



Centro de Investigaciones en Bioquímica
Clínica e Inmunología
CIBICI-CONICET.

Departamento de Bioquímica Clínica.
Facultad de Ciencias Químicas.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA



TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Linfocitos Th1, Th17 y T regulatorios en cepas de ratones con diferente susceptibilidad al desarrollo de Prostatitis Autoinmune Experimental: rol del receptor CXCR3 en la migración e infiltración al tejido prostático”

Lic. en Bioq. Maria Laura Breser

Director de Tesis: Prof. Dra. Virginia Elena Rivero

Córdoba, Argentina
2013

Comisión Asesora

Dra. Laura Cervi

Dra. Miriam Virgolini

Dr. Gustavo Nores

Evaluador Externo

Dr. Norberto W. Zwirner

El presente trabajo de tesis fue financiado gracias al apoyo económico obtenido a través de becas y subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FONCyT) y a la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (Secyt-UNC).

A mis padres,

A mi hermano

A Alfredo

Agradecimientos

Al llegar al punto donde el objetivo inicialmente planteado parece encontrar su realización, no queda más que redactar uno de los capítulos más satisfactorio de este trabajo, los agradecimientos. Y aunque agradecer parezca sencillo, las palabras que puedan ser escritas siempre serán escasas para expresar la enorme gratitud que siento en este momento hacia la gran cantidad de personas a las que no me gustaría dejar pasar por alto.

De manera muy especial, quiero agradecer a Vicky por haber confiado en mí, y haberme guiado y enseñado durante todos estos años; y a quien nunca podré retribuir como merecería su gran dedicación humana y científica a lo largo de mi formación. Pero sin lugar a duda, quiero agradecerle profundamente por contagiar ese gran entusiasmo por la ciencia, la docencia y la búsqueda de nuevos desafíos sin perder jamás de vista la brújula y el compromiso.

A los miembros de mi comisión de tesis, los Doctores Miriam Virgolini, Laura Cervi y Gustavo Nores, por su gran predisposición, respeto y criterio en mi formación personal, por asesorarme y colaborar activamente durante todo el proceso.

A la Dra. Clelia Riera por ser causa de un gran orgullo y fuente de inspiración constante. Gracias por ayudarnos a volar con su gran experiencia personal, científica y académica, enseñándonos día a día el valor de la vocación sin límites.

A mis compañeros de grupo por siempre tender la mano de manera desinteresada, o simplemente un hombro donde apoyarse para compartir las buenas y las malas. A mis primero maestros Rubén y al “famoso JP” quiero agradecerles por toda la dedicación y amor con que me enseñaron cada día lo mejor de ustedes. A Leo por aportar siempre una cuota de humor a cada situación y por tantas alegrías y tristezas compartidas. A Euge que a pesar de su corto tiempo, nos dejó conocer a una gran persona. A las nuevas integrantes del grupo Elsita y Janet por su gran predisposición y frescura.

A todos los compañeros del laboratorio por hacer que las horas pasadas dentro de la facultad se conviertan en mejores momentos. Gracias a todos y cada uno de ellos desde lo más profundo de mi corazón por compartir cada instante, los buenos y felices así como también los malos y frustrantes. Ya que la alegría compartida se multiplica, mientras que las penas compartidas se dividen....por eso muchas gracias a Vico, Magda, Mauri, Gera, Sol, Cari, así como también a los más jóvenes que inyectaron esa cuota de frescura y alegría: Sole (original), Bibi, Naty, Bachi, Angela, Sole M., Paula, Emi, Ceci, Lucho y Nico. Por poner siempre su mayor predisposición para que las cosas funcionen del mejor modo y siempre generar un trato afectivo y cordial no quería dejar de agradecer de una manera profunda y sincera a Silvia, Claudia, Ceci y Paula por todas sus colaboraciones y grandes enseñanzas.

A todos los integrantes de los demás laboratorios que a pesar de las barreras no han sido impedimentos para estrechar una mano, un consejo, una charla o simplemente un mate, por ello quería agradecer a los integrantes de laboratorio de Chagas: Dany, Meli SG, Andre, Jime, Carito, Fer, Augusto, Colo, Luisi, Nicopon, Ceci, Lau, Eli, Antonio, Tamara, Caro, Facu y Cris. Aunque también a todos los directores del laboratorio de Chagas que siempre han demostrado un excelente trato con una muy buena predisposición en todo momento como Adriana, Caro, Eva, Cinthia, Susi, Naty, Cristina, Fabio, Pilar y Horacio.

A todos los integrantes del laboratorio 9 Dany, Javi, JPRamos, Lupe, Emi, Anita y a sus directores Pablo y Ana, los cuales siempre han brindado una cordial y buena predisposición.

A todos los integrantes del laboratorio de Histología, Carito, Estefi, Ines, Romi, Flor, Fer, Belkys, Cristina y Gabriel que siempre han demostrado una gran cordialidad y ayuda desinteresada.

A todos los integrantes del laboratorio de Parasito y Mico por su generoso trato y predisposición, especialmente a Cristian.

A todos los integrantes del Departamento de Bioquímica Clínica-CIBICI por la colaboración recibida en cada momento. A todos los que con su compromiso y esfuerzo

diario hacen que las cosas funcionen mejor cada día por eso mi profundo agradecimiento para Adri, Laura, Luis y Fabri Navarro, Ale, Pilar y Paula.

También quería agradecer especialmente a la Dra. Jocelyne Demengeot, directora del Instituto Gulbenkian de Ciência en Oerias, Portugal y a todos los integrantes del laboratorio Lymphocyte physiology, Andreia, Elodie, Catarina, Lisa, Marie, Ricardo, Ana y Rosa, por haberme brindado una excelente estadía en lo personal y profesional, ofreciéndome siempre además de su amistad las mejores oportunidades de aprender y crecer junto a ellos. Tampoco puedo dejar de agradecer a 2 personas que fueron muy importantes en mis estadías como Clara y Reeta, grandes personas que la vida me puso en el camino.

A todo el Hospital Córdoba por su gran formación y en especial a la Dra. Marcela Demarchi por transmitir su calidez humana y su pasión por la inmunología.

...A mis amigos a los viejos, a los nuevos, a los de siempre a todas esas personas que me han hecho muy feliz durante toda mi vida Vicky, Val, Marcos, Lucho, Hil, Naty, Florcis, Fer, Dan, Vico y Magda, a mis amigas con las que curse toda la facultad y tengo los mejores recuerdos Flor, Bea, Lucre, Lau y Caro, a las amigas que nacieron entre las guardias y los pasillos del hospi, las que me han hecho pasar momentos increíbles Mari, Anita, Naty y Vicky gracias por todo.

A mi familia política, por ser tan cálida y generosa, apoyándome de manera desinteresada, abriéndome las puertas de su casa con todo su amor y respeto.

...A mis padres por estar siempre y en todo momento, por tener una esencia maravillosa llena de libertad y amor incondicional, a los que les debo no solo la vida misma, sino la persona en la que hoy me convertí. A mi hermano por todos estos años compartidos. A mis abuelas Irma y Carmen dos maravillosas personas que llenaron mi vida de amor y sabios consejos, a quienes admiro profundamente. A mis tías en especial a Raquel y Lili, que a pesar de las distancias han estado siempre ahí firmes apoyándome, ofreciendo su mejor esfuerzo para que todo salga mejor. A mis primos Ro, Luz y Pedrito hermosos acompañantes de la vida...

Y por último quiero agradecer de manera muy especial a mi compañero de camino en esta vida, Alfredo, la persona más maravillosa, sincera y generosa que conozco, que no solo confía en mí y me hace feliz cada día, sino que me apoya y ama de una manera incondicional. Gracias por todo, mi amor....

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....1

RESUMEN.....5

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....8

Introducción general 9

Respuestas autoinmunes y Enfermedades autoinmunes 19

Prostatitis autoinmune 24

CAPITULO II: OBJETIVOS.....29

CAPITULO III: RESULTADOS.....31

**PARTE I. Perfil de Respuesta inmune y tipo de lesión en tres cepas con
diferente susceptibilidad a PAE 33**

I-I: Caracterización del tipo de respuesta inmune específica que se induce luego de la inmunización de ratones con diferente susceptibilidad al desarrollo de PAE.	35
I-II: Caracterización del tipo de lesión que se induce luego de la inmunización de ratones con diferente susceptibilidad al desarrollo de PAE.	39
I-III: Balance entre las poblaciones de LT efectores y regulatorios en ratones con distinta susceptibilidad a PAE.	41
I-IV: Efecto de la depleción de células T regulatorias en la susceptibilidad de ratones NOD, C57Bl/6 y BALB/c al desarrollo de PAE.	43
<u>PARTE II. Rol del IFNγ en la susceptibilidad a desarrollar PAE.</u>	53
II-I: Caracterización del tipo de respuesta inmune específica que se induce luego de la inmunización de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} con antígenos prostáticos.	53
II-II: Efecto de la administración de IFN γ recombinante (rIFN γ) en la susceptibilidad de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} a desarrollar PAE.	58
II-III: Rol de los LT regulatorios en la fase inductora de la respuesta inmune frente a antígenos prostáticos en ratones incapaces de inducir un fenotipo Th1/Tc1.	62
<u>PARTE III. Receptores de quimiocinas en LT específicos de ratones con diferente susceptibilidad a PAE.</u>	67
III-I: Análisis de la expresión de los receptores de quimiocinas en LT específicos presentes en ratones NOD, C57Bl/6, BALB/c y NOD-IFN γ ^{-/-} luego de la inmunización con antígenos prostáticos emulsificados en CFA.	69

III-II: Expresión de receptores de quimiocinas en LT de ratones NOD, C57BL/6, BALB/c y NOD-IFN γ ^{-/-} tratados con un anticuerpo monoclonal IgG control o α CD25.	72
III-III: Expresión diferencial de los receptores de quimiocinas en la superficie de los LT y su relación con la capacidad de migrar e infiltrar la glándula prostática.	76
III-IV: Análisis en la expresión de receptores de quimiocinas en la superficie de los LT y su capacidad de migrar e infiltrar la glándula prostática luego del tratamiento <i>in vitro</i> con rIFN γ .	80
<u>PARTE IV.</u> Expresión de quimiocinas en próstata de ratones normales y luego de la inducción de PAE.	85
IV-I: Expresión de quimiocinas en tejidos prostáticos de ratones NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} controles.	86
IV-II: Expresión de quimiocinas en tejidos prostáticos de ratones NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} inmunizados con antígenos prostáticos y adyuvantes.	89
<u>PARTE V.</u> Rol de los receptores CXCR3 y CCR5 en la migración de LT específicos hacia el tejido prostático.	96
V-I: Capacidad de LT CXCR3 ⁺ y CCR5 ⁺ de infiltrar el tejido prostático de ratones receptores NOD-SCID.	97
V-II: Efecto de la administración <i>in vivo</i> de un antagonista mimético de CXCR3 y CCR5 (TAK-779) sobre la capacidad de LT de infiltrar la glándula prostática.	100

CAPITULO IV: DISCUSIÓN.....104

CAPITULO V: MATERIALES Y MÉTODOS.....126

Obtención de proteínas utilizadas en los protocolos de inmunización	127
Purificación del autoantígeno: Prostateína	127
Animales utilizados	128
Modelo experimental de inmunización	128
Análisis histológicos de las glándulas prostáticas	128
Inmunohistoquímica	129
Obtención de células infiltrantes de próstata y páncreas	129
Obtención de células mononucleares de bazo y ganglios linfáticos	130
Determinación de citoquinas en sobrenadantes de cultivo	130
Análisis de citometría de flujo para marcadores celulares de superficie e intracelular	131
Análisis de expresión de quimiocinas y citoquinas en el tejido prostático	132
Depleción <i>in vivo</i> de células T regulatorias	132
Administración <i>in vivo</i> de rIFN γ	133
Transferencia adoptiva de diferentes subpoblaciones de LT a ratones receptores	134
Tratamiento con el antagonista de receptores de quimiocinas TAK-779	135

Análisis estadístico	135
CAPITULO VI: BIBLIOGRAFÍA.....	136
CAPITULO VII: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	157
Publicaciones científicas en revistas con arbitraje	158
Premio obtenido	158
Presentaciones a congresos	159
Nacionales	159
Internacionales	160

Abreviaturas

Abreviaturas

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígenos
APC	Aloficocianina
AR	Artritis Reumatoide
BCR	Receptor del linfocito B
Bz	Bazo
CCL	Quimiocinas (β quimiocinas)
CCR	Receptores de β quimiocinas
CD	Célula dendrítica
CFA	Adyuvante Completo de Freund
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CP/CPPS	Síndrome de dolor pélvico crónico
CPA	Célula presentadora de antígeno
CXCL	Quimiocinas (α quimiocinas)
CXCR	Receptores de α quimiocinas
DAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Daño
DE	Desviación Estándar
EAE	Encefalomiелitis Autoinmune Experimental
ELISA	Enzimoimmunoensayo
EM	Esclerosis múltiple
EP	Extracto prostático

FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GL	Ganglios linfáticos
GLp	Ganglios linfáticos drenantes de próstata
H/E	Hematoxilina/Eosina
hs	horas
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenoso
IFN	Interferón
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
Iono	Ionicina
IRF	Factor Regulador de Interferón
LB	Linfocito B
LT	Linfocito T
LTc	Linfocito T citotóxico
LTh	Linfocito T helper o cooperador
LThf	Linfocito T helper foliculare
mg	Miligramo
mL	Mililitro
ng	Nanogramo
NOD	No Obesos Diabéticos
NOD-IFN γ ^{-/-}	No Obesos Diabéticos deficientes en la producción de IFN γ
PAE	Prostatitis Autoinmune Experimental
PAg	mezcla de antígenos prostáticos
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

PAP	Fosfatasa Ácida Prostática
PBS	Solución de Buffer Fosfato
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Clorofila Peridina
PMA	Ésteres de forbol miristato
PSA	Antígeno Específico Prostático
PSBP	Prostateína (Prostate Steroid Binding Protein)
rIFN γ	Interferón γ recombinante
SBF	Suero Bovino Fetal
SD	Desviación Estándar
SI	Sistema inmune
SNC	Sistema nervioso central
TAK-779	Antagonista mimético de los receptores CXCR3 y CCR5
TCR	Receptor del linfocito T
Tef	Linfocito T efectores
TGF β	Factor de crecimiento transformante β
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
Tr1	Linfocito T regulador tipo 1
Treg	Linfocito T regulatorio Foxp3 ⁺
UI	Unidades internacionales

Resumen

El modelo de Prostatitis Autoimmune Experimental (PAE) es considerado una herramienta útil para el estudio de la enfermedad humana Prostatitis Crónica, Síndrome del dolor pélvico crónico (CP/CPPS), una de las enfermedades más prevalentes en la clínica urológica masculina en la que se postula una etiología autoinmune. En la presente tesis se trabajó con este modelo animal analizando en primer lugar los perfiles de activación de los linfocitos T (LT) específicos que se inducen luego de la inmunización de ratones de diferentes cepas con antígenos prostáticos. Se estudiaron cepas con distinta susceptibilidad a desarrollar PAE: las cepas NOD (alta susceptibilidad), C57Bl/6 (susceptibilidad media) y BALB/c (resistente). A pesar que las tres cepas desarrollaron una respuesta inmune celular específica hacia antígenos prostáticos luego de la inmunización, la lesión del órgano blanco se observó principalmente en la cepa NOD y en menor medida en la cepa C57Bl/6, encontrándose ausente en ratones de la cepa BALB/c. Ratones de las cepas NOD y C57Bl/6 presentaron importantes cantidades de LT infiltrando la próstata y la presencia en periferia de una respuesta celular específica asociada a un fenotipo Th1/Th17, con bajos niveles de células Tr1 y Treg (Foxp3⁺). La cepa resistente BALB/c, mostró muy escasa infiltración en la próstata compuesta principalmente por monocitos/macrófagos con una respuesta celular periférica específica asociada principalmente al fenotipo Th17, con frecuencias elevadas de células regulatorias Tr1 y Treg. Al inmunizar ratones de la cepa NOD deficiente en IFN γ (NOD-IFN γ ^{-/-}) se observó una ausencia de infiltrado prostático en presencia de una respuesta celular específica periférica con un perfil dominante Th17 y con una moderada frecuencia de células Tr1 y Treg. Cuando evaluamos los niveles de linfocitos Treg y LT efectores (Tef) se observaron valores de Treg similares en todas las cepas, con niveles significativamente mayores de Tef en las cepas susceptibles. La eliminación transitoria de células Treg previo a la inmunización favoreció el desarrollo de LT específicos con perfil Th1 en las tres primeras cepas, perfil que se asoció con una mayor infiltración y lesión prostática. La eliminación de células Treg en ratones NOD-IFN γ ^{-/-}, en los que el perfil Th1 no puede ser inducido, generó un aumento importante de LT específicos con un perfil Th17, sin modificar la infiltración leucocitaria y/o lesión en el tejido prostático. Cuando ratones NOD-IFN γ ^{-/-} fueron inyectados por vía intraperitoneal (i.p.) con IFN γ recombinante (rIFN γ) se observó un incremento importante en la infiltración prostática, indicando que no era necesario que los LT secreten IFN γ para

infiltrar la glándula. Estos resultados sugirieron que el IFN γ podría jugar un rol importante en el control de la migración de los LT específicos hacia el tejido prostático.

El análisis de la expresión de receptores de quimiocinas en LT específicos de las diferentes cepas demostró que LT de ratones NOD y C57Bl/6 tenían un alta frecuencia de células CXCR3⁺CCR5⁺, mientras que los LT provenientes de ratones BALB/c y NOD-IFN γ ^{-/-} expresaban principalmente CCR6⁺. Para determinar si la expresión diferencial de receptores de quimiocinas le otorgaba a los LT específicos diferentes capacidades migratorias, LT específicos de ratones NOD o NOD-IFN γ ^{-/-} fueron purificados y transferidos adoptivamente a ratones receptores NOD-SCID. Al evaluar la recirculación y la capacidad de llegar al tejido prostático se observó que sólo los LT provenientes de ratones NOD eran capaces de llegar a la glándula prostática de los animales receptores e inducir además reclutamiento de células inmunes. LT específicos de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} re-estimulados *in vitro* con el autoantígeno en presencia de rIFN γ presentaron una clara inducción de los receptores CXCR3⁺CCR5⁺. Al transferir adoptivamente estos LT estimulados *in vitro* en presencia de rIFN γ se demostró una infiltración marcada y reclutamiento de otras células inmunes en próstata de ratones receptores. Se realizaron además transferencias adoptivas de LT específicos CD3⁺CXCR3⁻ o CD3⁺CXCR3⁺ y se demostró una capacidad mayor de llegar a próstata e infiltrar en los LT CXCR3⁺. Además el bloqueo *in vivo* de los receptores CXCR3 y CCR5 mediante el uso de un péptido antagonista mimético inhibió significativamente la llegada de LT específicos a la glándula prostática. En concordancia con los hallazgos obtenidos en relación a receptores de quimiocinas involucrados en PAE, se demostró una expresión basal de quimiocinas ligandos de CXCR3 y CCR5 en próstata de la cepa susceptible y un incremento marcado de las mismas luego de la instauración de la enfermedad.

Nuestros hallazgos demuestran que la expresión de los receptores CXCR3 y CCR5 en la superficie de los LT es esencial para conferirle a estos la capacidad de alcanzar el tejido prostático e inducir un microambiente que genere el reclutamiento de un mayor número de células. Estos resultados podrían ser significativos para el diseño de nuevas terapias que resulten efectivas para bloquear o favorecer la llegada de células inmunes al tejido prostático en procesos autoinmunes o infecciosos/neoplásicos.

Introducción

El sistema inmune (SI) está formado por un conjunto de estructuras, tejidos, células y moléculas que tienen como finalidad defendernos de agentes patógenos y procesos biológicos anómalos a través de la identificación y destrucción de los mismos. Para llevar a cabo estas funciones, debe poder distinguir perfectamente entre cuáles son los antígenos presentes en los tejidos propios de todo el organismo y cuáles no lo son.

El SI es un sistema extremadamente complejo que se encuentra protegiendo todo el organismo. Los órganos que lo conforman se pueden dividir en tejidos linfáticos primarios (medula ósea y timo) y secundarios (bazo, ganglios linfáticos y tejidos linfoides asociados a mucosas). En los órganos linfáticos primarios es donde se generan las células que componen el SI, mientras que los secundarios son los lugares donde estas células se alojan, se activan, y es donde se inducen las respuestas colaborativas con las células del entorno.

Funcionalmente el SI se clasifica en base a sus características en SI innato y SI adaptativo. El SI innato es el conjunto de mecanismos que involucran las primeras barreras de defensa contra los microorganismos, generando las primeras señales que van a actuar amplificando y modulando el tipo de respuesta inmune adaptativa que se va a inducir posteriormente y que se va a perpetuar con el tiempo. Los componentes de la inmunidad innata han sido detectados en organismos menos evolucionados como los invertebrados, mientras que la inmunidad adaptativa se caracteriza por poseer mecanismos muchos más sofisticados que involucran la inducción de una respuesta inmune específica, tolerancia y memoria inmunológica, la cual sólo está presente en los organismos vertebrados (Ezekowitz R.A.B., 1996; Fearon D.T., 1996).

El SI innato actúa como la primera línea de defensa contra los agentes que son reconocidos como extraños, involucrando mecanismos de reconocimiento de estructuras conservadas evolutivamente. Los principales componentes de la inmunidad innata son: las barreras físicas y químicas del organismo (epitelio, las sustancias químicas producidas por las superficies mucosas, etc); las células de la inmunidad innata (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos/monocitos, mastocitos, células NK, NKT, $LT\gamma\delta$ y las células dendríticas); y los componentes solubles de dicha inmunidad (sistema del complemento, citoquinas, quimiocinas, defensinas, péptidos antimicrobianos, etc) (Walker J.A., 2013). Los mecanismos de la inmunidad innata son rápidos y solo pueden distinguir entre

estructuras conservadas en los microorganismos (PAMPs) o macromoléculas asociadas a señales indicativas de daño tisular (DAMPs) (Roach J.C., 2005; Garg A.D., 2013). El reconocimiento de estas estructuras conservadas a través del SI innato se realiza por medio de receptores presentes en las células de la inmunidad innata que interaccionan con estas estructuras (PAMPs o DAMPs) generando una respuesta que va a depender del tipo de señal y de las condiciones del microambiente donde esto ocurra. La respuesta inmune innata generada va a ser esencial para la inducción del tipo y perfil de la respuesta inmune adaptativa (Ezekowitz R.A.B., 1996; Fearon D.T., 1996; Walker J.A., 2013).

A pesar que la inmunidad adaptativa necesita un tiempo de inducción, es capaz de recordar con gran especificidad y responder de forma más intensa y eficiente a exposiciones posteriores con el mismo antígeno, situación que se conoce como memoria inmunológica. Los principales componentes de la inmunidad adaptativa son las células llamadas linfocitos y los productos de su secreción. Existen 2 tipos de linfocitos, los linfocitos T (LT) y los linfocitos B (LB). Cada clon de LT o de LB expresa una única combinación de los receptores antigénicos de superficie llamados TCR (receptor de la célula T) o BCR (receptor de la célula B). En el caso del SI adaptativo, se generan millones de variabilidades de reconocimiento, las cuales son re-arregladas al azar, lo que produce un repertorio muy amplio de especificidades antigénicas. Los LT cuando se activan de manera específica ejercen sus funciones biológicas a través de la secreción de citoquinas, de la activación de otras células, de la inducción de apoptosis, entre otras cosas; mientras que los LB cuando se activan específicamente secretan citoquinas y se diferencian a células plasmáticas las cuales tienen la función de secretar los anticuerpos o inmunoglobulinas. Existen dos tipos de respuestas inmunes adaptativas, la respuesta inmune celular y la respuesta inmune humoral. Tanto la inmunidad humoral, mediada a través de los LB, o la inmunidad celular, generada por los LT, se basan en un amplio y variado repertorio de especificidades antigénicas distribuidos de manera clonal. Cada clon de LB o de LT reconoce un único motivo o epítipo antigénico determinado a través de su BCR o de su TCR. La existencia de una diversidad posible de 1.10^{14} clones diferentes de LB y de 1.10^{18} clones diferentes de LT, brinda la variabilidad adecuada para el reconocimiento de una amplia diversidad de epítipes extraños, aunque también una amplia variedad de epítipes propios (Waldmann T.A., 1987; Davis M.M., 1988; Fannig L.J., 1996; Nikolich-Zugich J.,

2004). Los linfocitos inmaduros dentro de los órganos linfáticos primarios son sometidos a una rigurosa selección con el fin de evitar que linfocitos que expresen BCRs o TCRs potencialmente autoreactivos puedan salir a periferia y causar daño. Durante esta selección aquellos linfocitos que expresan receptores con alta afinidad para antígenos propios son eliminados mediante un proceso conocido como tolerancia central (Nossal G.J., 1994; Nikolich-Zugich J., 2004).

La respuesta inmune adaptativa celular está a cargo de los LT, que emigran del timo como LT maduros *naive* o vírgenes presentando cada clon un TCR con una determinada especificidad, además de expresar los co-receptores CD4 o CD8. Los LT CD4⁺ o LT CD8⁺ vírgenes que salen del timo, comprenden a los cientos de millones de clones que componen el repertorio inmunológico que circulan por la sangre y por todos los órganos linfáticos secundarios, con el fin de encontrar su antígeno específico. Una vez que los LT vírgenes llegan a los órganos linfáticos secundarios, tienen la posibilidad de interactuar con las células presentadoras de antígeno (CPA). Las CPA son capaces de captar, procesar y presentar los antígenos y asociar pequeñas porciones de éstos a los complejos mayores de histocompatibilidad (CMH) clase I y II para poder activar a los LT vírgenes. Los LT vírgenes se activan a través de su TCR por el reconocimiento de secuencias antigénicas específicas asociadas a los CMH (expresados en la superficie de las CPA), además de las señales co-estimulatorias adecuadas, dadas por la interacción de las moléculas CD28 presente en los LT y CD80/CD86 presentes en las CPA activadas (Lenschow D.J., 1996). Cabe remarcar que los LT vírgenes que no reciban las 2 señales de activación (vía TCR y vía CD28) no se van a activar correctamente, conduciendo a los LT a un proceso de anergia irreversible que los llevará a la muerte celular. Las moléculas co-receptoras CD4 o CD8 expresadas en los LT estabilizan el reconocimiento antigénico en el momento de la presentación. Los LT CD4 van a estabilizar la interacción del TCR con el CMH clase II, mientras que los LT CD8 van a estabilizar la interacción del TCR con el CMH clase I (Gao G.F., 1997; Wu H., 1997; Rudolph M.G., 2006).

La respuesta inmune adaptativa humoral esta mediada por la producción de anticuerpos por parte de los LB activados de manera específica. A diferencia de los LT los LB no necesitan de las CPA para poder reconocer los antígenos (Rudolph M.G., 2006). Estas células son capaces de reconocer su antígeno específico soluble o asociado a una

partícula o a membranas a través de su BCR (Batista F.D., 2009). Para activar a un LB virgen e inducir una respuesta inmune adaptativa humoral, se necesita no sólo el reconocimiento del antígeno específico a través del BCR, sino que también de señales provistas por la colaboración con los LT a través de la interacción entre el CD40 (presente en el LT activado) con CD40L (expresado en LB). El LB virgen que reciba las 2 señales (BCR y CD40L) es capaz de activarse y entrar en el ciclo celular de proliferación y diferenciación a célula plasmática para poder posteriormente sintetizar y secretar anticuerpos (Batista F.D., 2009; Elgueta R., 2009). Los anticuerpos pueden unirse a su antígeno específico: actuando como neutralizante del antígeno e incrementar así su eliminación; como molécula opsonizante: favoreciendo la fagocitosis y la quimiotaxis; y también como un mecanismo efector: activando la vía clásica del complemento, generando la lisis del microorganismo y amplificando el proceso inflamatorio.

Una vez que los clones específicos de LT y de LB encuentran a su antígeno específico y son activados de manera correcta, se expanden para generar una mayor frecuencia de células específicas. Una fracción de esa amplificación va a ser diferenciada a células de memoria, mientras que las fracciones restantes de esa amplificación clonal van a llevar a cabo la función efectora. La fracción retenida y diferenciada a células de memoria puede durar por décadas (hasta toda la vida); siendo esta fracción de células, la responsable de generar una respuesta rápida y eficiente frente a un nuevo contacto con el mismo antígeno, lo que se conoce como memoria inmunológica (Batista F.D., 2009).

Por otro lado mientras los procesos de activación de LT y LB vírgenes están siendo llevados a cabo, las células reciben las señales presentes en el microambiente donde se produce este proceso, induciendo en las células características determinadas por estas señales. Los LB de acuerdo a las señales que reciban del medio donde se activen van a modificar el isotipo de los anticuerpos que produzcan, mientras que los LT como respuesta a esas señales van a inducir LT efectores con diferentes perfiles de secreción de citoquinas.

Los LT CD4⁺ o *helper* (LTh) vírgenes cuando se activan de manera específica para generar LT efectores y LT memoria, dependiendo las condiciones bajo las cuales se produce esta activación, inducirán LT con diferentes perfiles de activación. El concepto de que la misma célula T virgen, al activarse pueda diferenciarse en diferentes perfiles de

activación ha generado un paradigma en la inmunología moderna (Bluestone J.A., 2009; Zhu J., 2010 (a); Zhu J., 2010 (b)).

A los LTh se los puede clasificar en diferentes perfiles funcionales dependiendo de las citoquinas que ellos secreten cuando van a cumplir sus funciones. En base a la secreción de citoquinas los LTh efectores se clasifican en los fenotipos Th1, Th2, Th17, Tr1 y Treg entre los más importantes. Algunos autores han ampliado la lista de perfiles de activación agregando los fenotipos Th9, Thf, Th3, Th22 entre otros, aunque actualmente las condiciones de estabilidad y el compromiso de algunos de estos fenotipos están bajo una activa discusión (Bluestone J.A., 2009; Zhu J., 2010 (a); Zhu J., 2010 (b)).

Los perfiles funcionales de LTh están determinados por los patrones de citoquinas y condiciones presentes en el microambiente en donde se produce la presentación antigénica. El perfil de activación Th1 se induce bajo un microambiente favorecido por la presencia de IL-12p70 durante la presentación antigénica. Para este perfil se ha descrito necesaria la inducción de los factores de transcripción T-bet y STAT4. Este perfil de LT se identifica por la secreción de IFN γ , una citoquina pro-inflamatoria, descrita con un papel muy importante en la defensa contra bacterias, virus y tumores a través de la activación clásica de los macrófagos en los tejidos periféricos. Este perfil de activación ha sido asociado además a numerosos procesos inflamatorios crónicos y autoinmunes (Zhu J., 2010 (a); Zhu J., 2010 (b)) (Figura 1).

El perfil de activación Th17 se induce cuando la presentación antigénica se genera en un microambiente donde están presentes citoquinas como IL-6 y TGF β , este perfil se caracteriza por la inducción de factores de transcripción como Ror γ t y STAT3. Los LTh17 se identifican por la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias de la familia de la IL-17 (principalmente IL-17A e IL-17F) aunque también por la secreción de IL-21, IL-22 e IL-23. Todas las citoquinas producidas por este perfil tienen un rol importante en la defensa de ciertas infecciones bacterianas y micóticas, mientras que la producción de IL-17A se la ha relacionado íntimamente con procesos inflamatorios y autoinmunes, además de tener un fuerte impacto sobre la hematopoyesis y quimiotaxis de neutrófilos (Zhu J., 2010 (a); Zhu J., 2010 (b)) (Figura 1).

El perfil de activación Th2 se induce cuando la presentación antigénica es llevada a cabo bajo la presencia de altas concentraciones de IL-4 e IL-5, caracterizándose por la

inducción de los factores de transcripción GATA3 y STAT6. Este perfil de LT activados se caracteriza por la producción de citoquinas como IL-4, IL-5 e IL-13, las cuales han demostrado tener un papel fundamental en la defensa contra parásitos, activando a los macrófagos de manera alternativa e induciendo la activación de eosinófilos, mastocitos y favoreciendo también la producción de anticuerpos a través de la inducción de células plasmáticas (Zhu J., 2010 (a); Zhu J., 2010 (b)). Por otro lado cabe destacar que este fenotipo de activación está fuertemente involucrado en los procesos alérgicos (Figura 1).

La activación de todos los perfiles inflamatorios, tienen que tener estrictos procesos de control para evitar situaciones que se perpetúen en el tiempo causando daños funcionales irreparables dentro de los tejidos afectados. Es por ello que los LT vírgenes cuando se activan pueden generar LT efectores con un perfil regulatorio, dentro de los que podemos encontrar a los LT regulatorios tipo 1 (Tr1) y a los LT regulatorios Foxp3⁺ (Treg). Estos LT reguladores son esenciales para mantener la homeostasis inmunológica de LT y LB autoreactivos e involucrados en procesos inflamatorios severos (infecciones, trasplantes, enfermedades metabólicas, etc) que afecten la funcionalidad de los tejidos en la periferia. Los LTr1 se inducen cuando la presentación antigénica es llevada a cabo bajo la presencia de altas concentraciones de IL-10. Este perfil de activación se caracteriza por la expresión del factor de transcripción c-Maf y por la secreción de elevadas concentraciones de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (Zhu J., 2010 (b); Zhu J., 2010 (c)). Por otro lado los linfocitos Treg se inducen cuando la presentación antigénica se genera en un microambiente donde está presente la citoquina anti-inflamatoria TGFβ. Estas células se caracterizan por expresar el factor de transcripción dominante Foxp3 y adquieren características fenotípicas diferentes a otros LT activados, como la expresión de receptores de superficie GITR, CTLA-4, PD-1 y CD25. Las células Treg ejercen su función a través del contacto celular y de la liberación específica de grandes concentraciones de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGFβ (Josefowicz S.Z., 2012; Campbell D.J., 2011) (Figura 1).

Durante el proceso de diferenciación que sufren los LT vírgenes cuando se activan a los diferentes perfiles de LT efectores se han observado cambios en la expresión de receptores de recirculación linfocitaria. Se ha descrito que los LT vírgenes dejan de expresar los receptores de recirculación CCR7 y CD62L con el objetivo de poder egresar de

los órganos linfáticos accediendo a la circulación general y a los tejidos periféricos (Lewis M., 2008; Bradley L.M., 2003). En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento acerca de la importancia que tiene la expresión de los receptores de quimiocinas en la superficie de los LT efectores. Se ha reportado una asociación entre la expresión de determinados receptores quimiocinas con los diferentes perfiles de LT efectores (Groom J.R., 2011(b); Sallusto F., 1997; Sallusto F., 1998; Reboldi A., 2009; Bluestone J.A., 2009; O'Shea J.J., 2010).

