células fueron fijadas de la siguiente manera: etanol (3 seg, 4°C), formol al 10% en PBS (10 min, temperatura ambiente), etanol:acético (2:1, 5 min, -20°C). Luego de 2 lavados en PBS, las células se deshidrataron por pasajes en alcoholes, se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron en freezer de -70°C hasta su uso. Los “squashes” fueron irradiados en un horno a microondas a 370 W durante 5 min en buffer citrato de sodio 10 mM (pH:6.0) y posteriormente permeabilizados con Tritón X-100 al 0.1% en citrato de sodio al 0.1% durante 5 min a 4°C. La unión inespecífica fue bloqueada por la incubación con solución bloqueante (blocking reagent al 5% (Roche) en 150 mM NaCl y 100 mM de ácido maleico (pH:7.5) durante 30 min a temperatura ambiente. Luego de una incubación de 10 min con el buffer de reacción de la enzima dioxinucleotidil transferasa terminal (TdT) (buffer TdT, 1x, Roche) y CoCl₂ (1x, Roche), los extremos

3´ libres, generados en el ADN por la actividad de las endonucleasas endógenas, fueron marcados con el nucleótido dideoxi-uridina trifosfato (dd-UTP) conjugado con digoxigenina (4 μ M Dig-dd-UTP; Roche) empleando la enzima TdT (0.17 U/ml, Roche) diluida en buffer A durante 1 h a 37°C. En los controles negativos, la enzima TdT fue reemplazada por el mismo volumen de agua destilada. Las preparaciones fueron bloqueadas con solución de bloqueo (blocking reagent al 2% en 150 mM NaCl y 100 mM ácido maleico, pH:7.5) durante 30 min a temperatura ambiente, seguida por la detección de los Dig-dd-UTP con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche) durante 2 hs a temperatura ambiente. Los "squashes" fueron lavados y la actividad de la fosfatasa alcalina endógena fue bloqueada utilizando 1 mM de levamisol (Sigma Chemical Co.) diluido en Tris-HCl 100mM, NaCl 100mM, MgSO₄ 50 mM (pH:9.5). Luego, los sustratos de la fosfatasa alcalina (5-bromo-4-cloro-3indolyl-fosfato; NBT/BCIP), fueron agregados. La reacción se detuvo luego de los 60 min por lavados con buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH:8). La contratinción se realizó con eosina y hematoxilina suave y luego, los "squashes" fueron deshidratados y montados. El número de células TUNEL+ fue cuantificado en 5-10 campos por squash. Cada squash fue representativo de 1 hoyo (cada uno con 2 STS). En 2 experimentos independientes, 3 squashes se cuantificaron en cada uno de ellos.

3.18. Análisis estadístico

Los datos están expresados como la media \pm error estándar de la media (ESM). Para el análisis estadístico, se utilizaron tests paramétricos (ANOVA de 1 y 2 factores, test "t" de Student) y no paramétricos (test de la mediana, de ANOVA de Kruskal Wallis, de Mann Whitney) según la distribución de los datos. Los tests estadísticos empleados se indican en las leyendas de las figuras y tablas en la sección "Diseño experimental y resultados". Las diferencias fueron consideradas significativas a un valor de $p < 0.05$.

4. Diseño Experimental y Resultados

4. Diseño Experimental y Resultados

4.1. La OAE en la rata: histopatología

Como se describió previamente (Doncel y col., 1989), entre los 50-60 días posteriores a la primera inmunización, el 80% de los animales inmunizados con HT y adyuvantes desarrollaron orquitis, caracterizada por la presencia de un infiltrado intersticial moderado, rico en linfocitos y monolitos/macrófagos y de localización peritubular. Escasos a nulos polimorfonucleares fueron observados en el intersticio testicular y en la luz de los vasos sanguíneos. En general, los túbulos seminíferos rodeados por un infiltrado linfomonocitario adyacente, presentaban descamación del epitelio germinal de distinto grado, siendo los espermatocitos y las espermátides, las células más afectadas (OAE focal, Fig. 2B). La aparición en los túbulos seminíferos de espermatocitos y espermátides con signos de degeneración es un fenómeno que precede al aumento del número de las células germinales descamadas presentes en la luz de los túbulos epididimarios (Theas y col., 2003). A partir de los 70 días de la primera inmunización (OAE severa, Fig. 2C), la incidencia de la OAE alcanzó el 97%, observándose un incremento de la densidad celular del infiltrado intersticial con la misma composición y similar localización que la observada durante la lesión focal. Los leucocitos nunca fueron observados en el interior de los túbulos seminíferos. Los cambios a nivel del intersticio se acompañaron de alteraciones en el epitelio germinal: la descamación de células germinales se extendió a la mayoría de los túbulos seminíferos siendo más severa, ya que sólo células de Sertoli y espermatogonias permanecían adheridas a las paredes de los túbulos seminíferos (Fig. 2C). Ninguna de las ratas sacrificadas entre los 7-30 días posteriores a la primera inmunización o de los grupos N y C mostraron alteraciones patológicas del testículo (Fig. 2A). Los animales del grupo E que no desarrollaron orquitis luego de los 50 días de la primera inmunización no fueron estudiados.

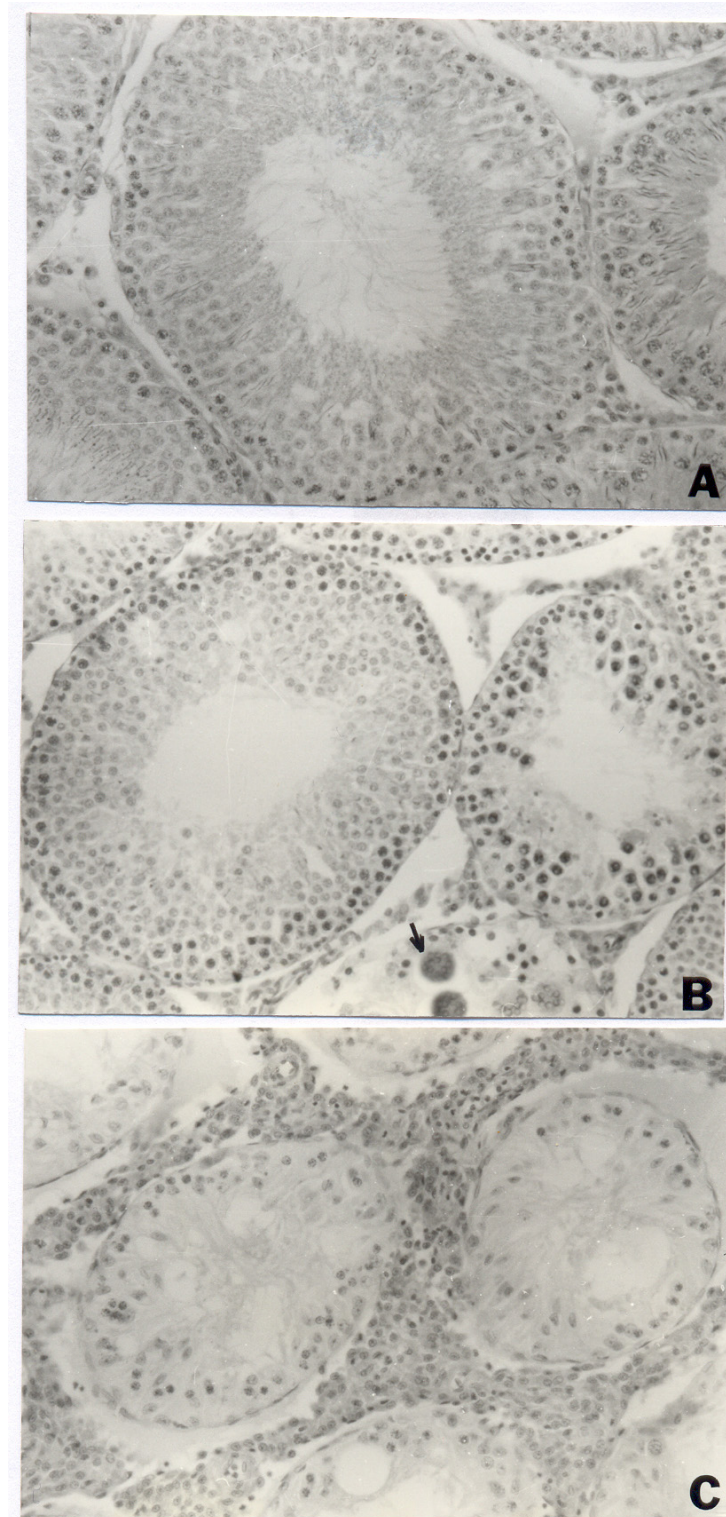


Figura 2. Histopatología testicular. Cortes de testículo teñidos con H&E correspondientes a una rata del grupo control (A) o con orquitis: focal (B) y severa (C). Las ratas controles mostraron una histología normal de los túbulos seminíferos y del intersticio (A). En B se observa un daño focal involucrando principalmente dos túbulos seminíferos con descamación parcial del epitelio germinal y degeneración de células germinales (flecha). En C se observa descamación severa del epitelio germinal en la mayoría de los túbulos seminíferos y abundante infiltrado celular intersticial. Es de notar el menor diámetro de los túbulos seminíferos mostrando una severa atrofia de los mismos. X180.

2003). Por lo tanto, la aparición de células germinales inmaduras en el epidídimo es un indicador de daño testicular.

La OAE en ratas de la cepa Wistar mostró las mismas alteraciones en la histopatología testicular que las ratas Sprague-Dawley en cuanto a la presencia de un infiltrado linfomonocitario intersticial y la descamación del epitelio germinal. Sin embargo, a diferencia de las ratas Sprague-Dawley, el peso testicular se redujo en similar medida durante los períodos 50-60 y 70-100 días luego de la primera inmunización (Tabla 5). Además, la presencia de granulomas (signo de una lesión testicular más severa) fue más abundante y frecuente en las ratas de la cepa Wistar desde el período 50-60 días. Estas observaciones indican que las ratas Wistar desarrollan OAE severa más tempranamente.

Tabla 5. Pesos testiculares (g.) de ratas de las cepas Sprague-Dawley y Wistar de los grupos normal, control y OAE.

| Grupo | Sprague-Dawley | Wistar |
|-----------------|----------------------------|--------------------------|
| Normal | 1.77 ± 0.04 | 1.74±0.07 |
| Control 50-60d | 1.70 ± 0.03 | 1.61±0.04 |
| OAE 50-60d | 1.29 ± 0.03 ^a | 0.88±0.06 ^{a,c} |
| Control 70-100d | 1.74 ± 0.03 | 1.67±0.10 |
| OAE 70-100d | 0.91 ± 0.03 ^{a,b} | 0.87±0.05 ^a |

50-60 y 70-100 días (d) posteriores a la primera inmunización. Los datos están expresados como la media ± ESM. n = 5-7 ratas/grupo/cepa. a: p<0.05 vs. respectivo grupo N y C, b: p<0.05 vs. respectivo grupo OAE 50-60d, c: p<0.05 vs. grupo OAE 50-60d de la cepa Sprague-Dawley (Test de la mediana).

4.2. La OAE en ratón: histopatología

Como se describió previamente (Mahi-Brown y col., 1987), la incidencia de la OAE en ratones de las cepas B6AF1 y B6 es del 90-100%. En la OAE focal, caracterizada por un índice de 1-2, los focos de infiltrados de tipo linfomononuclear comienzan a aparecer luego de las 2 semanas de la inmunización, fundamentalmente en la zona subalbugínea. A su vez, se observan alteraciones del epitelio germinal en las mismas regiones. Posteriormente, en la OAE severa, el infiltrado celular y el daño del epitelio germinal se extiende a todo el testículo (Fig. 4), con la aparición de células polimorfonucleares, fundamentalmente neutrófilos, que se observan en el intersticio y también en el interior de los túbulos seminíferos (Fig. 4A).

Los macrófagos y linfocitos también invaden el testículo pero, a diferencia de los neutrófilos, se localizan fundamentalmente en el intersticio testicular (Fig. 4B y C). Cabe aclarar que para este trabajo de tesis, se utilizaron ratones del grupo E que desarrollaron OAE severa (índice OAE: 3-5). Al igual que en la rata, las células germinales mueren por apoptosis y se descaman del epitelio seminífero, mientras que ninguno de los ratones de los grupos N y C mostraron alteraciones patológicas del testículo. El índice de OAE que se presenta en el caso del ratón, es de tipo cualitativo, ya que la evaluación de la histopatología fue realizada siempre por el mismo observador y descrita de la misma manera en numerosos trabajos previos del mismo investigador (Dr. K. Tung, referencias: Kohno y col., 1983, Mahi-Brown y col., 1989).

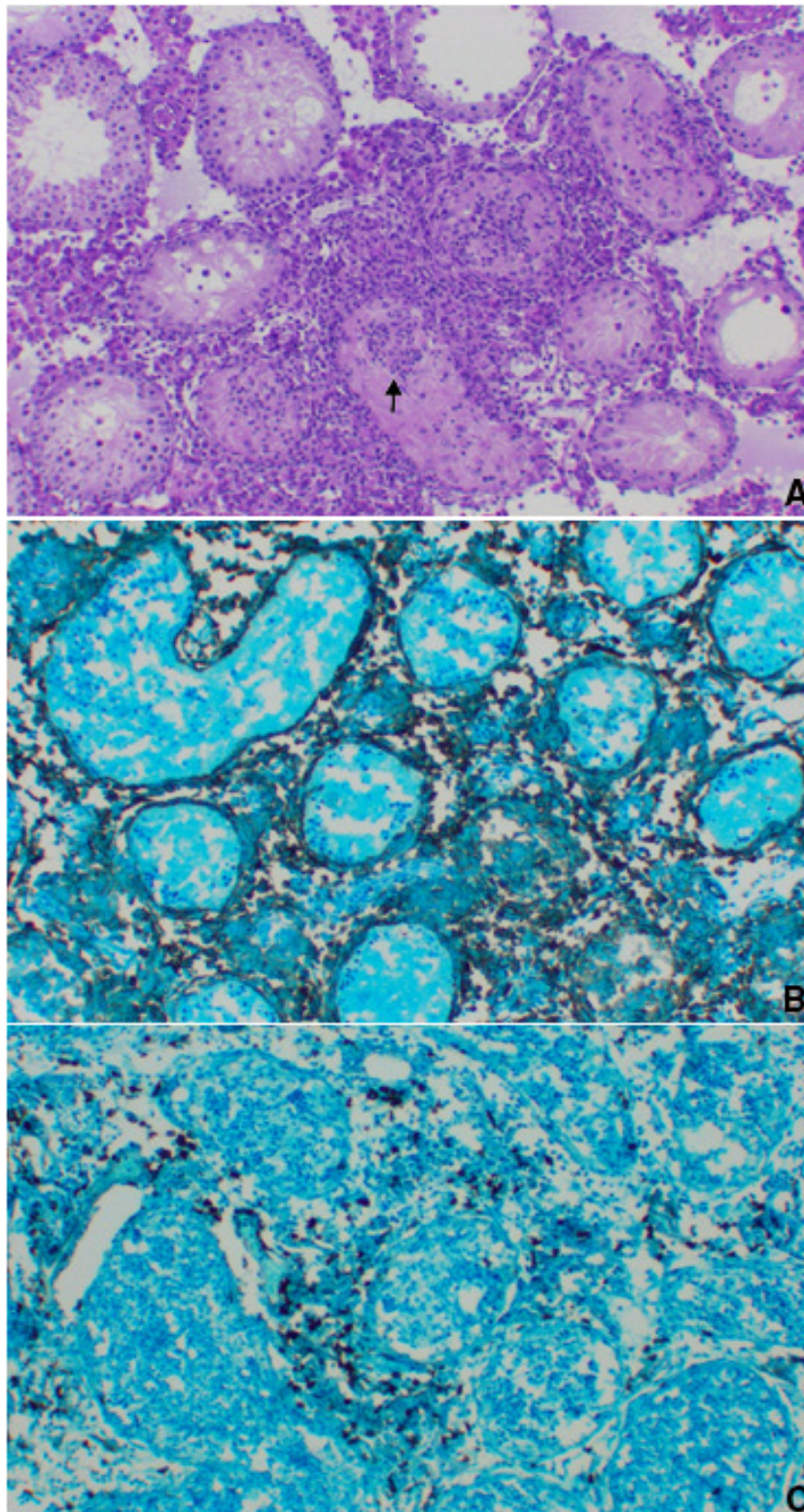


Figura 4. Histopatología testicular en la OAE murina. A: corte de testículo teñido con H&E mostrando el severo daño del epitelio germinal y el gran infiltrado leucocitario, inclusive dentro de los túbulos seminíferos (flecha). Los macrófagos F4/80+ (B) y linfocitos CD3+ (C) se localizan principalmente en el intersticio testicular y no dentro de los túbulos.

En la OAE, la lesión testicular comienza focalmente y luego se extiende a todo el testículo. A pesar de que los distintos modelos de orquitis presentan una histopatología testicular similar - un infiltrado inflamatorio intersticial y un daño severo del epitelio germinal con aspermatogénesis - existen diferencias entre cepas de la misma especie y entre especies. La aparición de la lesión testicular es más temprana y más severa en las ratas de la cepa Wistar respecto de la cepa Sprague-Dawley. Por otra parte, y como ya fue descrito previamente, la composición celular del infiltrado y la distribución de las células inflamatorias es distinta en la OAE murina comparada con la desarrollada en la rata. Por último, la OAE en el ratón se induce con una sola inmunización y en un tiempo más corto que en la rata.

4.3. El número de macrófagos testiculares aumenta durante la OAE

4.3.1. Aumento en el número de macrófagos en la OAE en ratas Sprague-Dawley

Los macrófagos testiculares fueron identificados por inmunohistoquímica utilizando los anticuerpos ED1 y ED2. Las células ED1+ son los monocitos/macrófagos que recién arriban al testículo desde la circulación sanguínea, mientras que los macrófagos residentes del tejido son ED2+.

Los resultados inmunohistoquímicos mostraron que los macrófagos, tanto ED1+ como ED2+, se localizaban siempre en el intersticio del testículo de las ratas N (no mostrado), C y E (Fig. 5 y 6). Concordante con su localización celular, la inmunoreacción para ED2 resultó ser más intensa en la superficie celular, mientras que las células ED1+ mostraron una inmunomarcación citoplasmática (Fig. 5 y 6).

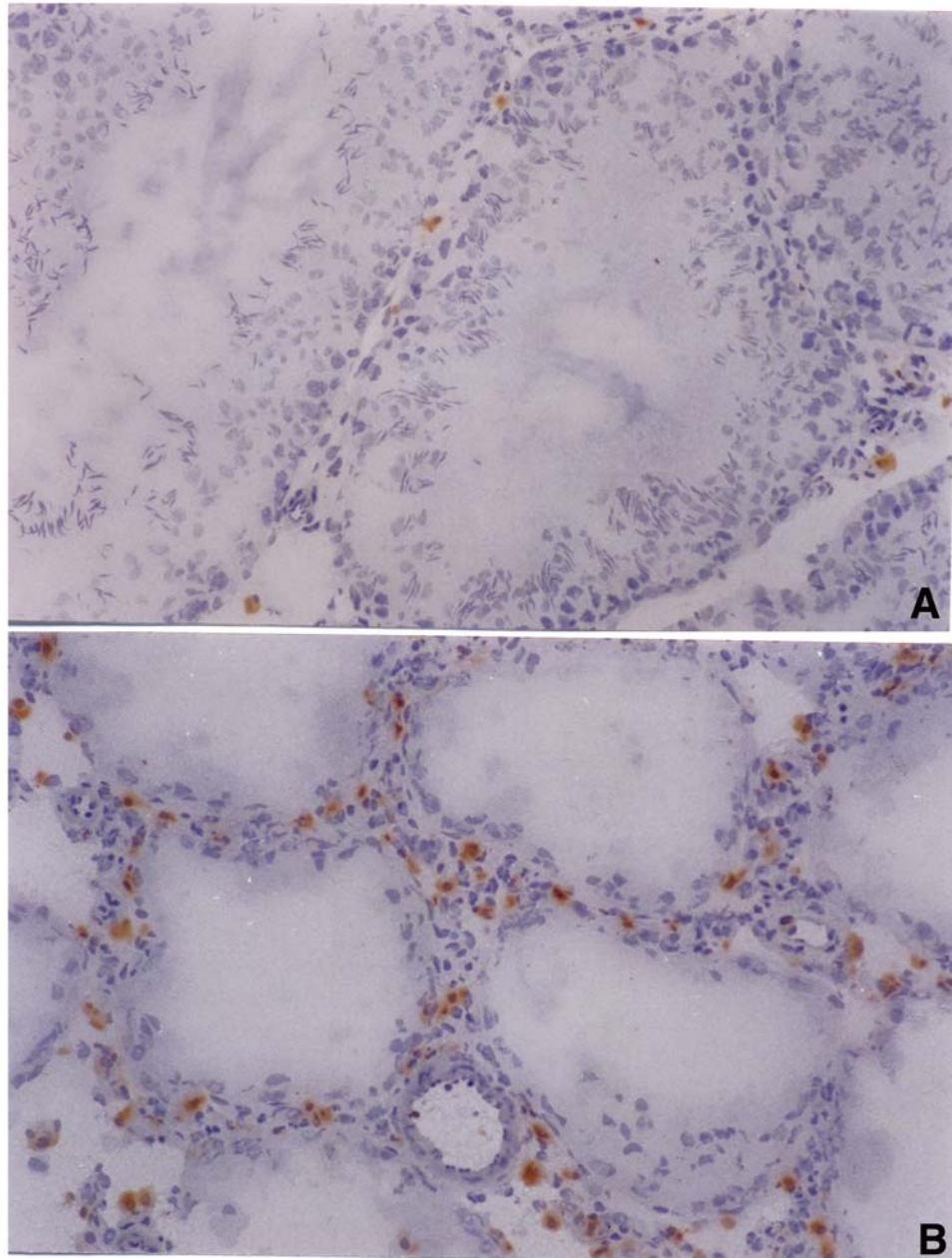
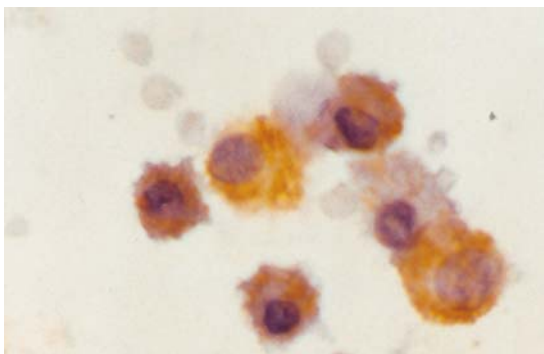


Figura 5. Técnica de inmunoperoxidasa para el marcador de monocitos/macrófagos ED1 en cortes de testículo. Se observan escasas células ED1+ en el intersticio testicular de una rata del grupo control (A) y un gran número de estas células en la rata con orquitis severa (B). X225.



Macrófagos testiculares aislados de ratas con orquitis mostrando inmunoreacción para ED1 con localización citoplasmática. X1150.

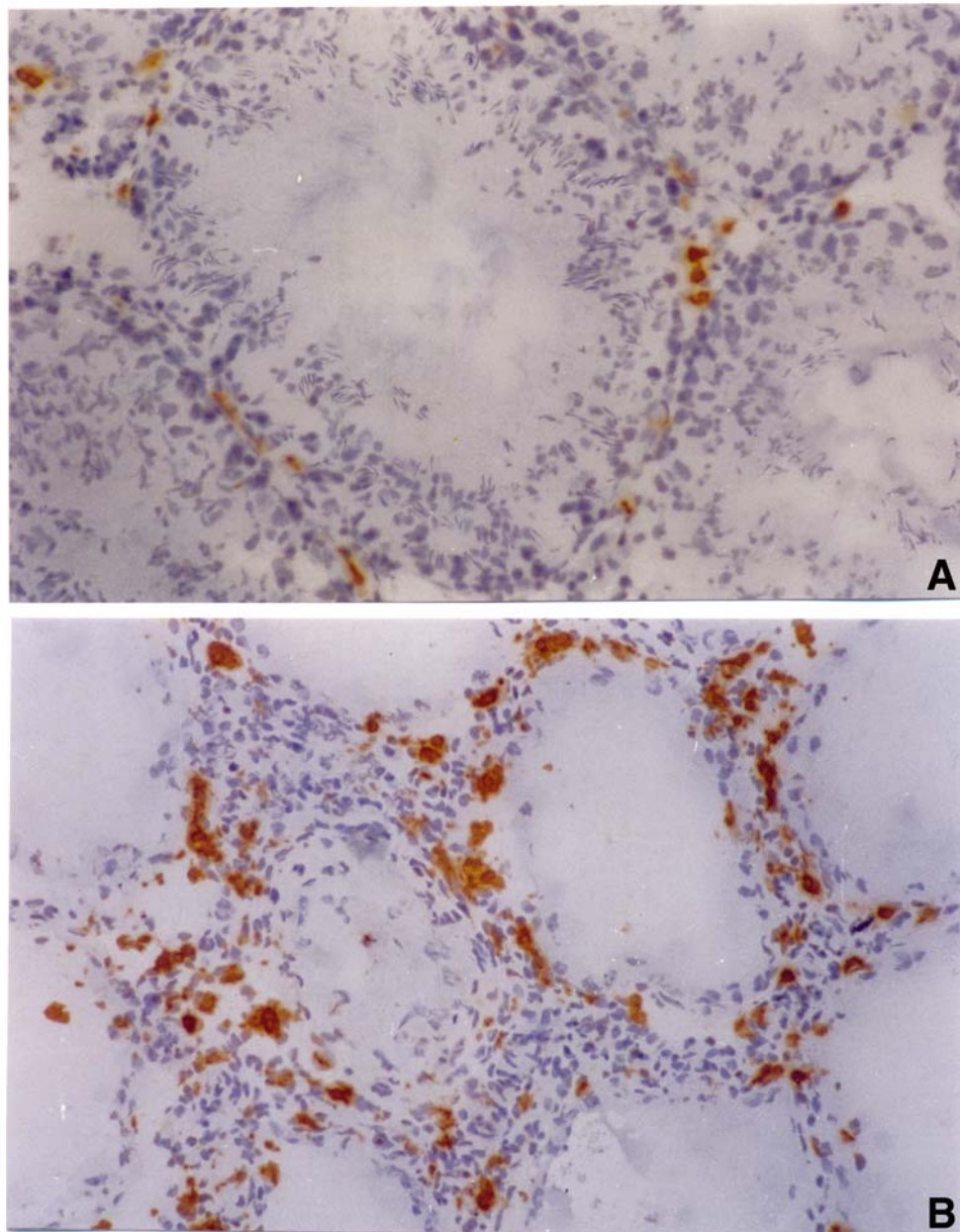
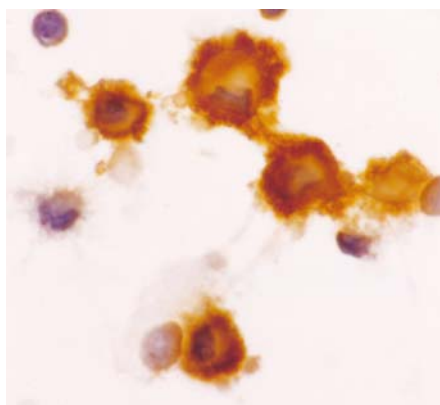


Figura 6. Técnica de inmunoperoxidasa para el marcador ED2 (macrófagos residentes) en cortes de testículo. Se observan escasas células ED2+ en el intersitio testicular de una rata del grupo control (A) y un gran número de estas células en la rata con orquitis severa (B). X225.



Macrófagos testiculares aislados de ratas con orquitis mostrando una inmunoreacción de mayor intensidad en la superficie celular. X1150.

El número de macrófagos por testículo fue cuantificado por técnicas estereoscópicas como se indica en la sección 3.13. de "Materiales y Métodos". El uso de esta metodología fue importante porque la disminución del peso testicular y la atrofia tubular con el concomitante aumento en el número de células intersticiales en el testículo de ratas con OAE, llevarían a una sobreestimación de las células cuantificadas.

Para evaluar las variaciones en el número de macrófagos testiculares durante el desarrollo de la OAE, el número células ED1+, ED2+ y macrófagos totales (empleando conjuntamente los anticuerpos ED1 y ED2) fue determinado en cortes de testículo de ratas N, C y E sacrificadas a distintos tiempos posteriores a la primera inmunización. Como se indica en la Tabla 6A, el número de macrófagos totales en el testículo normal es de aproximadamente 7.5×10^6 siendo la subpoblación ED2+ la predominante, lo que coincide con datos publicados previamente por otros autores (Wang y col., 1994). Durante el período de inmunización (7-30 días), se observa un incremento de 2.9 veces en el número de macrófagos totales en el testículo de ratas C y E respecto de N (Tabla 6A). Este aumento es causado por un incremento en el número de células de ambas subpoblaciones y sería producto del efecto inflamatorio sistémico de los adyuvantes. En este período, durante el cual no se observa lesión testicular en las ratas E, no existen diferencias significativas en el número de macrófagos testiculares entre los grupos C y E. A los 50-60 días de la primera inmunización, el número de macrófagos sufrió variaciones dependiendo del grado de lesión testicular desarrollada. Así, cuando la lesión comienza y sólo existen unos pocos túbulos seminíferos con descamación del epitelio germinal (índice de OAE: 1-3), el número de las diferentes subpoblaciones de macrófagos es similar al grupo C (Tabla 6A). En cambio, cuando la lesión aumenta y adquiere las características típicas del daño testicular observado luego de los 50 días (con un índice de OAE: 5-7), el número de macrófagos totales aumenta 1.7 y 4.5 veces comparado con los grupos C y N, respectivamente. Este incremento está dado por un aumento similar en el número de células ED1+ y ED2+. Finalmente, cuando la lesión progresa a un estadio más severo, el número de macrófagos totales aumenta 1.5 y 4.3 veces comparado con los grupos C y N, respectivamente. En esta etapa también, se produce un incremento similar en el número de las subpoblaciones ED1+ y ED2+. De

esta forma, las variaciones en la población de macrófagos testiculares son similares durante una lesión focal y severa.

