



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

# **¿Contribuye la angiogénesis a la perpetuación de un estado inflamatorio crónico del testículo que resulta en infertilidad?**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: QUÍMICA BIOLÓGICA

Directora de tesis: Dra. Vanesa Anabella Guazzone

Consejero de estudios: Dr. Norberto Zwirner

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED, UBA-CONICET)  
Facultad de Medicina, UBA

Buenos Aires, 2019

***¿Contribuye la angiogénesis a la perpetuación de un estado inflamatorio crónico del testículo que resulta en infertilidad?***



**RESUMEN**

La orquitis autoinmune experimental (OAE) es un modelo útil para estudiar la autoinmunidad específica de órgano y la inflamación crónica testicular asociadas a infertilidad. La progresión de la OAE se acompaña de un aumento en el porcentaje de células endoteliales (CE) y en el número de vasos sanguíneos testiculares (VST). El factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA) es el principal regulador de la angiogénesis fisiológica y patológica. Nos propusimos evaluar la relevancia de la angiogénesis mediada por VEGFA en la patogénesis de la OAE inducida en ratas mediante inmunización activa con homogenado testicular y adjuvantes. VEGFA se localizó en CE, células de Leydig y macrófagos testiculares. El máximo contenido de VEGFA testicular y sistémico precedió al desarrollo de la OAE. El VEGFR1 se localizó en CE testiculares, mientras que el VEGFR2 fue encontrado en células germinales y células musculares lisas. A su vez, ambos receptores se expresaron en células de Leydig y con morfología tipo macrófago del intersticio testicular. El aumento de la expresión de VEGFR2 ocurrió previamente al desarrollo de la OAE y ambos receptores fueron regulados negativamente en la orquitis. La inhibición específica de VEGFA *in vivo* redujo la incidencia y la severidad de la OAE, así como también el número de VST. Nuestros resultados demuestran la relevancia del eje VEGFA-VEGFR durante el desarrollo de la orquitis y sugieren que VEGFA podría ser un indicador temprano de patologías inflamatorias testiculares.

**Palabras clave**

ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL, VEGFA, RECEPTORES DE VEGF, AUTOINMUNIDAD, BEVACIZUMAB



*Does angiogenesis contribute to the perpetuation of a chronic inflammation of the testis resulting in infertility?*

**ABSTRACT**

Experimental autoimmune orchitis (EAO) is a useful model to study organ specific autoimmunity and chronic testicular inflammation associated to infertility. The progression of EAO in rodents is accompanied by a significant increase of the testicular endothelial cells (EC) percentage, consistent with an increased number of interstitial testicular blood vessels (TBV). Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) is the principal regulator of physiological and pathological angiogenesis. We evaluated the role of angiogenesis mediated by VEGFA in the pathogenesis of EAO induced in adult rats by active immunization with testis homogenate and adjuvants. VEGFA was expressed in EC, Leydig and testicular macrophages. The maximum content of VEGFA in testis and serum preceded the development of EAO. VEGFR1 was localized in testicular EC, while VEGFR2 was found in germ cell and vascular smooth muscle cells. Furthermore, both receptors were expressed in testicular interstitial cells. VEGFR2 increased before the development of EAO, and both receptors were downregulated in orchitis. Additionally, in vivo specific inhibition of VEGFA reduced the incidence and severity of EAO as well as the number of TBV. Our results highlight the relevance of the VEGFA-VEGFR axis during the development of orchitis and suggest that VEGFA could be an early marker of testicular inflammatory pathologies.

**Key words**

EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ORCHITIS, VEGFA, VEGF RECEPTORS, AUTOIMMUNITY, BEVACIZUMAB



**ABREVIATURAS**

Ac	Anticuerpo
AFC	Adjuvante de Freund Completo
Ang	Angiopoyetina
BHT	Barrera hemato-testicular
Bp	Bordetella pertusis
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Control
CD	Células dendríticas
CE	Células endoteliales
CG	Células germinales
CH	Cámara húmeda
E	Experimental
ES	Error estándar
HIF	Factor inducible por hipoxia 1a
HT	Homogenado testicular
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IFN	Interferón
MCA	Membrana corioalantoidea de codorniz



MCP1	Proteína quimioattractante de monocitos 1 y su receptor
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
Min	Minutos
MMP	Metaloproteinasa de matriz
N	Normal
OAE	Orquitis autoinmune experimental
ON	Óxido nítrico
ONS	Óxido nítrico sintasa
PBS	Buffer fosfato salino
Pc	Peso corporal
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PIGF	Factor de crecimiento placentario
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Pt	Peso testicular
ROS	Especies reactivas del oxígeno
TBS	Buffer tris salino
TGF	Factor de crecimiento transformante
Th	Linfocito T colaborador
TNF	Factor de necrosis tumoral

Treg	Linfocito T regulador
TS	Túbulos seminíferos
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

*A todos los que me acompañan siempre, no sólo en el camino profesional, sino también en el camino de la vida. A mis compañeros de trabajo, a mis amigas del alma, a la gente que me quiere bien, y sobre todo a mi familia: mis padres, Cinthia y Alejandro.*



**ÍNDICE**

1.	INTRODUCCIÓN	16
1.1.	Inmunoprivilegio testicular	17
1.2.	Orquitis Autoinmune Experimental	19
1.3.	Angiogénesis	
	• Conceptos generales	23
	• Regulación de la angiogénesis	25
	• Angiogénesis patológica	27
1.4.	Factor de crecimiento endotelial vascular A	
	• Conceptos generales	29
	• Regulación de VEGFA	33
1.5.	Receptores de VEGFA	35
1.6.	VEGFA y VEGFRs en el testículo	39
1.7.	Terapias anti-angiogénicas	43
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	48
2.1.	Objetivos específicos	50
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1.	Animales	52
3.2.	Inducción de la OAE	52
3.3.	Histopatología testicular	53

3.4. Inmunohistoquímica	
• Inmunoperoxidasa: Expresión de CD31, HIF1a, VEGFA y VEGFRs	55
• Inmunofluorescencia: Doble marcación VEGFA/ED1 y VEGFA/ED2	56
• Inmunomarcación con pimonidazol: Detección de células hipóxicas	59
3.5. Inhibición de VEGFA <i>in vivo</i>	59
• Diseño experimental 1	60
• Diseño experimental 2	60
3.6. Obtención de fluido testicular	61
3.7. Western Blot	62
3.8. Ensayo de angiogénesis	65
3.9. Determinación de nitritos	66
3.10. Inmunoensayo para VEGFA (ELISA)	66
3.11. Análisis estadístico	53
4. RESULTADOS	68
4.1. Histopatología testicular	69
4.2. Expresión de CD31 y cuantificación de vasos sanguíneos testiculares	71
4.3. Estado de oxigenación testicular	74
4.4. Inhibición de VEGFA <i>in vivo</i>	77
4.5. Expresión de VEGFA testicular	84

4.6. Medición <i>in vivo</i> de la respuesta angiogénica de los fluidos testiculares	92
4.7. Expresión de HIF1 $\alpha$	94
4.8. Expresión de los VEGFRs en testículo	98
4.9. Detección de VEGFA circulante	105
5. DISCUSIÓN	106
6. CONCLUSIONES	121
7. BIBLIOGRAFÍA	125





## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Inmunoprivilegio testicular

El testículo es considerado un órgano inmunoprivilegiado ya que sus células germinales (CG) están protegidas de la acción de distintas noxas así como de reacciones inmunes a antígenos propios. La liberación de nuevos antígenos espermáticos expresados en la pubertad, aparece como un desafío al sistema inmune ya que ocurre luego del establecimiento de los mecanismos de tolerancia; sin embargo, no desencadenan una reacción inmunológica. El mantenimiento del inmunoprivilegio está dado por la existencia de una barrera hemato-testicular (BHT) y por la secreción de factores inmunosupresores liberados al microambiente testicular por las células de Sertoli, Leydig, peritubulares y macrófagos (Li y col., 2012; Zhao y col., 2014). La BHT esta formada por uniones estrechas de células de Sertoli adyacentes que reducen la entrada de anticuerpos, moléculas del intersticio y leucocitos hacia los túbulos seminíferos (TS). Recientemente, Tung y col. (2017) han demostrado que existe una liberación basal de antígenos de células meióticas que atraviesan la BHT y contribuyen al mantenimiento de una tolerancia fisiológica dependiente de linfocitos T regulatorios (Tregs). Los Tregs cumplen un rol crítico en la prevención de la autoinmunidad órgano específica ya que han sido postulados como moduladores de la respuesta inmune actuando a través de mecanismos locales y sistémicos (Sakaguchi y col., 2008). Además de formar una barrera física, las células de Sertoli secretan factores inmunosupresores como la galectina 1 (Pérez y col., 2015; Gao y col., 2016) y anti-inflamatorios como el factor de crecimiento transformante (TGF)  $\beta$  y activina A (Avallet y col.,

1994; Phillips y col., 2009). Las células de Leydig contribuyen al microambiente inmunosupresor mediante la liberación de TGF $\beta$  y testosterona (Head y Billingham, 1985; Cheng y col., 2016). Por otro lado, la interleucina (IL) 10 secretada por los macrófagos testiculares inhibe la activación de linfocitos T efectores (Wang y col., 2017). Otros factores que modulan la respuesta inflamatoria son las kinureninas, productos del catabolismo del L-triptofano por la enzima indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) (Badawy y col., 2016; Mellor y col., 2017). En estudios previos hemos identificado que la expresión y la actividad de IDO están disminuidas en el testículo de ratas con inflamación crónica y que su bloqueo específico *in vivo* incrementa la severidad de la lesión testicular, sugiriendo que un mecanismo basado en IDO también estaría participando en el inmunoprivilegio testicular (Gualdoni y col., 2019).

A pesar del inmunoprivilegio, el testículo tiene la capacidad de montar una respuesta inflamatoria efectiva para combatir infecciones virales y bacterianas. El delicado equilibrio entre el inmunoprivilegio y la inflamación es modulado por las citocinas que desempeñan un doble papel como inmunosupresores y mediadores pro-inflamatorios. En situaciones patológicas, el desbalance entre la tolerancia y la capacidad de la respuesta inmune llevan al desarrollo de un cuadro inflamatorio testicular induciendo alteraciones severas de la espermatogénesis que pueden causar subfertilidad o infertilidad (Jacobo y col., 2011). Según Weidner y col. (2013) las infecciones que resultan en reacciones inflamatorias del tracto masculino, son una de las causas significativas de infertilidad y tienen una incidencia entre el 6-10 % de los pacientes que llegan a la consulta andrológica. La orquitis o la epidídimo-orquitis también pueden evolucionar debido a una infección a nivel sistémico

(Dejuca y Jegou, 2001); o debido a causas no-infecciosas tales como factores ambientales y reacciones autoinmunes (Chan y Schlegel, 2002 a, b; Schuppe y Meinhardt, 2005). En pacientes asintomáticos con fertilidad alterada, aproximadamente el 30% de los casos presentan lesiones inflamatorias testiculares de origen desconocido (Schuppe y col., 2001). En cuanto a una posible base inmunológica, se han reportado dos tipos de orquitis en humanos: la orquitis granulomatosa y la orquitis más común conteniendo múltiples focos de inflamación linfomonocitaria (Suominen y Söderström, 1982; Chan y Schlegel, 2002a, b). En el primer caso, los pacientes presentan dolor, inflamación o endurecimiento escrotal. A nivel histológico, los TS son reemplazados por granulomas conteniendo linfocitos T, macrófagos y células gigantes multinucleadas (Taurog y col., 2012). En el segundo caso, las células intersticiales infiltrantes forman cúmulos rodeando los TS y eventualmente los invaden, si la BHT se encuentra alterada (Schuppe y col., 2008). Para diagnosticar este tipo de patologías, generalmente, es necesario realizar un análisis histopatológico de biopsias testiculares, sin embargo dado el carácter invasivo de las mismas este tipo de procedimiento es raramente utilizado en la clínica andrológica (Lustig y col., 2014).

## **1.2 Orquitis Autoinmune Experimental**

La orquitis autoinmune experimental (OAE) constituye un modelo útil para estudiar la autoinmunidad específica de órgano e inflamación crónica testicular ya que refleja fehacientemente los cambios patológicos descritos en pacientes infértiles (Tung y col., 2014).

El modelo de OAE en la rata, que se desarrolló en nuestro laboratorio, es inducido por inmunizaciones activas con homogenado testicular (HT) y adyuvantes (Doncel y col., 1989) y se caracteriza, en su fase inicial o focal, por la presencia de infiltrados celulares inflamatorios en el intersticio testicular y por múltiples focos de TS con distinto grado de descamación del epitelio germinal. En este momento aún permanecen TS con espermatogénesis normal. En una fase crónica o severa de la orquitis, la densidad celular del infiltrado linfomonocitario se incrementa, extendiéndose a todo el órgano, así como también el área de TS dañados, en los cuales sólo células de Sertoli y espermatogonias permanecen adheridas a la pared tubular. La descamación del epitelio germinal, ocasionado por la apoptosis que sufren las CG, se correlaciona con la atrofia y consecuentemente con la disminución del diámetro de los TS resultando en una carencia total de espermatozoides maduros y consecuentemente en infertilidad (Theas y col., 2003). Las células de Sertoli sufren un proceso de vacuolización en su citoplasma y alteraciones funcionales tales como la disminución de la expresión de inhibina a (Suescun y col., 2001). Por otro lado, las células de Leydig mantienen su ultraestructura normal así como su capacidad de sintetizar testosterona, aunque Suescun y col. (1997) describieron que estas células pueden sufrir procesos de hipertrofia e hiperplasia. La población celular infiltrante del intersticio testicular durante el desarrollo de la OAE se compone de linfocitos T, macrófagos y células dendríticas (CD). En cuanto a las subpoblaciones de linfocitos T, se detectó un incremento en el número de células efectoras CD4+ Th1, productores del factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$  e interferón (IFN)  $\gamma$ , Th17, productores de IL 17, así como también de linfocitos Tregs Foxp3+ (Jacobo y col., 2009; Jacobo y col.,

2011). Las citocinas relacionadas con los perfiles de respuesta Th1 y Th17 promueven el desarrollo de reacciones inflamatorias favoreciendo la secreción de factores pro-inflamatorias y quimiocinas (Dardalhon y col., 2008). A pesar de que el número de linfocitos Tregs aumenta, dichas células son incapaces de suprimir en forma eficiente la inflamación, debido a que son superadas numéricamente por las subpoblaciones de linfocitos T efectores.

Los macrófagos testiculares constituyen una población heterogénea que incluye macrófagos residentes [reconocidos por el anticuerpo (Ac) anti-ED2] que poseen funcionalmente un perfil inmunosupresor y macrófagos pro-inflamatorios (reconocidos por el Ac anti-ED1) que provienen de la circulación sanguínea (Dijkstra y col., 1985). Estos últimos, pueden transformarse en ED2+ en el microambiente testicular, existiendo una población intermedia (ED1+ ED2+) que conjuntamente con los ED1+, predomina en la OAE (Rival y col., 2008). A pesar de que los macrófagos ED2+ sintetizan abundantes citocinas y otros mediadores involucrados en el inmunoprivilegio testicular, la llegada masiva de macrófagos ED1+ al testículo altera drásticamente la composición de las subpoblaciones induciendo un cambio en el balance de citocinas y factores a favor de aquellos involucrados en el desarrollo de una respuesta inflamatoria.

Otras células presentadoras de antígenos evaluadas en el modelo fueron las CD, su número se encuentra aumentado en el testículo con OAE y poseen un fenotipo maduro e inmunogénico. En efecto expresan IL10, IL12p35 y el receptor de quimiocinas CCR7 indicando que estas células tienen la capacidad de desplazarse a los ganglios linfáticos drenantes del testículo cuando están activadas. La amplificación progresiva de la respuesta autoinmune y la continua presentación de antígenos por parte de las CD a los

---

linfocitos, conducen a un estado crónico de la OAE (Rival y col., 2006b; Rival y col., 2007; Guazzone y col., 2011).

Como se mencionó anteriormente, el daño que se produce en los TS durante el desarrollo del cuadro autoinmune se debe a la muerte por apoptosis de los espermatoцитos y las espermátides. Se demostró que el TNF $\alpha$ , la IL6 y el FasL inducen la apoptosis de las CG a través de sus receptores específicos TNFR1, IL R6 y Fas respectivamente que se encuentran aumentados; y esto ocurre simultáneamente con un incremento en el daño testicular (Theas y col., 2008; Pérez y col., 2012; Rival y col., 2006a; Jacobo y col., 2012; Theas y col., 2003). Otro factor involucrado en el daño de los TS es el estrés oxidativo generado por los valores elevados del óxido nítrico (ON) y por hiperperoxidación lipídica. Particularmente, se vio que estos eventos favorecen el arresto del ciclo celular de las CG, la apoptosis y la senescencia. Al estudiar la acción del inhibidor competitivo de la enzima óxido nítrico sintasa (ONS) se observó una disminución en la incidencia y la severidad de la OAE en la rata. El aumento en la expresión de la ONS endotelial observado en el intersticio testicular asociado a su relevancia en el desarrollo del cuadro autoinmune han llevado a postular al sistema ON-ONS como uno de los mecanismos involucrados en la disfunción testicular observada en la orquitis (Jarazo Dietrich y col., 2012; Jarazo Dietrich y col. 2015).

Como se mencionó previamente, gran parte de las alteraciones tisulares descritas en la OAE, se deben a la importante extravasación leucocitaria intersticial característica del cuadro. Este evento está favorecido por un aumento en la producción de la proteína quimioattractante de monocitos (MCP) 1 y las proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP) 1  $\alpha$  y  $\beta$ . Además, se

observó una expresión aumentada de CD44 y CD106 en el endotelio de los vasos sanguíneos testiculares (Guazzone y col., 2009; Guazzone y col., 2005). La interacción de estas moléculas presentes en las células endoteliales (CE) con el ligando de CD106 (CD49d) expresado en un mayor porcentaje de leucocitos estarían facilitando la trans migración endotelial (Guazzone y col., 2012). Finalmente cabe destacar, que tanto en la rata como en el ratón, la progresión del cuadro de orquitis se asocia a un aumento significativo del porcentaje de CE CD31+ y a un incremento del número de vasos sanguíneos testiculares (Guazzone y col., 2012; Pérez y col., 2015) destacando un proceso angiogénico en curso.

### **1.3 Angiogénesis**

- **Conceptos generales**

A medida que el embrión crece, alcanza un determinado tamaño que ya no le permite intercambiar nutrientes, residuos metabólicos y gases por difusión pasiva; por lo tanto, requiere de la formación de un sistema vascular especializado. Los vasos sanguíneos y el corazón son los primeros órganos funcionales en desarrollarse en los mamíferos, pero la vasculatura sigue remodelándose dinámicamente en la vida adulta, incluso cuando los órganos funcionan correctamente. Una serie de mecanismos genéticos, epigenéticos, moleculares, de señales y comportamientos celulares controlan espacialmente y temporalmente todas las etapas del desarrollo vascular (Adams y Alitalo, 2007; Jain, 2003). En el desarrollo de las redes vasculares intervienen dos procesos: vasculogénesis y angiogénesis. Durante el periodo embrionario, la

vascularización se produce por la diferenciación *in situ* de hemangioblastos a CE (vasculogénesis) (Yamasaki Morita, 2006; Ucuizian y col., 2010); mientras que en los individuos adultos, los nuevos vasos sanguíneos se forman principalmente a través de la angiogénesis (Melincovici y col., 2018) asociada a procesos fisiológicos como el ciclo menstrual, el embarazo, la cicatrización y la reparación de heridas. La angiogénesis también se asocia a procesos patológicos de inflamación, autoinmunidad y crecimiento tumoral (Ferrara y Adamis, 2016), motivo por el cual es el blanco de las terapias clínicas.

Históricamente, el término angiogénesis era usado para describir la formación de nuevos brotes endoteliales a partir de vénulas post-capilares pre-existentes. Recientemente, este concepto ha sido utilizado para denotar los procesos de crecimiento y de remodelación de una red vascular primitiva a una compleja (Carmeliet, 2000; Chung y Ferrara, 2011). Los mecanismos involucrados en estos procesos son: a) la proliferación y migración de CE móviles que descomponen la matriz extracelular circundante y lideran el crecimiento de nuevos brotes vasculares que se agrupan y canalizan reestableciendo la membrana basal y las adhesiones endoteliales (*sprouting*); b) la elongación de las vénulas o capilares pre-existentes divididos por pilares de células periendoteliales (*unsprouting*); c) y la incorporación de precursores de CE circulantes hacia la pared de los vasos sanguíneos. Independientemente al mecanismo, la angiogénesis contempla múltiples cascadas de señalización, así como interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Chung y Ferrara, 2011). Dentro de las interacciones célula-célula, las células periendoteliales estabilizan a los nuevos vasos sanguíneos ejerciendo un control hemostático y protegiendo al endotelio de ruptura o regresión, ya que los vasos



---

pueden sufrir fácilmente una regresión mientras no estén cubiertos por células musculares lisas (Benjamin y col., 1998).

- **Regulación de la angiogénesis**

La regulación de la angiogénesis involucra a un número crítico de factores de crecimiento, citocinas, cascadas de señalización y procesos celulares que son disparados en respuesta a estímulos inflamatorios o isquémicos. Una desregulación del equilibrio entre factores pro-angiogénicos y factores anti-angiogénicos pueden conducir a una angiogénesis excesiva o contribuir a la angiogénesis insuficiente en condiciones patológicas (Oklu y col., 2010).

Los factores de crecimiento implicados en la regulación positiva de la angiogénesis son el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) ácido y el FGF básico (Pugh-Hmphreys, 1992), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Berse y col., 1992), el VEGF derivado de la glándula endocrina (EGVEGF) (Ferrara y col., 2004a), las angiopoyetinas (Ang) 1 y 2 (Gale y Yancopoulos, 1999; Maisonpierre y col., 1997), el factor de crecimiento placentario (PIGF) 1 (Kumazaki y col., 2002), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Battegay y col., 1994), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Rossen y col, 2007), los factores de crecimiento tipo insulina (IGF) 1 y 2 (Rissanen y col., 2002) y el TGF $\beta$  (Sunderkotter y col., 1994). Los FGF, VEGF y PIGF pueden encontrarse secuestrados en la matriz extracelular y ser liberados al activarse las proteinasas del activador del plasminógeno o las metaloproteinasas de matriz (MMP) (Potente y col., 2011). Por otro lado, dentro del grupo de citocinas que estimulan la angiogénesis se encuentran la IL1a

(Torisu y col., 2000), IL8 (Kotch y col., 1992) y el TNFa (Bryan y col., 2005). Otros factores involucrados en el desarrollo vascular son la angionina (Gao y Xu, 2008), la leptina (Sierra-Honigmann y col., 1998), el MCP1 y el factor estimulante de colonias de macrófagos/granulocitos (GM-CSF). Estos últimos dos factores pueden estimular la angiogénesis y la arteriogénesis mediante el aumento del flujo de monocitos-macrófagos y otras células derivadas de la médula ósea al tejido (Ito y col., 1997; Takahashi y col., 1999).

De todos ellos, VEGF es el principal estimulador de la angiogénesis descrito, ya que a través de la unión a su receptor activa una serie de cascadas de señalización que resultan en la proliferación de las CE, la migración, la estimulación de las células periendotheliales para recubrir y estabilizar la vasculatura incipiente y el incremento en la permeabilidad vascular (Dvorak y col., 1995; Hoeben y col., 2004). Los gradientes de VEGF soluble inducen la formación nuevos brotes junto con la participación de otras moléculas de señalización adicionales, incluyendo al ligando del receptor Notch (DLL4) y Ang 2, que, respectivamente, controlan el fenotipo de la CE móvil y desestabilizan las uniones intercelulares (Potente y col., 2011). El aumento en la permeabilidad permite la extravasación de proteínas plasmáticas que establecen un andamio provisorio para la migración de las CE. La formación de fenestraciones, la redistribución de la molécula de adhesión endotelial (PECAM1/CD31) y de la caderina endotelial vascular son algunos de los factores que median este proceso (Takahashi y col., 1999). A pesar de que la permeabilidad es positiva para la angiogénesis, en exceso puede llevar a un colapso circulatorio, hipertensión intracraneal, metástasis, malestar premenstrual o incluso ceguera (Chung y Ferrara, 2011). Para que la

migración endotelial ocurra las CE deben perder las uniones intercelulares y liberarse del soporte otorgado por las células periendotheliales. Entre los factores inhibidores de la angiogénesis podemos encontrar a la trombospondina 1 (regulada por p53) (Hashayi y col., 2016) y la angiostatina (O'Reilly y col., 1994) que inhiben de forma radical la proliferación endotelial *in vitro* y son postuladas como moléculas involucradas en la metástasis tumoral. La IL12 suprime la expresión del ARNm de VEGFA promoviendo la apoptosis, inhibiendo la tasa de proliferación y la densidad de vasos sanguíneos en tumores humanos y murinos (Oshikawa y col, 2010; Duda y col., 2000). Es por ello que tanto las quimiocinas como los factores de crecimiento mencionados poseen gran potencial terapéutico (Emanuelli y col., 2002).

- **Angiogénesis patológica**

La angiogénesis patológica está vinculada con la angiogénesis fisiológica dado que ambas están reguladas por varias moléculas bien estudiadas como VEGF, bFGF, angiopoyetinas y sus receptores. Sin embargo se ha reportado que las nuevas redes vasculares generadas en situaciones patológicas son morfológicamente diferentes en cuanto a su estructura ya que presentan irregularidades del diámetro vascular y en su membrana basal, y en general están dilatadas (Sasaki y col., 1991). Por otro lado, las CE obtenidas de un determinado tejido en una situación patológica poseen una expresión génica diferente principalmente a nivel de las proteínas de unión de membrana versus las mismas CE en una situación fisiológica (Seaman y col., 2007). La mayor diferencia es que la angiogénesis patológica no llega a resolverse luego del establecimiento de la perfusión vascular; como consecuencia la cascada

angiogénica persiste y lleva a una condición patológica (Chung y Ferrara, 2011).

La angiogénesis tumoral es provocada por las células tumorales para satisfacer la gran demanda de oxígeno y nutrientes necesarios para cumplir otras funciones metabólicas (Potente y col., 2011). La hipoxia es un impulsor clave de la angiogénesis tumoral ya que promueve la secreción de VEGF por parte de las células cancerosas hipóxicas formando un gradiente de concentración (LaGory y Giaccia, 2016). Los macrófagos son potentes promotores de la angiogénesis tanto en tumores como en cuadros inflamatorios dado que liberan factores pro-angiogénicos y pro-inflamatorios, entre ellos bFGF, PlGF, TNF $\alpha$  e INF $\gamma$  (Wang y col., 2009; Depalma y col., 2017). Sumado a esto se ha visto que un incremento en el número de macrófagos se asocia frecuentemente con aumento de la densidad vascular en linfomas humanos (Clear y col., 2010).

En la inflamación crónica hay muchas maneras por las cuales la angiogénesis puede contribuir a la patología. Por ejemplo un aumento en el número de nuevos vasos sanguíneos incrementa la migración, proliferación y reclutamiento de células inflamatorias que, a través de mediadores inflamatorios, promueven directa o indirectamente la angiogénesis. La especificidad de la migración leucocitaria está regulada por la combinación de quimiocinas en el microambiente, las moléculas de adhesión presentes en el endotelio y los receptores específicos en los leucocitos. Estas señales generadas en un sitio de inflamación llevan a la transmigración endotelial. Además del aumento de la superficie endotelial ocurren cambios en la expresión y distribución de moléculas de adhesión, una mayor producción de citocinas

pro-inflamatorias y un incremento de la permeabilidad de los vasos (Muller y col., 2011). Miller y col. (1996) demostraron que el TNF $\alpha$  y el IFN $\beta$  incrementan la expresión de la molécula de adhesión intercelular (ICAM) 1 en cultivos de CE umbilicales humanas. A su vez, el TNF $\alpha$  junto a otras citocinas como la IL1, IL6, IL15, IL17 e IL18 fueron capaces de ejercer un efecto angiogénico en el tejido sinovial en modelos experimentales de artritis reumatoide (Szekanecz y col., 2010). En síntesis, un estado inflamatorio promueve la angiogénesis y, a su vez, la angiogénesis facilita la inflamación. La retroalimentación positiva de estos procesos resulta en una condición crónica. Se ha demostrado que la expresión aumentada del VEGFA se correlaciona con la progresión y severidad de diversas patologías autoinmunes, entre ellas la artritis reumatoide, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), la esclerosis múltiple y la retinopatía diabética asociada a la degeneración macular por edema (DME) (Weber y col., 2000; Bagli y col., 2004, Carvalho y col., 2007 y Seabrook y col., 2010; Capitão y Soares, 2016). Dado que este trabajo de tesis tiene como principal objetivo el estudio del VEGFA asociado a la inflamación crónica testicular, en el capítulo siguiente se desarrollará *in extenso* dicho factor.

#### **1.4 Factor de crecimiento endotelial vascular**

- **Conceptos generales**

VEGFA pertenece a la familia de genes que también incluyen al VEGFB, VEGFC, VEGFD y PIGF (Ferrara y Kerbel, 2005). Estas glicoproteínas pertenecen a la superfamilia de factores de crecimiento que incluye al factor PDGF. VEGFA juega un importante rol en la vasculogenesis y la angiogénesis, induce

proliferación celular, incrementa la permeabilidad vascular y la vasodilatación, y permite el reclutamiento de células inmunes a los sitios de inflamación. VEGFB está principalmente presente en la vida embrionaria y en algunos tejidos particulares como el miocardio y el musculo esquelético en adultos (Bellomo y col., 2000). VEGFC tiene un rol en la linfangiogénesis inicial en la vida embrionaria y en la placenta; y en el ovario y corazón en adultos (Joukov y col., 1996). VEGFD está involucrado principalmente en la linfangiogénesis pero no es esencial para la angiogénesis (Rissanen y col., 2003).

Inicialmente, VEGFA fue aislado como un factor de unión a heparina secretado por las células foliculares-estrelladas de la pituitaria bovina en cultivos primarios (Ferrara y Henzel, 1989). Notablemente, este factor poseía la capacidad de inducir la proliferación de las CE cultivadas sugiriendo un papel en el desarrollo y el mantenimiento de la vasculatura hipofisaria (Ferrara y col., 1987). A fines de 1989; Leung y col. lograron purificar la proteína como un homodímero glicosilado de aproximadamente 42 kDa. VEGFA era capaz de promover la angiogénesis *in vivo* en el modelo de membrana corioalantoidea (MCA) de pollo (Ploüet y col., 1989) y su expresión se encontraba elevada en los cuerpos lúteos altamente vascularizados en el ovario de rata (Phillips y col., 1990). La administración exógena de VEGFA incrementó la permeabilidad de vénulas musculares, vénulas post-capilares y capilares extraídas de rata por un aumento de las fenestraciones entre las CE. Sorprendentemente, la magnitud de ese efecto fue mucho mayor a la de cualquier otro mediador descrito hasta ese momento, incluida la histamina (Roberts y Palade, 1995). Además, se encontró que VEGFA poseía propiedades quimiotácticas para los monocitos, los cuales atravesaban membranas de colágeno y monocapas de CE al ser

estimulados con este factor (Clausse y col., 1990). Años más tarde, se comprobó que este evento también ocurría en sitios de inflamación y tumores (Wang y col., 2009; Depalma y col., 2017). Diversas estrategias fueron empleadas para inhibir las funciones de VEGFA y así poder dilucidar su rol en la angiogénesis *in vivo*, por ejemplo el uso de Ac monoclonales disminuyó el crecimiento de varias líneas de células tumorales humanas implantadas en ratones inmunodeficientes (Kim y col., 1993). Por otro lado, se demostró que el VEGFA era necesario para la vasculogénesis o la angiogénesis temprana ya que ratones depletados de un alelo para VEGFA presentaron un fenotipo letal en la etapa embrionaria a los 9,5 días (d) (Carmeliet y col. 1996, Ferrara y col. 1996). En estos mutantes las CE mostraron un retraso en la diferenciación celular, además de observarse una desorganización a nivel de las redes vasculares así como también una disrupción en la formación de células hematopoyéticas. Sumado a esto se observó que los ratones que no expresaban el receptor de VEGFA (VEGFR) también tenían fallas en la vasculogénesis presentando un subdesarrollo en la placenta y en los islotes de células sanguíneas indiferenciadas ocasionando la muerte de los embriones entre los 8,5 y 9,5 d (Shalaby y col., 1995). Estos descubrimientos allanaron el camino para una intensa investigación y una rápida aplicación de drogas que suprimían la formación descontrolada y exagerada de vasos sanguíneos en cuadros patológicos.