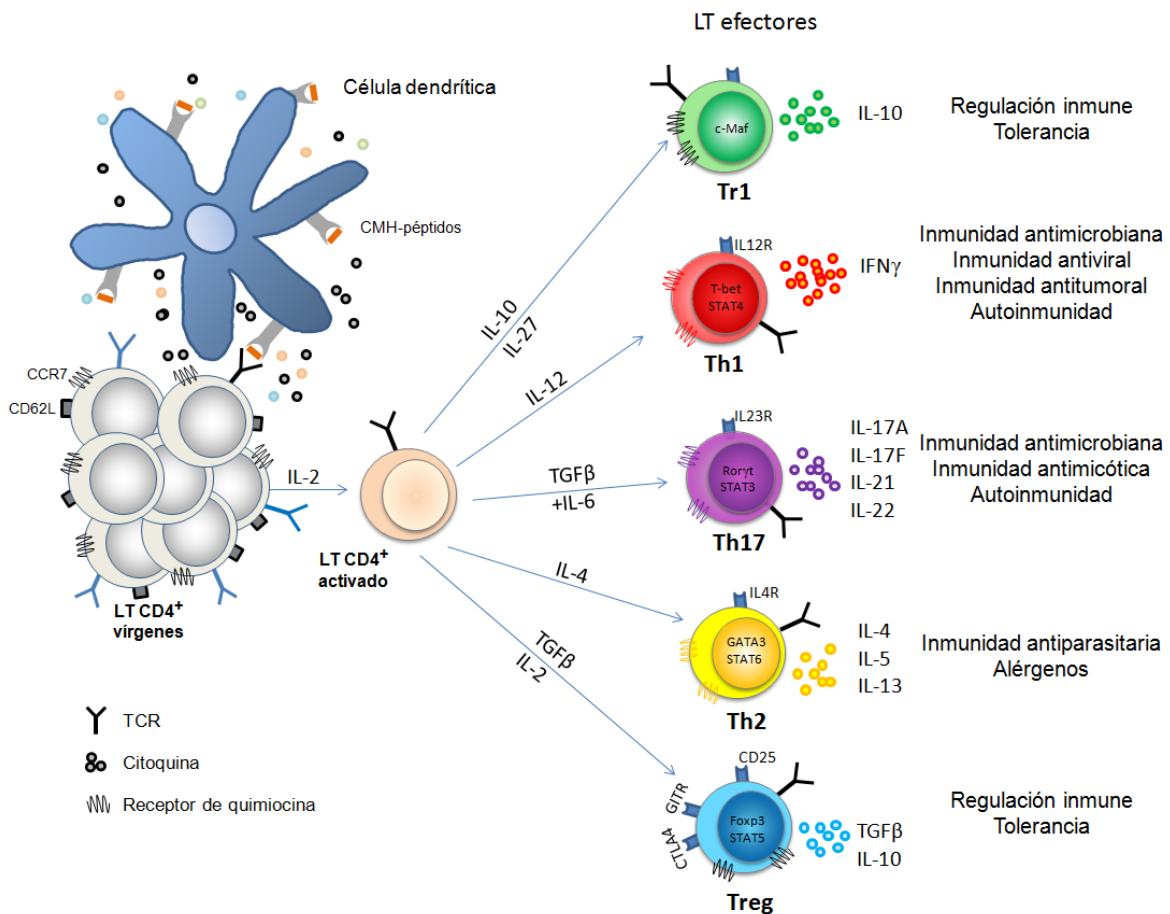


Figura 1. Esquema de los principales perfiles de diferenciación de LTh vírgenes a LTh efectores. En la figura se muestra la inducción de los diferentes perfiles de activación en los que se puede convertir un LT virgen cuando es activado de manera específica. Las condiciones de inducción, factores maestros de regulación, producción de citoquinas y efectos biológicos de cada perfil efector han sido detallados.

Se ha llegado al consenso general que los LTh1 expresan los receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5 (Groom J.R., 2011; Sallusto F., 1998), los LTh17 se los ha asociado a la expresión del receptor CCR6 (Wang C., 2009; Reboldi A., 2009), mientras que los LTh2 se los ha relacionado a la expresión de CCR3, CCR4 y CCR8 (Sallusto F., 1997; Sallusto F., 1998). Sin embargo, dentro de cada perfil de activación se han determinado subpoblaciones que expresan además de los receptores clásicos, otros receptores que les permiten migrar con mayor facilidad a un tejido determinado.

No se han determinado para las células Treg y Tr1 la expresión de receptores de recirculación particulares que podrían caracterizar a estas subpoblaciones. Actualmente se sugiere que las células con características regulatorias deberían expresar los mismos receptores de migración que las células T efectoras a las que van a modular. La utilización compartida de los receptores de quimiocinas entre LT efectoras y Treg tendría su fundamento como mecanismo funcional a través de la llegada de las células Treg a los sitios inflamados donde los LT efectoras están cumpliendo sus funciones. Apoyando esta hipótesis se han identificado subpoblaciones de células Treg que expresan diferentes patrones de receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión asociados a los perfiles de activación de LT efectoras (Wing J.B., 2012; Campbell D.J., 2011; Josefowicz S.Z., 2012).

Estudios recientes acerca de los LT efectoras han demostrado que muchas veces bajo ciertas condiciones ambientales y/o presencia de diferentes citoquinas en el microambiente, es posible la conversión o transformación de un perfil de respuesta efector a otro. El proceso de plasticidad celular es la capacidad de los LT efectoras de cambiar de un fenotipo a otro o de poseer características de más de un fenotipo (fenotipos híbridos) (Zhu J., 2010; O'Shea J.J., 2010; Nakayama S., 2012). En este proceso, los LT efectoras pertenecientes a un perfil determinado son capaces de inducir nuevos factores de transcripción y propiedades funcionales como por ejemplo cambiar la producción de citoquinas o de receptores de superficie. En base a estos hallazgos, numerosos grupos están trabajando en describir cuales podrían ser las ventajas y desventajas que tiene la plasticidad linfocitaria. Si bien todavía quedan muchos mecanismos por ser dilucidados, hay que reconocer que el avance en los mecanismos que favorezcan la estabilidad de un perfil determinado, la re-diferenciación de un perfil y la inducción de fenotipos híbridos ha cobrado gran importancia a la hora de discutir nuevos desarrollos terapéuticos para

procesos autoinmunes, alérgicos, tumorales e infecciosos (Bluestone J.A., 2009; O'Shea J.J., 2010; Zhu J., 2010; Nakayamada S., 2012).

Se ha demostrado que la activación específica de LT CD8⁺ o citotóxicos (LTc) vírgenes también puede inducir LTc efectores con diferentes perfiles de activación. Hasta el momento se han descrito solo 2 perfiles de LTc efectores: los LTc tipo 1 (LTc1) y los LTc tipo 17 (LTc17). Los LTc1 se inducen bajo las mismas condiciones que los LT con un fenotipo Th1 y cuando se activan secretan la misma citoquina. Los LTc17 se inducen bajo las mismas condiciones que el perfil Th17 y cuando se activan secretan principalmente IL-17A (Yen H.R., 2009; Henriques A., 2013). Cabe destacar que la activación de los LTc además de estar asociada a la producción de citoquinas y quimiocinas inflamatorias, lleva a la muerte celular de las células blanco a través de la expresión de moléculas de superficie (FasL) y de la secreción de perforinas y granzimas. Los LTc al igual que los LTh cuando se activan inducen la expresión de receptores de quimiocinas en la superficie. Se ha reportado que los LTc1 expresan los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR3, mientras que los Tc17 expresan el receptor CCR6 (Groom J.R., 2011(b); Sallusto F., 1998; Yen H.R., 2009; Reboldi A., 2009).

Aunque todos los LT vírgenes expresan diferentes TCRs, tienen un patrón muy similar de expresión de receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión (CD62L⁺ CCR7⁺CD44⁻) los cuales les sirven para poder entrar a los órganos linfáticos secundarios y tener la posibilidad de contactar con las CPA (Lewis M., 2008). Todos los LT efectores cuando se activan pierden la expresión de las moléculas CD62L y CCR7 y adquieren la expresión de la molécula CD44 y la expresión de los receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión características del perfil con el que se activan con el fin de poder egresar de los órganos linfáticos, accediendo a la circulación general y a los tejidos periféricos. Además, como se ha explicitado anteriormente, cuando los LT vírgenes se activan de manera específica a través de la presentación antigénica, las condiciones del microambiente donde este proceso se lleva a cabo influyen el perfil de activación de los LT efectores. De esta manera cada uno de los perfiles de activación de LT efectores (LTh y LTc) se caracteriza por la inducción de factores de transcripción determinados a cada perfil, la secreción de las citoquinas asociadas, la expresión de ciertas moléculas funcionales y la expresión de receptores de recirculación característicos. La expresión de estos receptores de

recirculación (receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión) le otorgan a los LT efectores las propiedades para poder acceder a los tejidos donde las quimiocinas o ligandos específicos sean expresados. De esta manera el patrón de expresión y la combinación de los receptores de quimiocinas y de moléculas de adhesión facilita el acceso de LT efectores a los tejidos donde los ligandos están siendo expresados (Bradley L.M., 2003; Ward S.G., 2009). Sin embargo, para que se produzca activación y permanencia de los LT efectores en dichos tejidos, es necesaria la presencia del antígeno específico. Es importante remarcar que los LT no son los únicos leucocitos que expresan receptores de quimiocinas, sino que los macrófagos/monocitos, CD, neutrófilos, mastocitos y eosinófilos activados también pueden hacerlo y ser reclutados a los tejidos periféricos a través de un gradiente de quimiocinas específicas (Ward S.G., 2009).

Como se mencionó las quimiocinas y sus receptores están involucrados en el tráfico fisiológico de las células (Oo Y.H., 2010). Se conocen hasta el momento aproximadamente 50 quimiocinas y 20 receptores para estas. El reclutamiento a través de las quimiocinas específicas y sus receptores se produce por contacto directo entre estos, aunque muchos receptores se unen a más de una quimiocina específica. Las quimiocinas pueden ser producidas por células epiteliales, fibroblastos, células endoteliales y células inmunes residentes de los tejidos. Estas pueden ser producidas en los tejidos de manera constitutiva o pueden ser inducidas bajo diferentes estímulos fisiológicos o patológicos (Ward S.G., 2009; Bonocchi R., 2009; Mortier A., 2012). Las quimiocinas inducidas responden a estímulos ambientales presentes en el microambiente a los que están expuestas las células dentro de los tejidos como PAMPs y DAMPs, así como también a condiciones de hipoxia, a la secreción de citoquinas y factores de crecimiento entre otras (Groom J.R., 2011(a) y Groom J.R., 2011(b)).

Las quimiocinas CCL3, CCL4 y CCL5 son ligandos específicos del receptor CCR5 y son inducidas por la presencia de citoquinas inflamatorias como IL-1, TNF α e IFN γ , así como también por diversos PAMPs (Lu P., 2003; Casola A., 2002; Carrero R., 2012; Chandrasekar B., 2013). Las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 son ligandos específicos del receptor CXCR3 y son inducidas por citoquinas inflamatorias como IFN γ , IFN α/β y TNF α . (Majumder S., 1998; Ohmori Y., 1997; Groom J.R., 2011 (b); Carrero R.,

2012). La quimiocina CCL20 es el único ligando descrito hasta el momento para el receptor CCR6 y se ha demostrado que se induce por citoquinas como IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-4, IL-17A, IL-12, entre otras (Kao C.Y., 2005; Reibman J., 2003; Carrero R., 2012; Iwamoto S., 2013). La expresión concomitante de diversas quimiocinas ha demostrado tener diferentes efectos *in vivo* dependiendo del modelo y/o del tejido en particular que se analice. Estas citoquinas pueden tener efectos sinérgicos, dominantes o colaborativos entre ellas. Además se ha reportado que las quimiocinas pueden tener diferentes patrones de expresión temporal dentro de los tejidos durante el curso de la respuesta inmune, generando así la llegada de células inmunes necesarias de acuerdo al momento del proceso fisiológico o patológico.

Respuestas autoinmunes y enfermedades autoinmunes

Como se mencionó anteriormente, los linfocitos inmaduros que reconocen con alta afinidad antígenos propios durante su maduración en la médula ósea o en el timo sufren procesos de anergia y eliminación clonal, proceso conocido como tolerancia central. Sin embargo, es común encontrar en la periferia, células que reconocen antígenos propios que han escapado a los controles de tolerancia central, las cuales son reguladas a través de mecanismos de tolerancia periférica. Los mecanismos de control de células autoreactivas en la periferia son principalmente llevados a cabo por las células T regulatorias. Las células Treg se dividen según su origen, en células Treg tímicas (tTreg) y células Treg periféricas (pTreg) (Abbas A.K., 2013). La generación de células tTreg se producen en el timo durante la ontogenia T, mientras que las pTreg se inducen en la periferia cuando la presentación antigénica se lleva a cabo en condiciones con altos niveles de TGF β . Las células tTreg se generan a partir de LT inmaduros que reconocen a través de su TCR antígenos propios presentados por las células epiteliales tímicas, con una intensidad intermedia. Las células pTreg se generan en la periferia a partir de LT CD4⁺ maduros vírgenes los cuales son activados bajo condiciones donde esté presente la citoquina TGF β (Waldmann H., 2006; Apostolou I., 2008; Curotto de Lafaille M.A., 2009). Hasta el presente aún no se ha consensuado un marcador que permita distinguir o identificar el origen de las células Treg

que se encuentran en periferia, aunque algunos autores indican que la expresión de la molécula *Neuropilina-1* podría ser un marcador para distinguir a células Treg que se originan en el timo (Weiss J.M., 2012; Bilate A.M., 2012). Aunque algunos autores recientemente han postulado que las tTreg y pTreg podrían tener diferentes especializaciones funcionales en el mantenimiento de la homeostasis inmune, actualmente no han sido reportadas diferencias en los mecanismos de acción de ambas poblaciones ya que las dos actúan mediante contacto célula-célula o a través de mecanismos indirectos como la secreción de citoquinas anti-inflamatorias o captación de IL-2 (Josefowicz S.Z., 2012; Bilate A.M., 2012; Wing K., 2008; Freeman G.J., 2000; Rubtsov Y.P., 2008; Wing K., 2012; Sakaguchi S., 2011).

Tanto las tTreg como las pTreg tienen un papel esencial en el mantenimiento de la tolerancia periférica y en la homeostasis del sistema inmune, observándose que una deficiencia genética o funcional del gen *Foxp3*, el principal factor de transcripción de ambas poblaciones, es capaz de generar una autoinmunidad generalizada multi-orgánica. Esto es lo que ocurre en los ratones *scurfy* y pacientes que poseen el síndrome IPEX (síndrome de disregulación inmune, poliendocrinopatía y enteropatía ligada al cromosoma X) (Brunkow M.E., 2001; Kim J.M., 2007; Bennett C.L., 2001). Se ha demostrado que las células Treg son capaces de suprimir respuestas inmunes asociadas a procesos inmunopatológicos y mantener así la homeostasis inmune periférica (Maloy K.J., 2001; Hori S., 2004; Kim J.M., 2007; Demengeot J., 2006). Sin llegar a casos extremos de ausencia funcional completa de células Treg Foxp3^+ , como el observado en ratones *scurfy* o en pacientes IPEX, se ha postulado que una disminución en la cantidad o funcionalidad de esta población podría estar involucrada en el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Thomas D.C., 2007; Long S.A., 2011; Alard P., 2006; Feuerer M., 2007; Dejaco C., 2006; Ziegler S.F., 2006). Es por ello que numerosos investigadores han estudiado cuantitativamente y cualitativamente a las células $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$ en pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes y en modelos experimentales para diversas enfermedades autoinmunes (Dejaco C., 2006; Long S.A., 2011; Ziegler S.F., 2006). En un gran número de modelos experimentales de autoinmunidad y en pacientes con enfermedades autoinmunes se han identificado alteraciones en los números de Treg o en su funcionalidad.

Sin embargo, también hay numerosos investigadores que han reportado no encontrar evidencia de alteraciones cualitativas o cuantitativas en la población de células Treg (Josefowicz S.Z., 2012; Bilate A.M., 2012). No obstante todavía queda mucho por clarificar en el entendimiento del rol que tienen estas células Treg en la inmunopatogénesis de la autoinmunidad y en los factores que podrían alterar su funcionalidad.

Normalmente un individuo posee células y anticuerpos autoreactivos circulando en la periferia. No obstante, un bajo porcentaje de la población desarrolla enfermedades autoinmunes, lo cual es debido a que los mecanismos de tolerancia funcionan correctamente. Sin embargo en algunas situaciones estos mecanismos de control fallan, lo cual permite que aquellas células autoreactivas se activen, proliferen, se diferencien y adquieran un perfil de activación particular patogénico (Th1 o Th17).

Las enfermedades autoinmunes son procesos patológicos donde los mecanismos efectores del sistema inmune específico están dirigidos hacia antígenos propios. El desencadenamiento de estas enfermedades es un proceso muy complejo que involucra la combinación de múltiples factores entre los cuales se pueden citar a los factores genéticos, ambientales (infecciones, fármacos) y otros de naturaleza aleatoria (Goodnow C.C., 2007).

Entre los factores genéticos que confieren susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes están los genes asociados a los CMH y los genes no asociados a los CMH. Existen estrechas relaciones entre los genes que codifican para las moléculas de CMH y la susceptibilidad a desarrollar ciertas patologías autoinmunes, las cuales están determinadas en mayor o menor medida con la presentación tímica o periférica de antígenos. Por otro lado, los genes que están relacionados a las enfermedades autoinmunes y que no están asociados a los CMH, pueden dividirse entre los que codifican para moléculas reguladoras de la activación (CTLA-4, CD25, entre otros) o para los que son causa directa de procesos autoinmunes (Foxp3, AIRE, Fas-FasL, entre otros) (Goodnow C.C., 2007).

Reportes bibliográficos donde se ha estudiado la relación de incidencia de enfermedades autoinmunes entre gemelos monocigotos indican que no se supera en ningún caso el 50-60%, indicando que hay factores que intervienen en el desarrollo de estas enfermedades que no son controlados de manera genética. Estos factores se conocen como factores ambientales y dentro de ellos se encuentran las hormonas sexuales (estrógenos),

factores físicos y químicos (radiación, drogas), traumatismos (donde queden expuestos antígenos de los sistemas inmunológicamente privilegiados) e infecciones bacterianas o virales (con presencia de superantígenos, mimetismo molecular, exposición de antígenos tisulares en un ambiente inflamatorio) (Goodnow C.C., 2007).

Según la distribución de los tejidos afectados, las enfermedades autoinmunes se clasifican en sistémicas y órgano-específicas. Las enfermedades órgano-específicas son un grupo de patologías que tienen características similares, donde se genera una respuesta inmune que reconoce exclusivamente antígenos específicos de un órgano, un tejido o un tipo celular determinado, mientras que las enfermedades sistémicas son patologías donde el SI reconoce específicamente componentes ubicuos expresados en diferentes órganos y células, lo cual afecta múltiples tejidos (ADN, anticuerpos, histonas, componentes nucleares, entre otros). Dependiendo de las características y la localización de los antígenos contra los cuales se induce la respuesta inmune específica, se va a determinar la clínica y el compromiso tisular. En general los antígenos y los mecanismos efectores de la respuesta inmune son muy diversos, por lo que las características clínicas entre las enfermedades de tipo autoinmune varían mucho entre ellas (Goodnow C.C., 2007).

Cabe destacar que a pesar de que las enfermedades autoinmunes tienen una alta prevalencia dentro de la población, la diversidad y complejidad etiopatológica de las mismas dificulta su diagnóstico. Aun con un diagnóstico confirmado, las terapias solo han sido enfocadas al tratamiento de los efectos que se generan en consecuencia a la respuesta inmune (uso de antiinflamatorios e inmunomoduladores) y/o terapias que no inciden sobre el proceso de lesión tisular (insulina, T4, entre otros).

Investigaciones en las que se avance en el conocimiento de los mecanismos inmunopatogénicos involucrados en el desarrollo de estas patologías son esenciales para mejorar el diagnóstico y avanzar en el desarrollo de nuevas terapias selectivas para cada patología. Aunque los mecanismos inmunopatogénicos de estas enfermedades son muy complejos y variados, hay que tener en cuenta múltiples factores que comprenden desde la imposibilidad de eliminar el autoantígeno, hasta la gran heterogeneidad en el tipo de respuesta inmune específica que se genera. Por lo que para poder avanzar en el desarrollo de terapias efectivas para cada una de estas patologías se necesita conocer todos los mecanismos inmunopatogénicos involucrados en el desarrollo de éstas.

Como se mencionó previamente, el desarrollo de enfermedades autoinmunes órgano específicas podría asociarse a alteraciones en el balance entre LT efectores y regulatorios. En muchas enfermedades autoinmunes o en modelos experimentales de las mismas se observa un perfil de activación que predomina. Un ejemplo de ello son la Diabetes Autoinmune y la Tiroiditis Autoinmune en las que se observa que el perfil de activación de tipo Th1 y Tc1 poseen un rol crucial en la patogénesis aunque se encuentren otros perfiles de activación (Rotondi M., 2007; Sarkar S.A., 2012; Horie, I., 2011). Por otro lado en patologías autoinmunes como la Esclerosis Múltiple (EM) y la Artritis Reumatoide (AR) se ha demostrado que los mecanismos lesivos iniciales son inducidos por el perfil de activación Th17 y Tc17 (Huber M., 2013; Reboldi A., 2009; Hirota K., 2007).

Se ha sugerido que la relación que existe entre el perfil de activación y el desarrollo de una enfermedad autoinmune es debida a las características que adquieren los LT efectores cuando se diferencian a uno u otro perfil de activación. Actualmente se está poniendo un especial énfasis en el estudio de los receptores de recirculación que adquieren los LT efectores cuando se activan, y la relación que tiene la expresión de estos receptores con la migración de las células a los distintos tejidos.

Se ha demostrado que las patologías a las que se las asocia con un perfil Th1 tanto en humanos como en modelos animales, incrementan la expresión *in situ* de quimiocinas específicas asociadas al reclutamiento de LT con un perfil Th1 y Tc1 frente a una injuria tisular. También se ha observado que durante una injuria tisular y/o un proceso inflamatorio, una elevada frecuencia de los leucocitos que llegan de manera temprana al tejido afectado expresan los receptores CXCR3 y CCR5, receptores asociados al perfil Th1 y Tc1 (Rhode A., 2005; Roep B.O., 2010; Uno S., 2010). Nuevas estrategias terapéuticas para estas patologías han demostrado que bloqueantes de la quimiocina CXCL10 podrían reducir la incidencia de patologías asociadas a perfiles Th1, Tc1 como la diabetes (Christen U., 2003; Shigihara T., 2005; Morimoto J., 2004).

Por otro lado se ha sugerido que los mecanismos inmunopatogénicos de las enfermedades autoinmunes que han mostrado tener una asociación con el perfil de activación Th17/Tc17, podrían estar mediados por la expresión de los receptores de recirculación de este perfil. Se ha observado tanto en modelos animales, como en pacientes afectados con estas patologías, que una gran proporción de los leucocitos infiltrantes de

manera temprana en los tejidos afectados expresan el receptor CCR6. Además estudios recientes han indicado que en las fases iniciales de la lesión tisular, hay una elevada expresión *in situ* de las citoquinas específicas de este perfil y de CCL20 el ligando natural del receptor CCR6 (Hirota K., 2007; Yamazaki T., 2008; van Hamburg J.P., 2011). Terapias experimentales en enfermedades con estas características han demostrado que la administración de un anticuerpo monoclonal anti-IL-17A y/o la administración de un anticuerpo de anti-CCR6 reducen significativamente el desarrollo de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) y el reclutamiento de LT al sistema nervioso central (Uyttenhove, C., 2006; Liston A., 2009; Jones S.A., 2012).

Cabe remarcar que hasta la fecha los perfiles de activación que dominan la inmunopatogénesis de muchas enfermedades autoinmunes no han sido determinados con certeza, mientras que en otras se especula que los mecanismos patogénicos podrían estar asociados a más de un perfil de activación, los cuales podrían colaborar entre ellos para generar un estado inflamatorio sostenido.

Es muy importante conocer de manera detallada los mecanismos inmunopatogénicos involucrados en cada una de las enfermedades de tipo autoinmune ya que las diferencias entre estos mecanismos pueden ser la base para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Asimismo la expresión de quimiocinas de manera constitutiva y bajo situaciones inflamatorias en cada tejido puede ser el fundamento del orquestamiento del tráfico leucocitario dentro de los tejidos normales e inflamados.

Prostatitis Autoinmune

Las prostatitis o inflamaciones de la glándula prostática, son una de las afecciones más comunes en la práctica urológica, dando cuenta de acerca del 12% de las consultas y habiéndose estimado que más de la mitad de los hombres sufren síntomas de prostatitis en algún momento de su vida (Domingue G.S., 1998). La prostatitis es el diagnóstico más común que se presenta en los consultorios urológicos en hombres menores de 50 años y el tercer diagnóstico más común en hombres mayores a 50 años, luego de la hiperplasia prostática benigna y el cáncer prostático (Hua V.N., 2004). Aparte de su incidencia y prevalencia, el mayor problema radica en la identificación de su etiología, la cual continúa

siendo un enigma en la mayoría de los casos. En base a esto, los tratamientos se administran empíricamente resultando en un fracaso terapéutico en la mayoría de los casos (Cohen J.M., 2012; Nickel J.C., 2013). Cabe mencionar que además del costo sanitario acarreado por la administración de terapias empíricas inefectivas, acarrea un costo social generado por afectar a hombres jóvenes, sexualmente activos y en plena edad productiva. Como puede advertirse, la prostatitis constituye un problema sanitario importante en el presente.

La clasificación de prostatitis más actualizada fue establecida en el año 1999 por un grupo de expertos del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (NIH) (Krieger J.N., 1999). Esta ha consensuado una clasificación para las prostatitis estableciendo 4 categorías. A las categorías I y II se las ha descrito como prostatitis agudas o crónicas de etiología bacteriana, la categoría III se ha descrito como prostatitis crónica no bacteriana y la categoría IV como prostatitis asintomática. La categoría III o síndrome del dolor pélvico crónico (CP/CPPS) es la más frecuente dentro de las prostatitis en los consultorios urológicos, representando alrededor de 90-95% de las consultas asociadas a prostatitis (Bierklund-Johansen T.E., 2002; Schaeffer A.J., 2006). Esta enfermedad afecta a hombres jóvenes y de mediana edad (20-50 años) y aunque estos presentan síntomas clásicos de la inflamación prostática es indistinguible desde el punto de vista clínico, ya que están asociadas a dolor pélvico o peneal, síntomas de dolor al miccionar y disfunción sexual, acompañados de un estado inflamatorio. La CP/CPPS es una patología que tiene un marcado impacto en la salud humana no solo por la frecuencia y edad de su incidencia, sino también el grado en el que afecta la calidad de vida del paciente generando perturbaciones emocionales asociadas a su cronicidad (Schaeffer A.J., 2006; Habermacher G.M., 2006; Nickel J.C., 2013).

Como se mencionó anteriormente los pacientes con esta patología presentan una inflamación de la glándula prostática, con numerosos síntomas asociados en ausencia de infección. Nuestro grupo de trabajo junto con otros grupos de investigadores han propuesto que este estado inflamatorio, en ausencia de un agente infeccioso detectable, podría involucrar un proceso autoinmune (Habermacher G.M., 2006; Rivero V.E., 2007). Nuestro grupo de investigación ha realizado estudios con muestras de pacientes afectados por CP/CPPS, demostrando que los linfocitos de sangre periférica de los mismos producen

elevados niveles de IFN γ cuando son estimulados *in vitro* en presencia de antígenos prostáticos como Fosfatasa ácida prostática (PAP), Antígeno específico prostático (PSA), Prostateína (PSBP) y otros antígenos prostáticos (Motrich R.D., 2005(a); Motrich R.D., 2005(b); Motrich R.D., 2006). Ensayos similares utilizando linfocitos de sangre periférica de individuos controles demostraron que los mismos producían niveles elevados de IL-10 en respuesta a la estimulación *in vitro* con antígenos prostáticos como PSA, PAP, PSBP, entre otros. Por otro lado muestras de plasma seminal de pacientes afectados por CP/CPPS mostraron niveles elevados de TNF- α , IFN γ e IL-1, sugiriendo que pacientes con esta afección podrían cursar con proceso autoinmune, asociado al perfil de respuesta Th1 (Motrich R.D., 2005(a)). Escasos grupos de investigación a nivel mundial han trabajado en la búsqueda de alteraciones inmunológicas en estos pacientes, por lo que investigaciones que se enfoquen en caracterizar el tipo de respuesta inmune y los mecanismos patogénicos que están involucrados pueden resultar fundamentales para elaborar en base a ello nuevas propuestas de diagnóstico y terapéuticas.

Además de los estudios realizados en pacientes, nuestro grupo ha desarrollado modelos animales que han sido postulados como válidos para la enfermedad humana CP/CPPS. Los modelos animales desarrollados en el laboratorio, utilizaron a ratas y ratones los cuales fueron inmunizados con una mezcla de antígenos prostáticos emulsificados en un adyuvante, lográndose la inducción de LT específicos hacia antígenos prostáticos capaces de quebrar la tolerancia inmunológica y desarrollar una lesión e inflamación en la glándula prostática (Rivero V.E., 1998; Motrich R.D., 2005 (a); Motrich R.D., 2005 (b)). El tipo de lesión observada y respuesta inmune generada en los animales fue similar al observado en pacientes con esta patología. El modelo de Prostatitis Autoinmune Experimental (PAE) desarrollado en ratones se basa en la inmunización de machos jóvenes con una mezcla de proteínas prostáticas (PAg), incorporadas al adyuvante Completo de Freund (CFA). Luego del esquema de inmunización los animales desarrollan una respuesta autoinmune específica, generando LT y anticuerpos específicos hacia antígenos prostáticos en la periferia, lo que lleva a una importante lesión en la glándula prostática de los animales inmunizados (Keetch D.W., 1994; Rivero V.E., 1998). Recientes estudios en los cuales han evaluado el dolor pélvico en ratones inmunizados con antígenos prostáticos, han

demostrado que el mismo se relaciona al grado de infiltración y lesión observada en la glándula prostática (Rudick C.N., 2008).

En trabajos realizados por nuestro grupo en el modelo de PAE murino se han utilizado ratones de la cepa NOD los cuales desarrollan una fuerte respuesta inmune celular y una severa lesión prostática caracterizada por un marcado infiltrado leucocitario dentro del tejido luego de ser inmunizados (Rivero V.E., 1998). Se observó una importante respuesta proliferativa de linfocitos de bazo y de ganglios linfáticos drenantes de próstata frente a la estimulación con antígenos prostáticos. Los sobrenadantes de estos cultivos celulares mostraron niveles importantes de la citoquina $IFN\gamma$ y ausencia de citoquinas relacionadas a un perfil Th2 como la citoquina IL-4 (Rivero V.E., 1998). Se determinó que el principal autoantígeno en nuestro modelo es una proteína específica del tejido prostático llamada Prostateína o PSBP y que ratones inmunizados con la misma desarrollaban respuesta inmune específica y lesión en la glándula prostática (Maccioni M., 1997). Otros estudios realizados por nuestro grupo utilizando ratones de la cepa C57Bl/6 mostraron que esta cepa es también susceptible al desarrollo de PAE ya que luego de la inmunización con PAg emulsificados en adyuvantes era posible detectar linfocitos específicos en bazo y ganglios drenantes de próstata con una moderada lesión en la glándula prostática (Motrich R.D., 2010). Estudios realizados con ratones de la cepa C57Bl/6 deficientes en moléculas asociadas a la vía de señalización del perfil de activación Th1, como IRF-1 y STAT1 demostraron que el perfil Th1 era crucial en el desarrollo de la patología ya que los ratones deficientes en estas vías de señalización, resultaron resistentes al desarrollo de PAE (Motrich R.D., 2010). Hasta la fecha no ha sido investigado si se inducen otros perfiles de activación luego de la inmunización como linfocitos Th17 y si estos tienen un rol patogénico en el modelo de PAE.

Estudios realizados por nuestro grupo y otros autores han descripto que diferentes cepas de ratones tienen diferente susceptibilidad al desarrollo de PAE. Se observó que ratones de las cepas NOD, C57Bl/6, SJL, A/J y BALB/c mostraban un grado de susceptibilidad decreciente luego del esquema de inmunización (Rivero V.E., 2007; Keetch D.W., 1994; Motrich R.D., 2007). Si bien los ratones de todas las cepas desarrollan respuesta inmune específica hacia antígenos prostáticos luego de la inmunización, sólo algunas cepas desarrollan una infiltración y lesión prostática severa, mientras que otras no

muestran ninguna alteración en el órgano blanco. En estos estudios no se analizó si las diferentes cepas de ratones presentaban diferentes frecuencias de LT efectores, diferentes perfiles de activación de estas células en periferia, diferencias en la frecuencia de células regulatorias y/o en la funcionalidad de estas, entre otras. Se propone estudiar el perfil de la respuesta inmune específica que se genera en cepas con diferentes susceptibilidades a PAE y su importancia en el desarrollo de la patología. Analizando la susceptibilidad y/o resistencia de las distintas cepas de ratones en relación a diferencias en la frecuencia y/o en el perfil de activación de las células T efectoras (Th1, Th2, Th17) o T regulatorias (Tr1, Treg) que se inducen luego de la inmunización en cada caso.

Objetivos

Objetivos

- Teniendo en cuenta los antecedentes previamente descritos el objetivo general de la presente tesis fue:

Estudio de los perfiles de activación de linfocitos T específicos hacia antígenos prostáticos en cepas con diferentes susceptibilidades al desarrollo de Prostatitis Autoinmune Experimental.

- Con el propósito de lograr este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el perfil de Respuesta Inmune celular y el tipo de lesión que se genera en tres cepas de ratones con distinta susceptibilidad al desarrollo de PAE
- Analizar la frecuencia de células T regulatorias y el efecto que tiene de su eliminación transitoria en el desarrollo de la patología.
- Estudiar la expresión de quimiocinas en el tejido prostático de animales normales y autoinmunes.
- Caracterizar los receptores de quimiocinas involucrados en el proceso de migración e infiltración de la glándula prostática.

Resultados

Resultados: Parte I

*Perfil de respuesta inmune y tipo de lesión en tres cepas
con diferente susceptibilidad a PAE*

Perfil de Respuesta inmune y tipo de lesión en tres cepas con distinta susceptibilidad a PAE

Reportes previos han demostrado que ratones de distintas cepas, como los ratones NOD, C57Bl/6, SJL, A/J y BALB/c, presentan una inflamación y lesión prostática diferente luego de la inmunización con una mezcla de antígenos prostáticos emulsificados en CFA (Rivero V.E., 2007; Keetch D.W., 1994; Motrich R.D., 2007). Si bien los ratones de todas las cepas desarrollan respuesta inmune específica contra autoantígenos prostáticos luego de la inmunización, sólo algunas cepas desarrollan una infiltración y lesión prostática severa, mientras que otras no muestran ninguna alteración en el órgano blanco. Las diferencias observadas en las distintas cepas de ratones podrían estar relacionadas a diferencias en las células T efectoras (Th1, Th2, Th17) o T regulatorias (Tr1, TregFoxp3+) que se inducen en cada caso.

En el presente trabajo de tesis, nos propusimos profundizar en el estudio y la descripción del perfil de células efectoras y regulatorias que se inducen y están presentes en periferia y además el tipo de lesión/infiltrado que se genera en cepas de ratones con diferente susceptibilidad al desarrollo de PAE. Con ese fin, se utilizaron 3 cepas de ratones seleccionadas de acuerdo a datos bibliográficos: la cepa NOD, descrita con una alta susceptibilidad al desarrollo de PAE (Rivero V.E., 1998); la cepa C57Bl/6 en la cual se ha reportado una susceptibilidad moderada (Keetch D.W., 1994; Motrich R.D., 2010) y la cepa BALB/c, resistente al desarrollo de dicha patología (Keetch D.W., 1994). La susceptibilidad a PAE fue determinada por la presencia de lesiones en la glándula prostática como pérdida de la arquitectura normal, infiltración del tejido dentro del espacio perivascular o en el estroma glandular, edema y hemorragia tisular luego de inmunizar a los ratones con una mezcla de antígenos prostáticos y CFA.