Tabla 6A. Número de macrófagos por testículo ($\times 10^6$)

| | Días § | ED1+ | ED2+ | TOTALES |
|----------------|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Normal | - | 4.40±0.49 | 7.32±0.57 | 7.46±1.13 |
| Control | 7-30 | 14.75±2.38 | 18.45±1.53 | 19.60±1.59 |
| Experimental | | 14.85±1.81 ^a | 18.72±1.49 ^a | 21.63±1.89 ^a |
| Control | 50-60 | 13.76±1.58 | 15.81±1.50 | 19.31±1.54 |
| Experimental | | 15.98±1.10 | 19.23±0.72 | 20.84±0.78 |
| Indice OAE 1-3 | | 25.74±2.11 ^b | 28.06±1.37 ^b | 33.28±2.31 ^b |
| Indice OAE 5-7 | | | | |
| Control | 70-100 | 14.69±0.69 | 16.67±2.56 | 21.76±2.50 |
| Experimental | | 25.76±1.23 ^c | 26.67±0.99 ^c | 31.98±0.76 ^c |

§: días luego de la primera inmunización. a: $p < 0.05$ vs. respectiva subpoblación del grupo Normal, b: $p < 0.05$ vs. respectiva subpoblación del grupo Control 50-60d, c: $p < 0.05$ vs. respectiva subpoblación del grupo Control 70-100d (Test de la mediana). $n=5-8$ ratas/grupo/periodo de tiempo.

Como puede observarse en la Tabla 6A, la sumatoria del número de macrófagos ED1+ y ED2+ no es igual al número de macrófagos totales. Esto se explica por la existencia de una subpoblación doble positiva (ED1+ ED2+) que correspondería a un estado transitorio entre la diferenciación de monocitos/macrófagos recién llegados al testículo (células ED1+) y los macrófagos residentes ED2+. Como se ha postulado previamente (Hedger, 1997), las células ED1+ED2- y ED2+ED1- representarían los extremos de un gradiente de diferenciación, con funciones inmunes opuestas: los macrófagos ED1+ED2- mantendrían las propiedades pro-inflamatorias de los monocitos, mientras que los macrófagos ED2+ED1-, bajo la influencia del

microambiente testicular, desarrollarían un perfil inmunosupresor. Por este motivo, resultó interesante analizar, en mayor profundidad, los datos obtenidos de la cuantificación de macrófagos. Como Wang y col. (1994) describieron previamente, las subpoblaciones de macrófagos ED1+ED2-, ED1+ED2+ y ED2+ED1- pueden calcularse a partir de los datos que se presentan en la Tabla 6A. De esta manera, el análisis de las diferentes subpoblaciones de macrófagos revela que en el testículo normal, un mínimo número de macrófagos es ED1+ED2- (Tabla 6B). El número reducido de células de esta subpoblación que expresan un perfil pro-inflamatorio, apoya la hipótesis del inmunoprivilegio testicular. Durante el período de inmunización (7-30 días), este nuevo análisis muestra que el incremento en el número de macrófagos ED1+ED2- (6 veces) y ED1+ED2+ (3.2 veces) es el principal responsable del aumento en el número de macrófagos totales respecto del grupo N (Tabla 6B). Por último, durante el inicio de la lesión testicular (50-60 días) y cuando existe una lesión severa (70-100 días), el aumento en el número de macrófagos totales se da por un incremento en la subpoblación ED1+ED2+ (Tabla 6B). De esta forma, la asociación entre el número de macrófagos y la presencia de lesión testicular sugiere que los macrófagos testiculares están involucrados en la patogenia de la OAE.

Tabla 6B. Número de macrófagos por testículo ($\times 10^6$)

| | Días § | ED1+ ED2- | ED1+ ED2+ | ED2+ ED1- | TOTALES |
|----------------------------------|--------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| Normal | - | 0.64±0.32 | 3.76±0.26 | 3.56±0.34 | 7.46±1.13 |
| Control | 7-30 | 3.00±0.51 | 10.75±1.80 | 6.61±1.39 | 19.60±1.59 |
| Experimental | | 3.87±0.80 ^a | 11.95±1.13 ^a | 6.78±1.21 ^b | 21.63±1.89 ^a |
| Control | 50-60 | 3.54±0.40 | 10.21±1.67 | 5.56±0.74 | 19.31±1.54 |
| Experimental | | 2.40±0.49 | 14.37±0.94 | 4.87±1.12 | 20.84±0.78 |
| Indice OAE 1-3 Indice OAE 5-7 | | 5.22±0.95 | 20.51±1.34 ^c | 7.55±0.92 | 33.28±2.31 ^c |
| Control | 70-100 | 5.10±0.85 | 9.66±1.89 | 9.47±1.46 | 21.76±2.50 |
| Experimental | | 5.31±1.07 | 20.45±1.90 ^d | 6.22±0.96 | 31.98±0.76 ^d |

§: Días luego de la primera inmunización. Los macrófagos totales fueron cuantificados utilizando los marcadores ED1 y ED2 simultáneamente. Las diferentes subpoblaciones fueron calculadas de la siguiente manera: ED1+ED2- = Totales - ED2+; ED2+ED1- = Totales - ED1+; ED1+ED2+ = ED1+ - ED1+ED2- ó ED2+ - ED2+ED1-. a: $p < 0.05$ vs. respectiva subpoblación del grupo N, b: $p = 0.05$ vs. respectiva subpoblación del grupo N. c: $p < 0.05$ vs. respectiva subpoblación del grupo Control 50-60d, d: $p < 0.05$ vs. respectiva subpoblación del grupo Control 70-100d. (Test de Mann Whitney). $n = 5-8$ ratas/grupo/período de tiempo.

4.3.2. Aumento del número de macrófagos en la OAE murina

En el ratón, los macrófagos pueden ser identificados mediante el anticuerpo F4/80 (Austyn y Gordon, 1981; Gordon, 1999). Por inmunohistoquímica, se observaron células F4/80+ en el intersticio testicular de ratones N (no mostrado), C y E (Fig. 7). Cualitativamente, puede observarse un incremento en el número de macrófagos en el testículo de ratones con OAE respecto de N y C (Fig. 7).

Los resultados cuantitativos fueron, en este caso, obtenidos por citometría de flujo y confirmaron las observaciones realizadas por inmunohistoquímica (Tabla 7). Las células testiculares constituyen una población compleja dado que es muy heterogénea, lo que dificulta su análisis por citometría de flujo. Además, el grado de contaminación con células germinales en la suspensión de células intersticiales, varía entre los experimentos y entre los grupos de animales N, C y E. Por ello, utilizamos el anticuerpo CD45 que nos permitió identificar a la población leucocitaria total del testículo. Luego, dentro de la población de células CD45+, se analizaron los distintos tipos de leucocitos (principalmente macrófagos y células dendríticas, Fig. 8).

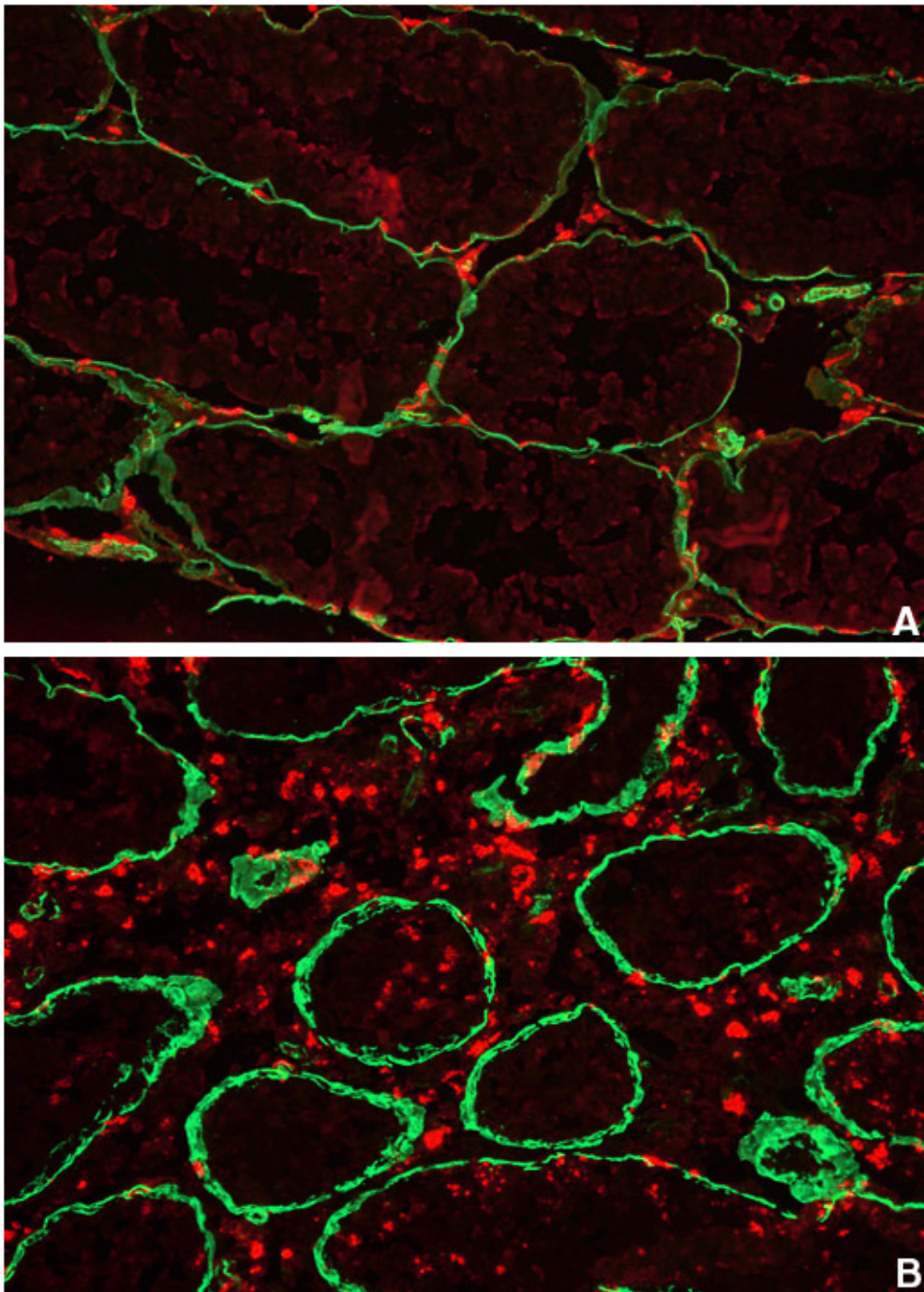


Figura 7. Inmunofluorescencia para el marcador de macrófagos F4/80 (rojo) en cortes de testículo de ratones del grupo control (A) y experimental (B). En verde, se observan las células peritubulares α -actina+ delimitando la pared de los túbulos seminíferos.

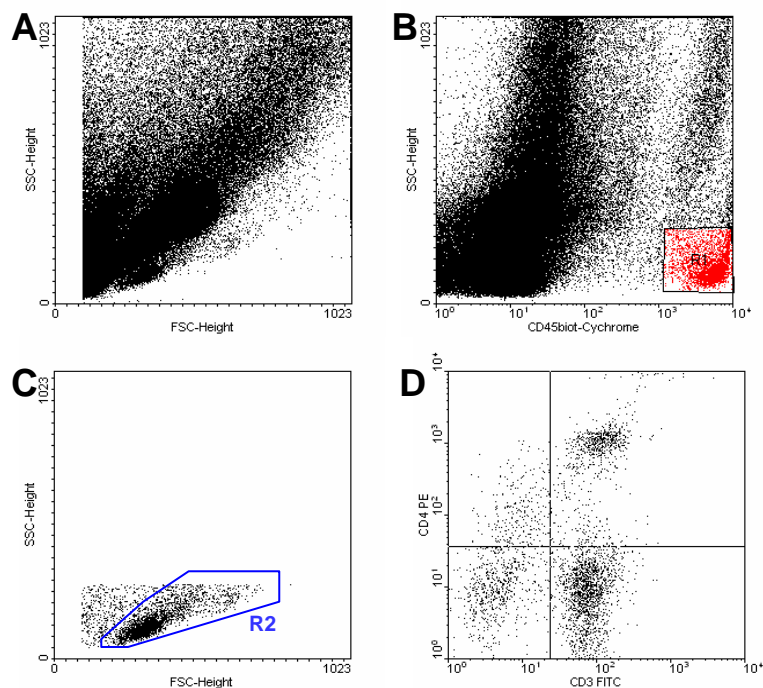


Figura 8. Análisis de las células intersticiales del testículo por citometría de flujo. **A:** “dot plot” mostrando la gran heterogeneidad de las células testiculares en tamaño (FSC) y complejidad interna (SSC). **B:** parámetros SSC e intensidad de fluorescencia para CD45 (con el fluorocromo Cychrome) en un “dot plot” mostrando cómo fue determinada la región R1 para las células CD45+. **C:** FSC y SSC en un “dot blot” mostrando solamente las células que están dentro de la región R1; puede observarse que la mayoría de los eventos se ubican en la región típica de linfocitos y monocitos/macrófagos. En este gráfico se realizó una segunda región R2 para eliminar las células muertas y los restos celulares. **D:** “dot plot” representativo del análisis realizado. En este gráfico sólo aparecen las células CD45+ “vivas”, ya que se seleccionaron las regiones R1+R2 y luego se seleccionaron los parámetros: intensidad de fluorescencia para dos marcadores linfocitarios: CD3 (FITC) y CD4 (PE).

El análisis de los resultados cuantitativos de la citometría de flujo reveló que el tratamiento con adyuvantes induce un aumento de 2.7 veces en el número de células CD45+ en el testículo de ratones controles comparado con el testículo normal (Tabla 7). Sin embargo, este influjo de leucocitos CD45+ al tejido se da también en otros órganos como el riñón (datos no mostrados) y esto se explica por el efecto sistémico de los adyuvantes. En la OAE, el incremento en el número de células CD45+ es de 91.2 y 33.4 veces comparado con los grupos N y C, respectivamente (Tabla 7). En la

orquitis severa, las principales subpoblaciones leucocitarias en el infiltrado inflamatorio intersticial son los macrófagos y neutrófilos (Porcentaje dentro de la población CD45+: macrófagos F4/80+: 33.6±7.5%, neutrófilos Gr-1+: 33.8±5.1%, linfocitos CD3+: 22.4±8.1% y células dendríticas CD11c+: 7.3±3.3%; n=6 ratones/grupo). En el testículo normal, los macrófagos constituyen el principal componente de la población CD45+. El tratamiento con adyuvantes altera la población de macrófagos testiculares induciendo un aumento, aunque no significativo estadísticamente, de 1.7 veces en el número de estas células (Tabla 7). En la orquitis severa, existe un aumento significativo en el número de macrófagos F4/80+ de 19.8 y 33.2 veces comparado con los grupos C y N, respectivamente (Tabla 7), sugiriendo que estas células están involucradas en el desarrollo de la inflamación testicular.

Tabla 7. Número ($\times 10^3$) de leucocitos totales (células CD45+) y de macrófagos (células F4/80+) en el testículo de ratones normales, controles y con OAE.

| | Normal | Control | OAE |
|-------|--------------|---------------------------|-------------------------------|
| CD45 | 15.13 ± 1.32 | 41.28 ± 3.34 ^a | 1380.00 ± 410.00 ^b |
| F4/80 | 9,67 ± 1.48 | 16.25 ± 2.50 | 321.32 ± 54.53 ^b |

a: $p < 0.05$ vs. respectivo grupo N, b: $p < 0.05$ vs. respectivos grupos N y C (Test de la mediana). n=5-7 ratones/grupo.

Por citometría de flujo, también se analizó la expresión de CD4 en las células F4/80+. En el testículo normal un 43±6 % de las células F4/80+ resultaron CD4+, mientras que en los ratones del grupo C, este porcentaje desciende a 30±2; sin embargo, la diferencia no resulta estadísticamente significativa. En la OAE, la proporción de macrófagos CD4+ se redujo, obteniéndose solamente un 5±2 % de macrófagos testiculares CD4+. Cabe aclarar que también detectamos células F4/80+ que expresaron CD4 en el bazo y en el riñón. De esta manera, este fenotipo celular no es exclusivo del testículo y muestra la heterogeneidad de la población de macrófagos presentes en un tejido. La diferente proporción de macrófagos CD4+ en

la OAE, sugiere que estas células cumplen un papel diferente al de la subpoblación CD4⁻ en la inflamación.

La utilización de diferentes técnicas (inmunohistoquímica en rata y citometría de flujo en ratón) para la cuantificación de los macrófagos testiculares está relacionada con que cada una de ellas formaban parte de las técnicas de rutina de cada laboratorio. De todos modos, las comparaciones resultan válidas ya que nos interesaron las diferencias entre los grupos de animales de una misma especie y no los valores absolutos.

La identificación de los macrófagos en el testículo normal de ratas y ratones revela la existencia de un importante número de estas células. En concordancia con lo descrito en la literatura, mostramos que en la rata la población de macrófagos testiculares está compuesta por células ED2+ED1⁻ y, en menor proporción, células ED1+ED2⁻. En el testículo de ratón, sólo una proporción de los macrófagos expresan CD4. Este hallazgo es relevante porque hasta el momento no se había descrito un marcador para estudiar la heterogeneidad de dichas células en el testículo del ratón. En ambas especies el tratamiento con adyuvantes altera la población leucocitaria del testículo: un aumento de ~ 3 y 1.7 veces se observa en el número de macrófagos totales en rata y ratón, respectivamente. Así, a pesar de que el testículo es un "órgano inmunoprivilegiado", el tratamiento con los adyuvantes altera la composición celular de este órgano. Durante la inflamación testicular (OAE), se observa un incremento en el número de macrófagos testiculares que supera al observado por el efecto de los adyuvantes y que sugiere que estas células están involucradas en la patogenia de la OAE.

Para entender cómo los macrófagos testiculares podrían participar en el desarrollo de la OAE, nos propusimos estudiar distintas características de estas células.

4.4. Moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 y del CMH II en el testículo

4.4.1. Los macrófagos testiculares de ratas expresan CD80, CD86 y CMH II

En el testículo de ratas C y E, detectamos por inmunohistoquímica, células que expresan las moléculas del CMH II (Fig. 9), CD80 (Fig. 10) y CD86 (Fig. 11). Estas células se caracterizaron por una morfología tipo macrófago/célula dendrítica y por una localización intersticial, indicando que estas moléculas son expresadas por las CPA testiculares. Cualitativamente, un incremento en el número de células inmunoreactivas para estas moléculas puede observarse en el testículo de ratas con orquitis.

La expresión de moléculas del CMH II y de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 se analizó por citometría de flujo en células intersticiales del testículo de animales N, C y E. Para ello, las células fueron marcadas con los anticuerpos CD45 (para la identificación de la población leucocitaria), ED1 y ED2 (marcadores de macrófagos en rata), F4/80 (marcador de macrófagos en ratón) y CMH II, CD80 y CD86. El análisis se realizó en la región CD45, de la misma manera que se explica en la sección 4.3.2.

En esta sección, las ratas controles y con OAE, sacrificadas en los períodos 50-60 y 70-100 días luego de la primera inmunización, se encuentran como un único grupo (50-100 días) ya que no se observaron diferencias entre los distintos períodos.

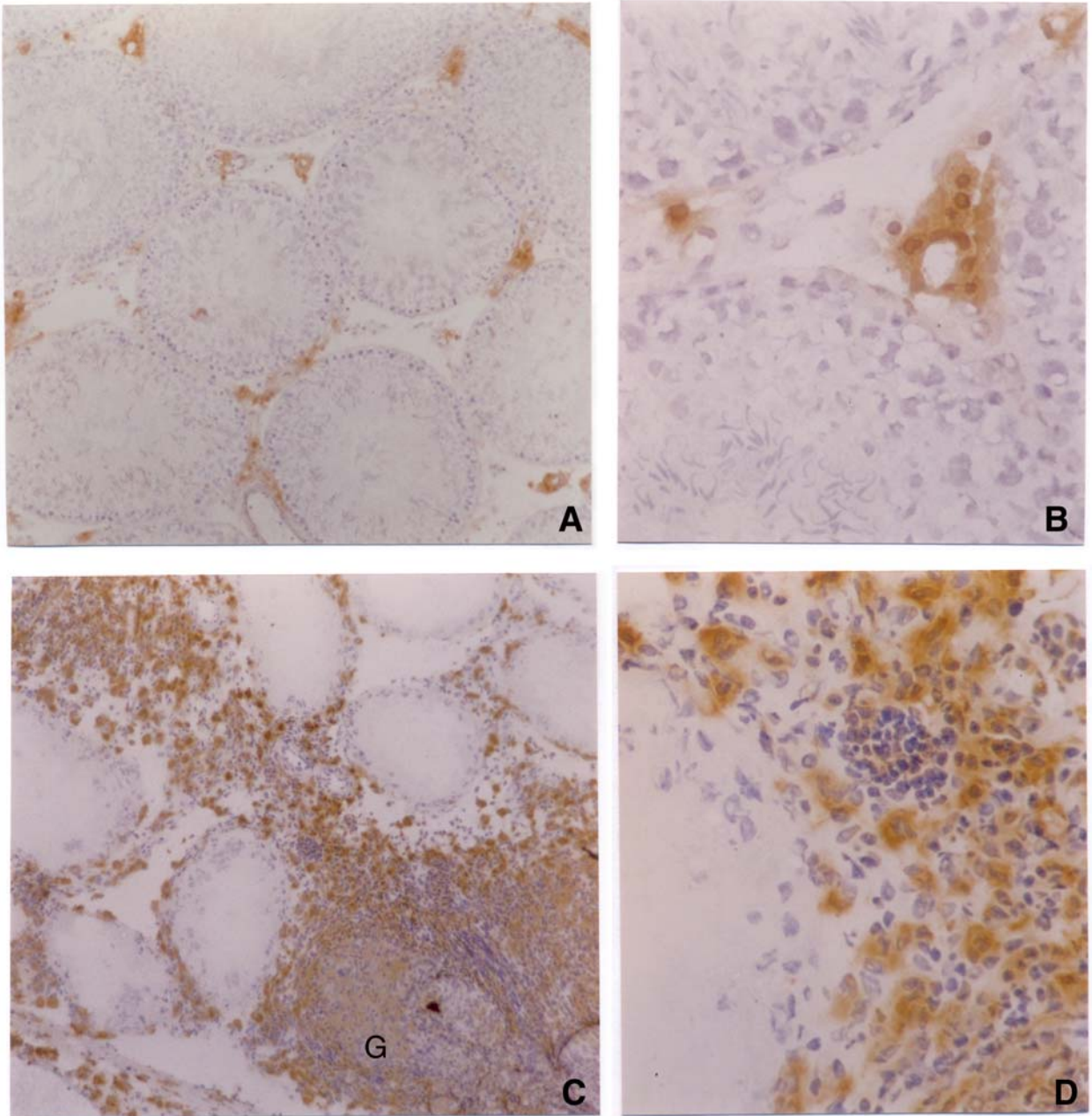


Figura 9. Técnica de inmunoperoxidasa mostrando la expresión del CMH II en cortes de testículo. Se observa un mayor número de células inmunoreactivas en el intersticio testicular de ratas con OAE severa (C y D) comparado con las ratas controles (A y B). Se destaca la localización peritubular (C) y en los granulomas (G) de las células CMH II+ en ratas con orquitis (D). X100 (A y C) y X400 (B y D).

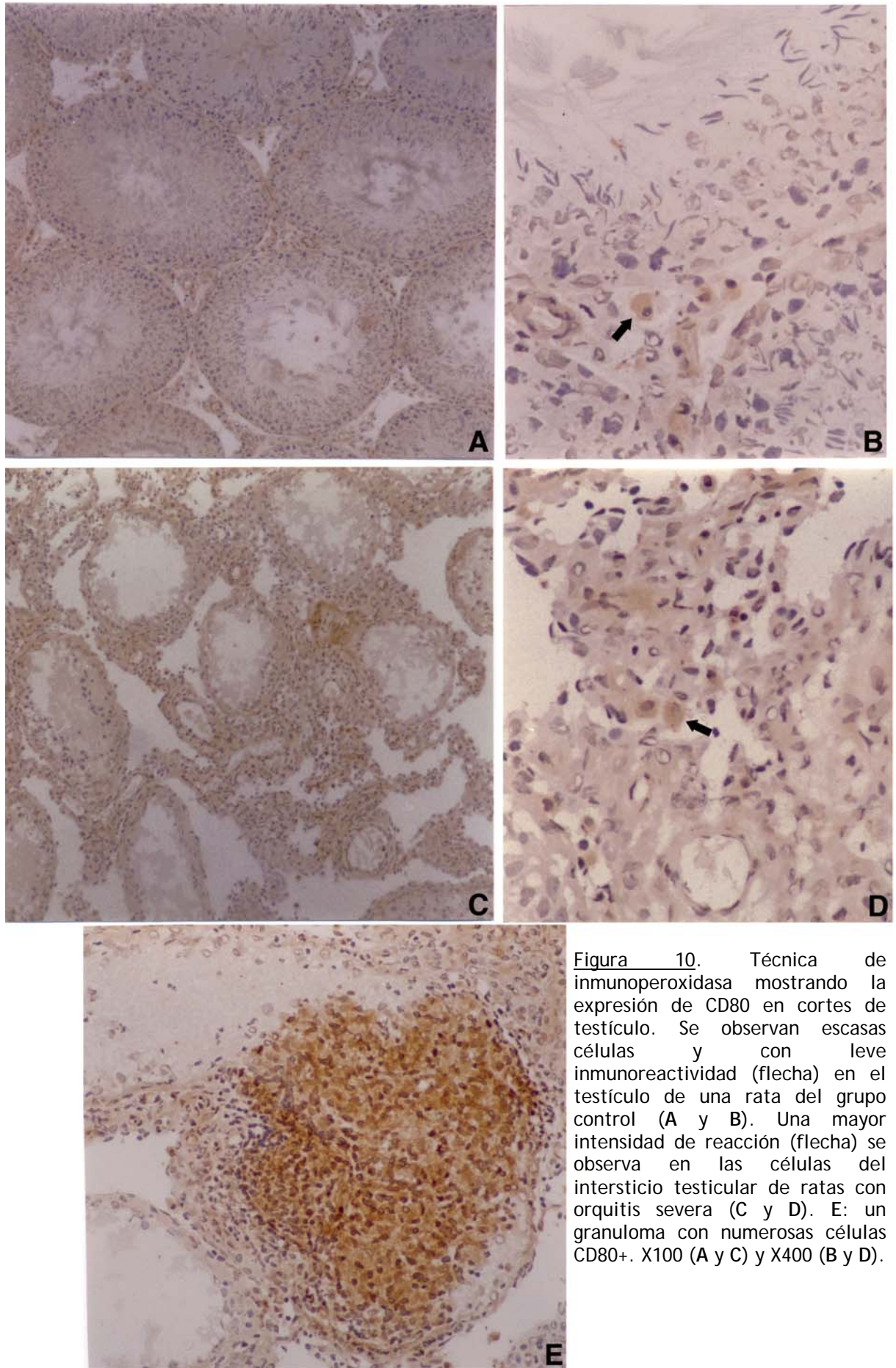


Figura 10. Técnica de inmunoperoxidasa mostrando la expresión de CD80 en cortes de testículo. Se observan escasas células y con leve inmunoreactividad (flecha) en el testículo de una rata del grupo control (A y B). Una mayor intensidad de reacción (flecha) se observa en las células del intersticio testicular de ratas con orquitis severa (C y D). E: un granuloma con numerosas células CD80+. X100 (A y C) y X400 (B y D).