VEGFA se une con alta afinidad a sus receptores específicos de tipo tirosina quinasa, denominados VEGFR1 (*fms-related tyrosine kinase*, Flt-1) y VEGFR2 (*kinase insert domain protein receptor*, KDR/ FLK1 (Neufeld y col., 1999). Se han descrito variantes moleculares para VEGFA generadas por *splicing*

alternativo o proteólisis y fueron clasificadas según sus propiedades diferenciales de afinidad por el heparán sulfato de la matriz extracelular (Ferrara y col., 2010). Las cuatro isoformas de VEGFA principales contienen 121, 165, 189 y 206 aminoácidos después de la secuencia señal para el clivaje (VEGFA<sub>121</sub>, VEGFA<sub>165</sub>, VEGFA<sub>189</sub>, VEGFA<sub>206</sub>) (Tischer y col., 1991). VEGFA<sub>121</sub> no puede unir heparina y es una proteína libremente difusible; VEGFA<sub>165</sub> es secretado pero una fracción significativa permanece unida a la superficie de la célula y a la matriz extracelular en virtud de las propiedades de unión a heparina; VEGFA<sub>189</sub> y VEGFA<sub>206</sub> son las isoformas más largas y poseen la mayor afinidad por la heparina, por lo tanto permanecen casi completamente unidas a la matriz extracelular dado que son altamente básicas (Houck y col., 1992, Park y col., 1993). Por esta razón, son considerados menos activos que las isoformas difusibles (121 y 165) (Neufeld y col., 1999).

Además de las isoformas pro-angiogénicas del VEGFA anteriormente mencionadas, Artac y col. (2009) han identificado isoformas anti-angiogénicas. La isoforma humana VEGFA<sub>165B</sub> inhibe la acción del VEGFA porque se une con la misma afinidad al receptor VEGFR2 pero no activa las vías de transducción de señales (Woolard y col., 2004). A su vez, se han identificado dos co-receptores, neuropilina (NP) 1 y 2 que se unen específicamente a las isoformas pro-angiogénicas VEGFA<sub>165</sub> y VEGFA<sub>189</sub> modulando su respuesta. Mientras que ambos co-receptores pueden estabilizar la unión de VEGFA al receptor VEGFR1, NP1 sólo estabilizaría la unión del VEGFA al VEGFR2 aumentando así la transducción de la señal.



Actualmente, hay evidencias que señalan al VEGFA<sub>165</sub> (VEGF<sub>164</sub> en ratón) como la isoforma más relevante a nivel fisiológico y la elegida para ser utilizada en ensayos clínicos (Apte y col., 2019).

- **Regulación de VEGFA**

La tensión de oxígeno y el estrés oxidativo generado por el aumento de expresión/actividad del sistema ON/ONS surgen como nuevas conexiones que vinculan los procesos inflamatorios y la angiogénesis asociada al daño tisular (Wilkinson-Berka y col., 2013, Bao y col., 2012). Esta interacción se centra principalmente en la vía de señalización de VEGFA. En efecto, en un modelo murino de fibrosis pulmonar se demostró que el ON es capaz de regular positivamente la expresión de VEGFA en el pulmón y además que la inhibición de ambos factores puede atenuar el cuadro (Iyer y col., 2015).

La tensión del oxígeno refiere a la concentración de oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) a la cual los tejidos están expuestas. Cuando un tejido se encuentra dentro de un rango de concentraciones de O<sub>2</sub> de 20%-5%, se dice que se encuentra en normoxia y para mantener esa condición existen una serie de complejos mecanismos homeostáticos. Por el contrario, la hipoxia se define como una reducción de la cantidad de O<sub>2</sub> disponible para una célula o tejido y se clasifica en una fase aguda y una fase crónica que se diferencian en los mecanismos que inducen para revertir la baja tensión de O<sub>2</sub> (Semenza, 2010). La hipoxia es el mayor regulador de la expresión de VEGFA a través del factor inducible por hipoxia (HIF) 1α (Ema y col., 1997).

HIF1 es un factor de transcripción heterodimérico compuesto por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . HIF1 $\alpha$  es sensible a los niveles tisulares de oxígeno, mientras que HIF1 $\beta$  no lo es y posee una expresión constitutiva (Bruick, 2003 y Wang y col., 1995). Bajo condiciones normóxicas, HIF1 $\alpha$  se hidroxila y es ubiquitinado para luego ser degradado por el proteasoma (Pugh y col, 2003). Las prolin hidroxilasas, enzimas que hidroxilan a HIF1 $\alpha$ , requieren ascorbato y oxígeno molecular para poder llevar a cabo sus funciones catalíticas (Semenza, 2004 y Bruick, 2003). En situaciones hipóxicas las prolin hidroxilasas se inhiben y HIF1 $\alpha$  se acumula permitiendo su propia estabilización, luego se trasloca al núcleo y se une al promotor de VEGFA promoviendo su síntesis (Yuan y col., 2003). En el testículo, el HIF1 $\alpha$  es expresado constitutivamente y su expresión es inducida en situaciones que generan estrés oxidativo como la hipoxia experimental y en patologías testiculares como el varicocele y la torsión (Lysiak y col., 2009; Paul y col., 2009, Kilinç y col., 2004, Reyes y col, 2012).

El estrés oxidativo también tiene la capacidad de inducir la expresión de HIF1 $\alpha$  (Gao y col., 2017) y, a su vez, HIF1 $\alpha$  puede estimular la transcripción de la ONS inducible en CE, cardiomiocitos, neuronas y células gliales en un modelo de isquemia cerebral de rata (Ylä-Herttuala y Alitalo, 2003; Lowenstein y Padalko, 2004; Matrone y col., 2004).

El estrés oxidativo se genera por las especies reactivas del nitrógeno como el ON y las especies reactivas del oxígeno (ROS). Los macrófagos y los neutrófilos activados generan ROS que funcionan como un importante factor angiogénico (Kim y col., 2013). Primero, se demostró que las ROS intracelulares participan en la señalización dependiente de VEGFA en CE *in vitro* (Colavitti y col., 2002). Por otro lado, las ROS tienen la capacidad de modular la

activación, polimerización y fosforilación de VEGFR2 en cultivos de CE aórticas porcinas (Colavitti y col., 2002). En el microambiente tumoral, también se observó que la NADPH oxidasa dependiente de ROS aumenta la secreción de VEGFA (Xia y col., 2007). Resultados similares se encontraron en patologías inflamatorias como la retinopatía diabética y otras enfermedades vasculares en donde la angiogénesis mediada por ROS se correlacionó directamente con la expresión de VEGFA; y que VEGFA, por otra parte, fue capaz de promover la generación de ROS mediante la activación de la NADPH oxidasa en CE (Li y col., 2010).

Finalmente el estrés oxidativo también tiene la capacidad de inducir la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL6 y TNF $\alpha$  (Gao y col., 2017) y el propio TNF $\alpha$  tiene la capacidad de inducir la expresión de VEGFA y VEGFR2 exacerbando el vínculo angiogénesis-inflamación (Huggenberger y Detmar, 2011; Hoeben y col., 2004).

### **1.5 Receptores de VEGFA**

VEGFR1 y VEGFR2 son altamente expresados en las CE y pertenecen a la misma familia de receptores tirosina kinasa (Barleon y col., 1996; Clauss y col., 1996). A pesar de su similitud estructural, los dos receptores de VEGFA son funcionalmente diferentes: VEGFR2 es requerido para el desarrollo del linaje endotelial, la proliferación, la supervivencia, la permeabilidad vascular y la migración de las CE; mientras que VEGFR1 juega un papel en la organización del endotelio vascular, la hematopoyesis y la migración linfomonocitaria (Fong y col., 1995; Shalaby y col., 1995; Kowanetz y Ferrara, 2006). La unión del ligando induce la homo/heterodimerización de los receptores activando la tirosina

kinasa y la autofosforilación de residuos tirosina en los dominios intracelulares de los receptores. Estos residuos circundantes forman sitios de unión para moléculas adaptadoras las cuales inician varias vías de señalización que median tanto respuestas inmediatas como la permeabilización vascular como respuestas a largo plazo que requieren regulación genómica tales como la supervivencia, la migración y la proliferación celular (Koch y col., 2011; Shibuya, 2013a).

La señalización de los VEGFRs está fuertemente regulada a diferentes niveles, incluyendo los niveles de expresión del receptor, las afinidades para la unión de sus diferentes ligandos, la presencia de co-receptores y la disponibilidad determinada por el grado de degradación y la velocidad de reciclado. La endocitosis y el tráfico de VEGFRs regulan la especificidad así como también la duración y amplitud de la señalización. Una vez que están en el citoplasma, los VEGFRs son o bien transportados a los lisosomas para su degradación o reciclados para volver a la membrana a través de vías de reciclaje rápidas o lentas. En el caso de VEGFR2, la activación de la señalización ERK1/2, la cual es esencial para la biología del receptor, es dependiente de la velocidad del tráfico intracelular (Nakayama y col., 2013; Simons, 2012).

VEGFR2 es una glicoproteína que se une a VEGFA con una afinidad 10 veces menor que VEGFR1 (Shinkai y col., 1998; Li y col., 1998), sin embargo transduce la gama completa de respuestas biológicas de VEGFA dado que su actividad tirosina quinasa es 10 veces mayor (Koch y col., 2011). Además de VEGFA, se une a VEGFC y VEGFD y la unión del ligando involucra a los dominios extracelulares tipo Ig 2 y 3 (McColi y col., 2003). VEGFR2 se expresa en el

endotelio vascular y en los hemangioblastos y su expresión es máxima durante la vasculogénesis y la angiogénesis embrionarias (Millauer y col., 1993, Oelrichs y col., 1993). Por otro lado, se encuentra en varias células no endoteliales tales como células del conducto pancreático, células progenitoras de la retina, megacariocitos y células hematopoyéticas (Koch y col., 2011). Los embriones de ratones *vegfr2* *-/-* mueren a los 8,5 d por un desarrollo deficiente de CE y células hematopoyéticas (Shalaby y col., 1995), un fenotipo similar al de ratones *vegfa* *-/-* (Carmeliet y col., 1996; Ferrara y col., 1996). Esto señala al VEGFR2 como el principal transductor de los efectos de VEGFA en la diferenciación, proliferación y migración de CE y en la formación del tubo vascular. Experimentos *in vitro* han indicado que la proliferación inducida por VEGFA es principalmente mediada por VEGFR2, mientras que VEGFR1 puede ser capaz de mediar una respuesta migratoria (Barleon y col., 1996; Clauss y col., 1996; Seetharam y col., 1995). Además se ha visto que el uso de agentes específicos que interrumpen la interacción VEGFA/VEGFR2 o que bloquean la vía de transducción de señal VEGFR2 resultan en la inhibición de la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Zogakis y Libutti, 2001; Margolin, 2002). Por otro lado, la expresión de VEGFR2 correlaciona con la angiogénesis fisiológica en el útero durante el ciclo reproductivo (Tasaki y col., 2010) o en procesos patológicos asociados a la neovascularización como el cáncer (Millauer y col., 1994; Plate y col., 1993).

VEGFR1 se expresa ampliamente en varios tipos celulares, incluidos los monocitos y macrófagos, las células del músculo liso vascular y las células neuronales (Selvaraj y col., 2015). Además de VEGFA, se une a VEGFB y PlGF y existe como un homodímero o un heterodímero dependiendo del ligando

(Mac Gabhann y Popel, 2007). Estudios han demostrado que la utilización de un receptor heterodimérico sintético específico no induce la proliferación de CE pero estimula la migración y la producción de ON. Por otra parte, se ha visto que este heterodímero, expresado en CE umbilicales, es capaz de bloquear la activación de VEGFR2 y ERK1/2 inducida por VEGFA, sugiriendo que en esta forma actúa como un regulador negativo del VEGFR2 (Cudmore y col., 2012). Aunque VEGFR1 se une a VEGFA con una mayor afinidad, la inducción de la fosforilación de VEGFR1 es débil (Ito y col., 1998). Se ha visto que embriones de ratón *Vegfr1* *-/-* de 8,5 a 9 d mueren debido al exceso en la proliferación de CE y vasculatura desorganizada (Fong y col., 1995), ya que hay una mayor disponibilidad de VEGFA para unirse a VEGFR2 y una mayor señalización de VEGFR2. La existencia de una variante de *splicing* que codifica un VEGFR1 soluble (VEGFR1s) reduce la señalización VEGFR2 actuando como un secuestrador fisiológico de VEGFA (Shibuya y col., 2013a). Por lo tanto, ambas isoformas del VEGFR1 son vistos en gran parte como señuelos que controlan la cantidad de VEGFA disponible para unirse y activar VEGFR2. Se ha demostrado que la regulación negativa de la expresión de VEGFR1 en lesiones ateroscleróticas puede promover el crecimiento de la placa por el aumento de la señalización VEGFA-VEGFR2 (Avraham-Daidi y col., 2012). Además de su papel como un regulador negativo en el desarrollo de la vascularización, VEGFR1 posee un rol importante en el montaje de una respuesta inflamatoria y en la angiogénesis asociada a la inflamación a través del reclutamiento de células mielomonocíticas derivadas de la médula ósea. En consecuencia, ratones *vegfr1* *-/-* muestran una angiogénesis alterada en una amplia gama de condiciones patológicas tales como crecimiento tumoral (Hiratsuka y col.,

2001), diseminación metastásica de tumores (Hiratsuka y col., 2002), neovascularización coroidea (Muranaka y col., 2008), artritis reumatoide (Murakami y col., 2006) e isquemia cerebral (Beck y col., 2010).

### **1.6 VEGFA y VEGFRs en el testículo**

La espermatogénesis y la esteroidogénesis testicular están reguladas por las gonadotrofinas hipofisarias, la hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), y ellas a su vez están moduladas por una serie de factores intratesticulares parácrinos o autócrinos, entre ellos IL1, IL6, TNF, IFN, el factor inhibidor de leucemia (LIF) y el factor de células *stem* (SCF) (Jegou y Pinau, 1995; Huleihel y Lunenfeld, 2004). Aparte de estos factores, la microcirculación testicular puede considerarse un determinante importante para la regulación de las funciones del testículo (Setchell, 1994). El adecuado mantenimiento del microambiente testicular en los compartimentos tubular e intersticial involucra un transporte y una distribución eficiente de precursores, factores reguladores y metabolitos a través de la microvasculatura testicular. Esto destaca la importancia de la producción de sustancias vasoactivas producidas dentro del testículo para mantener la capilarización y la permeabilidad vascular. Uno de los factores más potentes descritos en esta función es el VEGFA (Rudolfsson y col., 2004).

Durante el desarrollo embrionario del testículo, las distintas isoformas del VEGFA están involucradas en la vasculogénesis y en la formación de los cordones seminíferos en la rata (Baltes-Breitwish y col., 2010). Durante el desarrollo embrionario, tanto el bloqueo de VEGFA secretado por las células de Sertoli como la inhibición de la transducción de las señales a través de VEGFR1

y 2, afectó la formación de los cordones seminíferos, el desarrollo y la densidad vascular, específica del sexo en la morfogénesis gonadal de embriones de rata de 13 a 18 d (Bott y col., 2006). En ratas postnatales de 3 d de edad se demostró la expresión de VEGFA en los cordones testiculares, específicamente, en las células de Sertoli y en las células de Leydig (Caires y col., 2012). Este hallazgo fue significativo, ya que la célula de Sertoli es la primera en diferenciarse y se ha propuesto como la reguladora de los genes que controlan la diferenciación testicular (Magre y Jost, 1991). En el testículo bovino prepuberal, VEGFA se expresa principalmente en espermatogonias y, en menor medida, en células de Sertoli, CE y células de Leydig (Caires y col., 2009). Ratones *knock out* que no expresaban isoformas de VEGFA en células de Sertoli, CG y Leydig mostraron alteraciones en los genes necesarios para el mantenimiento a largo plazo de espermatogonias indiferenciadas y consecuentemente en la fertilidad. Sin embargo el análisis de la estructura vascular no mostró diferencias con los ratones *wild type* (Lu y col., 2013) indicando que en el testículo adulto los efectos no endoteliales/vasculares de VEGFA son relevantes para el mantenimiento testicular. Esto se aplica también al modelo bovino en donde se observó que este factor induce la expresión de genes que promueven la supervivencia y la proliferación de las CG (Caires y col., 2009).

En el testículo adulto se ha demostrado que las células de Sertoli y Leydig humanas normales expresan VEGFA así como sus receptores, VEGFR1 y 2, mientras que las CE y los pericitos sólo expresan dichos receptores (Ergün y col., 1997). La expresión de los receptores en células no endoteliales sugieren a VEGFA como un factor mitogénico y angiogénico parácrino, responsable de



modular la capilarización del tejido testicular humano y mantener las funciones de la microvasculatura y del epitelio germinal. Estos resultados en la localización tisular difieren con lo descrito para el ratón, donde se demostró expresión de VEGFR1 en espermatoцитos paquiténicos y espermátides redondas al igual que VEGFA pero no en células de Sertoli (Nalbandian y col., 2003). Sin embargo ambos receptores se expresan en CE y Leydig (Korpelaine y col., 1998). En la rata normal se describió la expresión de VEGFA en células de Leydig (Collin y Bergh, 1996), macrófagos (Coliny Bergh, 1996), células de Sertoli (Baltés-Breitwisch y col., 2010) y en CG (espermatoцитos y espermátides) (Ai y col., 2008). En las CG mencionadas también se observó expresión de VEGFR1 y 2 (Rudolfsson y col., 2004), no obstante se desconoce el patrón de expresión de VEGFA y sus receptores en el testículo bajo condiciones de inflamación. Se ha demostrado que los niveles de VEGFA disminuyen en roedores con ciclo estacional como el hámster en el período de regresión; y esto se correlaciona con una atrofia gradual de los testículos y un descenso en la masa testicular (Caires y col., 2009; Young y Nelson, 2000).

El VEGFA producido por las células de Leydig en rata estimuladas con hCG es capaz de estimular la angiogénesis cuando fragmentos intersticiales testiculares son trasplantados dentro de cápsulas en el riñón de un hospedador (Collin y Bergh, 1996). Sin embargo en estas ratas tratadas, no se observaron signos de fenestraciones en las CE del intersticio testicular (Bergh y Damber, 1996; Huminiecki y col., 2001). Estos resultados sugieren que alguno de los mecanismos por los cuales VEGFA afecta la permeabilidad vascular en otros tejidos estaría inhibido en el testículo normal. Además, se ha visto que la sobre expresión de VEGFA en testículo y epidídimo de ratones transgénicos causa

infertilidad. Esos testículos presentan arresto en las espermatogonias y un aumento en la densidad y permeabilidad capilar; mientras que en el epidídimo se observan células epiteliales hiperplásicas (Korpelaine y col., 1998). Por otro lado, se ha demostrado en ratas diabéticas que la expresión de VEGFA se encuentra disminuida en el testículo y esta reducción está vinculada con un aumento en la tasa de apoptosis de CG principalmente espermatogonias y la atrofia de los TS por decremento del diámetro de los túbulos. Este daño tisular está asociado a mayores niveles de estrés oxidativo lo que facilita la muerte celular apoptótica (Sisman y col., 2014). Además, la sobreexpresión de VEGFA en ratones transgénicos induce infertilidad masculina, potencialmente debido a la detención de la maduración de CG principalmente espermátides alargadas. Los efectos vasculares en los testículos también podrían contribuir al fenotipo infértil, dado que aumenta la densidad y la permeabilidad capilar. Se presume que estos eventos podrían aumentar la temperatura testicular y la extravasación (Korpelainen y col., 1998). Estas evidencias demuestran que VEGFA es un importante factor trófico para la reproducción masculina, sin embargo producido en exceso puede ser perjudicial para la fertilidad.

Nuevos resultados revelaron que VEGFA promueve la proliferación de las CG de ratón *in vitro* y aumenta la revascularización en injertos subcutáneos de células testiculares en matrigel; mientras que el uso de del antagonista SU5416, bloqueante de VEGFR2, ejerce efectos opuestos (Tian y col., 2016). Por último, ensayos *in vivo* en ratones normales adultos inyectados intratesticularmente con VEGFA mostraron que el uso de oligonucleótidos VEGFR-antisentido permitió regular negativamente la expresión de VEGFR1 y 2 bloqueando en

ambos casos la actividad angiogénica y la vasodilatación mediadas por VEGFA a nivel testicular (Marchand y col., 2002).

### **1.7 Terapias anti-angiogénicas**

Como hemos descrito anteriormente, la angiogénesis se asocia a una variedad de condiciones patológicas como el crecimiento tumoral, la DME, la artritis reumatoide, la EAE, etc. (Taylor, 2002; Witmer y col., 2003). Dado el importante rol de VEGFA y la interacción con sus receptores en estas condiciones, han sido considerados blancos importantes para las terapias anti-angiogénicas en cáncer, previniendo el desarrollo de neoplasias malignas y la diseminación metastásica (Yadav y col., 2015; Rugo, 2004), y en otros procesos patológicos de inflamación y autoinmunidad (Longo y col., 2002; Ferrara y Adamis, 2016). Si bien, VEGFA es el factor regulador estrella de la angiogénesis, no puede descartarse el estudio de HIF1 $\alpha$  en la tumorigénesis y el cáncer dado que aumentos en los niveles de expresión están asociados con mal pronóstico de la enfermedad (Lim y col., 2017; Gao y col., 2017). La gran interacción de moléculas y factores involucrados en la vía angiogénica ha justificado el estudio y el uso de una combinación de agentes terapéuticos (Fallah y Rini, 2019). Los inhibidores angiogénicos se han clasificados en dos categorías: endógenos (presentes dentro del organismo) o sintéticos (drogas).

Dentro del primer grupo de inhibidores se encuentran los INFs y las ILs. La administración de una dosis óptima de INF $\alpha$ / $\beta$  en cultivos de células de carcinoma disminuyó la expresión de factores de crecimiento como VEGFA y bFGF a nivel mRNA y proteína (Slatyon y col., 1999; Singh y col., 1995; Yildirim y col., 2015). Por otro lado, se sabe que INF $\alpha$  tiene la capacidad de reducir el

crecimiento tumoral y la densidad microvascular en ratones *nude* transplantados con tumores hepáticos humanos por medio de la inhibición de la transcripción del gen de VEGFA (Marschall y col., 2003). A nivel de HIF1 $\alpha$  se vio que tanto el INF $\alpha$  como el INF $\gamma$  pueden inhibir su expresión y traslocación al núcleo, impidiendo de esta manera la producción de VEGFA y la proliferación de EC provenientes de venas umbilicales humanas (HUVECs) (Gerber y Pobel, 2008; Hiroi y col., 2009). Por otro lado, en un modelo de fibrosis pulmonar se vio que el INF $\gamma$  posee efectos anti-angiogénicos indirectos a través de la liberación de CXCL10, quimiocina inducible por interferones, dado que ratones tratados con la proteína recombinante redujeron significativamente la expresión de CD31 y el número de CE en el pulmón (Keane y col., 1999; Borden, 2019). Es por ello que el uso de INF $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos para su uso en el tratamiento de distintas patologías como leucemia, melanoma y enfermedad granulomatosa crónica respectivamente (Jonasch y Haluska, 2001). La estructura de las ILs es esencial para determinar su función ya que pueden tener efectos pro o anti-angiogénicos. La IL10 regula negativamente la síntesis de VEGFA, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6 y MMP9 por parte de macrófagos infiltrantes de tumores (Huang y col., 1999). Por sus propiedades anti-angiogénicas y anti-inflamatorias, la IL10 ha sido utilizada en el tratamiento de pacientes con desordenes de inflamación crónica del tracto digestivo (Ming y Shao, 2004) y con artritis reumatoide (St Clair, 1999). La IL4 ha sido postulada como otro potente inhibidor de la angiogénesis en modelos de neovascularización corneal y de artritis reumatoide en rata (Haas y col., 2006). Recientemente, Bucher y col. (2018) reportaron que la IL5 es capaz de inhibir la proliferación, la

migración y la formación de nuevos vasos sanguíneos en matrigel en cultivos de CE provenientes de la microvasculatura pulmonar humana, sugiriendo un potencial rol terapéutico.

Dentro de la categoría de inhibidores sintéticos, existe una gran diversidad de drogas que inhiben la angiogénesis actuando a distintos niveles en la cascada de señalización VEGFA-VEGFRs. Por un lado están los Ac anti-VEGFA, los cuáles neutralizan directamente a la proteína inhibiendo sus acciones biológicas como por ejemplo el Bevacizumab y el Aflibercept (Zhang y col., 2002). Estos compuestos bloquean la unión del ligando al dominio transmembrana tirosina kinasa del VEGFR impidiendo la autofosforilización del dominio intracelular y la consecuente cascada de señalización. El uso conjunto de Bevacizumab y Aflibercept mediante inyecciones intraoculares en ratas con neo-vascularización inducida, disminuyó el número de vasos sanguíneos y los restringió hacia la periferia de la cornea (Gal-Or y col., 2016). Fármacos con estructura similar a la de los receptores solubles de VEGFA y que se unen a él específicamente también inhiben la interacción ligando-receptor, como por ejemplo el VEGFA $_{trap}$  que suprime de manera efectiva el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones inyectados con células de glioma humano y la vascularización, dando como resultado tumores atrofiados y casi completamente avasculares. (Witte y col., 1998; Holash y col., 2002). Por otro lado, se han creado drogas que pueden unirse directamente a los receptores de VEGFA actuando como inhibidores específicos de la vía de señalización como el Sunitinib y el Sorafenib (Gan y col., 2009; Wilhelm y col., 2008). Otro ejemplo es el Ramucirumab, una IgG1 humana que se une al sitio de unión al ligando de VEGFR2 específicamente y evita su activación (Calvetti y col., 2015).

Además, se han descrito inhibidores de la vía de transducción de señales que actúan mediante el bloqueo de la autofosforilación de los receptores, entre ellos, LY294002, Wortmannin, FARA-A, Rapamicina, Temsirolimus, Everolimus, Tipifarnib, Lonafarnib (Downward, 2003; Yadav y col., 2015). Por último, nucleótidos antisentido específicos para VEGFA los cuales se unen al ARNm y luego interfieren con el proceso de traducción, inhiben directamente la formación de proteínas de VEGFA. Se vio que estos nucleótidos transferidos a ratones *nude* con tumores de glioma disminuyeron los valores de VEGFA endógeno y el crecimiento tumoral (Im y col., 1999). Varios de estos inhibidores como el Sunitinib, el Ramucirumab y el Bevacizumab han sido aprobados por la FDA y ya han sido utilizados en la terapia clínica en DME, cáncer de mama y cáncer colorrectal metastásico (Gan y col., 2009, Kim y col., 1993; Ferrara y col., 2006; Calvetti y col., 2001). De todos ellos, Bevacizumab fue el primero en ser descubierto y es principal bloqueante de VEGFA utilizado en las terapias antiangiogénicas (Ferrara y col., 2004b).

Bevacizumab es un Ac monoclonal humanizado anti-VEGFA, específicamente en su isoforma de 165 aminoácidos, por lo tanto no neutraliza a otros miembros de la familia de VEGF como VEGFB y VEGFC (Presta y col., 1997). Para caracterizar la actividad biológica de Bevacizumab a través del bloqueo de VEGFA, Wang y col. (2004) realizaron estudios *in vitro* utilizando HUVECs y células pertenecientes a líneas tumorales que expresaban los receptores de VEGFA. Lo que se observó fue que el inhibidor es capaz de bloquear completamente la proliferación, la migración y la supervivencia de las CE inducida por VEGFA, así como también el incremento de la permeabilidad y la producción del ON sugiriendo que este fármaco es capaz de inhibir y

neutralizar los eventos biológicos mediados por la interacción de VEGFA-VEGFR1 y VEGFA-VEGFR2.

Bevacizumab es utilizado como tratamiento de primera línea para pacientes con cáncer de colon y también ha sido probado en combinación con quimioterapia para el tratamiento de cáncer de pulmón no escamoso y de pacientes con DME. En cuanto a trabajos experimentales, Bock y col. (2007) informaron que Bevacizumab es un potente inhibidor de la angiogénesis a nivel de la córnea y de la linfangiogénesis *in vivo* en modelos murinos de neovascularización corneal. En ensayos farmacocinéticos en ratas, ratones y monos, se vio que Bevacizumab administrado a nivel sistémico alcanza varios tejidos del cuerpo y su biodisponibilidad en suero es del 69% en ratas y 100% en ratones y monos (Lin y col., 1999). Además se ha descrito la acción de Bevacizumab sobre la permeabilidad vascular en un modelo de EAE en ratón en el cual disminuyó la inflamación en los animales tratados debido a que se observó una reducción en el infiltrado de células mononucleares a nivel sistema nervioso central con una dosis de 5 mg/kg (McMillan y col., 2012).





## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

El testículo es considerado un órgano inmunoprivilegiado ya que sus CG están protegidas de la acción de distintas noxas y de reacciones inmunológicas contra antígenos propios. En situaciones patológicas, el desbalance entre la tolerancia y la capacidad de la respuesta inmune llevan al desarrollo de un cuadro inflamatorio testicular que induce alteraciones severas de la espermatogénesis.

La inflamación crónica tisular involucra fenómenos de migración, proliferación y reclutamiento de células inflamatorias que, a través de mediadores inflamatorios, promueven directa o indirectamente la angiogénesis. VEGFA es el principal regulador de la angiogénesis y de la permeabilidad vascular fisiológica y patológica. Su expresión es inducida por la hipoxia y el estrés oxidativo a través del factor de transcripción HIF1 $\alpha$ .

El objetivo general de esta tesis es dilucidar la contribución del proceso de angiogénesis mediado por VEGFA en la inducción y el desarrollo de la inflamación crónica del testículo utilizando un modelo de OAE. Conocer los mecanismos que contribuyen a la inflamación permitirá idear estrategias anti-inflamatorias útiles para evitar la infertilidad que sufren los pacientes con orquitis crónicas.