Como un resultado preliminar de esta tesis, se corroboró la susceptibilidad diferencial al desarrollo de PAE descrita en bibliografía, realizando estudios histológicos de las glándulas prostáticas obtenidas luego de la inmunización de ratones NOD, C57Bl/6 y BALB/c según se describe en materiales y métodos. Como se muestra en las fotografías de cortes de próstata teñidos con Hematoxilina/Eosina (H/E) de la Figura 2, animales inmunizados de la cepa NOD, demostraron una severa infiltración leucocitaria

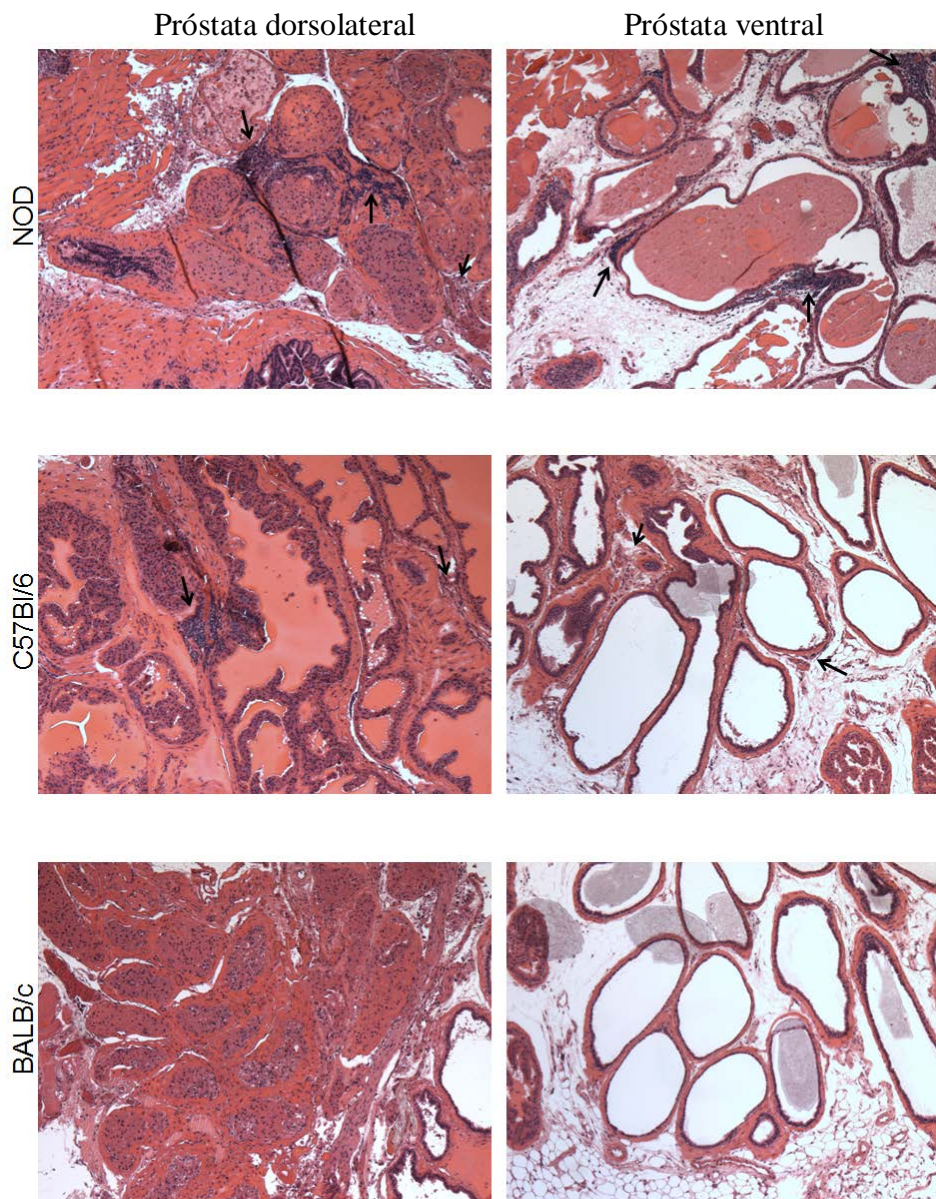


Fig. 2. Análisis de cortes histológicos de glándulas prostáticas de ratones con diferente susceptibilidad a PAE. Ratones machos de las cepas NOD, C57Bl/6 y BALB/c fueron inmunizados en los días 0 y 15 del esquema experimental con una mezcla de antígenos prostáticos emulsificados en CFA y sacrificados en el día 24 del esquema. Las glándulas prostáticas fueron extraídas y fijadas para ser teñidas por H/E. Secciones pertenecientes a la glándula prostática como dorsolaterales y ventrales fueron analizadas en las 3 cepas de ratones en estudio (200x).

principalmente compuesta por células mononucleares presentes en focos perivasculares y dentro del parénquima glandular. Además se observó una alteración de la arquitectura del órgano con la presencia de edema y focos hemorrágicos aislados dentro del tejido. Animales inmunizados de la cepa C57Bl/6 demostraron una infiltración focal de leucocitos principalmente con focos perivasculares sin comprometer en gran proporción el parénquima del tejido, el cual no mostró alteraciones importantes en la estructura tisular. Por otro lado, cuando las secciones de tejido prostático provenientes de animales de la cepa BALB/c fueron analizadas, se observó una escasa infiltración leucocitaria y ausencia de lesiones importantes dentro de la glándula prostática.

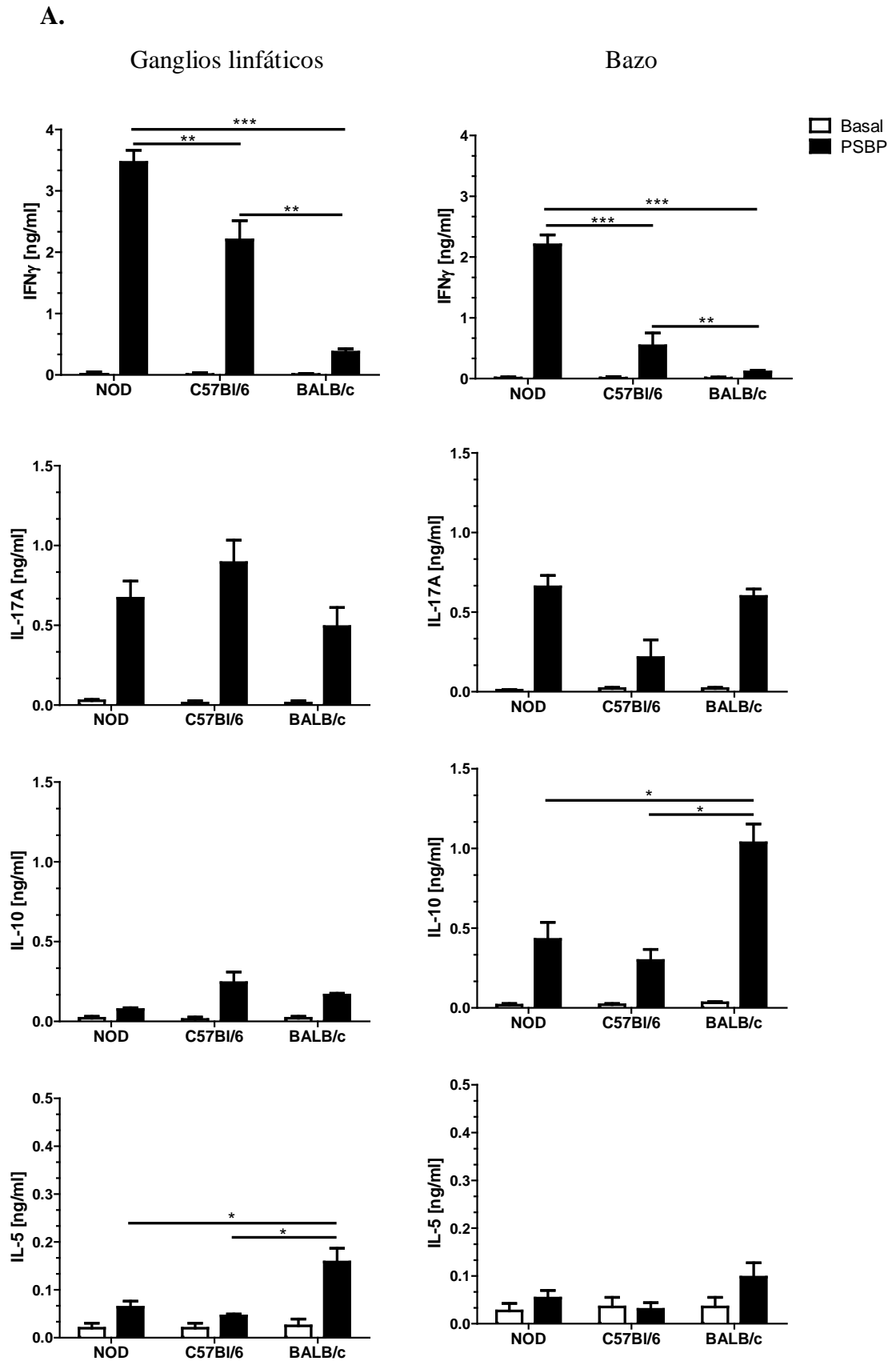
I. Caracterización del tipo de respuesta inmune específica que se induce luego de la inmunización de ratones con diferente susceptibilidad al desarrollo de PAE

Para analizar si las diferencias observadas en las distintas cepas de ratones podrían estar relacionadas a la cantidad y/o a los perfiles de células T efectoras (Th1, Th2, Th17) o T regulatorias (Tr1, Treg) inducidos, nos propusimos en primer lugar caracterizar el tipo de respuesta inmune específica que se genera en periferia en las 3 cepas de ratones descriptas.

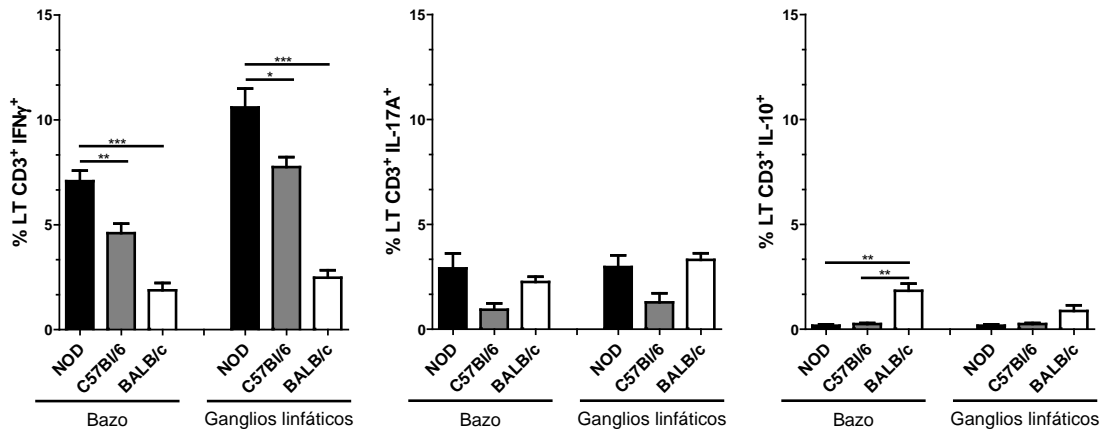
Ratones machos de 6-8 semanas de edad de las diferentes cepas fueron inmunizados con solución fisiológica (Grupo Control) o con una mezcla de antígenos prostáticos (Grupo PAg) emulsificados en CFA en los días 0 y 15 del protocolo experimental y en el día 24 del esquema los animales fueron sacrificados. Las células mononucleares de bazo (Bz) y ganglios linfáticos drenantes de próstata (GLp) fueron cultivadas durante 72 horas en presencia de medio de cultivo solo (condición basal) o suplementado con PSBP, el principal autoantígeno descrito en nuestro modelo (Maccioni y col, 1998). Para evaluar los diferentes fenotipos de linfocitos (Th1, Th17, Th2, Tr1 y Treg) se analizó la secreción de IFN γ , IL-17A, IL-5 e IL-10 en sobrenadantes de cultivos de células de GLp y de Bz de los animales controles o inmunizados. Se evaluó además la frecuencia de células T productoras de IFN γ , IL-17A, IL-10 o Foxp3⁺ luego de la re-estimulación específica con el autoantígeno PSBP.

Como se puede observar en la Figura 3A, los niveles de IFN γ , IL-17A, IL-5 e IL-10, fueron diferentes en los cultivos de ratones con distinta susceptibilidad a PAE. La producción de citoquinas y la presencia de LT productores de éstas, solo se produjo de manera antígeno específica, ya que no se detectó presencia de citoquinas en los sobrenadantes, de LT productores de citoquinas frente a las condiciones basales (Figura 3) ni en cultivos estimulados con un antígeno no relacionado como Ovalbumina (datos no mostrados).

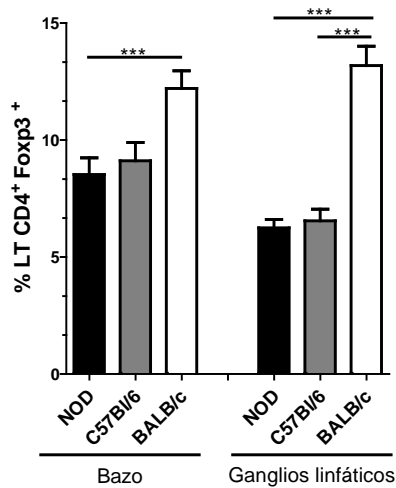
Se observó que las cepas que poseían una mayor susceptibilidad al desarrollo de la patología, cepas NOD y C57Bl/6, mostraban un perfil principalmente asociado al fenotipo Th1/Tc1 y Th17/Tc17 con niveles altos de IFN γ e IL-17A luego de la re-estimulación específica *in vitro* con el autoantígeno (Figura 3A). La frecuencia de LT productores de IFN γ fue también significativamente elevada en los cultivos de ratones NOD y C57Bl/6 (Figura 3B). Por otro lado, los cultivos provenientes de ratones NOD y C57Bl/6 presentaron una producción similar de IL-10 y una frecuencia similar de LT productores de IL-10 (Tr1) y de células Treg (CD4⁺Foxp3⁺) luego de la re-estimulación *in vitro* con el autoantígeno (Figuras 3A, 3B, 3C y 3D).



B.



C.



D.

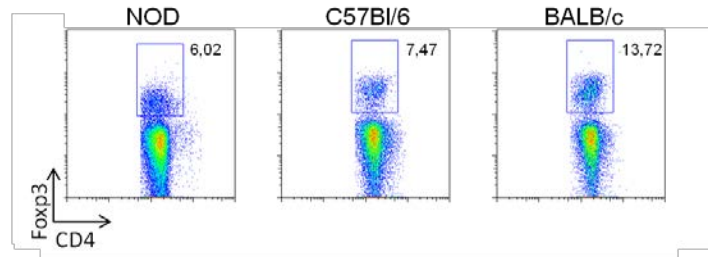


Fig. 3. Perfil de activación de linfocitos T específicos luego de la reestimulación con el autoantígeno en células mononucleares de células Bz y GLp de ratones con distinta susceptibilidad a PAE. Ratones de las 3 cepas fueron inmunizados y sacrificados en el día 24 del esquema. Células mononucleares de GLp y Bz fueron estimuladas *in vitro* en presencia de medio (condición basal) o del autoantígeno (PSBP) por 72 hs. (A) Secreción de citoquinas medida en los sobrenadantes de cultivo mediante técnicas de ELISA. (B) Frecuencia de células productoras de IFN γ , IL-17A, IL-10 analizada en la población de LT CD3⁺ luego de la reestimulación *in vitro* con PSBP (C-D) Frecuencia de células T regulatorias (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) determinada luego de la reestimulación *in vitro* con PSBP (D) Gráfico representativo de la frecuencia de células Treg en GLp. Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

En el caso de la cepa BALB/c, resistente al desarrollo de PAE, se observó un perfil principalmente asociado a los fenotipos Th17 y Th2, con niveles elevados de IL-17A e IL-5, niveles bajos de IFN γ y de células productoras de esta citoquina (Figuras 3A y 3B). Ratones BALB/c mostraron además una frecuencia mayor de células Tr1 y Treg; con una elevada producción de IL-10 en los sobrenadantes de cultivo luego de la re-estimulación específica. Dicha producción fue significativamente mayor en comparación con las cepas susceptibles (Figura 3).

Los animales pertenecientes a los grupos controles de cada cepa, es decir inmunizados sólo con solución salina emulsificada en CFA, no presentaron niveles detectables de las citoquinas estudiadas en sobrenadantes, ni presencia de LT productores de citoquinas luego de re-estimulación específica con PSBP (datos no mostrados).

II. Caracterización del tipo de lesión que se induce luego de la inmunización de ratones con diferente susceptibilidad al desarrollo de PAE

Para analizar si la presencia de determinados perfiles de LT específicos se asociaba con un infiltrado leucocitario prostático, realizamos estudios de inmunohistoquímica (IHQ) y citometría de flujo en el órgano blanco. Secciones de próstata fueron analizadas mediante IHQ a través del uso de un anticuerpo dirigido contra un marcador panleucocitario como es la molécula CD45. Como se puede observar en la Figura 4A, las secciones prostáticas de ratones NOD mostraron una marcada infiltración leucocitaria diseminada y en acúmulos focales extensos con una severa lesión del tejido prostático. Las glándulas provenientes de ratones C57Bl/6 mostraron infiltraciones con numerosos focos compuestos por una limitada cantidad de leucocitos. Por otro lado los ratones BALB/c mostraron muy escasos focos de leucocitos conformados por un número limitado de células CD45⁺ distribuidas en el tejido.

Para poder identificar la composición de las células inmunes que estaban siendo reclutadas al tejido prostático, se utilizó la técnica de citometría de flujo en suspensiones celulares de homogenizados prostáticos. Las glándulas prostáticas fueron extraídas, disgregadas de manera mecánica y enzimática como se indica en Materiales y Métodos, obteniéndose una suspensión celular homogénea que fue cuantificada y luego teñida en base a marcadores específicos para diferentes linajes celulares.

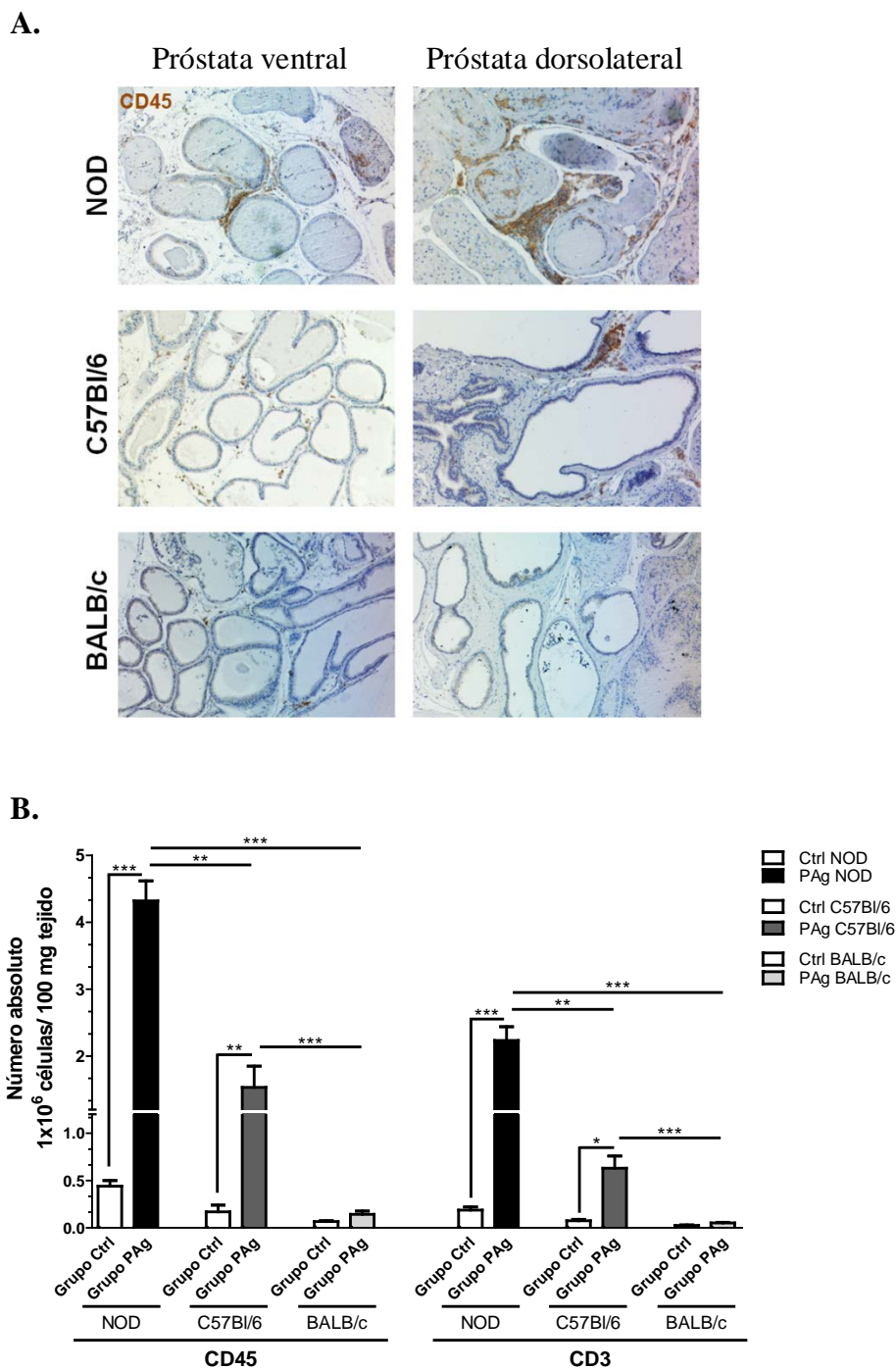


Fig. 4. Análisis del infiltrado leucocitario prostático de ratones con diferente susceptibilidad a PAE. (A) Presencia y localización del infiltrado leucocitario a través de la detección del marcador panleucocitario CD45 mediante IHQ, en las glándulas prostáticas provenientes de los Grupos PAg de las cepas de ratones NOD, C57Bl/6 y BALB/c (200x). (B) Las células mononucleares de glándulas prostáticas fueron cuantificadas y teñidas con anticuerpos monoclonales para identificar las moléculas CD45 y CD3. El número absoluto de células CD45 y CD3 dentro del tejido prostático fue posteriormente calculado. Los datos se muestran como media \pm S.D., n=4 por grupo, representativo de 3 experimentos independientes. Valores de $p < 0,05$; $**p < 0,005$; $***p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

El análisis de las suspensiones celulares prostáticas pertenecientes a los Grupos PAg de los ratones NOD y C57Bl/6, mostró la presencia de un elevado número absoluto de leucocitos CD45⁺, compuesto en gran proporción por LT CD3⁺ (Figura 4B). Por el contrario, suspensiones celulares de tejidos prostáticos provenientes del Grupo PAg de la cepa BALB/c, demostraron tener una escasa cantidad de células CD45⁺ en comparación con las cepas susceptibles (Figura 4A). Esta reducida cantidad de leucocitos presente en próstata de ratones BALB/c estuvo principalmente compuesta por células F480⁺ y CD11b⁺, marcadores que corresponden a células de la inmunidad innata como macrófagos/monocitos (datos no mostrados).

Estos resultados demostraron que cepas de ratones susceptibles al desarrollo de PAE, como las cepas NOD y C57Bl/6, presentaban importantes cantidades de linfocitos T infiltrando próstata y presentaban en periferia presencia de respuesta celular específica asociada a los perfiles Th1/Tc1 y Th17/Tc17, con bajos niveles de linfocitos Tr1 y Treg (Foxp3⁺). Por otro lado, la cepa resistente al desarrollo de PAE, la cepa BALB/c, mostró muy escasa infiltración en próstata compuesta principalmente de monocitos/macrófagos. Sin embargo estos animales desarrollaron respuesta celular específica asociada principalmente al fenotipo Th17, aunque también se observaron frecuencias elevadas de células regulatorias Tr1 y Treg.

III. Balance entre las poblaciones de LT efectores y regulatorios en ratones con distinta susceptibilidad a PAE

Numerosos reportes bibliográficos han postulado que el balance entre las células efectoras/patogénicas y células regulatorias es fundamental para que un individuo desarrolle o no una enfermedad autoinmune (Thomas D.C., 2007; Long S.A., 2011; Alard P., 2006; Feuerer M., 2007; DeJaco C., 2006; Ziegler S.F., 2006). Muchos autores postulan que deben existir determinados umbrales de células patogénicas y regulatorias para que las células autoreactivas logren infiltrar y producir daño en el tejido blanco. Debido a que nuestros resultados han mostrado diferencias en las cantidades y perfiles de LT y células regulatorias en las cepas con diferente susceptibilidad a PAE, nos propusimos estudiar los niveles de LT

activados efectores (Tef) y LT regulatorios (Treg) que se generaban luego de la inmunización de ratones NOD, C57Bl/6 y BALB/c con antígenos prostáticos/CFA.

Con este objetivo, ratones de los Grupos PAg de todas las cepas fueron sacrificados en el día 24 del esquema y el número absoluto de LT CD4⁺ efectores (CD4⁺CD44^{hi}CD62L⁻) o LT regulatorios (CD4⁺Foxp3⁺) se analizó en GLp y en Bz.

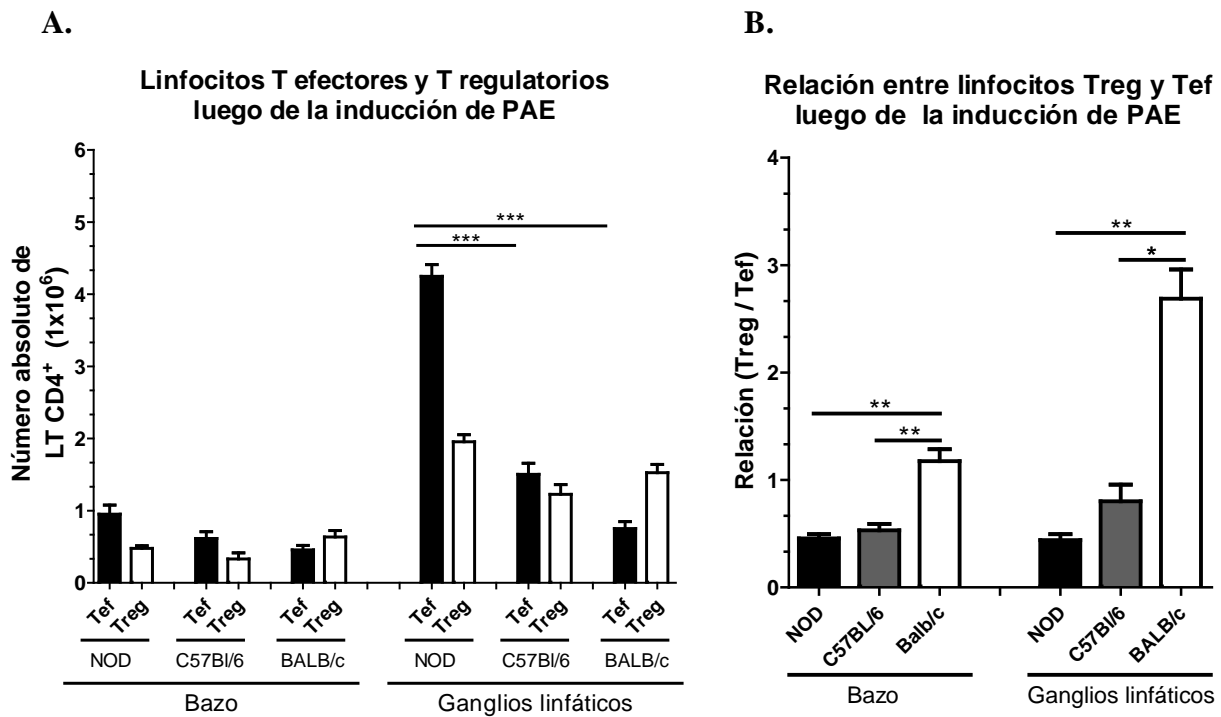


Fig. 5 Linfocitos T efectores y regulatorios en ratones con diferente susceptibilidad a PAE. El número absoluto de LT efectores y regulatorios provenientes del Grupo PAg de ratones NOD, C57Bl/6 y BALB/c fue evaluado en bazo y GLp en el día 24 del esquema experimental. (B) La relación entre linfocitos T regulatorios y efectores fue calculada en cada caso. Los datos se muestran como media ± S.D., n=3 por grupo, representativo de 2 experimentos independientes. Valores de **p*<0,05; ***p*<0,005; ****p*<0,001 fueron considerados estadísticamente significativos.

Al realizar el análisis de cantidades absolutas de LT efectores CD4⁺CD44^{hi}CD62L⁻ en el bazo, no se observaron diferencias marcadas entre las distintas cepas analizadas. Las mayores diferencias fueron observadas en el número absoluto de LT efectores en los GLp,

siendo estos muy elevados en ratones de cepa NOD y bajos en ratones de la cepa BALB/c, mientras en la cepa C57Bl/6 se mantuvo intermedia a las cepas anteriormente mencionadas (Figura 5A).

Aunque el análisis de los porcentajes de LT regulatorios Foxp3⁺ (Figura 3C) reveló mayores porcentajes de esta población en Bz y GLp de ratones BALB/c, al calcular valores absolutos de Treg no se observaron diferencias significativas entre las distintas cepas (Figura 5A). Considerando el número absoluto de LT efectores y el de LT regulatorios se calculó la relación que existía entre linfocitos Treg y Tef para cada cepa (Figura 5B). Como se puede observar, la cepa de ratones BALB/c, resistente a la infiltración y lesión de la glándula prostática, mostró tener un mayor índice de Treg/Tef. Por otra parte las cepas susceptibles a desarrollar lesión e infiltración prostática mostraron relaciones Treg/Tef menores principalmente en los sitios inductores de la respuesta inmune específica como son los ganglios linfáticos drenantes de la glándula (Figura 5B).

IV. Efecto de la depleción de células Treg en la susceptibilidad de ratones NOD, C57Bl/6 y BALB/c al desarrollo de PAE.

En base a los resultados anteriores, nos propusimos evaluar si la presencia y función de LT regulatorios era importante en el momento de la inducción de la respuesta autoinmune; y si su ausencia podría producir cambios en el perfil de activación de los LT efectores. Como se mencionó anteriormente las células Treg se identifican por los marcadores de superficie CD4⁺, CD25^{hi} y el factor de transcripción Foxp3. Se ha determinado experimentalmente que el tratamiento intravenoso (i.v.) y/o intraperitoneal (i.p.) de ratones con el anticuerpo IgG monoclonal anti-CD25 (α CD25) elimina aproximadamente el 80% de las células Treg (CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺) a las 48 h post inyección (Zelenay S., 2005); mientras que a los 5-7 días de la administración el número de las células Treg retornan a los valores normales.

Con estos datos diseñamos el esquema experimental que se muestra en la Figura 6, en el cual dos grupos de ratones fueron inyectados con α CD25 o un anticuerpo monoclonal

control (IgG Control) en el día -1 y luego inmunizados en el día 0 del esquema experimental.

Para controlar la funcionalidad del anticuerpo algunos animales fueron sacrificados a las 48 horas post inyección y se evaluaron los porcentajes de depleción de células Treg, observándose que las tres cepas lograron muy buenos porcentajes de depleción de células Treg en GLp y Bz (Figura 7).

Esquema experimental: depleción *in vivo* de células Treg.

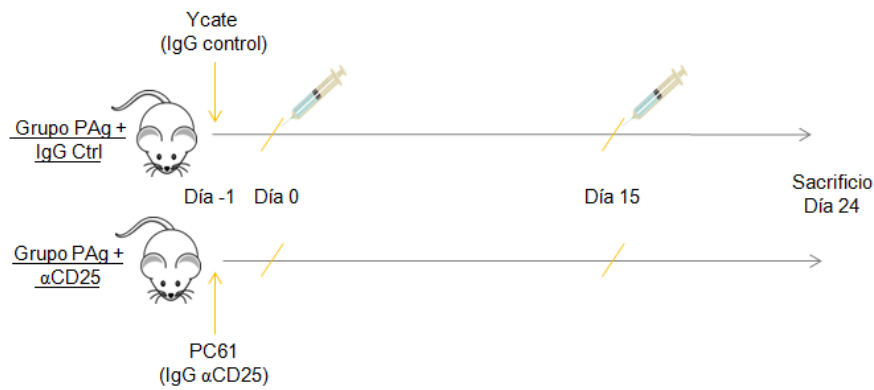


Fig. 6. Esquema experimental utilizado para generar la depleción de Treg *in vivo*. El día previo a la primera inmunización ratones de las cepas NOD, C57Bl/6 y BALB/c fueron inyectados por vía i.v. con un ac IgG control (Grupo PAg + IgG Ctrl) o con un ac α CD25 (Grupo PAg + α CD25). Luego de la administración de los diferentes anticuerpos, todos los animales fueron inmunizados en el día 0 y 15 con una mezcla de antígenos prostáticos emulsificados en CFA para luego ser sacrificados en el día 24.

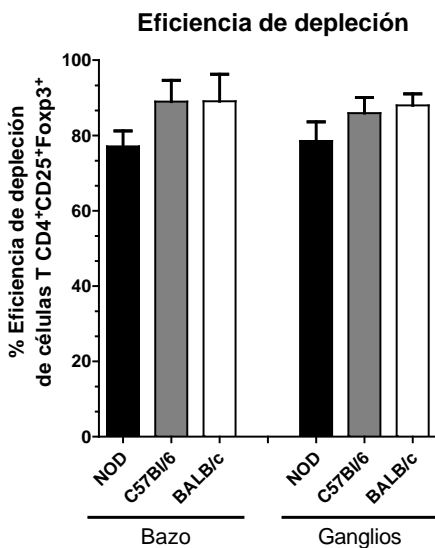
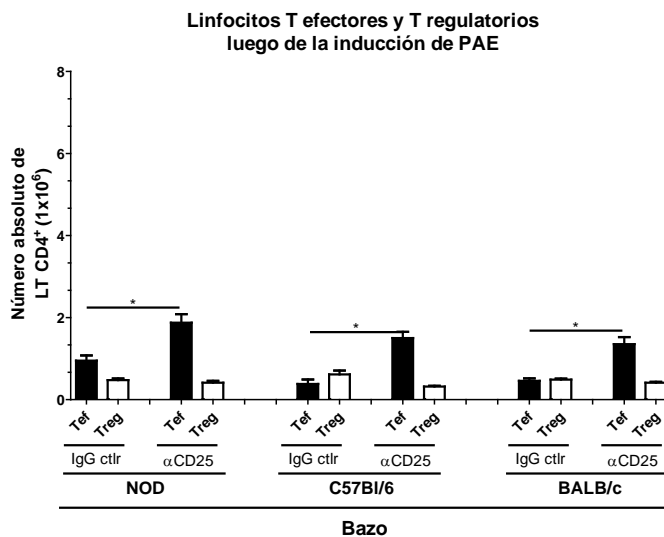


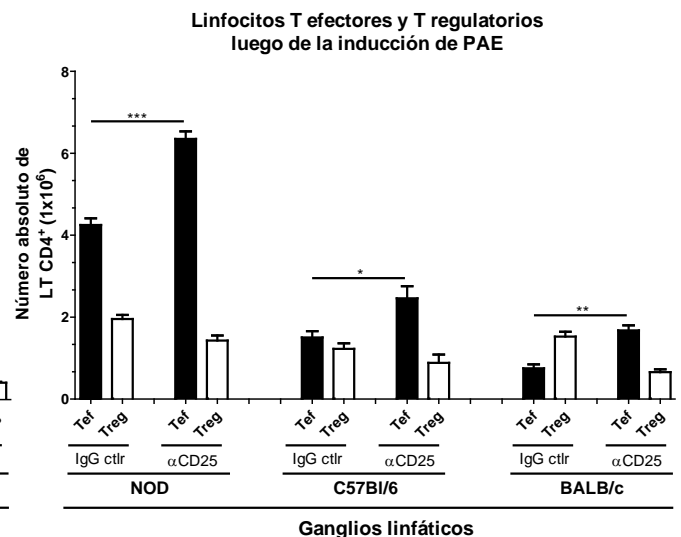
Fig.7. Evaluación de la eficiencia de depleción de LT CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en las tres cepas en estudio. Los anticuerpos IgG control o α CD25 fueron administrados por vía i.v. en animales de las 3 cepas. Luego de 48 hs. de la administración el número absoluto las células Treg presentes en bazo y los ganglios de los animales fue evaluada. La eficiencia de la depleción fue calculada como el porcentaje $[1 - (\text{Treg}_{\alpha\text{CD}25} / \text{Treg}_{\text{IgG control}})] \times 100$.