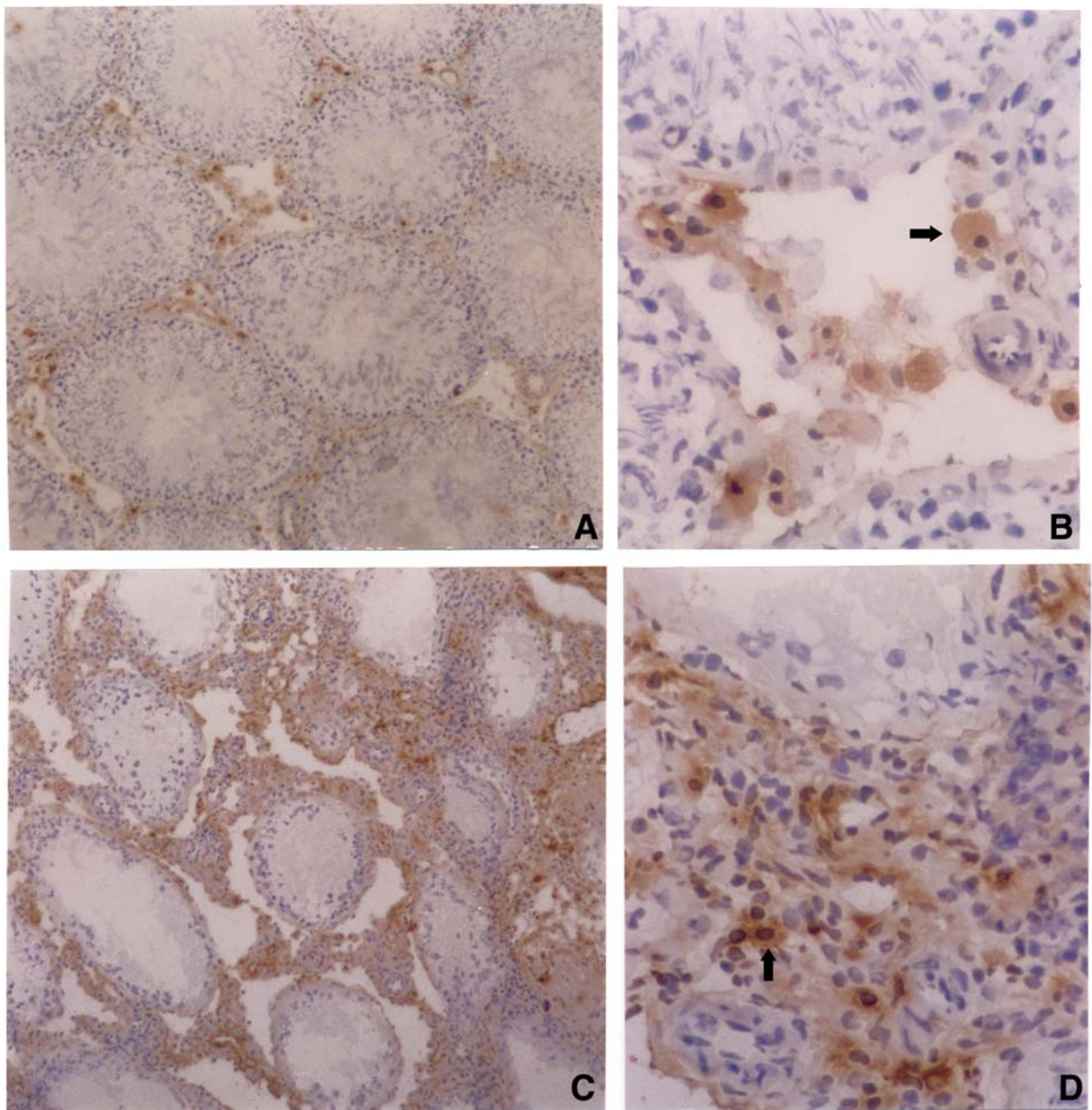


Figura 11. Técnica de inmunoperoxidasa mostrando la expresión de CD86 en cortes de testículo. Se observa un mayor número de células inmunoreactivas en el intersticio testicular de ratas con OAE severa (C y D) comparado con las ratas controles (A y B). Las flechas indican células CD86+ con aspecto morfológico tipo macrófagos (B y D). X100 (A y C) y X400 (B y D).

4.4.1. Moléculas co-estimuladoras y del CMH II en la rata

De forma similar al ratón, el tratamiento con adyuvantes indujo un aumento (2.2 veces) del número de células CD45+ testiculares, siendo este número aún más elevado durante la OAE (Tabla 8).

Por citometría de flujo, detectamos células CMH II+, CD80+ y CD86+ en el testículo de ratas N, C y E. Dada la existente heterogeneidad en la población de macrófagos, nos interesó estudiar la expresión de estas moléculas en los macrófagos ED1+ y ED2+. En la Fig. 12 pueden observarse "dot plots" representativos del análisis realizado. Los resultados muestran que la mayoría de los macrófagos ED1+ expresaron moléculas del CMH II y co-estimuladoras en el testículo de los animales N, C y E (Tabla 8). En cambio, los macrófagos ED2+ presentaron un perfil de expresión diferente: un menor porcentaje de estas células resultaron CMH II+, CD80+ y CD86+ en el testículo de las ratas de los distintos grupos (Tabla 8).

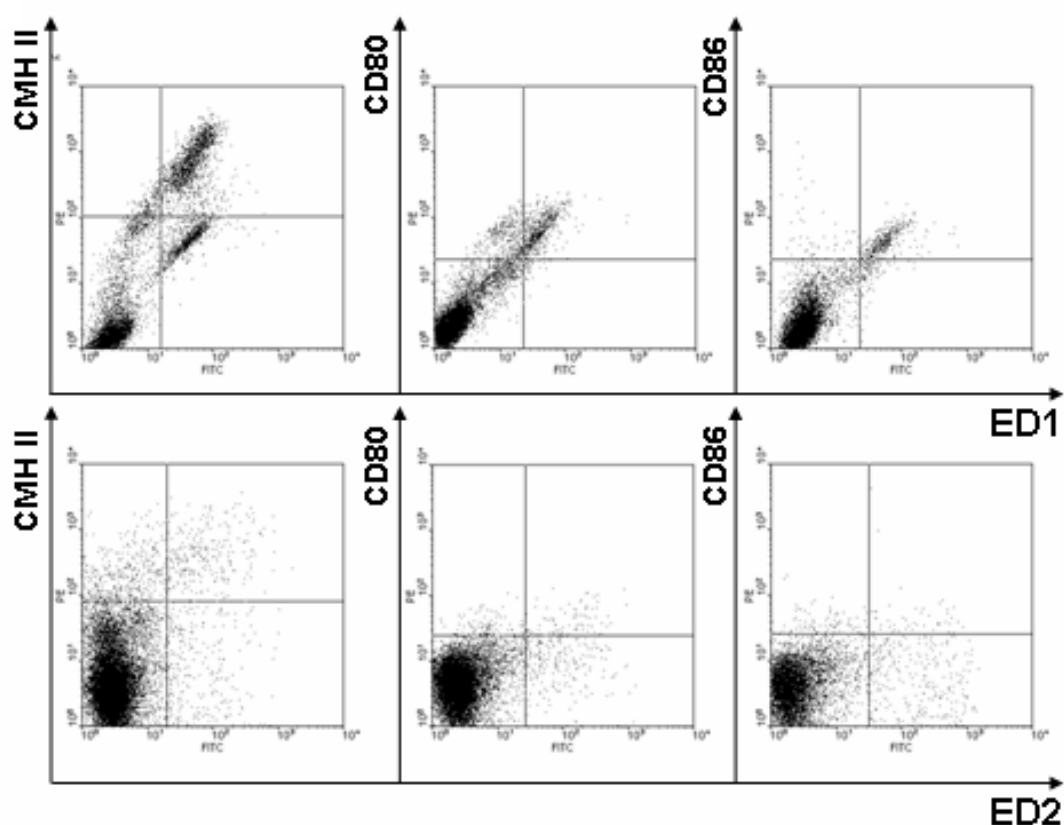


Figura 12. "Dot plots" representativos mostrando la expresión de las moléculas del CMH II, CD80 y CD86 (fluorocromo PE) en los macrófagos ED1+ y ED2+(fluorocromo FITC) de ratas con OAE. Los gráficos muestran solamente los eventos CD45+ ya que se realizaron las regiones R1 y R2 como se indica en la Fig. 8.

Tabla 8. Número (Nro.) de células CD45+/testículo y porcentajes (%) de macrófagos ED1+ y ED2+ que expresan las moléculas del CMH II, CD80 y CD86 en el testículo de ratas de los grupos normal, control y OAE.

| | Molécula | Normal | Control | OAE |
|-------------------------------------|----------|-----------|----------|------------|
| Nro. de células (x10 ⁵) | CD45+ | 4.1±1.3 | 9.0±0.7* | 21.7±3.0** |
| Macrófagos ED1+ (%) | CMH II+ | 94.8±1.7 | 95.6±0.9 | 95.1±0.6 |
| | CD80+ | 88.7±0.3 | 99.0±0.4 | 97.0±0.8 |
| | CD86+ | 100.0±0.2 | 99.3±0.6 | 88.6±3.4 |
| Macrófagos ED2+ (%) | CMH II+ | 44.5±6.2 | 55.3±6.9 | 52.5±4.6 |
| | CD80+ | 11.4±3.0 | 8.0±2.3 | 11.0±2.3 |
| | CD86+ | 13.0±1.9 | 9.2±0.7 | 5.8±1.33 |

*p<0.05 vs. grupo N, **p<0.001 vs. grupos N y C (Test de la mediana) n=7 ratas/grupo/molécula.

Los porcentajes de macrófagos CMH II+, CD80+ y CD86+ resultaron similares entre los distintos grupos de animales (Tabla 8). Sin embargo, dado el aumento en las subpoblaciones de macrófagos ED1+ y ED2+ durante la OAE (Tabla 6A), el número de células CMH II+ es significativamente mayor en el testículo de ratas con orquitis respecto de ratas controles y normales (Fig. 13A y B). Lo mismo ocurre con el número de macrófagos ED1+ que expresan CD80 y CD86 (Fig. 13A) y los macrófagos ED2+ CD80+ (Fig. 13B).

También estudiamos los niveles de expresión de las moléculas CMH II, CD80 y CD86 analizando la intensidad de fluorescencia. Los macrófagos testiculares ED1+ de las ratas con OAE expresaron niveles más elevados de las moléculas del CMH II comparado con los del grupo N, mientras que entre las ratas C y E, no se detectaron diferencias significativas (Fig. 14A). Las moléculas CD80 y CD86 presentaron niveles comparables de expresión entre las ratas de los distintos grupos (Fig. 14A). En cuanto a los macrófagos testiculares ED2+, se observó una intensidad de fluorescencia para las moléculas del CMH II, CD80 y CD86 similar entre las ratas N, C y E (Fig. 14B).

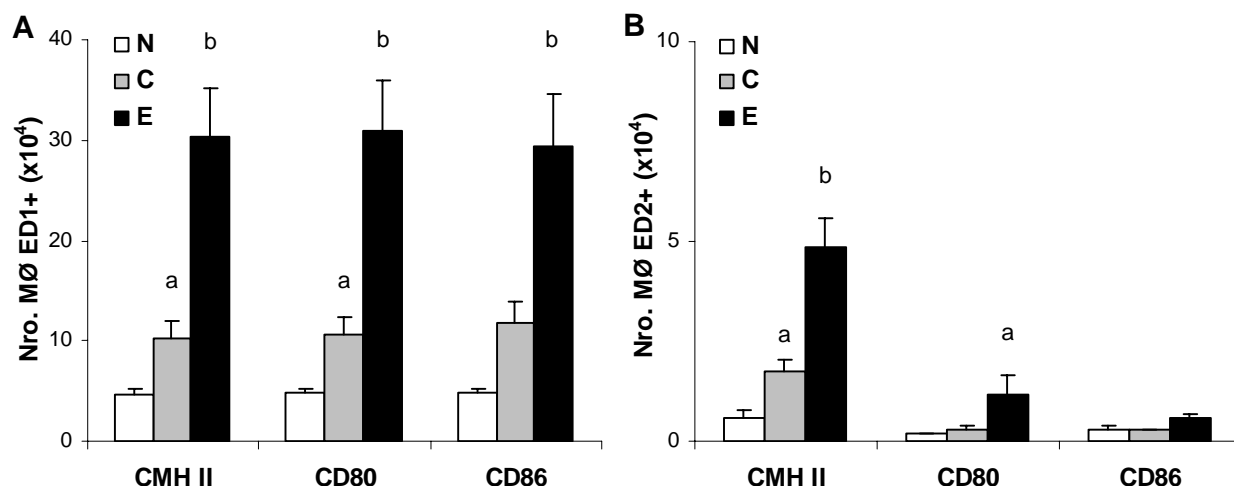


Figura 13. Datos cuantitativos obtenidos por citometría de flujo mostrando el número (Nro., 10^4) de macrófagos testiculares ED1+ (A) y ED2+ (B) que expresan las moléculas del CMH II y las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en ratas de los grupos N, C y E. a: $p < 0.05$ vs. respectivo grupo N, b: $p < 0.01$ vs. respectivos grupos N y C (Test "t" de Student). $n = 7$ ratas/grupo/molécula. Nótese la distinta escala de los gráficos A y B.

Comparamos también, los niveles de expresión de las distintas moléculas entre los macrófagos ED1+ y ED2+ en cada grupo de animales (Fig. 14C-E). Los macrófagos ED1+ presentaron una intensidad de fluorescencia para el CMH II 3 y 4.7 veces mayor comparada con la de los macrófagos ED2+ en las ratas controles y con OAE, respectivamente (Fig. 14D y E). En cambio, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión del CMH II entre los macrófagos ED1+ y ED2+ del testículo de ratas normales. Las moléculas CD80 y CD86 se expresaron con similar intensidad en los macrófagos ED1+ y ED2+ en las ratas de los grupos N, C y E (Fig. 14C-E). De esta manera, aunque el porcentaje de macrófagos que expresan CMH II y las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 sea similar entre los distintos grupos de animales, el análisis de la intensidad de fluorescencia revela que los macrófagos ED1+ de los animales con orquitis presentan una mayor expresión del CMH II comparado con las ratas normales. Por otra parte, los macrófagos ED1+ provenientes de ratas C y E expresan niveles más elevados del CMH II respecto a los macrófagos ED2+ de las mismas ratas, aportando más evidencias que apoyan la idea de que los macrófagos ED1+ y ED2+ cumplen distintas funciones.

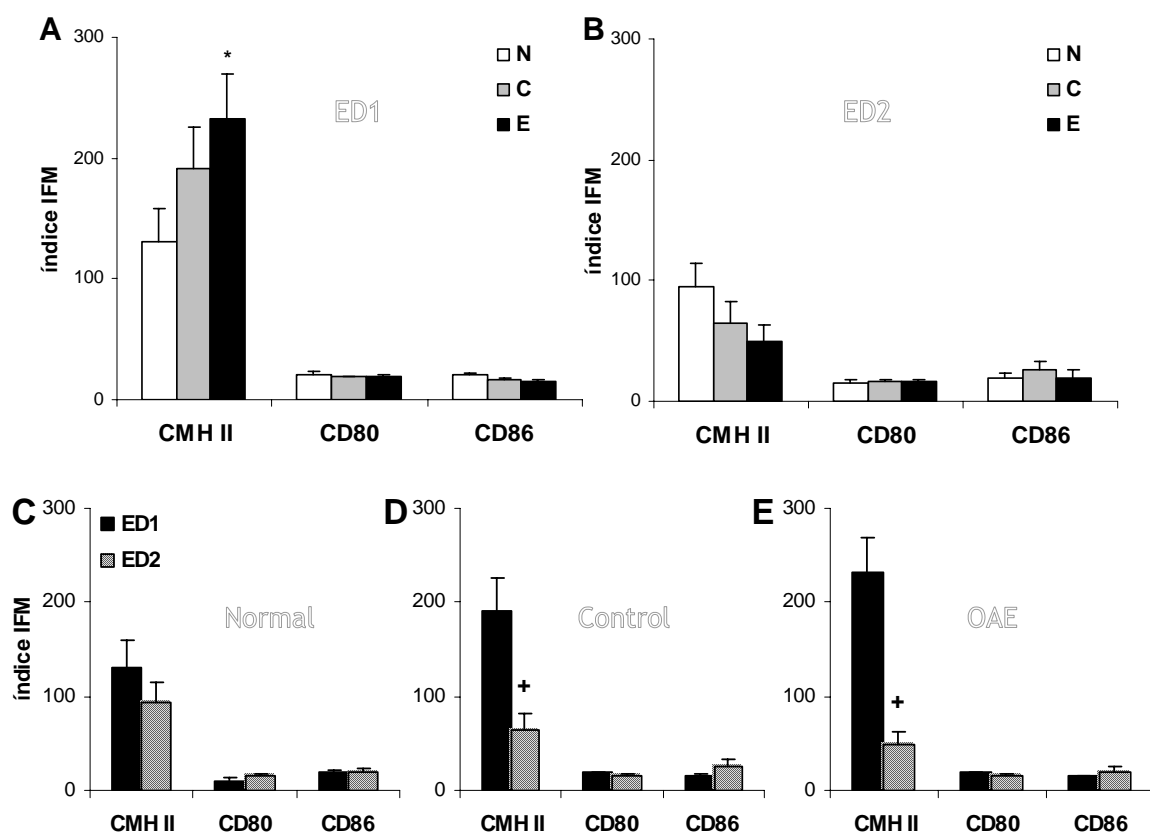


Figura 14. Expresión de las moléculas del CMH II y moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en macrófagos testiculares ED1+ (A) y ED2+ (B) provenientes del testículo de ratas N, C y E. El índice de intensidad de fluorescencia media (IFM) fue calculado como la IFM de la población positiva / IFM de la población negativa. C-D: Expresión de las moléculas CMH II, CD80 y CD86 en los macrófagos ED1+ y ED2+ de los animales de los distintos grupos. * $p < 0.05$ vs. respectivo N, + $p < 0.01$ vs. respectiva subpoblación ED1+ (Test de la mediana). $n = 7$ ratas/grupo/molécula.

4.4.2. Los macrófagos testiculares de ratón expresan las moléculas CD80, CD86 y del CMH II

En el testículo de ratones N, C y E también se analizó la expresión del CMH II y de las moléculas co-estimuladoras por citometría de flujo. En el testículo normal, el porcentaje de macrófagos F4/80+ que expresaron las moléculas del CMH II+ fue 20.2 ± 3.7 (Fig. 15A). El tratamiento con adyuvantes indujo un aumento de 3.2 veces en el porcentaje de macrófagos CMH II+, mientras que no existieron diferencias en este porcentaje entre los animales C y E (Fig. 15A). De esta manera, estos resultados indican que los adyuvantes modifican el estado de activación de los macrófagos

testiculares. El análisis de las moléculas CD80 y CD86 reveló que un alto porcentaje de los macrófagos testiculares expresaban estas moléculas (70-90%) sin existir una expresión diferencial entre los diferentes grupos de animales (Fig. 15A). De forma similar que en la rata, aunque el porcentaje de macrófagos CMH II+, CD80 y CD86+ fue similar entre los grupos C y E, al existir un incremento en el número total de macrófagos, se observa un aumento significativo en el número de macrófagos que expresan estas moléculas en la OAE (Fig. 15B).

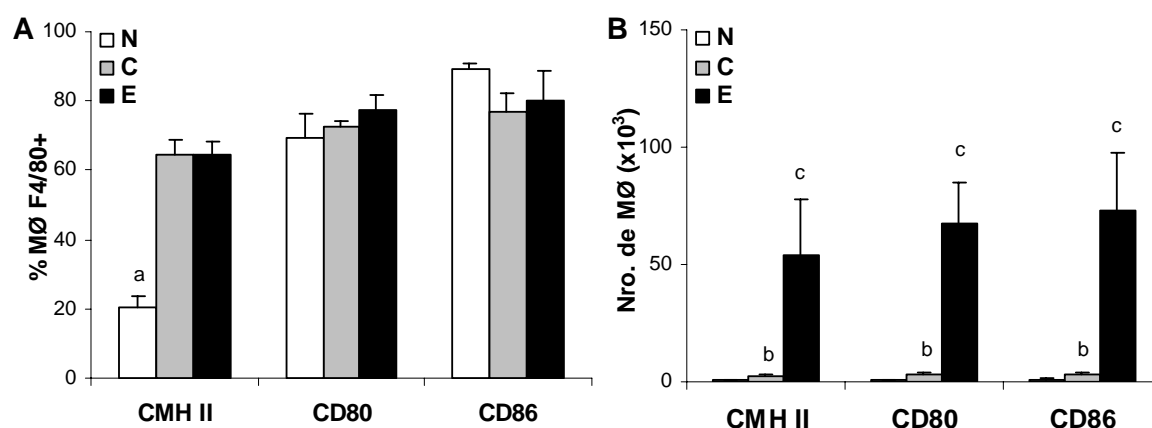


Figura 15. Porcentaje (A) y número (B) de macrófagos testiculares que expresan las moléculas del CMH II y las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en ratones de los grupos N, C y E. La cuantificación se realizó por citometría de flujo utilizando el marcador de macrófagos F4/80. a: $p < 0.05$ vs. respectivos grupos C y E; b: $p < 0.05$ vs. respectivo grupo N, c: $p < 0.05$ vs. respectivos grupos N y C (Test de la mediana). $n = 5-7$ ratones/grupo/molécula.

4.5. Los macrófagos testiculares son capaces de estimular una respuesta alogénea

Para evaluar la funcionalidad de las moléculas co-estimuladoras expresadas por los macrófagos testiculares y su capacidad de presentar antígenos, realizamos un cultivo mixto leucocitario. Los macrófagos testiculares aislados de ratas N, C y E de la cepa Sprague-Dawley fueron incubados con linfocitos obtenidos de ganglios linfáticos de ratas N de la cepa Wistar. Como puede observarse en la Fig. 16, los macrófagos testiculares estimularon la proliferación linfocitaria, indicando que son capaces de presentar antígenos a los linfocitos T. Por otra parte, cuando los linfocitos fueron incubados con macrófagos testiculares obtenidos de ratas E, se alcanzó un mayor nivel de proliferación señalando que recibieron un mayor estímulo y sugiriendo que

los macrófagos testiculares de las ratas E presentan un mayor estado de activación comparado con macrófagos testiculares de ratas N y C.

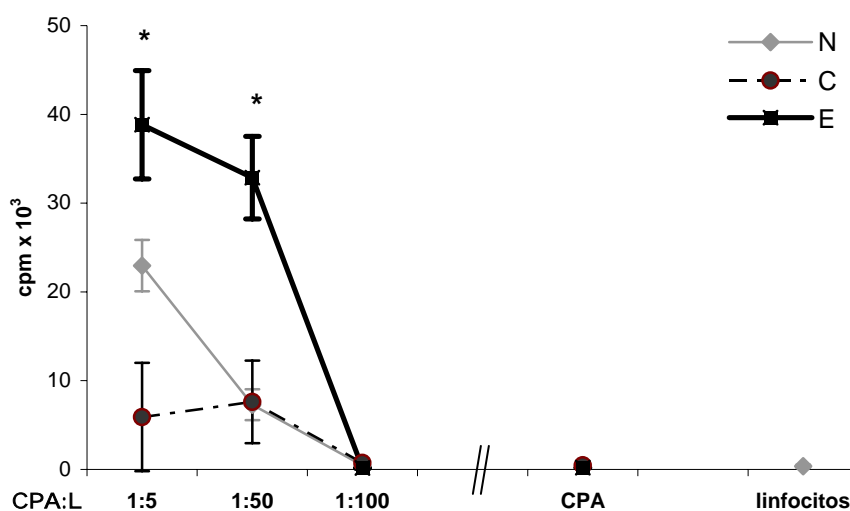


Figura 16. Reacción mixta leucocitaria. Macrófagos testiculares (CPA) de ratas Sprague-Dawley de los grupos N, C y E fueron incubados con linfocitos de ratas Wistar en las proporciones CPA:linfocitos (CPA:L) 1:5, 1:50 y 1:100. Como controles se cultivaron macrófagos y linfocitos en ausencia del estímulo alogeneico. * $p < 0.05$ vs respectivo control (Test de ANOVA Kruskal Wallis).

Nuestros resultados muestran que tanto en el testículo normal de la rata como del ratón, los macrófagos expresan moléculas del CMH II y las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86. En la rata, existen diferencias en la expresión de estas moléculas entre las subpoblaciones de macrófagos testiculares ED1+ y ED2+: un mayor porcentaje de células ED1+ son CMH II+, CD80+ y CD86+ respecto de los macrófagos ED2+ en los grupos N, C y E. Además, los macrófagos testiculares ED1+ provenientes de ratas con orquitis expresan niveles más elevados de moléculas del CMH II. En ambas especies de roedores, encontramos un aumentado número de macrófagos CMH II+, CD80+ y CD86+ en el testículo de animales con OAE. La expresión de estas moléculas en los macrófagos testiculares y la estimulación de la proliferación linfocitaria en el ensayo mixto leucocitario, sugieren que estas células son capaces de presentar antígenos a los linfocitos T.

4.6. Los macrófagos testiculares son necesarios para el desarrollo de la OAE

Para evaluar el papel de los macrófagos testiculares en el desarrollo de la OAE, eliminamos dichas células mediante el uso liposomas que contienen clodronato (lip-clod). Nuestros primeros experimentos se centraron en la inyección de los liposomas por vía intratesticular. Esta metodología utilizada previamente (Bergh y col., 1993; Gaytan y col., 1994 y 1995), contaba con la ventaja de eliminar exclusivamente los macrófagos del testículo y no de otros órganos, pero su gran desventaja resultó ser que la inyección *per se* provocaba daño testicular haciendo muy dificultosa la discriminación entre el daño inducido por la inyección y la lesión característica de la orquitis. Por lo tanto, utilizamos un enfoque diferente inyectando los liposomas vía intraperitoneal (ip). Según se ha descrito (Biewenga y col., 1995; van Rooijen, 1989), la inyección de los lip-clod por esta vía induce la eliminación de macrófagos de la cavidad peritoneal, los monocitos de la circulación, de la médula ósea y los de algunos ganglios linfáticos. De esta manera, eliminando los monocitos circulantes esperábamos reducir el flujo de monocitos/macrófagos ED1+ hacia el testículo y así observar una reducción del daño testicular de la OAE. Se inyectaron los liposomas cada 2 días ya que experimentos previos (Biewenga y col., 1995) mostraron que la depleción de macrófagos peritoneales con 2 ml de lip-clod inyectados vía ip, persistía durante ese tiempo. Como grupo control, utilizamos ratas inmunizadas con HT y adyuvantes e inyectadas con liposomas que contienen PBS (lip-PBS) en las mismas condiciones que el grupo inyectado con lip-clod. Para el análisis de la histopatología testicular, el índice de OAE resultó sumamente útil. Los resultados muestran que la reducción del número de macrófagos inducida por los lip-clod, provocó una disminución en la incidencia y en el grado de severidad de la OAE (Fig. 17).

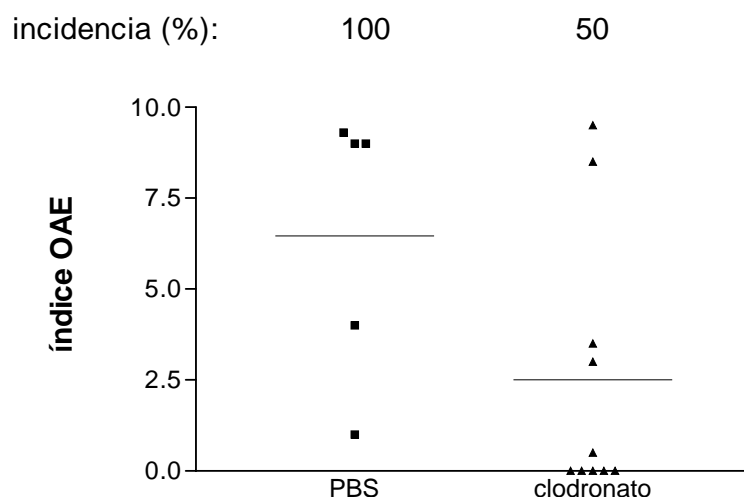


Figura 17. Porcentaje de ratas que desarrollaron OAE (incidencia) e índice de OAE. Los animales fueron inmunizados con HT + adyuvantes e inyectados con liposomas conteniendo PBS o clodronato (Incidencia: $p < 0.05$ (Test de la proporción); índice OAE: $p = 0.05$, test de Mann Whitney). $n = 5$ (grupo lip-PBS) y $n = 10$ (grupo lip-clod).

Para determinar si la reducción en la incidencia y severidad de la OAE estaba relacionada con una disminución en el número de macrófagos testiculares en las ratas tratadas con lip-clod, cuantificamos el número de células ED1+ y ED2+ en el testículo de dichas ratas. Los resultados muestran que en las ratas inyectadas con lip-clod, existe una reducción significativa del número de macrófagos testiculares ED1+ (2.7 veces) y ED2+ (2.4 veces) respecto del grupo inyectado con lip-PBS. (Fig. 18). El número de células ED1+ y ED2+ en el testículo de las ratas inyectadas con lip-clod fue aún menor que el número de estas células en las ratas del grupo C sacrificadas durante el mismo período de tiempo; sin embargo, no se alcanzaron los valores observados en el testículo normal (Nro. de macrófagos ED1+ ($\times 10^6$): N: 4.40 ± 0.49 ; C: 14.76 ± 2.38 ; lip-clod: $11.00 \pm 0.96^*$ y nro. de macrófagos ED2+ ($\times 10^6$): N: 7.32 ± 0.57 ; C: 18.45 ± 1.53 ; lip-clod: $8.49 \pm 0.73^*$, $*p < 0.05$ vs respectivo C).

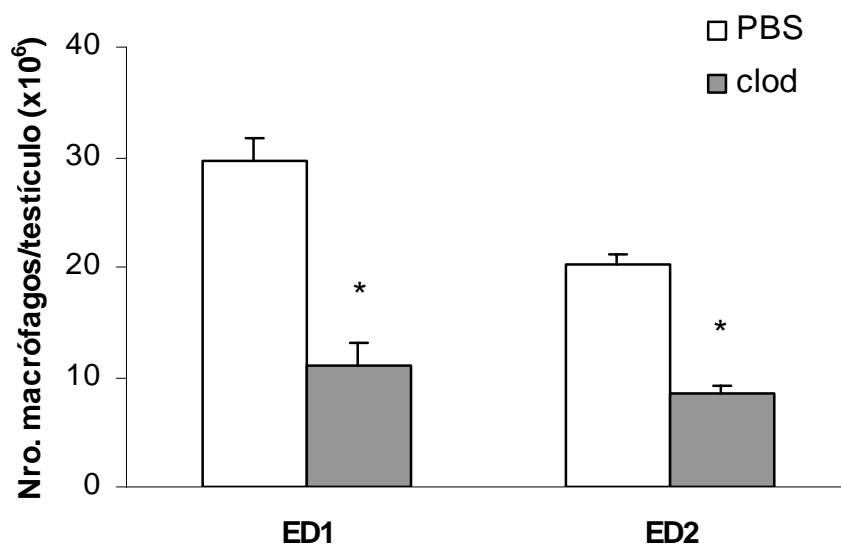


Figura 18. Número de macrófagos ED1+ y ED2+ por testículo de ratas inyectadas con liposomas conteniendo PBS o clodronato (clod). * $p < 0.01$ vs. respectivo grupo inyectado con PBS (Test Mann Whitney). $n=5$ (grupo lip-PBS) y $n=10$ (grupo lip-clod).