La hipoxia junto a los niveles aumentados de ON estabilizarían a HIF1 $\alpha$  permitiendo su translocación al núcleo y modulando la expresión de VEGFA durante el desarrollo de la orquitis. Esperamos que el nivel de VEGFA se asocie con la progresión y la severidad de la lesión testicular y que la neutralización directa con Bevacizumab reduzca la formación de vasos sanguíneos y, en consecuencia, el grado de inflamación tisular y el daño del epitelio germinal.

## 2.1 Objetivos específicos

1. Analizar el número de vasos testiculares con un marcador específico de células endoteliales y correlacionar dicho fenómeno con la progresión y severidad de la OAE.
2. Determinar el estado de oxigenación del testículo durante el desarrollo de la OAE.
3. Analizar *in vivo* el efecto de inhibir VEGFA sobre la inducción y desarrollo de la OAE.
4. Estudiar la expresión del factor pro-angiogénico VEGFA en el testículo de ratas con OAE.
5. Analizar *in vivo* la capacidad angiogénica del fluido testicular (FT) obtenido de ratas con OAE.
6. Analizar la expresión de HIF1 $\alpha$  en el testículo durante el desarrollo de la OAE.
7. Evaluar el contenido de ON testicular durante el desarrollo de la OAE.
8. Analizar la expresión de los VEGFRs en el testículo de ratas con OAE.
9. Estudiar la expresión de VEGFA a nivel sistémico en la OAE.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

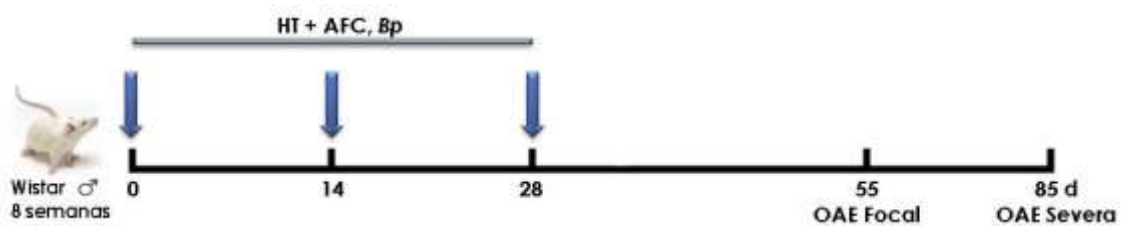
#### 3.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas (8 semanas) provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). Los animales fueron mantenidos a 22 °C con un esquema de 14 h de luz y 10 h de oscuridad, alimentadas con comida estándar y agua *ad libitum*. Todos los protocolos experimentales empleados en este trabajo fueron realizados según las indicaciones de la Guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio del *National Institutes of Health* y aprobados por la Comisión Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina (UBA).

#### 3.2 Inducción de la OAE

Las ratas del grupo experimental (E) fueron inmunizadas con una emulsión de homogenado testicular (HT) y adyuvante de Freund completo (AFC, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) preparado como previamente se describe (Doncel y col., 1989). Brevemente, testículos de ratas adultas jóvenes fueron decapsulados, diluidos en igual volumen de solución salina y homogenizados en un Omni mixer por 30 s. La concentración final fue 500 mg peso húmedo/ml. Las ratas del grupo E fueron inyectadas 3 veces con 0,4 ml de HT (200 mg)/ dosis/ rata cada 14 d emulsionado con 0,4 ml de AFC (Fig. 1). La inmunización se realizó por vía intradérmica en las almohadillas plantares y por vía

subcutánea en múltiples sitios cercanos a las regiones ganglionares inguinales y cervicales. Se utilizó como coadyuvante *Bordetella Pertussis* (Bp) (cepa 10536, Instituto Nacional de Microbiología "C. Malbrán"), inyectándose  $10^{10}$  microorganismos por vía intravenosa en las 2 primeras inmunizaciones y  $5 \times 10^9$  microorganismos por vía intraperitoneal en la tercera inmunización. Las ratas del grupo control (C) se inmunizaron en las mismas condiciones que las del grupo E reemplazando el HT por solución fisiológica y las ratas del grupo normal (N) no fueron tratadas. Los animales correspondientes a los tres grupos estudiados fueron sacrificados a los 30, 35, 55 y 85d posteriores a la primera inmunización. Los testículos fueron removidos, pesados, fijados en una solución de Bouin e incluidos en parafina, congelados para cortes de criostato y Western Blot o procesados para la obtención de fluido testicular (FT). La sangre fue colectada para la obtención de suero.



**Figura 1.** Esquema representativo de la inducción de la orquitis autoinmune experimental (OAE). Las flechas azules indican los días (d) de inmunización. HT: homogenado testicular, AFC: Adyuvante de Freund Completo, Bp: *Bordetella pertussis*.

### 3.3 Histopatología testicular

La histopatología testicular se estudió en cortes de parafina obtenidos en tres diferentes niveles y teñidos con hematoxilina-eosina. El daño de los TS y la presencia de infiltrado linfomonocitario intersticial constituyen la principal característica de la histopatología testicular de la OAE. A efectos de cuantificar el grado de descamación del epitelio germinal, se utilizó una escala del 1-10 siendo 10 el valor máximo de daño testicular (Rival y col., 2008), que se obtuvo de la siguiente manera:

$$\text{Índice de OAE} = V + T + P$$

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%); 9 (96-100%). T es un valor que indica la severidad de la lesión del epitelio germinal; vale 0 puntos cuando la descamación de las CG es leve y 0,5 puntos cuando el grado de descamación es severo (es decir, cuando solamente células de Sertoli y espermatogonias permanecen adheridas a la pared de los TS). P es un factor de 0,5 puntos que se agrega cuando la relación peso testicular (Pt)/Peso corporal (Pc) es menor que  $2,5 \times 10^{-3}$ .

A efectos de cuantificar el grado de infiltración linfomonocitaria intersticial, se utilizó una escala del 1-5 siendo 5 el máximo de inflamación testicular. Los valores del índice de inflamación se asignaron según el criterio descrito a continuación: 1 (Presencia de células infiltrantes en la rete testis o alrededor de los túbulos rectos); 2 (Infiltrado intersticial en focos); 3 (Presencia de 1 granuloma); 4 (Infiltrado intersticial de intensidad moderada en zonas

extensas del corte); 5 (Infiltrado intersticial severo en áreas extensas del corte y/o con la presencia de más de un granuloma).

### 3.4 Inmunohistoquímica

- **Inmunoperoxidasa: Expresión de CD31, HIF1 $\alpha$ , VEGFA y VEGFRs**

La expresión de CD31, VEGFA, VEGFR1 y VEGFR2 fue detectada por la técnica de inmunoperoxidasa indirecta. Se utilizaron cortes de criostato o parafina de la zona ecuatorial del testículo previamente fijados según la recomendación específica para cada anticuerpo (Ac) primario (ver Tabla 1). Los cortes de parafina fueron desparafinados y luego hidratados con una concentración decreciente de alcoholes. Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda (CH) y como solución de lavado, entre cada incubación, se empleó una solución salina buffereada (PBS) fría durante 10 min. Las soluciones de bloqueo, diluciones de los Ac primarios anti-CD31 (Genway Biotech, Inc., San Diego, CA, USA), anti-HIF1 $\alpha$ , anti-VEGFA, anti-VEGFR1 y anti-VEGFR2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) y especificaciones de los Ac secundarios empleados (Vector Lab.) (1/250) se detallan en la Tabla 1. Los cortes fueron incubados con las soluciones de bloqueo durante 30 min a temperatura ambiente (TA), con los Ac primarios durante toda la noche a 4° C y con los secundarios 60 min a TA. Los cortes fueron incubados con una solución de bloqueo para avidina y biotina siguiendo las recomendaciones del kit (*Blocking kit*, Vector Lab., Burlingame, CA, USA). Como control negativo uno de los cortes se incubó solo con PBS omitiendo el Ac primario. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada con 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol durante 30

min a TA. Luego la reacción fue amplificada mediante el kit ABC elite (Vector Lab.) empleando 3`diaminobenzidina- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB, Vector Lab.) como sustrato de la peroxidasa. Luego de una tinción de contraste con hematoxilina, los cortes se deshidrataron y montaron con medio DPX (Sigma Aldrich).

El recuento de vasos sanguíneos CD31+ pertenecientes a la red microvascular del testículo (arteriolas, capilares, vénulas) fue realizado empleando un objetivo de 40X y un ocular de 10X. Por cada animal se contaron dos cortes y 13 campos/corte que se promediaron. Los resultados fueron expresados como número de vasos sanguíneos CD31+ cada 50 TS.

- **Inmunofluorescencia : Doble marcación VEGFA/ED1 y VEGFA/ED2**

La co-localización de VEGFA con marcadores específicos de macrófagos ED1 y ED2 de rata fue evaluada por la técnica de inmunofluorescencia doble. Estos anticuerpos reconocen el antígeno citoplasmático CD68 de monocitos, macrófagos y CD o el antígeno CD163 en la superficie de la membrana de macrófagos residentes, respectivamente (Dijkstra y col., 1985; Polfliet y col., 2006). En los cortes ecuatoriales del testículo se realizó en primera instancia la marcación para ED1 y ED2 y en segundo lugar la marcación para VEGFA. Todas las incubaciones se realizaron en CH y como solución de lavado, entre cada incubación, se empleó PBS frío durante 10 min. Luego de bloquear los sitios de unión inespecífica (30 min a TA), los cortes fueron incubados con Ac primarios anti-ED1 o anti-ED2 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) (Tabla 1) durante 120 min a TA y luego con el Ac secundario conjugado con cianina 3 (Cy3) (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) (1/500) 60 min a TA en



oscuridad. En la segunda parte y luego de la incubación con solución de bloqueo los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario anti-VEGFA (Santa Cruz Biotech.) durante la noche a 4° C en oscuridad. Finalmente, se incubaron con Ac secundario conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Vector Lab.) (1/50) 60 min a TA en oscuridad, se tiñeron con DAPI (1/500) durante 3 min y se montaron en glicerina-PBS (1:1 V/V). La observación se realizó con un microscopio de epifluorescencia Axiophot (Carl Zeiss Inc., Göttingen, Alemania).

AC PRIMARIO	DILUCIÓN	BLOQUEO	AC SECUNDARIO	CORTE/ FIJACIÓN
<b>Anti-CD31</b>	1/50 en PBS, Cat. N° GWB-54ABE1	PBS-BSA 3% Suero normal de caballo 5 %	Anti-ratón obtenido en caballo diluido en PBS  Cat. N° BA-2001	Crióstato Metanol
<b>Anti-HIF1a</b>	1/25 en solución de bloqueo, Cat. N° SC-10790	PBS-Tritón 0,1%  Leche descremada 5%	Anti-conejo obtenido en cabra diluido en solución de bloqueo  Cat. N° BA-2000	Crióstato Paraformaldehído (PFA) 4%
<b>Anti-VEGFA</b>				
<b>(IPI)</b>	1/750 en solución de bloqueo, Cat. N° SC-7269(*)	PBS Suero normal de caballo 1,5%	Anti-ratón obtenido en caballo diluido en solución de bloqueo	Parafina Bouin
<b>(IF)</b>	1/5 en PBS, Cat. N° SC-152(*)	PBS Suero normal de cabra 5%	Anti-conejo FITC obtenido en cabra diluido en PBS  Cat. N° FI-1000	Crióstato Acetona
<b>Anti-VEGFR1</b>	1/750 en solución de bloqueo, Cat. N° SC-316	PBS-BSA 3% Suero normal de cabra 5%	Anti-conejo obtenido-en cabra diluido en PBS	Parafina Bouin
<b>Anti-VEGFR2</b>	1/100 en solución de bloqueo, Cat. N° SC-6251	PBS-Tween 0,1% BSA 3% Suero normal de caballo 5%	Anti-ratón obtenido en caballo diluido en PBS-Tween 0.1%	Parafina Bouin
<b>Anti-ED1</b>	1/40 en solución de bloqueo, Cat. N° 554954	PBS Suero normal de burro 5%	Anti-ratón Cy3 obtenido en burro diluido en solución de bloqueo  Cat. N° AP192C	Crióstato Acetona
<b>Anti-ED2</b>	1/50 en solución de bloqueo, Cat. N° 554900	PBS Suero normal de burro 5%	Anti-ratón Cy3 obtenido en burro diluido en solución de bloqueo	Crióstato Acetona

**Tabla 1:** Condiciones de muestras, bloqueo y anticuerpos utilizados para las técnicas inmunoperoxidasa indirecta (IPI) e inmunofluorescencia (IF). (\*) Estos anticuerpos reconocen las isoformas de 121, 165 y 189 aminoácidos.

- **Inmunomarcación con pimonidazol: Detección de células hipóxicas**

La determinación del estado de oxigenación tisular fue realizada utilizando un marcador de células hipóxicas, el pimonidazol. Esta molécula se une a proteínas conteniendo grupos tioles en células bajo condiciones hipóxicas. Los animales fueron inyectados intraperitonealmente con pimonidazol (60mg/kg, Hypoxyprobe, Inc., Burlington, MA, USA) diluido en solución salina 90 min previo al sacrificio. Los testículos fueron extraídos, fijados en una solución de formalina (Formol 5% en PBS) e incluidos en parafina. La inmunodetección fue realizada en cortes de testículo siguiendo el procedimiento recomendado para el kit Hypoxyprobe<sup>TM-1</sup> (Hypoxyprobe, Inc).

### **3.5 Inhibición de VEGFA *in vivo***

Ratas inmunizadas para desarrollar OAE fueron inyectadas por vía intraperitoneal una vez por semana con Bevacizumab (5 mg/kg, Avastin, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) o solución salina (vehículo) de acuerdo a los diseños experimentales resumidos en la Fig. 2. Las ratas fueron sacrificadas a los 55 o 85d después de la primera inmunización. Los testículos y el hígado fueron extraídos, fijados en una solución de Bouin e incluidos en parafina para realizar el análisis histopatológico correspondiente. El recuento de vasos sanguíneos PAS+ pertenecientes a la red microvascular del testículo

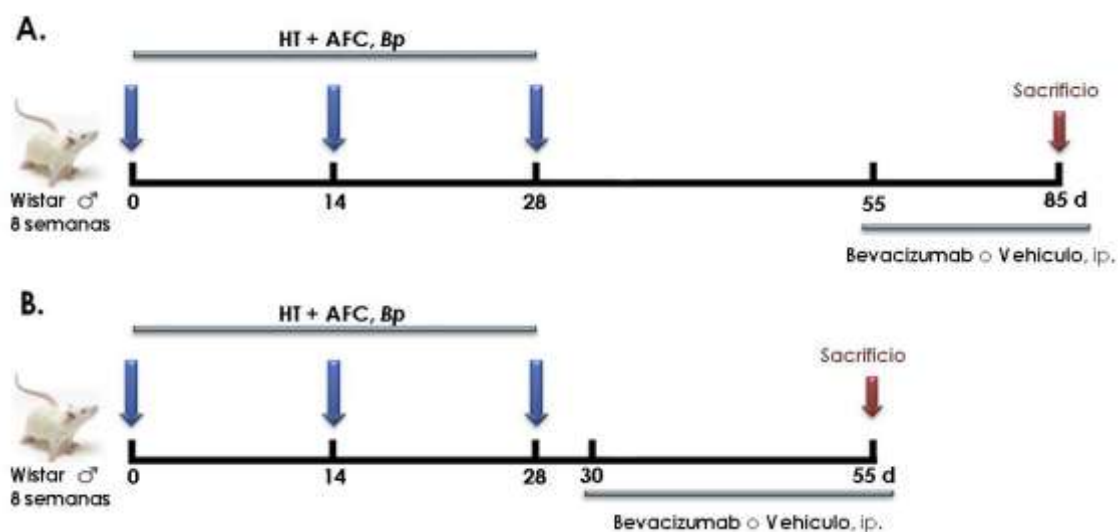
(arteriolas, capilares, vénulas) fue realizado empleando un objetivo de 40X y un ocular de 10X. Por cada animal se contaron dos cortes y 13 campos/corte que se promediaron. Los resultados fueron expresados como número de vasos sanguíneos PAS+ cada 50 TS. Adicionalmente, se evaluó si la inhibición de VEGFA a nivel fisiológico traía alguna consecuencia en cuanto al mantenimiento del epitelio germinal y la espermatogénesis. Para ello un lote de ratas N fueron inyectadas con Bevacizumab durante un período de 30d.

- **Diseño experimental 1**

La administración de Bevacizumab o vehículo se inició a partir de los 55d posteriores a la primera inmunización (Fig. 2 A) y se mantuvo hasta el tiempo del sacrificio (85d).

- **Diseño experimental 2**

La administración de Bevacizumab o vehículo inició a partir de los 30d posteriores a la primera inmunización (Fig. 2 B) y se mantuvo hasta el tiempo del sacrificio (55d).



**Figura 2.** Esquemas representativos de los diseños experimentales 1 (A) y 2 (B). Ratas inmunizadas para desarrollar orquitis fueron inyectadas intraperitonealmente (ip) con Bevacizumab o vehículo. Las flechas azules indican los días (d) de inmunización. HT: homogenado testicular, AFC: Adyuvante de Freund Completo, Bp: *Bordetella pertussis*.

### 3.6 Obtención de fluido testicular

Muestras de FT fueron recogidas de acuerdo a la metodología descrita por Sharpe y Cooper (1983). Brevemente, los testículos fueron decapsulados y suspendidos por la arteria principal. EL FT drenante fue recogido en presencia de 3  $\mu$ l de PMSF (100mM, Sigma Aldrich) y 0,5  $\mu$ l de aprotinina (10 $\mu$ g/ml, Sigma Aldrich) después de 16 h a 4° C.

Con el objetivo de evaluar VEGFA en FT provenientes de ratas del grupo E 35d, se realizó una hemicastración. Este procedimiento permitió evaluar la histopatología del testículo contralateral a los 55d. A ratas anestesiadas con una dosis de Ketamina 100 mg/kg y Xilacina 10 mg/kg intraperitoneal, se practicó una incisión hemiescrotal derecha, se expuso el testículo y se ligó la

vasculatura irrigante del mismo a nivel de la rete testis con hilo de seda 4-0. Luego se procedió a la extracción del testículo cortando con tijeras por debajo de la ligadura. El escroto fue suturado con catgut cromado 2-0.

### 3.7 Western Blot

El contenido de VEGFA fue analizado en muestras de FT y homogenado testicular, HIF1a en la fracción nuclear de homogenados testiculares y los VEGFRs en la fracción tubular e intersticial del testículo. En todas las muestras obtenidas se determinó la concentración de proteínas con un kit comercial (Bio Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA).

Brevemente, se decapsuló un testículo y se lo cortó con tijera metálica. El homogenado testicular se dejó en hielo 30 min con buffer de lisis (4ml/g de tejido, Tris-CL 50mM, NaCl 150mM, SDS 10% mg/ml, EDTA 2mM, desoxicolato Na 0,5% mg/ml, NP-40 1% mg/ml, pH 7,4) conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, leupeptina 10µg/ml, pepstatina A 10µg/ml y aprotinina 10µg/ml, Sigma Aldrich). Luego se centrifugaron a 22000 g durante 30 min a 4° C y se preservó el sobrenadante.

Para obtener la fracción nuclear, el homogenado testicular se incubó con el buffer A (Hepes 10mM, KCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, DTT 0,5mM, NP-40 1%, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100mM, PMSF 1mM, aprotinina 5µg/ml, leupeptina 5µg/ml, pepstatina 5µg/ml) durante 30 min en hielo. Luego se centrifugó a 22000 g durante 30 min a 4° C y se descartó el sobrenadante conteniendo la fracción citosólica. El pellet se resuspendió en el buffer B (Hepes 20mM, Glicerol 25%, NaCl 0,42mM, MgCl<sub>2</sub>

1,5mM, DTT 0,5mM, EDTA 0,2mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100mM, PMSF 1mM, aprotinina 5µg/ml, leupeptina 5µg/ml, pepstatina 5µg/ml), se homogeneizó y se incubó durante 30 min en hielo. Luego se volvió a centrifugar a 22000 g y se preservó el sobrenadante correspondiente a la fracción nuclear.

Para separar las fracciones tubular e intersticial, el testículo decapsulado se incubó en 2,5 ml de colagenasa (0,23mg/ml, Sigma Aldrich) diluida en PBS en un baño térmico a 34° C con agitación durante 20 min. Luego de observarse la disgregación de los TS se cortó la reacción agregando PBS frío hasta 25 ml. Los tubos fueron invertidos 3 veces y se dejaron decantar los TS 5 min en hielo. Luego se tomó el sobrenadante con pipeta Pasteur y se centrifugó 10 min a 300 g. Se resuspendió el pellet en 1 ml de PBS y se lo volvió a centrifugar en iguales condiciones obteniéndose la fracción intersticial. Los TS decantados se secaron con papel absorbente, se cortaron en trozos con tijeras metálicas y se incubaron con buffer de lisis durante 30 min en hielo al igual que la fracción intersticial. Luego se centrifugaron a 22000 g durante 30 min a 4° C.

Previamente a la electroforesis, las muestras fueron hervidas a 100° C durante 5 min e inmediatamente enfriadas en hielo y diluidas (1:1 v/v) con buffer de siembra (Tris-HCl 500µM pH 6,8, SDS 4%, glicerol 60%, β-mercaptoetanol 0,5% y azul de bromofenol 0,02%). 200µg de proteína fueron sembradas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida en presencia de SDS (ver Tabla 2), corridas a 120 volts durante 75 min a TA y luego transferidas a una membrana de PVDF (Millipore). El peso molecular de las bandas inmunoreactivas fue determinado por comparación con un patrón estándar de proteínas pre-teñidas (rango de pesos moleculares de 250 a 10kDa) (Precision Plus Protein Standards All Blue, Bio-Rad Lab.) sembrado en cada gel.

La transferencia de las proteínas fue monitoreada por tinción de las membranas con Rojo Ponceau. Todas las incubaciones a continuación se realizaron con agitación y los lavados entre incubaciones se realizaron con 6 cambios de buffer Tris-NaCl Tween-20 (TBST, Tris 10mM, NaCl 154mM, Tween-20 (v/v) al 0,1%, pH 7,5) cada 5 min a TA. Las membranas fueron bloqueadas empleando TBST conteniendo 5% de leche descremada (buffer de bloqueo) durante 60 min a TA. Luego fueron incubadas con los Ac anti-VEGFA (Santa Cruz Biotech.), anti-HIF1 $\alpha$  (Millipore), anti-VEGFR1 y anti-VEGFR2 (Santa Cruz Biotech.) durante la noche a 4° C (Tabla 2). Como control interno de carga proteica de la fracción citosólica se evaluó el contenido de  $\beta$ -actina empleando un antisuero anti- $\beta$ -actina (Sigma Aldrich). Luego de lavados, las membranas fueron incubadas con el Ac secundario biotinilado correspondiente (Vector Lab.) (1/1000) 60 min a TA (Tabla 2). Por último se incubaron con HRP (Millipore) (1/2000) diluido en solución de bloqueo 60 min a TA en oscuridad. Las bandas fueron visualizadas empleando un fotodocumentador G: Box (Syngene, Frederick, MD, USA) y evaluadas por análisis densitométrico empleando el programa Gene Tools.



AC PRIMARIO	DILUCIÓN	AC SECUNDARIO	% GEL	TIPO DE TRANSFERENCIA
<b>Anti-HIF1<math>\alpha</math></b>	1/200 en PBS, Cat. N° 07-1585	Anti-conejo diluido en solución de bloqueo	7,5 %	Durante la noche, 66mA, 4° C
<b>Anti-VEGFA</b>	1/50 en solución de bloqueo, Cat. N° SC-7269	Anti-ratón diluido en solución de bloqueo	12 %	Durante la noche, 66mA, 4° C
<b>Anti-VEGFR1</b>	1/30 en solución de bloqueo, Cat. N° SC-316	Anti-conejo diluido en solución de bloqueo	7,5 %	60 min, 150 volts, 4° C
<b>Anti-VEGFR2</b>	1/25 en solución de bloqueo, Cat. N° SC-6251	Anti-ratón diluido en solución de bloqueo	7,5 %	60 min, 150 volts, 4° C
<b>Anti-<math>\beta</math>-Actina</b>	1/500 en solución de bloqueo, Cat. N° A2066	Anti-conejo diluido en solución de bloqueo	—	—

**Tabla 2:** Condiciones de anticuerpos, diluciones, porcentaje de geles y transferencias utilizados para la técnica de Western Blot.

### 3.8 Ensayo de angiogénesis

La capacidad angiogénica del FT fue evaluada *in vivo* sobre la membrana corioalantoidea (MCA) del embrión de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) siguiendo la metodología descrita por Haro Durand y col. (2015). Se utilizaron huevos fecundados, los cuales fueron incubados *in ovo* durante 2 d a 37,5 °C. Posteriormente, su contenido fue vertido cuidadosamente en placas de cultivo de 6 pocillos. Luego de 5 d de incubación *ex ovo*, se aplicó sobre las MCA discos de papel de filtro (5 mm de diámetro, Whatman) impregnados con

FT pre-incubados o no durante 60 min con Bevacizumab (2,5 ng/ml, Avastin, Roche). Luego de los 2 d post-tratamiento las MCA fueron fijadas *in situ* con PFA 4%/glutaraldehído al 2% en PBS durante 48 h. Luego de la fijación fueron disecadas, montadas sobre un portaobjetos y analizadas bajo una lupa estereoscópica empleando un aumento de 35X. Se tomaron fotografías de las áreas de las MCA delimitadas con el disco de papel de filtro. La evaluación morfométrica de la densidad vascular se realizó con el programa ImageJ y consistió en cuantificar el número de puntos de bifurcación de los vasos sanguíneos en el área (19,62 mm<sup>2</sup>) de la MCA confinada a cada disco.

### 3.9 Determinación de Nitritos

Los nitritos, productos de la oxidación del ON, fueron medidos por la reacción de Griess (Green y col., 1982). Para ello se decapsuló un testículo, se homogenizó y sonicó en buffer Tris-HCl conteniendo 0,05% Tritón X-100 (100µl/g de tejido). Los homogenados fueron centrifugados a 22000 g durante 30 min a 4° C y se conservó el sobrenadante. Luego se precipitaron proteínas agregando ZnSO<sub>4</sub> (0,15M, 10µl/ml) y NaOH (10M, 0,6ml/ml) en buffer Tris-HCl, 0,05% Triton X-100. La solución se incubó en hielo por 15 min y se volvió a centrifugar. El sobrenadante fue utilizado para medir el contenido de nitritos. Los valores se expresan como concentración total de nitritos (µM) por muestra.

### 3.10 Inmunoensayo para VEGFA (ELISA)

Un kit de ELISA específico (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) fue empleado para determinar la concentración de VEGFA en muestras de suero provenientes de ratas de los grupos N, C, E 35d y con OAE. Los sueros de los grupos E 35d y OAE fueron recogidos en los mismos animales pero a distintos tiempos después de la primera inmunización. Los reactivos, soluciones, curva estándar y control positivo se prepararon de acuerdo a lo especificado en el protocolo del kit. La lectura de la densidad óptica se realizó en un lector de placa de ELISA a 450 nm. Previo a realizar la curva de absorbancias, el valor del blanco fue restado a cada muestra. Todos los pocillos fueron leídos por duplicado. La media de la mínima concentración detectable establecida por el kit fue de 8,4 pg/mL.

### **3.11 Análisis estadístico**

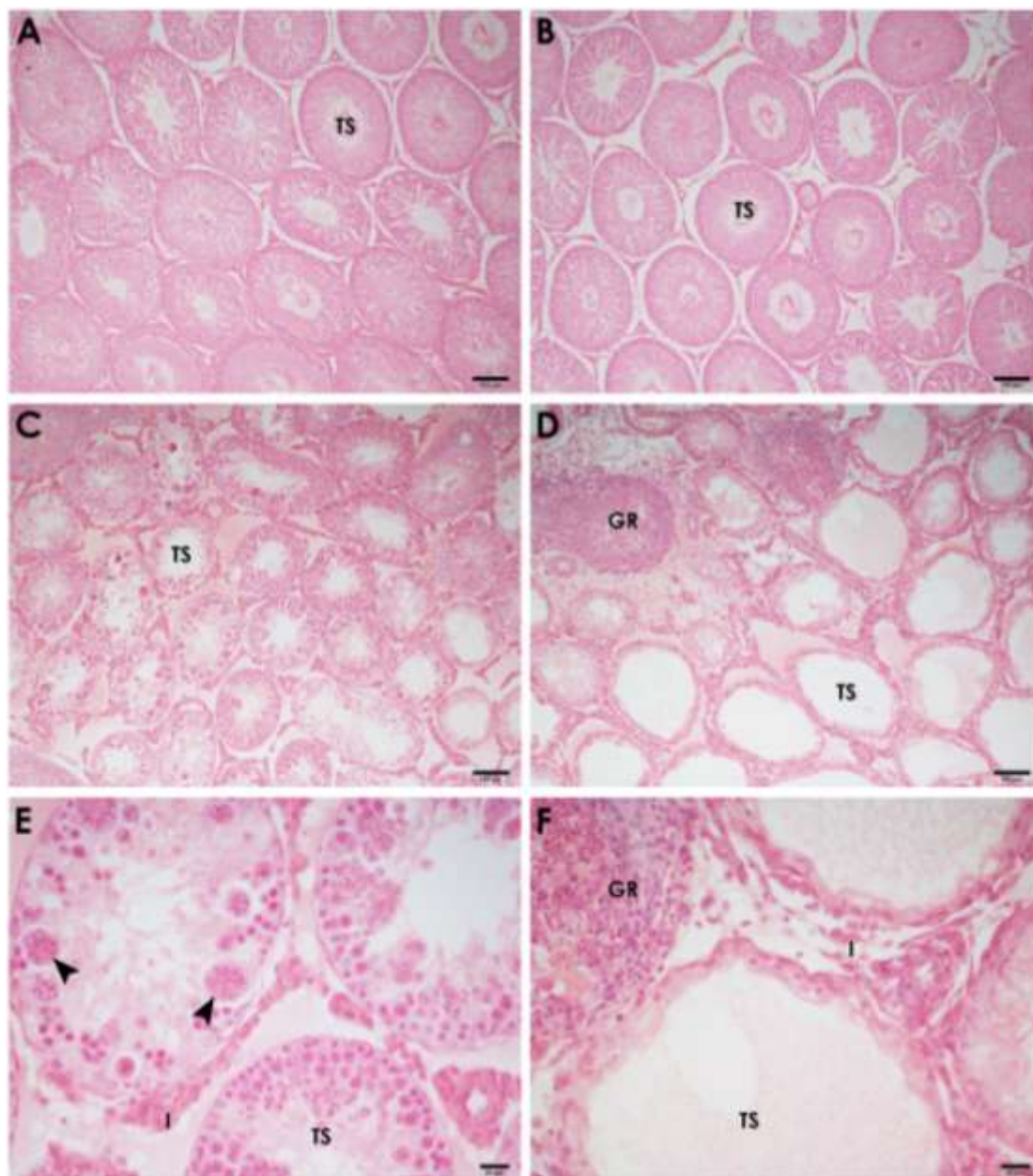
Las evaluaciones estadísticas fueron realizadas empleando el test no paramétrico Mann-Whitney Rank test para comparar dos muestras, Kruskal - Wallis (ANOVA de un factor) para comparar más de dos muestras o test de Tukey (ANOVA de dos factores) y test de regresión lineal para la correlación entre dos parámetros. Un valor de  $p \leq 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Histopatología testicular

A los 55d posteriores a la primera inmunización, el 80% las ratas del grupo E desarrollaron OAE focal caracterizada por lesiones de los TS en los cuales se observaron distintos grados de descamación de las CG y numerosas células multinucleadas, producto de la fusión de espermátidas (Fig. 3 C, E). A los 85d, el 83% de las ratas inmunizadas desarrolló una lesión testicular severa en donde se observan grandes áreas de TS aspermatogénicos que sólo contenían espermatogonias y células de Sertoli adheridas a la pared tubular (Fig. 3 D y F), por lo tanto, su diámetro era menor que el de las ratas de los grupos N, C y E 35d (Fig. 3 A, B). En el intersticio testicular de los animales que presentaban lesión se observó un infiltrado linfomononuclear y frecuentemente, la formación de granulomas en las ratas con orquitis severa (Fig. 3 D). Ninguna de las ratas de los grupos N, C y E 35d mostraron alteraciones patológicas de los testículos (Fig. 3 A, B). A partir de este momento las ratas inmunizadas que desarrollaron algún grado de lesión se agruparon bajo el mismo grupo definido como OAE. Las ratas inmunizadas que no desarrollaron orquitis no fueron estudiadas.