Ratones de los grupos inmunizados con antígenos prostáticos y tratados con anticuerpos controles (Grupo PAg IgG ctrl) o con el anticuerpo α CD25 (Grupo PAg α CD25) fueron sacrificados en el día 24 y se realizaron diferentes estudios. En primer lugar se analizaron los números absolutos de LT efectores y Treg que se encontraban en Bz y GLp. Como se puede observar en la Figuras 8A y 8B, los grupos de animales tratados con α CD25 mostraron números absolutos incrementados de LT activados en todas las cepas analizadas. Esta mayor activación se presentó principalmente en los GLp. No se observaron diferencias en los números absolutos de Treg en los animales tratados, ya que si bien a las 48 horas post inyección del anticuerpo α CD25 la depleción había sido mayor o igual al 80% (Figura 7), a los 25 días de esta inyección los valores de Treg fueron similares en los ratones tratados con α CD25 o con anticuerpo control. Cuando se analizó la relación entre LT regulatorios y efectores en todos los casos se observaron valores menores en las tres cepas tratadas con α CD25, aunque esta relación disminuyó marcadamente en el grupo PAg α CD25 de la cepa BALB/c (Figura 8C).

A.



B.



C.

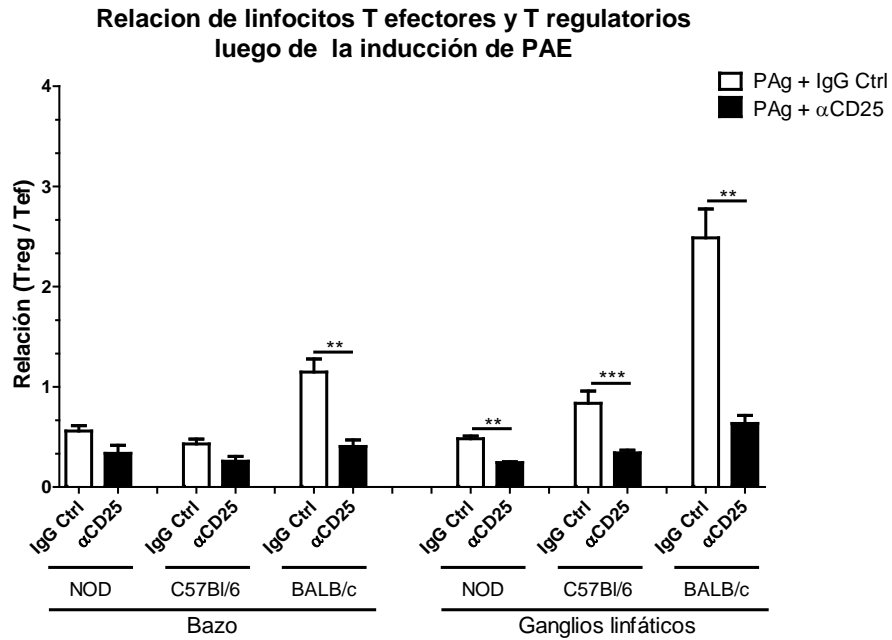


Fig. 8. Efecto del tratamiento con un anticuerpo αCD25 o IgG control en el número de linfocitos T efectores y regulatorios en ratones con diferente susceptibilidad a PAE. En el día -1 ratones de las cepas NOD, C57Bl/6 y BALB/c fueron tratados con anticuerpos monoclonales IgG control o αCD25. Los animales fueron inmunizados en el día 0 y 15 y sacrificados en el día 24. (A-B) El número absoluto de LT efectores y regulatorios presentes en el Bz y GLp fue obtenido luego de realizar marcaciones para detectar las poblaciones CD4⁺CD44^{hi}CD62L⁻ y CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺. (C) La relación entre linfocitos T regulatorios y efectores fue calculada en cada caso. Los datos se muestran como la media ± S.D., n=3 por grupo, representativo de 2 experimentos independientes. Valores de **p*<0,05; ***p*<0,005; ****p*<0,001 fueron considerados estadísticamente significativos.

Con el objetivo de evaluar si el tratamiento con αCD25 no sólo fue capaz de inducir un aumento en la cantidad de linfocitos efectores, sino también cambios en los perfiles de las mismas, se realizaron cultivos de células mononucleares de Bz y GLp y se analizó el perfil de secreción de citoquinas y la frecuencia de LT productores de citoquinas luego de re-estimulación específica *in vitro* con el autoantígeno.

Citoquinas en sobrenadantes de cultivos

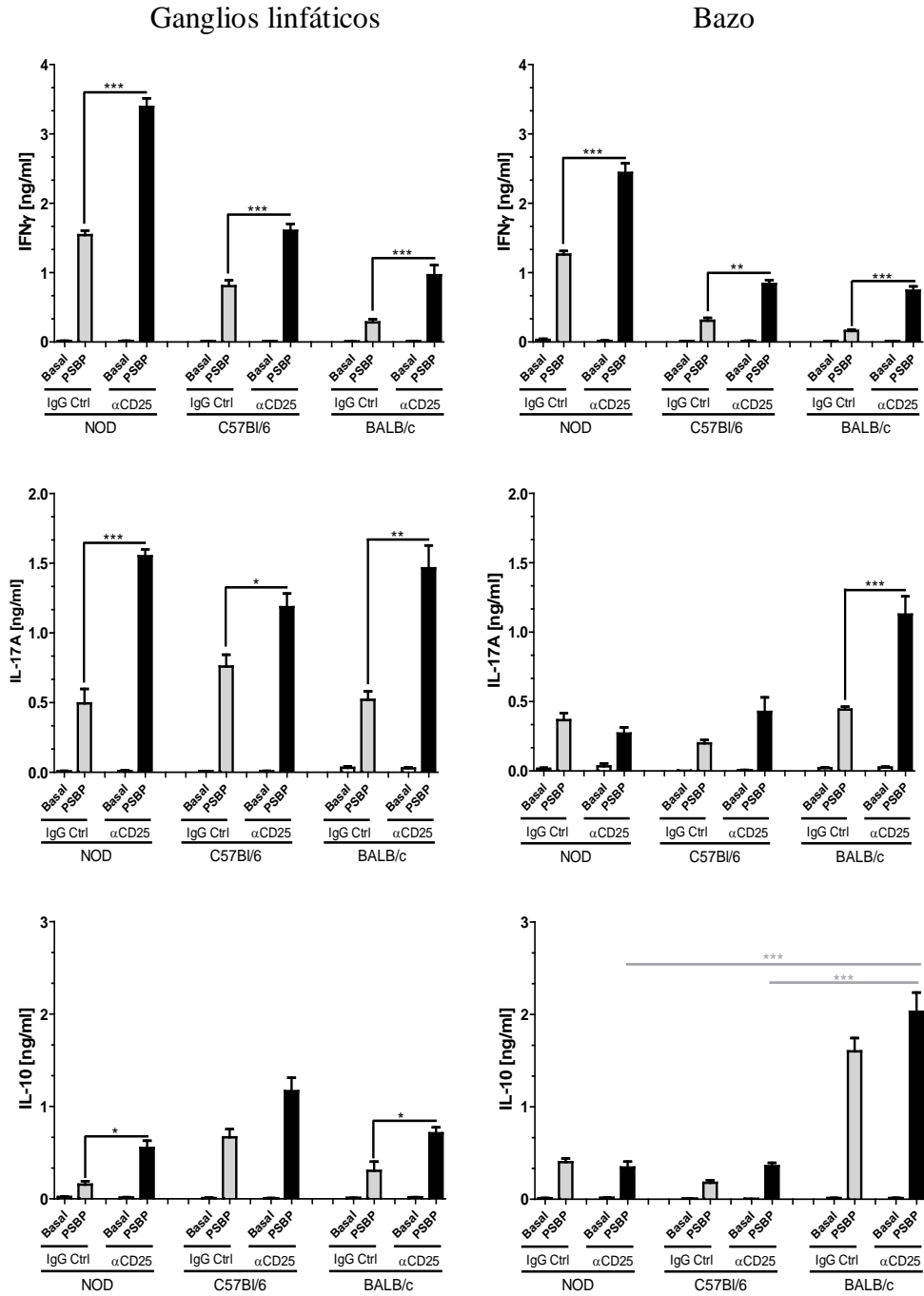


Fig. 9. Secreción de citoquinas en los sobrenadantes de cultivos de GLp y Bz de ratones inmunizados NOD, C57Bl/6 y BALB/c tratados con un anticuerpo α CD25 o IgG control. Células mononucleares de GLp y Bz de los Grupos PAG_{IgG Control} y PAG _{α CD25} fueron re-estimuladas *in vitro* en presencia de medio (basal) o con autoantígeno (PSBP) por 72 hs. La secreción de citoquinas IFN γ , IL-17A e IL-10 fueron medidas en los sobrenadantes de cultivo por la técnica de ELISA. Valores de $*p < 0,05$; $**p < 0,005$; $***p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Como se puede observar en la Figura 9, la producción de IFN γ e IL-17A se vió incrementada significativamente en todos los grupos de animales tratados con α CD25. Se pudo observar que tanto las cepas de ratones susceptibles como la cepa resistente BALB/c mostraron un incremento significativo en la secreción de IFN γ e IL-17A en los sobrenadantes de cultivos de GLp y Bz. Se observó también un incremento en los niveles de IL-10, una citoquina anti-inflamatoria, en los sobrenadantes de cultivo de ganglios drenantes de los animales tratados con α CD25 de todas las cepas y en sobrenadantes de cultivos de Bz de ratones BALB/c tratados con α CD25.

Por otro lado, cuando las células mononucleares fueron re-estimuladas *in vitro* con el autoantígeno y luego se realizaron inmunomarcaciones, se pudo observar claramente que la frecuencia de células productoras de IFN γ se veía significativamente incrementada en todas las cepas de animales tratados α CD25 (Figuras 10A y 10B). La frecuencia de LT productores de IL-17A no se observó mayormente afectada, mostrando solo un incremento significativo en Bz de los animales BALB/c tratados con α CD25. Los linfocitos productores de IL-10 no se vieron sensiblemente afectados en los animales tratados con α CD25 en relación con los tratados con el anticuerpo Control (datos no incluidos).

Al analizar los porcentajes de células Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) luego de los cultivos de re-estimulación de con PSBP en los grupos de trabajo, se observaron menores frecuencias de células Treg en los grupos tratados con α CD25, principalmente en GLp de las tres cepas (Figura 10C). De esta manera, la depleción transitoria de Treg en la fase inductora de nuestro modelo de PAE indujo un incremento en la cantidad de linfocitos activados, una reducción en la relación Treg/Tef y favoreció un perfil Th1 en respuesta a PSBP en las 3 cepas de ratones analizadas.

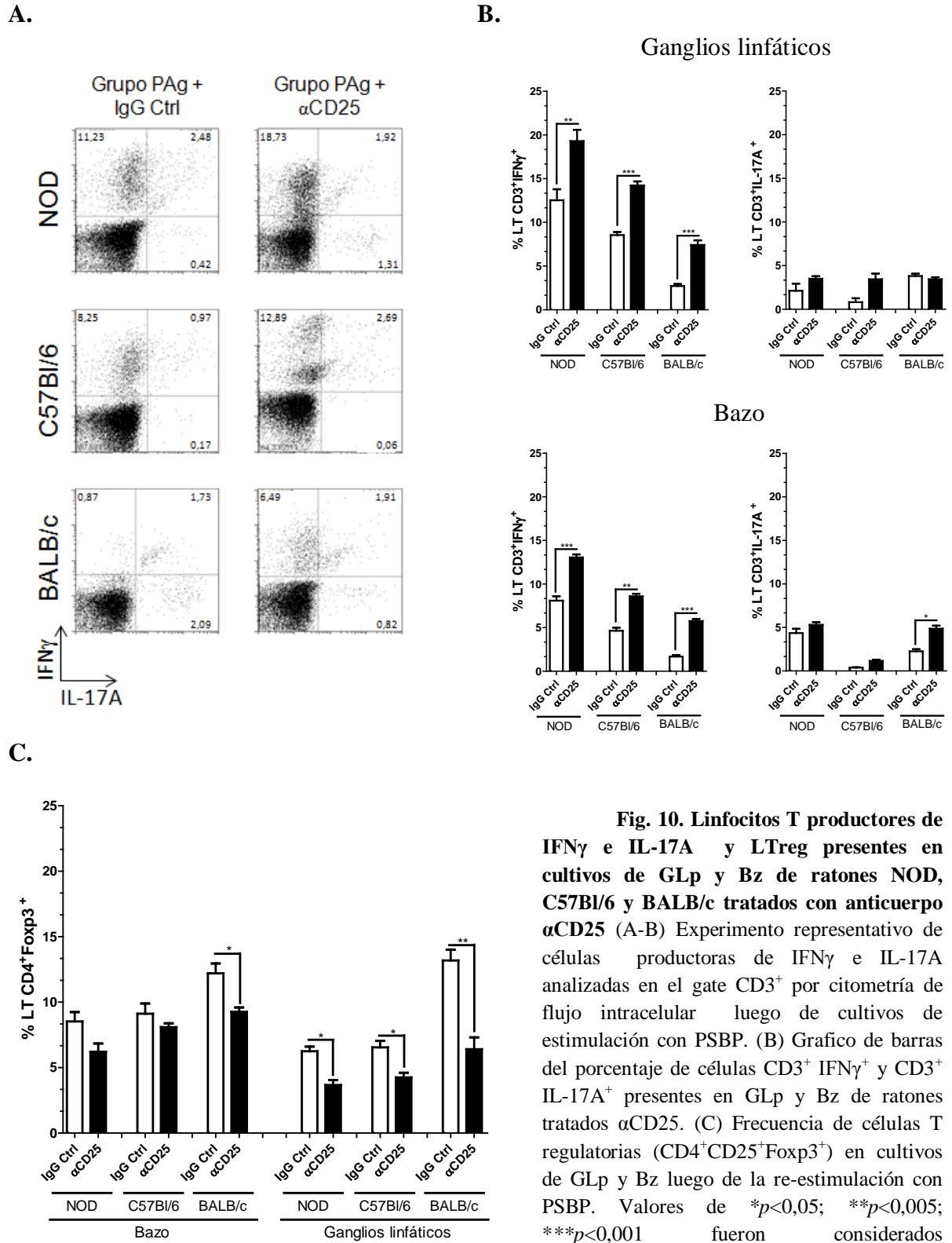
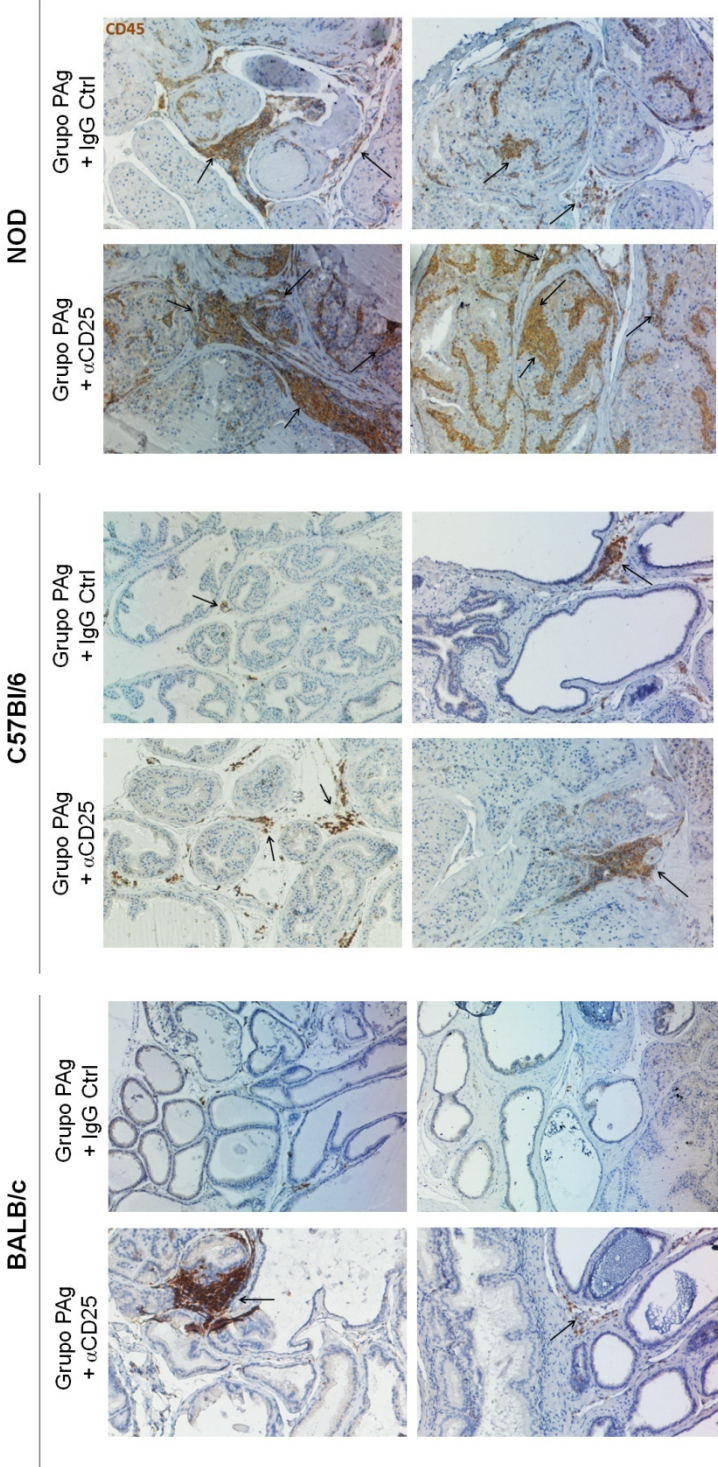


Fig. 10. Linfocitos T productores de IFN γ e IL-17A y LTreg presentes en cultivos de GLp y Bz de ratones NOD, C57Bl/6 y BALB/c tratados con anticuerpo α CD25 (A-B) Experimento representativo de células productoras de IFN γ e IL-17A analizadas en el gate CD3⁺ por citometría de flujo intracelular luego de cultivos de estimulación con PSBP. (B) Grafico de barras del porcentaje de células CD3⁺ IFN γ ⁺ y CD3⁺ IL-17A⁺ presentes en GLp y Bz de ratones tratados α CD25. (C) Frecuencia de células T regulatorias (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) en cultivos de GLp y Bz luego de la re-estimulación con PSBP. Valores de * p <0,05; ** p <0,005; *** p <0,001 fueron considerados estadísticamente significativos.

Cuando las glándulas prostáticas de los diferentes grupos de animales fueron analizadas a través de IHQ y citometría de flujo, se pudo observar que los grupos de animales que habían sido tratados con el anticuerpo α CD25 presentaron una mayor infiltración en el tejido prostático en comparación con animales de la misma cepa tratados con el anticuerpo IgG control. Como se puede observar en la Figura 11A, la cepa NOD incrementó significativamente la magnitud de la infiltración, pudiéndose observar una mayor cantidad de leucocitos CD45⁺ no solo perivasculares rodeando los acinos, sino también una gran cantidad de éstos localizados dentro de acinos prostáticos (Figura 11A). En próstata de ratones C57Bl/6 donde se observaban focos puntuales de leucocitos intraprostáticos, el tratamiento con el anticuerpo α CD25 incrementó la cantidad de focos de leucocitos infiltrantes y la cantidad de leucocitos por foco inflamatorio (Figura 11A). Finalmente la cepa BALB/c resistente a PAE, la cual poseía mayores niveles de Treg y Tr1 se vio sensiblemente afectada por la depleción de Treg en la fase inductora de la patología. Las glándulas prostáticas de animales BALB/c tratados con el anticuerpo α CD25 mostraron un marcado infiltrado de leucocitos intraprostáticos significativamente diferente a los animales tratados con anticuerpo control (Figura 11).

Estos resultados fueron corroborados por la técnica de citometría de flujo luego de digerir, homogeneizar el tejido y marcar la suspensión celular con anticuerpos monoclonales característicos de subpoblaciones leucocitarias. Los niveles de células CD45⁺ presentes en próstata incrementaron significativamente en todos los grupos tratados con el anticuerpo α CD25 (Figura 11B). Se encontró que una proporción importante de los leucocitos infiltrantes CD45⁺ eran también CD3⁺, es decir que una gran frecuencia de las células presentes dentro del tejido prostático son LT (Figura 11B y 11C). Es interesante notar que el tratamiento con el anticuerpo α CD25, y con ello la depleción de células Treg al momento de la generación de la respuesta autoinmune induce en la cepa de susceptibilidad moderada niveles de infiltración similares a los de la cepa más susceptible NOD sin tratamiento. De la misma manera ratones de la cepa resistente BALB/c depletados de células Treg en el momento de la inducción de la respuesta autoinmune, alcanzan niveles de infiltración similares a los observados en la cepa C57Bl/6 sin tratamiento (Figuras 11B y 11C).

A.



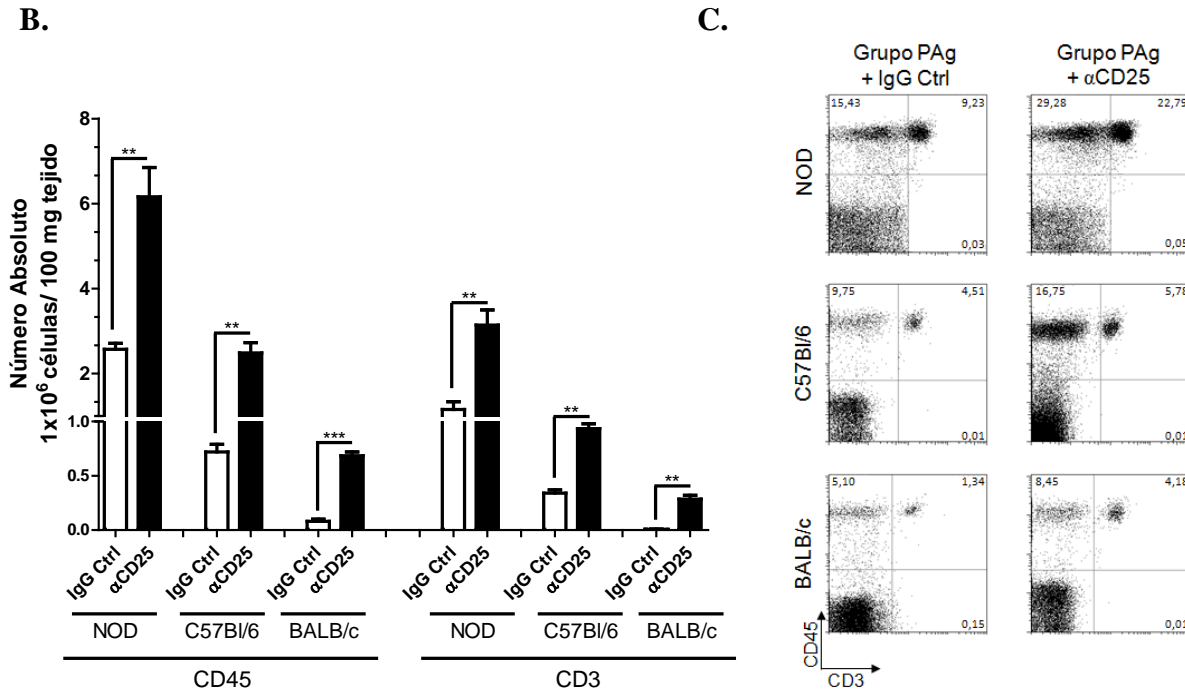


Fig. 11. Análisis del infiltrado leucocitario prostático en ratones NOD, C57Bl/6 y BALB/c tratados con los anticuerpos monoclonales αCD25 o IgG control. (A) Presencia y localización del infiltrado leucocitario a través de la detección del marcador panleucocitario CD45 en glándulas prostáticas provenientes de ratones NOD, C57Bl/6 y BALB/c tratados con anticuerpo αCD25 o anticuerpo control (200x) mediante la técnica de IHQ. (B-C) Células mononucleares aisladas de suspensiones de glándulas prostáticas contadas y teñidas para CD45 y CD3. El número absoluto de células dentro del tejido prostático fue previamente contado para luego poder estimar el número absoluto de las subpoblaciones leucocitarias. Los datos se muestran como media ± S.D., n=4 por grupo, representativo de 2 experimentos. Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Nuestros resultados demuestran que la falta de células Treg en el momento de la inducción de la respuesta contra antígenos prostáticos genera mayores niveles de LT activados con un perfil principalmente Th1 y mayores grados de infiltración y lesión en la glándula prostática en las tres cepas de animales en estudio. De manera interesante, la falta de células Treg en el momento de la inducción de la respuesta autoinmune contra próstata hace que ratones resistentes a PAE se tornen susceptibles y desarrollen la enfermedad. En periferia estos ratones BALB/c tratados incrementan sus niveles de LT activados, pero más importante aún estos linfocitos cambian hacia un perfil Th1, lo que se relaciona de manera directa con una mayor infiltración en la glándula prostática.

Resultados: Parte II

Rol del IFN γ en la susceptibilidad a desarrollar PAE

Rol del IFN γ en la susceptibilidad a desarrollar Prostatitis Autoinmune

Los resultados presentados en el capítulo anterior demostraron que la respuesta Th1 se asociaba a una mayor susceptibilidad a desarrollar PAE. Los ratones NOD con susceptibilidad elevada presentaron niveles altos de LTh1 específicos para PSBP, mientras que ratones resistentes como los ratones BALB/c presentaron una muy baja respuesta Th1 específica.

Las diferencias en susceptibilidad al desarrollo de PAE entre estas dos cepas se podrían relacionar también a sus diferentes bases genéticas, a diferencias en los mecanismos de tolerancia central y/o periférica, con el reconocimiento de distintos autoantígenos o epítopes de autoantígenos por los LT efectores entre otras muchas posibilidades.

Debido a que nuestros resultados sugieren que el fenotipo Th1 y la producción de IFN γ están directamente relacionados a la susceptibilidad a desarrollar prostatitis autoinmune, se propuso trabajar con ratones NOD genéticamente deficientes en la producción de la citoquina IFN γ (NOD-IFN $\gamma^{-/-}$). Esta cepa de ratones, posee la misma base genética que la cepa susceptible NOD, pero no tiene la posibilidad de producir IFN γ nos brindó un modelo interesante en el cual estudiar el rol de esta citoquina en el modelo de Prostatitis Autoinmune.

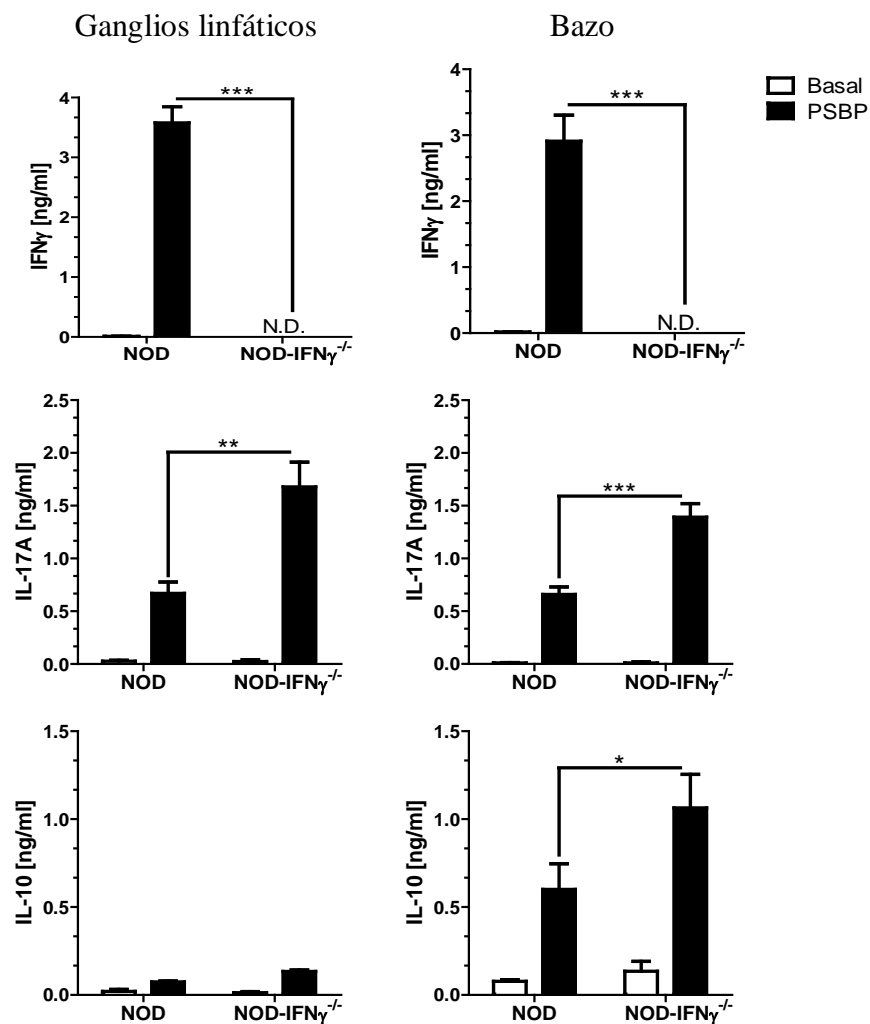
I. Caracterización del tipo de respuesta inmune específica que se induce luego de la inmunización de ratones NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ con antígenos prostáticos

Ratones NOD *wt* y NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ fueron inmunizados con antígenos prostáticos y adyuvantes según el protocolo ya descripto. Se realizaron cultivos de GLp y Bz en presencia PSBP y se analizaron las poblaciones Th1, Th17, Th2, Tr1 y Treg a través del estudio de citoquinas en los sobrenadantes de cultivos y del análisis de la frecuencia de células productoras de citoquinas.

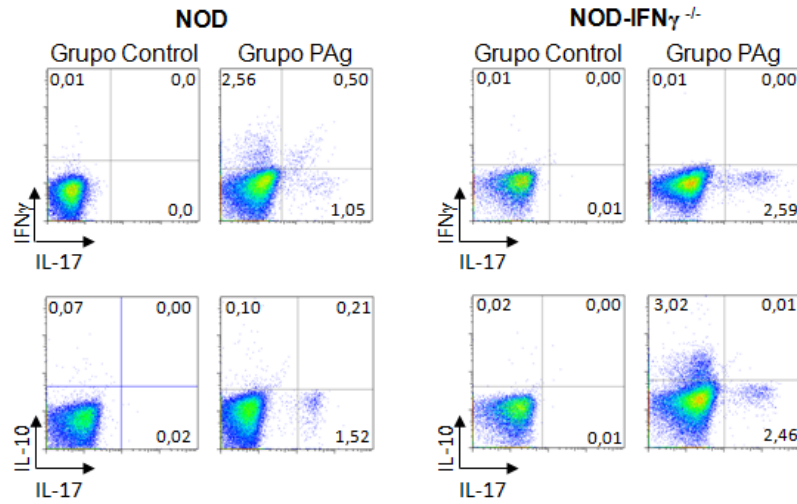
Como era esperado, cultivos de GLp y Bz de ratones NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ no mostraron presencia de LT específicos productores de IFN γ o de esta citoquina en los sobrenadantes de cultivo en ninguna de las condiciones ensayadas (Figuras 12A, 12B y 12C). Se observó una marcada desviación del perfil de respuesta inmune hacia el fenotipo Th17, con niveles

elevados de secreción de IL-17A y una mayor frecuencia de LT de productores de IL-17A, en comparación con los valores obtenidos de ratones NOD *wt* (Figuras 12A, 12B y 12C). Se observó además un incremento en la secreción de IL-10 en los sobrenadantes de cultivos de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} y una mayor frecuencia de células productoras de IL-10 (Tr1), en comparación con los ratones NOD *wt* (Figura 12). Estudios de doble marcación para IL-17A e IL-10 demostraron ausencia de células CD4⁺ doble productoras de estas citoquinas (Figura 12B). Cuando se analizó la población CD4⁺Foxp3⁺ se observó que los cultivos de células de GLp de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} tenían una frecuencia similar al de ratones NOD *wt*. Sin embargo se encontró una mayor frecuencia de células Treg en ratones NOD-IFN γ ^{-/-} luego de los cultivos de células de Bz, comparados con NOD *wt* (Figura 12D).

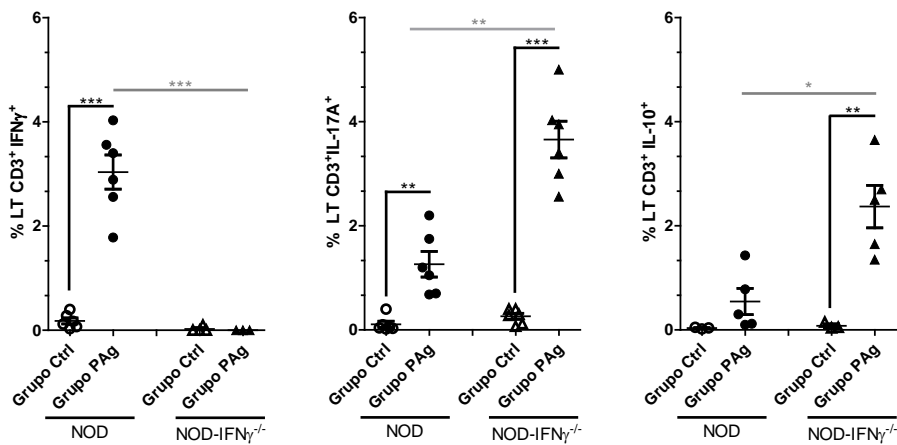
A.



B.



C.



D.