Por último, dado que las células dendríticas también son células fagocíticas y por lo tanto, también podrían ser eliminadas mediante los lip-clod, estudiamos el número de células OX62+ en el testículo de ratas tratadas con lip-clod. Como se verá en la sección 4.8., el número de células dendríticas se encuentra incrementado en el testículo de ratas con OAE (Fig. 19). En las ratas inyectadas con lip-clod dicho aumento no se produce, observándose un número de células dendríticas similar al de las ratas N y C (Fig. 19).

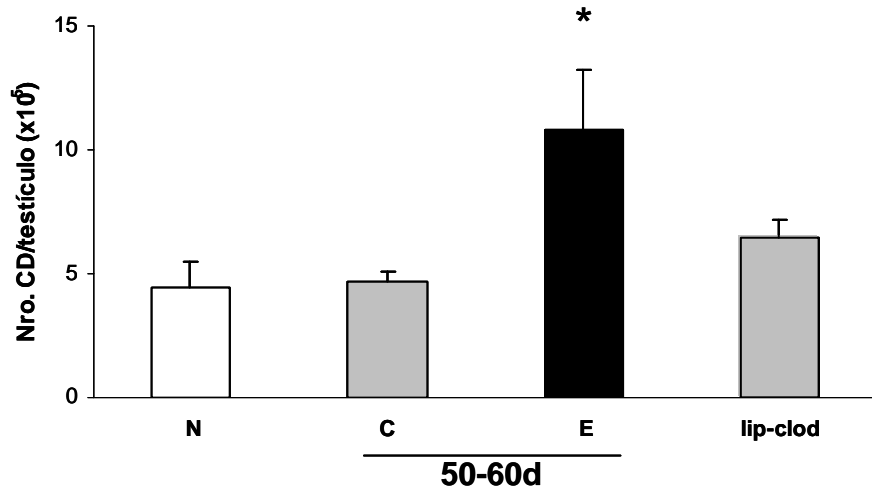


Figura 19. Número de células dendríticas (CD) OX62+ en el testículo de ratas del grupo N, C, E y ratas inmunizadas con HT+adyuvantes e inyectadas con liposomas conteniendo clodronato (lip-clod). 50-60d: días (d) posteriores a la primera inmunización. * $p < 0.05$ E vs. grupos N, C y lip-clod (Test de ANOVA Kruskal Wallis). $n=5-10$ ratas/grupo.

De esta manera, mediante el uso de los liposomas in vivo, determinamos que los macrófagos son necesarios para el desarrollo de la OAE. Aunque la eliminación de macrófagos no es completa ni exclusiva del testículo, la reducción en el número de macrófagos testiculares se asocia a una reducción en la incidencia y severidad de la OAE, sugiriendo que estas células están involucradas en la patogenia de la OAE.

4.7. Expresión de citoquinas en el testículo

Las citoquinas juegan un papel clave para el inicio y desarrollo de los procesos inflamatorios. En la orquitis, nos interesó estudiar fundamentalmente el papel de las citoquinas pro-inflamatorias como el $TNF\alpha$, IL-6 e $IFN\gamma$.

Previamente, estudiamos la expresión del $TNF\alpha$ y su receptor (TNFR1) en el testículo de ratas con OAE (Suescun y col., 2003). Mostramos que las células germinales expresan el TNFR1 y que existe un aumento en el número de células germinales TNFR1+ en la OAE. Por otro lado, los macrófagos testiculares de ratas con OAE severa producen mayores niveles de $TNF\alpha$. De esta manera, en este trabajo de

tesis, nos centramos en el estudio de otras citoquinas pro-inflamatorias como la IL-6 y el IFN γ .

4.7.1. Interleuquina 6 y su receptor (IL-6R)

En primer lugar estudiamos la expresión de la IL-6 y la de su receptor en el testículo de ratas controles y con OAE. Para la detección de la IL-6 por inmunohistoquímica, se utilizaron los anticuerpos de dos casas comerciales: Peprotech y R&D Systems (anticuerpo perteneciente al kit de ELISA). La inmunoreactividad para IL-6 fue observada en macrófagos testiculares y células de Leydig de ratas del grupo C y E (Fig. 20A y B). También, se observaron células de Sertoli IL-6+ en los túbulos con epitelio germinal de histología normal (ratas C), mientras que en las ratas con OAE, donde el epitelio seminífero se encontraba desorganizado y alterado, unas pocas células de Sertoli mostraron una débil inmunoreactividad para IL-6 (Fig. 20A y B). En las ratas con orquitis, la expresión de IL-6 fue detectada además en las células peritubulares (anticuerpo Peprotech, no mostrado). La expresión de IL-6R fue detectada en macrófagos testiculares, células de Leydig y germinales de ratas C y E (Fig. 20C y D) mientras que las células peritubulares IL-6R+ sólo se observaron en el testículo de ratas con OAE (Fig. 20D). Dado que las células germinales son el blanco del ataque inmunológico en la OAE, nos interesó cuantificar el número de células germinales que expresaban el receptor de la IL-6. Como se muestra en la Fig. 21, existe un incremento significativo en el número de células germinales IL-6R+ en la OAE a partir de los 70-110 días de la primera inmunización respecto de las ratas C. Este aumento se mantiene con el progreso de la lesión (120-150 días, Fig. 21).

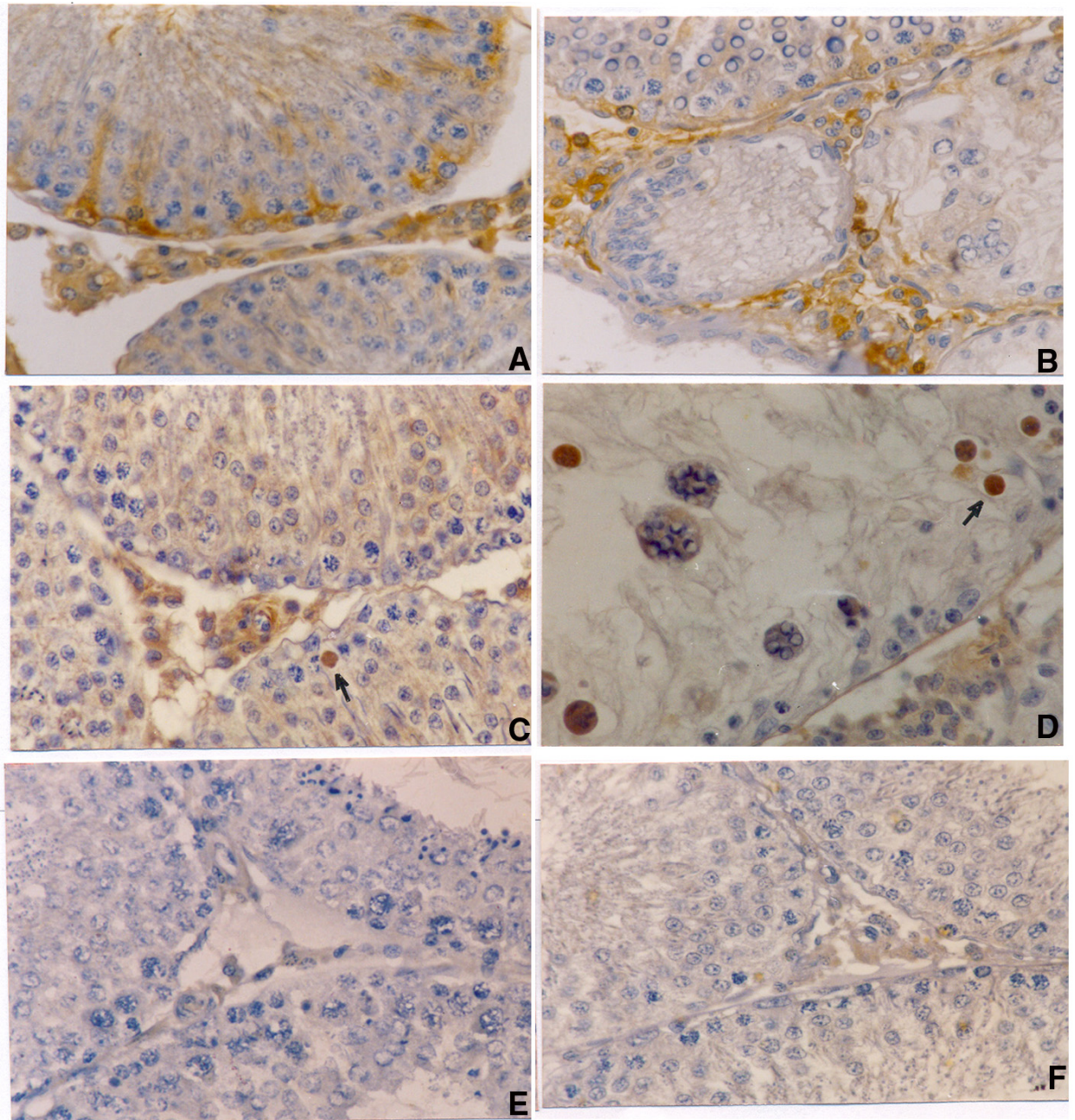


Figura 20. Técnica de inmunoperoxidasa para la IL-6 y su receptor realizada en cortes de testículo de ratas control (A y C) y ratas con OAE severa (B y D) sacrificadas a los 80 días luego de la primera inmunización. Se observan células IL-6+ e IL-6R+ en el intersticio testicular de ratas de los grupos control y experimental (A-D), mientras que las células de Sertoli IL-6+ se encuentran principalmente en las ratas del grupo control (A). Se observan varias células germinales IL-6R+ (flecha) en los túbulos seminíferos dañados de una rata con OAE (D), mientras que una única célula germinal IL-6R+ se observa en el testículo de una rata control (C). Cuando se omitió el primer anticuerpo (E) o se preabsorbió el anticuerpo anti IL-6 (Peprotech) con la citoquina IL-6 (F), no se observó inmunoreacción. X180.

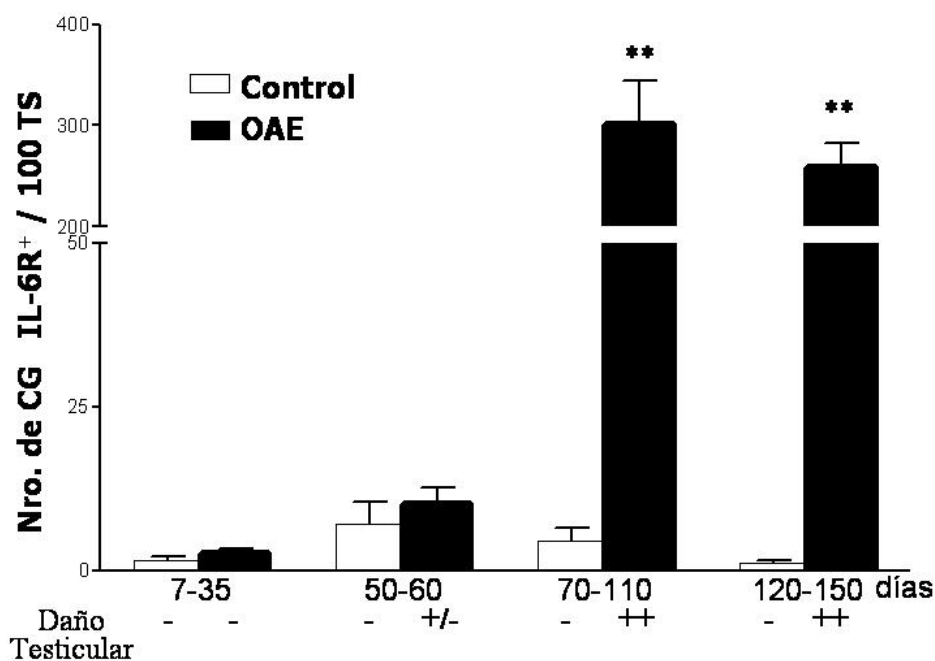


Figura 21. Cuantificación de células germinales (CG) que expresan el receptor de la IL-6 (IL-6R) en cortes de testículo de ratas controles y con OAE sacrificadas a distintos tiempos luego de la primera inmunización. Los diferentes grupos presentaron diferentes grados de lesión testicular: daño focal (+/-), severo (+), severo y extenso (++) o nulo (-). ** $p < 0.01$ vs respectivo control (Test de la mediana). $n = 4-5$ ratas/grupo/periodo de tiempo.

Por la técnica de ELISA, determinamos el contenido de IL-6 en el medio condicionado de macrófagos (MCM) testiculares. Se observó un aumento de 2.5 veces en la producción de IL-6 por los macrófagos testiculares provenientes de ratas con OAE respecto de ratas C (Fig. 22). En el suero de ratas C y E, no se detectó IL-6 indicando que el aumento de IL-6 es local (testicular) y no a nivel sistémico.

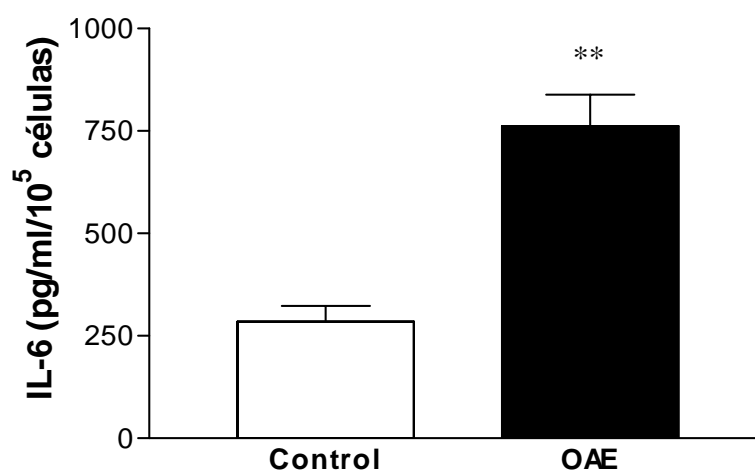


Figura 22. Producción de IL-6 por los macrófagos testiculares. La concentración de IL-6 fue medida por ELISA en los MCM testiculares obtenidos de ratas controles y con OAE severa (sacrificadas a los 130 días de la primera inmunización). Los datos están expresados como pg/ml/10⁵ células. **p<0.01 vs. control (Test "t" de Student). n=4 ratas/grupo.

Dado que la bibliografía sugiere un papel diferencial para los macrófagos testiculares ED1+ y ED2+, nos interesó estudiar si ambas subpoblaciones estaban involucradas en la producción de IL-6. Para ello, detectamos por inmunofluorescencia de doble marcación, la expresión de IL-6 y de los marcadores de las subpoblaciones ED1 y ED2, en macrófagos testiculares aislados de ratas con orquitis severa. Como se muestra en la Fig. 23, la mayoría de los macrófagos ED1+ expresaron IL-6 (Fig. 23A y B), mientras que los macrófagos residentes ED2+ no expresaron esta citoquina (Fig. 23C y D).

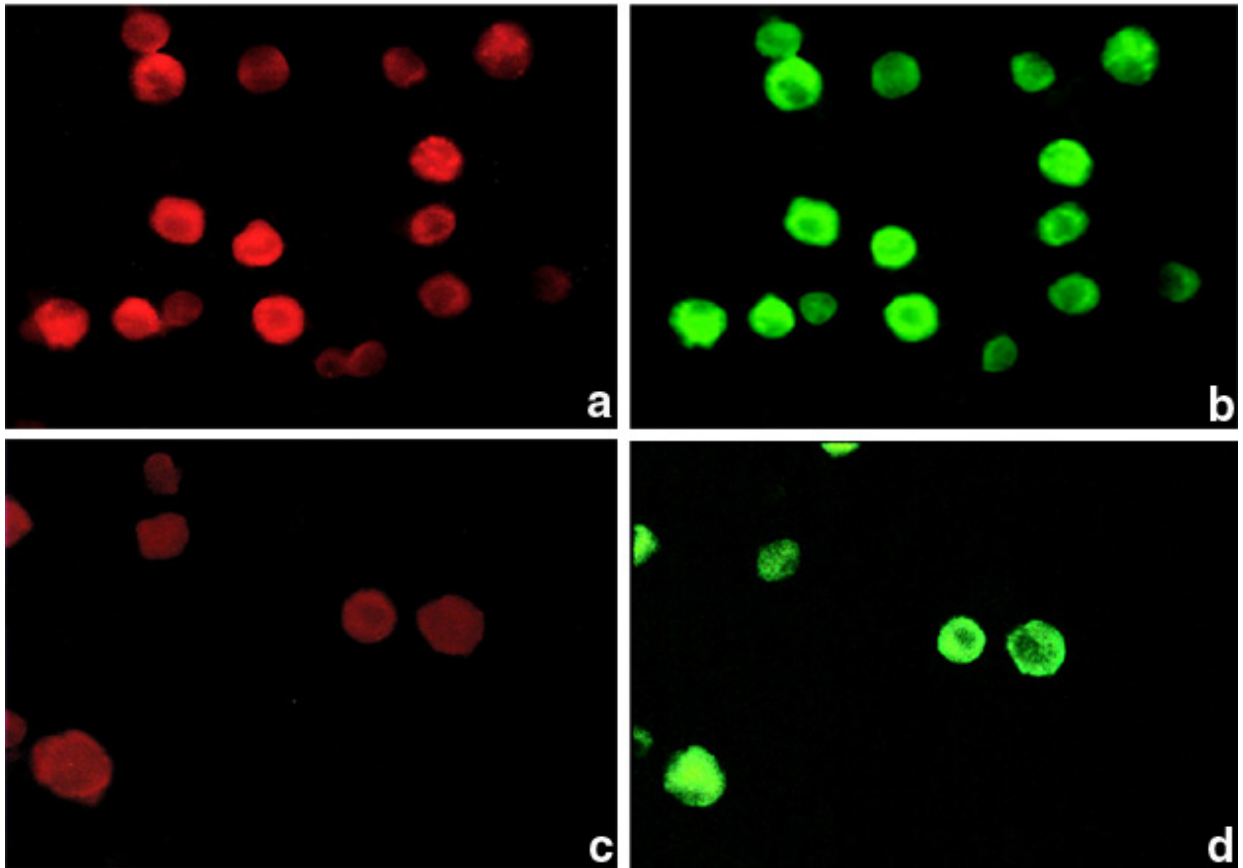


Figura 23. Expresión de IL-6 (a y c) en macrófagos testiculares aislados de ratas con orquitis severa. Mediante los anticuerpos ED1 (b) y ED2 (d), se identificaron los monocitos/macrófagos provenientes de la circulación y los macrófagos residentes, respectivamente. Para detectar la IL-6 se utilizó un segundo anticuerpo conjugado con rodamina (rojo), mientras que para ED1 y ED2 se usó un segundo anticuerpo conjugado con FITC (verde). X750.

4.7.2. La IL-6 está involucrada en la apoptosis de las células germinales *in vitro*

Previamente demostramos que en la OAE, las células germinales mueren por apoptosis (Theas y col., 2003). La presencia de células germinales que expresan el receptor de la IL-6 en las ratas con orquitis y la producción incrementada de esta citoquina por los macrófagos testiculares en la OAE, sugería que la IL-6 podría estar involucrada en la inducción de la apoptosis de las células germinales. Por ello, estudiamos el papel de la IL-6 sobre la viabilidad de las células germinales, utilizando dos sistemas experimentales *in vitro*: células germinales aisladas y segmentos de túbulos seminíferos. El primero tiene la ventaja de ser un sistema más sencillo, que además permite evaluar los efectos directos sobre las células germinales y el segundo, de preservar las interacciones celulares dentro del túbulo seminífero y de esta manera, conservar su fisiología.

En los segmentos de túbulos seminíferos, la IL-6 indujo una reducción en la viabilidad evaluada por el método de exclusión de azul tripán (Tabla 9) y un aumento en el número de células apoptóticas TUNEL+ (Fig. 24). En las células germinales aisladas, se observó que la IL-6 redujo significativamente la viabilidad celular, evaluada por el ensayo de MTS (Tabla 9). Además, la IL-6 incrementó el porcentaje de células germinales caspasa 3+ (datos no mostrados). Consistentemente, por los tres métodos utilizados, la IL-6 redujo la viabilidad celular aproximadamente en un 15%.

Tabla 9. Efecto de la IL-6 sobre la viabilidad de las células germinales *in vitro*

| | IL-6 (ng/ml) | |
|---|--------------|--------------|
| | 0 | 50 |
| Azul tripán (% de células muertas) ¹ | 22.01±4.43 | 37.12±6.38* |
| Ensayo de MTS (DO x 10 ⁻³) ² | 81.00±5.70 | 54.30±6.30** |

Segmentos de túbulos seminíferos (1) y células germinales aisladas (2) de ratas normales fueron incubados con IL-6. La viabilidad de las células germinales fue evaluada por el método de exclusión de azul tripán y el ensayo de MTS. Los datos representan la media ± ESM de 4 experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01 vs. muestras no tratadas con IL-6 (Test de ANOVA de 2 factores).

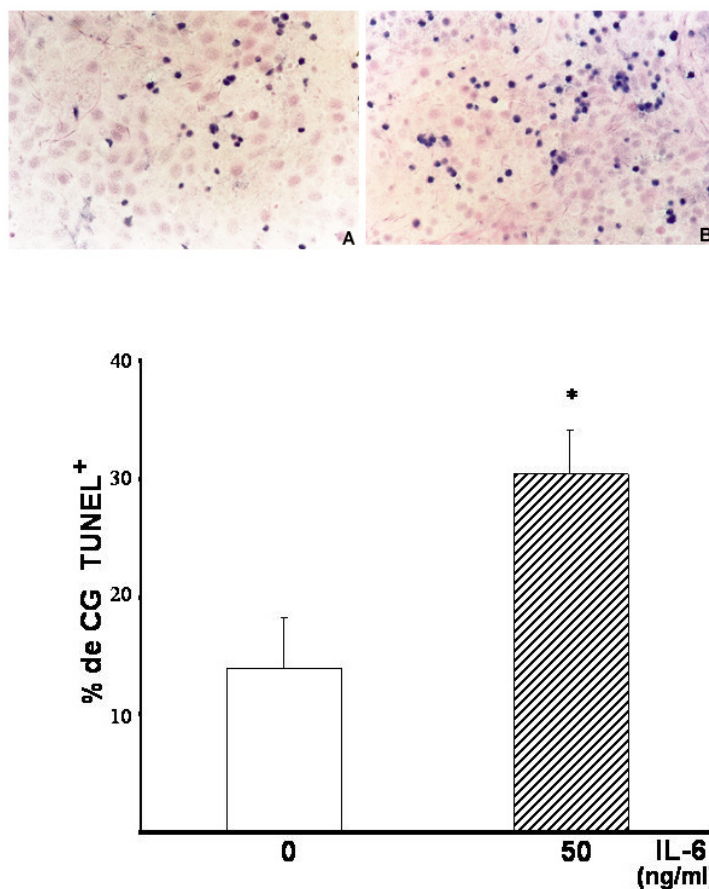


Figura 24. Efecto *in vitro* de la IL-6 sobre la apoptosis de las células germinales (CG). La técnica de TUNEL fue empleada sobre los "squashes" de segmentos de túbulos seminíferos (STS) previamente incubados con IL-6 por 18 hs. Los datos están expresados como la media \pm ESM de 2 experimentos independientes. * $p < 0.05$ (Test "t" de student). En el panel superior se muestran microfotografías de la técnica de TUNEL realizada en los "squash": A: STS no tratado y B: STS incubado con IL-6. 137X.

*En el testículo normal diferentes tipos celulares producen IL-6 (macrófagos, células de Sertoli y de Leydig). Durante la OAE, la expresión de la IL-6 disminuye en las células de Sertoli, mientras que aumenta la producción de esta citoquina en los macrófagos testiculares. Dentro de esta población de CPA, los macrófagos ED1+ serían los responsables de dicha secreción. Por otra parte, los resultados de los experimentos *in vitro* mostrando un efecto apoptótico de la IL-6 y el incremento en el número de células germinales que expresan el receptor de la*

IL-6 in vivo, sugieren que la IL-6 está involucrada en la apoptosis de las células germinales.

4.7.3. En la OAE, los macrófagos testiculares producen niveles más elevados de otra citoquina pro-inflamatoria: el IFN γ .

Por la técnica de ELISA, determinamos los niveles de IFN γ en el MCM testiculares obtenidos de ratas C y E. Como puede observarse en la Fig. 25, en el grupo E comparado con el grupo C, existe un aumento significativo en los niveles de IFN γ de 6.8 y de 2.8 veces en los períodos 50-60 y 80-100 días luego de la primera inmunización, respectivamente.

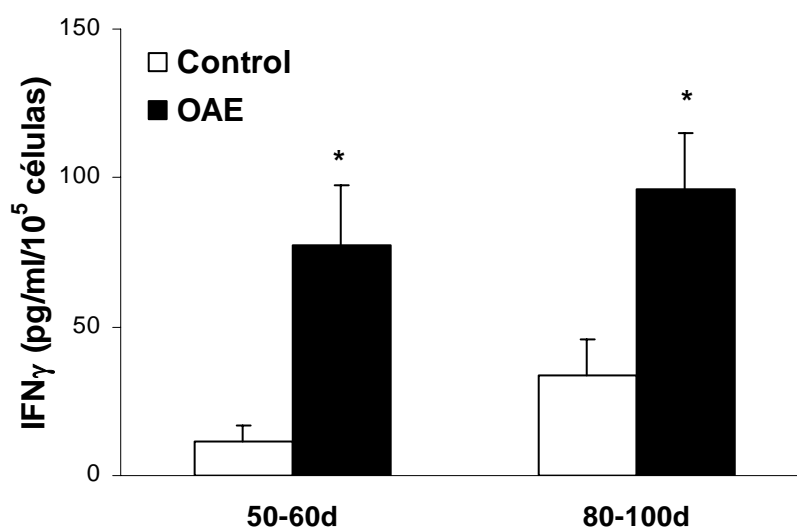


Figura 25. Producción de IFN γ por los macrófagos testiculares. La concentración de IFN γ fue medida por ELISA en los MCM testiculares obtenidos de ratas controles y con orquitis sacrificadas entre los 50-60 y 80-100 días de la primera inmunización. Los datos están expresados como pg/ml/10⁵ células. * $p < 0.05$ vs. grupo control (Test de ANOVA Kruskal Wallis). $n = 4-7$ ratas/grupo/período de tiempo.

4.7.4. Otras citoquinas producidas por los macrófagos testiculares que no estarían especialmente involucradas durante la OAE

Se determinaron, por ELISA, los niveles de citoquinas con funciones inmunosupresoras como la IL-10 y el TGF β . También se estudió la secreción del GM-CSF. En cuanto al GM-CSF y la IL-10 no se observaron diferencias en el contenido de estas citoquinas en los MCM testiculares provenientes de ratas C y E (media \pm ESM (pg/ml/10⁵ células): GM-CSF: N: 49.82 \pm 13.65; período 50-60 días (d): C:

70.56±29.79, E: 44.60±6.69; período 80-100d: C: 55.91±12.67, E: 41.39±10.56; IL-10: N: 25.39±7.31; período 50-60d: C: 20.81±6.58, E: 27.43±6.99; período 80-100d: C: 32.24±16.47, E: 33.47±14.23), mientras que los niveles de TGFβ de todas las muestras estudiadas se encontraron por debajo de los niveles de detección del kit de ELISA.

4.7.5. El TNFR1 es necesario para el desarrollo de la OAE.

Previamente demostramos que los macrófagos testiculares producen TNFα y que durante la OAE severa, existe un aumento significativo en la producción de TNFα por dichas células (Suescun y col., 2003). Los principales efectos inflamatorios del TNFα están mediados por su receptor de tipo 1 (TNFR1) (Peschon y col., 1998). Para evaluar el papel del TNFα en la OAE, inmunizamos con HT y AFC, un grupo de ratones deficientes en la expresión del TNFR1 y como control, un grupo de ratones silvestres de la misma cepa siguiendo el esquema de inmunización indicado para los ratones E (sección 3.4. de "Materiales y Métodos"). Los resultados de la histopatología testicular muestran que tanto la incidencia como la severidad de la lesión (evaluada por el índice de OAE) se encuentran significativamente reducidas en los animales deficientes para TNFR1 respecto de los animales silvestres (Fig. 26), lo que sugiere que el TNFR1, probablemente a través del TNFα, tiene un papel fundamental en el desarrollo de la OAE.