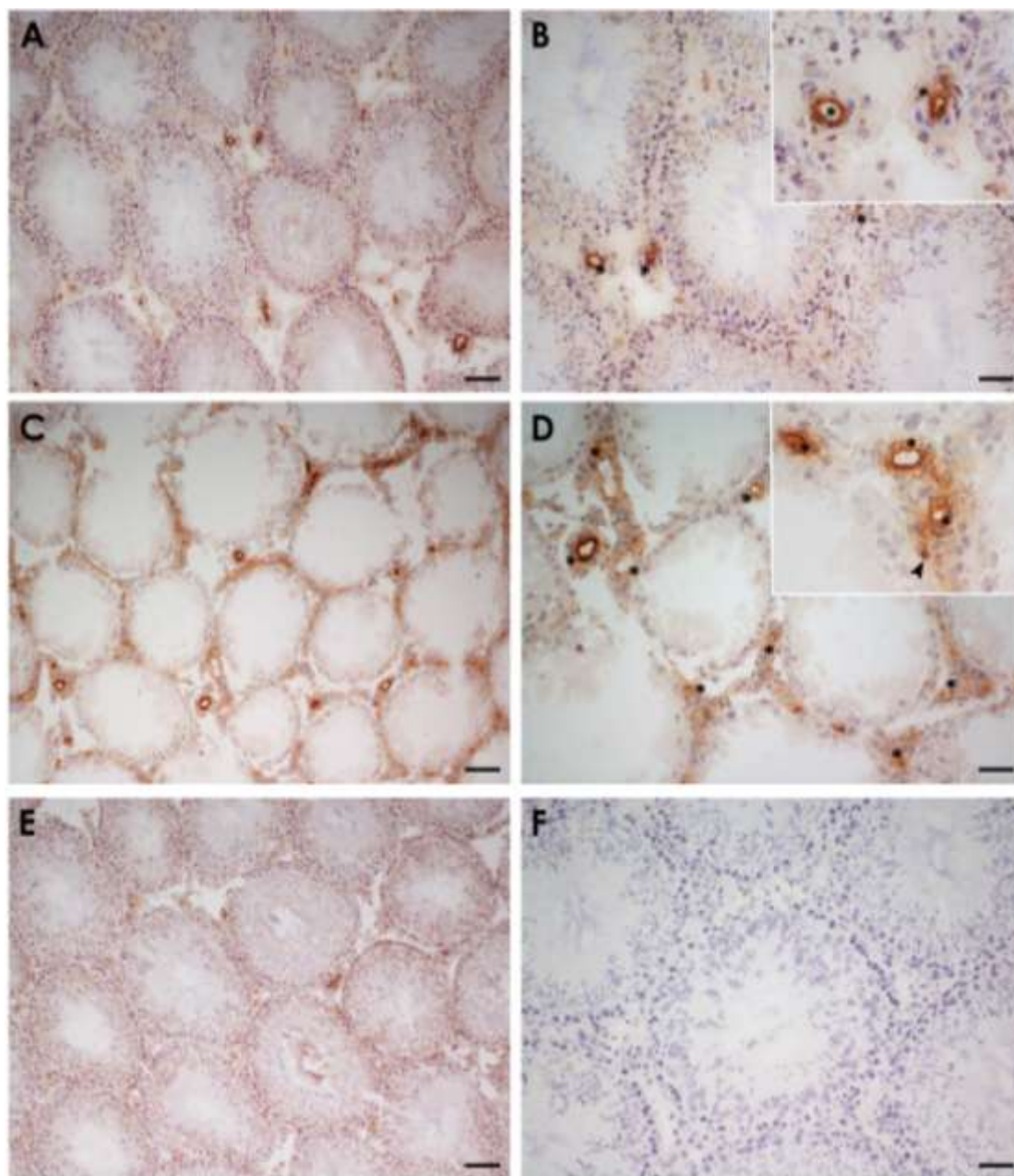
**Figura 3.** *Histopatología testicular.* Microfotografías representativas de cortes de parafina de testículo de ratas de los grupos control (**A**), experimental 35 días (**B**) y con orquitis focal (**C**, **E**) o severa (**D**, **F**). En A y B se observa el epitelio seminífero completo y ausencia de infiltrado intersticial, mientras que en C y E los túbulos seminíferos (TS) se observan con descamación de las células germinales y cuerpos multinucleados de células apoptóticas (punta de flecha). En el intersticio testicular (I) comienza a aparecer un infiltrado linfomonocitario peritubular y perivascular. En D y F los TS se encuentran atrofiados en los cuales solo células de Sertoli y espermatogonias permanecen en la pared tubular. A nivel intersticial el infiltrado se extiende a todo el tejido formando granulomas (GR). Las ratas del grupo normal no difieren del control

---

Tinción con hematoxilina-eosina. La barra corresponde a 100  $\mu\text{m}$  (A, B, C, D) y a 20  $\mu\text{m}$  (E, F).

#### **4.2 Expresión de CD31 y cuantificación de vasos sanguíneos testiculares**

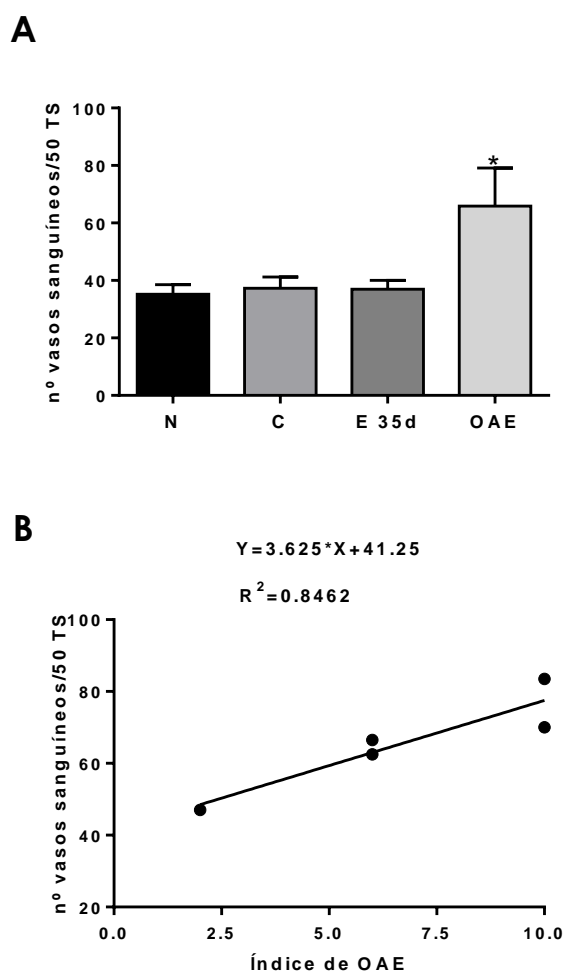
Dado que en ratas con orquitis se ha reportado un aumento en el porcentaje de células endoteliales testiculares CD31+ (Guazzone y col., 2012), se propuso estudiar mediante inmunohistoquímica la expresión de CD31 en cortes de criostato de testículo de ratas de los grupos N, C, E 35d y con OAE. CD31 se detectó en el endotelio de todos los vasos sanguíneos intersticiales desde capilares hasta arterias/venas en todos los grupos estudiados (Fig. 4). Sin embargo, en el grupo OAE se observó una mayor densidad de vasos sanguíneos por campo en comparación con el resto de los grupos estudiados e inmunomarcación en algunas células inmunes mononucleares del intersticio (Fig. 4 C, D).



**Figura 4.** Expresión de CD31 en el testículo. Microfotografías representativas de cortes de criostato de testículo de ratas de los grupos experimental 35 días (**A** y **B**), con orquitis (**C** y **D**) y control (**E**). En A, B, C, D y E se observa inmunomarcación en el endotelio de los vasos sanguíneos intersticiales. Los testículos con orquitis presentan una mayor densidad de vasos sanguíneos por campo correspondientes a la microvasculatura testicular (\*) e inmunomarcación en algunas células inmunes mononucleares del intersticio (punta de flecha negra). (**F**) Control negativo por omisión del anticuerpo primario. Las ratas del grupo normal no difieren del control. Técnica: inmunoperoxidasa. Las barras corresponden a 100  $\mu\text{m}$  (A, C, E) y a 50  $\mu\text{m}$  (B, D, F). Aumento de los insertos en B y D: 40X.



A modo de cuantificar las diferencias observadas por inmunohistoquímica, se realizó un recuento de los vasos sanguíneos CD31+ que componen la red microvascular del testículo. En las ratas del grupo OAE el número de vasos sanguíneos testiculares aumentó significativamente respecto al resto de los grupos de estudiados. No se observaron diferencias significativas entre las ratas de los grupos N, C y E 35d (Fig. 5 A). El índice de OAE correlacionó positivamente con el número de vasos sanguíneos y se ajustó a una regresión lineal con un  $R^2=0.846$  y con una pendiente significativamente distinta de 0 (Fig. 5 B).

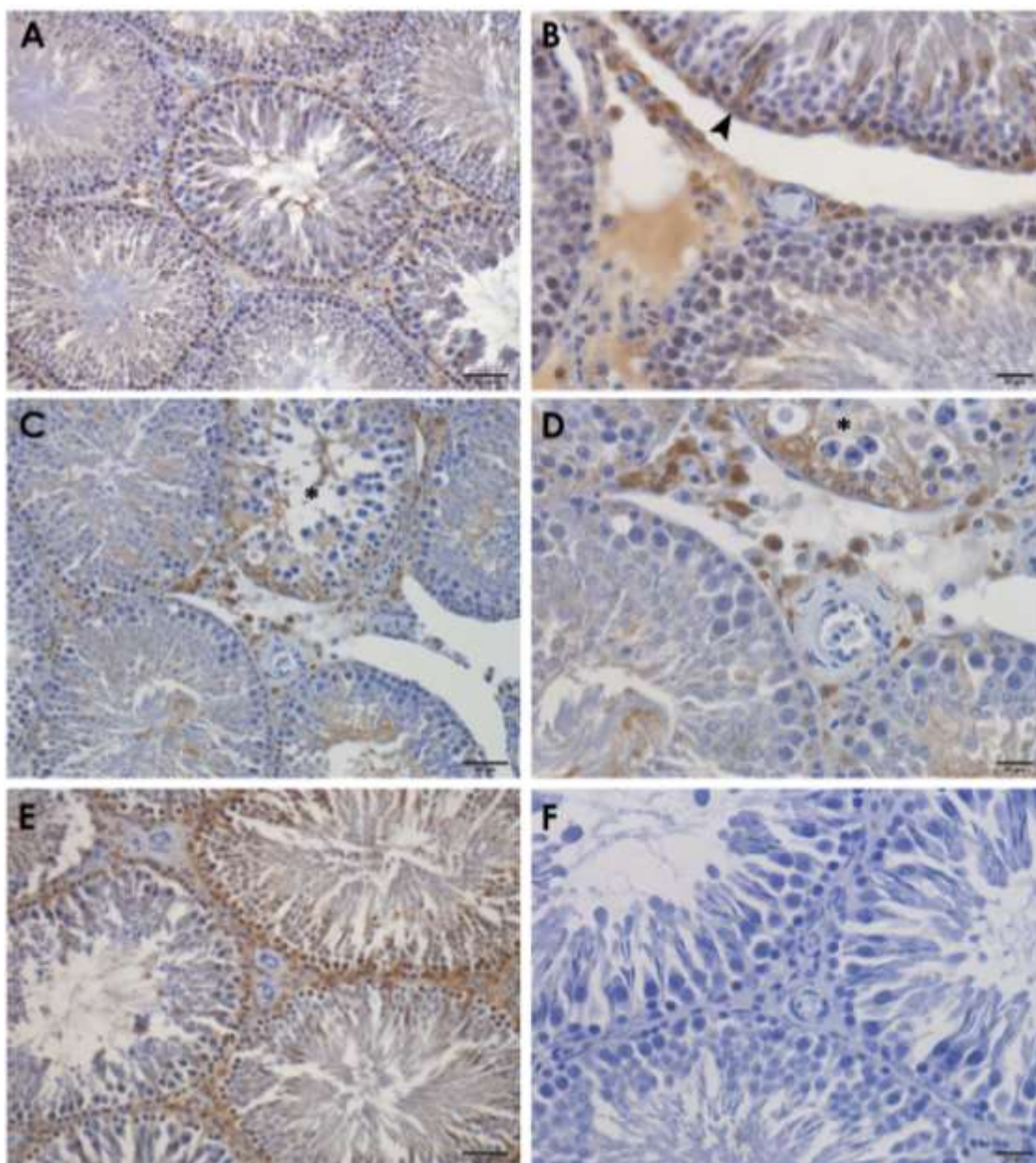


**Figura 5.** Cuantificación de la microvasculatura testicular y relación con la severidad de la orquitis autoinmune experimental (OAE). Recuento de vasos sanguíneos CD31+ en 50 túbulos seminíferos (TS) evaluados en ratas de los grupos normal (N), control (C), experimental (E) 35 días (d) y con OAE (A). Regresión lineal entre el número de vasos sanguíneos CD31+ en 50 TS y el índice de OAE (B) evaluado en ratas del grupo OAE. Las barras representan la media  $\pm$  ES. \* $p \leq 0,05$  vs N, C, E 35d.  $n = 5$  ratas/grupo. La pendiente en el gráfico B es significativamente distinta de 0,  $p \leq 0,05$ .

#### 4.3 Estado de oxigenación testicular

Dado que se ha postulado a la tensión de oxígeno como un posible inductor de la angiogénesis asociada al daño tisular (Wilkinson-Berka y col., 2013); se evaluó el estado de oxigenación del testículo utilizando la tinción con

pimonidazol. En cortes de testículo de ratas de los grupos N, C, E 35d y con orquitis se observó tinción positiva en células de Leydig y células inmunes presentes en el intersticio testicular (Fig. 6). En los TS, el pimonidazol fue detectado principalmente en las células de Sertoli y en el citoplasma de las espermatídes elongadas en cortes de testículo de ratas de los grupos N, C y E 35d (Fig. 6 A, B, E). Por el contrario, en las ratas con orquitis la mayor intensidad de reacción fue detectada en los TS dañados (Fig. 6 C, D).



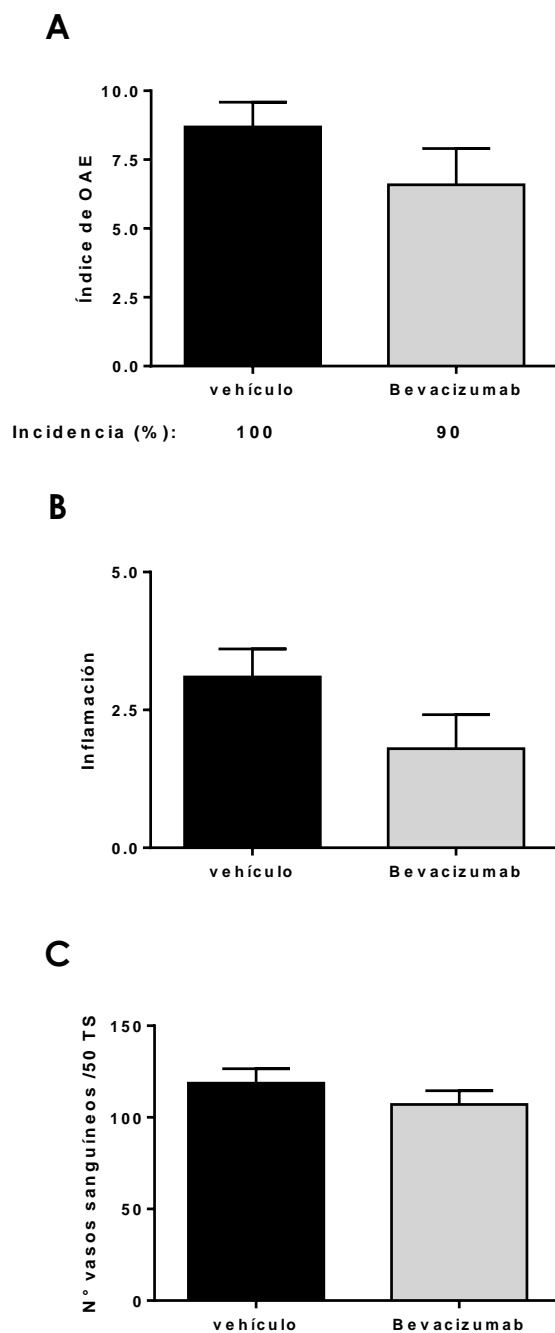
**Figura 6.** Localización de células hipóxicas en el testículo. Microfotografías representativas de cortes de parafina de testículo de ratas de los grupos experimental 35 días (**A, B**), con orquitis (**C, D**) y control (**E**). En A, B y E se observa tinción positiva principalmente en las células de Sertoli (punta de flecha) conteniendo grupos de espermátides elongadas y en algunas células del intersticio testicular. En C y D la marca se observa en el intersticio testicular y en los túbulos seminíferos dañados (\*). (**F**) Control negativo por omisión del Ac primario. La inmunomarcación observada en el testículo de las ratas del grupo normal es similar a la del grupo control. Técnica: inmunoperoxidasa. Las barras corresponden a 50 (A, C, E) y 20  $\mu$ m (B, D, F).

#### 4.4 Inhibición de VEGFA *in vivo*

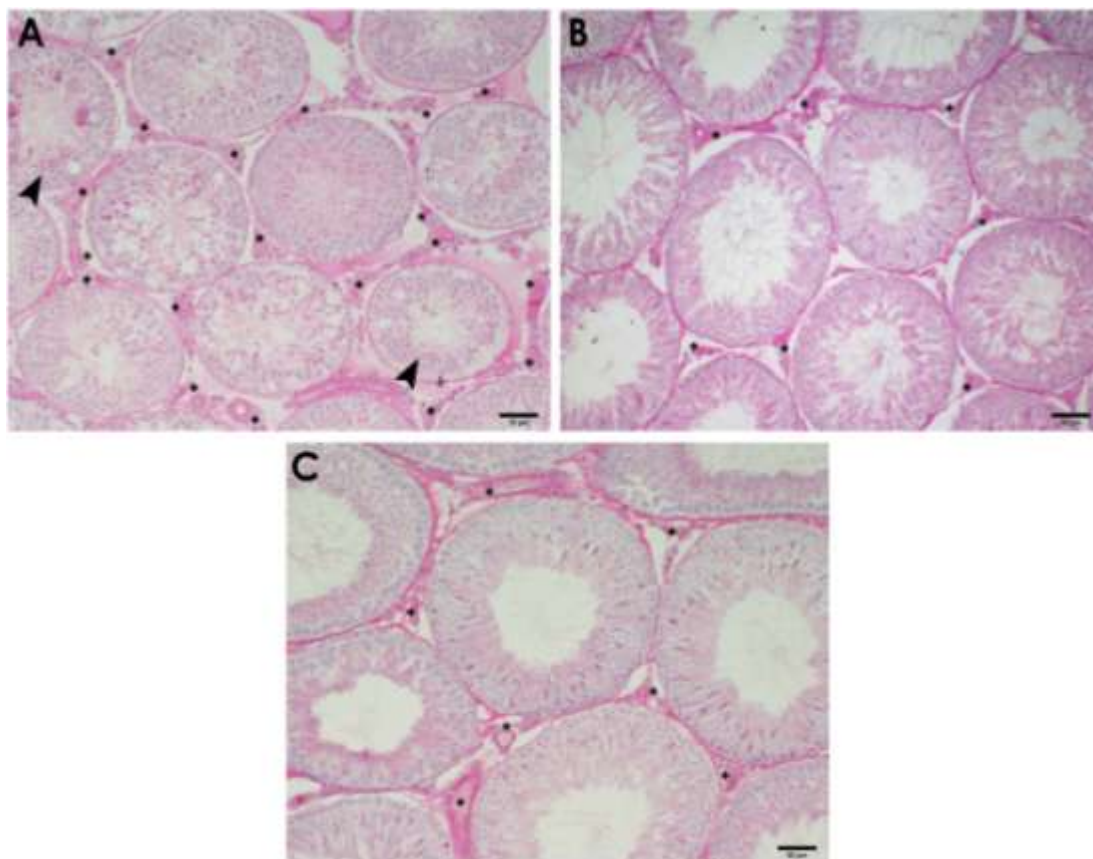
Interesados en conocer si VEGFA está involucrado en el proceso de angiogénesis observado en el testículo durante el desarrollo de la orquitis, se evaluó el efecto de neutralizar su actividad biológica con un Ac específico utilizando dos diseños experimentales distintos.

De acuerdo a lo descrito en “Materiales y Métodos”, en el diseño experimental 1, se administró Bevacizumab o vehículo a partir de los 55d posteriores a la primera inmunización. El análisis histopatológico no reveló diferencias significativas entre los grupo estudiados. La incidencia y la severidad de la OAE, el grado de inflamación, así como, el número de vasos sanguíneos testiculares fueron similares al comparar los grupos Bevacizumab y vehículo (Fig. 7).

Por el contrario, análisis histopatológico de los testículos de las ratas tratadas con el bloqueante del VEGFA a partir de los 30d posteriores a la primera inmunización (diseño experimental 2) mostró que la mayoría de las ratas del grupo Bevacizumab (Fig. 8 B) no presentaba infiltrados intersticiales exhibiendo un epitelio seminífero normal en contraste con las alteraciones histopatológicas de los testículos de las ratas del grupo vehículo que desarrollaron orquitis (Fig. 8 A).



**Figura 7.** Inhibición de VEGFA *in vivo* (diseño experimental 1). Evaluación de la incidencia y la severidad de la orquitis autoinmune experimental (OAE) (A), índice de inflamación testicular (B) y cuantificación de la microvasculatura testicular (C) en ratas inmunizadas para desarrollar OAE e inyectadas con Bevacizumab o vehículo. El recuento de vasos sanguíneos PAS+ se realizó cada 50 túbulos seminíferos (TS). Las barras representan la media  $\pm$  ES. n=10 ratas/grupo.

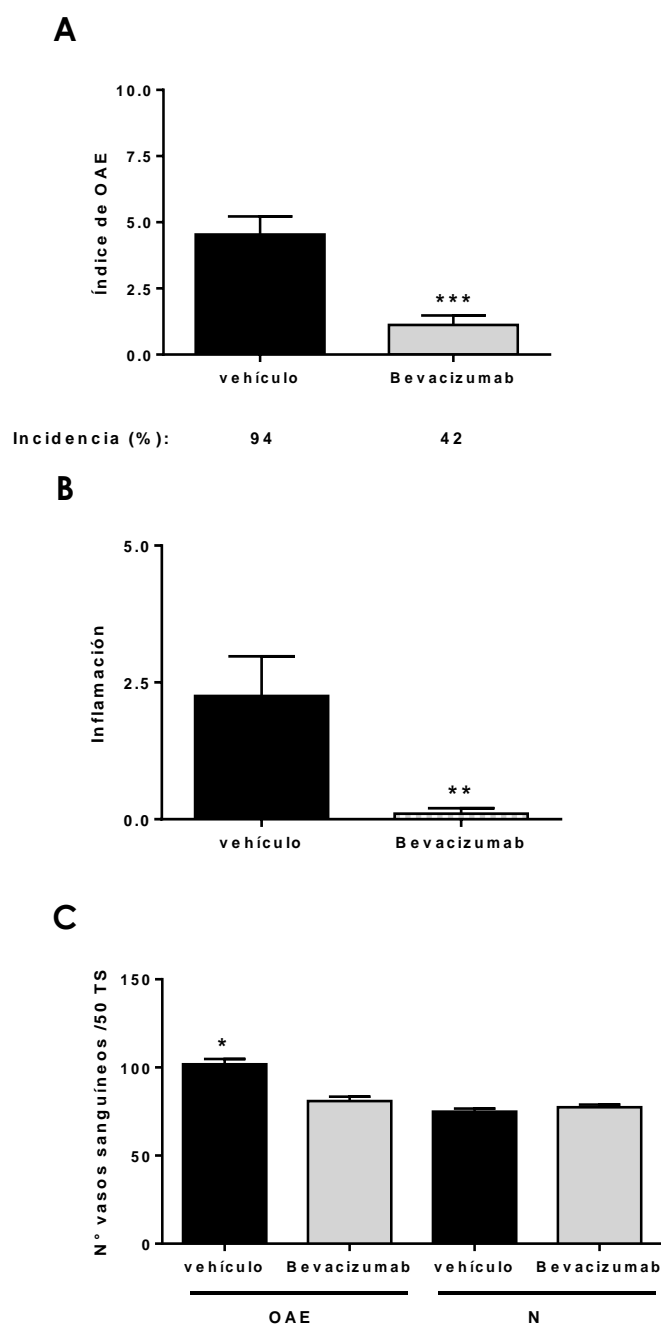


**Figura 8.** *Inhibición de VEGFA in vivo (diseño experimental 2). Histopatología testicular.* Microfotografías representativas de cortes de parafina de testículo de ratas inmunizadas para desarrollar OAE inyectadas con vehículo (**A**) o con Bevacizumab (**B**) y ratas normales sin tratar (**C**). En (A) se observan alteraciones y atrofia de los túbulos seminíferos (punta de flecha) con descamación de las células germinales correspondientes a un testículo lesionado, mientras que en (B) y (C) se observan el epitelio seminífero completo y ausencia de infiltrado. A nivel intersticial el grupo vehículo presenta una mayor densidad de vasos sanguíneos PAS+ pertenecientes a la red microvascular testicular por campo. Tinción con PAS. La barra corresponde a 50 µm.

Al calcular la incidencia y el índice de severidad de la OAE se observó una disminución significativa de ambos parámetros en el grupo Bevacizumab respecto del grupo vehículo así como también un menor grado o ausencia de inflamación (Fig. 9 A, B). Al realizar el recuento del número de vasos testiculares, se observó una disminución significativa en el grupo OAE tratado con Bevacizumab como consecuencia del bloqueo específico de VEGFA (Fig. 9 C).

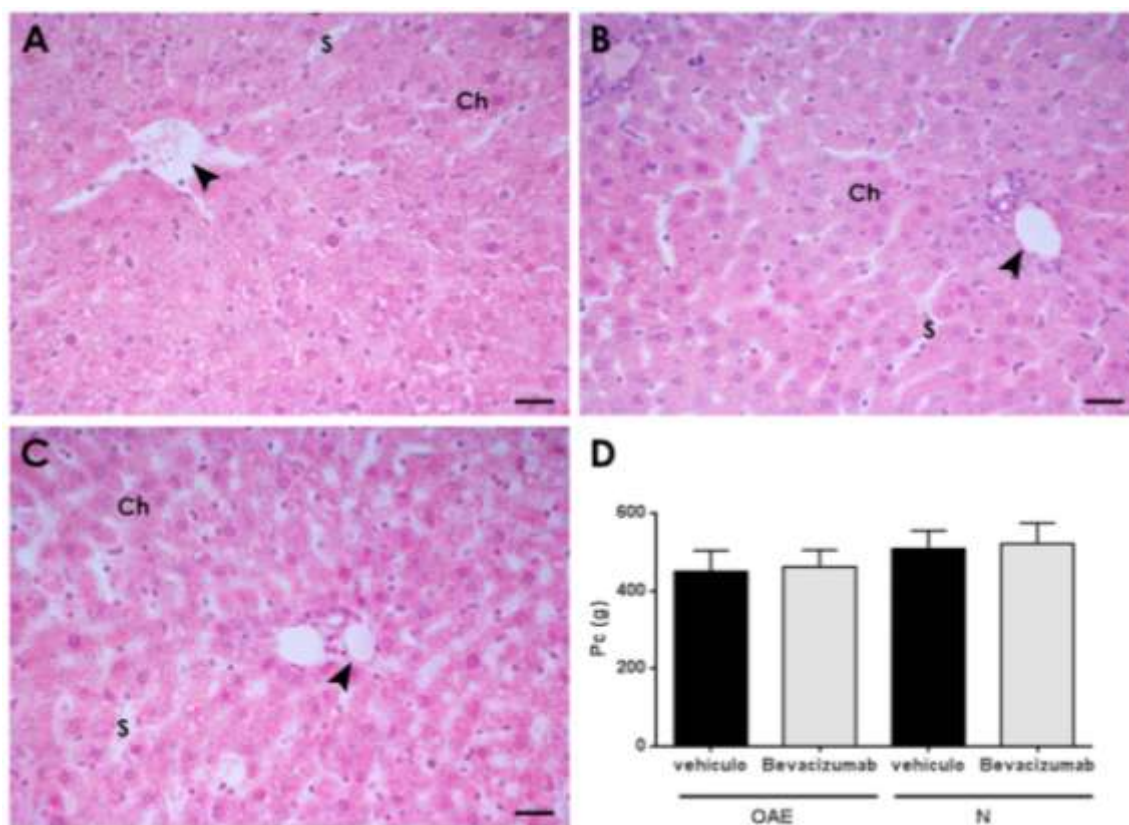
Por otro lado, ratas del grupo N fueron tratadas con Bevacizumab para determinar si el bloqueo de VEGFA fisiológico podía traer consecuencias a nivel de epitelio germinal y de la vasculatura testicular. No se observaron alteraciones histopatológicas del testículo ni del número de vasos sanguíneos intersticiales (Fig. 8 C; Fig. 9 C).





**Figura 9.** Inhibición de VEGFA *in vivo* (diseño experimental 2). Evaluación de la incidencia y la severidad de la orquitis autoinmune experimental (OAE) (**A**) e índice de inflamación testicular (**B**) en ratas inmunizadas para desarrollar OAE e inyectadas con vehículo o Bevacizumab. Cuantificación de la microvasculatura testicular en ratas inmunizadas para desarrollar OAE y ratas normales (N) inyectadas con vehículo o Bevacizumab(**C**). El recuento de vasos sanguíneos PAS+ se realizó cada 50 túbulos seminíferos (TS). Las barras representan la media  $\pm$  ES. \*\*\* $p \leq 0,0005$  vs vehículo; \*\* $p \leq 0,005$  vs vehículo; \* $p \leq 0,05$  vs el resto de los grupos.  $n=10$  ratas/grupo.