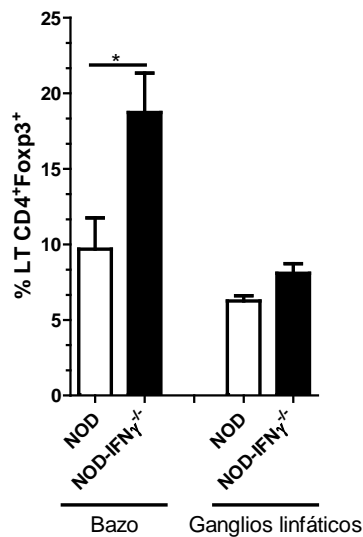


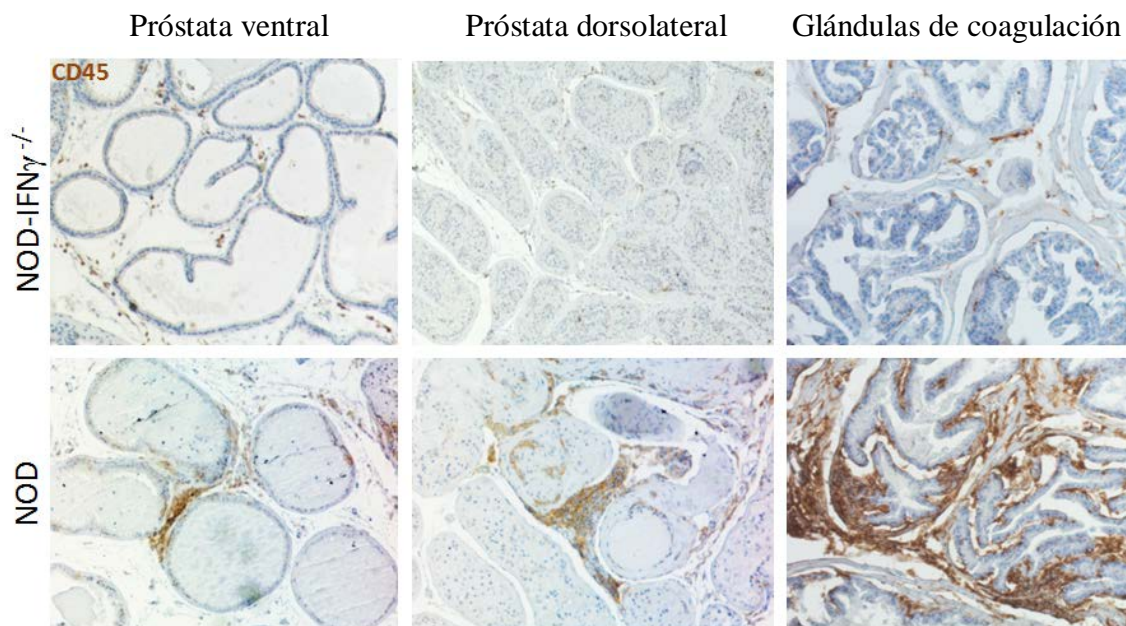
Fig 12. Linfocitos T específicos (Th1, Th17, Tr1 y Treg) en órganos linfáticos secundarios de ratones NOD-IFN γ ^{-/-}. Células mononucleares de GLp y Bz fueron re-estimuladas *in vitro* en presencia de medio (condición basal) o PSBP por 72 hs. (A) Secreción de citoquinas medida en sobrenadantes de cultivo por técnicas de ELISA. (B) Gráfico representativo de frecuencia de células productoras de IL-17A e IL-10 analizada dentro de la población de células CD3⁺ (C) Frecuencia de células productoras de IFN γ , IL-17A e IL-10 analizada en dentro de la población de células CD3⁺ (D) Frecuencia de células T regulatorias (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) luego de la re-estimulación con PSBP. Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

En los sobrenadantes de estos cultivos se midieron también los niveles de otras citoquinas como TGF β , IL-5, IL-4 e IL-13 encontrando niveles similares en muestras de ratones NOD y NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ (datos no mostrados).

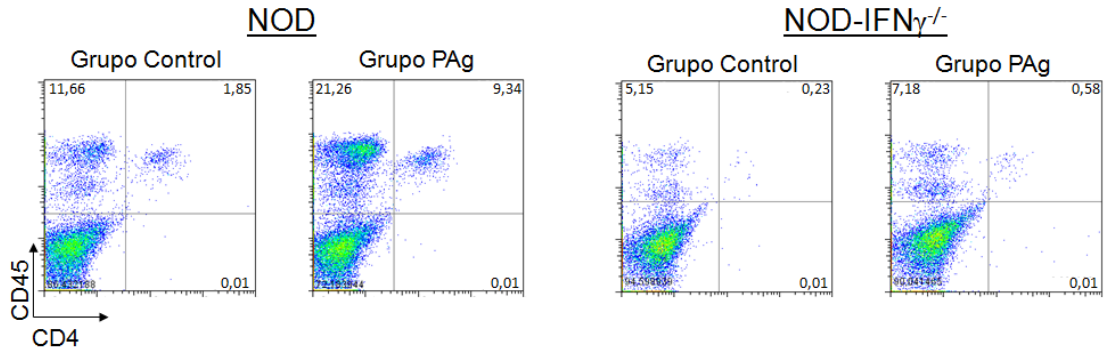
La infiltración leucocitaria en las glándulas prostáticas de estos animales fue analizada por IHQ y por citometría de flujo. Se observó que las secciones de las glándulas prostáticas de los ratones NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ mostraron un número limitado y significativamente menor de células CD45 $^{+}$ distribuidas en el tejido blanco en comparación con NOD *wt* (Figura 13A).

El análisis de las suspensiones celulares prostáticas pertenecientes a los ratones NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ mostró una escasa cantidad de células CD45 $^{+}$ en comparación con lo detectado en la cepa NOD *wt* (Figura 13 B, C). Esta cantidad reducida de leucocitos presente en próstata de los ratones NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ estaba compuesta por células positivas para los marcadores F480 y CD3.

A.



B.



C.

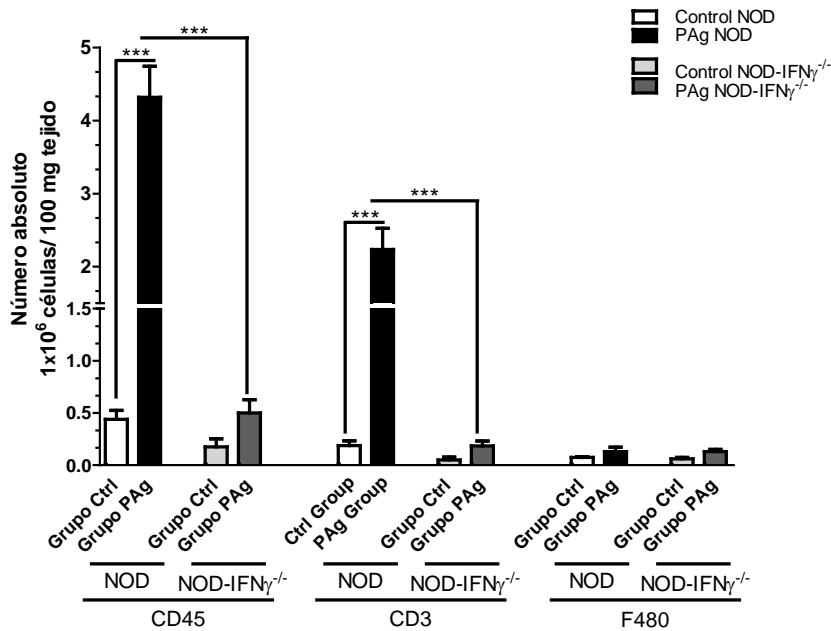


Fig 13. Análisis del infiltrado leucocitario en el tejido prostático de ratones NOD y NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ de los Grupos Control y PAg (A) Presencia y localización del infiltrado leucocitario a través de la detección del marcador panleucocitario CD45 en glándulas prostáticas provenientes de los Grupos PAg de las cepas de NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ y NOD *wt* mediante IHQ (200x). (B) Identificación del infiltrado prostático a través de la utilización de los marcadores CD45 y CD4, se muestran gráficos representativos de suspensiones celulares provenientes del tejido prostático de los grupos de ratones analizados (C) El número absoluto de células CD45⁺, CD3⁺ y F480⁺ infiltrantes dentro del tejido prostático fueron calculadas. Los datos están graficados mostrando la media \pm S.D., utilizando un n=4 por grupo cada grupo experimental. Resultados representativos de 2 experimentos independientes. Valores *** p <0,001 fueron considerados estadísticamente significativos.

En base a los resultados obtenidos en estos experimentos se pudo determinar que los ratones NOD-IFN γ ^{-/-} inmunizados con antígenos prostáticos y adyuvantes generaban LT específicos con un fenotipo diferente al observado en ratones NOD *wt*. En esta cepa de ratones deficiente en IFN γ ^{-/-}, se detectaron LT específicos con un fenotipo dominante Th17/Tc17, además de una mayor frecuencia de células Treg y Tr1. En estos animales no se observó presencia de infiltración o daño en el tejido blanco observándose un perfil muy similar al detectado en los ratones BALB/c.

II. Efecto de la administración de IFN γ recombinante (rIFN γ) en la susceptibilidad de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} a desarrollar PAE

Con el propósito de dilucidar si era necesario que el IFN γ fuese secretado por los LT específicos presentes en periferia, o si era necesaria la presencia de esta citoquina en el animal para que los linfocitos T específicos inducidos pudieran infiltrar la próstata e inducir lesión, se diseñaron experimentos en los que ratones NOD-IFN γ ^{-/-} fueron tratados con rIFN γ luego de la segunda inmunización (Figura 14).

Esquema experimental: tratamiento *in vivo* con rIFN γ

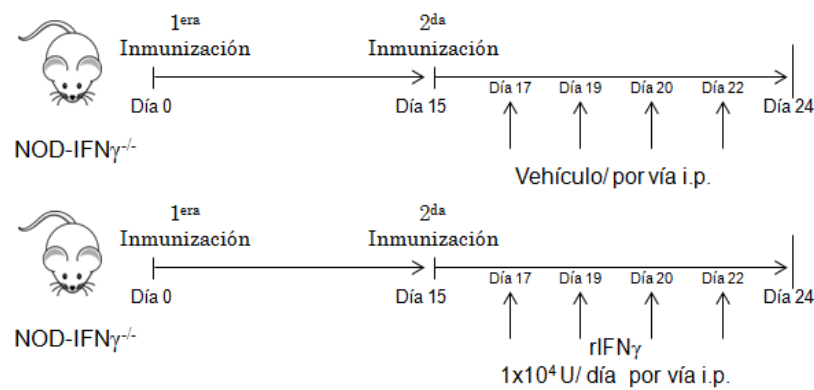


Fig. 14. Modelo experimental correspondiente al tratamiento con rIFN γ . Ratones de la cepa NOD-IFN γ ^{-/-} fueron inmunizados con una mezcla de antígenos prostáticos emulsificados en CFA en el día 0 y 15 del protocolo experimental. En los días 17, 19, 20, 22 del protocolo fueron inyectados por vía i.p. con BSA (vehículo) o con 1x10⁴U/I de rIFN γ . Los animales fueron sacrificados al día 24 para ser analizados.

Ratones de la cepa NOD-IFN γ ^{-/-} fueron inmunizados siguiendo el mismo protocolo y luego de la segunda inmunización, es decir en la fase efectora de la respuesta inmune, los animales fueron inyectados por vía i.p. con albumina sérica bovina al 0,1% en PBS (BSA) como vehículo o con rIFN γ en los días 17, 19, 20 y 22 del esquema experimental. Al finalizar el tratamiento en el día 24 del esquema los animales fueron sacrificados. La dosis de rIFN γ fue elegida siguiendo experimentos reportados por Savinov, A.Y. y col. La administración de BSA o rIFN γ fue realizada en la fase efectora final, para no afectar la fase de inducción de los LT específicos. En esta etapa se había demostrado una frecuencia alta de células específicas con un fenotipo dominante Th17.

Al sacrificar los animales en el día 24, se realizaron experimentos con células de GLp, Bz y muestras prostáticas. En las muestras de GLp y Bz se evaluaron los niveles de LT activados efectores y Treg sin encontrar diferencias significativas entre ratones NOD-IFN γ ^{-/-} tratados con rIFN γ o vehículo. Cuando las células mononucleares de GLp y Bz fueron re-estimuladas *in vitro* en presencia del autoantígeno y se evaluó la frecuencia de LT efectores (CD3⁺CD44^{hi}CD62L⁻) y de células Treg (CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺) no se observaron diferencias significativas entre los grupos de animales tratados con el vehículo o con IFN γ (Figura 15).

Frecuencia de células luego de la re-estimulación específica con PSBP

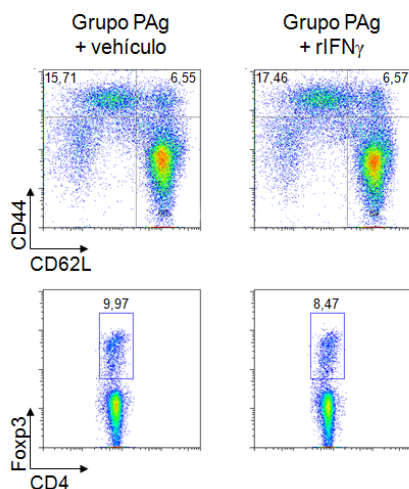


Fig. 15. Células T activadas y regulatorias en GLp de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} tratados con vehículo o rIFN γ . Células mononucleares de GLp de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} de los Grupos PAg tratados con vehículo (Grupo PAg + vehículo) o con rIFN γ (Grupo PAg + rIFN γ) fueron re-estimuladas *in vitro* en presencia del autoantígeno (PSBP) durante 72 hs. Frecuencia de LT efectores CD3⁺CD44^{hi}CD62L⁻ y LT regulatorios CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ analizada dentro de la población de células CD3⁺ por la técnica de citometría de flujo.

Al analizar los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de cultivos de GLp de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} tratados con rIFN γ o con vehículo no se observaron diferencias significativas en los valores de IL-17A e IL-10, no hallando valores detectables de IFN γ en los mismos (Figura 16).

Producción de citoquinas en sobrenadantes de cultivo

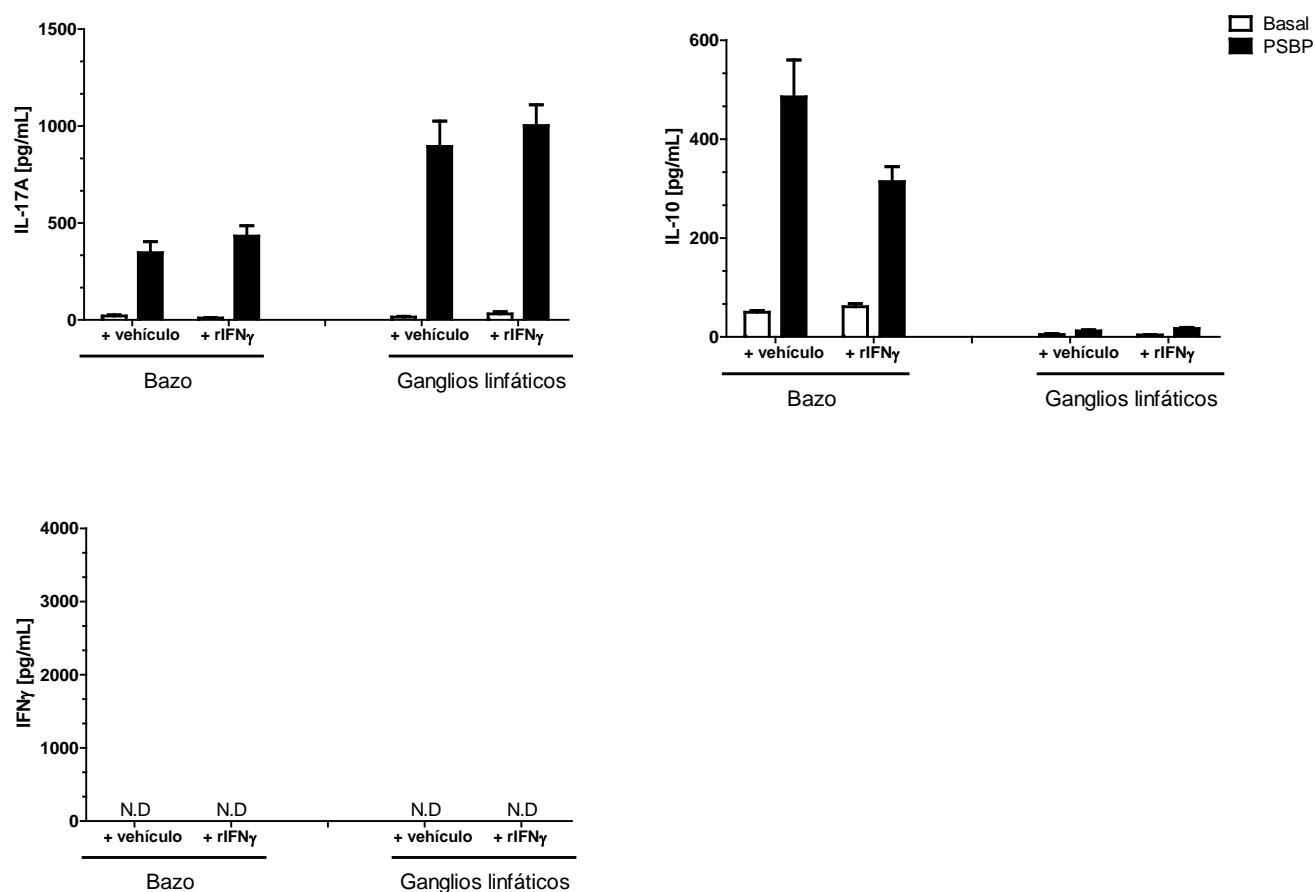
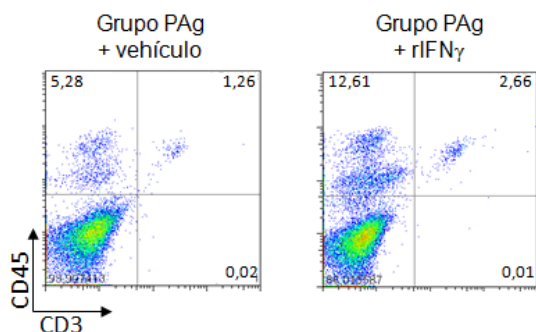


Fig. 16. Niveles de IFN γ , IL-17A, IL-10 en sobrenadantes de cultivos de GLp y Bz de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} tratados con rIFN γ . Células mononucleares de GLp y Bz de ratones de los Grupos PAg tratados con vehículo (Grupo PAg + vehículo) o con rIFN γ (Grupo PAg + rIFN γ) de la cepa NOD-IFN γ ^{-/-} fueron re-estimuladas *in vitro* en presencia medio (Basal) o autoantígeno (PSBP) durante 72 hs. La secreción de IFN γ , IL-17A e IL10 fue medida por la técnica de ELISA. Los datos se muestran como media \pm S.D., n=4 por grupo, representativo de 2 experimentos.

Se realizó también el análisis del número de leucocitos presentes en las glándulas prostáticas de los ratones NOD-IFN γ ^{-/-} tratados con rIFN γ o vehículo observándose un incremento significativo de células CD45⁺ y de LT CD3⁺ en próstatas de ratones tratados con rIFN γ (Figura 17 A-B).

A.



B.

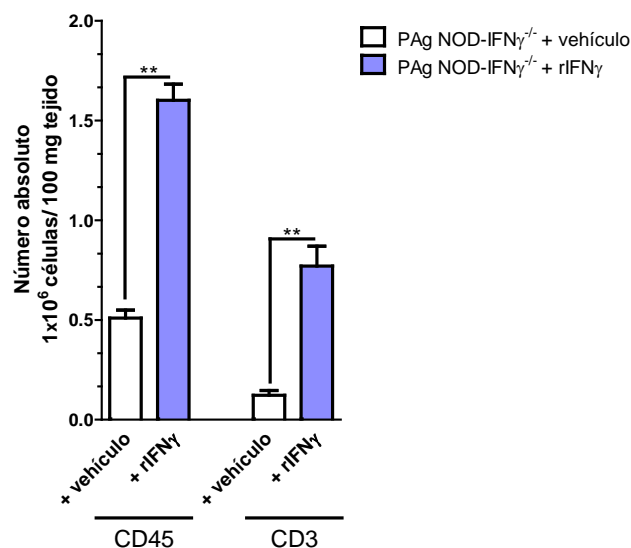


Fig.17. Análisis del infiltrado leucocitario prostático en ratones NOD-IFN γ ^{-/-} tratados con vehículo o rIFN γ . Células mononucleares de suspensiones de glándulas prostáticas fueron contadas y teñidas para los marcadores CD45 y CD3. A) Grafico representativo de marcación CD45 y CD3 en suspensiones celulares de próstata de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} tratados con vehículo o rIFN γ . B) Número absoluto de células infiltrantes CD45 y CD3 dentro del tejido prostático. Los datos se muestran como media \pm S.D., n=4 por grupo, representativo de 2 experimentos. Valores de ****p<0,005** fueron considerados estadísticamente significativos.

Estos resultados demuestran que no es necesario que los linfocitos T secreten $\text{IFN}\gamma$ para que estas células lleguen e infiltren la glándula, ya que en ratones $\text{NOD-IFN}\gamma^{-/-}$ tratados con la citoquina recombinante las células específicas no podían secretar $\text{IFN}\gamma$, y fueron principalmente secretoras de IL-17A. Sin embargo el tratamiento con r $\text{IFN}\gamma$ produjo cambios que hicieron que las células específicas pudieran llegar al órgano blanco. En base a estos resultados, se podría especular que el $\text{IFN}\gamma$ podría jugar un rol importante en el control de la migración de los LT específicos hacia el tejido prostático.

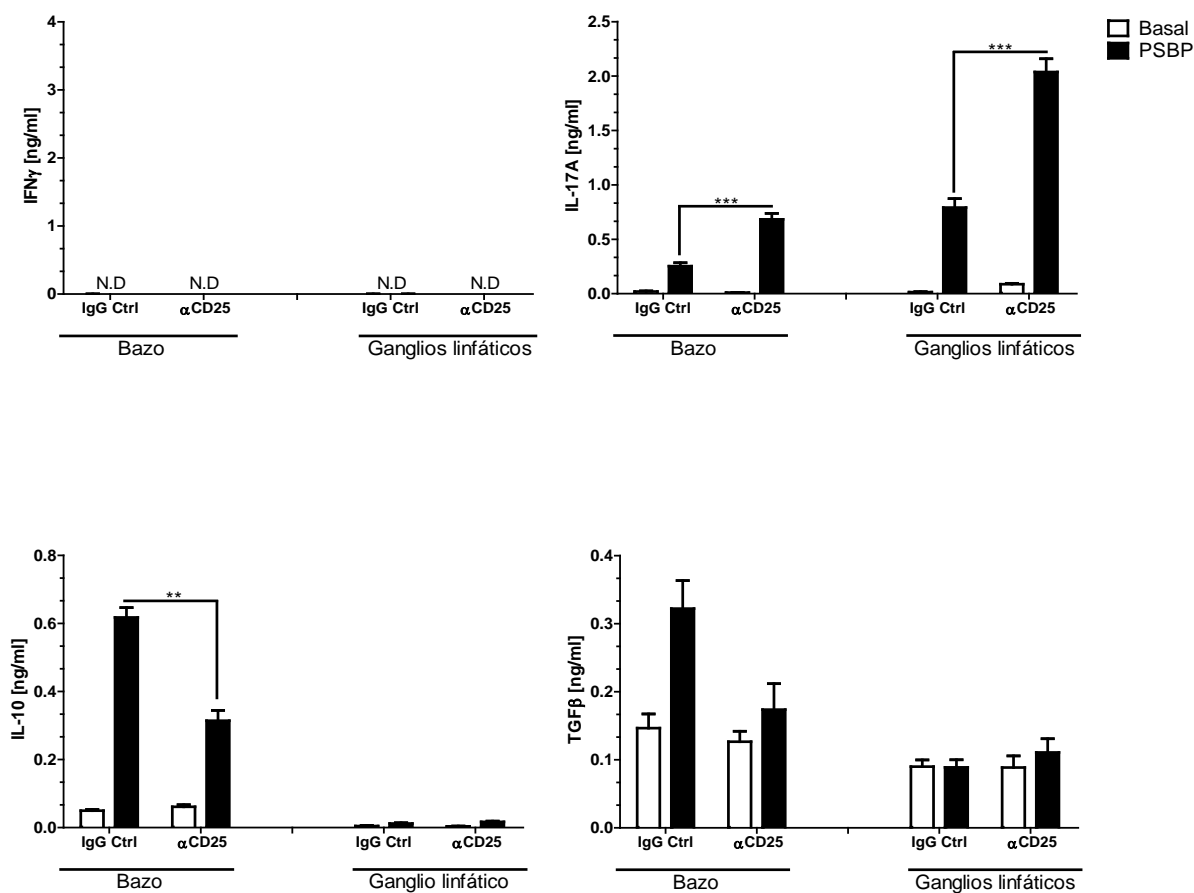
III. Rol de los LT regulatorios en la fase inductora de la respuesta inmune frente a antígenos prostáticos en ratones incapaces de inducir un fenotipo Th1/Tc1.

En el capítulo anterior, se ha demostrado que la depleción de células Treg incrementa la susceptibilidad al desarrollo de PAE en 3 cepas con diferentes susceptibilidades. El tratamiento de depleción de Treg se asoció a mayores niveles de LTh1 y mayor infiltración leucocitaria. El siguiente paso fue evaluar el efecto de la depleción de Treg en ratones de la cepa $\text{NOD-IFN}\gamma^{-/-}$ en donde no es posible la inducción de LT específicas con un perfil de activación Th1. Para ello se realizó un protocolo similar al de la Figura 6, pero en ratones de la cepa $\text{NOD-IFN}\gamma^{-/-}$. En el día 24 del esquema experimental los ratones $\text{NOD-IFN}\gamma^{-/-}$ fueron sacrificados y se realizaron cultivos de GLp y Bz en presencia de medio (Basal) o PSBP. Ratones $\text{NOD-IFN}\gamma^{-/-}$ inmunizados que fueron inyectados con el anticuerpo αCD25 reportaron mayores niveles de IL-17A en sobrenadantes de Bz y GLp cuando se los comparó con los valores hallados en muestras de ratones tratados con anticuerpo IgG control (Figura 18A). Los niveles de IL-10 se encontraron disminuidos en cultivos de bazo de ratones tratados con el anticuerpo αCD25 , sin demostrar cambios en sobrenadantes de células provenientes de GLp. En relación a los niveles de $\text{TGF}\beta$ no se observaron diferencias entre los valores encontrados en sobrenadantes de ratones tratados con los anticuerpos IgG control o αCD25 (Figura 18A). Ratones $\text{NOD-IFN}\gamma^{-/-}$ tratados con el anticuerpo αCD25 presentaron mayor frecuencia de LT productores de IL-17A en Bz y GLp (Figuras 18B y 18C). La frecuencia de linfocitos

Tr1 productores de IL-10 no se vio comprometida por el tratamiento con α CD25, aunque la frecuencia de células Treg se encontró levemente disminuida en GLp en comparación con los valores presentes en ratones inyectados con el anticuerpo IgG control (Figura 18D).

A.

Producción de citoquinas en sobrenadantes de cultivo



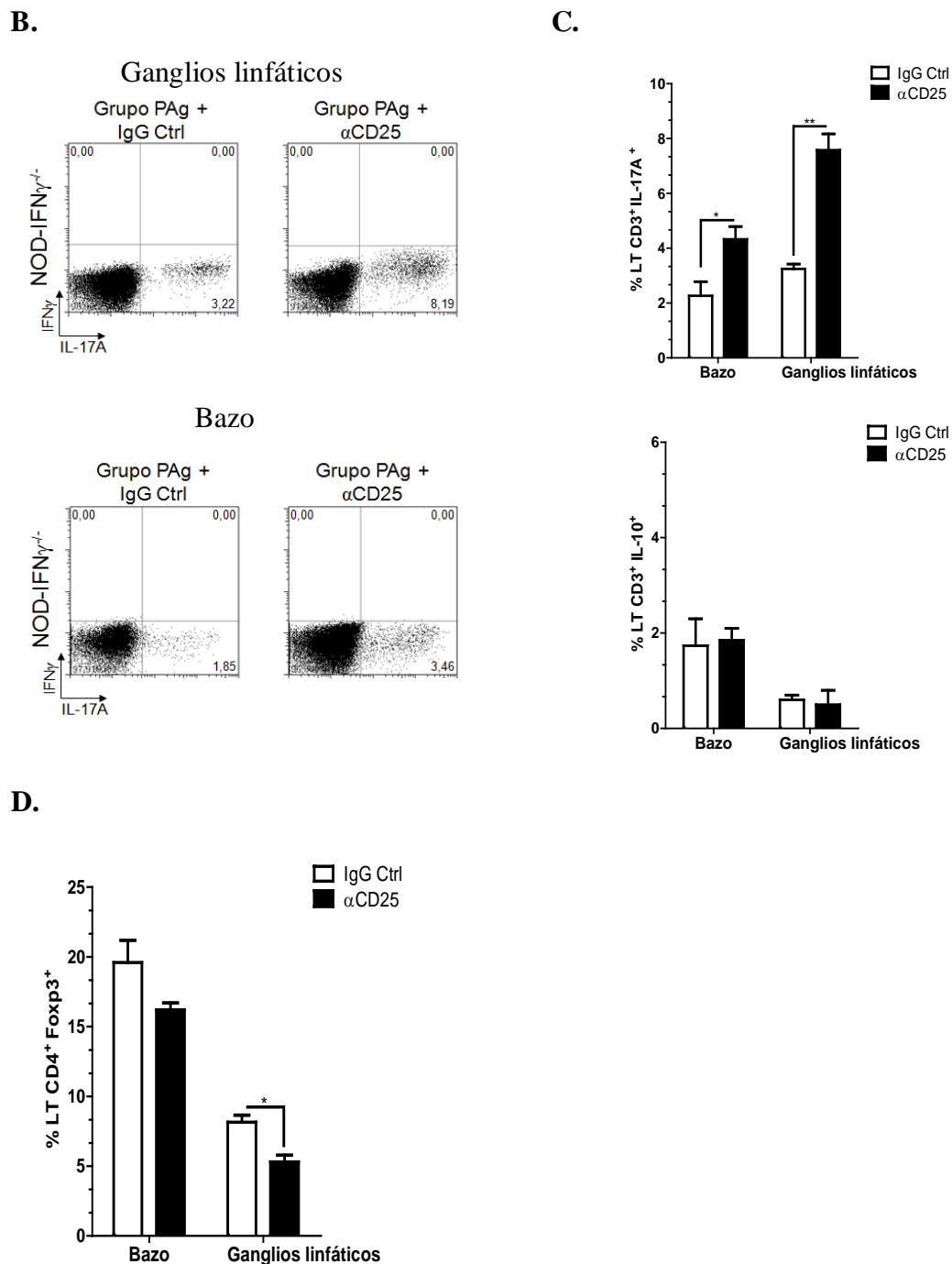


Fig. 18. Efecto del tratamiento con anticuerpos IgG control o α CD25 a ratones NOD-IFN γ ^{-/-}. Células mononucleares provenientes de GLp y Bz de los Grupos PAg_{IgG Control} y PAg _{α CD25} de la cepa NOD-IFN γ ^{-/-} fueron re-estimuladas *in vitro* en presencia de medio (basal) o con autoantígeno (PSBP) por 72 hs. (A) Secreción de citoquinas medida en sobrenadantes de cultivo por la técnica de ELISA. (B-C) Frecuencia de células específicas productoras de IL-17A e IL-10 fue analizada en la población de células CD3 por citometría de flujo intracelular. (D) Frecuencia de células Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) en GLp y Bz luego de la reestimulación con PSBP. Valores de * p <0,05; ** p <0,005; *** p <0,001 fueron considerados estadísticamente significativos.

Cuando las glándulas prostáticas de ratones NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ inyectados con el anticuerpo α CD25 o IgG control fueron analizadas no se encontraron diferencias significativas en la infiltración leucocitaria en los dos grupos con una baja cantidad de células CD45 infiltrando el tejido prostático (Figura 19). Al analizar las subpoblaciones infiltrantes de próstata se observó un leve incremento de células CD11b⁺, aunque la cantidad de células LT CD3⁺ en ratones tratados con el anticuerpo α CD25 no se vio modificada (Figura 19B).

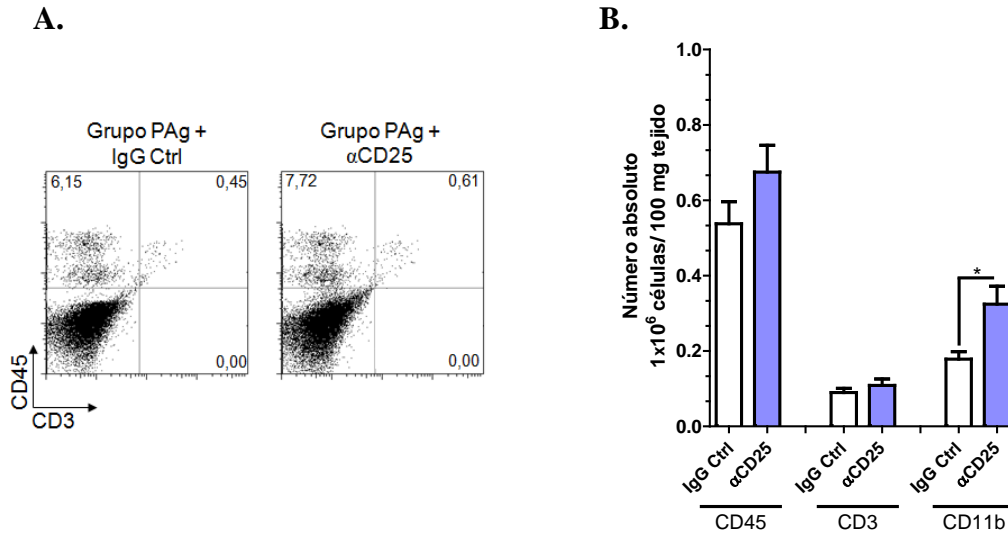


Fig. 19. Análisis del infiltrado leucocitario prostático de ratones NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ inmunizados y tratados con un anticuerpo IgG control o α CD25. Células mononucleares aisladas de suspensiones de glándulas prostáticas fueron contadas y teñidas para las moléculas CD45, CD3 y CD11b (A) Gráficos representativos de las suspensiones celulares prostáticas fueron analizadas a través de la técnica de citometría de flujo. (B) Número absoluto de células CD45, CD3 y CD11b dentro del tejido prostático. Los datos se muestran como media \pm S.D., n=3 por grupo cada grupo experimental, representativo de 2 experimentos. Valores de * p <0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Estos resultados demuestran que la depleción de células Treg en la fase inicial de la respuesta inmune en ratones con una base genética susceptible (NOD) en los que el perfil de activación Th1/Tc1 no puede ser inducido, favorece la inducción de LT específicos con un perfil dominante Th17/Tc17. A pesar de poseer una alta frecuencia de LT específicos Th17/Tc17 en la periferia, no se observó una significativa infiltración en la glándula prostática. La eliminación de Treg de manera transitoria en ratones NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ no se asoció con una mayor susceptibilidad al desarrollo de PAE.

Resultados: Parte III

Receptores de quimiocinas en LT específicos de ratones con diferente susceptibilidad a PAE

Receptores de quimiocinas en LT específicos de ratones con diferente susceptibilidad a PAE

Recientes reportes bibliográficos han demostrado que cuando se inducen los LT específicos en periferia, éstos lo hacen en un microambiente determinado influenciado por muchos factores y mediadores. Estos factores tienen la capacidad de condicionar y/o comprometer el fenotipo de activación de los LT de manera que inducen la expresión de determinados factores de transcripción, haciendo que adquieran la capacidad de secretar citoquinas particulares y la expresión de receptores que les permitan recircular y/o acceder a determinados tejidos. Entre los receptores de re-circulación se encuentran los receptores de quimiocinas, los que son utilizados por las células inmunes para poder alcanzar los tejidos particulares donde se expresan sus quimiocinas específicas.

Aunque los reportes acerca de la expresión de receptores de quimiocinas sobre LT de los fenotipos Th1, Th17, Th2, Tr1 y Treg no son lo suficientemente claros aun, existe un consenso en bibliografía que asocia la expresión de algunos receptores de quimiocinas con cada fenotipo de LT. Varios reportes indican que los receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5 son expresados preferencialmente en linfocitos con un fenotipo Th1 (Groom J.R., 2011; Sallusto F., 1998), mientras que los receptores CCR3, CCR4 y CCR8 son expresados en linfocitos con fenotipo Th2 (Sallusto F., 1998). En relación a los linfocitos Th17 diferentes autores indican que el receptor CCR6 se asocia a este perfil Th17 (Wang C., 2009; Reboldi A., 2009), aunque existe también evidencia que todos los fenotipos pueden expresar más receptores o compartir algunos de ellos (Chang H.K., 2009).