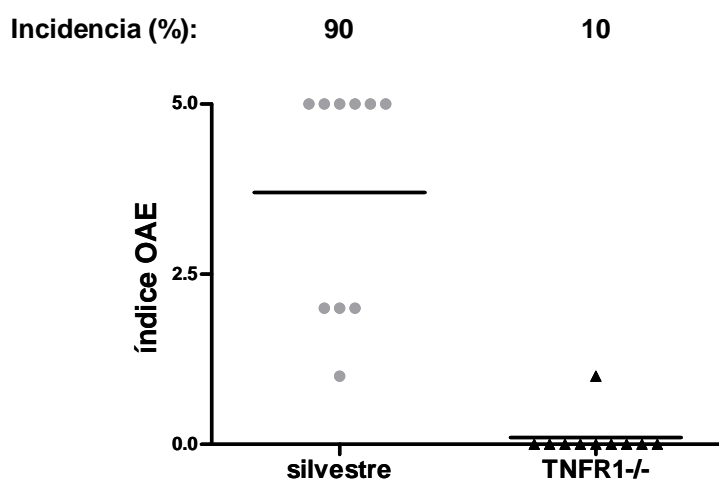


Figura 26. Porcentaje de animales que desarrollaron OAE (incidencia) y severidad de la lesión testicular (índice OAE) en ratones silvestres y deficientes para la expresión del TNFR1 (TNFR1-/-). Incidencia: $p < 0.01$ (Test de proporción) e índice de OAE: $p < 0.01$ (Test de la mediana) vs. ratones silvestres. $n = 10$ ratones/grupo.

Los macrófagos testiculares de las ratas con orquitis producen altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias como el $TNF\alpha$, la IL-6 y el $IFN\gamma$, sugiriendo que estas moléculas están involucradas en la inflamación y/o daño testicular. En efecto, los resultados obtenidos con los ratones deficientes en la expresión de $TNFR1$ indican que este receptor, y posiblemente el $TNF\alpha$, son indispensables para el desarrollo de la OAE.

4.8. En el testículo normal existen células dendríticas y su número se encuentra aumentado en la OAE

Las células dendríticas en la rata pueden ser identificadas mediante los marcadores OX62 y CD11c (Turnbull y MacPherson 2001; Brenan y col., 1992), mientras que en el ratón, se utiliza el anticuerpo CD11c (Banchereau y col., 2000).

4.8.1. Células dendríticas en el testículo de ratas

La identificación y cuantificación de las células dendríticas testiculares fue realizada en ratas de las cepas Sprague-Dawley y Wistar en colaboración con un grupo de investigación dirigido por el Dr. Meinhardt (Universidad Justus-Liebig, Giessen, Alemania).

Por inmunohistoquímica observamos que las células dendríticas OX62+ y CD11c+ se localizaron en el intersticio testicular de ratas N (no mostrado), C y E (Fig. 27 y 28), concentrándose, especialmente, en los granulomas presentes en el testículo de ratas con OAE (Fig. 28B).

Por técnicas estereoscópicas cuantificamos el número de células dendríticas del testículo de ratas de los distintos grupos. Durante el período de inmunización (30 días posteriores a la primera inmunización), no se observaron diferencias en el número de células dendríticas testiculares entre los grupos N, C y E (Nro. de células OX62+ ($\times 10^5$): N: 3.78 ± 0.81 ; C: 3.69 ± 0.62 ; E: 3.68 ± 1.33 y nro. de células CD11c+ ($\times 10^5$): N: 3.78 ± 0.50 ; C: 3.96 ± 0.79 ; E: 4.67 ± 4.33 ; ratas de la cepa Sprague-Dawley).

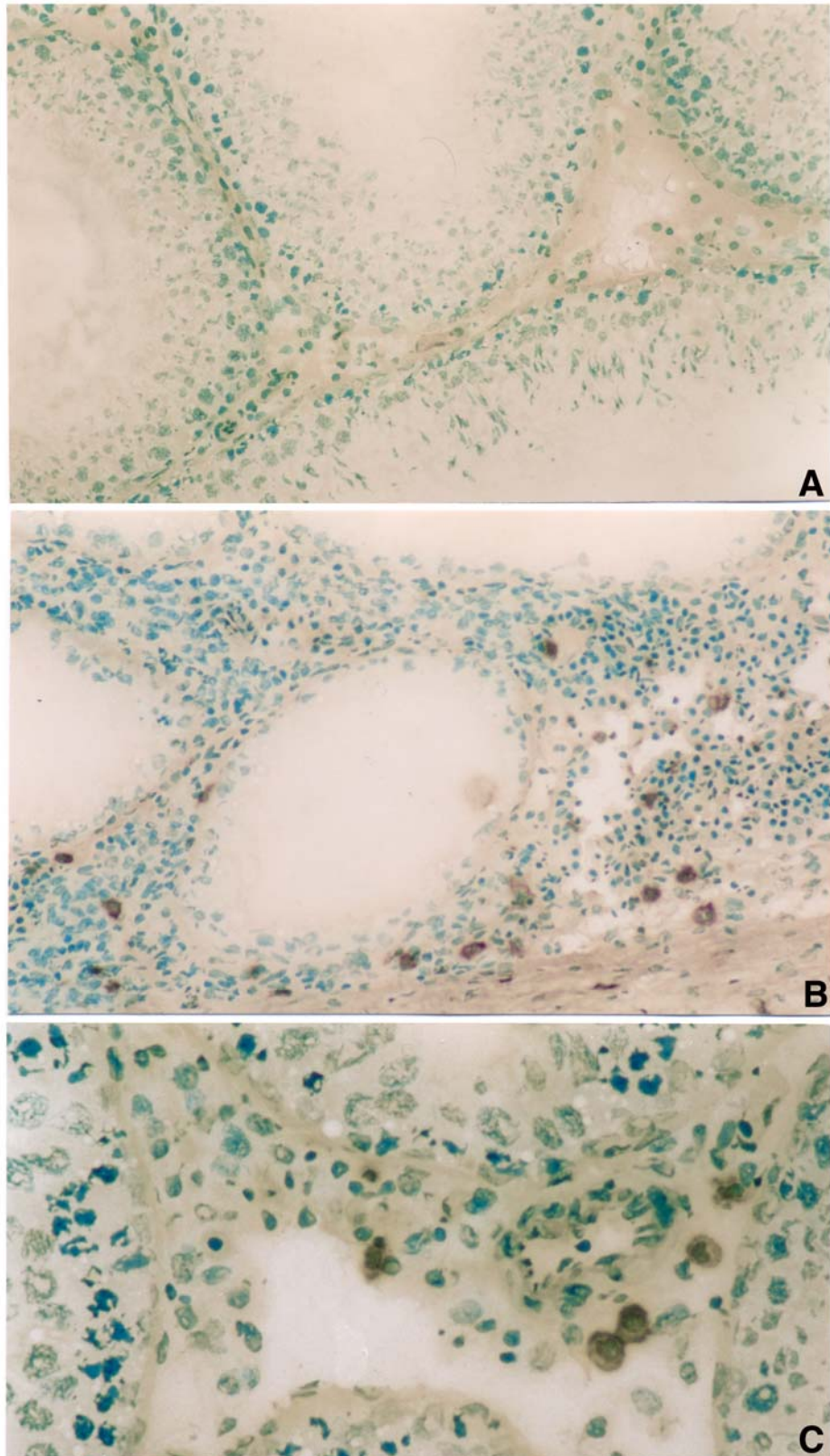


Figura 27. Técnica de inmunoperoxidasa utilizando el anticuerpo OX62 en cortes de testículo correspondientes a ratas de la cepa Sprague-Dawley del grupo control (A) y experimental (B y C) sacrificadas 50 días luego de la primera inmunización. X200 (A y B) y X400 (C).

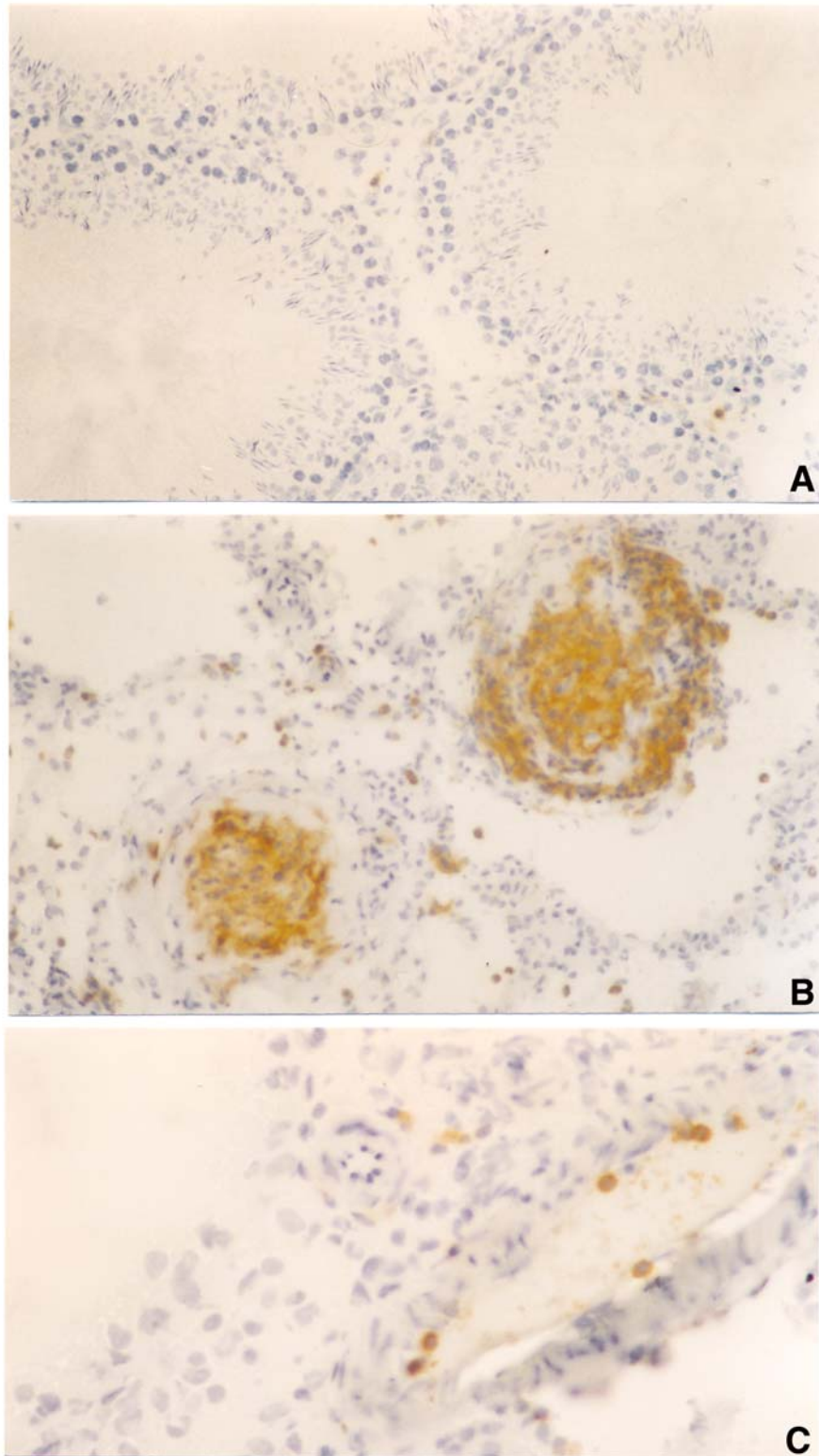


Figura 28. Técnica de inmunoperoxidasa utilizando el anticuerpo CD11c en cortes de testículo correspondientes a ratas de la cepa Wistar del grupo control (A) y experimental (B y C) sacrificadas 50 días luego de la primera inmunización. Numerosas células CD11c+ se observan en dos granulomas, mientras que en la luz de un vaso sanguíneo se detectan algunas células inmunoreactivas. X200 (A y B) y X400 (C).

Luego de los 50 días de la primera inmunización, se observó un aumento significativo en el número de células OX62+ y CD11c+ en las ratas con OAE de las cepas Sprague-Dawley y Wistar respecto de los grupos N y C (Fig. 29a y c). Este aumento se mantuvo elevado en las ratas con OAE de la cepa Wistar luego de los 80 días de la primera inmunización (Fig. 29b). El abundante número de células dendríticas presentes en los granulomas no fue incluido en la cuantificación por la dificultad de distinguir células individuales. Entre las ratas N y C de ambas cepas no se observaron diferencias en el número de células dendríticas (Fig. 29a-d) sugiriendo que el tratamiento con adyuvantes no modifica a la población de células dendríticas testiculares. A pesar de que los marcadores utilizados identifican diferentes poblaciones celulares, los números de células dendríticas OX62+ y CD11c+ fueron similares, indicando que la utilización de uno de ellos es suficiente.

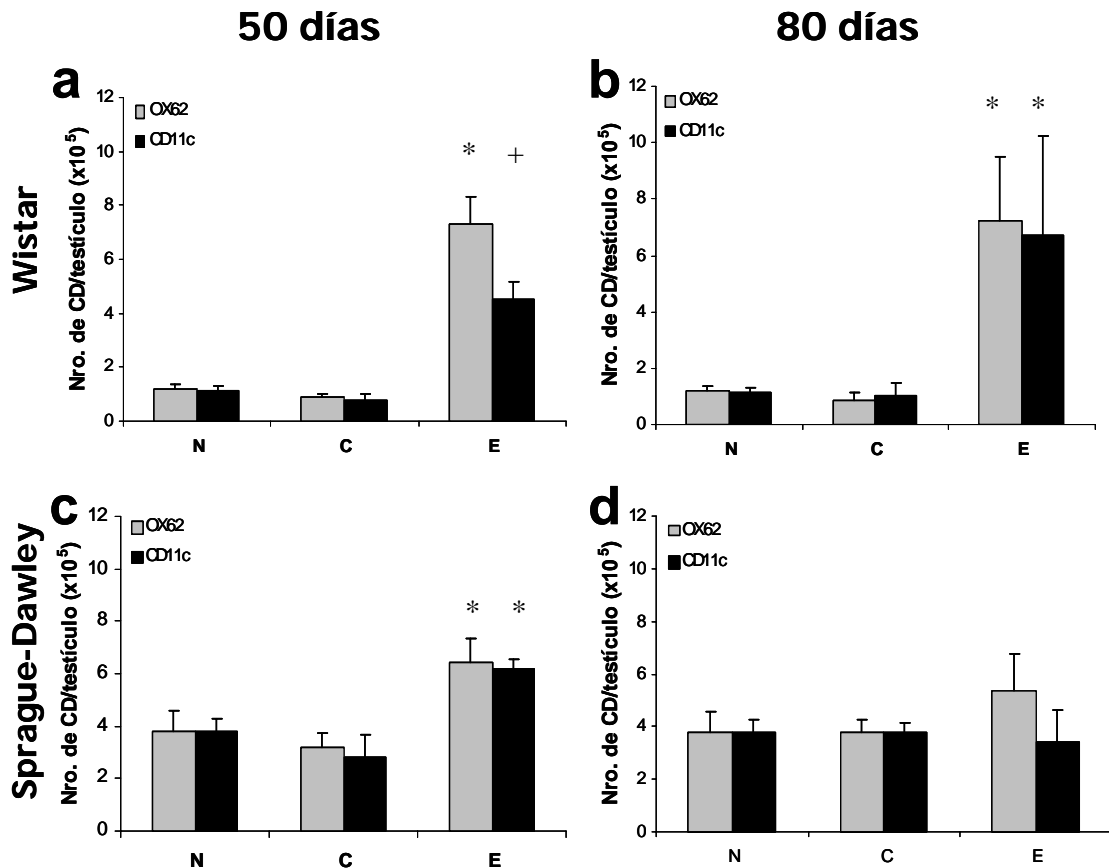


Figura 29. Número de células dendríticas (CD) OX62+ y CD11c+ por testículo en ratas Wistar (a y b) y Sprague-Dawley (c y d) de los grupos N, C, y E sacrificadas a los 50 y 80 días luego de la primera inmunización. * $p < 0.05$ vs. respectivo grupo N y C, + $p < 0.05$ vs. OX62+ del mismo grupo y vs. respectivo grupo N y C (Test de ANOVA Kruskal Wallis). $n = 5-7$ ratas/grupo/período de tiempo.

4.8.2. Células dendríticas en el testículo del ratón

Por inmunofluorescencia, las células CD11c⁺ fueron observadas en muy pocas ocasiones en el testículo de ratones N, indicando la presencia de un número muy reducido de dichas células. En el testículo de ratones con OAE respecto de los controles y normales, se encontró un mayor número de células CD11c⁺. De forma similar a lo descrito en la rata, las células dendríticas siempre se localizaron en el intersticio testicular y se concentraron especialmente en los granulomas (datos no mostrados).

El número de células dendríticas fue cuantificado por citometría de flujo utilizando el marcador CD45, siguiendo la misma metodología utilizada para estudiar los macrófagos testiculares. En el testículo de ratones con OAE se observó un incremento de 69 y 13 veces comparado con los ratones N y C, respectivamente (Fig. 30). Además, se observó que el tratamiento con adyuvantes indujo un incremento de 5.3 veces en el número de células dendríticas testiculares (Fig. 30). Por otro lado, el porcentaje de células dendríticas CMH II⁺, evaluado por citometría de flujo, resultó similar entre los distintos grupos de ratones (porcentaje de células CD11c⁺ CMH II⁺: N: 41.3±2.8, C: 63.8±11.0 y E: 60.5±11.8, n=4-7 ratones/grupo).

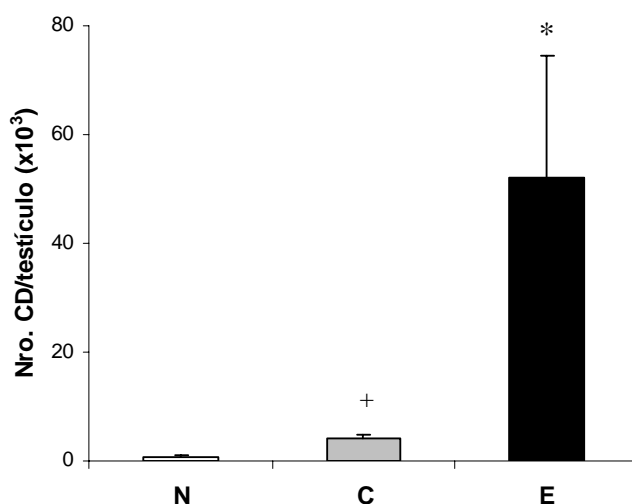


Figura 30. Cuantificación del número de células dendríticas (CD) CD11c⁺ por citometría de flujo en ratones de los grupos N, C y E. *p<0.05 vs. grupos N y C, +p<0.05 vs. grupo N (Test de la mediana). n=6-7 ratones/grupo.

4.9. El nivel de expresión de las moléculas del CMH II y moléculas co-estimuladoras en las células dendríticas testiculares es similar entre las ratas de los distintos grupos

Para estudiar el fenotipo de las células dendríticas testiculares, se analizó, por citometría de flujo, la expresión de moléculas del CMH II y de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en células OX62+. Para estos experimentos, utilizamos ratas de la cepa Wistar dado que fue la cepa donde se observó un incremento más importante en el número de células dendríticas testiculares. Los resultados indican que el 95-100% de las células dendríticas presentes en el testículo de ratas N, C y E expresan las moléculas CMH II, CD80 y CD86 mientras que no existen diferencias entre los grupos (Fig. 31).

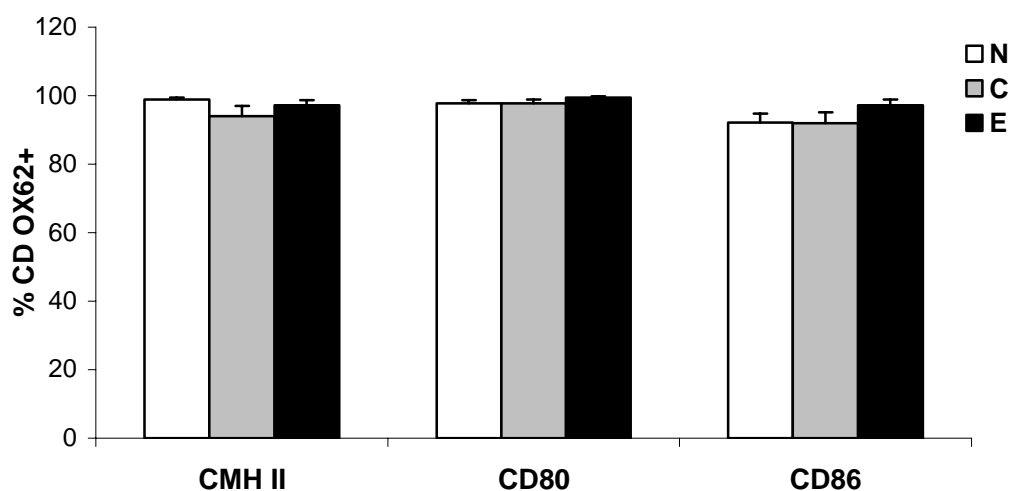


Figura 31. Porcentaje de células dendríticas (CD) OX62+ que expresan moléculas del CMH II y las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en ratas de los grupos N, C y E sacrificadas entre los 50-60 días luego de la primera inmunización. n=15 ratas/grupo/molécula.

El análisis de la intensidad de fluorescencia del CMH II, CD80 y CD86 reveló similares niveles de expresión de estas moléculas en las células dendríticas testiculares de ratas N, C y E (Fig. 32). Por otro lado, en otros órganos como el bazo y pulmón, la intensidad de fluorescencia para las moléculas del CMH II en las células OX62+, resultó comparable a la observada en el testículo (índice IFM: testículo: 27.4 ± 4.4 ; bazo: 25.6 ± 11.1 ; pulmón: 25.1 ± 3.2). De esta manera, los resultados

sugieren que las células dendríticas testiculares presentarían un fenotipo inmaduro tanto en el testículo normal como durante la OAE.

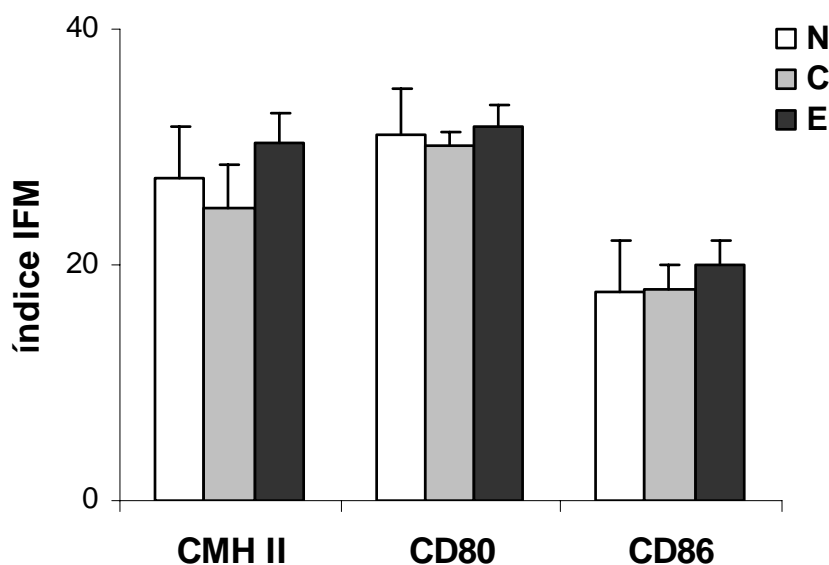


Figura 32. Expresión de las moléculas del CMH II y co-estimuladoras CD80 y CD86 en células dendríticas testiculares de ratas N, C y E. Índice de intensidad media de fluorescencia (IMF): IMF población positiva/IMF población negativa. n=15 ratas/grupo/molécula.

Nuestros resultados muestran la existencia de células dendríticas en el testículo normal de ratas y ratones. Durante una inflamación sistémica, como la inducida por los adyuvantes, el número de células dendríticas testiculares no se modifica en la rata, mientras que en el ratón, se produce un aumento en el número de dichas células, sugiriendo una diferente susceptibilidad a los adyuvantes entre ambas especies. Las células dendríticas testiculares expresan las moléculas del CMH II, CD80 y CD86 y dicha expresión no se modifica durante la inflamación testicular (OAE).

5. Discusión

5. Discusión

5.1. La orquitis autoinmune: modelos experimentales utilizados

La orquitis autoinmune experimental (OAE) es un modelo útil para estudiar autoinmunidad específica de órgano y para comprender los mecanismos involucrados en una respuesta inflamatoria en el testículo. En la OAE, el blanco del ataque inmunológico son las células germinales, principalmente espermátides y espermatoцитos, que mueren por apoptosis y se descaman del epitelio germinal, dejando los túbulos seminíferos atróficos (Theas y col., 2003). Recientemente, Fijak y col. (2005) identificaron algunos de los autoantígenos involucrados en la inducción de la OAE. Estos autores mostraron que el suero de ratas con OAE reaccionaba con las proteínas Hsp70 ("heat shock protein 70"), hnRNP H1 ("heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1"), ER-60 ("disulphide isomerase") y ODF-2 ("outer dense fibre major protein 2") y que un 25% de las ratas inmunizadas con estas proteínas desarrollaba OAE. De esta manera, identificaron algunos autoantígenos, de los cuales ODF-2 se expresa exclusivamente en el testículo, específicamente en los espermatozoides, y ER-60 se localiza en el acromosa de las espermátides y espermatozoides. Para estudiar la inflamación testicular, se han desarrollado experimentalmente diferentes modelos de orquitis autoinmune, en todos ellos se observa, como denominador común, un infiltrado inflamatorio intersticial y un daño del epitelio germinal. Estos modelos resultan útiles para estudiar los mecanismos inmunoregulatorios del testículo y para entender patologías con inflamación testicular de etiología desconocida en el hombre. Las ventajas del modelo de la OAE murina con respecto al de la rata son, claramente, el menor tiempo en el que se desarrolla la lesión testicular y el requerimiento de una sola inmunización. Además, la gran disponibilidad de ratones deficientes en la expresión de distintas moléculas y de ratones transgénicos, permite dilucidar los mecanismos involucrados en la patogenia de la OAE. El modelo de OAE en rata permite obtener un mayor rendimiento de células y, por lo tanto, la utilización de un menor número de animales para los experimentos *in vitro*. Comparando la OAE desarrollada en ratas de la cepa Wistar respecto de la cepa Sprague-Dawley, observamos que a tiempos cortos (50 días luego de la primera inmunización), las ratas Wistar desarrollan una lesión más severa y caracterizada por una mayor frecuencia de granulomas. Por lo

tanto, el modelo de OAE en ratas Wistar, sería especialmente útil para estudiar los mecanismos involucrados en la formación de granulomas. Por otro lado, estas observaciones indican que el grado de daño testicular de la orquitis dependería de factores genéticos. De hecho, varios estudios mostraron que la susceptibilidad a la OAE está influenciada fuertemente por genes relacionados al CMH y por otros genes no relacionados, como por ejemplo el receptor de la histamina H1 (Lustig y Tung, 2006; Ma y col., 2002; Person y col., 1992; Teuscher y col., 1987).

Aunque estos modelos de OAE ya han sido previamente descritos y los cambios histológicos están bien caracterizados, en el modelo de ratas no se había desarrollado un índice de OAE que permitiera evaluar cuantitativamente el grado de lesión testicular. Este nuevo aporte será de gran utilidad para sistematizar el estudio de la OAE en ratas y para agrupar a los animales de acuerdo a la lesión testicular, la cual, a veces varía notablemente entre los animales del grupo experimental sacrificados en un mismo período de tiempo.

5.2. Macrófagos testiculares

A pesar de ser un "órgano inmunoprivilegiado", un gran número de macrófagos está presente en el intersticio del testículo normal. Como se ha descrito extensamente (Hales, 2002; Hutson, 2006), los macrófagos testiculares tienen un papel relevante en la regulación de la esteroidogénesis a través de su interacción con las células de Leydig y de esta manera, los macrófagos testiculares son importantes para el mantenimiento de la fisiología testicular. Sin embargo, las funciones inmunológicas de los macrófagos testiculares han sido poco estudiadas, sobre todo en condiciones de inflamación testicular.

5.2.1. Los macrófagos testiculares en condiciones fisiológicas

En el testículo normal de la rata, la población de macrófagos es heterogénea, siendo la subpoblación ED2+ la predominante. Los monocitos/macrófagos ED1+ que llegan desde la circulación al testículo se diferenciarían en el tejido a macrófagos residentes ED2+. Esto explicaría la existencia de una subpoblación ED1+ED2+ que corresponde a un estado de transición en el camino de diferenciación entre un extremo (monocitos) y el otro (macrófagos residentes tisulares). El número de células ED1+ED2- presentes en el testículo normal es bajo y nuestros resultados

muestran que representan aproximadamente el 9% de los macrófagos totales. Esto podría explicarse por un escaso o lento reclutamiento de monocitos de la circulación y/o también por una rápida diferenciación a macrófagos residentes (ED2+) bajo la influencia de factores presentes en el testículo. De esta manera, el número de macrófagos testiculares se mantendría estable gracias al reclutamiento de células precursoras desde la circulación. Sin embargo, Schlatt y col. (1999) mostraron que en el testículo normal, existe un nivel de mitosis basal de los macrófagos testiculares, que también contribuiría al mantenimiento de esta población celular.

De forma similar al modelo de activación M1 y M2, se ha postulado que las subpoblaciones de macrófagos testiculares tienen diferentes características. Según este modelo de polarización, los macrófagos se diferencian a subtipos M1 o M2 dependiendo de los estímulos que activen a estas células. Así, los macrófagos M1 secretan altos niveles de citoquinas como la IL-12 y la IL-23, lo que induce una respuesta Th1. En cambio, los macrófagos M2 secretan bajos niveles de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1, IL-6 y TNF α y elevados niveles de citoquinas inmunosupresoras como la IL-10. De esta manera, los macrófagos M2 estarían más bien involucrados en la eliminación de restos celulares, en promover la angiogénesis y en el remodelamiento tisular (Mantovani y col., 2004). En forma análoga, los macrófagos ED1+ mantendrían el perfil pro-inflamatorio de los monocitos, mientras que los macrófagos residentes ED2+, bajo la influencia del microambiente testicular, presentarían propiedades más bien inmunosupresoras. Entre estos dos extremos, encontraríamos una gran gama de células ED1+ED2+ cuya función predominante, probablemente, dependa del camino de diferenciación recorrido y por lo tanto, del extremo más próximo del cual se encuentren.