Para evaluar posibles efectos adversos del Bevacizumab se estudiaron histopatológicamente muestras de hígado y se comparó el Pc de los animales tratados vs el grupo sin tratar. No se observaron alteraciones en la estructura hepática, las ratas tratadas como las sin tratar presentaron cordones de hepatocitos y sinusoides con morfología y disposición normal (Fig. 10 A, B, C). Los Pc de las ratas del grupo tratado con Bevacizumab fueron similares a los del grupo sin tratar (Fig. 10 D).

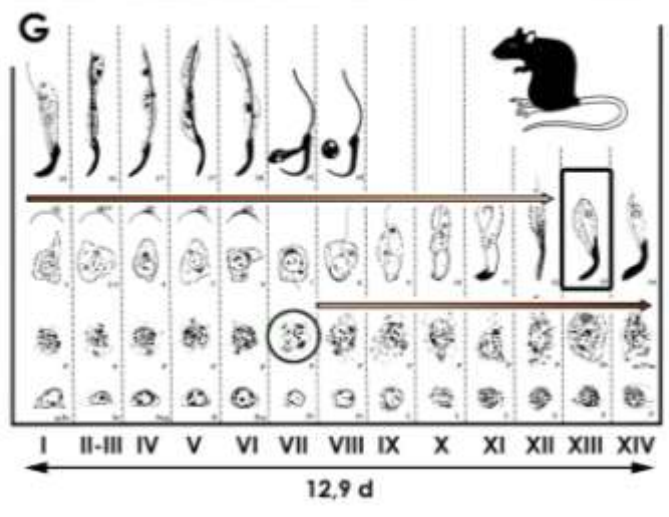
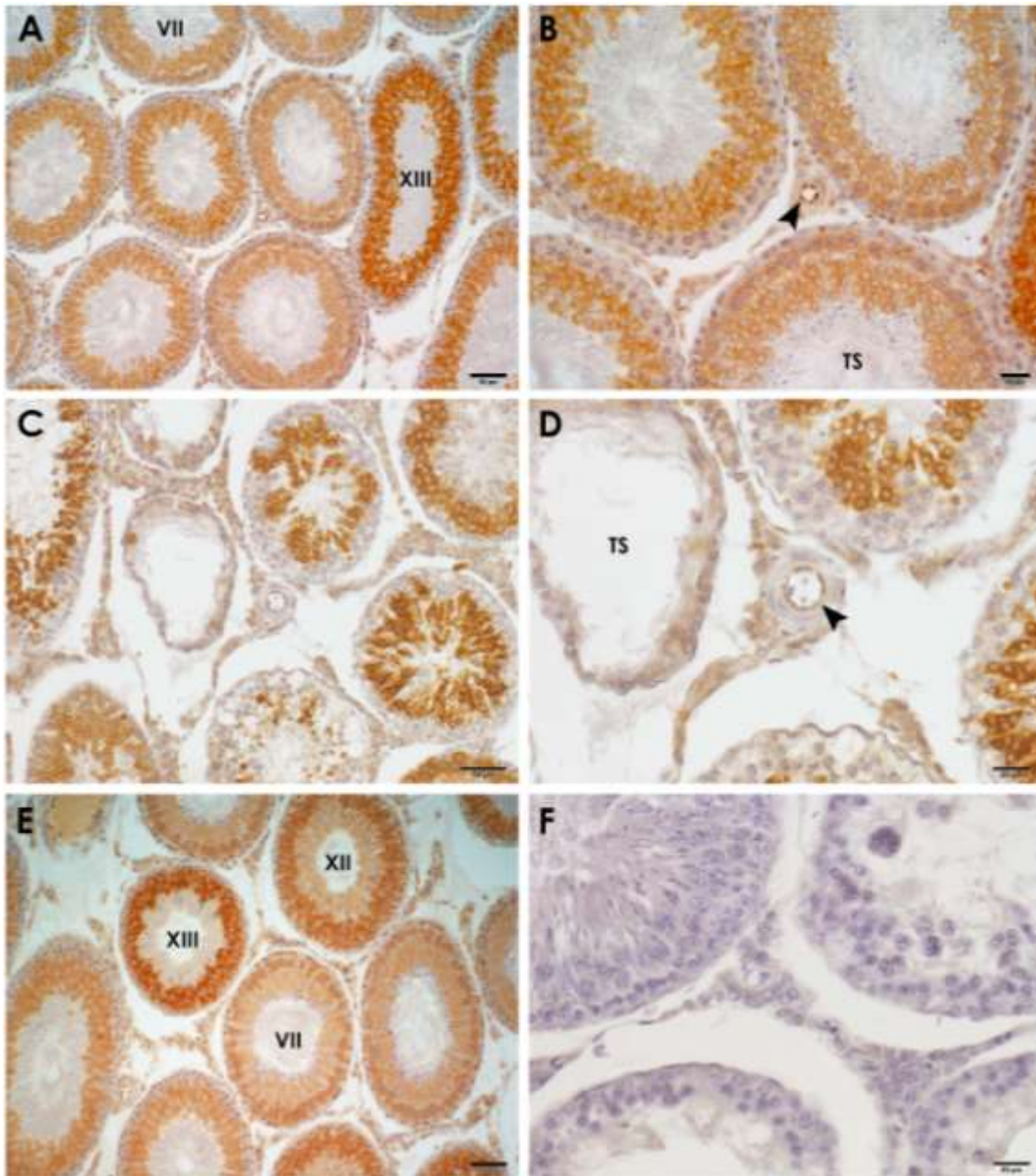


**Figura 10.** Evaluación de la toxicidad del Bevacizumab en el ensayo de inhibición de VEGFA *in vivo* (diseño experimental 2). Histopatología hepática: Microfotografías representativas de cortes de parafina de hígado de ratas inmunizadas para desarrollar orquitis autoinmune experimental (OAE) inyectadas con vehículo (A) o con Bevacizumab (B) y ratas normales (N) sin tratar (C). En los tres grupos estudiados se observan cordones de hepatocitos (Ch) y sinusoides (S) sin alteraciones histopatológicas, así como, vasos sanguíneos (punta de flecha) correspondientes a venas y arterias hepáticas con morfología y disposición normal en las tríadas portales. Tinción con hematoxilina-eosina. La barra corresponde a 20  $\mu$ m. (D) Comparación de los pesos corporales (Pc) al finalizar el tratamiento con Bevacizumab o vehículo. Las barras representan la media  $\pm$  ES. n=10 ratas/grupo.

#### 4.5 Expresión de VEGFA testicular

Considerando los resultados descritos anteriormente que demuestran la relevancia de VEGFA como factor angiogénico durante el desarrollo de la OAE, se propuso estudiar su expresión en el testículo.

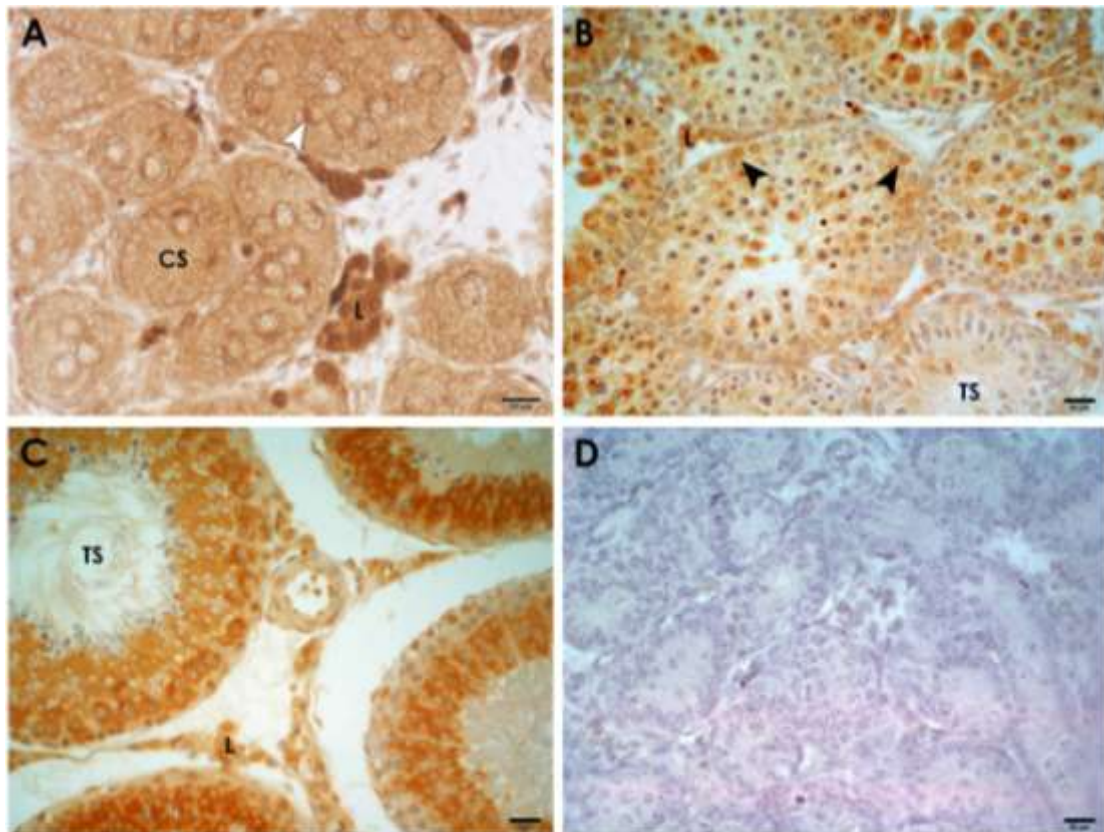
Mediante la técnica de inmunoperoxidasa se evaluó su localización en cortes de parafina de testículo de ratas de los grupos N, C, E 35d y OAE. La expresión de VEGFA fue observada en todos los grupos de ratas estudiados, principalmente en el epitelio germinal de los TS con una intensidad variable de acuerdo al tipo celular y al estadio del ciclo de la espermatogénesis (Fig. 11 A, B, E). La intensidad del producto de reacción fue mínima en espermátocitos en paquitene del estadio VII y se fue incrementando hasta hacerse máxima en espermátocitos diploténicos del estadio XIII. Luego la marca comienza a disminuir su intensidad en las siguientes células de la línea germinal hasta hacerse negativa en espermátidas elongadas del estadio XIII (Fig. 11 E, G). No se observaron diferencias en la localización de VEGFA entre las ratas de los grupos N, C y E 35d. En las ratas con OAE, el grado de expresión en los TS disminuyó como consecuencia de la descamación de CG característica de este cuadro (Fig. 11 C, D). Las células de Sertoli fueron negativas para esta técnica en todos los grupos de ratas estudiados. En el intersticio testicular, VEGFA se expresó en el endotelio de algunos vasos sanguíneos, principalmente en arterias y arteriolas, en células de Leydig y en células mononucleares con morfología tipo macrófago (Fig. 11 B, D).



**Figura 11.** *Expresión de VEGFA en el testículo.* Microfotografías representativas de cortes de parafina de testículo de ratas de los grupos experimental 35 días (d) (**A, B**), con orquitis (**C, D**) y control (**E**). En (A), (B), (C), (D) y (E) se observa inmunomarcación en el endotelio de algunas arteriolas (punta de flecha), en células del intersticio y en los túbulos seminíferos (TS) siguiendo un patrón determinado por los estadios de desarrollo espermático en rata (I al XIV) en un ciclo de 12,9 d (modificado a partir de esquema de Russel y col., 1990; **G**). El círculo marca el tipo celular donde aparece la marca (espermatozoides en paquitene del estadio VII) y el rectángulo donde desaparece (espermátides elongadas del estadio XIII). La flecha marrón indica la dirección en la que se intensifica la marca haciéndose máxima en los espermatozoides diplotémicos del estadio XIII. (**F**) Control negativo por omisión del anticuerpo primario. La expresión de VEGFA en testículo de ratas del grupo normal fue similar a la observada en ratas del control. Técnica: inmunoperoxidasa. Las barras corresponden a 50  $\mu\text{m}$  (A, C, E) y a 20  $\mu\text{m}$  (B, D, F).

Dado que se ha reportado la expresión de VEGFA en células de Sertoli adultas bovinas, humanas y murinas (Caires y col., 2009; Ergün y col., 1997; Nalbandian y col., 2003) y en células de Sertoli de rata en las primeras semanas de vida (Baltes-Breitwisch y col., 2010), se quiso evaluar si la ausencia de tinción en las ratas adultas estudiadas se debía a una limitación técnica o a una expresión diferencial de VEGFA dependiente del desarrollo testicular. Mediante la técnica de inmunoperoxidasa y siguiendo el protocolo ya descrito se estudió VEGFA en cortes de parafina de ratas de 3 y 21 d de edad (Pre-púber). Se observó una inmunomarcación positiva difusa para VEGFA en el citoplasma de las células de Sertoli que forman los cordones seminíferos, siendo más intensa en el citoplasma de los gonocitos a los 3d (Fig. 12 A). En las ratas pre-púberes la tinción comienza a tomar el patrón observado en las adultas alcanzando su máxima expresión en las CG más diferenciadas (espermatozoides en paquitene) ubicadas hacia la luz de los TS. Sin embargo, contrariamente a

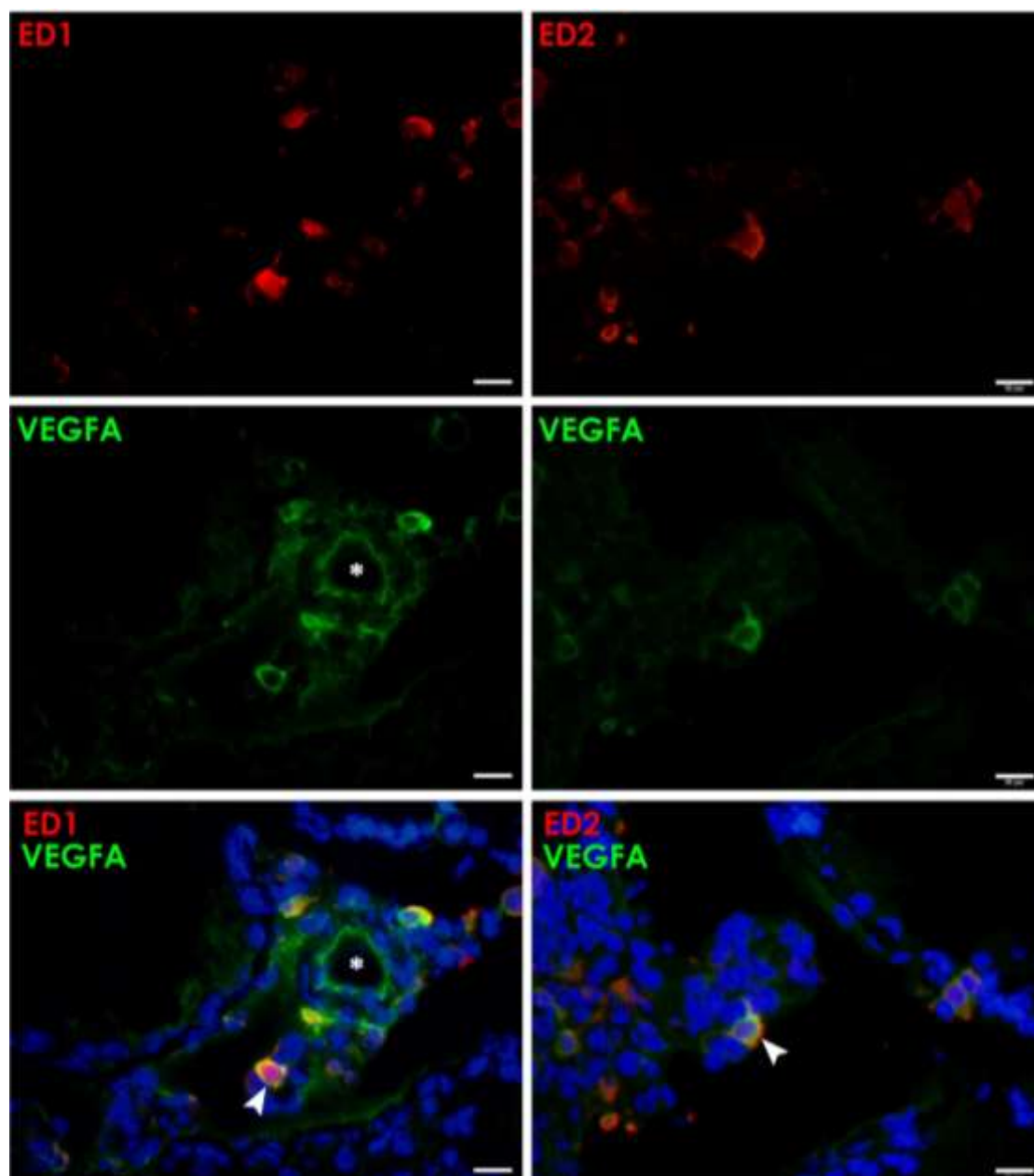
lo observado los testículos de ratas adultas, algunas células de Sertoli fueron positivas para VEGFA (Fig. 12 B). En el intersticio testicular, se observó una tinción muy intensa en las células de Leydig de las ratas de 3d, que fue disminuyendo en los testículos de pre-púberes y adultas (Fig. 12 C). Los vasos sanguíneos fueron negativos en los tiempos previos a la adultez.



**Figura 12.** Expresión de VEGFA durante el desarrollo testicular de la rata. Microfotografías representativas de cortes de parafina de testículo de ratas normales de 3 **(A)**, 21 (pre-púber) **(B)** y 50 (adulto) días **(C)** de edad. VEGFA se localiza en los gonocitos (punta de flecha blanca) de los cordones seminíferos (CS), en algunas células de Sertoli (punta de flecha negra) y en las células de Leydig (L) agrupadas en el intersticio testicular. A lo largo del crecimiento la marca de las células germinales se hace estadio dependiente y la marca en células de Sertoli desaparece en los animales adultos. **(D)** Control negativo por omisión del anticuerpo primario. TS: túbulo seminífero. Técnica: inmunoperoxidasa. Las barras corresponden a 20  $\mu\text{m}$ .



Por otro lado, a efectos de identificar si los macrófagos podrían ser las células mononucleares del intersticio testicular que expresan VEGFA, se realizó una técnica de inmunofluorescencia doble sobre cortes de criostato obtenidos de testículo de animales con orquitis en los cuáles se ha reportado un aumento en el número de células ED1+ y ED2+ (Suescun y col., 2003). Los macrófagos testiculares fueron identificados utilizando los anticuerpos ED2 y ED1, específicos de macrófagos residentes y monocitos provenientes de la circulación, macrófagos y CD, respectivamente. Se observó co-localización para ambos marcadores sugiriendo que tanto las células ED1+ como ED2+ expresan VEGFA (Fig. 13).

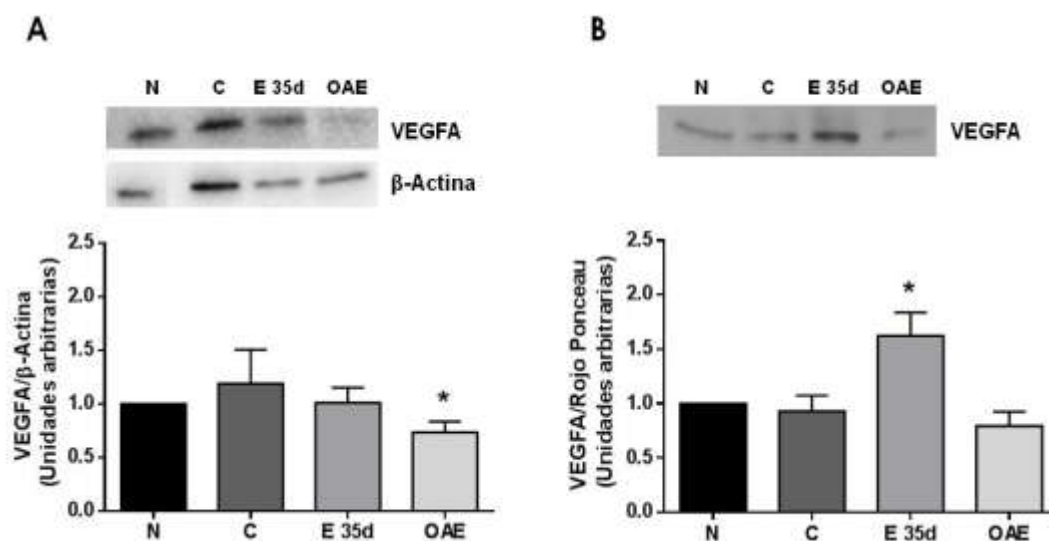


**Figura 13.** Expresión de VEGFA en macrófagos testiculares ED1 y ED2 positivos (punta de flecha). Cortes de crióstato de testículo de ratas con orquitis inmunomarcados con VEGFA, ED1 y ED2. Además de la co-localización de los marcadores, puede verse la expresión de VEGFA en el endotelio de una arteriola (\*). NEG: control negativo por omisión del anticuerpo primario. Técnica: inmunofluorescencia doble. Las barras corresponden a 20  $\mu\text{m}$ .

---

Luego de confirmarse la expresión y distribución de VEGFA en el testículo de ratas adultas, se estudió mediante la técnica de *Western Blot* la expresión de VEGFA en el testículo de ratas de los grupos N, C, E 35d y con OAE. El análisis densitométrico mostró una disminución significativa de la expresión de VEGFA en el homogenado testicular proveniente de ratas con OAE respecto a las ratas de los grupos N, C y E 35d, no observándose diferencias significativas entre estos últimos tres grupos (Fig. 14 A).

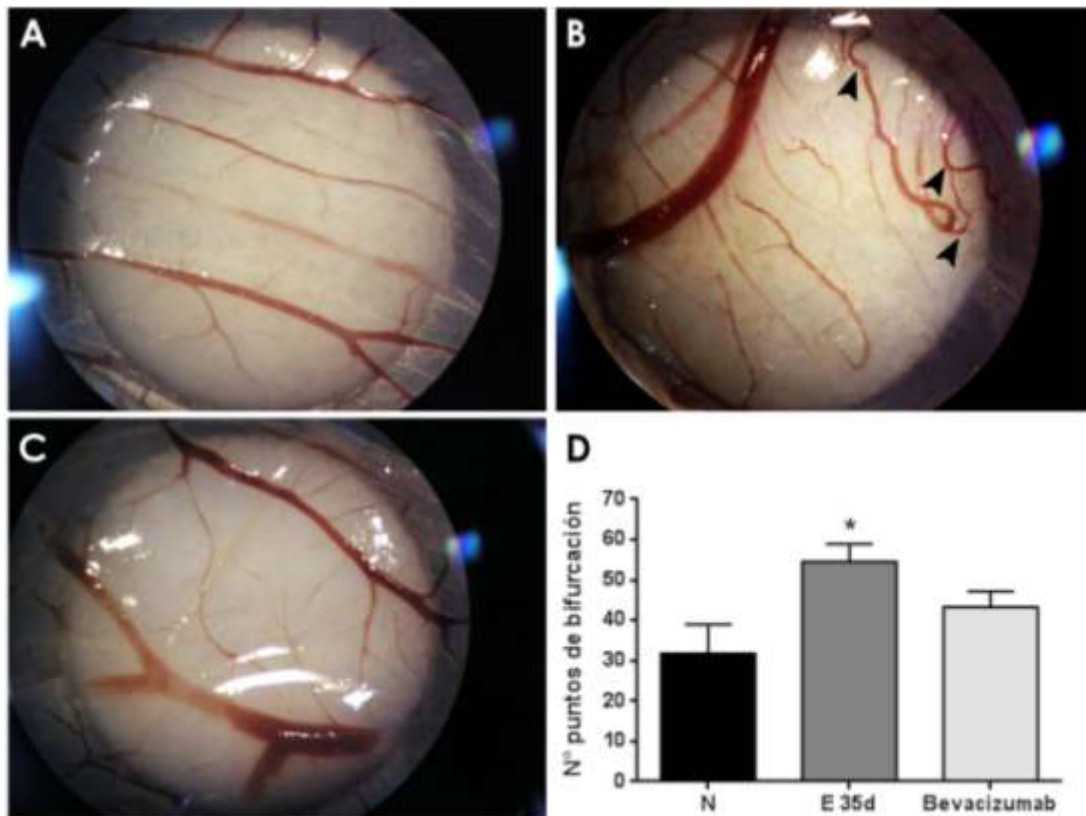
Dado los resultados previamente descritos y considerando que el aporte de los TS al contenido total del VEGFA testicular podría estar enmascarando cambios a nivel de las secreciones por parte de las CE e intersticiales, se decidió estudiar su expresión en el FT el cual resulta más representativo en cuanto a las secreciones del compartimento intersticial (Sharpe y col., 1984). Se observó un aumento significativo en el contenido de VEGFA en las ratas del grupo E 35d respecto a las ratas de los grupos N, C y OAE, no observándose diferencias entre estos últimos tres grupos (Fig. 14 B). Al analizar histopatológicamente el testículo contralateral a los 55d, se comprobó que las ratas del grupo E 35d que tenían alto contenido de VEGFA testicular desarrollaron OAE.



**Figura 14.** Expresión de VEGFA en testículo. Western Blots representativos y resultados semi-cuantitativos del contenido de VEGFA (21 kDa) en homogenados (**A**) y fluidos testiculares (**B**) provenientes de ratas de los grupos normal (N), control (C), experimental (E) 35 días (d) y con orquitis (OAE). Las barras representan la media  $\pm$  ES, \* $p \leq 0,05$  vs el resto de los grupos.  $n=8$  ratas/grupo.

#### 4.6 Medición *in vivo* de la respuesta angiogénica de los fluidos testiculares

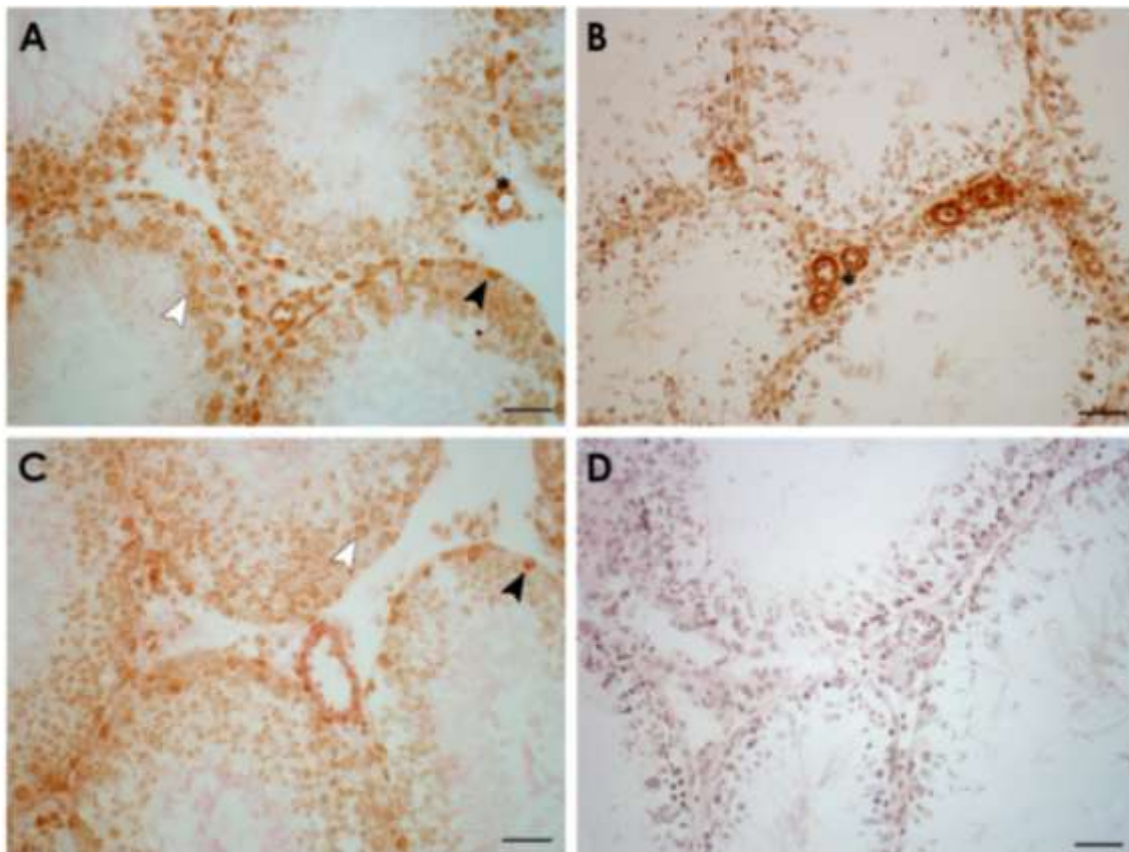
Habiendo detectado valores elevados de VEGFA en los FT de ratas E 35d se propuso evaluar la capacidad angiogénica *in vivo* de estas muestras sobre las MCA siguiendo la metodología previamente descrita. Para ello las MCA fueron incubadas con FT provenientes de ratas de los grupos N y E 35d en presencia o ausencia de Bevacizumab. La evaluación morfométrica mostró una mayor densidad vascular en las MCA incubadas con FT de ratas del grupo E 35d en comparación con las incubadas con FT de ratas N (Fig. 15 B). El aumento en el número de puntos de bifurcación se atenúa al pre-incubar los FT con Bevacizumab (Fig. 15 D).



**Figura 15.** Respuesta angiogénica *in vivo*. Fotografías representativas de membranas corioalantoideas de codorniz incubadas con fluidos testiculares provenientes de ratas de los grupos normal (N) (A), experimental (E) de 35 días (d) (B) y E 35d en presencia de Bevacizumab (C). En B se observan vasos sanguíneos contorneados formando figuras típicas en respuesta a estímulos angiogénicos (punta de flecha). (D) La cuantificación de la densidad vascular fue calculada como puntos de bifurcación de los vasos sanguíneos por área ( $19,62 \text{ mm}^2$ ). Aumento: 35X. Las barras representan la media  $\pm$  ES,  $*p \leq 0,05$  vs el resto de los grupos.  $n=4$  ratas/grupo.