Debido a que en los capítulos anteriores demostramos que los ratones de las cepas NOD, C57Bl/6, BALB/c y NOD-IFN γ ^{-/-} presentaban diferencias importantes en los fenotipos de LT específicos hallados en periferia, con una presencia importante del fenotipo Th1 en ratones que revelaban una mayor infiltración prostática, nos propusimos investigar la expresión de los receptores de quimiocinas CXCR3, CCR5, CCR3, CCR4 y CCR6 en LT específicos de las distintas cepas.

I. Análisis de la expresión de los receptores de quimiocinas en LT específicos presentes en órganos linfoides de ratones NOD, C57Bl/6, BALB/c y NOD-IFN γ ^{-/-} luego de la inmunización con antígenos prostáticos emulsificados en CFA.

Para poder analizar si los linfocitos específicos para PSBP presentes en periferia de ratones de las cepas mencionadas expresaban receptores de quimiocinas asociados a los diferentes perfiles, se inmunizaron ratones de las distintas cepas siguiendo el protocolo ya descrito. Los animales fueron sacrificados en el día 24 y se realizaron cultivos de células mononucleares de Bz y GLp re-estimulando *in vitro* con PSBP durante 72 horas. Al finalizar los cultivos, se evaluó la expresión de los receptores CXCR3, CCR5, CCR6, CCR4 y CCR3 en superficie de células CD3⁺ por citometría de flujo.

LT provenientes de las cepas susceptibles NOD y C57Bl/6 expresaron mayores frecuencias de CXCR3 tanto en Bz como en GLp (~15 y 8 % de los LT) en comparación con las frecuencias halladas en linfocitos de la cepa resistente BALB/c (~3% de los LT) (Figura 20). La expresión de CCR5 fue también mayor en LT de ratones NOD y C57Bl/6, observándose una importante proporción de células CXCR3⁺CCR5⁺ en Bz de ratones NOD. La expresión de CCR6 se detectó elevada en LT de Bz de ratones BALB/c, aunque no se encontraron diferencias significativas en la expresión de este receptor entre los Grupos inmunizados con antígenos prostáticos de las 3 cepas analizadas (Figura 20). Se observó un incremento significativo en la expresión de CCR6 en los LT provenientes de animales de los Grupos PAg de las 3 cepas comparados con los Grupos Controles (datos no mostrados). Los LT provenientes de los Grupos PAg de las diferentes cepas de ratones (NOD, C57Bl/6 y BALB/c) no mostraron frecuencias elevadas de CCR4 o CCR3, ni diferencias significativas en la expresión de estos receptores cuando se comparó con los valores hallados en ratones controles (datos no mostrados).

Los LT de los animales pertenecientes a los Grupos controles de todas las cepas analizadas mostraron una expresión basal en los receptores de quimiocinas estudiados (datos no mostrados).

Expresión de receptores de quimiocinas

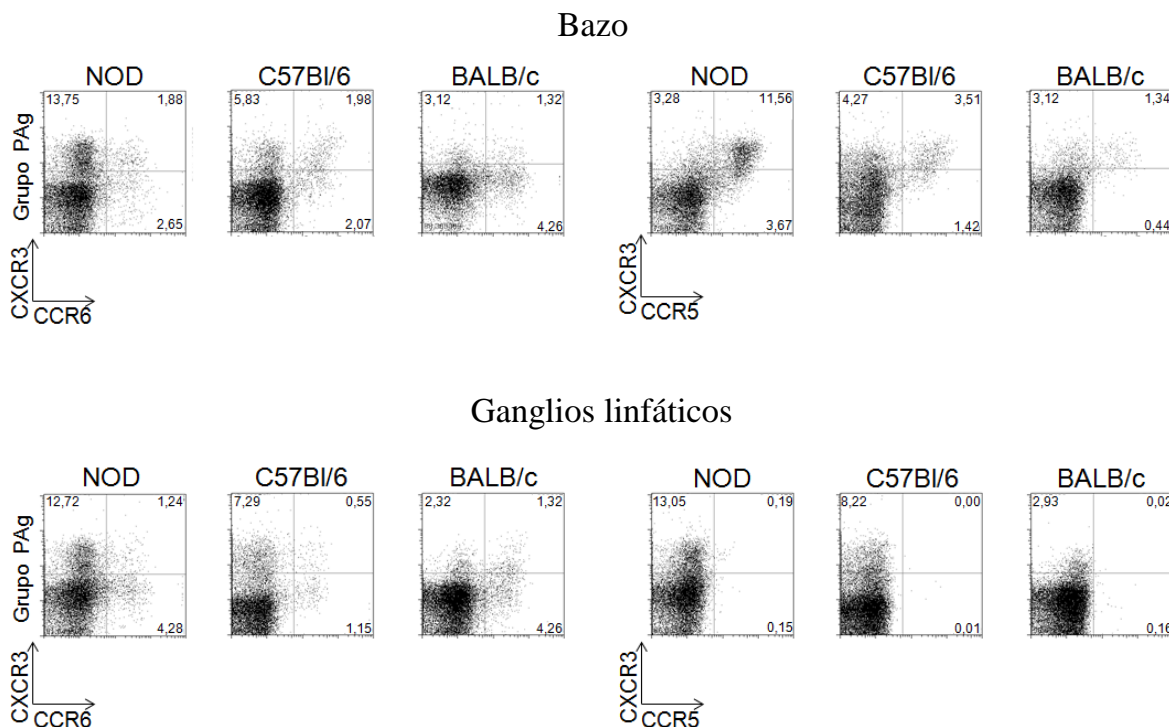


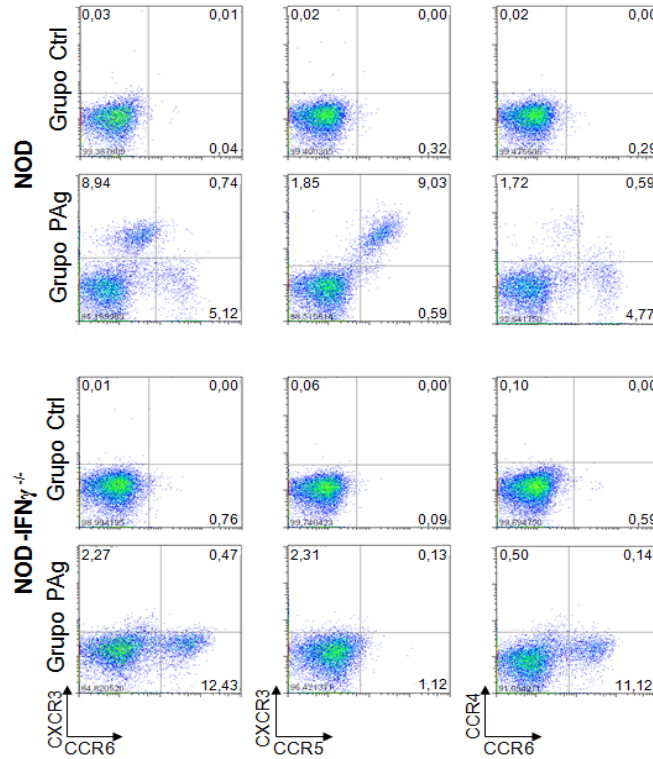
Fig.20. Expresión de receptores de quimiocinas en LT de ratones NOD, C57Bl/6 y BALB/c luego de la re-estimulación con PSBP. Células mononucleares de Bz y GLp de ratones de los Grupos PAG de las cepas NOD, C57Bl/6 y BALB/c fueron estimuladas *in vitro* en presencia de PSBP por 72hs. La expresión de los receptores de quimiocinas CXCR3, CCR5 y CCR6 fue evaluada dentro de la población de LT CD3⁺. Los datos se muestran como media \pm SD, n=3 por grupo cada grupo experimental, representativo de 2 experimentos independientes.

Siguiendo el mismo protocolo, se evaluó la expresión de receptores de quimiocinas en LT de ratones NOD-IFN γ ^{-/-}. Como se puede observar en la Figura 21A, LT de Bz de animales de los Grupos controles de las cepas NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} mostraron frecuencias muy bajas de expresión de CXCR3, CCR5, CCR4 y CCR6 luego del cultivo de estimulación con PSBP (valores entre 0.01-0.59%). LT provenientes de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} inmunizados del Grupo PAG presentaron una elevada frecuencia de LT CCR6⁺, con muy bajas frecuencias de LT que expresan los receptores CXCR3, CCR5, CCR4 o CCR3 (Figura 21A). El fenotipo de los LT específicos provenientes de estos ratones se identificó como CCR6⁺CXCR3⁻CCR5⁻ con bajas frecuencia de células CCR4⁺ y CCR3⁺, un fenotipo muy diferentes al encontrado en

los LT específicos provenientes de ratones NOD *wt*, identificados como CXCR3⁺CCR5⁺CCR6⁻ (Figura 21A y 21B).

A.

Expresión de receptores de quimiocinas



B.

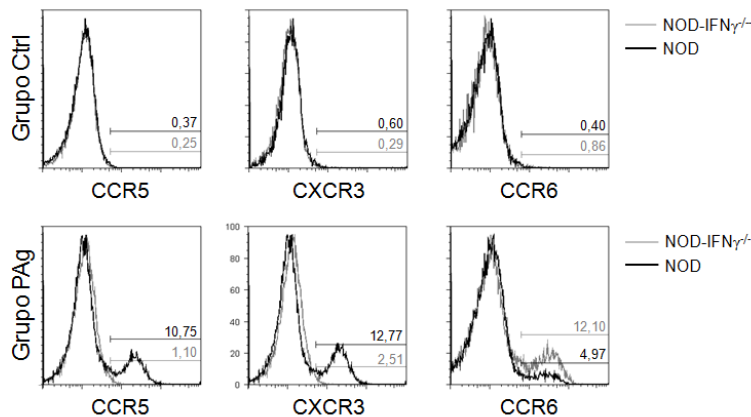


Fig. 21. Expresión de receptores de quimiocinas en LT de ratones NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} luego de la re-estimulación con PSBP. Células mononucleares de Bz de los Grupos PAg de ratones NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} fueron estimuladas *in vitro* en presencia de PSBP durante 72hs. La expresión de los receptores de quimiocinas CXCR3, CCR5 y CCR6 fue evaluada dentro de la población de LT CD3⁺. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

Estos resultados mostraron que los LT específicos provenientes de la cepa NOD y C57Bl/6 expresaron principalmente los receptores CXCR3 y CCR5 asociados al patrón Th1/Tc1, mientras que los LT específicos de las cepas BALB/c y NOD-IFN γ ^{-/-} expresaron principalmente el receptor CCR6 asociado al patrón Th17/Tc17.

II. Expresión de receptores de quimiocinas en LT de ratones NOD, C57Bl/6, BALB/c y NOD-IFN γ ^{-/-} tratados con α CD25

En el primer capítulo de la tesis se ha demostrado que el tratamiento con α CD25 fue capaz de inducir un incremento en la cantidad de LT con un perfil Th1 en ratones de las cepas NOD, C57Bl/6 y BALB/c y también aumentar el grado de infiltración y lesión en próstata en las tres cepas. Estos resultados sugirieron que la depleción de Treg en la fase inductora del modelo favorece el desvío de la respuesta inmune específica hacia el perfil Th1. Nos interesó entonces analizar si los LT de animales tratados con el anticuerpo α CD25 presentaban diferencias en la expresión de receptores de quimiocinas. Para ello seguimos el protocolo de tratamiento con vehículo o α CD25 descrito en la Figura 6, y en el día 24 del esquema los animales fueron sacrificados y se realizaron cultivos de células mononucleares de Bz y GLp en presencia del autoantígeno. Como se puede observar en la Figura 22, los LT de Bz y GLp provenientes del grupo de animales tratados con el anticuerpo α CD25 y re-estimulados *in vitro* con el autoantígeno, mostraron principalmente una mayor frecuencia en la expresión del receptor CXCR3 en todas las cepas analizadas. La expresión del receptor CXCR3 en la superficie de los LT de los grupos tratados con α CD25 se duplicó, en comparación con la expresión hallada en los ratones tratados con vehículo (en cada cepa analizada). La expresión del receptor CCR5 en LT de Bz de animales tratados con α CD25 se vio incrementada en la misma proporción y magnitud que la observada para CXCR3 (Figura 22). Sin embargo no se observó expresión de CCR5 en LT provenientes de GLp de ninguno de los grupos experimentales evaluados. Cuando la expresión de CCR6 en LT fue evaluada, no se observaron diferencias en la expresión de este receptor entre ratones tratados con los anticuerpos IgG control o α CD25. Estos resultados se correlacionaron con el mayor desvío de la respuesta inmune específica hacia un perfil Th1/Tc1 descrito previamente.

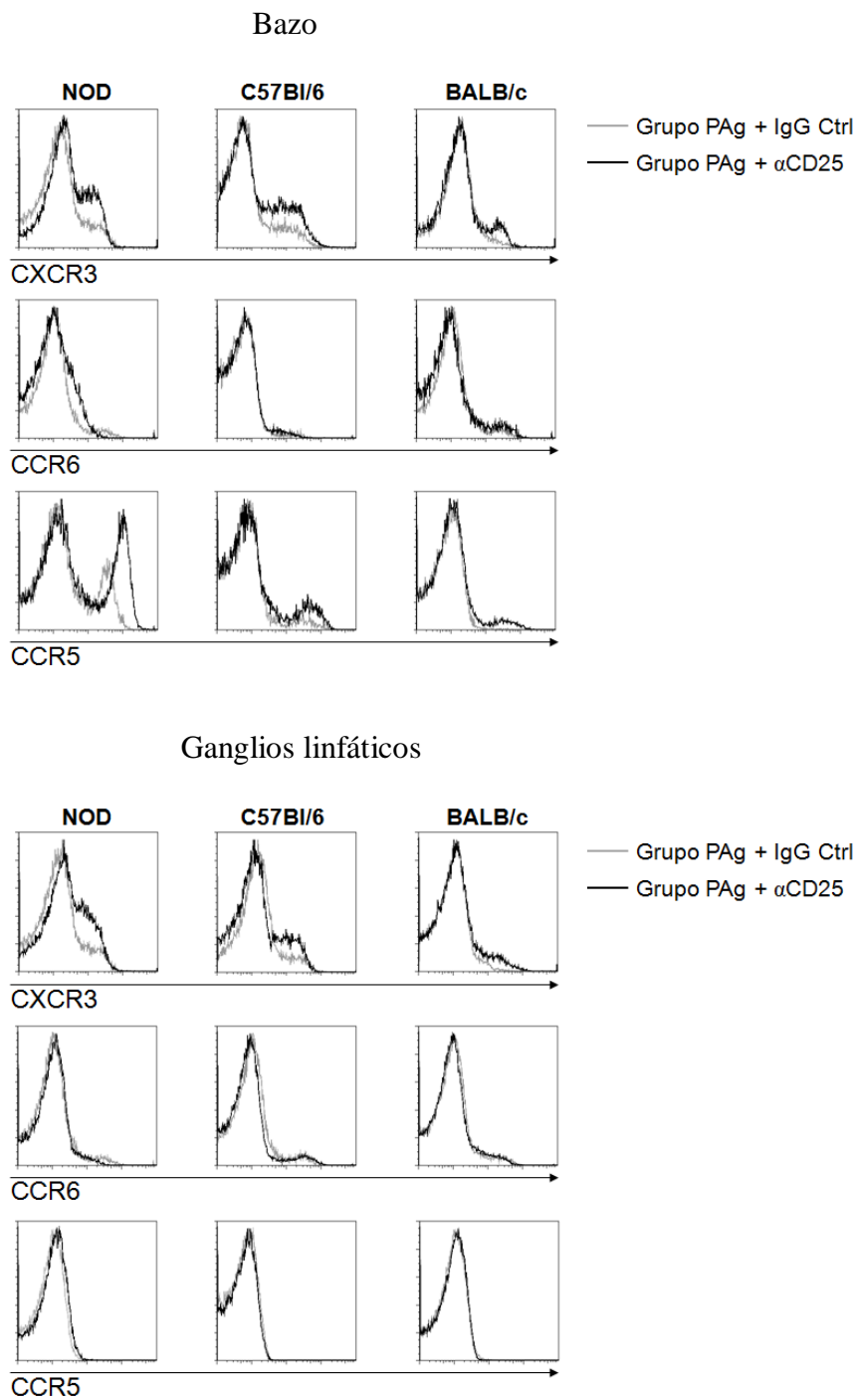


Fig. 22. Expresión de los receptores de quimiocinas en la superficie de los LT de ratones NOD, C57Bl/6 y BALB/c tratados con IgG control o α CD25. Células mononucleares de Bz y GLp de los Grupos PAg de ratones NOD, C57Bl/6 y BALB/c tratados con IgG control o α CD25 fueron estimuladas *in vitro* con PSBP durante 72 hs. La expresión de los receptores de quimiocinas CXCR3, CCR5 y CCR6 en la superficie de los LT CD3⁺ fue evaluada por citometría de flujo. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.

Estos resultados demostraron que la disminución de Treg en la fase inductora de la respuesta inmune específica no genera cambios en las poblaciones de LT CCR6⁺, pero sí induce un incremento en la expresión de LT CXCR3⁺ en las tres cepas de ratones analizadas: NOD, C57Bl/6 y BALB/c. Estos resultados se correlacionan con resultados previos donde se había reportado que la frecuencia de LT específicos con un fenotipo Th17/Tc17 no se veía afectada con la administración del anticuerpo α CD25 en las cepas de analizadas.

A continuación se propuso analizar si los LT de animales de la cepa NOD-IFN γ ^{-/-} tratados con el anticuerpo α CD25 presentaban diferencias en la expresión de receptores de quimiocinas. Para ello células mononucleares de Bz y GLp de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} tratados con los anticuerpos monoclonales IgG control o con α CD25 fueron re-estimuladas *in vitro* con PSBP, para luego analizar la expresión de receptores de quimiocinas en la población de LT. Los LT de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} del Grupo PAg tratados con el anticuerpo α CD25 revelaron un incremento significativo en la expresión de CCR6 luego de la re-estimulación con el antígeno (Figura 23). Este incremento se observó tanto en Bz como en GLp. La expresión del receptor CXCR3⁺ en la superficie de los LT no fue observada, mientras que se observó un leve y significativo incremento en la expresión del receptor CCR5 en la superficie de los LT de Bz en ratones tratados con el anticuerpo α CD25 (Figura 23).

Estos resultados demostraron que la depleción de células Treg en una cepa que no puede producir IFN γ desvía la respuesta hacia un perfil Th17/Tc17, con aumentos en los niveles de secreción de IL-17A, mayores frecuencias de LT productores de IL-17 con una mayor frecuencia en la expresión del receptor CCR6⁺.

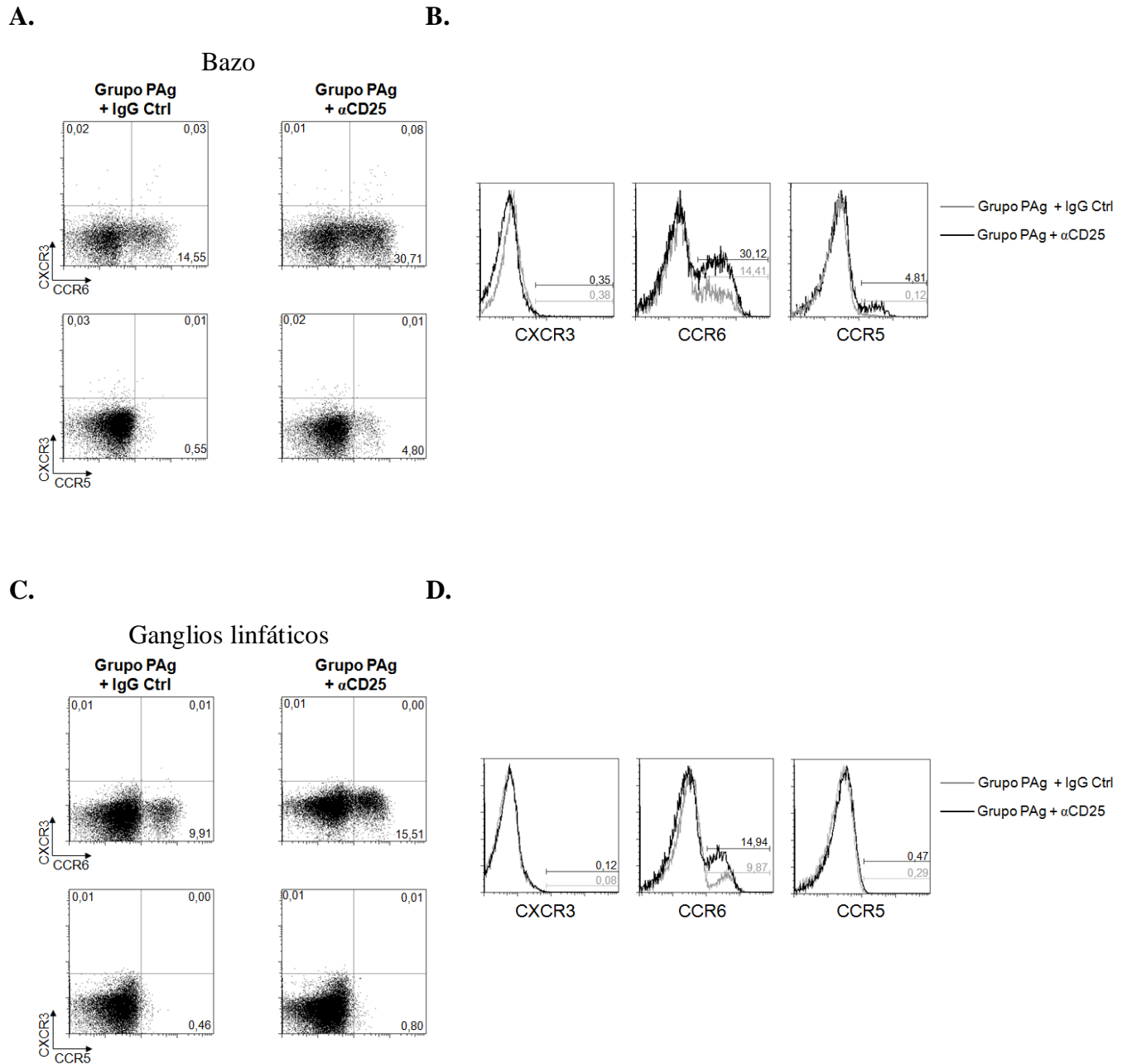


Fig. 23. Expresión de los receptores de quimiocinas en la superficie de LT de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} tratados con IgG control o α CD25. Células mononucleares de Bz y GLp del Grupos PAg de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} tratados con IgG control o α CD25 fueron estimuladas *in vitro* con PSBP durante 72 hs. La expresión de los receptores de quimiocinas CXCR3, CCR5 y CCR6 en la superficie de los LT CD3⁺ fue evaluada por citometría de flujo. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes

III. Expresión diferencial de los receptores de quimiocinas en la superficie de los LT y su relación con la capacidad de migrar e infiltrar la glándula prostática.

Para analizar la capacidad de recircular, migrar e infiltrar próstata de los LT específicos expresando distintos receptores de quimiocinas, se diseñaron experimentos de transferencia adoptiva de LT a ratones NOD-SCID (deficientes en linfocitos T y B) (Charron J., 1992). Con este objetivo, células mononucleares esplénicas de ratones inmunizados NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} (Grupos PAg), fueron re-estimuladas *in vitro* con PSBP durante 72hs y luego purificadas en base a expresión en superficie de CD3 (Figura 24). Un millón de LT CD3⁺ provenientes de ratones NOD *wt* o NOD-IFN γ ^{-/-} inmunizados fueron transferidos adoptivamente por vía intravenosa (i.v.) a ratones receptores NOD-SCID. A los 15 o 30 días post-transferencia, los ratones receptores NOD-SCID fueron sacrificados y se evaluó la presencia de LT CD3⁺ en Bz, GLp, ganglios no drenantes y en otros tejidos. De esta manera, se evaluó la recirculación de los LT CD3⁺ transferidos dentro de los órganos linfáticos secundarios y la capacidad de éstos de migrar e infiltrar la glándula prostática.

Esquema experimental

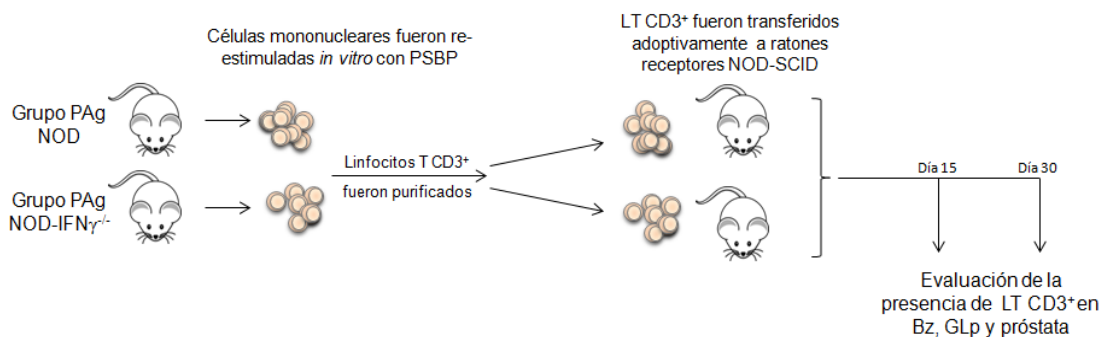
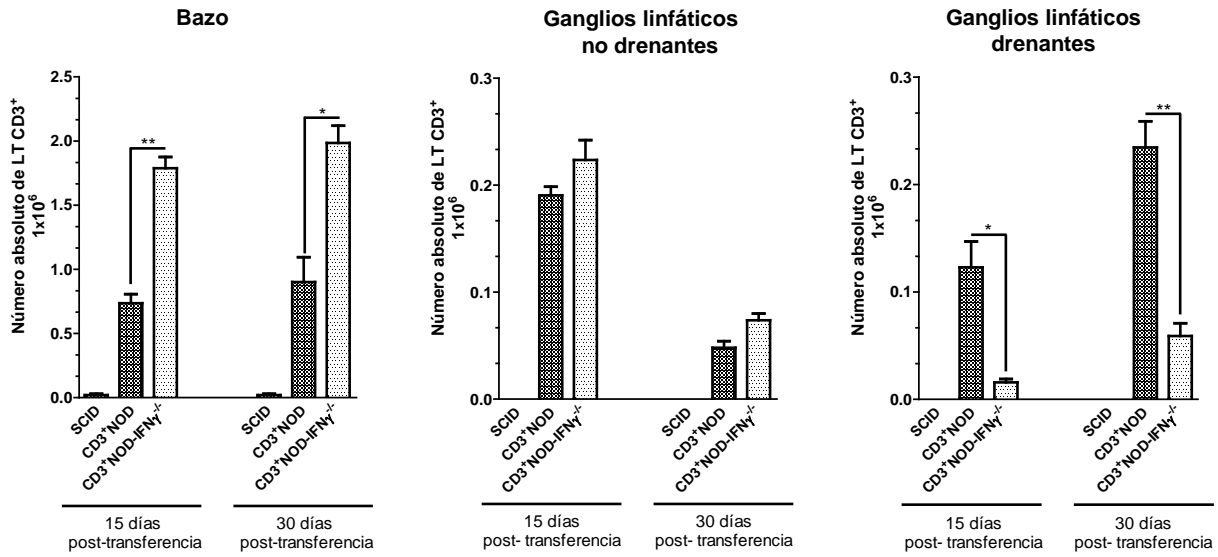


Fig. 24 Modelo experimental utilizado para evaluar la migración de los LT específicos. Células mononucleares provenientes de Bz de los Grupos PAg de animales NOD *wt* y NOD-IFN γ ^{-/-} fueron re-estimuladas *in vitro* en presencia de PSBP durante 72 hs. Los LT CD3⁺ de ratones NOD *wt* y NOD-IFN γ ^{-/-} fueron purificados por *cell-sorting* en base a la expresión de CD3 en la superficie. Un millón de LT de cada condición fue transferido a ratones receptores NOD-SCID. La presencia de LT dentro de los ratones NOD-SCID fue evaluada a los 15 y 30 días luego de la transferencia adoptiva.

A.



B.

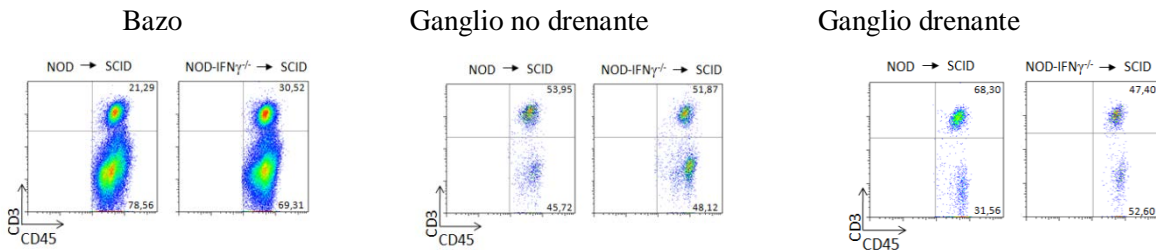


Fig. 25. Circulación periférica de los LT CD3⁺ de ratones NOD y NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ dentro de los ratones receptores NOD-SCID. (A) Número absoluto de LT CD3⁺ presentes en Bz, GL y ganglios no drenantes de próstata en ratones receptores NOD-SCID a los 15 y 30 días post-transferencia. (B) Gráficos de citometría de flujo representativos donde se muestra la frecuencia de LT dentro de Bz, GLp y ganglios no drenantes de próstata. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; fueron considerados estadísticamente significativos.

Como era de esperar, no se observaron niveles detectables de células CD3⁺ en ratones NOD-SCID no transferidos con LT. Sin embargo, se observaron células CD3⁺ en Bz, GLp y ganglios no-drenantes de próstata de ratones NOD-SCID receptores a los 15 y 30 días post-transferencia, demostrando que tanto los linfocitos ratones NOD *wt*, como los LT de ratones NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ fueron capaces de recircular por los órganos linfoides secundarios. Se

encontraron mayores niveles de LT CD3⁺ en Bz de ratones NOD-SCID transferidos con células de ratones NOD-IFN γ ^{-/-}, sin hallarse diferencias en la cantidad de LT CD3⁺ presentes en ganglios no drenantes de próstata (axilares y braquiales) (Figura 25). Se observó una mayor cantidad de LT CD3⁺ en ganglios drenantes de próstata de los ratones transferidos con LT provenientes de ratones NOD *wt* (Figura 25). Durante los tiempos analizados (15 y 30 post transferencia) se observó que el número absoluto de LT se mantenía estable en el Bz de los animales receptores, mientras que éstos valores incrementaron en los GLp y disminuían en los ganglios no drenantes o alejados al tejido prostático (Figura 25).

Para analizar si los LT transferidos además de recircular por órganos linfoides secundarios eran capaces de alcanzar el tejido prostático se evaluó la presencia de células CD3⁺ en próstata de los ratones NOD-SCID (Figura 26). Cuando las glándulas prostáticas fueron analizadas, sólo se pudo determinar la presencia de LT CD3⁺ en los animales receptores de células provenientes de ratones NOD *wt*. No se detectaron LT CD3⁺ en las glándulas prostáticas de ratones receptores NOD-SCID que recibieron la transferencia de células de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} (Figura 26).

Estos resultados demostraron que los LT CD3⁺ específicos provenientes de ratones NOD *wt* y NOD-IFN γ ^{-/-} transferidos a ratones NOD-SCID recircularon por los órganos linfáticos secundarios, sin embargo sólo pudieron alcanzar la glándula prostática aquellos LT CD3⁺ que provenían de los animales NOD. Para evaluar si esta capacidad de migrar a los tejidos era próstata-específica se analizó además la presencia de LT CD3⁺ en páncreas de los ratones NOD-SCID, no encontrándose células CD3⁺ en el páncreas de ratones transferidos con LT de ratones NOD *wt*, ni en el páncreas de receptores de LT de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} (datos no mostrados).

Además de buscar la presencia de células CD3⁺ dentro del tejido prostático se ha analizado los niveles de infiltración leucocitaria, es decir la cantidad de células CD45⁺ en próstata de los ratones receptores NOD-SCID. Se pudo determinar la presencia no sólo de LT CD3⁺ sino también una moderada cantidad de células CD45⁺ a los 15 días de la transferencia de células CD3⁺ provenientes de ratones NOD *wt*. Se observó que tanto el número absoluto de leucocitos CD45⁺ como así también el de LT CD3⁺ presentes en las glándulas prostáticas de los ratones receptores incrementaba significativamente con el tiempo post-transferencia (Figura 26B). Treinta días después de la transferencia adoptiva de LT de ratones NOD *wt*, se

observó un gran incremento en el número absoluto de leucocitos y LT en el tejido prostático en comparación con los valores hallados a los 15 días post transferencia (Figura 26B). Los resultados sugieren que células CD45⁺CD3⁻ de los ratones NOD-SCID receptores serían reclutadas a próstata. Es posible especular que la llegada de LT CD3⁺ específicos al tejido blanco y no a páncreas podría iniciar la liberación de citoquinas y/o quimiocinas que estarían reclutando otros leucocitos (CD45⁺CD3⁻) pertenecientes a los ratones huésped (Figura 26B).

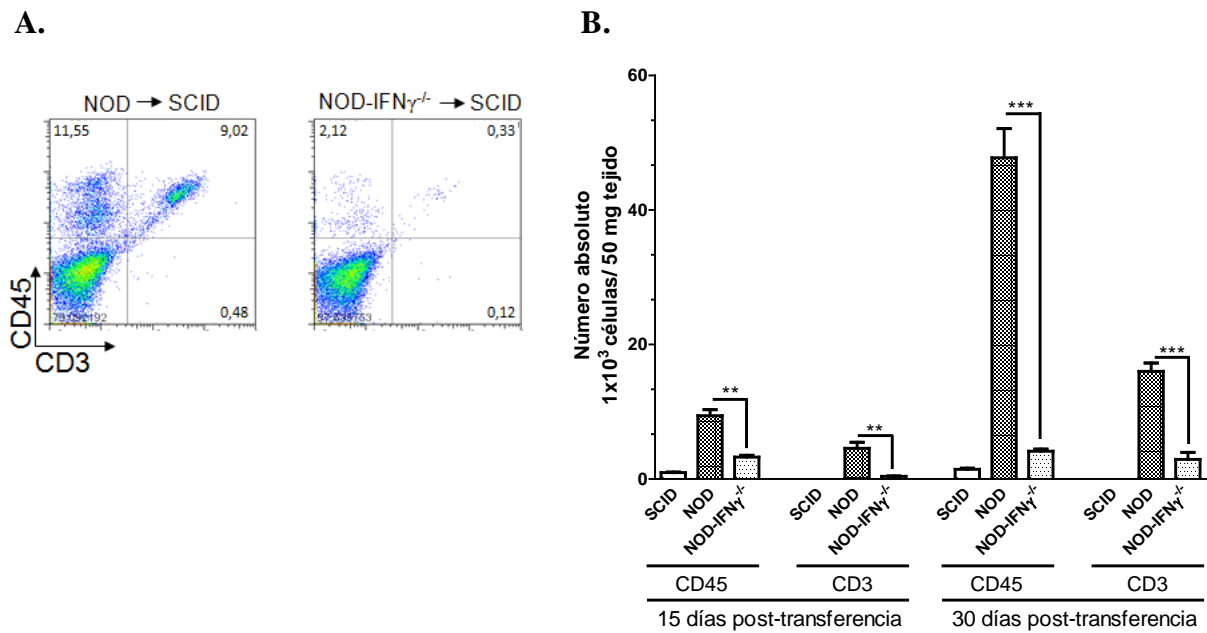


Fig. 26. Análisis del infiltrado leucocitario en las glándulas prostáticas de animales receptores NOD-SCID. (A) Gráficos representativos que muestran frecuencia y caracterización de leucocitos presentes dentro del tejido prostático de ratones receptores NOD-SCID a 30 días post-transferencia adoptiva de los LT específicos de ratones NOD o NOD-IFN $\gamma^{-/-}$. (B) Cuantificación de leucocitos totales (CD45⁺) y LT (CD3⁺) presentes en glándulas prostáticas de ratones receptores luego de 15 y 30 días post-transferencia adoptiva. Datos representativos de 2 experimentos independientes de un n=3 animales receptores por cada grupo. Los datos graficados en el inciso B son mostrados como la media \pm S.D. Valores de ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Cuando los animales receptores de los LT de ratones NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ fueron analizados, se encontró un número limitado de LT CD3⁺ y de leucocitos CD45⁺, valores que además no

incrementaron al día 30 post transferencia. Estos resultados demuestran que los LT CD3⁺ provenientes de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} son capaces de recircular por órganos linfoides pero no son capaces de infiltrar próstata y/o de iniciar el reclutamiento de otras células leucocitarias (Figura 26B).