En el testículo del ratón, las células F4/80+ también se localizan en el intersticio, en íntimo contacto con las células de Leydig, de forma similar al testículo de la rata. El anticuerpo F4/80 identifica un antígeno con función aún desconocida expresado por los monocitos y macrófagos (Gordon, 1999). Bryniarski y col. (2004) mostraron que existen diferentes subpoblaciones de macrófagos en el testículo de ratón que presentan una alta o baja producción de TGF β y que esto se correlaciona con una baja o alta capacidad de presentar antígenos, respectivamente. Nuestros resultados muestran que en el testículo normal, la mayor parte (~60%) de los macrófagos no expresan CD4, siendo esta otra característica que evidencia la heterogeneidad de la

población de macrófagos testiculares. La expresión de CD4 en CPA, como monocitos y células dendríticas, ha sido descrita previamente (Szabo y col., 1990; Zhang y col., 2005). Estos estudios indican que las CPA CD4⁺ tienen una mayor capacidad para presentar antígenos y una elevada producción de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF α respecto de las CPA que no expresan CD4. Aunque son necesarios más estudios al respecto, la expresión de CD4 podría ser utilizada como un marcador de distintas subpoblaciones de macrófagos en el testículo así como en otros órganos.

5.2.2. Los macrófagos testiculares durante la inflamación testicular

Hemos observado que en la OAE murina y de rata, existe un aumento significativo en el número de macrófagos testiculares, sugiriendo que estas células están involucradas en el daño testicular. En otros modelos de autoinmunidad específica de órgano, como la encefalitis y uveoretinitis autoinmunes, también se observa un incremento del número de macrófagos en el tejido blanco, indicando un importante papel para estas células en la autoinmunidad (Polfliet y col., 2002; Benveniste, 1997; Raivich y Banati, 2004; Forrester y col., 1998). El análisis de las distintas subpoblaciones de macrófagos en la rata, revela un aumento similar (1.8-1.9 veces) en el número de células ED1⁺ y ED2⁺ durante la OAE focal y severa. Pero, dado que existe una población doble positiva (ED1⁺ED2⁺), nos resultó interesante poder discriminar entre las células ED1⁺ED2⁻ y aquellas ED2⁺ED1⁻ que representarían los polos extremos de células con perfiles funcionales claramente diferentes. Así, durante la OAE focal (índice OAE: 5-7), se observa un incremento significativo en el número de macrófagos dobles positivos (ED1⁺ED2⁺), mientras que la subpoblación ED2⁺ED1⁻ no se modifica en número. Sería de esperar que en un período más avanzado de la lesión testicular, se encontrase un aumento de la subpoblación de macrófagos ED2⁺ED1⁻, producto de la diferenciación de las células dobles positivas. En cambio, en la OAE severa, existe, al igual que lo que ocurre durante la lesión focal, un aumento en el número de macrófagos ED1⁺ED2⁺ sin cambios significativos en el número de células ED2⁺ED1⁻. Entonces, ¿cuál es el destino de estas células dobles positivas? Dado que no observamos células apoptóticas en el intersticio testicular durante la OAE (Theas y col., 2003), postulamos que los macrófagos ED1⁺ED2⁺ se mantienen "indiferenciados", más cerca del perfil ED1⁺, resultado del aumento de factores pro-inflamatorios secretados en el testículo de animales con

OAE. (ver más adelante, sección 5.3. "Citoquinas"). De esta manera, los macrófagos dobles positivos, bajo la acción de estímulos inflamatorios, seguirían la vía de activación M1, convirtiéndose en potentes células efectoras iniciadoras de una respuesta tipo Th1.

5.2.3. ¿Cómo se produce el incremento en el número de macrófagos testiculares durante la OAE?

Dado que el número de macrófagos testiculares aumenta en la OAE, surge una segunda pregunta: ¿cuáles son los factores involucrados en este incremento celular? Es conocido el papel de las quemoquinas en el reclutamiento de diferentes leucocitos a los tejidos en condiciones fisiológicas y durante procesos inflamatorios. En la OAE, demostramos que desde una etapa temprana (30 días posteriores a la primera inmunización), existe un aumento en los niveles de MCP-1 en el testículo de ratas experimentales (Guazzone y col., 2003). Esta quemoquina sería esencial para el reclutamiento de monocitos durante la OAE y también estaría involucrada en el aumento inicial del número de macrófagos testiculares observado durante el período de inmunización (7-30 días). Por otra parte, otras quemoquinas que reclutan monocitos como las proteínas inflamatorias de macrófagos 1 α y β (MIP-1 α y β) se encuentran aumentadas en la OAE (Guazzone y col., 2004). Apoyando estos resultados, se observó, en el testículo de ratas con orquitis, un aumento en el número de células intersticiales que expresan los receptores para estas quemoquinas (CCR5 y CCR2) (Guazzone y col., 2003 y 2004), lo que sugiere que dichas quemoquinas están involucradas en el reclutamiento de leucocitos al testículo durante la OAE.

5.2.4. Papel de los macrófagos testiculares en la inducción de la OAE

Experimentos previos de transferencia adoptiva de células, mostraron que las células T eran necesarias para el desarrollo de la OAE. Sin embargo, cuando se inyectaban ratones con una suspensión celular obtenida de ganglios linfáticos a la cual se le habían eliminado los linfocitos, se observaba que los animales también desarrollaban OAE (Tung y col., 1981). Estos resultados sugerían que los linfocitos T y otras células no T, presentes en los ganglios linfáticos, eran necesarias para el desarrollo de la OAE. El aumento del número de macrófagos testiculares que

observamos en la OAE, también sugiere que estas células están involucradas en el desarrollo de este cuadro. Mediante los experimentos de depleción macrofágica utilizando liposomas que contienen clodronato, demostramos fehacientemente que los macrófagos son componentes esenciales en los mecanismos patogénicos de la OAE. En efecto, se indujo una reducción en la incidencia y severidad de la orquitis cuando se impidió el aumento del número de macrófagos testiculares. En los experimentos utilizando liposomas con clodronato, la eliminación de los macrófagos no fue total; sin embargo, a juzgar por los resultados obtenidos, se alcanzó un umbral efectivo que impidió la evolución del cuadro autoinmune. Dado que se utilizó la vía intraperitoneal para la administración de los liposomas, no se esperaba que la depleción de macrófagos fuera exclusiva del testículo ni que los macrófagos testiculares residentes fueran eliminados, ya que los liposomas no atraviesan el endotelio vascular. Sin embargo, se observó una reducción en el número de macrófagos testiculares ED2+ en las ratas inyectadas con liposomas conteniendo clodronato obteniéndose un número similar al que se encuentra en el testículo normal. Esto sugiere que en la OAE (y también bajo el efecto inducido por los adyuvantes), el reclutamiento de monocitos ED1+ es la principal fuente para el incremento de los macrófagos testiculares, mientras que la mitosis de los macrófagos ED2+, si existe, no tendría un aporte significativo. Por último, según se ha descrito (van Rooijen, 1989), la inyección intraperitoneal de los liposomas conteniendo clodronato provoca la eliminación principalmente, de los macrófagos peritoneales y los de la circulación, o sea de los monocitos ED1+. Por lo tanto, los resultados obtenidos de la depleción de macrófagos y la cuantificación de macrófagos testiculares por inmunohistoquímica, nos permiten postular que los monocitos/macrófagos ED1+ son las principales células involucradas en la patogenia de la OAE.

Nuestros resultados indican que los macrófagos serían indispensables para el desarrollo de la OAE, mientras que los resultados de otros autores (Tung y col., 1981; Mahi-Brown y col., 1987) destacan principalmente el papel de las células T. Evaluando los resultados en conjunto, postulamos que los macrófagos serían indispensables para iniciar la respuesta autoinmune, probablemente por su función como CPA, y luego los linfocitos serían necesarios en la fase efectora, para inducir el daño testicular. Los macrófagos testiculares podrían participar también en esta

segunda etapa, desempeñando distintos roles en diferentes momentos del desarrollo de la orquitis.

5.2.5. Funciones de los macrófagos testiculares en la OAE: presentación antigénica

Teniendo en cuenta que los macrófagos testiculares serían esenciales para el desarrollo de la OAE, ¿Cuáles son las funciones de dichas células? ¿Qué mecanismos les permiten desencadenar una reacción inflamatoria en el testículo? Un papel crucial para iniciar una respuesta inmunológica es la capacidad de los macrófagos de presentar antígenos a los linfocitos y de esta manera inducir su activación. Para que una célula presentadora de antígenos sea capaz de activar a los linfocitos T “helper” CD4+, es necesario que los antígenos sean presentados en un contexto de moléculas del CMH II y de una segunda señal dada por las moléculas co-estimuladoras. Los macrófagos testiculares expresan estas moléculas en condiciones fisiológicas y durante la OAE. Sin embargo, se encontró una mayor expresión del CMH II en los macrófagos ED1+ provenientes de ratas con OAE respecto de las ratas normales. Dado que los experimentos de depleción de macrófagos indican que son las células ED1+ las principalmente involucradas en la inducción de la OAE, el hecho de que estas expresen un mayor nivel del CMH II, sugiere que dicho papel patogénico está estrechamente vinculado a la presentación antigénica. De hecho, los macrófagos testiculares obtenidos de ratas con orquitis pueden estimular una respuesta alogénea, indicando que *in vivo*, podrían presentar antígenos a los linfocitos y así, desencadenar la respuesta autoinmune. Dado que los experimentos de cultivo mixto leucocitario se realizaron con los macrófagos testiculares totales, no es posible dilucidar si ambas subpoblaciones de macrófagos (ED1+ y ED2+) son capaces de presentar antígenos y, en caso afirmativo, si tienen la misma eficiencia. El aislamiento diferencial de las subpoblaciones de macrófagos testiculares utilizando perlas magnéticas acopladas a los anticuerpos ED1 y ED2 permitiría resolver este interrogante.

Los presentes resultados en rata y ratón y los previamente obtenidos por Bryniarski y col. (2004) mostrando que los macrófagos testiculares tienen la capacidad de presentar antígenos *in vivo*, debilita la hipótesis que sostiene que uno de los mecanismos involucrados en el mantenimiento del inmunoprivilegio testicular sería la inducción de anergia en los linfocitos que arriban a este órgano, hipótesis basada

en la ausencia de moléculas co-estimuladoras en las CPA testiculares (Sainio-Pollanen y col., 1996).

Contrariamente a lo esperado, nuestros resultados muestran que en el testículo normal, los macrófagos expresan moléculas del CMH II y moléculas co-estimuladoras y que durante la OAE no se modifica la expresión de dichas moléculas con la excepción del CMH II en los macrófagos ED1+. Por lo tanto, dado que en el testículo normal, existen linfocitos T y CPA que podrían activarlos, posiblemente, varios mecanismos deban operar simultáneamente en la inmunoregulación testicular para evitar reacciones autoinmunes en la gónada. Por un lado, fisiológicamente, los principales autoantígenos se encontrarían "secuestrados" en el compartimento adluminal del túbulo seminífero, mientras que durante la inflamación testicular, la liberación de estos autoantígenos por alteraciones de la barrera hemato-testicular, activaría a las CPA del testículo, iniciando así la respuesta autoinmune. En el tracto reproductor masculino, a nivel de la rete testis, existe cierta liberación de antígenos espermáticos. Por lo tanto, pequeñas cantidades de antígeno podrían ser presentadas continuamente por las CPA testiculares, de modo de inducir una respuesta tolerogénica dirigida a los antígenos espermáticos. Otro aspecto a considerar, sería el microambiente testicular. Las CPA testiculares, aunque tienen la capacidad de iniciar una respuesta inmune, podrían estar sujetas a factores inmunosupresores que impiden su activación. De este modo, durante la inflamación testicular, la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la llegada de nuevas células inflamatorias, alterarían el microambiente testicular, permitiendo entonces, la activación de las CPA testiculares.

El porcentaje de macrófagos testiculares que expresan CMH II y moléculas co-estimuladoras es similar entre los animales controles y con OAE; sin embargo, dado que existe un incremento en el número de macrófagos totales, el número de macrófagos testiculares que expresan estas moléculas es mayor en la OAE. Por lo tanto, cambios en el número de células y no necesariamente, en el nivel de expresión de estas moléculas, podrían ser importantes y suficientes para una activación linfocitaria en el testículo durante la OAE.

El perfil de expresión de las moléculas del CMH II y co-estimuladoras CD80 y CD86 es diferente en los macrófagos ED1+ y ED2+, sugiriendo que las células ED1+ tienen

una mayor capacidad para presentar antígenos, apoyando así, una vez más, el concepto de que los macrófagos ED1+ conservarían las características pro-inflamatorias de los monocitos, mientras que los macrófagos residentes ED2+, tendrían un perfil diferente. Por las características mencionadas, el perfil de los macrófagos ED1+ coincidiría con el de los M1, mientras que los ED2 podrían seguir el perfil M2. Dado que en la OAE se observa un incremento en el número de vasos sanguíneos y en el número de células endoteliales (Guazzone, 2006) y también se observa un alto grado de fibrosis durante los estadios avanzados del cuadro, podríamos especular que los macrófagos ED2+ están involucrados en fenómenos como la angiogénesis y la remodelación tisular.

En varias patologías autoinmunes se ha demostrado que la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 es imprescindible para el desarrollo de la enfermedad (Bagenstose y col., 2002; Salomón y col., 2000; Shao y col., 2002). Nuestros resultados en la OAE sugieren que las señales de co-estimulación serían importantes para el desarrollo de este cuadro autoinmune. Por otro lado, sería interesante, también, determinar si otras moléculas co-estimuladoras como CD40, CD83 y la molécula de adhesión intercelular (ICAM), están involucradas en este cuadro.

5.3. Citoquinas

Estudiamos la producción de varias citoquinas pro-inflamatorias por los macrófagos testiculares durante la OAE, llevando a cabo un estudio más completo respecto a la IL-6.

5.3.1. La interleuquina-6

En la OAE existe un aumento en la secreción de IL-6 por los macrófagos ED1+ en el testículo

Demostramos que los macrófagos testiculares expresan y secretan IL-6 y, que en las ratas con OAE, existe un aumento en la producción de esta citoquina de 2.5 veces/macrófago. Dado que en la OAE, también se observa un incremento en el número de macrófagos/testículo, estimamos que el aumento en los niveles de IL-6 en el testículo *in vivo* es mucho mayor. En la OAE, los macrófagos testiculares producen mayores niveles de TNF α (Suescun y col., 2003); esta citoquina podría

estimular a dichas células para la síntesis de IL-6 por un mecanismo autócrino. Por estudios de co-localización, observamos que los macrófagos ED1+ (aquellos que recién llegan al testículo desde la circulación) son los que, principalmente, producen IL-6, reforzando el concepto del papel funcional diferente que cumplen las dos subpoblaciones de macrófagos en el testículo. Resultados obtenidos por Gerdprasert y col. (2002a, 2002b) y también por nuestro laboratorio (Guazzone y col., 2003), sugieren que los macrófagos ED1+, al expresar factores pro-inflamatorios, preservarían el perfil pro-inflamatorio de los monocitos, mientras que los macrófagos residentes (ED2+), sensibles al microambiente testicular, exhibirían un perfil más bien inmunosupresor.

IL-6 como factor apoptótico de las células germinales

Las funciones principales descritas para la IL-6 son la capacidad de estimular la proliferación celular e inhibir la apoptosis. Sin embargo, existen estudios (mencionados en los siguientes párrafos) que muestran que la IL-6 también es capaz de inducir apoptosis.

Nuestros resultados de experimentos *in vitro* demuestran que la IL-6 es capaz de inducir la apoptosis de las células germinales. Por otro lado, en experimentos *in vivo*, hemos observado un aumento en el número de células germinales apoptóticas en las ratas con OAE (Theas y col., 2003) y, concomitantemente, un aumento del número de células germinales IL-6R+. Estos datos sugieren que la IL-6 actuaría como un factor apoptótico para las células germinales. Dado que la expresión de IL-6 por las células de Sertoli está disminuída en las ratas con orquitis, es probable que la fuente principal de la IL-6 esté constituida por los numerosos macrófagos ED1+ del intersticio testicular. Sin embargo, no podemos descartar la contribución de las células de Leydig y/o peritubulares. En las ratas controles, la IL-6 secretada por las células de Sertoli induciría la apoptosis de las células germinales que expresan su receptor, células que se encuentran en un escaso número en el testículo durante condiciones fisiológicas. De esta manera, esta citoquina permitiría el mantenimiento de un balance adecuado entre el número de células germinales y células de Sertoli.

El efecto apoptótico de la IL-6 podría estar mediado a través de la modulación de la expresión de factores pro o anti-apoptóticos como los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (Usuda y col., 2001, Minami y col., 2000; Oritani y col., 1999; Choi y

Hwang, 2003; Boer y col., 2003) o de la modulación del ciclo celular. Hakorvirta y col. (1995) demostraron que la IL-6 inhibe la síntesis de ADN en espermatocitos y, en menor grado, en espermatogonias. Dicha inhibición podría inducir el arresto celular y la subsiguiente apoptosis de las células germinales como se ha demostrado con otros factores que detienen el ciclo celular (Selva y col., 2000; Salazar y col., 2003; Wolgemuth y col., 2004).

Trabajos realizados con otras citoquinas de peso molecular similar al de la IL-6, nos permiten especular que dicha citoquina secretada por las células del intersticio testicular puede llegar al compartimento adluminal del túbulo seminífero (Banks y Kastin, 1992; McLay y col., 1997). Por otra parte, es probable que en la OAE en la rata, la barrera hemato-testicular se encuentre alterada como ha sido demostrado en otros modelos de OAE (Pelletier, 2001), facilitando así el pasaje de IL-6 y otros factores al compartimento adluminal.

Papel pro-inflamatorio de la IL-6 en el cuadro de OAE

La IL-6 podría jugar un importante papel en el reclutamiento de células del sistema inmune durante el cuadro de OAE, al igual que en otros modelos experimentales de inflamación (Kamimura y col., 2003). En efecto, ha sido demostrado que la IL-6 es un potente inductor MCP-1 (Biswas y col., 1998). Esta quemoquina, como hemos demostrado recientemente (Guazzone y col., 2003), se encuentra muy aumentada en el microambiente testicular de las ratas con orquitis.

En varios cuadros autoinmunes se demostró que la IL-6 tiene un papel patogénico (Samoilova y col., 1998; Okuda y col., 1996; Yamamoto y col., 2000; Boe y col., 1999). Sin embargo, Li y col. (2002), demostraron que la IL-6, administrada exógenamente, reduce la incidencia y severidad de la orquitis. Dada la metodología utilizada, los propios autores sugieren que sus resultados no son concluyentes respecto al papel de la IL-6 en la patogénesis de la OAE y que otros experimentos como el bloqueo de la IL-6 endógena podrían aclarar el rol funcional de esta citoquina en la inducción de la OAE.

En conclusión, postulamos que la IL-6 juega un rol patogénico en el cuadro de OAE dada la alta producción de IL-6 por parte de los macrófagos ED1+ y el aumento del número de células germinales que expresan el receptor de la IL-6 en las ratas con OAE así como la capacidad de esta citoquina de inducir apoptosis de dichas células.

5.3.2. El factor de necrosis tumoral α

Previamente demostramos que los macrófagos testiculares producen TNF α y que, en la OAE, los niveles de esta citoquina pro-inflamatoria aumentan significativamente (Suescun y col., 2003). Estos datos sumados a los descritos en otros cuadros autoinmunes, nos sugirieron que el TNF α estaba involucrado en la patogénesis del cuadro. Esta citoquina tiene la capacidad de aumentar la permeabilidad del endotelio vascular, facilitar la extravasación de los linfomonocitos y activar células del sistema inmune a través de mecanismos paracrinos y autocrinos. Probablemente en la OAE, el TNF α se encuentre ejerciendo su papel patogénico a través de estas acciones, pero también, estaría involucrado en la apoptosis de las células germinales, dado que un 40-50% de las células germinales apoptóticas en las ratas con orquitis expresan TNFR1 (Suescun y col., 2003).

Teuscher y col. (1990) inyectaron ratones inmunizados con homogenado testicular y adyuvantes con anticuerpos neutralizantes anti TNF α y sus resultados indicaron que esta citoquina no era un factor importante en la patogenia del cuadro. En cambio, Yule y Tung (1993) en otro modelo experimental de OAE, lograron reducir el daño testicular utilizando también un anticuerpo neutralizante anti TNF α destacando así, la importancia patogénica de esta citoquina. Dado estos resultados contradictorios, nos pareció importante buscar otra estrategia para definir el papel funcional del TNF α en la OAE. Por ello, inmunizamos ratones deficientes en la expresión de TNFR1, principal receptor involucrado en las funciones inflamatorias del TNF α (Peschon y col., 1998). La menor la incidencia y severidad de la OAE observada en estos ratones confirman el papel patogénico del TNF α en este cuadro. Por lo tanto, en base a estos resultados y, a los previamente obtenidos en rata, concluimos que el TNF α desempeña un importante papel en la inducción del daño testicular en la OAE.

5.3.3. El interferón γ

El IFN γ es una citoquina producida principalmente por los linfocitos Th1. Sin embargo, varios estudios mostraron que esta citoquina también es secretada por las CPA (Fenton y col., 1997; Frucht y col., 2001; Ohteki y col., 1999).

Nuestros resultados de ELISA indican que en el período inicial del cuadro de OAE, los macrófagos testiculares secretan casi 7 veces más $\text{IFN}\gamma$ que en las ratas controles. Este aumento se mantiene, aunque en menor grado (aproximadamente 3 veces) en períodos más tardíos del cuadro, cuando la lesión es severa. Estos datos sugieren un papel relevante para esta citoquina en la inducción de la orquitis. En base a nuestros resultados de la determinación de $\text{IFN}\gamma$ por ELISA y los experimentos de depleción de macrófagos en la OAE, postulamos que los macrófagos testiculares, a través de la producción de $\text{IFN}\gamma$, están involucrados en la inducción del cuadro. En efecto, Itoh y col. (1998) en otro modelo de OAE inducido en ratón en ausencia de adyuvantes, lograron prevenir el cuadro inyectando anticuerpos bloqueantes anti $\text{IFN}\gamma$.

Por otro lado, es conocida la capacidad del $\text{IFN}\gamma$ para activar a las CPA (macrófagos y células dendríticas) induciendo la expresión de moléculas del CMH II y moléculas co-estimuladoras y de esta manera, aumentar la capacidad de dichas células para presentar antígenos (Goñalons y col., 1998; Mukhopadhyay y col., 2004). En la OAE, los niveles elevados del $\text{IFN}\gamma$ podrían ser parcialmente responsables de la expresión aumentada del CMH II en los macrófagos ED1+ respecto del grupo normal. Sin embargo, un porcentaje similar de macrófagos testiculares en las ratas controles (en las cuales los niveles de $\text{IFN}\gamma$ son significativamente menores) también expresan esta molécula con una intensidad comparable. Por lo tanto, la expresión del CMH II en los macrófagos y células dendríticas testiculares parece estar regulada por otros factores mediante mecanismos más complejos.

Por último, la producción aumentada de $\text{IFN}\gamma$, sugiere que en las primeras etapas de la OAE predomina el perfil Th1 de citoquinas.

5.3.4. El factor de crecimiento transformante β

El $\text{TGF}\beta$ es un factor predominantemente inmunosupresor y anti-inflamatorio producido por macrófagos y linfocitos. Dado que el microambiente del testículo normal se caracteriza por un perfil inmunosupresor y que el $\text{TGF}\beta$ sería, en parte, responsable de dicho estado, era importante definir si existían cambios en el contenido de este factor en el testículo de ratas con OAE. Lamentablemente, no logramos detectar, por ELISA, $\text{TGF}\beta$ en el medio condicionado de macrófagos testiculares ya que los niveles de este factor en todas las muestras estudiadas estaba

por debajo de la curva Standard. El TGF β está mayoritariamente presente bajo la forma de un precursor latente, inactivo, que sólo se activa en el sitio de acción por proteasas locales (Lyons y col., 1988; Prud'homme y Piccirillo, 2000). Por esta razón, el protocolo del kit de ELISA incluía la acidificación de las muestras para liberar el TGF β activo, lo que implicó diluir las muestras. Por lo tanto, no podemos excluir que las diluciones realizadas durante la preparación de las muestras para el ELISA, aunque recomendadas por el fabricante, hayan alterado nuestros resultados. Por otro lado, es probable que las cantidades secretadas de esta citoquina sean muy bajas y no puedan ser detectadas fácilmente con esta metodología.

Lamentablemente, no pudimos aportar datos acerca de las variaciones del TGF β en el microambiente testicular durante la inflamación. Sería importante poder lograrlo ya que los datos de la literatura señalan a esta citoquina, secretada por los macrófagos testiculares, células de Leydig y peritubulares, como uno de los factores importantes a considerar en el inmunoprivilegio testicular.

5.3.5. El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos y la interleuquina 10

Los resultados de la técnica de ELISA, en los cuales no se detectaron diferencias significativas en los niveles de GM-CSF en medios condicionados de macrófagos testiculares de animales controles y con OAE, nos sugieren que este factor no tendría un papel relevante en el cuadro de orquitis.

Respecto del papel de la IL-10 en la OAE, existen resultados contradictorios. Watanabe y col. (2005) demostraron que la IL-10, administrada mediante un vector viral para su expresión endógena, reduce la incidencia y severidad de la OAE. En contraste, Kaneko y col. (2003), inyectando IL-10 exógenamente, observaron que esta citoquina aumentaba el daño testicular en los ratones con OAE, sugiriendo un papel pro-inflamatorio para la IL-10. Nuestros resultados muestran que no existen diferencias significativas en los niveles de producción de IL-10 por los macrófagos testiculares de ratas controles y con OAE. Sin embargo, no podemos excluir que otras células del testículo secreten dichas citoquinas.

5.4. Células dendríticas

Muy pocos datos existen en la bibliografía sobre las células dendríticas del testículo. La importancia del estudio de las células dendríticas testiculares en este trabajo de tesis reside en la identificación de estas células en un “órgano inmunoprivilegiado” y su estudio en experimentos *in vivo* en condiciones fisiológicas y de inflamación. Logramos identificar las células dendríticas en el testículo normal de la rata y del ratón y detectar un incremento significativo de estas células en un cuadro de inflamación crónica como es la OAE.

5.4.1. Células dendríticas en el testículo normal

A diferencia de trabajos anteriores (Derrick y col., 1993; Haas y col., 1988; Head y Billingham 1985; Hoek y col., 1997; Itoh y col., 1995) en los cuales se utilizaron marcadores inespecíficos, que no permitían diferenciar células dendríticas de macrófagos, empleamos anticuerpos más específicos para células dendríticas. El anticuerpo OX62 reconoce la cadena α de la integrina E2 expresada en células dendríticas de rata y en células T $\gamma\delta$, mientras que el anticuerpo CD11c es específico para la integrina αx , expresada en células dendríticas y en una pequeña población de células mieloides. En el testículo normal de ratas y ratones, las células dendríticas, al igual que los macrófagos, sólo se localizan en el intersticio testicular y no en el interior de los túbulos seminíferos y representan el 3 y 5% de la población leucocitaria total del testículo, respectivamente. Ocasionalmente, algunas células dendríticas CD11c+ se observaron en la luz de los vasos sanguíneos del testículo de ratas, indicando que las células dendríticas testiculares se reclutarían desde la circulación.

Por otro lado, en el testículo normal de la rata, el número de células OX62+ y CD11c+ resultó similar, indicando que, a pesar de que estos marcadores son expresados por diferentes poblaciones celulares, la utilización de uno de ellos es suficiente.

El recuento de células dendríticas muestra que dichas células se encuentran en mayor número en el testículo de ratas Sprague-Dawley respecto de las ratas Wistar. Esto podría explicarse por diferencias genéticas entre las cepas; sin embargo, no podemos descartar diferencias en las condiciones en las que fueron mantenidos los animales.

En el ratón, el marcador utilizado para identificar las células dendríticas es el CD11c. En el testículo normal, las células CD11c+ fueron observadas esporádicamente por inmunofluorescencia, indicando que estas células se encuentran en muy baja proporción en este órgano durante condiciones fisiológicas.

5.4.2. Las células dendríticas durante la inflamación testicular

En la rata, cuando se inicia la lesión histológica del testículo en la OAE (50 días), se observa un incremento significativo en el número de células dendríticas testiculares, que se mantiene en el período de orquitis severa (80 días) en las ratas de la cepa Wistar. Este aumento en el número de células dendríticas, de forma similar al de los macrófagos testiculares, podría deberse a un mayor reclutamiento de células precursoras desde la circulación, inducido por una mayor producción de quemoquinas pro-inflamatorias secretadas en el testículo inflamado. Sin embargo, nuestros resultados de cuantificación de macrófagos y células dendríticas, sugieren la existencia de diferentes mecanismos reguladores en el reclutamiento de estas células en el testículo ya que los animales controles (sólo inyectados con adyuvantes) presentan un aumento en el número de macrófagos pero no de células dendríticas.

Los granulomas, presentes en mayor número en el testículo de las ratas Wistar en comparación con las ratas Sprague-Dawley, concentran un gran número de células dendríticas. Dada la alta densidad de células dendríticas, resultó imposible cuantificar estas células con dicha localización. Por lo tanto, los números absolutos de células dendríticas testiculares presentados están subestimados en los grupos experimentales, más aún, en las ratas con OAE de la cepa Wistar.