#### 4.7 Expresión de HIF1a

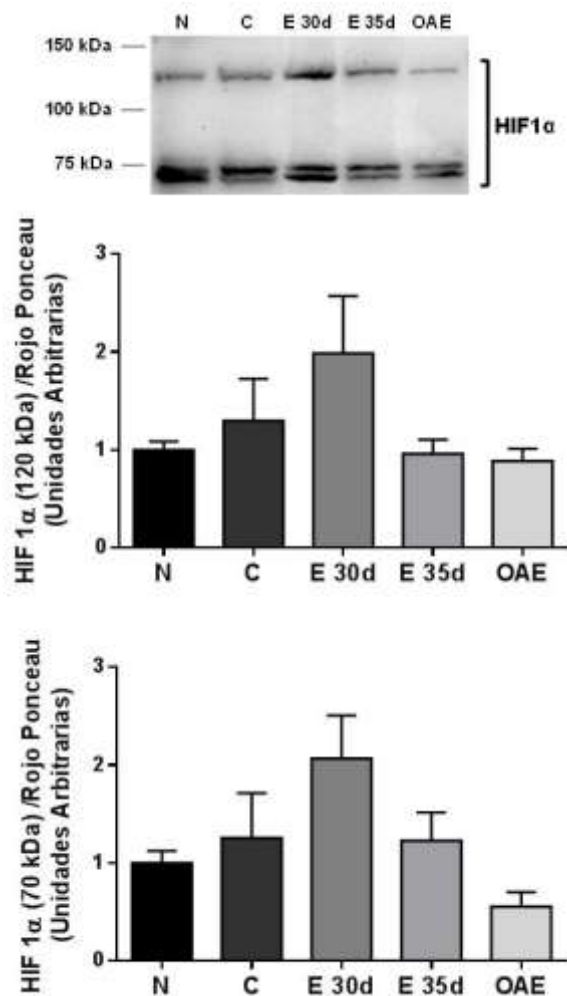
Dado que HIF1a es un factor con la capacidad de modular la transcripción de VEGFA y otros factores pro-angiogénicos (Kim y col., 2013), se evaluó su expresión durante el desarrollo de la OAE. Mediante la técnica de inmunoperoxidasa, la expresión de HIF1a fue observada en CG (principalmente en espermatoцитos del compartimento adluminal) y en células de Sertoli de ratas de los grupos N, C y E 35d (Fig. 16 A, C). En el grupo OAE la marca en los TS disminuyó producto de la descamación de CG, además de perderse la expresión por parte de las células de Sertoli (Fig. 16 B). En el intersticio testicular, HIF1a se localizó en las CE y en la túnica media de los vasos sanguíneos testiculares de todos los grupos de ratas estudiados (Fig. 16).



**Figura 16.** Expresión de HIF1 $\alpha$  en el testículo. Microfotografías representativas de cortes de crióstato de testículo de ratas de los grupos experimental 35 días (**A**), con orquitis (**B**) y control (**C**). En (A) y (C) se observa inmunomarcación positiva para HIF1 $\alpha$  en los espermatocitos (punta de flecha blanca) y células de Sertoli (punta de flecha negra) de los túbulos seminíferos. En intersticio testicular, la inmunomarcación positiva se observa en los vasos sanguíneos (\*) de de los 3 grupos estudiados. (**D**) Control negativo por omisión del anticuerpo primario. La expresión de HIF1 $\alpha$  en testículo de ratas del grupo normal es similar a la observada en ratas del grupo control. Técnica: inmunoperoxidasa. Las barras corresponden a 50  $\mu$ m.

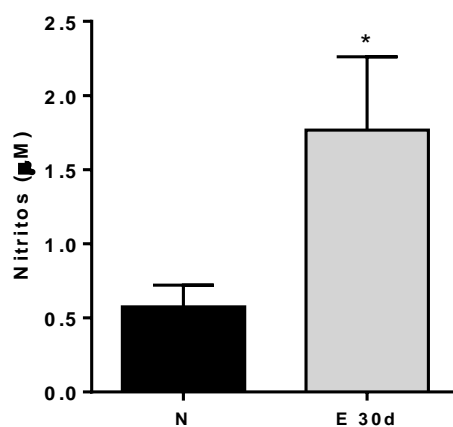
Luego se realizó una evaluación semi-cuantitativa del contenido de HIF1a en todos los grupos estudiados. Mediante la técnica de *Western Blot* se determinó la expresión de HIF1a en extractos nucleares de homogenados de testículo de ratas de los grupos N, C, E 30d, E 35d y con OAE. El grupo E 30d fue estudiado a efectos de evaluar HIF1a en un tiempo previo al tiempo en el cual se detectó el mayor contenido de VEGFA. El análisis densitométrico de la bandas correspondiente a las dos isoformas de HIF1a estudiadas (70 y 120 kDa) no mostró diferencias significativas para ninguno de los grupos experimentales, sin embargo cabe destacar una tendencia a valores aumentados de HIF1a en las ratas E 30d (Fig. 17).





**Figura 17.** Expresión de *HIF1α* en testículo. Western Blot representativo y resultados semi-cuantitativos del contenido de *HIF1α* en extractos nucleares de homogenado testicular de ratas de los grupos normal (N), control (C), experimental (E) de 30 días (d), 35d y con orquitis (OAE). Las barras representan la media  $\pm$  ES.  $n=10$  ratas/grupo.

Teniendo como antecedente que el ON estabiliza e induce la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  (Sumbayev y col., 2007), y que éste tiende a aumentar en las ratas del grupo E 30d, se midió el contenido de nitritos en homogenados testiculares de ratas de los grupos N y E 30d. Los nitritos son productos finales de la oxidación del ON y poseen una estabilidad molecular mayor, por lo tanto pueden ser medidos en diferentes tejidos como estimadores de la formación total de ON. Acorde a lo esperado la concentración de nitritos fue significativamente mayor en las ratas del grupo E 30d respecto a las ratas N (Fig. 18).

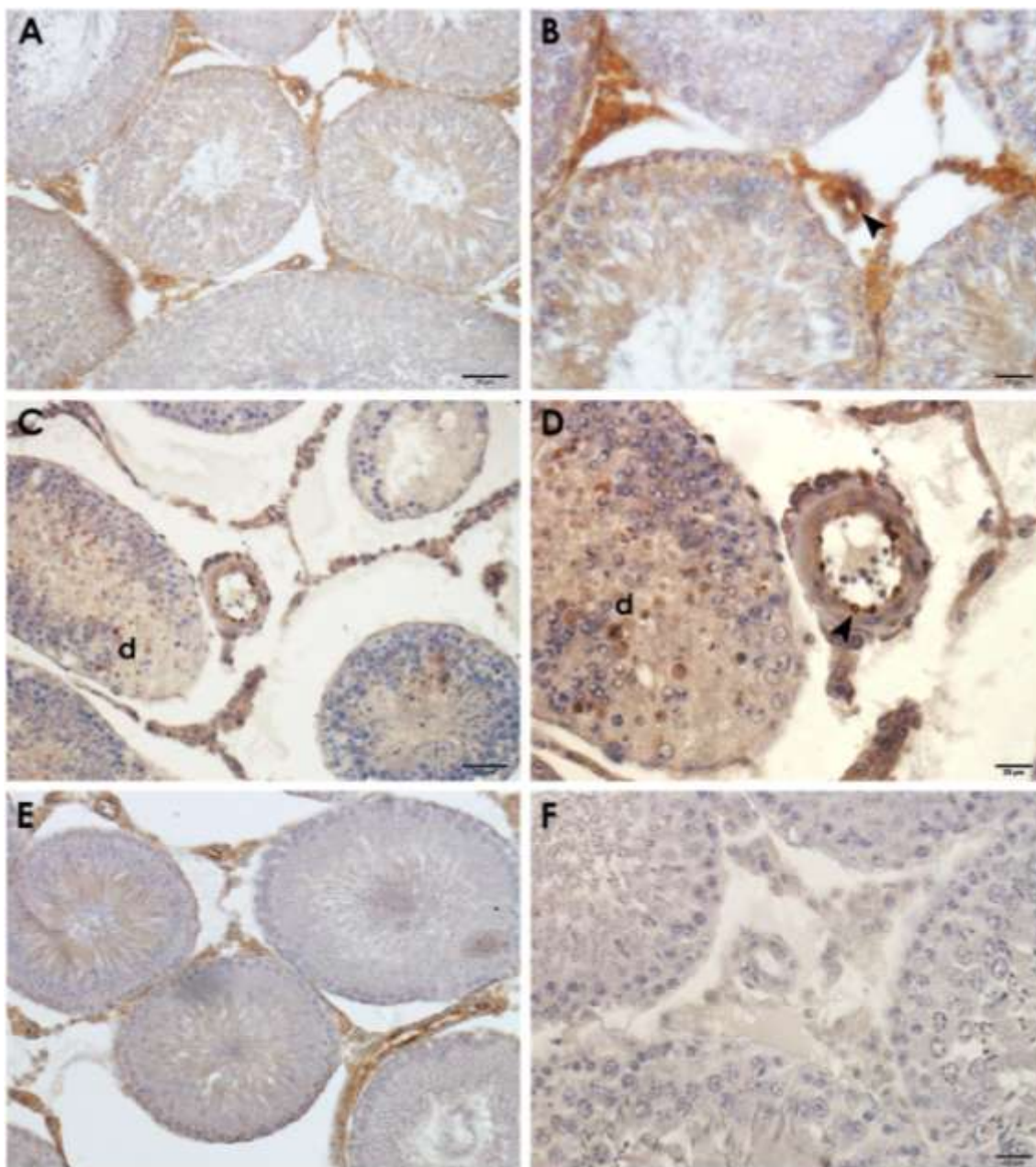


**Figura 18.** *Contenido de nitritos en el testículo.* Concentración de nitritos medidos en homogenado testicular de ratas de los grupos normal (N) y experimental (E) 30 días (d). Se observa un aumento significativo en el contenido de nitritos en el grupo E 30d respecto a los N. Las barras representan la media  $\pm$  ES. \* $p \leq 0,05$  vs N.  $n=10$  ratas/grupo.

#### 4.8 Expresión de los VEGFRs en testículo

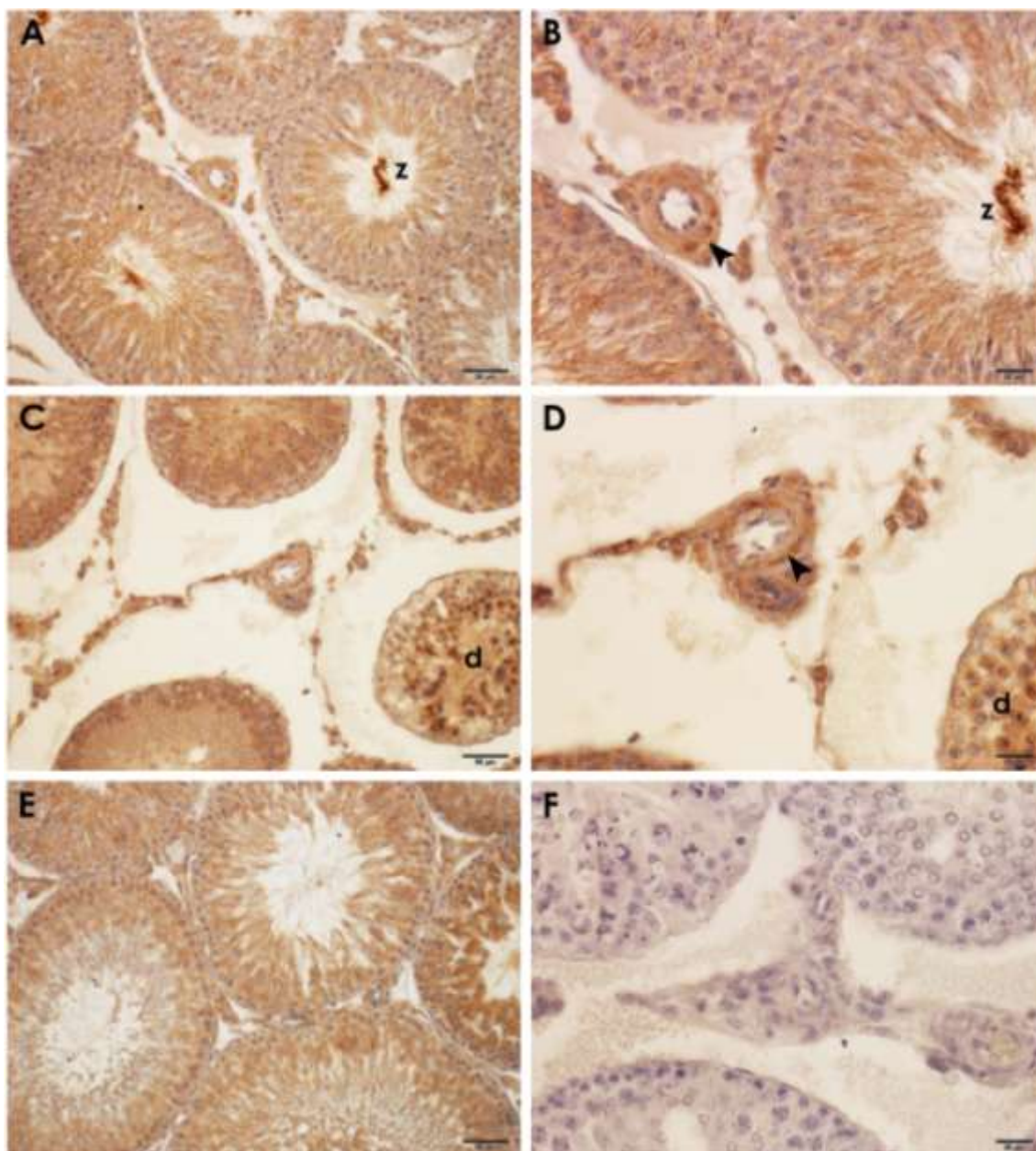
Adicionalmente, se estudió la expresión de los receptores específicos de VEGFA, VEGFR1 y VEGFR2. Mediante la técnica de inmunoperoxidasa se evaluó

su localización en cortes de parafina de testículo de ratas de los grupos N, C, E 35d y OAE. A nivel de los TS, el epitelio germinal presentó una leve tinción para VEGFR1 que se intensificó en las células en degeneración en animales con OAE (Fig. 19 C, D). Se observó inmunomarcación específica intensa para este receptor a nivel del compartimiento intersticial en las células de Leydig, a nivel de la túnica íntima en las CE de algunos capilares, arteriolas y arterias medianas; y en menor medida en las células con morfología tipo macrófago (Fig. 19 A, B, C, D, E). Si bien no se observaron diferencias en la localización tisular, la intensidad de la marca disminuyó a nivel intersticial en el grupo OAE vs los grupos N, C y E 35d (Fig. 19 C, D).



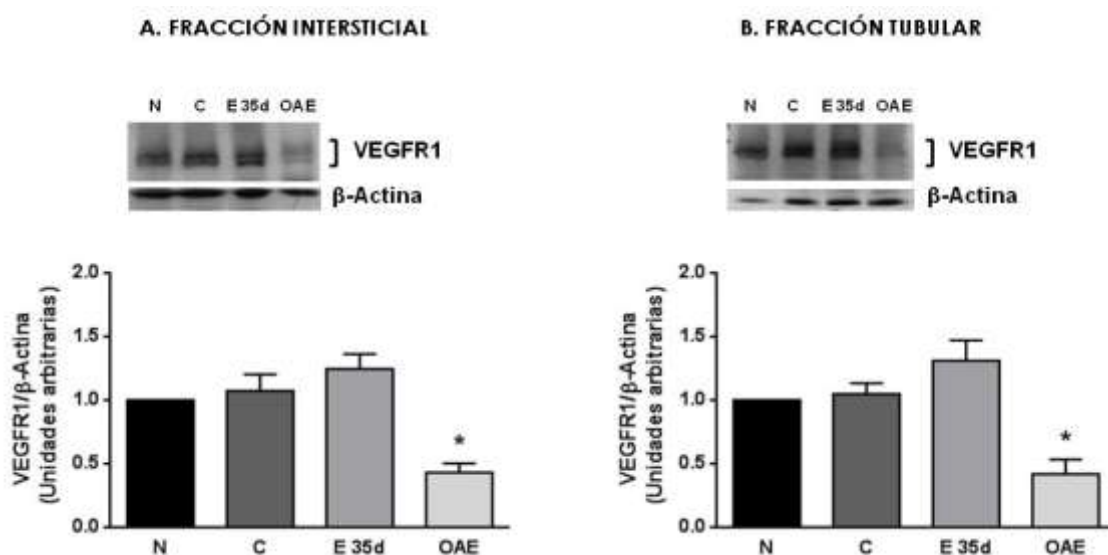
**Figura 19.** Expresión de VEGFR1 en el testículo. Microfotografías representativas de cortes de parafina de testículo de rata de los grupos experimental 35 días (**A**, **B**), con orquitis (**C**, **D**) y control (**E**). En A, B, C, D y E VEGFR1 se localiza en células endoteliales de pequeñas y medianas arteriolas (punta de flecha), y en células del intersticio. Las células germinales presentan una tinción leve que se acentúa en las células que se descaman en la orquitis (d) (D). Si bien la localización celular no cambia, la intensidad de la marcación a nivel intersticial disminuye en (C) y (D). (**F**) Control negativo de la técnica por omisión del anticuerpo primario. Las ratas del grupo normal no difieren del control. Técnica: inmunoperoxidasa. Las barras corresponden a 50 (A, C, E) y 20  $\mu$ m (B, D, F).

Al estudiar la expresión del VEGFR2 se observó inmunomarcación en el intersticio testicular correspondiente a células de Leydig y células con morfología tipo macrófago, además este receptor se localizó en las fibras musculares lisas de la túnica media de arteriolas y arterias pequeñas y medianas (Fig. 20 A, B, C, D, E). En los TS, se observó marca en CG principalmente en colas de espermatozoides y células en degeneración en el grupo OAE (Fig. 20 C, D). Esta expresión fue similar entre los distintos grupos estudiados (Fig. 20).



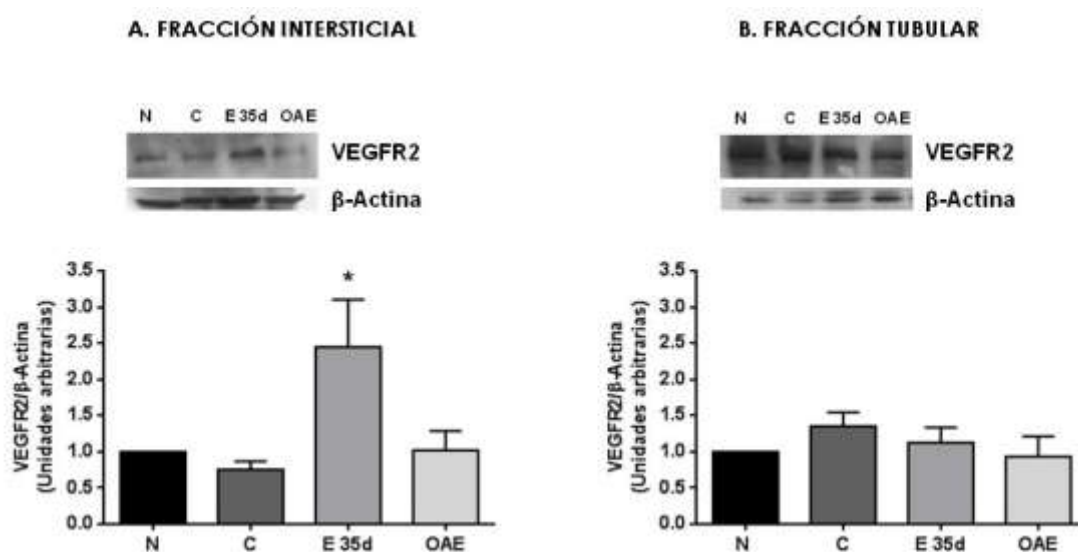
**Figura 20.** Expresión de VEGFR2 en el testículo. Microfotografías representativas de cortes de parafina de testículo de rata de los grupos experimental 35 días (**A, B**) con orquitis (**C, D**) y control (**E**). En A, B, C, D y E se observa tinción positiva para VEGFR2 en fibras musculares lisas de la túnica media de pequeñas y medianas arteriolas (\*), en células del intersticio y en células germinales, principalmente en colas de espermatozoides (z) y células en degeneración (d). (**F**) Control negativo de la técnica por omisión del anticuerpo primario. Las ratas del grupo normal no difieren del control. Técnica: inmunoperoxidasa. Las barras corresponden a 50 (A, C, E) y 20  $\mu$ m (B, D, F).

Mediante la técnica de *Western Blot* se analizó el contenido de VEGFR1 y VEGFR2 en las fracciones tubular e intersticial del testículo de ratas de los grupos estudiados previamente. El análisis densitométrico de las bandas correspondientes a VEGFR1 mostró una disminución significativa en las ratas con OAE tanto en la fracción intersticial como en la fracción tubular en comparación con el contenido del receptor en las ratas de los grupos N, C y E 35d (Fig. 21).



**Figura 21.** Expresión de VEGFR1 en testículo. *Western Blots* representativos y resultados semi-cuantitativos del contenido de VEGFR1 (180-190 kDa) en las fracciones intersticial (A) y tubular (B) del testículo de de ratas de los grupos normal (N), control (C), experimental (E) 35 días (d) y con orquitis (OAE) relativizadas a β-Actina (42 kDa). Las barras representan la media ± ES, \* $p \leq 0,005$  vs el resto de los grupos.  $n=10$  ratas/grupo.

Al estudiar el contenido de VEGFR2 se observó un aumento significativo en las ratas del grupo E 35d respecto a los grupos N, C y OAE en la fracción intersticial (Fig. 22 A). Al analizar la fracción tubular no se observaron diferencias en el contenido del receptor entre los grupos estudiados (Fig. 22 B).

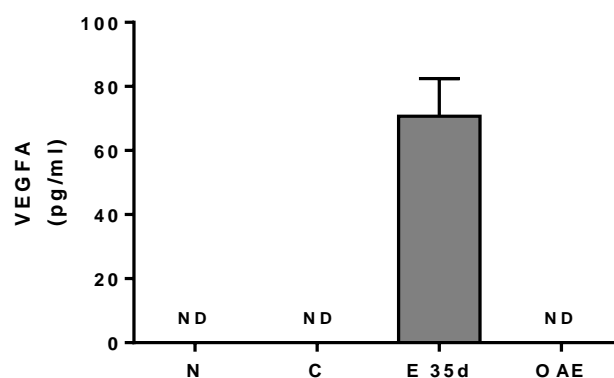


**Figura 22.** Expresión de VEGFR2 en testículo. Western Blots representativos y resultados semi-cuantitativos del contenido de VEGFR2 (150 kDa) en las fracciones intersticial (A) y tubular (B) del testículo de ratas de los grupos normal (N), control (C), experimental (E) 35 días (d) y con orquitis (OAE) relativizadas a β-Actina (42 kDa). Las barras representan la media ± ES, \* $p \leq 0,05$  vs el resto de los grupos.  $n=10$  ratas/grupo.



#### 4.9 Detección de VEGFA circulante

Interesados en evaluar si los niveles de VEGFA circulantes reflejan la condición particular del microambiente testicular, se evaluó si sus niveles eran detectados a nivel sistémico. La concentración de VEGFA fue evaluada por la técnica de ELISA en suero de ratas de los grupos N, C, E 35d y con OAE. VEGFA sólo fue detectado en el suero proveniente de ratas del grupo E 35d y su concentración promedio fue  $70.69 \pm 11.77$  pg/ml (Fig. 23). Los mismos animales evaluados posteriormente cuando el cuadro de orquitis se desarrolló (grupo OAE) presentaron valores indetectables de VEGFA al igual que las ratas de los grupos N y C.



**Figura 23.** Determinación de VEGFA en suero. La concentración de VEGFA fue cuantificada por ELISA en suero proveniente de ratas de los grupos normal (N), control (C), experimental (E) 35 días (d) y con orquitis (OAE). La barra representa la media  $\pm$  ES. ND: valores no detectables. n=10 ratas/grupo.



## 5. DISCUSIÓN

Se acepta que la inflamación y las infecciones del tracto genital masculino pueden ser causas frecuentes o cofactores de infertilidad. En efecto, aproximadamente el 6-10% de los pacientes con infertilidad posee un componente inflamatorio y/o autoinmune que involucra la presencia de infiltrados intersticiales del testículo asociados a un daño del epitelio seminífero y/o a la producción de anticuerpos contra antígenos espermáticos (Weidner y col., 2013). El modelo de OAE murino es útil para estudiar la autoinmunidad órgano-específica ya que refleja las alteraciones histopatológicas del testículo descritas en el hombre. Es por ello que en nuestro laboratorio es utilizado como herramienta para comprender los mecanismos involucrados en el desarrollo de patologías inflamatorias testiculares que resultan en subfertilidad o infertilidad.

La inflamación crónica tisular promueve directa o indirectamente la angiogénesis. Por otra parte, teniendo como antecedentes que el número de vasos sanguíneos testiculares y el porcentaje de CE intersticiales aumenta significativamente en ratas (Guazzone y col., 2012) y ratones con OAE (Pérez y col., 2015), se propuso dilucidar la contribución del proceso de angiogénesis mediado por VEGFA en el desarrollo del cuadro patológico.

Por inmunohistoquímica, mediante el uso de un marcador específico de CE (CD31) se confirmó el incremento del número de vasos sanguíneos testiculares y que el mismo correlacionó positivamente con el índice de OAE, sugiriendo que existe una asociación entre el proceso angiogénico y la progresión y la severidad de la orquitis en la rata.

Dado que la hipoxia induce angiogénesis y que la baja tensión de oxígeno en patologías como varicocele y torsión testicular se asocia a subfertilidad o infertilidad (Reyes y col., 2012), se evaluó el estado de oxigenación testicular en el modelo de OAE. La tinción con pimonidazol observada en los TS e intersticio testicular de las ratas del grupo N reflejan la condición hipóxica del órgano en condiciones fisiológicas y esto se correspondió con lo descrito en el ratón (Gruber y col., 2010). Esta situación se explica por el gran consumo y demanda de oxígeno del testículo para poder llevar a cabo la espermatogénesis. Resultados similares se observaron en los testículos de ratas de los grupos C y E 35d, sin embargo en las ratas con orquitis la tinción disminuyó en los TS que no presentaban daño del epitelio germinal. El aumento en el número de vasos sanguíneos que se observa en el testículo con OAE contribuiría a la re-oxigenación del tejido resolviendo en gran medida la situación de hipoxia que queda limitada a los TS dañados como consecuencia de la inflamación.

Hay numerosos factores que estimulan la angiogénesis, como factores de crecimiento, quimiocinas, integrinas, metaloproteasas, prostaglandinas, etc. Estos han sido estudiados en procesos patológicos de inflamación, autoinmunidad y crecimiento tumoral (Ferrara y Adamis, 2016). VEGFA ha sido postulado como el principal regulador de la angiogénesis fisiológica y patológica (Shibuya y col. 2013b). Para determinar si VEGFA es un factor clave en el proceso angiogénico en la OAE, se evaluó mediante un ensayo *in vivo* los efectos de su bloqueo con un Ac específico utilizado de rutina en la clínica médica para el tratamiento de distintos tipos de cáncer (Calvetti y col., 2015). Los resultados obtenidos indicaron que Bevacizumab reduce el número de vasos sanguíneos testiculares, la incidencia y la severidad de la OAE así como

también el grado de inflamación testicular cuando se comienza a aplicar antes de observarse el daño histopatológico, a partir de los 30d de la primera inmunización. MacMillan y col. (2012) también registraron una reducción en la angiogénesis y en los índices patológicos al aplicar Bevacizumab previo a la aparición de los primeros signos clínicos de la EAE en ratón. Nuestros resultados revelaron que VEGFA es un factor necesario para desencadenar la respuesta angiogénica observado durante el desarrollo de la orquitis en la rata. Sin embargo, el tratamiento con Bevacizumab una vez establecido el cuadro inflamatorio y la lesión del epitelio germinal no resultó efectivo.

Dada la importancia del VEGFA a nivel del mantenimiento del epitelio germinal y de los capilares que transportan los metabolitos necesarios para la proliferación y diferenciación de las CG (Rudolfsson y col., 2004), Bevacizumab fue administrado a un grupo de ratas N para determinar si el bloqueo del VEGFA fisiológico podía traer consecuencias en el testículo. La dosis de droga empleada no provocó alteraciones de la histomorfología testicular, ni tampoco modificó el número de vasos sanguíneos de la microvasculatura testicular. Es probable que las inmunoglobulinas anti-VEGFA (Bovacizumab) no fueron capaces de atravesar la BHT en la cual las uniones estrechas de las células de Sertoli adyacentes forman un cierre circunferencial continuo (Lui y col, 2003). Se sabe que estas uniones estrechas cumplen tres funciones principales: a) Juegan un rol esencial en la compartimentalización, creando una barrera que restringe la difusión de solutos a través de la vía paracelular, b) crean un límite entre los dominios apical y basolateral de la célula, que difieren en su composición lipídica y proteica, creando polaridad celular y c) reducen el pasaje de antígenos de la superficie de las CG a la circulación sistémica y

---

excluye total o parcialmente la entrada de inmunoglobulinas circulantes y linfocitos al compartimento adluminal.

VEGFA se localizó en las CG de los TS con una expresión diferencial dependiendo del tipo celular y del estadio del ciclo de la espermatogénesis, siendo mayor en espermatoцитos en paquitene y en diplotene, lo cual fue similar al patrón de expresión previamente descrito para rata y ratón (Ai y col., 2008; Nalbandian y col., 2003). La marca diferencial de CG podría depender de los requisitos propios de cada célula. Los espermatoцитos en paquitene de la rata pueden permanecer en ese estadio hasta por 2 semanas, siendo las CG que más prevalecen en los TS, por otro lado aumentan relativamente su tamaño y sus requerimientos energéticos en relación a la fase de la meiosis que atraviesan (Russel y col., 1990). Dado que VEGFA tiene efectos tróficos en el testículo de roedores con ciclo reproductivo estacional (Young y Nelson, 2000) y estimula la sobrevida *in vitro* de trozos de testículo bovino (Caires y col., 2009) y de ovocitos porcinos (Kere y col., 2014) podría pensarse que posee un efecto autócrino sobre el desarrollo y la sobrevida de las CG testiculares. En las ratas con orquitis, la marca en los TS disminuyó como consecuencia de la descamación de CG característica de este cuadro. A diferencia de lo publicado por Bott y col. (2006) en roedores y Ergün y col. (1997) en humanos, las células de Sertoli fueron negativas en nuestro modelo. Dado que la expresión de VEGFA mediada por las células de Sertoli está involucrada en el desarrollo testicular de la rata durante la vida embrionaria y el periodo postnatal (Baltes-Breitwish y col., 2010), se propuso evaluar si la ausencia de expresión de VEGFA en las células de Sertoli adultas se debía a una limitación de la técnica o si esta expresión era dependiente del estadio de desarrollo del

animal (período postnatal: 3d; pre-púberes: 21d; adultas: 8 semanas). En las ratas de 3d se observó una marca difusa para VEGFA en la zona central de los cordones seminíferos siendo más intensa en el citoplasma de los gonocitos. Esta marcación particular en el período postnatal se corresponde con la descrita por Caires y col. (2012). En las ratas pre-púberes la distribución de la expresión de VEGFA se asemejó más a la observada en el epitelio germinal de los adultos, excepto que algunas células de Sertoli fueron positivas sobre todo en la parte apical de su citoplasma el cual contacta con las CG más maduras. Este resultado permitió comprender que el patrón de marcación para VEGFA cambia durante el proceso de maduración y desarrollo testicular en la rata. Esto está asociado al rol no vascular que posee VEGFA sobre el testículo adulto promoviendo el mantenimiento del epitelio germinal, respectivamente (Ergün y col., 1997).