IV. Análisis en la expresión de receptores de quimiocinas en la superficie de los LT y su capacidad de migrar e infiltrar la glándula prostática luego del tratamiento *in vitro* con rIFN γ .

La bibliografía indica que la expresión del receptor de quimiocina CXCR3 es inducido bajo señales que involucran la vía de activación a través de T-bet y que el IFN γ es capaz de activar la expresión de CXCR3 en células T (Lord G.M., 2005; Beima K.M., 2006; Afkarian M., 2000; Groom J.R., 2011(b)). En el caso de la expresión del receptor CCR5, se ha postulado que su expresión se asocia a señales que involucran la activación de STAT4 a través de IL-12p70, aunque se ha demostrado que la señalización a través del receptor de IFN γ amplifica y estabiliza la expresión del receptor (Iwasaki M., 2001 (a); Iwasaki M., 2001(b)). Debido a que en resultados previos se había observado que el tratamiento *in vivo* de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} con rIFN γ inducía un significativo incremento en la infiltración prostática, y conociendo que estos animales presentaban en circulación LT específicos con un perfil Th17/Tc17 (CCR6⁺), se propuso evaluar si el tratamiento *in vitro* con esta citoquina inducía cambios a nivel de la expresión de receptores de quimiocinas en la superficie de los LT específicos y si alteraba la capacidad migratoria de éstos favoreciendo su llegada al tejido prostático.

Con ese objetivo, se han realizado experimentos en los que células mononucleares esplénicas de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} fueron cultivadas *in vitro* durante 72 hs en presencia de PSBP o PSBP combinado con rIFN γ . Luego del cultivo se evaluó la expresión de receptores de quimiocinas en superficie. Como puede observarse en la Figura 27, los LT que fueron re-estimulados *in vitro* con PSBP en presencia de rIFN γ mostraron un aumento significativo de la expresión de CXCR3⁺ y CCR5⁺ en comparación con lo observado en células incubadas con el autoantígeno. Por otro lado, pudo observarse una disminución de la expresión del

receptor CCR6⁺ en la superficie de las células T en comparación a lo hallado en células cultivadas sólo con PSBP (Figura 27). Fue interesante observar que la expresión de CXCR3 y CCR5 en la superficie de los LT provenientes de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} estimulados con PSBP mas rIFN γ fue una expresión similar a la detectada en LT de ratones NOD *wt* (Figura 27B).

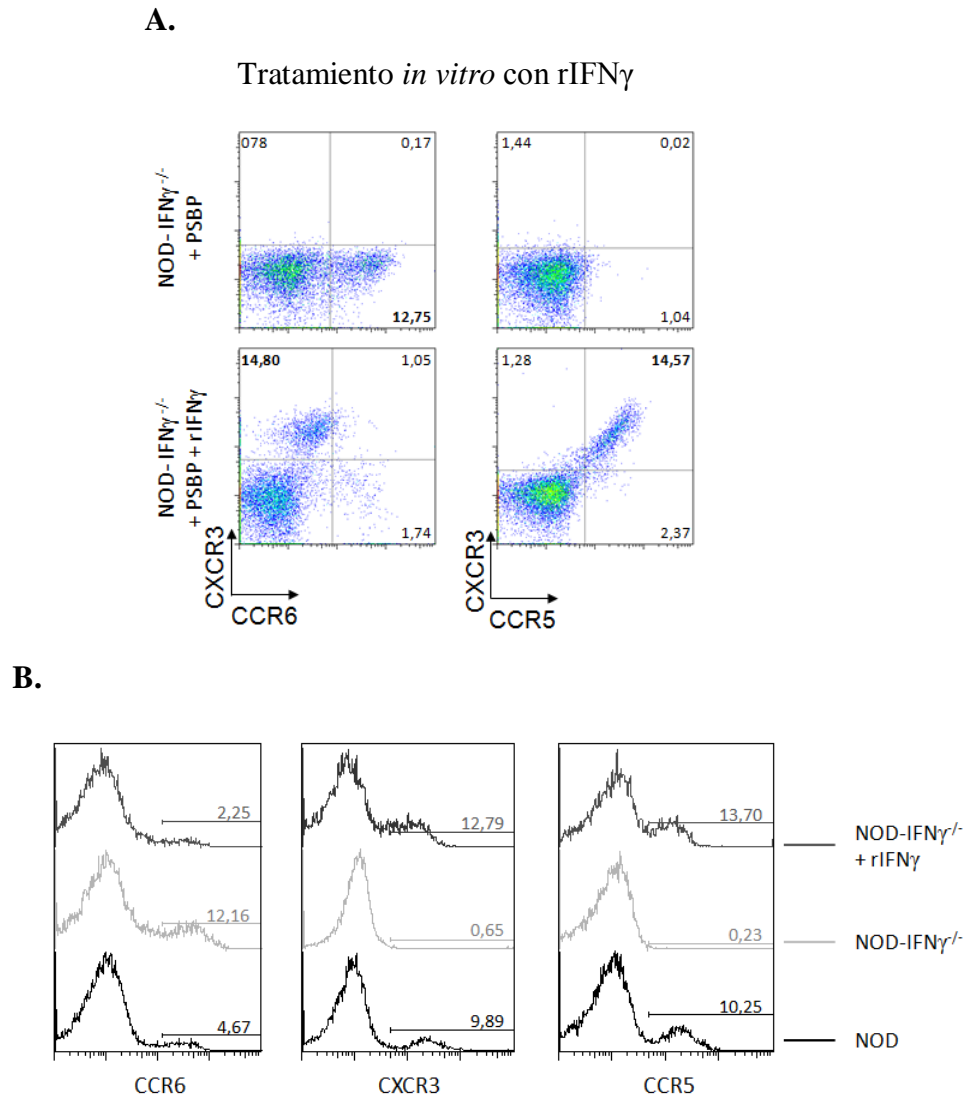


Fig. 27. Expresión de receptores de quimiocinas en la superficie de LT reestimulados *in vitro* con PSBP o con PSBP en presencia de rIFN γ Células mononucleares de Bz de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} fueron cultivadas *in vitro* durante 72 hs con PSBP o con PSBP en presencia de rIFN γ . (A) Expresión de los receptores CXCR3, CCR5 y CCR6 fue analizada en la superficie de la población de LT CD3⁺ por citometría de flujo. (B) Análisis de histogramas realizados en la población de LT CD3⁺. La línea gris oscuro representa a los LT de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} cultivados con PSBP en presencia de rIFN γ ; la línea gris clara representa a LT de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} cultivados con PSBP; y la línea negra representa a LT de ratones NOD cultivados con PSBP.

Además de evaluar la expresión de receptores de quimiocinas luego de la incubación en presencia de rIFN γ con el autoantígeno, realizamos experimentos de transferencia adoptiva de células CD3⁺ purificadas por *cell-sorting* a ratones NOD-SCID siguiendo el protocolo descrito en la Figura 24. Como Grupo control, se transfirieron también LT específicos provenientes de ratones NOD que habían sido estimulados con PSBP. A los 15 y 30 días post transferencia, se evaluó la recirculación de los LT CD3⁺ dentro de los órganos linfáticos secundarios y la capacidad de éstos de infiltrar la glándula prostática de los ratones NOD-SCID receptores (Figura 28).

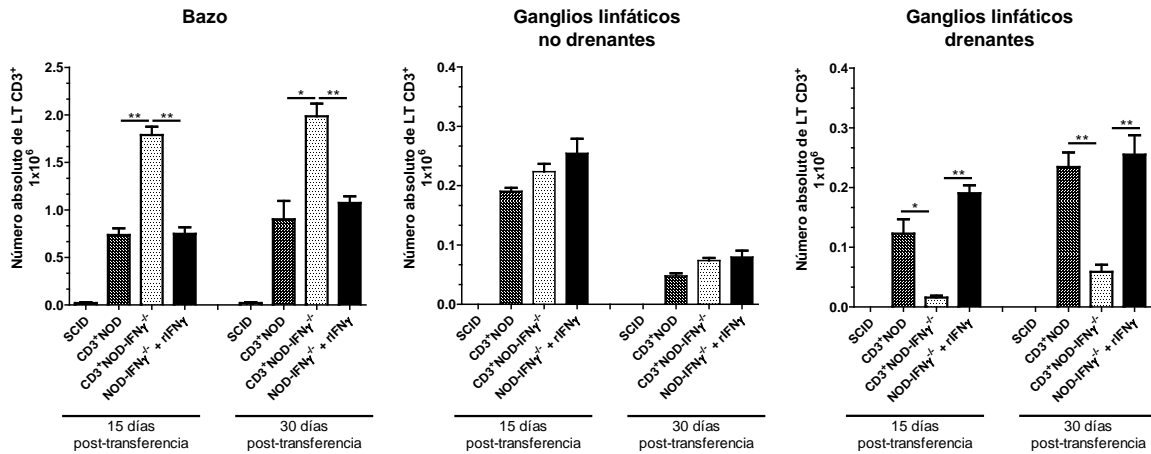
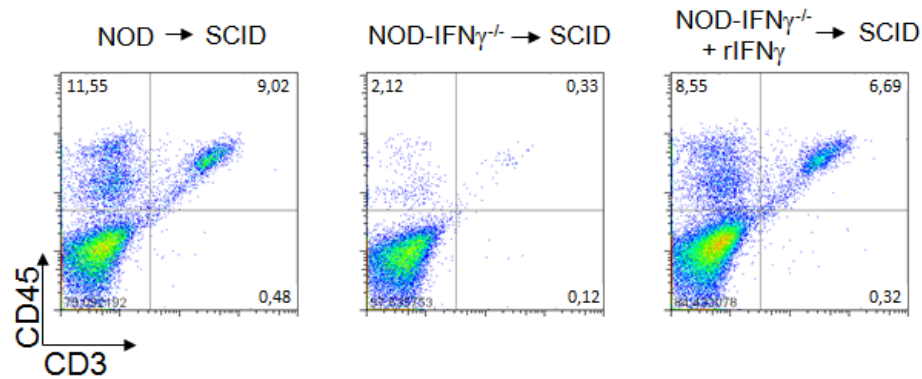


Fig. 28. Circulación periférica de LT provenientes de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} reestimulados con PSBP en presencia de rIFN γ , en órganos linfáticos de ratones receptores. (A) Número absoluto de LT CD3⁺ presentes en Bz, GLp y ganglios linfáticos no drenantes de próstata en ratones receptores NOD-SCID a los 15 y 30 días post-transferencia de LT provenientes de ratones NOD, NOD-IFN γ ^{-/-} y NOD-IFN γ ^{-/-} + rIFN γ . Los datos muestran media \pm SD, n=3 por cada grupo experimental, representativo de 2 experimentos independientes. Valores de * p < 0,05; ** p <0,005 fueron considerados estadísticamente significativos.

Linfocitos T CD3⁺ fueron encontrados en el Bz, GLp y ganglios linfáticos no-drenantes de próstata de ratones receptores NOD-SCID que fueron transferidos con LT de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} reestimulados con PSBP en presencia de rIFN γ . Estos resultados demuestran que los LT fueron capaces de recircular por órganos linfoides secundarios en similares niveles a los hallados en ratones receptores de LT provenientes de ratones NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} (Figura 28).

A.



B.

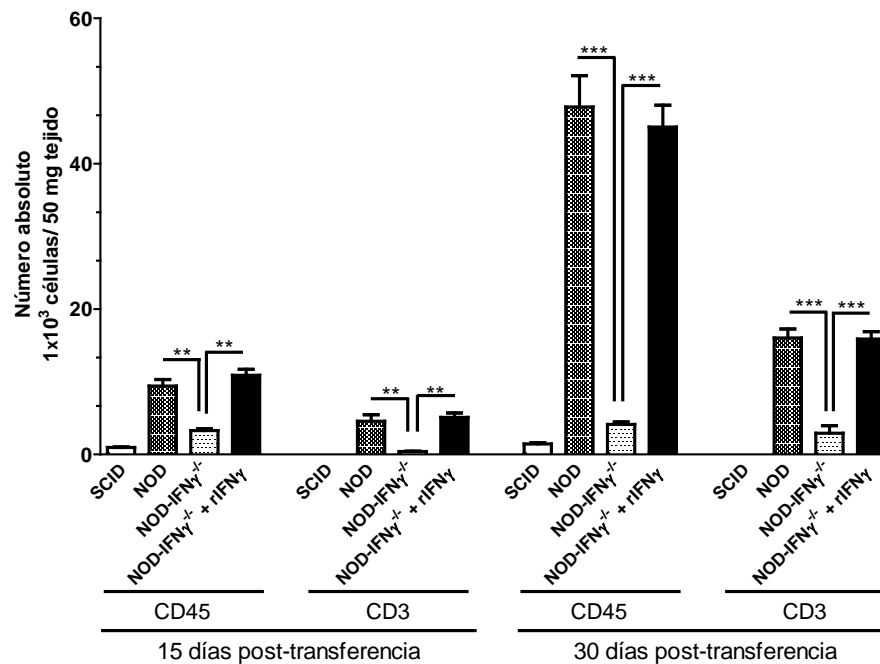


Fig. 29. Análisis del infiltrado leucocitario presente en las glándulas prostáticas de animales receptores NOD-SCID transferidos con LT de ratones NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ re-estimuladas con PSBP ó PSBP + rIFN γ . (A) Gráficos representativos de frecuencia y caracterización de leucocitos presentes dentro del tejido prostático de ratones receptores NOD-SCID luego de 30 días post-transferencia de LT específicos de ratones NOD, NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ y NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ tratados in vitro con rIFN γ (B) Cuantificación de leucocitos totales (CD45⁺) y LT (CD3⁺) presentes en las glándulas prostáticas de ratones receptores luego de 15 y 30 días post-transferencia adoptiva. Datos representativos de 2 experimentos independientes con un n=3 animales receptores por grupo. Los datos graficados en el inciso B fueron analizados como la media \pm S.D. Valores de ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

De manera interesante, los linfocitos T $CD3^+$ provenientes de ratones NOD- $IFN\gamma^{-/-}$, que fueron estimulados *in vitro* con PSBP en presencia de $rIFN\gamma$, fueron detectados en el tejido prostático en cantidades similares a las encontradas en receptores NOD-SCID de LT provenientes de ratones NOD *wt* (Figura 29). La cantidad de células $CD3^+$, como así también la cantidad de leucocitos $CD45^+CD3^-$, incrementaron con los días post transferencia indicando que los LT de ratones NOD- $IFN\gamma^{-/-}$ reestimulados *in vitro* con PSBP + $rIFN\gamma$ fueron capaces de infiltrar el tejido prostático e inducir el reclutamiento de leucocitos del huésped ($CD45^+CD3^-$) a la glándula prostática (Figura 29). Estos resultados demuestran que células T específicas que son incapaces *per se* de producir $IFN\gamma$, una vez reestimuladas en presencia de esta citoquina, inducen la expresión de CXCR3 y CCR5 y ahora si son capaces de migrar e infiltrar el órgano blanco, e inducir el reclutamiento de otros leucocitos al tejido prostático.

En base a estos resultados se puede concluir que la expresión de CXCR3 en la superficie de los LT específicos (y no la capacidad de producir $IFN\gamma$), está relacionada de manera directa con la habilidad de estas células de alcanzar la glándula prostática. Estos resultados podrían sugerir que la migración de los LT específicos hacia el tejido prostático podría estar regulada por la expresión de los receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5 y la expresión de sus ligandos específicos en el órgano blanco.

Resultados: Parte IV

Expresión de quimiocinas en próstatas de ratones normales y luego de la inducción de PAE

En distintos modelos de autoinmunidad órgano-específica se postula que los linfocitos T autoreactivos migran a los tejidos blancos guiados por quimiocinas presentes en los mismos. Hasta este momento, se han reportado aproximadamente 50 quimiocinas y 20 receptores para éstas. El reclutamiento a través de quimiocinas específicas y sus receptores se produce por contacto directo entre estos, aunque muchos receptores se unen a más de una quimiocina específica (Oo Y.H., 2010; Bradley L.M., 2003; Ward S.G., 2009). Se ha reportado que los ligandos específicos del receptor CXCR3 son las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11, mientras que los ligandos de CCR5 son las quimiocinas CCL3, CCL4 y CCL5. En el caso del receptor CCR6 el único ligando descrito es la quimiocina CCL20. Las quimiocinas pueden ser producidas en forma constitutiva o ser inducidas bajo diferentes estímulos, por células epiteliales de los tejidos, fibroblastos, células endoteliales y células inmunes (Bonecchi R., 2009; Mortier A., 2012; Groom J.R., 2011(a))

Se postula que una vez que los LT específicos logran alcanzar su órgano blanco guiados en parte por las quimiocinas expresadas en ese tejido, permanecen allí porque encuentran su antígeno, se activan, amplifican y liberan citoquinas, con lo que se iniciaría el reclutamiento de más células inmunes amplificando el proceso inflamatorio y el daño tisular.

Debido a que en resultados previos encontramos un patrón particular de expresión de receptores de quimiocinas en LT específicos asociado a la capacidad de infiltrar próstata, decidimos estudiar la expresión de quimiocinas asociadas a estos receptores en próstata de ratones NOD y NOD-IFN γ ^{-/-}.

I. Expresión de quimiocinas en tejidos prostáticos de ratones NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} controles

Para determinar que quimiocinas y factores solubles estaban siendo expresados en las glándulas prostáticas normales en animales de las cepas NOD y NOD-IFN γ ^{-/-}, y también en próstata de estos ratones inmunizados con antígenos prostáticos y adyuvantes, se utilizó un *array* que permitió evaluar un grupo numeroso de quimiocinas, citoquinas y factores de crecimiento en el tejido. Las glándulas prostáticas de ratones normales de

ambas cepas fueron disgregadas y analizadas. Nos focalizamos en primera medida en la expresión de las quimiocinas asociadas a los receptores CXCR3, CCR5 y CCR6.

Se observó que las próstatas de ratones NOD tenían una expresión basal detectable de los ligandos específicos de CXCR3, las quimiocinas CXCL11 y CXCL9, mientras que ninguna de estas quimiocinas fue detectada en las glándulas prostáticas de animales controles NOD-IFN γ ^{-/-} (Figura 30A). Una expresión basal de las quimiocinas CCL3, CCL4 y CCL5, asociadas al receptor CCR5, también fue detectada en glándulas de animales controles NOD, mientras que en próstata de animales controles NOD-IFN γ ^{-/-} se detectó solo una expresión baja de CCL4 (Figura 30B). Bajos niveles de CCL20, única quimiocina asociada al receptor CCR6, también fueron revelados en las próstatas de animales controles de la cepa NOD (Figura 30C).

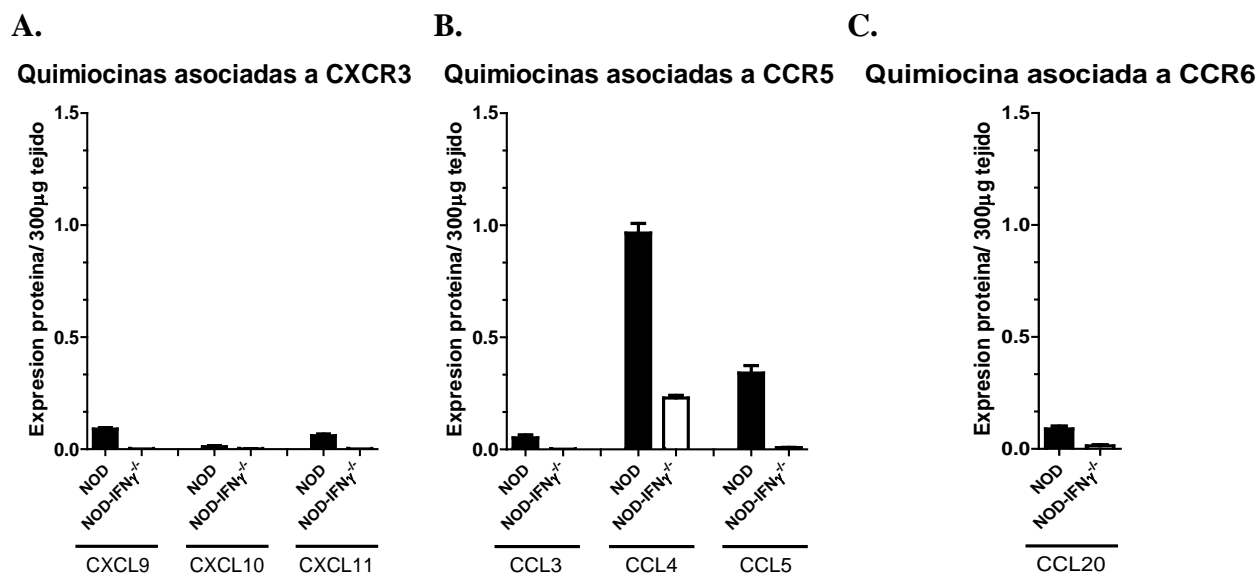


Fig. 30. Expresión proteica relativa de quimiocinas en extractos completos de próstatas provenientes de ratones controles NOD y NOD-IFN γ ^{-/-}. (A) Quimiocinas asociadas al receptor CXCR3. (B) Quimiocinas asociadas al receptor CCR5. (C) Quimiocina asociada a CCR6. La expresión relativa de las quimiocinas fue medida y analizada en las glándulas prostáticas de animales controles NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} a través de la utilización de un array proteico.

Estos resultados indicaron que las quimiocinas CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL11, CCL20 y CCL3 se expresaban de manera constitutiva en el tejido prostático normal de ratones de la cepa NOD, mientras que en próstata de ratones controles NOD-IFN γ ^{-/-} había una expresión basal mucho menor de estas quimiocinas, sólo encontrándose una expresión moderada de CCL4 (Figura 30). Muchas quimiocinas no fueron detectadas en los tejidos prostáticos de las dos cepas como CCL22, CCL21, CCL25, CXCL13, CXCL15, CCL12, CXCL19 entre otras; mientras que CXCL2 y CCL2 fueron expresadas en próstatas de las dos cepas (datos no mostrados).

Por otro lado, también se evaluaron las cantidades relativas de citoquinas presentes en las glándulas prostáticas normales NOD y NOD-IFN γ ^{-/-}. Como se puede ver en la Figura 31, una leve expresión de IL-12p70 e IL-1 α se observó en tejido prostático de ratones NOD y NOD-IFN γ ^{-/-}.

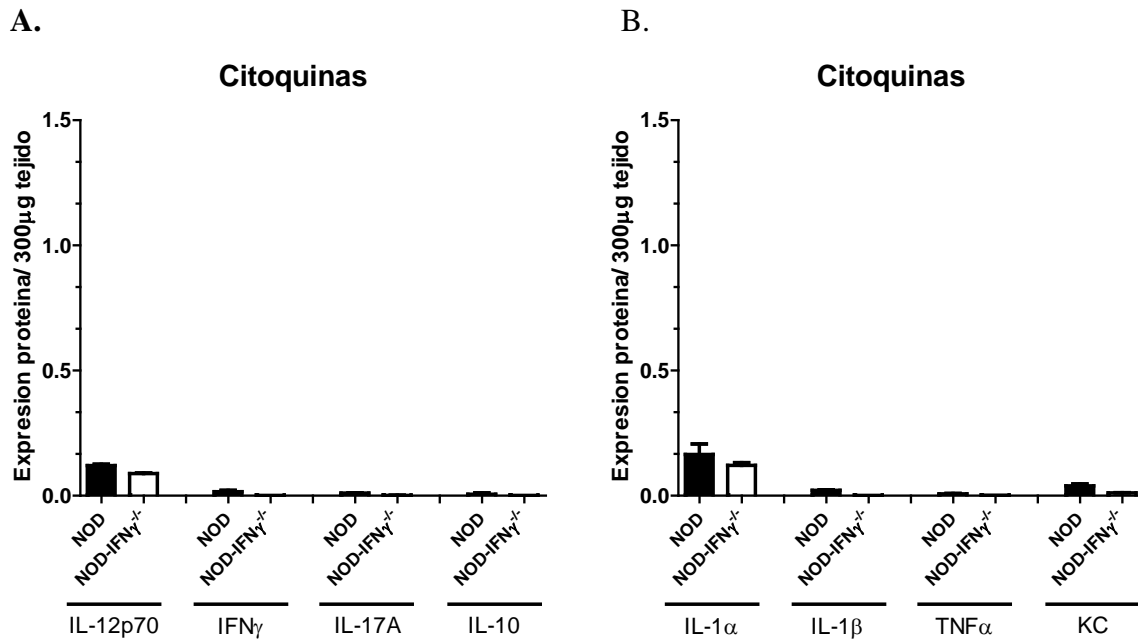


Fig. 31. Expresión proteica relativa de citoquinas en extractos completos de próstatas provenientes de ratones controles NOD y NOD-IFN γ ^{-/-}. (A-B) Citoquinas expresadas en la glándula prostática. La expresión relativa de las citoquinas fue medida y analizada en las glándulas prostáticas de animales controles NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} a través de la utilización de un array proteico.

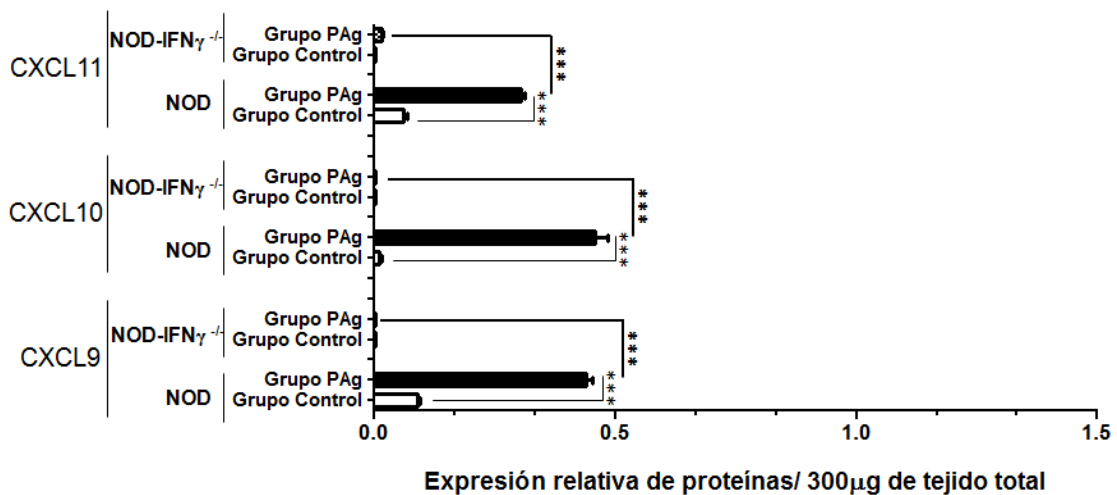
Citoquinas como IFN γ , IL-17A, IL-5, IL-6, IL-7, IL-2, IL-3, IL-10 y TNF α no fueron detectadas en las glándulas prostáticas de ratones controles NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} mediante esta técnica.

II. Expresión de quimiocinas en tejidos prostáticos de ratones NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} inmunizados con antígenos prostáticos emulsificados en adyuvante.

Cuando los tejidos prostáticos de los ratones inmunizados con antígenos prostáticos y adyuvantes fueron analizados, se observó que CXCL9, CXCL10 y CXCL11 mostraron un incremento marcado en ratones NOD del grupo PAg (Figura 32A). Todas las quimiocinas asociadas al receptor CXCR3 se vieron aumentadas, aunque CXCL10 fue la principal quimiocina incrementada en estos animales (más de 15 veces) (Figura 32B). Por otro lado, ratones de la cepa NOD-IFN γ ^{-/-} del Grupo PAg no evidenciaron incrementos en las quimiocinas asociadas a CXCR3 (Figura 32A).

A.

Quimiocinas asociadas al receptor CXCR3



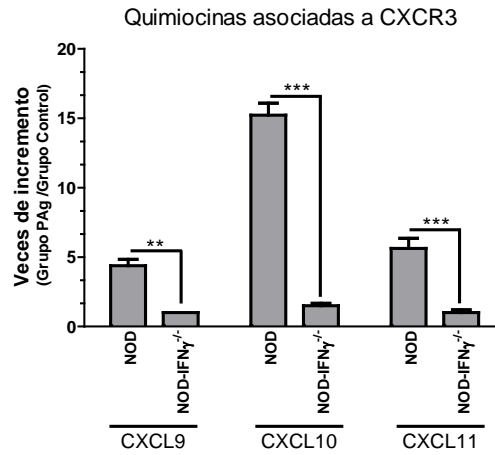
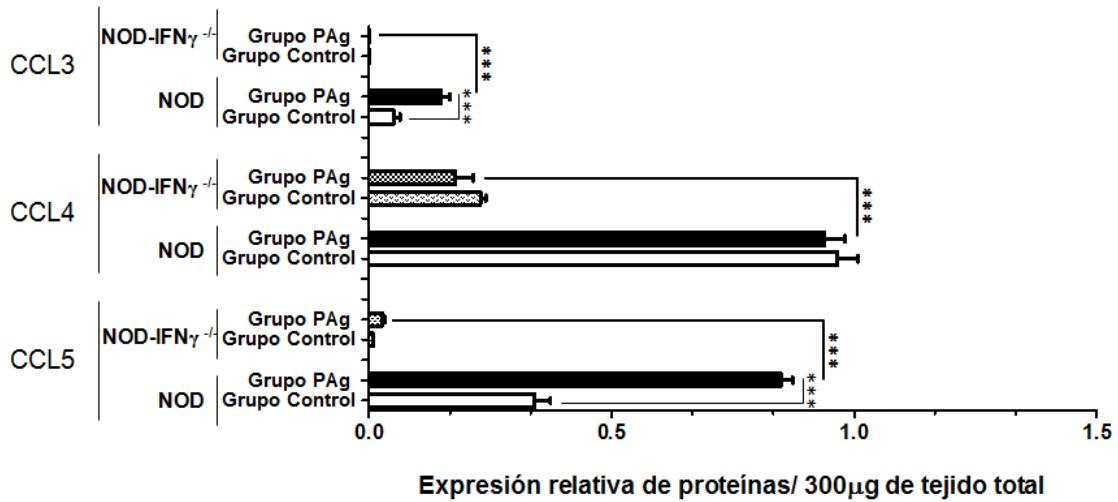
B.

Fig. 32. Expresión proteica relativa de las quimiocinas asociadas al receptor CXCR3 en extractos completos de próstatas provenientes de Grupos Control y Grupos PAg de ratones NOD y NOD-IFN γ ^{-/-}. (A) Expresión de CXCL9, CXCL10, CXCL11 en el tejido prostático. (B) Índice que indica las veces de incremento respecto a la expresión basal (Grupo control) de la misma cepa para cada quimiocina asociada a CXCR3. La expresión relativa de las quimiocinas fue medida en las glándulas prostáticas de los Grupos Control y PAg de ratones NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} a través de la utilización de un array proteico. Los datos se muestran como la media \pm S.D. Valores de $**p < 0,005$; $***p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

En relación a la quimiocina CCL4, se observaron niveles similares en ratones NOD controles e inmunizados, mientras que los valores de CCL5 y CCL3 incrementaron 6 y 3 veces respectivamente en ratones NOD del grupo PAg (Figura 33). Estas 3 quimiocinas no revelaron aumentos significativos en ratones NOD-IFN γ ^{-/-} del grupo PAg cuando se comparó con los valores hallados en ratones controles de la misma cepa (Figura 33B).

A.

Quimiocinas asociadas al receptor CCR5



B.

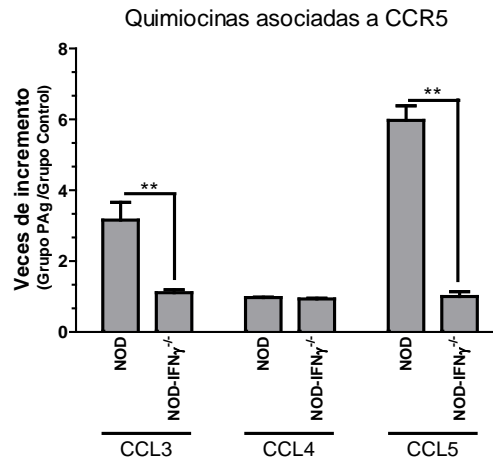
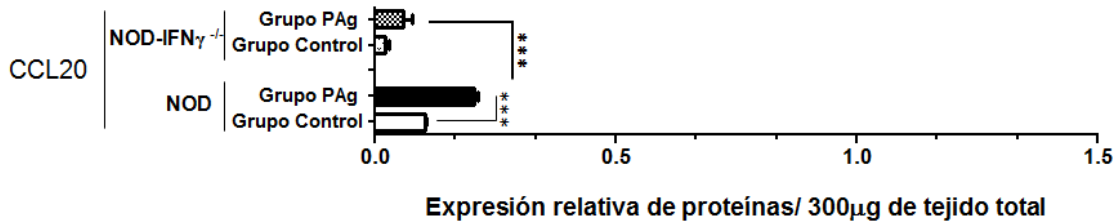


Fig. 33. Expresión proteica relativa de las quimiocinas asociadas al receptor CCR5 en extractos completos de próstatas provenientes de Grupos Control y Grupos PAg de ratones NOD y NOD-IFN γ ^{-/-}. (A) Expresión de CCL3, CCL4, CCL5 en el tejido prostático. (B) Índice que indica las veces de incremento respecto a la expresión basal (Grupo control) de la misma cepa para cada quimiocina asociada a CCR5. La expresión relativa de las quimiocinas fue medida en las glándulas prostáticas de los Grupos Control y PAg de ratones NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} a través de la utilización de un array proteico. Los datos se muestran como la media \pm S.D. Valores de ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

En relación a la quimiocina CCL20, se encontró un leve aumento en próstatas de ratones NOD y NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ de los Grupos PAg (3,7 y 2 veces de incremento respectivamente) (Figura 34).

A.

Quimiocina asociada al receptor CCR6



B.