Datos de la bibliografía sugieren que un pre-requisito para la formación del granuloma es un alto número de células dendríticas y una sobreexpresión de moléculas del CMH II y moléculas co-estimuladoras en dichas células (Jiang y col., 1999; Tsuchiya y col., 2002; Uehira y col., 2002). En el cuadro de OAE observamos una alta densidad de células dendríticas en los granulomas. Sin embargo, no detectamos una mayor expresión de estas moléculas en dichas células, indicando que la sobreexpresión de las moléculas del CMH II, CD80 y CD86 no es necesariamente indispensable para la formación de los granulomas y que,

problemente, el aumento del número de células dendríticas que expresan estas moléculas es suficiente para dar origen a estas estructuras.

En las ratas con orquitis de la cepa Wistar, el mayor número de granulomas se asocia a una mayor severidad y extensión de la lesión testicular, por otro lado, en esta cepa, se encuentra un aumento mayor del número de células dendríticas testiculares comparado con la cepa Sprague-Dawley. Estos resultados sugieren que estas células podrían determinar el grado de severidad de la lesión testicular durante la OAE. En la clínica, es frecuente observar granulomas espermáticos en el conducto deferente luego de una vasectomía, en los túbulos epididimarios y en la orquitis granulomatosa (Chan y Schlegel, 2002), por lo tanto, es relevante entender los mecanismos que llevan a la formación de los granulomas en el testículo.

En la OAE murina, también existe un aumento en el número de células dendríticas testiculares, comparable al que se observa en las ratas de la cepa Wistar (13 y 8 veces en ratón y rata (células OX62+), respectivamente). Esto podría explicarse por el tipo de lesión, muy severa, que también se desarrolla en los ratones con OAE. Por otro lado, el aumento de células dendríticas respecto del grupo normal resultó mucho mayor en el ratón comparado con las ratas, probablemente debido a que en el testículo normal de ratón, estas células se encuentran en un número muy reducido.

El incremento en el número de células dendríticas en el testículo de ratas y ratones con OAE sugiere la existencia de un mayor tráfico de estas células hacia los ganglios linfáticos drenantes con la subsiguiente activación de un gran número de linfocitos T.

5.4.3. *¿Qué factores estimulan el reclutamiento de células dendríticas al testículo?*

El $\text{TNF}\alpha$ actúa como citoquina moduladora de la migración de las células dendríticas en los tejidos inflamados (Iizasa y col., 2005) y como factor inductor de los cambios fenotípicos de las células dendríticas durante el proceso de maduración. Dado que en la OAE observamos un aumento significativo en los niveles de $\text{TNF}\alpha$ producido por los macrófagos testiculares (Suescun y col., 2003), esta citoquina podría estar involucrada en el reclutamiento de las células dendríticas al testículo durante la OAE.

Las células dendríticas inmaduras expresan receptores de quemoquinas con capacidad de unión a quemoquinas inflamatorias (Cravens y Lipsky, 2002; Sozzani y col., 2000). Nuestros resultados obtenidos en el cuadro de OAE, sugieren que las quemoquinas podrían constituir otro factor quimiotáctico importante para el reclutamiento y maduración de las células dendríticas testiculares. En efecto, hemos demostrado (Guazzone y col., 2003 y 2004) un aumento en la concentración de quemoquinas de la familia C-C tales como MIP-1 α , MIP-1 β y MCP-1 en el microambiente testicular de ratas con OAE (fluido testicular y medio condicionado de macrófagos testiculares) que se asocia, en el mismo período de evolución del cuadro, a un aumento en el número de células que expresan los receptores para dichas quemoquinas (CCR2 y CCR5) en el intersticio testicular (Guazzone, 2006).

A su vez, la migración de las células dendríticas desde los tejidos periféricos hacia los ganglios linfáticos está controlada, entre otros factores, por la molécula de adhesión CD44 (Cella y col., 1997). Resultados previos de nuestro grupo de trabajo (Guazzone y col., 2005) demostraron que, en la OAE, el número de células CD44+ está aumentado en el intersticio testicular, sugiriendo una mayor migración de las células dendríticas a los ganglios linfáticos drenantes.

Por otra parte, un mecanismo propuesto para el reclutamiento de las células dendríticas es el que describe que proteínas Hsp liberadas de tejidos lesionados son reconocidas por las células dendríticas, que expresan receptores tipo Toll (Millar y col., 2003). Fijak y col. (2005) demostraron que, en la OAE, las Hsp 60 y 70 son reconocidas como autoantígenos. Por lo tanto, la liberación de Hsp y de otros antígenos espermáticos específicos podría iniciar la respuesta inmune en el cuadro de OAE.

5.4.4. ¿Qué grado de maduración presentan las células dendríticas en el testículo de ratas con orquitis autoinmune?

Numerosos datos de la bibliografía indican claramente las características fenotípicas que diferencian células dendríticas maduras de inmaduras. Las células dendríticas inmaduras poseen una gran capacidad de captar antígenos, presentan una baja expresión de moléculas de superficie co-estimuladoras y del CMH II y no migran eficientemente hacia los ganglios linfáticos debido a que no expresan CCR7, receptor de quemoquinas. Las células dendríticas maduras, en cambio, tienen alta

expresión de las moléculas necesarias para la presentación de antígenos, poseen una reducida capacidad para captar antígenos pero, una alta capacidad para migrar a los órganos linfáticos secundarios y activar a las células T. Por otra parte, el patrón de receptores de quemoquinas es diferente entre ambas subpoblaciones, ya que las células dendríticas inmaduras expresan fundamentalmente receptores de quemoquinas tales como CCR1, 2, 4, 5, 6 y CXCR4 mientras que, las células dendríticas maduras, expresan CCR7. En base a los resultados obtenidos hasta el momento, nos resulta difícil definir el fenotipo característico de las células dendríticas observadas en el testículo. La existencia de un gran número de células dendríticas en los granulomas testiculares presentes en las ratas con OAE nos hizo pensar que el fenotipo predominante de estas células sería el maduro, sin embargo, los resultados de citometría de flujo sugieren la presencia de células dendríticas de tipo inmaduro, ya que tanto en la rata como en el ratón no se observaron diferencias en la expresión de moléculas del CMH II entre los grupos normal, control y experimental. Tampoco se observaron diferencias en la expresión de las moléculas co-estimuladoras entre los grupos de animales estudiados. Otros resultados que sugieren que las células dendríticas testiculares presentan un fenotipo inmaduro, son los que provienen de la comparación con los macrófagos testiculares. Las células dendríticas testiculares presentan un índice de intensidad media de fluorescencia de 25-30 para el CMH II (Fig. 32), en cambio, los niveles de expresión para esta molécula en los macrófagos testiculares ED1+ es mucho mayor (Fig. 14), sugiriendo que las células dendríticas del testículo no expresan esta molécula en su máximo nivel.

Por otra parte, resultados preliminares de inmunofluorescencia de doble marcación, donde observamos células dendríticas CCR2+ en el testículo de ratas con OAE (Guazzone, 2006), sugieren también, un fenotipo inmaduro para estas células. Estudios en curso, en colaboración con el Dr. Meinhardt y su grupo en Alemania, utilizando técnicas de "Real time PCR" para determinar la expresión de receptores de quemoquinas en células dendríticas aisladas del testículo, nos permitirán definir mejor el fenotipo de estas células. Sin embargo, dado que las características distintivas entre células dendríticas maduras e inmaduras provienen principalmente de estudios *in vitro*, Turnbull y MacPherson (2001) destacan el hecho de que *in vivo*, las células dendríticas pueden no adquirir o perder todas las características

fenotípicas asociadas a los estadios de madurez o inmadurez celular por lo que, a diferencia de los experimentos *in vitro*, puede no ser tan clara la identificación de uno u otro estadio.

Las células dendríticas están involucradas en la iniciación y el mantenimiento de distintos cuadros autoinmunes y, en particular, en cuadros órgano-específicos como es la OAE (Link y col., 2001; Ludewig, 2001; Menges y col., 2002; Xiao y col., 2001). Este papel central de las células dendríticas podría ser explicado por su capacidad de infiltrar al órgano blanco y de promover el desarrollo de la lesión presentando autoantígenos a los linfocitos T en los ganglios linfáticos drenantes. Por lo tanto, postulamos que en la OAE, las células dendríticas testiculares estarían cumpliendo este mismo papel funcional y que el aumento en el número de células dendríticas testiculares estaría dado por el reclutamiento de células precursoras y su diferenciación a células dendríticas *in situ*.

5.5. Efecto de los adyuvantes sobre la población de CPA testiculares

Los adyuvantes estimulan la respuesta inmunológica a distintos niveles (Billiau y Matthys, 2001; Lim, 2003). Dada la vía de administración de los mismos, el efecto que producen es a nivel sistémico y podría compararse con los cambios que se producen durante una infección. Durante el período de inmunización (7-30 días), puede observarse un incremento en el número de macrófagos testiculares, principalmente de la subpoblación ED1+ED2-, en las ratas del grupo control (inyectadas solamente con adyuvantes). Este aumento se mantiene también en el mismo grupo de ratas sacrificadas 50-60 y 70-110 días luego de la primera inmunización; es decir, que el efecto de los adyuvantes sobre la población de macrófagos testiculares es evidente hasta casi tres meses posteriores a la última inmunización. Estos resultados revelan que los adyuvantes presentan un efecto prolongado en el tiempo, por lo menos a nivel testicular, y que son irreversibles, al menos durante el período de tiempo estudiado. En el ratón, el tratamiento con adyuvantes induce una respuesta que presenta algunas diferencias con la rata: el número de macrófagos en el testículo de ratones controles aumenta (aunque no es estadísticamente significativo) respecto de los normales, y por otro lado, existe un incremento en el porcentaje de macrófagos testiculares que expresan las moléculas del CMH II, sugiriendo que los adyuvantes provocan la activación de estas células.

Por otra parte, en el ratón, el número de células dendríticas testiculares está aumentado por el tratamiento con adyuvantes. Estas diferencias en la respuesta a los adyuvantes entre rata y ratón podría explicarse por diferencias en la susceptibilidad a los adyuvantes y/o al esquema de inmunización diferente: las ratas son sometidas a tres inmunizaciones y los ratones a una sola pero, usando una mayor concentración (4.5 veces) del microorganismo *Mybacterium tuberculosis* y empleando la toxina de la *Bordetella Pertussis* en lugar del microorganismo en su totalidad. A pesar de estas diferencias, en las dos especies de roedores utilizadas, los adyuvantes inducen cambios en la población de células presentadoras de antígeno, haciendo al testículo más susceptible para un ataque inmunológico.

En resumen, durante la OAE aumenta el número de CPA (macrófagos y células dendríticas) en el testículo. Estas células expresan moléculas del CMH II y moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86) indicando que pueden presentar antígenos y activar a los linfocitos T. Por otra parte, los macrófagos testiculares de ratas con orquitis secretan elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IFN γ y TNF α). El TNF α está involucrado en la patogenia de la OAE, mientras que la IL-6 induciría la activación de células del sistema inmune, promoviendo la inflamación en el testículo. Ambas citoquinas, participarían en la inducción de la apoptosis de las células germinales durante la OAE. Los resultados indican que las CPA testiculares están involucradas en la patogenia de este cuadro autoinmune.

En base a los resultados obtenidos, proponemos que el papel patogénico de los macrófagos testiculares en la OAE se explica, en parte, por su capacidad de presentar antígenos. Esto les permitiría activar a los linfocitos T que llegan al testículo y así, iniciar la respuesta autoinmune. Luego, los linfocitos T, principalmente CD4+, siendo las principales células efectoras, inducirían el daño tisular. Los macrófagos testiculares también estarían involucrados en esta fase, secretando citoquinas pro-inflamatorias que activan a los linfocitos y a otras células inmunes y células propias del testículo, propagando en el tiempo el estado de inflamación testicular. Las células dendríticas estarían involucradas en la iniciación del cuadro autoinmune, dado que tienen la capacidad de activar linfocitos vírgenes. También amplificarían la respuesta inmune, migrando hacia los ganglios linfáticos y activando un gran número de linfocitos, que a su vez, llegarían al testículo, bajo la acción de quemoquinas, secretadas por el mismo testículo.

El conocimiento de las interacciones entre células del sistema inmune y las células germinales en el testículo, permitirá entender la inmunoregulación normal de la gónada masculina y las consecuencias, en la espermatogénesis y esteroidogénesis, de un estado inflamatorio crónico.

Por lo tanto, este tipo de estudios facilitará, a nivel clínico, el mejor manejo, en el diagnóstico y tratamiento de patologías del tracto reproductor masculino que cursan con subfertilidad o infertilidad y enfatiza la necesidad de conocer la historia previa de infecciones que puedan alterar la inmunoregulación normal del testículo.

6. Conclusiones

6. Conclusiones

Considerando globalmente nuestros resultados obtenidos en rata y ratón, concluimos que las células presentadoras de antígeno testiculares juegan un papel crucial durante el desarrollo de la orquitis autoinmune experimental (OAE). En particular determinamos que,

- El testículo normal, “órgano inmunoprivilegiado”, presenta una importante población de células presentadoras de antígeno, compuesta fundamentalmente por macrófagos y, por células dendríticas, en menor proporción.
- Durante la inflamación testicular, se modifica cuantitativamente y cualitativamente la población de macrófagos testiculares ya que aumenta el número de estas células y existen cambios en las características fenotípicas y funcionales de las mismas.
- Durante el desarrollo de la OAE, los macrófagos modifican el microambiente testicular, a través de la secreción aumentada de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-6, el $\text{INF}\gamma$ y el $\text{TNF}\alpha$.
- Las citoquinas GM-CSF y la IL-10 producidas por los macrófagos testiculares no estarían especialmente involucradas en el desarrollo del cuadro autoinmune testicular.
- Las citoquinas IL-6, $\text{INF}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$, por su capacidad de activar células inmunes, serían cruciales para perpetuar, en el tiempo, el estado inflamatorio característico de la OAE. Estarían también, involucradas, directamente, en el daño tisular, a través de la inducción de la apoptosis de las células germinales, como lo hemos demostrado, *in vitro*, para la IL-6.

- Durante la OAE, los macrófagos testiculares aumentan la secreción de IL-6. La subpoblación ED1+, sería la principal responsable en esta producción. En cambio, las células de Sertoli, disminuyen la expresión de esta citoquina, probablemente como resultado de las alteraciones morfológico-funcionales que sufren estas células en la orquitis severa.
- Los resultados de los experimentos realizados en los ratones deficientes en TNFR1, mostraron que esta molécula, posiblemente a través de la acción del TNF α , está involucrada en la patogénesis de la OAE.
- En forma similar a lo que ocurre con la población de macrófagos testiculares, el número de células dendríticas aumenta en el intersticio testicular de animales con OAE y, especialmente, en los granulomas.
- En el testículo de los animales con OAE, existe un aumento del número de células presentadoras de antígeno que expresan moléculas del CMH II y moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86), lo que indicaría que estas moléculas participan en el desarrollo del cuadro.
- La expresión de las moléculas del CMH II y co-estimuladoras CD80 y CD86 en las células presentadoras de antígeno testiculares y su habilidad para estimular una respuesta alogeneica, indican que estas células tienen la capacidad de presentar antígenos a los linfocitos T, induciendo su activación.
- Nuestros resultados describen características de los macrófagos testiculares que no fueron estudiadas previamente, confirmando la existencia de heterogeneidad para esta población celular. La mayor expresión de moléculas del CMH II y la síntesis de IL-6 en la subpoblación de macrófagos ED1+ apoya el concepto de que los macrófagos ED1+ mantendrían un perfil pro-inflamatorio, mientras que los macrófagos ED2+ tienen características más bien inmunosupresoras.

- Los resultados de los experimentos con liposomas que contienen clodronatos indican que los macrófagos son indispensables para el desarrollo de la OAE. Dado el diferente perfil entre las subpoblaciones ED1+ y ED2+, postulamos que los macrófagos testiculares ED1+ son los que están principalmente involucrados en la inducción del cuadro autoinmune.
- Durante una inflamación sistémica (inducida en los animales controles por el tratamiento con los adyuvantes) se altera la población de células presentadoras de antígeno testiculares, haciendo más susceptible a este órgano para el ataque inmunológico.

En síntesis, las células presentadoras de antígeno testiculares están involucradas en la inducción y desarrollo de la orquitis autoinmune, al alterar la inmunoregulación del testículo debido al incremento en su número, en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y a la presentación de antígenos a las células T.

El conocimiento del papel funcional de las células presentadoras de antígeno y de las interacciones entre células del sistema inmune y germinales facilitará la comprensión a nivel clínico de patologías testiculares y cuadros de infertilidad asociados a mecanismos inmunológicos.

Parte de los resultados de este trabajo de tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

Rival C., Theas M.S., Guazzone V.A., Lustig L. Interleukin-6 and IL-6 receptor cell expression in testis of rats with autoimmune orchitis. J. Reprod. Immunol. 70:43-58, 2006.

Rival C., Lustig L., Iosub R., Guazzone V.A., Schneider E., Meinhardt A., Fijak M. Identification of a dendritic cell population in normal testis and in chronically inflamed testis of rats with autoimmune orchitis. Cell Tissue Res. 324:311-8, 2006.

Los resultados preliminares de la cuantificación de macrófagos en la OAE fueron incluidos en:

Suescun M.O., Rival C., Theas M.S., Calandra R.S., Lustig L. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of autoimmune orchitis in rats. Biol Reprod. 68:2114-21, 2006.

Algunos resultados están incluidos dentro de los siguientes manuscritos en preparación:

Rival C. Theas M.S., Jacobo P., Guazzone V.A., Jarazo S., Lustig L. Phenotypical and functional characteristics of testicular macrophages in normal and inflamed testis.

Rival C., Qiao H., Paul L., Desjardin C., Ley K., Lustig L., Tung K.S.K. Morphological and phenotypical alterations of peritubular myoid cells during murine experimental autoimmune orchitis.

7. Bibliografía

7. Bibliografía

- Agata Y., Kawasaki A., Nishimura H., Ishida Y., Tsubata T., Yagita H., Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* 8:765-772, 1996.
- Anderson D.J., Berkowitz R.S. Gamma-interferon enhances expression of Class I MHC antigens in the weakly HLA+ human choriocarcinoma cell line BeWo, but does not induce MHC expression in the HLA- choriocarcinoma cell line Jar. *J. Immunol.* 135:2498-2501, 1985.
- Allison J., Georgiou H.M., Strasser A., Vaux D.L. 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, 1997.
- Austyn J.M., Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* 11:805-815, 1981.
- Azuma M., Ito D., Yagita H., Okumura K., Phillips J.H., Lanier L.L., Somoza C. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366:76-79, 1993.
- Bagenstose L.M., Class R., Salgame P., Monestier M. B7-1 and B7-2 co-stimulatory molecules are required for mercury-induced autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.* 127:12-9, 2002.
- Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252, 1998.
- Banchereau J., Briere F., Caux C., Davous J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B., Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811, 2000.
- Banks W.A., Kastin A.J. Human interleukin-1 α crosses the blood testis barriers of the mouse. *J. Androl.* 13: 254-259, 1992.
- Barak V., Schoenfeld Y. Cytokines in autoimmunity. *The Decade of Autoimmunity.* Ed: Schoenfeld Y. Elsevier Science. Pág. 313-322, 1999.
- Bayry J., Thirion M., Delignat S., Misra N., Lacroix-Desmazes S., Kazatchkine M.D., Kaveri S.V. Dendritic cell and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 3:183-187, 2004.
- Bellgrau D., Gold D., Selawry H., Moore J., Franzusoff A., Duke R.C. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377:630-632, 1995.
- Benveniste E.N. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* 1997; 75:165-173.
- Bergh A., Damber J.E., van Rooijen N. The human chorionic gonadotrophin-induced inflammation-like response is enhanced in macrophage depleted rat testes. *J. Endocrinol.* 136:415-420, 1993.
- Biewenga J., van der Ende M.B., Krist L.E.G., Borst A., Ghufren M., van Rooijen N. Macrophage depletion in the rat after intraperitoneal administration of liposome-encapsulated clodronate: depletion kinetics and accelerated repopulation of peritoneal and omental macrophages by administration of Freund's adjuvant. *Cell Tissue Res.* 280:189-196, 1995.
- Billiau A., Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvant in experimental models of autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.* 70: 849-860, 2001.

- Biswas P., Delfanti F., Bernasconi S., Mengozzi M., Cota M., Polentarutti N., Mantovani A., Lazzarin A., Sozzani S., Poli G. Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. *Blood* 91: 258-265, 1998.
- Boe A., Baiocchi M., Carbonatto M., Papoian R., Serlupi-Crescenzi O. Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis. *Cytokine* 11:1057-1064, 1999.
- Boer U., Fennekohl A., Puschel G.P. Sensitization by interleukin-6 of rat hepatocytes to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J. Hepatol.* 38:728-735, 2003.
- Borriello F., Sethna M.P., Boyd S.D., Schweitzer A.N., Tivol E.A., Jacoby D., Strom T.B., Simpson E.M., Freeman G.J., Sharpe A.H. B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 6:303-313, 1997.
- Brenan M., Puklavec M. The MRC OX-62 antigen: a useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin. *J. Exp. Med.* 175:1457-1465, 1992.
- Bronson R.A., O'Connor W.J., Wilson T.A., Bronson S.K., Chasalow F.I., Drosch K. Correlation between puberty and the development of autoimmunity to spermatozoa in men with cystic fibrosis. *Fertil. Steril.* 58:1199-1204, 1992.
- Brunner M.C., Chambers C.A., Chan F.K., Hanke J., Winoto A., Allison J.P. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J. Immunol.* 162:5813-5820, 1999.
- Bryniarski K., Szczepanik M., Maresz K., Ptak M., Ptak W. Subpopulations of mouse testicular macrophages and their immunoregulatory function. *Am. J. Reprod. Immunol.* 52:27-35, 2004.
- Calkins J.H., Guo H., Sigel M.M., Lin T. Tumor necrosis factor- α enhances inhibitory effects of interleukin-1 β on Leydig cell steroidogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166:1313-1318, 1990.
- Carreno B.M., Collins M. BTLA: a new inhibitory receptor with a B7-like ligand. *Trends Immunol.* 24:524-52, 2003.
- Cella M., Sallusto F., Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9:10-16, 1997.
- Chambers C.A. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends in Immunol.* 22:217-223, 2001.
- Chambers C.A., Kuhns M.S., Egen J.G., Allison J.P. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 19:565-594, 2001.
- Chan P.T., Schlegel P.N. Inflammatory conditions of the male excurrent ductal system. Part I. *J. Androl.* 23:453-460, 2002.
- Choi E.M., Hwang J.K. Effects of (+)-catechin on the function of osteoblastic cells. *Biol. Pharm. Bull.* 26:523-526, 2003.
- Chuluyan H.E., Jancic C.C., Lutzky V.P., Zittermann S.I., Maffia P., Scimone M.L., Burzyn D., Carnevale R. Células dendríticas. *Inmunología molecular: nuevas fronteras de la medicina*. Ed: Rabinovich G.A. Panamericana, Buenos Aires. Pág. 77-111, 2004.
- Cohen P.E., Nishimura K., Zhu L., Pollard J.W. Macrophages: important accessory cells for reproductive function. *J. Leukoc. Biol.* 66:765-772, 1999.

- Coyle A.J., Lehar S., Lloyd C., Tian J., Delaney T., Manning S., Nguyen T., Burwell T., Schneider H., Gonzalo J.A., Gosselin M., Owen L.R., Rudd C.E., Gutierrez-Ramos J.C. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13:95-105, 2000.
- Cravens P.D., Lipsky P.E. Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunol. Cell. Biol.* 80:497-505, 2002.
- D'Alessio A., Riccioli A., Lauretti P., Padula F., Muciaccia B., De Cesaris P., Filippini A., Nagata S., Ziparo E. Testicular FasL is expressed by sperm cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:3316-21, 2001.
- D'Amico G., Frascaroli G., Bianchi G., Transidico P., Doni A., Vecchi A., Sozzani S., Allavena P., Mantovani A. Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nat. Immunol.* 5:387-91, 2000.
- De Cesaris P., Filippini A., Cervelli C., Riccioli A., Muci S., Starace G., Stefanini M., Ziparo E. Immunosuppressive molecules produced by Sertoli cells cultured in vitro: biological effects on lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:1639-1646, 1992.
- Delavierre D. Orchi-épididymites. *Annales d' Urologie* 37:322-338, 2003.
- Denduchis B., Lustig L. Experimental orchitis induced in rats by an antiserum to a noncollagen fraction of seminiferous tubule basement membrane. *Oligozoospermia: Recent Progress in Andrology*. Eds: Frajese G., Hafez E.S.F., Conti C., Fabbrini A. Raven Press, New York. Pág. 207-218, 1981.
- Derrick E.K., Barker J.N., Khan A., Price M.L., MacDonald D.M. The tissue distribution of factor XIIIa positive cells. *Histopathology* 22:157-162, 1993.
- Detin L., Rubinstein N., Aoki A., Rabinovich G.A., Maldonado C.A. Regulated expression and ultrastructural localization of galectin-1, a proapoptotic beta-galactoside-binding lectin, during spermatogenesis in rat testis. *Biol. Reprod.* 68:51-59, 2003.
- Dijkstra C.D., Dopp E.A., Joling P., Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54:589-599, 1985.
- Doncel G.F., Di Paola J.A., Lustig L. 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, 1989.
- Ebert R.H., Florey H.W. The extravascular development of the monocyte observed in vivo. *Brit. J. Exp. Pathol.* 20:342-356, 1939.
- Eriksson U., Ricci R., Hunziker L., Kurrer M.O., Oudit G.Y., Watts T.H., Sonderegger I., Bachmaier K., Kopf M., Penninger J.M. Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity. *Nat. Med.* 9:1484-1490, 2003.
- Erkkila K., Henrickse K., Hirvonen V., Rannikko S., Salo J., Parvinen M., Dunkel L. Testosterone regulates apoptosis in adult human seminiferous tubules in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:2314-2321, 1997.

- Fawcett D.W., Leak L.V., Heidger P.M. Jr. Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 10:105-122, 1970.
- Fenton M.J., Vermeulen M.W., Kim S., Burdick M., Strieter R.M., Kornfeld H. Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 65:5149-5156, 1997.
- Fijak M., Iosub R., Schneider E., Linder M., Respondek K., Klug J., Meinhardt A.J. Identification of immunodominant autoantigens in rat autoimmune orchitis. *J. Pathol.* 207:127-138, 2005.
- Floderus S. Untersuchungen über den Bau der menschlichen Hypophyse mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen Verhältnisse. *Acta Path. Microbiol. Scand. (Suppl)* 53:1-276, 1944.
- Forrester J.V., Huitinga I., Lumsden L., Dijkstra C.D. Marrow-derived activated macrophages are required during the effector phase of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Curr. Eye Res.* 17:426-437, 1998.
- Freeman G.J., Gribben J.G., Boussiotis V.A., Ng J.W., Restivo V.A. Jr, Lombard L.A., Gray G.S., Nadler L.M. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262:909-911, 1993.
- Frucht D.M., Fukao T., Bogdan C., Schindler H., O'Shea J.J., Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 22:556-560, 2001.
- Frungieri M.B., Weidinger S., Meineke V., Kohn F.M., Mayerhofer A. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma: Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:15072-15077, 2002.
- Gaytan F., Bellido C., Morales C., Reymundo C., Aguilar E., van Rooijen N. Effects of Macrophage depletion at different times after treatment with ethylene dimethane sulfonate on the regeneration of Leydig cells in the adult rat. *J. Androl.* 15:558-564, 1994.
- Gaytan F., Bellido C., van Rooijen N. Pituitary-testicular axis in rats lacking testicular macrophages. *Eur. J. Endocrinol.* 132:218-222, 1995.
- Geissman F., Jung S., Litman D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19:71-82, 2003.
- Gerdprasert O., O'Bryan M.K., Muir J.A., Caldwell A.M., Schlatt S., de Kretser D.M., Hedger M.P. The response of testicular leukocytes to lipopolysaccharide-induced inflammation: further evidence for heterogeneity of the testicular macrophage population. *Cell Tissue Res.* 308:277-285, 2002a.
- Gerdprasert O., O'Bryan M.K., Nikolic-Paterson D.J., Sebire K., de Kretser D.M., Hedger M.P. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor in normal and inflamed rat testis. *Mol. Hum. Reprod.* 8:518-524, 2002b.
- Goñalons E., Barrachina M., Garcia-Sanz J.A., and Celada A. Translational control of MHC class II I-A molecules by IFN-gamma. *J. Immunol.* 161:1837-1843, 1998.
- Gordon S. Macrophage-restricted molecules: role in differentiation and activation. *Immunol. Lett.* 65:5-8, 1999.

- Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5:953-964, 2005.
- Greenwald R.J., Boussiotis V.A., Lorschach R.B., Abbas A.K., Sharpe A.H. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* 14:145-55, 2001.
- Guazzone V.A., Rival C., Denduchis B., Lustig L. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in experimental autoimmune orchitis. *J. Reprod. Immunol.* 60:143-157, 2003.
- Guazzone V.A., Rival C., Denduchis B., Lustig L. Variations of macrophage inflammatory protein-1 α and -1 β expression in the testis of rats undergoing autoimmune orchitis. *Clinical and Investigative Medicine (resumen)* 27 (28C), 2004.
- Guazzone V.A., Denduchis B., Lustig L. Involvement of CD44 in leukocyte recruitment to the rat testis in experimental autoimmune orchitis. *Reproduction* 129:603-609, 2005.
- Guazzone V.A. Estudio de las moléculas de adhesión celular y quemoquinas involucradas en el tráfico leucocitario en un cuadro de orquitis autoinmune experimental. Tesis de Doctorado presentada en la FCEyN, UBA, marzo 2006.
- Haagmans B.L., Hoogerbrugge J.W., Themmen A.P., Teerds K.J. Rat testicular germ cells and Sertoli cells release different types of bioactive transforming growth factor beta in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:3-9, 2003.
- Haas G.G. Jr., D'Cruz O.J., De Bault L.E. Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 18:47-51, 1988.
- Hakovirta H., Syed V., Jégou B., Parvinen M. Function of interleukin-6 as an inhibitor of meiotic DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium. *Mol. Cell. Endocrinol.* 108:193-198, 1995.
- Hales D.B., Diemer T., Hales K.H. Role of cytokines in testicular function. *Endocrine* 10:201-217, 1999.
- Hales D.B. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J. Reprod. Immunol.* 57:3-18, 2002.
- Hathcock K.S., Laszlo G., Pucillo C., Linsley P., Hodes R.J. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* 180:631-640, 1994.
- Head J.R., Billingham R.E. Immune privilege in the testis. II. Evaluation of potential local factors. *Transplantation* 40:269-275, 1985.
- Hedger M.P. Testicular leukocytes: what are they doing? *Rev. Reprod.* 2:38-47, 1997.
- Hedger M.P., Nikolic-Paterson D.J., Hutchinson P., Atkins R.C., de Kretser D.M. Immunoregulatory activity in adult rat testicular interstitial fluid: roles of interleukin-1 and transforming growth factor beta. *Biol. Reprod.* 58:927-934, 1998.
- Hedger M.P., Meinhardt A. Local regulation of T cell numbers and lymphocyte-inhibiting activity in the interstitial tissue of the adult rat testis. *J. Reprod. Immunol.* 48:69-80, 2000.
- Hedger M.P. Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *J. Reprod. Immunol.* 57:19-34, 2002.
- Hedger M.P., Meinhardt A. Cytokines and the immune-testicular axis. *J. Reprod. Immunol.* 58:1-26, 2003.

- Hoek A., Allaerts W., Leenen P.J., Schoemaker J., Drexhage H.A. Dendritic cells and macrophages in the pituitary and the gonads. Evidence for their role in the fine regulation of the reproductive endocrine response. *Eur. J. Endocrinol.* 136:8-24, 1997.
- Hogg N., Takacs L., Palmer D.G., Selvendran Y., Allen C. The p150,95 molecule is a marker of human mononuclear phagocytes: comparison with expression of class II molecules. *Eur. J. Immunol.* 16:240-248, 1986.
- Hutloff A., Dittrich A.M., Beier K.C., Eljaschewitsch B., Kraft R., Anagnostopoulos I., Kroczeck R.A. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397:263-266, 1999.
- Hutson J.C. Changes in the concentration and size of testicular macrophages during development. *Biol. Reprod.* 43:885-890, 1990.
- Hutson J.C. Development of interdigitations between Leydig cells and macrophages. *Cell Tissue Res.* 267:385-389, 1992.
- Hutson J.C. Testicular macrophages. *Int. Rev. Cytol.* 149:99-143, 1994.
- Hutson J.C. Interactions between testicular macrophages and Leydig cells. *J. Androl.* 19:394-398, 1998.
- Hutson J.C. Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. *Exp. Biol. Med.* 231:1-7, 2006.
- Iizasa H., Yoneyama H., Mukaida N., Katakoka Y., Naito M., Yoshida N., Nakashima E., Matsushima K. Exacerbation of granuloma formation in IL-1 receptor antagonist-deficient mice with impaired dendritic cell maturation associated with Th2 cytokine production. *J. Immunol.* 174:3273-3280, 2005.
- Iosub R., Klug J., Fijak M., Schneider E., Frohlich S., Blumbach K., Wennemuth G., Sommerhoff C.P., Steinhoff M., Meinhardt A. Development of testicular inflammation in the rat involves activation of proteinase-activated receptor-2. *J. Pathol.* 208:686-698, 2006.
- Itoh M., De Rooij D.G., Jansen A., Drexhage H.A. Phenotypical heterogeneity of testicular macrophages/dendritic cells in normal adult mice: an immunohistochemical study. *J. Reprod. Immunol.* 28:217-232, 1995.
- Itoh M., Yano A., Xie Q., Iwahashi K., Takeuchi Y., Meroni P.L., Nicoletti F. Essential pathogenic role for endogenous interferon-gamma during disease onset phase of murine experimental autoimmune orchitis. I. In vivo studies *Clin. Exp. Immunol.* 111:513-520, 1998.
- Jahnukainen K., Morris I., Roe S., Salmi T.T., Makiperna A., Pollanen P. A rodent model for testicular involvement in acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Cancer* 67:885-892, 1993.
- Jansen A., Homo-Delarche F., Hooijkaas H., Leenen P.J., Dardenne M., Drexhage H.A. Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes* 43:667-675, 1994.
- Jiang H.R., Lumsden L., Forrester J.V. Macrophages and dendritic cells in IRBP-induced experimental autoimmune uveoretinitis in B10RIII mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40:3177-3185, 1999.

- Kamimura D., Ishihara K., Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 149:1-38, 2003.
- Kaneko T., Itoh M., Nakamura Y., Iimura A., Hayashi S., Takahashi K., Stivala F., Bendtzen K., Nicoletti F. Proinflammatory effects of exogenously administered IL-10 in experimental autoimmune orchitis. *Cytokine* 22:50-53, 2003.
- Karandikar N.J., Vanderlugt C.L., Bluestone J.A., Miller S.D. Targeting the B7/CD28:CTLA-4 costimulatory system in CNS autoimmune disease. *J. Neuroimmunol.* 89:10-18, 1998.
- Kern S., Roberston S.A., Mau V.J., Maddocks S. Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biol. Reprod.* 53:1407-1416, 1995.
- Kehrl J.H., Wakefield L.M., Roberts A.B., Jakowlew S., Alvarez-Mon M., Derynck R., Sporn M.B., Fauci A.S. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* 163:1037-1050, 1986.
- Khono S., Munoz J.A., Williams T.M., Teuscher C., Bernard C.C.A., Tung K.S.K. Immunopathology of murine experimental allergic orchitis. *J. Immunol.* 130:2675-2682, 1983.
- Kollias G., Douni E., Kassiotis G., Kontoyiannis D. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Ann. Rheum. Dis.* 58 Suppl 1:132-39, 1999.
- Kozawa O., Suzuki A., Kaida T., Tokuda H., Uematsu T. Tumor necrosis factor-alpha autoregulates interleukin-6 synthesis via activation of protein kinase C. Function of sphingosine 1-phosphate and phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 272:25099-25104, 1997.
- Krummel M.F., Allison J.P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* 182:459-465, 1995.
- La Cava A., Sarvetnick N. The role of cytokines in autoimmunity. *Curr. Dir. Autoimmun.* 1:56-71, 1999.
- Lanzavecchia A., Lezzi G., Viola A. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* 96:1-4, 1999.
- Latchman Y., Wood C.R., Chernova T., Chaudhary D., Borde M., Chernova I., Iwai Y., Long A.J., Brown J.A., Nunes R., Greenfield E.A., Bourque K., Bousiotis V.A., Carter L.L., Carreno B.M., Malenkovich N., Nishimura H., Okazaki T., Honjo T., Sharpe A.H., Freeman G.J. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* 2:261-268, 2001.
- Lenschow D.J., Walunas T.L., Bluestone J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14:233-258, 1996.
- Lehman D., Temminch D., Da Rugna D., Leibundgut B., Sulmoni A., Muller H.J. Role of immunological factors in male infertility: immunohistochemical and serological evidence. *Lab. Invest.* 57: 21-28, 1987.
- Li L., Itoh M., Ablake M., Macri B., Bendtzen K., Nicoletti F. Prevention of murine experimental autoimmune orchitis by recombinant human Interleukin-6. *Clinical Immunol.* 102:135-137, 2002.
- Lim S.K. Freund adjuvant induces TLR2 but not TLR4 expression in the liver of mice. *Int. Immunopharmacol.* 3:115-118, 2003.

- Ling V., Wu P.W., Finnerty H.F., Bean K.M., Spaulding V., Fouser L.A., Leonard J.P., Hunter S.E., Zollner R., Thomas J.L., Miyashiro J.S., Jacobs K.A., Collins M. Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J. Immunol.* 164:1653-1657, 2000.
- Link H., Huang Y.M., Masterman T., Xiao B.G. Vaccination with autologous dendritic cells: from experimental autoimmune encephalomyelitis to multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 114:1-7, 2001.
- Lohr J., Knoechel B., Jiang S., Sharpe A.H., Abbas A.K. The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat. Immunol.* 4:664-669, 2003.
- Ludewig B., Junt T., Hengartner H., Zinkernagel R.M. Dendritic cells in autoimmune diseases. *Curr. Opin. Immunol.* 13:657-662, 2001.
- Lustig L., Lourtou L., Perez R., Doncel G.F. Phenotypic characterization of lymphocytic cell infiltrates of the testes of rats undergoing autoimmune orchitis. *Int. J. Androl.* 16:279-284, 1993.
- Lustig L., Denduchis B., Ponzio R., Lauzon M., Pelletier R.M. Passive immunization with anti-laminin immunoglobulin G modifies the integrity of the seminiferous epithelium and induces arrest of spermatogenesis in the guinea pig. *Biol. Reprod.* 62:1505-1514, 2000.
- Lustig L. Inmunorregulación del testículo normal y patológico. *Inmunología molecular: nuevas fronteras de la medicina*. Ed: Rabinovich G.A. Panamericana, Buenos Aires. Pág. 377-382, 2004.
- Lustig L., Tung K.S.K. Autoimmune orchitis and male infertility. *The Autoimmune Diseases*. Eds: Rose N., Mackay I.R. Elsevier Academic Press, Pág. 841-847, 2006.
- Lyons R.M., Keski-Oja J., Moses H.L. Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β from fibroblast-conditioned medium. *J. Cell. Biol.* 106:1659-1665, 1988.
- Ma R.Z., Gao J., Meeker N.D., Fillmore P.D., Tung K.S.K. Watanabe T., Zachary J.F., Offner H., Blankenhorn E.P., Teuscher C. Identification of *Bphs*, an autoimmune disease locus, as histamine receptor H1. *Science* 297:620-623, 2002.
- Maddocks S., Setchell B.P. Recent advances for immune privilege in the testis. *J. Reprod. Immunol.* 18:9-18, 1990.
- Mandelbrot D.A., McAdam A.J., Sharpe A.H. B7-1 or B7-2 is required to produce the lymphoproliferative phenotype in mice lacking cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4). *J. Exp. Med.* 189:435-440, 1999.
- Mahi-Brown C.A., Yule T.D., Tung K.S.K. Adoptive transfer of murine autoimmune orchitis to naïve recipients with immune lymphocytes. *Cell. Immunol.* 106:408-419, 1987.
- Mahi-Brown C.A., Tung K.S.K. Activation requirements of donor T cells and host T cell recruitment in adoptive transfer of murine experimental autoimmune orchitis. *Cell. Immunol.* 124:368-379, 1989.
- Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25:677-686, 2004.
- Matzinger P. Tolerance, danger and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12:991-1045, 1994.
- McAdam A.J., Schweitzer A.N., Sharpe A.H. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* 165:231-247, 1998.

- McLay R.N., Banks W.A., Kastin A.J. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor crosses the blood-testis barrier in mice. *Biol. Reprod.* 57:822-826, 1997.
- Minami R., Muta K., Ilseung C., Abe Y., Nishimura J., Nawata H. Interleukin-6 sensitizes multiple myeloma cell lines for apoptosis induced by interferon-alpha. *Exp. Hematol.* 28:244-255, 2000.
- Meineke V., Frungieri M.B., Jessberger B., Vogt H., Mayerhofer A. Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. *Fertil. Steril.* 74:239-244, 2000.
- Meinhardt A., Bacher M., Metz C., Bucala R., Wreford N., Lan H., Atkins R., Hedger M. Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. *Biol. Reprod.* 59:371-378, 1998.
- Mendis-Handagama S.M.L.C. Conditions affecting Leydig cells. *The Leydig Cell*. Eds: Payne A.H., Hardy M.P., Russell L.D. Cache River Press, Florida. Pág. 712-716, 1996.
- Menges M., Rossner S., Voigtlander C., Schindler H., Kukutsch N.A., Bogdan C., Erb K., Schuler G., Lutz M.B. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J. Exp. Med.* 195:15-21, 2002.
- Millar D.G., Garza K.M., Odermatt B., Elford A.R., Ono N., Li Z., Ohashi P.S. Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo. *Nat. Med.* 9:1469-1476, 2003.
- Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19:683-765, 2001.
- Moser M., Murphy K.M. Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. *Nat. Immunol.* 1:199-205, 2000.
- Mosser D.M. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73:209-212, 2003
- Mukhopadhyay S., Peiser L., Gordon S. Activation of murine macrophages by *Neisseria meningitidis* and IFN- γ in vitro: distinct roles of class A scavenger and Toll-like pattern recognition receptors in selective modulation of surface phenotype. *J. Leukoc. Biol.* 76:577-584, 2004.
- Muller R., Klug J., Rodewald M., Meinhardt A. Macrophage migration inhibitory factor suppresses transforming growth factor-beta2 secretion in cultured rat testicular peritubular cells. *Reprod. Fertil. Dev.* 17:435-8, 2005.
- Munoz J.J., Arai H. Studies on crystalline pertussigen. *Seminars in infectious diseases*. Eds: Robbins J.B., Hill J.C., Sadoff J.C. Thieme-Stratton. Pág: 395-400, 1982.
- Naito M., Nagai H., Kawano S., Umezumi H., Zhu H., Moriyama H., Yamamoto T., Takatsuka H., Takei Y. Liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate induces macrophage apoptosis in vivo and in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 60:337-344, 1996.
- Niemi M., Sharpe R.M., Brown W.R. Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell Tissue Res.* 243:337-344, 1986.
- Nuovo G.J., Becker J., Sinsir A., Margiotta M., Khalife G., Shevchuk M. HIV-1 nucleic acids localize to the spermatogonia and their progeny. A study by polymerase chain reaction in situ hybridization. *Am. J. Pathol.* 144:1142-1148, 1994.

- O'Bryan M.K., Gerdprasert J.A., Nikolic-Paterson D.J., Meinhardt A., Muir J.A., Foulds L.M., Phillips D.J., de Kretser D.M., Hedger M.P. Cytokine profiles in the testes of rats treated with lipopolysaccharide reveal localized suppression of inflammatory responses. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288:R1744-1755, 2005.
- Ohteki T., Fukao T., Suzue K., Maki C., Ito M., Nakamura M., Koyasu S. Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 189:1981-1986, 1999.
- Okuda Y., Sakoda S., Fujimura H., Saeki Y., Kishimoto T., Yanagihara T. IL-6 plays a crucial role in the induction phase of myelin oligodendrocyte glucoprotein 35-55 induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 101:188-196, 1999.
- Oosterwegel M.A., Mandelbrot D.A., Boyd S.D., Lorsbach R.B., Jarrett D.Y., Abbas A.K., Sharpe A.H. The role of CTLA-4 in regulating Th2 differentiation. *J. Immunol.* 163:2634-2639, 1999.
- Oritani K., Tomiyama Y., Kincade P.W., Aoyama K., Yokota T., Matsumura I., Kanakura Y., Nakajima K., Hirano T., Matsuzawa Y. Both Stat3-activation and Stat3-independent bcl-2 downregulation are important for interleukin-6-induced apoptosis of 1A9-M cells. *Blood* 93:1346-1354, 1999.
- O'Shea J.J., Ma A., Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2:37-45, 2002.
- Owens T., Wekerle H., Antel J. Genetic models for CNS inflammation. *Nat. Med.* 7:161-166, 2001.
- Ozu M. Detección de TNF- α y NGF- β en el testículo de ratas con orquitis autoinmune, en distintos períodos de evolución del cuadro, Tesina de Licenciatura. Presentada en la FCEyN, UBA, 2001.
- Palecanda A., Kobzik L. Receptors for unopsonized particles: the role of alveolar macrophage scavenger receptors. *Curr. Mol. Med.* 1:589-595, 2001.
- Parvinen M., Ruokonen A. Endogenous steroids in rat seminiferous tubules: comparison of different stages of epithelial cycle isolated by transillumination - assisted microdissection. *J. Androl.* 3:211-220, 1982.
- Pelletier R.M. Tight junctions in the testis, epididymis, and vas deferens. *Tight Junctions (Cell Biology)*. Eds: Cerejeido M. y col. CRC Press, Florida. Pág. 600-618, 2001.
- Perez V.L., Van Parijs L., Biuckians A., Zheng X.X., Strom T.B., Abbas A.K. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 6:411-417, 1997.
- Person P.L., Snoek M., Demant P., Woodward S.R., Teuscher C. The immunogenetics of susceptibility and resistance to murine experimental allergic orchitis. *Reg. Immunol.* 4:284-297, 1992.
- Peschon J.J., Torrance D.S., Stocking K.L., Glaccum M.B., Otten C., Willis C.R., Charrier K., Morrissey P.J., Ware C.B., Mohler K.M. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J. Immunol.* 160:943-952, 1998.
- Philpott C.J., Rahman N.A., Kenny N., Londo T.R., Young R.M., Barisas B.G., Roess D.A. Rotational dynamics of luteinizing hormone receptors and MHC class I antigens on murine Leydig cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1235:62-68, 1995.
- Polfliet M.M.J., van de Veerdonk F., Dopp E.A., van Kesteren-Hendriks E.M.L., van Rooijen N., Dijkstra C.D., van den Berg T.K. The role of perivascular and meningeal macrophages in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 122:1-8, 2002.

- Pollanen P., Niemi M. Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. *Int. J. Androl.* 10:37-42, 1987.
- Pollanen P., Uksila J. Activation of the immune system in the testis. *J. Reprod. Immunol.* 18:77-87, 1990.
- Pollanen P., Cooper T.G. Immunology of the testicular excurrent ducts. *J. Reprod. Immunol.* 26:167-216, 1994.
- Prasad S.J., Farrand K.J., Matthews S.A., Chang J.H., McHugh R.S., Ronchese F. Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting protective tumor immunity in mice depleted of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 174:90-98, 2005.
- Prud'homme G.J., Piccirillo C.A. The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 in autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* 14:23-42, 2000.
- Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes.* 43:613-621, 1994.
- Raburn D.J., Coquelin A., Reinhart A.J., Hutson J.C. Regulation of the macrophage population in postnatal rat testis. *J. Reprod. Immunol.* 24:139-151, 1993.
- Raivich G., Banati R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res. Rev.* 46:261-281, 2004.
- Riccioli A., Starace D., D'Alessio A., Starace G., Padula F., De Cesaris P., Filippini A., Ziparo E. TNF-alpha and IFN-gamma regulate expression and function of the Fas system in the seminiferous epithelium. *J. Immunol.* 165:743-749, 2000.
- Rodriguez M.G., Rival C., Theas M.S., Lustig L. Immunohistopathology of the contralateral testis of rats undergoing experimental torsion of the spermatic cord. *Asian J. Androl.* 8:576-583, 2006.
- Sainio-Pollanen S., Saari T., Simell O., Pollanen P. CD28-CD80/CD86 interactions in testicular immunoregulation. *J. Reprod. Immunol.* 31:145-163, 1996.
- Sainio-Pollanen S., Sundstrom J., Erkkila S., Hanninen A., Vainiopaa M., Martikainen M., Salminen E., Verajankorva E., Antola H., Nikula H., Simell O., Pollanen P. CD106 (VCAM-1) in testicular immunoregulation. *J. Reprod. Immunol.* 33:221-238, 1997.
- Salazar G., Liu D., Liao C., Batkiewicz L., Arbing R., Chung S.S., Lele K., Wolgemuth D.J. Apoptosis in male germ cells in response to cyclin A1-deficiency and cell cycle arrest. *Biochem. Pharmacol.* 66:1571-1579, 2003.
- Salomon F., Saremaslani P.P., Jacob M., Hedinger C.F. Immune complex orchitis in infertile men. Immunoelectron microscopy of abnormal basement membrane structures. *Lab. Invest.* 47:555-567, 1982.
- Salomon B., Lenschow D.J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A., Bluestone J.A. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440, 2000.
- Salomon B., Bluestone J.A. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* 19:225-252, 2001.

- Samoilova E.B., Horton J.L., Hilliard B., Liu T.S., Chen Y. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J. Immunol.* 161:6480-6486, 1998.
- Sansom D.M. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology* 101:169-177, 2000.
- Selva D.M., Tirado O.M., Toran N., Suarez-Quian C.A., Reventos J., Munell F. Meiotic arrest and germ cell apoptosis in androgen-binding protein transgenic mice. *Endocrinology* 141:1168-1177, 2000.
- Serafini P., Borrello I., Bronte V. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties and mechanisms of immune suppression. *Seminars in Cancer Biology* 16:53-65, 2006.
- Schlatt S, de Kretser DM, Hedger MP. Mitosis of resident macrophages in the adult rat testis. *J. Reprod. Fertil.* 116:223-228, 1999.
- Schuppe H.C., Meinhardt A. Immune privilege and inflammation of the testis. *Chem. Immunol. Allergy* 88:1-14, 2005.
- Shao H., Sun D., Sun S.L., Cruze J.M., Bora N., Kaplan H.J. Expression of B7 molecules in the eye during experimental autoimmune anterior uveitis. *Curr. Eye Res.* 25:271-277, 2002.
- Sharpe A.H., Freeman G.J. The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 2:116-126, 2002.
- Smith P.D., Ochsenbauer-Jambor C., Smythies L.E. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol. Rev.* 206:149-159, 2005.
- Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Mantovani A. Chemokines and dendritic cell traffic. *J. Clin. Immunol.* 20:151-160, 2000.
- Sozzani S. Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:581-592, 2005.
- Steinke J.W., Borish L. Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117:S441-445, 2006.
- Steinman R.M., Cohn Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137:1142-1162, 1973.
- Suescun M.O., Calandra R.S., Lustig L. Alterations of testicular function after induced autoimmune orchitis in rats. *J. Androl.* 15:442-448, 1994.
- Suescun M.O., Calandra R.S., Lustig L. Increased testosterone production in vitro by Leydig cells from rats with severe autoimmune orchitis. *Int. J. Androl.* 20:339-346, 1997.
- Suescun M.O., Calandra R.S., Lustig L. Effect of testicular macrophages conditioned media from rats with autoimmune orchitis on Leydig cell function. *Am. J. Reprod. Immunol.* 43:116-123, 2000.
- Suescun M.O., Lustig L., Calandra R.S., Groome N.P., Campo S. Correlation between inhibin secretion and damage of seminiferous tubules in a model of experimental autoimmune orchitis. *J. Endocrinol.* 170:113-120, 2001.
- Suescun M.O., Rival C., Theas M.S., Calandra R.S., Lustig L. Involvement of tumor necrosis factor- α in the pathogenesis of autoimmune orchitis in rats. *Biol. Reprod.* 68:2114-2121, 2003.
- Szabo G., Miller C.L., Kodys K. Antigen presentation by the CD4 positive monocyte subset. *J. Leukoc. Biol.* 47:111-120, 1990.

- Tarter T.H., Ablin R.J. Immunoregulatory properties of seminal plasma: perspective and prospective considerations. *J. Investig. Allergol.* 2:106-112, 1992.
- Teuscher C., Smith S.M., Tung K.S.K. Experimental allergic orchitis in mice: III. Differential susceptibility and resistance among BALB/c sublines. *J. Reprod. Immunol.* 10:219-230, 1987.
- Teuscher C., Hickey W.F., Korngold R. An analysis of the role of tumor necrosis factor in the phenotypic expression of actively induced experimental allergic orchitis and experimental allergic encephalomyelitis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 54:442-453, 1990.
- Theas S., Rival C., Lustig L. Germ cell apoptosis in autoimmune orchitis: involvement of the Fas-Fas L system. *Am. J. Reprod. Immunol.* 50:166-176, 2003.
- Tsuchiya T., Chida K., Suda T., Schneeberger E.E., Nakamura H. Dendritic cell involvement in pulmonary granuloma formation elicited by bacillus calmette-guerin in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165:1640-1646, 2002.
- Tung K.S.K., Teuscher C., Meng A.L. Autoimmunity to spermatozoa and the testis. *Immunol. Rev.* 55:217-255, 1981.
- Tung K.S.K., Teuscher C. Mechanisms of autoimmune disease in the testis and ovary. *Hum. Reprod. Update* 1:35-50, 1995.
- Tung K.S.K. Autoimmune disease of the testis and the ovary. *The Autoimmune Diseases*. Eds: Rose N.R., Mackay I.R. Elsevier Academic Press. Pág. 687-704, 1998.
- Turek P.J., Malkowicz S.B., Tomaszewski J.E., Wein A.J., Peehl D. The role of the Sertoli cell in active immunosuppression in the human testis. *Br. J. Urol.* 77:891-895, 1996.
- Turley S., Poirot L., Hattori M., Benoist C., Mathis D. Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J. Exp. Med.* 198:1527-1537, 2003.
- Turnbull E., MacPherson G. Immunobiology of dendritic cells in the rat. *Immunol. Rev.* 184:58-68, 2001.
- Uehira K., Amakawa R., Ito T., Tajima K., Naitoh S., Ozaki Y., Shimizu T., Yamaguchi K., Uemura Y., Kitajima H., Yonezu S., Fukuhara S. Dendritic cells are decreased in blood and accumulated in granuloma in tuberculosis. *Clin. Immunol.* 105:296-303, 1996.
- Usuda J., Okunaka T., Furukawa K., Tsuchida T., Kuroiwa Y., Ohe Y., Saijo N., Nishio K., Konaka C., Kato H. Increased cytotoxic effects of photodynamic therapy in IL-6 gene transfected cells via enhanced apoptosis. *Int. J. Cancer.* 93:475-480, 2001.
- van den Berg T.K., Dopp E.A., Dijkstra C.D. Rat macrophages: membrane glycoproteins in differentiation and function. *Immunol. Rev.* 184:45-57, 2001.
- van Rooijen N. The liposome-mediated macrophage "suicide" technique. *J. Immunol. Methods* 124:1-6, 1989.
- van Rooijen N., Sanders A., van der Berg T.K. Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J. Immunol. Methods* 193:93-99, 1996.
- van Rooijen N., van Kesteren-Hendriks E. Clodronate liposomes: perspectives in research and therapeutics. *J. Liposome Res.* 12:81-94, 2002.

- Verreck F.A., de Boer T., Langenberg D.M., Hoeve M.A., Kramer M., Vaisberg E., Kastelein R., Kolk A., de Waal-Malefyt R., Ottenhoff T.H. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:4560-4565, 2004.
- Voisin G.A., Delauney A., Barber M. Sur les lésions testiculaires provoquées chez les cobayes par iso- et autosensibilisation. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 81:48-63, 1951.
- Walunas T.L., Lenschow D.J., Bakker C.Y., Linsley P.S., Freeman G.J., Green J.M., Thompson C.B., Bluestone J.A. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1:405-413, 1994.
- Walunas T.L., Bakker C.Y., Bluestone J.A. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J. Exp. Med.* 183:2541-2550, 1996.
- Wang J., Wreford N.G.M., Lan H.Y., Atkins R., Hedger M.P. Leukocyte 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, 1994.
- Warren D.W., Pasupuleti V., Lu Y., Platler B.W., Horton R. Tumor necrosis factor and interleukin-1 stimulate testosterone secretion in adult male rat Leydig cells in vitro. *J. Androl.* 11:353-360, 1990.
- Watanabe M., Kashiwakura Y., Kusumi N., Tamayose K., Nasu Y., Nagai A., Shimada T., Daida H., Kumon H. Adeno-associated virus-mediated human IL-10 gene transfer suppresses the development of experimental autoimmune orchitis. *Gene Ther.* 12:1126-1132, 2005.
- Werner C.A. Mumps orchitis and testicular atrophy; occurrence. *Ann. Intern. Med.* 32:1066-1074, 1950.
- Wolgemuth D.J., Lele K.M., Jobanputra V., Salazar G. The A-type cyclins and the meiotic cell cycle in mammalian male germ cells. *Int. J. Androl.* 27:192-199, 2004.
- Xiao B.G., Huang Y.M., Yang J.S., Xu L.Y., Link H. Bone marrow-derived dendritic cells from experimental allergic encephalomyelitis induce immune tolerance to EAE in Lewis rats. *Clin. Exp. Immunol.* 125:300-309, 2001.
- Yamanaka K., Fujisawa M., Tanaka H., Okada H., Arakawa S., Kamidono S. Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility. *Hum. Reprod.* 15:1543-1547, 2000.
- Yamamoto M., Yoshizaki K., Kishimoto T., Ito H. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J. Immunol.* 164:4878-4882, 2000.
- Yee J.B., Hutson J.C. Testicular macrophages: isolation, characterization and hormonal responsiveness. *Biol. Reprod.* 29:1319-1326, 1983.
- Yrlid U., Macpherson G. Phenotype and function of rat dendritic cell subsets. *APMIS* 111:756-765, 2003.
- Yule T.D., Tung K.S.K. Experimental autoimmune orchitis induced by testis and sperm antigen-specific T cell clones: an important pathogenic cytokine is tumor necrosis factor. *Endocrinology* 133:1098-1107, 1993.
- Zhang X., Huang H., Yuan J., Sun D., Hou W.S., Gordon J., Xiang J. CD4-8- dendritic cells prime CD4+ T regulatory 1 cells to suppress antitumor immunity. *J. Immunol.* 175:2931-2937, 2005.