A nivel del intersticio testicular VEGFA se expresó en células de Leydig, CE, y en células mononucleares en testículos de ratas de los grupos N, C, E 35d y con OAE. La expresión de VEGFA por las células de Leydig ha sido reportada en testículo adulto humano y murino bajo condiciones fisiológicas y estimularía la permeabilidad de las CE vecinas mediante un efecto parácrino (Ergün y col., 1997; Collin y Bergh, 1996). La expresión de VEGFA detectada en las células mononucleares del intersticio testicular en ratas con OAE correspondió a macrófagos residentes (ED2) y monocitos provenientes de la circulación, macrófagos y CD (ED1). En relación a los macrófagos testiculares, previamente demostramos que además de los macrófagos residentes (ED2+) y de los monocitos provenientes de la circulación (ED1+) existe una población doble positiva, mas indiferenciada en relación a ED2+, que aumenta en la orquitis y

que está bajo la influencia de las citocinas pro-inflamatorias ,TNF $\alpha$ , MCP1 y IL6, entre otras (Rival y col., 2008). En la angiogénesis tumoral, se demostró que la población de monocitos intermedios y algunos monocitos circulantes secretan VEGFA y MMP9 para inducir la formación de capilares en modelos de carcinomas a través de Ang2 (Ziegler-Heitbrock y Hofer, 2013; De Palma y col., 2005; Subimerb y col., 2010; Chambers y col., 2013). Similarmente, en la inflamación crónica como la artritis reumatoide se ha reportado que las distintas subpoblaciones de macrófagos residentes pueden estimular la angiogénesis y la reparación de heridas tomando un perfil pro-angiogénico mediante la secreción de bFGF, PlGF, VEGF, TNF $\alpha$ , IL8 o IGF1 (Sunderkötter y col., 1994; Schmid y Varner, 2010). Del linaje mieloide, las CD también son capaces de regular la formación de vasos sanguíneos. Estas células presentadoras de antígenos profesionales pueden ser reclutadas hacia un microambiente inflamado donde secretan osteopontina, IL8, TNF $\alpha$ , IL6 y TGF $\beta$  aumentando así la respuesta angiogénica (Curiel y col., 2004; Feijoo y cl., 2005; Riboldi y col., 2008).

Cabe destacar la de participación del TNF $\alpha$  y MCP1 en la regulación de la angiogénesis. Por ejemplo, Goukassian y col. (2007) han proporcionado evidencia de que la neovascularización inducida por isquemia es parcialmente dependiente de la señalización a través del receptor p75 de TNF $\alpha$ . Ratones con deficiencia del receptor p75 muestran una pierden la capacidad de recuperar el flujo sanguíneo normal después de la isquemia provocada en la extremidad posterior, asociada con un aumento en la apoptosis de las CE, disminución de la densidad capilar y bajos niveles de VEGF y bFGF en el tejido isquémico y en células progenitoras circulantes pro-angiogénicas (Goukassian y col., 2007).



---

Como antecedente en nuestro laboratorio, Suescun y col. (2003) detectaron un mayor porcentaje de macrófagos que expresaban TNFa en el testículo de ratas con OAE. Por otro lado en estas células aumentó la producción de IL6 (Rival y col., 2006b). Se desconoce el contenido de TNFa e IL6 testicular previo al desarrollo de la orquitis.

En relación a MCP1, Salcedo y col. (2000) demostraron sus propiedades angiogénicas ya que la quimiocina fue capaz de inducir la quimiotaxis de CE humanas que expresaron CCR2 y la formación de vasos sanguíneos en ensayos en matrigel y en el modelo de MAC. En ensayos de cultivos de anillos de aorta de rata, MCP1 indujo la formación de capilares y la expresión génica de HIF1a y VEGFA (Hong y col., 2005). En nuestro laboratorio se demostró que los niveles de la quimiocina MCP1 en FT y medio condicionado de macrófagos aumentan en las ratas inmunizadas para desarrollar OAE en un tiempo previo al daño histopatológico y se mantienen elevados en la orquitis (Guazzone y col., 2003). Por otro lado se demostró que las CE del intersticio testicular expresaron el receptor CCR2, sugiriendo que además de reclutar células inmunes, MCP1 estaría involucrado en la angiogénesis observada en la OAE.

El contenido de VEGFA en homogenados de testículo disminuyó en las ratas con orquitis como consecuencia de la gran descamación de CG de los túbulos lesionados las cuales aportarían una proporción importante de VEGFA al testículo. A efectos de sortear este obstáculo, decidimos estudiar el VEGFA secretado al FT. En el FT los niveles de VEGFA aumentaron previo al daño histopatológico y estos valores disminuyeron hasta valores basales luego de establecerse la orquitis. Este resultado indicaría que existe una regulación positiva en la producción de VEGFA a los 35d y una regulación negativa del

mismo en las ratas con lesión testicular. A su vez explicaría el resultado obtenido al usar Bevacizumab una vez establecida el daño testicular.

Los mecanismos por los cuáles el VEGFA secretado aumentaría podrían ser: la transcripción y la estabilización de su mensajero por parte de HIF1 $\alpha$  y ON; o por la estimulación de las células secretoras con factores pro-inflamatorios/pro-angiogénicos. Por otro lado, este pulso en los niveles de VEGFA podría ser el desencadenante del aumento observado en el número de vasos sanguíneos testiculares cuantificados por inmunohistoquímica en las ratas con OAE.

Sharpe y Cooper (1983) determinaron que las secreciones colectadas en los FT están representadas principalmente por el aporte de las células pertenecientes al compartimiento intersticial, ya que la contaminación con BSA marcada inyectada en los TS fue despreciable. Por lo tanto, el VEGFA detectado en el FT en nuestros resultados sería aportado principalmente por las CE, las células de Leydig, los macrófagos y las CD. El porcentaje de los macrófagos ED1+, ED2+ y la población intermedia ED1+ ED2+ aumentado a los 30d argumentaría nuestra hipótesis (Rival y col., 2008; Rival y col., 2005). El porcentaje de CD también se incrementa en tiempos previos al daño testicular y en la OAE en los ganglios drenantes del testículo los cuáles reflejan la situación particular del mismo; y además expresan el receptor CCR2 (Guazzone y col., 2011; Rival y col., 2007), por lo tanto podría suponerse que estas células sean responsables de contribuir a la mayor producción de VEGFA observada en el FT. Al evaluar la capacidad angiogénica del FT en un ensayo de MCA se observó que los FT obtenidos de ratas del grupo E 35d fueron capaces de inducir la formación de pequeñas estructuras capilares a partir de las ramas

vasculares iniciales. A su vez, la pre-incubación de los FT con Bevacizumab atenúa la respuesta angiogénica ya que disminuyó el número de ramificaciones cuantificadas. Este resultado confirma que el VEGFA secretado por el testículo de ratas inmunizadas para desarrollar OAE es uno de los factores angiogénicos relevantes durante el desarrollo del cuadro.

En ratones transgénicos que sobreexpresan VEGFA, la descamación de CG está asociada a un aumento en la tasa de apoptosis de espermatoцитos y a la pérdida de adhesión a las células de Sertoli (Huminiecki y col., 2001). A su vez, valores elevados de VEGFA en el testículo de ratones (Korpelainen y col., 1998) y en el semen de pacientes (2-100 ng/ml) (Obermair y col., 1999) fueron asociados con alteraciones de la fertilidad. Sumado a esto, Kilic y col. (2009) establecieron que la expresión de VEGFA aumenta en biopsias testiculares de pacientes fumadores azospérmicos y tiene efectos apoptóticos en los TS a través de la activación de la caspasa 3. Sin embargo, nuestros resultados preliminares indican que el número de CG apoptóticas es similar en fragmentos testiculares de ratas normales incubados o no con distintas concentraciones de VEGFA, (5-100 ng/ml). No se podría descartar algún efecto indirecto del VEGFA sobre la descamación de las CG. Como se describió en la "Introducción", la apoptosis de las CG en la OAE está dada, en gran medida, por la producción de citocinas proinflamatorias por parte de las células pertenecientes al infiltrado linfomonocitario que alteran el microambiente inmunosupresor normal (Theas y col., 2008; Jacobo y col., 2014).

HIF1a es el factor de transcripción responsable de inducir un aumento en los niveles de VEGFA en condiciones hipóxicas y de inflamación (Yuan y col., 2003). Mediante la técnica de inmunoperoxidasa HIF1a se expresó en CG

(principalmente en espermatoцитos del compartimento adluminal) y células de Sertoli en las ratas de los grupos N, C y E 35d. En los TS del grupo OAE, la tinción disminuyó producto de la descamación de CG y la ausencia de marca en las células de Sertoli. El patrón de expresión en las CG se correspondió con lo descrito en ratón (Marti y col., 2002) y en rata en condiciones normóxicas y de isquemia (Kilinç y col., 2004). En el intersticio testicular, HIF1a se localizó en las CE y en la túnica media de los vasos sanguíneos testiculares de todos los grupos de ratas estudiados. Este resultado difiere de lo publicado previamente en ratón adulto en donde se observaron células de Leydig HIF1a+ (Lysiak y col., 2009). En relación al contenido de HIF1a testicular y de acuerdo a la tendencia observada, aumentaría en ratas del grupo E 30d en un tiempo previo al aumento del VEGFA secretado (E 35d) y disminuiría en las ratas con OAE cuando también los valores de VEGFA vuelven a ser basales. Un incremento en los niveles de HIF1a ha sido reportado el testículo de rata en respuesta a la isquemia experimental para restablecer la perfusión vascular (Powell y col., 2002).

Las moléculas reactivas del nitrógeno como el ON participan en la transducción de señales hipóxicas, principalmente por un aumento en la expresión y la estabilización del HIF1a (Sumbayev y col., 2007), o directamente en la angiogénesis, estimulando los niveles del ARNm de VEGFA y la síntesis de proteína (Jozkowicz y col., 2001; Iyer y col., 2015). Por lo tanto, se cuantificó la concentración testicular de nitritos, metabolitos estables del ON, en el tiempo en el cual se detectó el mayor contenido de HIF1a (30d posteriores a la inmunización). Acorde a lo esperado se observó un aumento significativo en la concentración de nitritos en las ratas del grupo E 30d sugiriendo que el estrés

oxidativo podría estar involucrado en la regulación de la angiogénesis observada durante el desarrollo de la orquitis. Por otro lado, los antecedentes de nuestro laboratorio mostraron que el estrés oxidativo generado por el aumento de los niveles del ON contribuye al sostenimiento de un estado inflamatorio en ratas con OAE y que la acción del inhibidor competitivo de la ONS disminuye la incidencia y la severidad de la orquitis (Jarazo Dietrich y col., 2012; Jarazo Dietrich y col., 2015).

Por otro lado, existen evidencias que apuntan al papel crucial de HMGB1 (proteína de alta movilidad de grupo 1) en la mediación de eventos tardíos en inflamación *de novo* y autoinmunidad, estableciendo nuevas conexiones entre procesos inflamatorios y angiogénesis patológica (Andersson y Harris, 2010; van Beijnum y col., 2008). A través de su receptor RAGE, este factor puede activar la proliferación de las CE, inducir la migración de las mismas y favorecer los brotes angiogénicos en la progresión y la propagación tumoral (Schlueter y col., 2005). En tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide se demostró que HMGB1 regula la expresión de HIF1 $\alpha$ , lo que consecuentemente aumenta la producción de VEGFA por parte de los fibroblastos y estimula la proliferación de CE (So Youn Park y col., 2015). Por otro lado, dado que el bloqueo específico de HMGB1 en ratas inmunizadas para desarrollar OAE atenúa la inflamación testicular (Aslani y col., 2014) y disminuye el número de vasos sanguíneos testiculares (datos personales no publicados), no podemos descartar que exista una relación HMGB1-HIF1 $\alpha$  o HMGB1-VEGFA que regule el proceso de angiogénesis en el modelo de OAE.

En relación a los receptores de VEGFA, demostramos que VEGFR1 es expresado principalmente en CG y en CE testiculares, mientras que el VEGFR2

se localiza en CG y en células musculares lisas de la túnica media de los vasos sanguíneos. A su vez, la expresión de ambos receptores fue detectada en células con morfología tipo macrófago y células de Leydig. Tanto en el testículo normal como en el testículo bajo condiciones de inflamación la localización para esta marcación fue similar, excepto que en las ratas con OAE la intensidad de la marca disminuyó a nivel intersticial. La distribución tisular de los receptores de VEGFA se correspondió con lo previamente observado en el testículo humano, ratón y bovino (Ergün y col., 1997; Nalbandian y col., 2003; Caires y col., 2009).

El contenido de VEGFR1 disminuyó significativamente en las ratas con orquitis tanto en la fracción de TS como en la fracción intersticial en comparación con el contenido de las ratas de los grupos N, C y E 35d. Estos resultados indican que una regulación negativa estaría ocurriendo en la expresión de este receptor en la orquitis. El contenido de VEGFR2 aumentó significativamente en las ratas del grupo E 35d en la fracción intersticial el cual se correspondió con el pico observado para la expresión de VEGFA en los FT, mientras que en las ratas que desarrollaron orquitis ambos parámetros volvieron a valores basales. Este resultado fue contrario a lo observado para la expresión de VEGFR1, mostrando un comportamiento diferencial en la regulación de los dos receptores de VEGFA. El aumento del VEGFR2 podría explicarse por una regulación positiva ejercida directamente por el VEGFA. Caires y col. (2009) demostraron que VEGFA induce la expresión de VEGFR2 en cultivos de testículos bovinos. Se ha reportado en HUVECs y en células neoplásicas de pulmón que la activación del VEGFR2 rápidamente induce varias cascadas de señalización que incluyen fosfatidilinositol-3-quinasa, fosfolipasa C, MAPK, y Src involucrados en la

promoción de la proliferación celular, la supervivencia, y eventos de diferenciación (Takahashi & Shibuya 2005); mientras que la activación del VEGFR1 provoca una pobre respuesta mitogénica (en comparación con la generada por VEGFR2) y principalmente funciona como regulador de la quimiotaxis, la supervivencia y las interacciones célula-célula en monocitos, macrófagos y células madre hematopoyéticas (Kaplan y col., 2005, Takahashi & Shibuya 2005, Fragoso y col. 2006). Nuestros resultados sugieren que en el proceso angiogénico observado en el cuadro de OAE, el VEGFR2 también sería el receptor más relevante.

Se ha descrito una fuerte correlación entre los niveles de VEGFA en el suero de pacientes y el contenido detectado en el órgano afectado por patologías autoinmunes (Colville-Nash y Scott, 1992; Peacock, 1992) y el cáncer (Macedo y col., 2017). En casos clínicos de cáncer gástrico se vio que el contenido de VEGFA en el suero de pacientes con regresión de los tumores disminuía; mientras que en pacientes con metástasis aumentaba (Macedo y col., 2017). Los niveles de VEGFA también se asociaron negativamente con la supervivencia en pacientes con cáncer colorectal metastásico (Suénaga y col., 2016). En pacientes con patologías autoinmunes como la artritis reumatoide se determinó un incremento de VEGFA en el fluido sinovial y suero (Fava y col., 1994). Esta correlación también se observó entre fluido vítreo y suero de pacientes con retinopatía diabética (Aiello y col., 1994; Maier y col., 2008), así como, en los fluidos oculares de pacientes con trastornos retinianos isquémicos (Ferrara y Kerbel, 2005). Estos antecedentes han permitido la postulación de VEGFA como un marcador sistémico de la progresión tumoral y de procesos inflamatorios. Basándonos en esta premisa, nos propusimos analizar si VEGFA

podría ser un marcador sistémico relevante de la OAE. En nuestros ensayos encontramos valores detectables de VEGFA (70 pg/ml) únicamente en el suero proveniente de ratas del grupo E 35d coincidiendo con el aumento de VEGFA detectado en las secreciones testiculares de las ratas inmunizadas previo al daño histopatológico y el brote angiogénico. VEGFA está regulado positivamente en biopsias de tumores de CG y en el suero de los pacientes, pero en este caso, no posee especificidad como biomarcador de tumores testiculares debido a que no se ha encontrado una correlación entre los niveles séricos y el riesgo de metástasis (Bentas y col., 2003). Sin embargo, no se ha estudiado este rol en patologías testiculares asociadas a la inflamación. Nuestros resultados proveen nueva evidencia que señala al VEGFA como posible marcador temprano de la inflamación crónica testicular independizando el diagnóstico clínico de las biopsias testiculares.





## 6. CONCLUSIONES

- El número de vasos sanguíneos pertenecientes a la microvasculatura testicular se correlaciona positivamente con la progresión y severidad de la OAE
- El estado de oxigenación de las células presentes en los TS y en el intersticio testicular fue similar en las ratas de los grupos N, C y E 35d. Sin embargo, en las ratas con orquitis la inmunomarcación fue menor en aquellos TS que no presentaban alteraciones histopatológicas del epitelio germinal
- La inhibición específica de VEGFA *in vivo* reduce el número de vasos sanguíneos testiculares, la incidencia y la severidad de la orquitis
- VEGFA y sus receptores se localizan en los mismos tipos celulares en el testículo de ratas de los grupos N, C, E 35d y OAE y
- Los niveles de VEGFA secretados aumentan en el FT de ratas del grupo E 35d previo a la lesión testicular y vuelven a valores basales en la orquitis
- El VEGFA presente en los FT de ratas E 35d es el factor responsable de estimular la angiogénesis *in vivo* en el modelo de MAC y su efecto se atenúa al pre-incubar las muestras con Bevacizumab
- Los niveles de HIF 1a no difieren significativamente entre los grupos estudiados, sin embargo tienden a aumentar en ratas del grupo E 30d previo al pico de expresión de VEGFA
- La concentración de nitritos testiculares es mayor en ratas del grupo E 30d, sugiriendo una relación entre ON- HIF1a

- La expresión del VEGFR2 aumenta previo a la lesión testicular y ambos receptores están regulados negativamente durante la orquitis
- VEGFA es sólo es detectable en el suero de ratas del grupo E 35d, previo al daño histopatológico

Los resultados obtenidos demuestran la relevancia del sistema VEGFA-VEGFR en el desarrollo de un cuadro de inflamación crónica testicular. La detección de VEGFA podría utilizarse como un marcador predictivo de inflamación testicular y la neutralización del mismo como una potencial herramienta terapéutica en el tratamiento de la infertilidad asociada a mecanismos autoinmunes.



**BIBLIOGRAFÍA**

1. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 464-478.
2. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, Nguyen HV, Aiello LM, Ferrara N, Kinget GL. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med.* 1994; 331: 1480–1487.
3. Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation- related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39: 18 –22.
4. Andersson U y Harris HE. The role of HMGB1 in the pathogenesis of rheumatic disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1799: 141–148.
5. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell.* 2019; 176: 1248-1264.
6. Armstrong AW, Voyles SV, Armstrong EJ, Fuller EN, Rutledge JC. Angiogenesis and oxidative stress: common mechanisms linking psoriasis with atherosclerosis. *J Dermatol Sci.* 2011; 63: 1-9.
7. Avallet O, Vigier M, Leduque P, Dubois PM, Saez JM. Expression and regulation of transforming growth factor-beta 1 messenger ribonucleic acid and protein in cultured porcine Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology.* 1994; 134: 2079-2087.
8. Avraham-Davidi I, Ely Y, Pham VN, Castranova D, Grunspan M, Malkinson G, Gibbs-Bar L, Maysseless O, Allmog G, Lo B, Warren CM, Chen TT, Ungos J, Kidd K, Shaw K, Rogachev I, Wan W, Murphy PM, Farber SA, Carmel L, Shelness GS, Iruela-Arispe ML, Weinstein BM, Yaniv K. ApoB-containing lipoproteins regulate angiogenesis by modulating expression of VEGF receptor 1. *Nat Med.* 2012; 18: 967-973.
9. Badawy AA, Namboodiri AM, Moffett JR. The end of the road for the tryptophan depletion concept in pregnancy and infection. *Clin Sci (Lond).* 2016; 130: 1327-1333.

10. Bagli E, Xagorari A, Papetropoulos A, Murphy C, Fotsis T. Angiogenesis in inflammation. *Autoimmun Rev.* 2004; 3: s26.
11. Baltés-Breitwisch MM, Artac RA, Bott RC, McFee RM, Kerl JG, Clopton DT, Cupp AS. Neutralization of vascular endothelial growth factor antiangiogenic isoforms or administration of proangiogenic isoforms stimulates vascular development in the rat testis. *Reproduction.* 2010; 140: 319-329.
12. Bao F, Wu P, Xiao N, Qiu F, Zeng QP. Nitric oxide-driven hypoxia initiates synovial angiogenesis, hyperplasia and inflammatory lesions in mice. *PLoS One.* 2012; 7: e34494.
13. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marmé D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood.* 1996; 87: 3336-3343.
14. Bategay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, Sage EH, Pech M. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J Cell Biol.* 1994; 125: 917-928.
15. Beauchamp C y Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* 1971; 44: 276-287.
16. Beck H, Raab S, Copanaki E, Heil M, Scholz A, Shibuya M, Deller T, Machein M, Plate KH. VEGFR-1 signaling regulates the homing of bone marrow-derived cells in a mouse stroke model. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010; 69: 168-175
17. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings MC, Hayward NK, Kay GF. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res.* 2000; 86: E29-35.
18. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development.* 1998; 125: 1591-1598.

19. Bentas W, Beecken WD, Glienke W, Binder J, Schuldes H. Serum levels of basic fibroblast growth factor reflect disseminated disease in patients with testicular germ cell tumors. *Urol Res.* 2003; 30: 390-393.
20. Bergh A, Damber J-E. Vascular controls in testicular physiology. In: deKretser DM (ed), *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. New York: Academic press Inc; 1993: 439-468.
21. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell.* 1992; 3: 211-220.
22. Bérubé M, Deschambeault A, Boucher M, Germain L, Petitclerc E, Guérin SL. MMP-2 expression in uveal melanoma: differential activation status dictated by the cellular environment. *Mol Vis.* 2005; 11: 1101-1111.
23. Bock F, Onderka J, Dietrich T, Bachmann B, Kruse FE, Paschke M, Zahn G, Cursiefen C. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48: 2545-2552.
24. Borden EC. Interferons  $\alpha$  and  $\beta$  in cancer: therapeutic opportunities from new insights. *Nat Rev Drug Discov.* 2019; 18: 219-234.
25. Bott RC, McFee RM, Clopton DT, Toombs C, Cupp AS. Vascular endothelial growth factor and kinase domain region receptor are involved in both seminiferous cord formation and vascular development during testis morphogenesis in the rat. *Biol Reprod.* 2006; 75: 56-67.
26. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development.* 1992; 114, 521-532.
27. Brown LF, Berse B, Tognazzi K, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR, Dvorak HF, Rosen S. Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney. *Kidney Int.* 1992; 42, 1457-1461.



28. Brown LF, Yeo KT, Berse B, Morgentaler A, Dvorak HF, Rosen S. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is strongly expressed in the normal male genital tract and is present in substantial quantities in semen. *J Urol.* 1995; 154: 576-579.
29. Bruick RK. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev.* 2003; 17: 2614–2623.
30. Bryan D, Walker KB, Ferguson M, Thorpe R. Cytokine gene expression in a murine wound healing model. *Cytokine.* 2005; 31: 429-438.
31. Bucher F, Lee J, Shin S, Kim MS, Oh YS, Ha S, Zhang H, Yea K. Interleukin-5 suppresses Vascular Endothelial Growth Factor-induced angiogenesis through STAT5 signaling. *Cytokine.* 2018; 110: 397-403.
32. Caires KC, De Avila J, McLean DJ. Vascular endothelial growth factor regulates germ cell survival during establishment of spermatogenesis in the bovine testis. *Reproduction.* 2009; 138: 667–677.
33. Caires KC, de Avila JM, Cupp AS, McLean DJ. VEGFA family isoforms regulate spermatogonial stem cell homeostasis in vivo. *Endocrinology.* 2012; 153: 887-900.
34. Calvetti L, Pilotto S, Carbognin L, Ferrara R, Caccese M, Tortora G, Bria E. The coming of ramucirumab in the landscape of anti-angiogenic drugs: potential clinical and translational perspectives. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15: 1359-1370
35. Capitão M, Soares R. Angiogenesis and Inflammation Crosstalk in Diabetic Retinopathy. *J Cell Biochem.* 2016; 117: 2443-2453.
36. Carvalho JF, Blank M, Shoenfeld Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in autoimmune diseases. *J Clin Immunol.* 2007; 27: 246–256.
37. Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med.* 1999; 5: 495–502.

38. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000; 6: 389–395.
39. Chambers SE, O'Neill CL, O'Doherty TM, Medina RJ, Stitt AW. The role of immune-related myeloid cells in angiogenesis. *Immunobiology.* 2013; 218: 1370-1375.
40. Chan PT y Schlegel PN. Inflammatory conditions of the male excurrent ductal system. Part I. *J Androl.* 2002a; 23: 453-460.
41. Chan PT y Schlegel PN. Inflammatory conditions of the male excurrent ductal system. Part II. *J Androl.* 2002b; 23: 461-469.
42. Chung AS y Ferrara N. Developmental and Pathological Angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011; 27: 563–584.
43. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT, Stern D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med.* 1990; 172: 1535-1545.
44. Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Röckl W, Waltenberger J, Risau W. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem.* 1996; 271: 17629-17634.
45. Clear AJ, Lee AM, Calaminici M, Ramsay AG, Morris KJ, Hallam S, Kelly G, Macdougall F, Lister TA, Gribben JG. Increased angiogenic sprouting in poor prognosis FL is associated with elevated numbers of CD163+ macrophages within the immediate sprouting microenvironment. *Blood.* 2010; 115: 5053-5056.
46. Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem.* 2002; 277: 3101-3108.
47. Collin O y Bergh A. Leydig cells secrete factors which increase vascular permeability and endothelial cell proliferation. *Int J Androl.* 1996; 19: 221-228.

48. Colville-Nash PR y Scott DL. Angiogenesis and rheumatoid arthritis: pathogenic and therapeutic implications. *Ann Rheum Dis.* 1992; 51: 919-925.
49. Cudmore MJ, Hewett PW, Ahmad S, Wang KQ, Cai M, Al-Ani B, Fujisawa T, Ma B, Sissaoui S, Ramma W, Miller MR, Newby DE, Gu Y, Barleon B, Weich H, Ahmed A. The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nat Commun.* 2012; 3: 972.
50. Curiel TJ, Cheng P, Mottram P, Alvarez X, Moons L, Evdemon-Hogan M, Wei S, Zou L, Kryczek I, Hoyle G, Lackner A, Carmeliet P, Zou W. Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 2004; 64: 5535-5538.
51. Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun.* 2008; 31: 252-256.
52. De Palma M, Biziato D, Petrova TV. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2017; 17: 457-474.
53. Dejuçq N y Jégou B. Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001; 65: 208-231.
54. Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P, Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology.* 1985; 54: 589-599.
55. Doncel GF, Di Paola JA, 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.* 1989; 20: 44-51.
56. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 11-22.
57. Duda DG, Sunamura M, Lozonschi L, Kodama T, Egawa S, Matsumoto G, Shimamura H, Shibuya K, Takeda K, Matsuno S. Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res.* 2000; 60: 1111-1116.

58. Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, van de Water L, Senger DR. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107: 233-235.
59. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 4273-4278.
60. Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Graiani G, Manni L, Madeddu P. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation*. 2002; 106: 2257-2262.
61. Ergün S, Kiliç N, Fiedler W, Mukhopadhyay AK. Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol*. 1997; 131: 9-20.
62. Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Senger DR, Dvorak HF, Brown LF. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med*. 1994; 180: 341-346.
63. Feijoó E, Alfaro C, Mazzolini G, Serra P, Peñuelas I, Arina A, Huarte E, Tirapu I, Palencia B, Murillo O, Ruiz J, Sangro B, Richter JA, Prieto J, Melero I. Dendritic cells delivered inside human carcinomas are sequestered by interleukin-8. *Int J Cancer*. 2005; 116: 275-281.
64. Ferrara N y Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2016; 15: 385-403.
65. Ferrara N y Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med*. 1999; 5: 1359-1364.
66. Ferrara N y Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparinbinding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 161: 851-858.
67. Ferrara N y Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005; 438: 967-974.

68. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996; 380: 439-442.
69. Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, Kim R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina*, 2006; 26: 859-870.
70. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9: 669-676.
71. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2004b; 3: 391-400.
72. Ferrara N, LeCouter J, Lin R, Peale F. EG-VEGF and Bv8: a novel family of tissue-restricted angiogenic factors. *Biochim Biophys Acta*. 2004a; 1654: 69-78.
73. Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G, Mitchell R, Gospodarowicz D. Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84: 5773-7.
74. Ferrara N. Role of myeloid cells in vascular endothelial growth factor-independent tumor angiogenesis. *Curr Opin Hematol*. 2010; 17: 219-224.
75. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995; 376: 66-70.
76. Fragoso R, Pereira T, Wu Y, Zhu Z, Cabeçadas J, Dias S. VEGFR-1 (FLT-1) activation modulates acute lymphoblastic leukemia localization and survival within the bone marrow, determining the onset of extramedullary disease. *Blood*. 2006; 107: 1608-1616.
77. Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1998; 273: 11197-11204.
78. Gale NW y Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev*. 1999; 13: 1055-1066.

79. Gal-Or O, Livny E, Sella R, Nisgav Y, Weinberger D, Livnat T, Bahar I. Efficacy of Subconjunctival Aflibercept Versus Bevacizumab for Prevention of Corneal Neovascularization in a Rat Model. *Cornea*. 2016; 35: 991-996.
80. Gan HK, Seruga B, Knox JJ. Sunitinib in solid tumors. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009; 18: 821-834
81. Gao J, Wang X, Wang Y, Han F, Cai W, Zhao B, Li Y, Han S, Wu X, Hu D. Murine Sertoli cells promote the development of tolerogenic dendritic cells: a pivotal role of galectin-1. *Immunology*. 2016; 148: 253-265.
82. Gao X y Xu Z. Mechanisms of action of angiogenin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008; 40: 619-624.
83. Gao X, Li Y, Wang H, Li C, Ding J. Inhibition of HIF-1 $\alpha$  decreases expression of pro-inflammatory IL-6 and TNF- $\alpha$  in diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*. 2017; 95: e746-e750.
84. Gao ZJ, Wang Y, Yuan WD, Yuan JQ, Yuan K. HIF-2 $\alpha$  not HIF-1 $\alpha$  overexpression confers poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*. 2017; 39: 1010428317709637.
85. Gerber SA, Pober JS. IFN- $\alpha$  induces transcription of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  to inhibit proliferation of human endothelial cells. *J Immunol*. 2008; 181: 1052-1062.
86. Goukassian DA, Qin G, Dolan C, Murayama T, Silver M, Curry C, Eaton E, Luedemann C, Ma H, Asahara T, Zak V, Mehta S, Burg A, Thorne T, Kishore R, Losordo DW. Tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor p75 is required in ischemia-induced neovascularization. *Circulation*. 2007; 115: 752-762.
87. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126: 131-138.
88. Gruber M, Mathew LK, Runge AC, Garcia JA, Simon MC. EPAS1 Is Required for Spermatogenesis in the Postnatal Mouse Testis. *Biol Reprod*. 2010; 82: 1227-1236.

89. Gualdoni GS, Jacobo PV, Sobarzo CM, Pérez CV, Matzkin ME, Höch C, Frungieri MB, Hill M, Anegón I, Lustig L, Guazzone VA. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in testicular immune-privilege. *Sci Rep.* 2019; SREP-19-00638B (En revisión).
90. Guazzone VA, Hollwegs S, Mardirosian M, Jacobo P, Hackstein H, Wygrecka M, Schneider E, Meinhardt A, Lustig L, Fijak M. Characterization of dendritic cells in testicular draining lymph nodes in a rat model of experimental autoimmune orchitis. *Int J Androl.* 2011; 34: 276-289.
91. Guazzone VA, Jacobo P, Denduchis B, Lustig L. Expression of cell adhesion molecules, chemokines and chemokine receptors involved in leukocyte traffic in rats undergoing autoimmune orchitis. *Reproduction.* 2012; 143: 651: 662.
92. Guazzone VA, Rival C, Denduchis B, Lustig L. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in experimental autoimmune orchitis. *J Reprod Immunol.* 2003; 60: 143-157.
93. Haas CS, Amin MA, Allen BB, Ruth JH, Haines GK, Woods JM, Koch AE. Inhibition of angiogenesis by interleukin-4 gene therapy in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 2402-2414.
94. Habig W, Pabst M, Jakoby W. Glutathione S-transferase AA from rat liver. *Arch Biochem Biophys.* 1976; 175: 710-716.
95. Hammond BW y Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 1988; 3: 25-32.
96. Haro Durand L, Vargas GE, Romero NM, Vera-Mesones R, Porto-López JM, Boccaccini AR, Zago MP, Baldi A, Gorustovich A. Angiogenic effects of ionic dissolution products released from a boron-doped 45S5 bioactive glass. *Journal of Materials Chemistry B.* 2015; 3: 1142-1148.
97. Head JR y Billingham RE. Immune privilege in the testis. II. Evaluation of potential local factors. *Transplantation.* 1985; 40: 269-275.
98. Hicklin DJ y Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 1011–1027.

99. Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, Seiki M, Noda T, Shibuya M. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res.* 2001; 61: 1207-1213.
100. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell.* 2002; 2: 289-300.
101. Hiroi M, Mori K, Sakaeda Y, Shimada J, Ohmori Y. STAT1 represses hypoxia-inducible factor-1-mediated transcription. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 387: 806-810.
102. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004; 56: 549-580.
103. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Rudge JS. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 11393-11398.
104. Hong KH, Ryu J, Han KH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood.* 2005; 105: 1405-1407.
105. Houck KA y Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms, *J Biol Chem.* 267; 1992: 26031-26037.
106. Huang S, Ullrich SE, Bar-Eli M. Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience. *J Interferon Cytokine Res.* 1999; 19: 697-703.
107. Huggenberger R y Detmar M. The cutaneous vascular system in chronic skin inflammation. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2011; 15: 24-32.
108. Huleihel M y Lunenfeld E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl.* 2004; 6: 259-268.



109. Huminiecki L, Chan HY, Lui S, Poulsom R, Stamp G, Harris AL, Bicknell R. Vascular endothelial growth factor transgenic mice exhibit reduced male fertility and placental rejection. *Mol Hum Reprod.* 2001; 7: 255-264.
110. Im SA, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Liu TJ, Ke LD, Kim JS, Lee HY, Steck PA, Kyritsis AP, Yung WK. Antiangiogenesis treatment for gliomas: transfer of antisense-vascular endothelial growth factor inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 1999; 59: 895-900.
111. Isachenko V, Mallmann P, Petrunkina AM, Rahimi G, Nawroth F, Hancke K, Felberbaum R, Genze F, Damjanoski I, Isachenko E. Comparison of in vitro- and chorioallantoic membrane (CAM)-culture systems for cryopreserved medulla-contained human ovarian tissue. *PLoS One.* 2012; 7: e32549.
112. Ito N, Wernstedt C, Engström U, Claesson-Welsh L. Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *J Biol Chem.* 1998; 273: 23410-23418.
113. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res.* 1997; 80: 829-837.
114. Iyer AK, Ramesh V, Castro CA, Kaushik V, Kulkarni YM, Wright CA, Venkatadri R, Rojanasakul Y, Azad N. Nitric oxide mediates bleomycin-induced angiogenesis and pulmonary fibrosis via regulation of VEGF. *J Cell Biochem.* 2015; 116: 2484-2493.
115. Jacobo P, Fass M, Pérez CV, Jarazo-Dietrich S, Lustig L, Theas MS. Involvement of soluble Fas Ligand in germ cell apoptosis in testis of rats undergoing autoimmune orchitis. *Cytokine.* 2012; 60: 385-92.
116. Jacobo P, Guazzone VA, Jarazo-Dietrich S, Theas MS, Lustig L. Differential changes in CD4+ and CD8+ effector and regulatory T lymphocyte subsets in the testis of rats undergoing autoimmune orchitis. *J Reprod Immunol.* 2009; 81: 44-54.
117. Jacobo P, Guazzone VA, Theas MS, Lustig L. Testicular autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2011; 10: 201-204.

118. Jacobo P, Pérez CV, Theas MS, Guazzone VA, Lustig L. CD4+ and CD8+ T cells producing Th1 and Th17 cytokines are involved in the pathogenesis of autoimmune orchitis. *Reproduction*. 2011; 141: 249-258.
119. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003; 9: 685-693.
120. Jain S, Tran TH, Amiji M. Macrophage repolarization with targeted alginate nanoparticles containing IL-10 plasmid DNA for the treatment of experimental arthritis. *Biomaterials*. 2015; 61: 162-177.
121. Jarazo Dietrich S, Fass MI, Jacobo PV, Sobarzo CM, Lustig L, Theas MS. Inhibition of NOS-NO System Prevents Autoimmune Orchitis Development in Rats: Relevance of NO Released by Testicular Macrophages in Germ Cell Apoptosis and Testosterone Secretion. *Plos One*. 2015; 10: e0128709.
122. Jonasch E y Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist*. 2001; 6: 34-55.
123. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*. 1996; 15: 1751.
124. Jozkowicz A, Cooke JP, Guevara I, Huk I, Funovics P, Pachinger O, Weidinger F, Dulak J. Genetic augmentation of nitric oxide synthase increases the vascular generation of VEGF. *Cardiovasc Res*. 2001; 51: 773-783.
125. Kami J, Muranaka K, Yanagi Y, Obata R, Tamaki Y, Shibuya M. Inhibition of choroidal neovascularization by blocking vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase. *Jpn J Ophthalmol*. 2008; 52: 91-98.
126. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SW, Jensen KK, Rafii S, Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005; 438: 820-827.

127. Keane MP, Belperio JA, Arenberg DA, Burdick MD, Xu ZJ, Xue YY, Strieter RM. IFN-gamma-inducible protein-10 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis. *J Immunol.* 1999; 163: 5686-5692.
128. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med.* 2008. 358: 2039–2049.
129. Kilic S, Lortlar N, Bardakci Y, Ozdemir E, Yuksel B, Ozturk U, Budak G, Dogan M. Caspase-3 and VEGF immunopositivity in seminiferous tubule germ cells in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia in smokers versus non-smokers. *J Assist Reprod Genet.* 2009; 26: 57-63.
130. Kiliñç F, Kayaselcuk F, Aygun CEM, Guvel S, Egilmez T, Ozkardes H. Experimental varicocele induces hypoxia inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in the rat testis. *J Urol.* 2004; 172: 1188-1191.
131. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature.* 1993; 362: 841-844.
132. Kim YW, West XZ, Byzova TV. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *J Mol Med (Berl).* 2013; 91: 323-328.
133. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.* 1992; 258: 1798-1801.
134. Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J.* 2011; 437: 169-183.
135. Korpelainen EI, Karkkainen MJ, Tenhunen A, Lakso M, Rauvala H, Vierula M, Parvinen M, Alitalo K. Overexpression of VEGF in testis and epididymis causes infertility in transgenic mice: evidence for nonendothelial targets for VEGF. *J Cell Biol.* 1998; 143: 1705-1712.
136. Kralleke D, Ng YS, Shima DT. The heparin-binding domain confers diverse functions of VEGF-A in development and disease: a structure-function study. *Biochem Soc Trans.* 2009; 37: 1201-1206.

137. Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, Wada Y. Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Hum Pathol.* 2002; 33: 1069-1077.
138. Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, Wada Y. Expression of vascular endothelial growth Factor, placental wrowth factor, and their Receptors flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Human Pathol.* 2002; 33: 1069–1077.
139. LaGory EL y Giaccia AJ. The ever-expanding role of HIF in tumour and stromal biology. *Nat Cell Biol.* 2016; 18: 356-365.
140. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989; 246: 1306-1309.
141. Li J, Wang JJ, Yu Q, Chen K, Mahadev K, Zhang SX. Inhibition of reactive oxygen species by Lovastatin downregulates vascular endothelial growth factor expression and ameliorates blood-retinal barrier breakdown in db/db mice: role of NADPH oxidase 4. *Diabetes.* 2010; 59: 1528-1538.
142. Li MC y He SH. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2004; 10: 620-625.
143. Li N, Wang T, Han D. Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the testis. *Front Immunol.* 2012; 3: 152.
144. Lim E, Kuo CC, Tu HF, Yang CC. The prognosis outcome of oral squamous cell carcinoma using HIF-2 $\alpha$ . *J Chin Med Assoc.* 2017; 80: 651-656.
145. Lin YS, Nguyen C, Mendoza JL, Escandon E, Fei D, Meng YG, Modi NB. Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 288: 371-378.
146. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M, Capaccetti B, Gattuso D, Gasparin Gi. Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis.* 2002; 5: 237–256.

147. Lopez PF, Sippy BD, Lambert HM, Thach AB, Hinton DR. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37: 855–868.
148. Lowenstein CJ y Padalko E. iNOS (NOS2) at a glance. *J Cell Sci.* 2004; 117: 2865-2867.
149. Lu N, Sargent KM, Clopton DT, Pohlmeier WE, Brauer VM, McFee RM, Weber JS, Ferrara N, Silversides DW, Cupp AS. Loss of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) isoforms in the testes of male mice causes subfertility, reduces sperm numbers, and alters expression of genes that regulate undifferentiated spermatogonia. *Endocrinology.* 2013; 154: 4790-4802.
150. Lui WY, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Sertoli cell tight junction dynamics: Their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2003; 68: 1087–1097.
151. Lustig L, Rival C, Tung SK. Autoimmune Orchitis and Autoimmune Oophoritis. *The Autoimmune Diseases.* Elsevier Inc. 2014: 1007-1020.
152. Lysiak JJ, Kirby JL, Tremblay JJ, Woodson RI, Reardon MA, Palmer LA, Turner TT. Hypoxia-inducible factor-1alpha is constitutively expressed in murine Leydig cells and regulates 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promoter activity. *J Androl.* 2009; 30: 146-156.
153. Mac Gabhann F y Popel AS. Dimerization of VEGF receptors and implications for signal transduction: a computational study. *Biophys Chem.* 2007; 128: 125-139.
154. Macedo F, Ladeira K, Longatto-Filho A, Martins SF. Gastric Cancer and Angiogenesis: Is VEGF a Useful Biomarker to Assess Progression and Remission? *J Gastric Cancer.* 2017; 17: 1-10.
155. MacMillan MC, Furlong SJ; Doucette CD, Chen PL, Hoskin DW, Easton AS. Bevacizumab diminishes experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting spinal cord angiogenesis and reducing peripheral T-cell responses. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012; 71: 983-999.

156. Magre S y Jost A. Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus. *J Electron Microsc Tech.* 1991; 19: 172-188.
157. Maier R, Weger M, Haller-Schober EM, El-Shabrawi Y, Wedrich A, Theisl A, Aigner R, Barth A, Haas A. Multiplex bead analysis of vitreous and serum concentrations of inflammatory and proangiogenic factors in diabetic patients. *Mol Vis.* 2008; 14: 637-643.
158. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997; 277: 55-60.
159. Marchand GS, Noiseux N, Tanguay JF, Sirois MG. Blockade of in vivo VEGF-mediated angiogenesis by antisense gene therapy: role of Flk-1 and Flt-1 receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282: H194-204.
160. Margolin K. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the treatment of solid tumors. *Curr Oncol Rep.* 2002; 4: 20-28.
161. Marti HH, Katschinski DM, Wagner KF, Schaffer L, Stier B, Wenger RH. Isoform-specific expression of hypoxia-inducible factor-1alpha during the late stages of mouse spermiogenesis. *Mol Endocrinol.* 2002; 16: 234-243.
162. Matrone C, Pignataro G, Molinaro P, Irace C, Scorziello A, Di Renzo GF, Annunziato L. HIF-1alpha reveals a binding activity to the promoter of iNOS gene after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Neurochem.* 2004; 90: 368-378.
163. McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG. Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med.* 2003; 198: 863-868.
164. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod.* 1996; 11: 220-223.

165. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Mişu CM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018; 59: 455-467.
166. Mellor AL, Lemos H, Huang L. Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tolerance: Where Are We Now? *Front Immunol.* 2017; 8: 1360.
167. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature.* 1994; 367: 576-579.
168. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Møller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell.* 1993; 72: 835-846.
169. Miller A, Lanir N, Shapiro S, Revel M, Honigman S, Kinarty A, Lahat N. Immunoregulatory effects of interferon-beta and interacting cytokines on human vascular endothelial cells. Implications for multiple sclerosis autoimmune diseases. *J Neuroimmunol.* 1996; 64: 151-161.
170. Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 1999; 99: 1726-1732.
171. Muller WA. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6: 323-344.
172. Murakami M, Iwai S, Hiratsuka S, Yamauchi M, Nakamura K, Iwakura Y, Shibuya M. Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood.* 2006; 108: 1849-1856.
173. Nakayama M, Nakayama A, van Lessen M, Yamamoto H, Hoffmann S, Drexler HC, Itoh N, Hirose T, Breier G, Vestweber D, Cooper JA, Ohno S, Kaibuchi K, Adams RH. Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. *Nat Cell Biol.* 2013; 15: 249-260.

174. Nalbandian A, Dettin L, Dym M, Ravindranath N. Expression of vascular endothelial growth factor receptors during male germ cell differentiation in the mouse. *Biol Reprod.* 2003; 69: 985-994.
175. Nap AW, Dunselman GA, de Goeij AF, Evers JL, Groothuis PG. Inhibiting MMP activity prevents the development of endometriosis in the chicken chorioallantoic membrane model. *Hum Reprod.* 2004; 19: 2180-2187.
176. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999; 13: 9-22.
177. Obermair A, Obruca A, Pöhl M, Kaider A, Vales A, Leodolter S, Wojta J, Feichtinger W. Vascular endothelial growth factor and its receptors in male fertility. *Fertil Steril.* 1999; 72: 269-275.
178. Oelrichs RB, Reid HH, Bernard O, Ziemiecki A, Wilks AF. NYK/FLK-1: a putative receptor protein tyrosine kinase isolated from E10 embryonic neuroepithelium is expressed in endothelial cells of the developing embryo. *Oncogene.* 1993; 8: 11-18.
179. Oklu R, Walker TG, Wicky S, Hesketh R. Angiogenesis and current antiangiogenic strategies for the treatment of cancer. *J Vasc Interv Radiol.* 2010; 21: 1791-1805.
180. Oshikawa K, Rakhmilevich AL, Shi F, Sondel PM, Yang N, Mahvi DM. Interleukin 12 gene transfer into skin distant from the tumor site elicits antimetastatic effects equivalent to local gene transfer. *Hum Gene Ther.* 2001; 12: 149-160.
181. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor isoforms (VEGF): differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell.* 1993; 4: 1317- 1326.
182. Park SY, Lee SW, Kim HY, Lee WS, Hong KW, Kim CD. HMGB1 induces angiogenesis in rheumatoid arthritis via HIF-1 $\alpha$  activation. *Eur J Immunol.* 2015; 45: 1216-1227.
183. Paul C, Teng S, Saunders PT. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biol Reprod.* 2009; 80: 913-919.



184. Payabvash S, Salmasi AH, Kiumehr S, Tavangar SM, Nourbakhsh B, Faghihi SH, Dehpour AR. Salutory effects of N-acetylcysteine n apoptotic damage in a rat model of testicular torsion. *Urol Int.* 2007; 79: 248–254.
185. Peacock DJ, Banquerigo ML, Brahn E. Angiogenesis inhibition suppresses collagen arthritis. *J Exp Med.* 1992; 175: 1135-1138.
186. Pérez CV, Gómez LG, Gualdoni GS, Lustig L, Rabinovich GA, Guazzone VA. Dual roles of endogenous and exogenous galectin-1 in the control of testicular immunopathology. *Sci Rep.* 2015; 5: 12259.
187. Pérez CV, Sobarzo CM, Jacobo PV, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Denduchis B, Lustig L. Loss of occludin expression and impairment of blood-testis barrier permeability in rats with autoimmune orchitis: effect of interleukin 6 on Sertoli cell tight junctions. *Biol Reprod.* 2012; 87: 122.
188. Phillips HS, Hains J, Leung DW, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology.* 1990; 127: 965-967.
189. Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 1993; 53: 5822-5827.
190. Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.* 1989; 8: 3801-3806.
191. Polfliet MM, Fabriek BO, Daniëls WP, Dijkstra CD, van den Berg TK. The rat macrophage scavenger receptor CD163: expression, regulation and role in inflammatory mediator production. *Immunobiology.* 2006; 211: 419-425.
192. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011; 146: 873-887.
193. Powell JD, Elshtein R, Forest DJ, Palladino MA. Stimulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1alpha) protein in the adult rat testis following ischemic injury occurs without an increase in HIF-1alpha messenger RNA expression. *Biol Reprod.* 2002; 67: 995–1002.

194. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 1997; 57: 4593-4599.
195. Pugh-Humphreys RG. Macrophage-neoplastic cell interactions: implications for neoplastic cell growth. *FEMS Microbiol Immunol.* 1992; 5: 289-308.
196. Reyes JG, Farias JG, Henríquez-Olavarrieta S, Madrid E, Parraga M, Zepeda AB, Moreno RD. The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012: 929285.
197. Riboldi E, Sozzani S, Presta M. Dendritic cells and angiogenesis. In: *Angiogenesis in Inflammation: Mechanism and Clinical Correlates*. Editors: Seed MP, Walsh DA. Birkhauser Basel. 2008: 29-43.
198. Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Heikura T, Puranen A, Kettunen MI, Kholová I, Kauppinen RA, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K, Ylä-Herttuala S. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res.* 2003; 92: 1098-1106.
199. Rissanen TT, Vajanto I, Hiltunen MO, Rutanen J, Kettunen MI, Niemi M, Leppänen P, Turunen MP, Markkanen JE, Arve K, Alhava E, Kauppinen RA, Ylä-Herttuala S. Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Fk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration. *Am J Pathol.* 2002; 160: 1393-1403.
200. Rival C, Guazzone VA, von Wulffe W, Hackstein H, Schneider E, Lustig L, Meinhardt A, Fijak M. Expression of co-stimulatory molecules, chemokine receptors and proinflammatory cytokines in dendritic cells from normal and chronically inflamed rat testis. *Mol Hum Reprod.* 2007; 13: 853-861.
201. Rival C, Lustig L, Iosub R, Guazzone VA, 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.* 2006a; 324: 311-318.
202. Rival C, Theas MS, Guazzone VA, Lustig L. Interleukin-6 and IL-6 receptor cell expression in testis of rats with autoimmune orchitis. *J Reprod Immunol.* 2006b; 70: 43-58.

203. Rival C, Theas MS, Suescun MO, Jacobo P, Guazzone V, van Rooijen N, Lustig L. Functional and phenotypic characteristics of testicular macrophages in experimental autoimmune orchitis. *J Pathol.* 2008; 215: 108-117.
204. Rosen EM, Lamszus K, Laterra J, Polverini PJ, Rubin JS, Goldberg ID. HGF/SF in angiogenesis. *Ciba Found Symp.* 1997; 212:215-26; discussion 227-9.
205. Rudolfsson SH, Wikström P, Jonsson A, Collin O, Bergh A. Hormonal regulation and functional role of vascular endothelial growth factor a in the rat testis. *Biol Reprod.* 2004; 70: 340-347.
206. Rugo HS. Bevacizumab in the treatment of breast cancer: rationale and current data. *Oncologist.* 2004; 9: 43-49.
207. Russell LD, Sinha Hikim AP, Ettl R, Clegg ED. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis.* Cache River Press, Clearwater, Florida, 1990.
208. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008; 133: 775-787.
209. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood.* 2000; 96: 34-40.
210. Sasaki K, Kiuchi Y, Sato Y, Yamamori S. Morphological analysis of neovascularization at early stages of rat splenic autografts in comparison with tumor angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 1991; 265: 503-510.
211. Schmid MC y Varner JA. Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *J Oncol.* 2010; 2010: 201026.
212. Schuppe HC y Meinhardt A. Immune privilege and inflammation of the testis. *Chem Immunol Allergy.* 2005; 88: 1-14.
213. Schuppe HC, Meinhardt A, Allam JP, Bergmann M, Weidner W, Haidl G. Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? *Andrologia.* 2008; 40: 84-91.

214. Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner W. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Dtsch Arztebl Int.* 2017; 114: 339-346.
215. Seabrook TJ, Littlewood-Evans A, Brinkmann V, Pöllinger B, Schnell C, Hiestand PC. Angiogenesis is present in experimental autoimmune encephalomyelitis and pro-angiogenic factors are increased in multiple sclerosis lesions. *J Neuroinflammation.* 2010; 7: 95.
216. Seaman S, Stevens J, Yang MY, Logsdon D, Graff-Cherry C, St Croix B. Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell.* 2007; 11: 539-554.
217. Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, Shibuya M. A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene.* 1995; 10: 135-147.
218. Selvaraj D, Gangadharan V, Michalski CW, Kurejova M, Stösser S, Srivastava K, Schweizerhof M, Waltenberger J, Ferrara N, Heppenstall P, Shibuya M, Augustin HG, Kuner R. A Functional Role for VEGFR1 Expressed in Peripheral Sensory Neurons in Cancer Pain. *Cancer Cell.* 2015; 27: 780-796.
219. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda).* 2004; 19: 176–182.
220. Setchell B y Breed W. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil E, Neill JD (Eds). *The Physiology of Reproduction.* 1994: 1063-1175.
221. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 1995; 376: 62-66.
222. Sharpe RM y Cooper I. Testicular interstitial fluid as a monitor for changes in the intratesticular environment in the rat. *J Reprod Fertil.* 1983; 69: 125-135.
223. Sharpe RM, Cooper I, Doogan DG. Increase in Leydig cell responsiveness in the unilaterally cryptorchid rat testis and its relationship to the intratesticular levels of testosterone. *J Endocrinol.* 1984; 102: 319–327.

224. Shi Q, Le X;Wang B, Abbruzzese JL, Xiong Q, He Y, Xie K. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells. *Oncogene*. 2001; 20: 3751–3756.
225. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem*. 2013b; 153: 13-9.
226. Shibuya M. VEGFR and type-V RTK activation and signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013a; 5: a009092.
227. Shinkai A, Ito M, Anazawa H, Yamaguchi S, Shitara K, Shibuya M. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1998; 273: 31283-31288.
228. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, García-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*. 1998; 281: 1683-1686.
229. Simons M. An inside view: VEGF receptor trafficking and signaling. *Physiology (Bethesda)*. 2012; 27: 213-222
230. Singh RK, Gutman M, Bucana CD, Sanchez R, Llansa N, Fidler IJ. Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92) :4562-4566.
231. Sisman AR, Kiray M, Camsari UM, Evren M, Ates M, Baykara B, Aksu I, Guvendi G, Uysal N. Potential novel biomarkers for diabetic testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats: nerve growth factor Beta and vascular endothelial growth factor. *Dis Markers*. 2014; 2014: 108106.
232. Skirnisdottir I, Seidal T, Åkerud H. The relationship of the angiogenesis regulators VEGF-A, VEGF-R1 and VEGF-R2 to p53 status and prognostic factors in epithelial ovarian carcinoma in FIGO-stages I-II. *Int J Oncol*. 2016; 48: 998-1006.

233. Slaton JW, Perrotte P, Inoue K, Dinney CP, Fidler IJ. Interferon-alpha-mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule. *Clin Cancer Res.* 1999; 5: 2726-2734.
234. St Clair EW. Interleukin 10 treatment for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1999; 58: 199-1102.
235. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem.* 1995; 270: 27348-27357.
236. Subimerb C, Pinlaor S, Lulitanond V, Khuntikeo N, Okada S, McGrath MS, Wongkham S. Circulating CD14(+) CD16(+) monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma. *Clin Exp Immunol.* 2010; 161: 471-479.
237. Suenaga M, Mashima T, Kawata N, Wakatsuki T, Horiike Y, Matsusaka S, Dan S, Shinozaki E, Seimiya H, Mizunuma N, Yamaguchi K, Yamaguchi T. Serum VEGF-A and CCL5 levels as candidate biomarkers for efficacy and toxicity of regorafenib in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016; 7: 34811-34823.
238. Suescun MO, Rival C, Theas MS, Calandra RS, Lustig L. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of autoimmune orchitis in rats. *Biol Reprod.* 2003; 68: 2114-2121.
239. Suescun MO, Calandra RS, Lustig L. Increased testosterone production in vitro by Leydig cells from rats with severe autoimmune orchitis. *Int J Androl.* 1997; 20: 339-346.
240. Suescun MO, Lustig L, Calandra RS, Calandra RS, Groome NP, Campo S. Correlation between inhibin secretion and damage of seminiferous tubules in a model of experimental autoimmune orchitis. *J Endocrinol.* 2001; 170: 113-120.
241. Sumbayev VV y Yasinska IM. Mechanisms of hypoxic signal transduction regulated by reactive nitrogen species. *Scand J Immunol.* 2007; 65: 399-406.
242. Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 1994; 55: 410-422.

243. Suominen J y Söderström KO. Lymphocyte infiltration in human testicular biopsies. *Int J Androl*. 1982; 5: 461-466.
244. Szekanecz Z, Besenyei T, Szentpétery A, Koch AE. Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2010; 22: 299-306.
245. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109: 227-241.
246. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999; 5: 434-438.
247. Tasaki Y, Nishimura R, Shibuya M, Lee HY, Acosta TJ, Okuda K. Expression of VEGF and its receptors in the bovine endometrium throughout the estrous cycle: effects of VEGF on prostaglandin production in endometrial cells. *J Reprod Dev*. 2010; 56: 223-229.
248. Taurog JD, Rival C, van Duivenvoorde LM, Satumtira N, Dorris ML, Sun M, Shelton JM, Richardson JA, Hamra FK, Hammer RE, Tung KS. Autoimmune epididymoorchitis is essential to the pathogenesis of male-specific spondylarthritis in HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum*. 2012; 64: 2518-2528.
249. Taylor PC. VEGF and imaging of vessels in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2002; 4: S99-107.
250. Theas S, Rival C, Lustig L. Germ cell apoptosis in autoimmune orchitis: involvement of the Fas-FasL system. *Am J Reprod Immunol*. 2003; 50: 166-176.
251. Tian R, Yang S, Zhu Y, Zou S, Li P, Wang J, Zhu Z, Huang Y, He Z, Li Z. VEGF/VEGFR2 Signaling Regulates Germ Cell Proliferation in vitro and Promotes Mouse Testicular Regeneration in vivo. *Cells Tissues Organs*. 2016; 201: 1-13.
252. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*. 1991; 266: 11947-11954.

253. Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF $\alpha$  and IL-1 $\alpha$ . *Int J Cancer*. 2000; 85: 182-188.
254. Tung KS, Harakal J, Qiao H, Rival C, Li JC, Paul AG, Wheeler K, Pramoonjago P, Grafer CM, Sun W, Sampson RD, Wong EW, Reddi PP, Deshmukh US, Hardy DM, Tang H, Cheng CY, Goldberg E. Egress of sperm autoantigen from seminiferous tubules maintains systemic tolerance. *J Clin Invest*. 2017; 127: 1046-1060.
255. Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler HP. Molecular mediators of angiogenesis. *J Burn Care Res*. 2010; 31: 158-175.
256. Uysal N, Sisman AR, Dayi A, Aksu I, Cetin F, Gencoglu C, Tas A, Buyuk E. Maternal exercise decreases maternal deprivation induced anxiety of pups and correlates to increased prefrontal cortex BDNF and VEGF. *Neurosci Lett*. 2011; 505: 273-278.
257. van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis*. 2008; 11: 91–99.
258. Volpert OV, Fong T, Koch AE, Peterson JD, Waltenbaugh C, Tepper RI, Bouck NP. Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *J Exp Med*. 1998; 188: 1039-1046.
259. von Marschall Z, Scholz A, Cramer T, Schäfer G, Schirner M, Oberg K, Wiedenmann B, Höcker M, Rosewicz S. Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95: 437-448.
260. Vukanovic J, Isaacs JT. Linomide inhibits angiogenesis, growth, metastasis, and macrophage infiltration within rat prostatic cancers. *Cancer Res*. 1995; 55: 1499-1504.
261. Wang C, Duan H, He L. Inhibitory effect of atractylenolide I on angiogenesis in chronic inflammation in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol*. 2009; 612: 143-152.
262. Wang GL y Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1995; 270: 1230–1237.



263. Wang M, Fijak M, Hossain H, Markmann M, Nüsing RM, Lochnit G, Hartmann MF, Wudy SA, Zhang L, Gu H, Konrad L, Chakraborty T, Meinhardt A, Bhushan S. Characterization of the Micro-Environment of the Testis that Shapes the Phenotype and Function of Testicular Macrophages. *J Immunol*. 2017; 198: 4327-4340.
264. Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis*. 2004; 7: 335-345.
265. Weber AJ, De Bandt M, Gaudry M. Immunohistochemical analysis of vascular endothelial growth factor expression in severe and destructive rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2000; 27: 2284-2286.
266. Weidner W, Pilatz A, Diemer T, Schuppe HC, Rusz A, Wagenlehner F. Male urogenital infections: impact of infection and inflammation on ejaculate parameters. *World J Urol*. 2013; 31: 717-723
267. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther*. 2008; 7: 3129-3140
268. Wilkinson-Berka JL, Rana I, Armani R, Agrotis A. Reactive oxygen species, Nox and angiotensin II in angiogenesis: implications for retinopathy. *Clin Sci (Lond)*. 2013; 124: 597-615.
269. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res*. 2003; 22: 1-29.
270. Witte L, Hicklin DJ, Zhu Z, Pytowski B, Kotanides H, Rockwell P, Böhlen P. Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy. *Cancer Metastasis Rev*. 1998; 17: 155-161.
271. Xia C, Meng Q, Liu LZ, Rojanasakul Y, Wang XR, Jiang BH. Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res*. 2007; 67: 10823-10830.
272. Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Sharma V. Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9: XE01-XE05.

273. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000; 407: 242–248.
274. Yıldırım C, Nieuwenhuis S, Teunissen PF, Horrevoets AJ, van Royen N, van der Pouw Kraan TC. Interferon-Beta, a Decisive Factor in Angiogenesis and Arteriogenesis. *J Interferon Cytokine Res*. 2015; 35: 411-420.
275. Ylä-Herttuala S y Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med*. 2003; 9: 694-701.
276. Ylä-Herttuala S y Martin JF. Cardiovascular gene therapy. *Lancet*. 2000; 355: 213-222.
277. Young KA y Nelson RJ. Short photoperiods reduce vascular endothelial growth factor in the testes of *Peromyscus leucopus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 279: R1132-1137.
278. Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor1- $\alpha$  and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia inducible factor- $\alpha$ . *J Biol Chem*. 2003; 278: 15911–15916.
279. Zhang W, Ran S, Sambade M, Huang X, Thorpe PE. A monoclonal antibody that blocks VEGF binding to VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibits vascular expression of Flk-1 and tumor growth in an orthotopic human breast cancer model. *Angiogenesis*. 2002; 5: 35-44.
280. Zhao S, Zhu W, Xue S, Han D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell Mol Immunol*. 2014; 11: 428-437.
281. Zogakis TG y Libutti SK. General aspects of anti-angiogenesis and cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2001; 1: 253-275.