Quimiocina asociada a CCR6

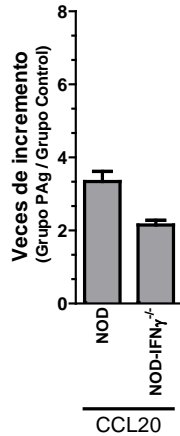
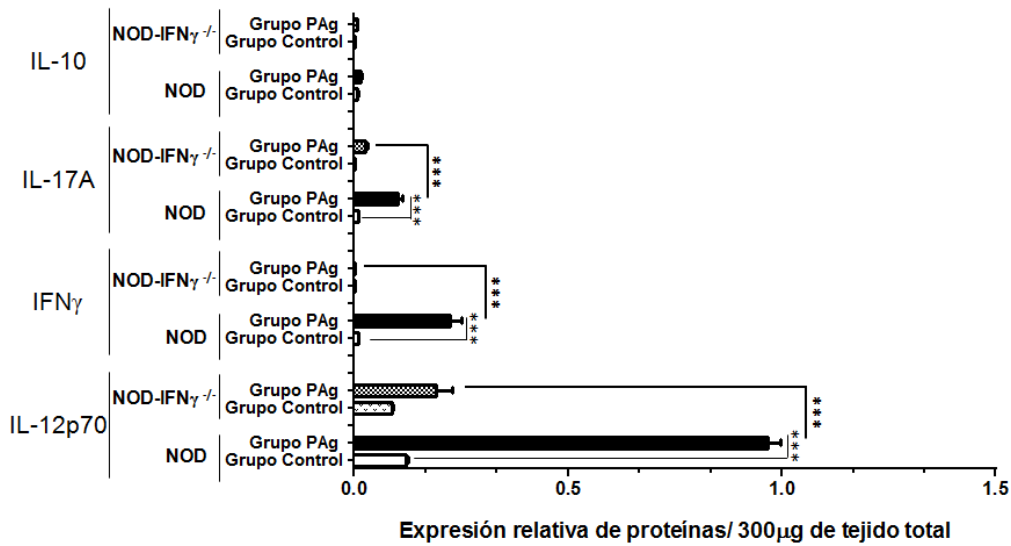


Fig. 34. Expresión proteica relativa de la quimiocina asociada al receptor CCR6 en extractos completos de próstatas provenientes de Grupos Control y Grupos PAg de ratones NOD y NOD-IFN $\gamma^{-/-}$. (A) Expresión de CCL20 en el tejido prostático. (B) Índice que indica las veces de incremento respecto a la expresión basal (Grupo control) de la misma cepa para CCL20. La expresión relativa de CCL20 fue medida en las glándulas prostáticas de los Grupos Control y PAg de ratones NOD y NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ a través de la utilización de un array proteico. Los datos se muestran como la media \pm S.D. Valores de *** $p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

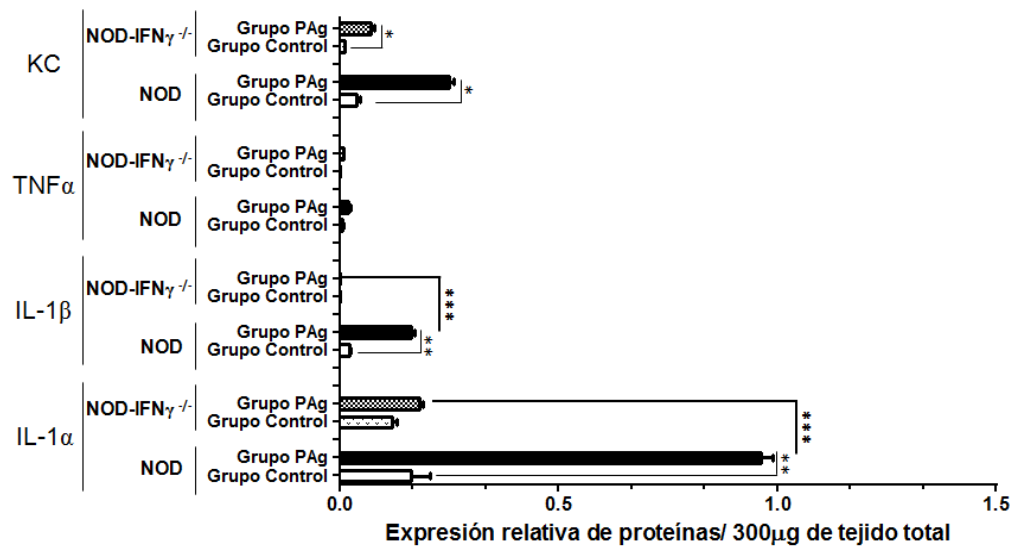
Utilizando esta misma herramienta, se determinó la expresión de citoquinas inflamatorias en tejido prostático. Se analizó la expresión las citoquinas IL-10, IL-17A,

IFN γ , IL-12p70, IL-1 α , IL-1 β , TNF α y KC. Como se puede ver en la Figura 31 las glándulas prostáticas de animales controles de ambas cepas mostraron niveles bajos de IL-12p70. Tejidos prostáticos de animales del Grupo PAg NOD mostraron un gran incremento en la expresión de IL-12p70, IFN γ , IL-17A, IL-1 α , IL-1 β y KC comparados con próstatas provenientes del Grupo control de animales NOD. Los tejidos prostáticos provenientes del Grupo PAg de la cepa NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ mostraron un incremento en la expresión de IL-12p70 y KC, sin cambios significativos en IL-10 y TNF α (Figura 35).

A.



B.



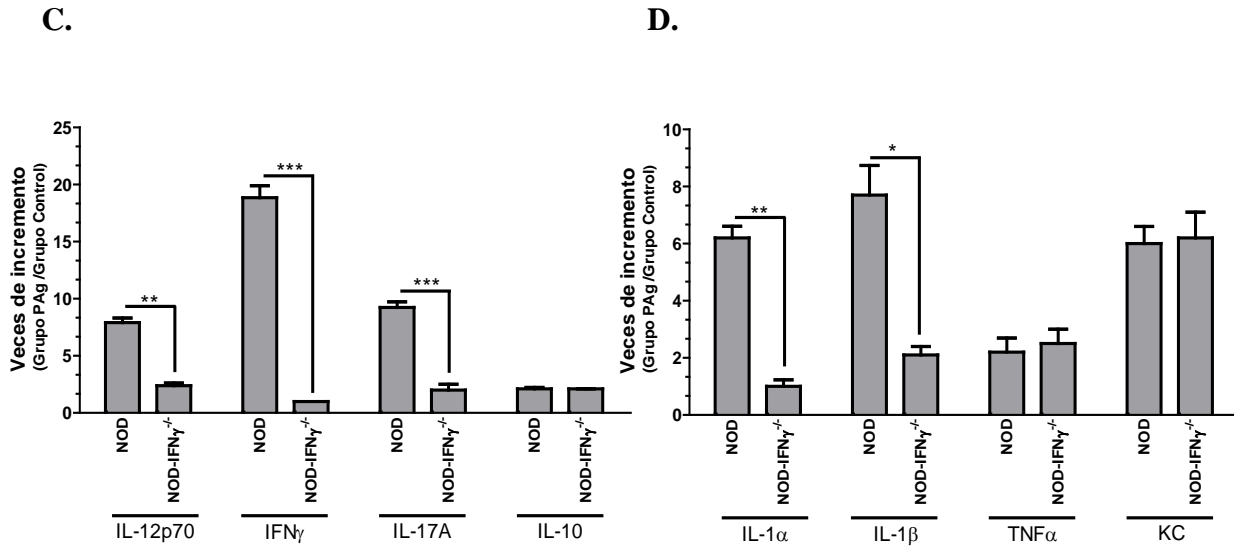


Fig. 35. Expresión proteica relativa de citoquinas en extractos completos de próstatas provenientes de Grupos Control y Grupos PAG de ratones NOD y NOD-IFN $\gamma^{-/-}$. (A) Expresión de IL-12p70, IFN γ , IL-17A e IL-10 en el tejido prostático. (B) Expresión de IL-1 α , IL-1 β , TNF α y KC en el tejido prostático. (C) Índice que indica las veces de incremento respecto a la expresión basal (Grupo control) de la misma cepa para las las citoquinas IL-12p70, IFN γ , IL-17A e IL-10. (D) Índice que indica las veces de incremento respecto a la expresión basal (Grupo control) de la misma cepa para las citoquinas IL-1 α , IL-1 β , TNF α y KC. La expresión relativa de las citoquinas fue medida en las glándulas prostáticas de los Grupos Control y PAG de ratones NOD y NOD-IFN $\gamma^{-/-}$ a través de la utilización de un array proteico. Los datos se muestran como la media \pm S.D. Valores de $*p < 0,05$; $**p < 0,005$; $***p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

La citoquina que mayor aumento reportó en el tejido prostático de los ratones NOD del Grupo PAG con respecto a los animales controles fue el IFN γ (~17 veces de incremento) (Figura 35C). En base a los resultados expuestos, se podría especular que los tejidos prostáticos de ratones NOD controles al expresar ciertas citoquinas y quimiocinas de manera constitutiva tendrían un microambiente particular que facilitaría el reclutamiento de células del sistema inmune hacia la glándula prostática. Reportes previos de nuestro grupo de trabajo, indican que ratones machos de la cepa NOD desarrollan prostatitis espontánea con la edad, la cual podría estar favorecida por este microambiente rico en quimiocinas.

Se demostró que LT específicos para antígenos prostáticos que expresan CXCR3 y CCR5 son capaces de alcanzar la glándula prostática. La expresión basal de ciertas

citoquinas y quimiocinas asociadas a estos receptores en tejido prostático podría estar asociada con la capacidad de los LT específicos de migrar hacia la glándula prostática. Se podría postular que una vez que las células T CXCR3⁺CCR5⁺ llegan al tejido siguiendo un gradiente de quimiocinas específicas y al tener especificidad para antígenos expresados en próstata, podrían activarse liberando citoquinas asociadas a su fenotipo, las cuales podrían inducir un mayor incremento en la producción de quimiocinas y éstas aumentar el reclutamiento y la llegada de más células inmunes al tejido prostático, amplificando así el proceso inflamatorio.

Resultados: Parte V

*Rol de los receptores CXCR3 y CCR5 en la migración de
LT específicos hacia el tejido prostático*

Rol de los receptores CXCR3 y CCR5 en la migración de LT específicos al tejido prostático.

Los resultados obtenidos hasta este momento nos permitieron establecer una relación entre la expresión de los receptores CXCR3 y CCR5 y la capacidad de LT específicos de migrar e infiltrar la glándula prostática. Realizando experimentos de transferencia de LT a ratones NOD-SCID observamos que células CD3⁺ de ratones NOD estimuladas *in vitro* con el autoantígeno lograban infiltrar próstata de los ratones NOD-SCID. Un dato muy interesante fue el obtenido en experimentos de estimulación de células CD3⁺ de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} con autoantígeno + rIFN γ , ya que se observó un aumento en la expresión de CXCR3 y CCR5 asociado con la capacidad de estas células de migrar e infiltrar la próstata en experimentos de transferencia adoptiva. Estos datos nos permitieron relacionar la expresión de los receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5 con la capacidad de LT de infiltrar tejido prostático. Sin embargo, al transferir células CD3⁺ purificadas que no expresaban en su totalidad estos receptores, existía la posibilidad de que la expresión de los mismos no fuera completamente necesaria o que la expresión de otros receptores no evaluados estuviera implicada.

Para avanzar en el estudio del rol preciso de los receptores CXCR3 y CCR5 en PAE diseñamos experimentos en los que se purificaron LT que expresaban o no estos receptores y por transferencia adoptiva se evaluó la capacidad de migrar e infiltrar próstata de las poblaciones purificadas. Al mismo tiempo se realizaron experimentos en los que se utilizó un antagonista mimético para bloquear funcionalmente estos receptores y se evaluó el efecto de este tratamiento en PAE.

I. Capacidad de LT CXCR3⁺ y CCR5⁺ purificados de infiltrar tejido prostático de ratones receptores NOD-SCID.

Para evaluar la capacidad de poblaciones CXCR3⁺ de infiltrar tejido prostático, se realizaron experimentos similares a los descritos anteriormente. En resumen, ratones NOD fueron inmunizados de acuerdo al protocolo descrito, sacrificados en el día 24 y

luego de realizar los cultivos de estimulación de células de Bz con el autoantígeno, las células fueron teñidas para CD3, CXCR3 y purificadas mediante *cell sorting*. Se obtuvieron las siguientes poblaciones celulares: células T CD3⁺ totales, células T CD3⁺CXCR3⁻ y células T CD3⁺CXCR3⁺. Siguiendo protocolos anteriores, 1x10⁶ células CD3⁺ totales, 1x10⁶ células CD3⁺CXCR3⁻ o 3,5 x10⁵ CD3⁺CXCR3⁺ fueron transferidos a 3 grupos experimentales de ratones NOD-SCID. A los 30 días post transferencia se analizó la capacidad de las tres poblaciones purificadas de infiltrar tejido prostático de los animales receptores (Figura 36).

Esquema experimental: Transferencias adoptivas de poblaciones de LT.

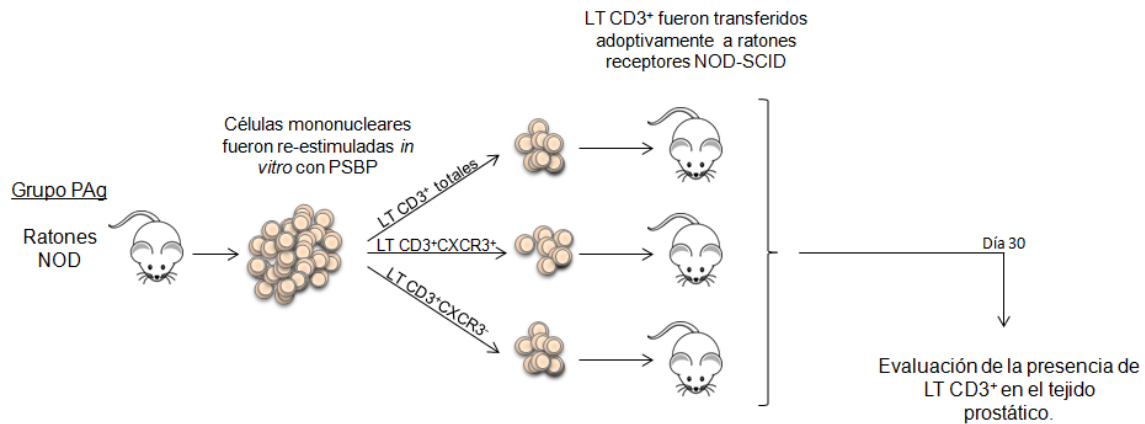


Fig 36. Esquema experimental utilizado para evaluar la capacidad de infiltrar próstata de poblaciones de LT CXCR3⁺ y CXCR3⁻. Células mononucleares esplénicas provenientes del Grupo PAg de ratones NOD fueron reestimuladas *in vitro* en presencia de PSBP durante 72hs. Luego de los cultivos los LT fueron purificados en base a la expresión de marcadores de superficie en 3 grupos: LT CD3⁺ totales, LT CD3⁺CXCR3⁻ y LT CD3⁺CXCR3⁺. Los 3 grupos de LT fueron transferidos adoptivamente a ratones receptores NOD-SCID y luego de 30 días de realizadas las transferencias las glándulas prostáticas fueron extraídas para analizar la cantidad de leucocitos infiltrantes.

A los 30 días luego de las transferencias adoptivas, se analizó la presencia de células infiltrantes en próstata de los ratones receptores NOD-SCID. Un elevado número de células CD3⁺ fue encontrada en el infiltrando las glándulas de los receptores NOD-SCID que habían sido transferidos con LT CD3⁺ totales y LT CD3⁺CXCR3⁺. Los

animales NOD-SCID receptores de LT $CD3^+CXCR3^-$ mostraron una escasa presencia de células $CD3^+$ en glándulas prostáticas (Figura 37).

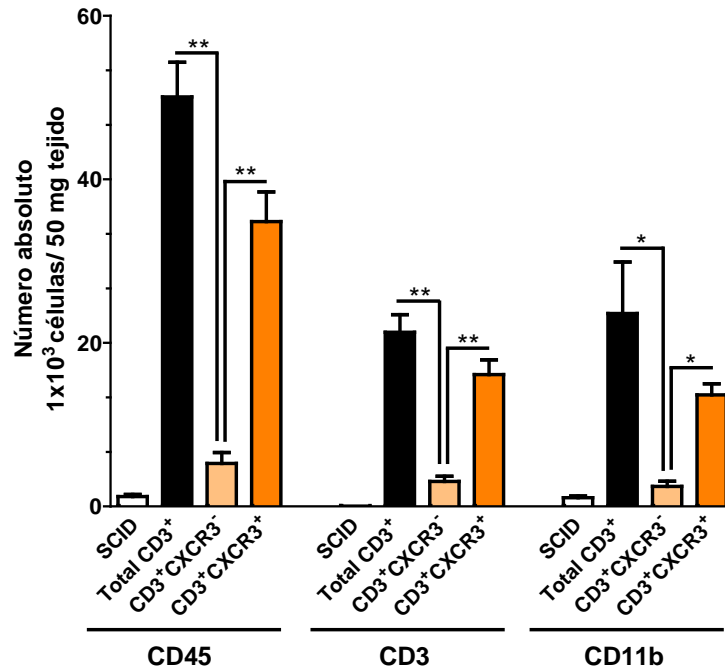


Fig. 37. Análisis del infiltrado leucocitario en la glándula prostática de los animales receptores. Células mononucleares esplénicas provenientes del Grupo PAg de ratones NOD fueron reestimuladas *in vitro* en presencia de PSBP por 72h. Luego de los cultivos los LT fueron purificados en base a la expresión de marcadores de superficie en 3 grupos: LT $CD3^+$ totales, LT $CD3^+CXCR3^-$ y LT $CD3^+CXCR3^+$. Los 3 grupos de LT fueron transferidos de manera adoptiva a ratones receptores NOD-SCID y luego de 30 días las glándulas prostáticas fueron extraídas para ser analizadas. El número absoluto de las diferentes subpoblaciones de células inmunes CD45, CD3 y CD11b infiltrando las glándulas prostáticas de los animales receptores de cada grupo fueron analizadas. Los datos se muestran como media \pm S.D., n=3 por grupo, representativo de 2 experimentos. Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ fueron considerados estadísticamente significativos.

La presencia de células $CD3^+$ en próstata se acompañó de un importante número de leucocitos $CD45^+$ y $CD11b^+$ en ratones SCID-NOD receptores de células $CD3^+CXCR3^+$ (Figura 37). Estos datos demostraron que las células T $CXCR3^+$ poseían una mayor capacidad de infiltrar próstata y que la llegada de estos linfocitos T indujo

posteriormente el reclutamiento al tejido blanco de otras células $CD3^+CD45^+$ provenientes del huésped (Figura 37).

II. Efecto de la administración *in vivo* de un antagonista mimético de CXCR3 y CCR5 (TAK-779) sobre la capacidad de LT de infiltrar la glándula prostática.

Se ha reportado que el antagonista mimético no peptídico TAK-779 tiene una alta afinidad por los receptores CXCR3 y CCR5, lo que le confiere la capacidad de unirse de manera irreversible y bloquear la actividad de estos receptores sin afectar la funcionalidad de las células que los expresan (Ni J., 2009). Para evaluar el efecto del bloqueo funcional de los receptores CXCR3 y CCR5 en nuestro modelo, se realizaron experimentos de transferencia adoptiva siguiendo protocolos descritos previamente y al día siguiente de la transferencia los ratones receptores fueron inyectados cada 48 hs por vía i.p. con PBS (Grupo control) o con TAK-779 (Grupo TAK-779) (Figura 38). Los ratones receptores NOD-SCID fueron sacrificados en el día 30 y se evaluó la presencia de LT $CD3^+$ en glándulas prostáticas.

Esquema experimental: tratamiento *in vivo* con TAK-779

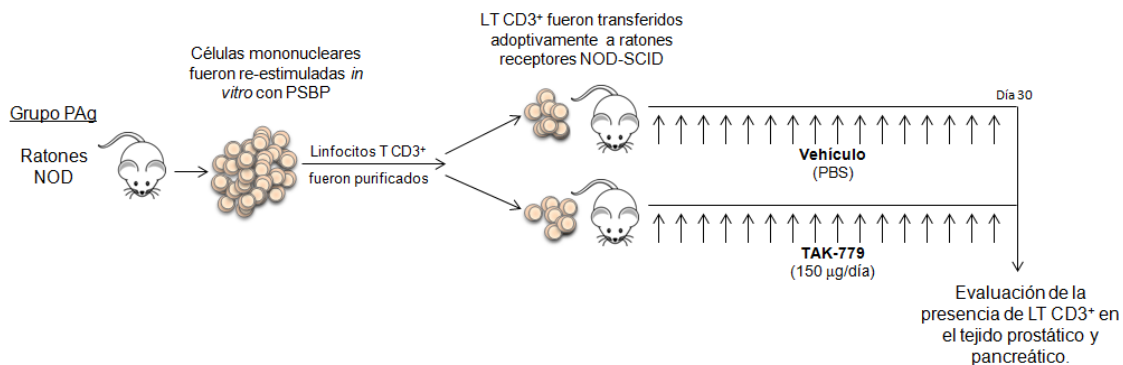
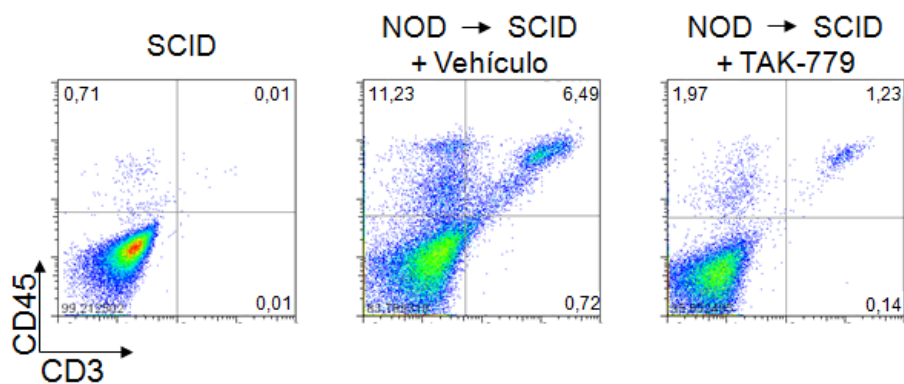


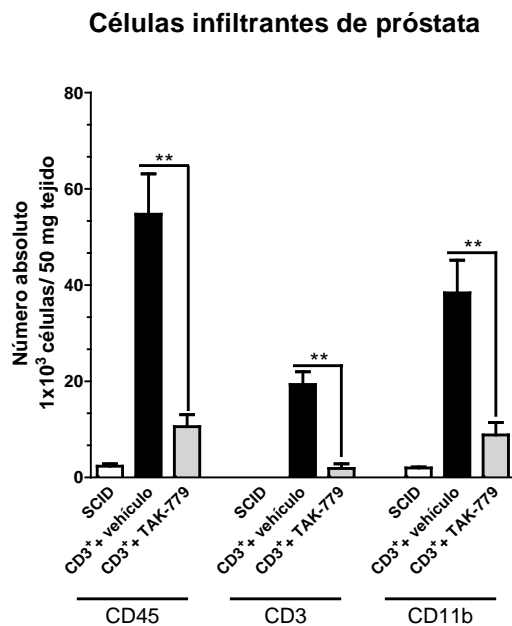
Fig. 38. Modelo experimental correspondiente al tratamiento *in vivo* con TAK-779, un inhibidor mimético de los receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5. Células mononucleares provenientes del Grupo PAg de animales NOD fueron reestimuladas *in vitro* en presencia de PSBP durante 72 hs. Los LT $CD3^+$ fueron purificados y 1×10^6 LT fueron transferidos a ratones receptores NOD-SCID. Los ratones receptores fueron inyectados cada 48 hs. con PBS (vehículo) o con TAK-779 (150 µg/ratón/dosis) por vía i.p. La presencia de LT dentro de las glándulas prostática y pancreática de los ratones NOD-SCID fue evaluada a los 30 días luego de realizadas las transferencias.

Al analizar la presencia de LTCD3⁺ en próstata de ratones NOD-SCID tratados con vehículo se observó una infiltración importante de la glándula prostática compuesta por LT CD3⁺ y también por células inmunes CD45⁺CD3⁻ (Figura 39). Los ratones NOD-SCID tratados con el antagonista TAK-779 mostraron valores significativamente menores de LT CD3⁺ y de células CD45⁺CD3⁻ en las glándulas prostáticas, en comparación con hallados en los animales tratados con el vehículo (Figura 39). Estos resultados demuestran que el bloqueo *in vivo* de los receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5 inhibió la llegada de LT específicos a la glándula prostática de los animales receptores. Es posible que la menor cantidad de LT CD3⁺ en el tejido prostático tenga también efectos reduciendo significativamente el reclutamiento de leucocitos CD45⁺CD3⁻ provenientes del huésped NOD-SCID (Figura 39).

A.



B.



C.

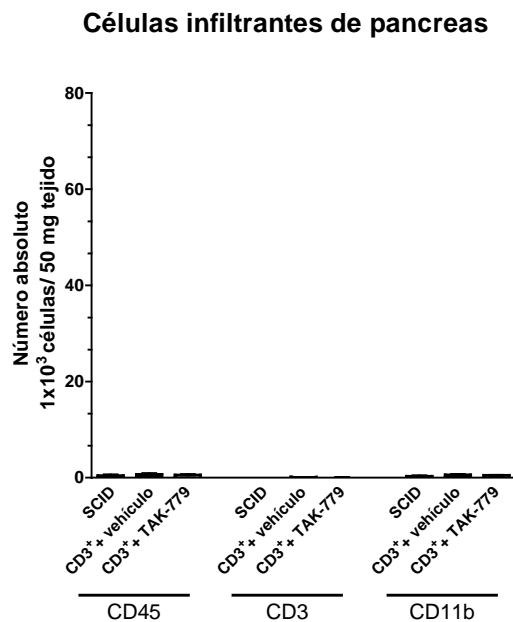


Fig. 39. Tratamiento con un antagonista del receptor CXCR3 y CCR5 bloquea la migración de las células T específicas a la glándula prostática. Células mononucleares esplénicas provenientes del Grupo PAg de ratones NOD fueron amplificadas *in vitro* en presencia de PSBP. Se purificaron los LT CD3⁺ y fueron transferidos a ratones receptores SCID-NOD los cuales se inyectaron con PBS (vehículo) o TAK-779. (A) Citometría de flujo donde se muestran los leucocitos infiltrantes dentro de la glándula prostática 30 días post transferencia adoptiva. (B-C) El número absoluto de células CD45⁺, CD3⁺ y CD11b⁺ en la glándula prostática y pancreática fue analizado. Los datos se muestran como media \pm S.D., n=3 por grupo, representativo de 2 experimentos. Valores de $**p < 0,005$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Para evaluar si la migración e infiltración prostática era específica de tejido, se analizaron además la presencia de LT CD3⁺ en tejidos como páncreas, hígado y cerebro. No se detectó la presencia de células CD3⁺ en cerebro, hígado (datos no mostrado) o la glándula pancreática de los ratones receptores de las células T CD3⁺ (Figura 39C). Cabe remarcar que la cantidad de células CD45⁺ y CD3⁺ en estos tejidos extra prostáticos no

fue diferente a la encontrada en los animales receptores NOD-SCID sin transferencia de células CD3⁺.

En base a los resultados expuestos, se pudo establecer que la expresión de los receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5 tiene un rol fundamental en el proceso de migración/infiltración tisular de LT específicos para antígenos prostáticos. A lo largo de los experimentos se pudo comprobar la importancia que tiene el IFN γ en el modelo de PAE. Nuestros resultados demuestran que esta citoquina también tendría un rol importante en la inducción de los receptores de quimiocinas asociados al perfil Th1/Tc1. Hemos demostrado que no es necesario que los LT específicos secreten esta citoquina para poder alcanzar la glándula prostática, pero si es importante que los LT específicos expresen receptores de quimiocinas asociados al perfil Th1/Tc1. Una vez que los LT específicos tienen la habilidad de acceder a la glándula prostática, la presencia del autoantígeno expresado en el tejido podría favorecer la permanencia y/o proliferación de las mismas, comenzando un proceso inflamatorio con la secreción de citoquinas y la inducción de quimiocinas que favorecería el reclutamiento de mas células inmunes y la amplificación del proceso inflamatorio que conllevan al daño del tejido blanco.

Discusión

En la presente tesis doctoral se ha trabajado con un modelo de autoinmunidad que tiene como órgano blanco al tejido prostático, modelo que es considerado válido para el estudio de la enfermedad humana CP/PPS. A lo largo del trabajo de tesis se han analizado los perfiles de activación de los linfocitos específicos que se inducen luego de la inmunización con antígenos prostáticos a ratones de diferentes cepas. Se estudiaron cepas con distinta susceptibilidad a desarrollar PAE: las cepas NOD (alta susceptibilidad), C57Bl/6 (susceptibilidad media) y BALB/c (resistentes). A pesar que las tres cepas de animales desarrollaron una respuesta inmune celular específica hacia antígenos prostáticos luego de la inmunización, la lesión del órgano blanco se observó principalmente en la cepa NOD y también aunque en menor medida en la cepa C57Bl/6. Estos resultados nos llevaron a plantearnos una primera hipótesis que estuvo dirigida en buscar los mecanismos inmunológicos regulatorios que podrían estar involucrados en las cepas de animales poco susceptibles donde las células Treg y Tr1 podrían controlar a la activación de las células T específicas que pudieran haber escapado a los mecanismos de tolerancia central. Nuestra hipótesis también planteaba la posibilidad que en las cepas susceptibles, la deficiencia en los mecanismos de control permitiría una gran expansión de poblaciones patogénicas específicas para antígenos prostáticos, o quizás que las diferencias no sólo se podrían deber a deficiencias en la regulación sino a que también se podrían inducir diferentes perfiles de activación.

Nuestros resultados indican que luego de la inducción de PAE en las diferentes cepas en estudio, no se encontraron diferencias significativas en el número absoluto de células Treg presentes en los órganos linfáticos secundarios. Se observó un mayor porcentaje de Treg en la cepa resistente que no se tradujo en diferencias en valores absolutos de esta población. En base a los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental, el número de células Treg presentes en Bz y GLp no se podría asociar a susceptibilidad y/o resistencia al desarrollo de PAE. Sin embargo, en nuestros experimentos no se evaluó funcionalidad de Treg, sólo se evaluó el número absoluto y la frecuencia de las mismas.

Al respecto varios grupos de investigación han asociado la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes con deficiencias en el número o funcionalidad de

células Treg (Alard P., 2006; Wu A.J., 2002). Nuestros resultados concuerdan con los hallados obtenidos por otros grupos de investigadores quienes no encontraron diferencias en la frecuencia de estas células entre las cepas con diferente susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes (Mellanby R.J., 2007; Thomas D.C., 2007(a); Thomas D.C., 2007(b); D'alise A.M., 2008). Es posible que las diferencias entre estos grupos se hayan debido a la utilización de distintos marcadores y/o reactivos para identificar o definir las poblaciones de células Treg ($CD4^+CD25^{hi}$ o $CD4^+Foxp3^+$). Con el fin de evitar discrepancias por el uso de diferentes marcadores, recientemente los científicos más reconocidos en el área de las células Treg se han reunido para consensuar ciertas recomendaciones a tener en cuenta para la clasificación y la nomenclatura de estas células (Abbas A.K., 2013). Además y como se comentó anteriormente, al evaluar la cantidad de Treg mediante marcaciones $CD4^+CD25^{hi}$ o $CD4^+Foxp3^+$ no es posible distinguir si se trata de Treg generadas en el timo (tTreg) o inducidas en la periferia (pTreg) (Josefowicz S.Z., 2012; Abbas A.K., 2013). Una posibilidad también podría ser que en las cepas con mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades autoinmunes exista un defecto en la selección tímica de Treg. Recientemente se ha propuesto al marcador Neurofilina-1 para distinguir tTreg pero este marcador no ha sido analizado en los estudios citados (Weiss J.M., 2012). En reportes recientes se ha demostrado que ratones de cepas propensas al desarrollo de enfermedades autoinmunes no tienen una selección deficiente de células Treg, ni una menor frecuencia de éstas en periferia (D'alise A.M., 2008; Thomas D.C., 2007(a); Thomas D.C., 2007(b); Tang Q., 2008; Monteiro J.P., 2008).

En la presente tesis, además de evaluar las cantidades de Treg en las distintas cepas, se han estudiado los niveles de LT efectores $CD44^{hi}CD62L^-$. Las cepas susceptibles al daño prostático mostraron un incremento significativo en el número de LT efectores principalmente en los GLp. Se demostró una fuerte correlación entre la cantidad de LT efectores y la susceptibilidad al desarrollo de PAE. La relación de células Treg/Tef demostró una asociación inversa con la susceptibilidad a desarrollar PAE. En base a estos resultados se podría especular que para determinar la susceptibilidad/resistencia no sólo es importante la cantidad de células Treg, sino que también se debe tener en cuenta la cantidad de LT efectores y el balance relativo que existe entre estas poblaciones en los órganos linfáticos secundarios, principalmente en los GLp. Se observaron mayores relaciones

Treg/Tef en ratones de la cepa resistente BALB/c y relaciones mucho menores en ratones de la cepa NOD. Algunos autores han postulado que el balance entre las células efectoras y células regulatorias es fundamental para que un individuo desarrolle o no una enfermedad autoinmune (Monteriro J.P., 2008; Thomas D.C., 2007; Long S.A., 2011; Alard P., 2006; Feuerer M., 2007; Dejaco C., 2006; Ziegler S.F., 2006). Algunos autores han indicado que deben existir determinados umbrales de células patogénicas y regulatorias para que las células autoreactivas logren infiltrar y producir daño en el tejido blanco.

La menor relación Treg/Tef observada en los animales de las cepas susceptibles (con mayores cantidades de Tef y cantidades similares de Treg), también podría deberse a que las células Tef de animales susceptibles fueron menos sensibles a la supresión ejercida por Treg o a que necesitaban más requerimientos para poder ser moduladas (D'alise A.M., 2008). Estudios realizados en ratones de la cepa NOD comparados con la cepa de referencia C57Bl/6, demostraron que los ratones NOD no poseen un defecto primario en el número de las células Treg en órganos linfoides. En experimentos de funcionalidad se observó que las células Treg de ratones NOD suprimen con igual eficiencia que las de ratones C57Bl/6. Sin embargo se observó que los linfocitos Tef de ratones NOD no podían ser controlados de manera eficiente por las células Treg y tenían una mayor respuesta a la estimulación *in vitro* frente a activadores policlonales o autoantígenos. Algunos autores han postulado que la mayor susceptibilidad de los ratones NOD era debida en mayor medida a la incapacidad de los linfocitos Tef de ser regulados, que a defectos en la funcionalidad de las células Treg (D'alise A.M., 2008). En nuestros experimentos sólo fueron evaluadas las cantidades de células efectoras y regulatorias, no se realizó un análisis de funcionalidad de células Treg en las distintas cepas, por lo que no podemos concluir que lo mismo esté ocurriendo en nuestro caso. Sin embargo, en los experimentos de eliminación transitoria de células Treg mediante la administración de un anticuerpo monoclonal, se observó que la falta de Treg en el momento de inducción de la respuesta contra antígenos prostáticos favoreció en todas las cepas (aún en la resistente) un incremento significativo en los niveles de linfocitos Tef y una disminución en las relaciones Treg/Tef. El mayor efecto de este tratamiento fue encontrado en la cepa resistente. Estos resultados nos permiten especular que en la cepa resistente BALB/c, a pesar que luego de la inmunización se generan LT específicos, la tolerancia se mantiene y no se induce un daño en el tejido prostático. Sin

embargo, si los niveles de Treg son disminuidos en el momento de la inmunización se logra inducir una mayor frecuencia de células Tef que ya no pueden ser controladas y estas células migran a próstata e inducen daño. Este resultado apoya los postulados de los investigadores que indican que existe un umbral en la relación de Treg/Tef y cuando éste se sobrepasa las células Tef pueden escapar al control. Es interesante también tener en cuenta que la falta de Treg en el momento de la inmunización favoreció preferencialmente la inducción de linfocitos específicos Th1 y LTc1. Resultados previos de nuestro grupo y los que se desprenden de esta tesis demuestran que este tipo celular sería el más involucrado en la patogenicidad de PAE (Motrich R.D., 2010).

En la presente tesis doctoral no sólo analizamos las cantidades y frecuencias de LT efectores que se inducen, sino que también se examinaron los perfiles de activación que eran predominantes en cada cepa. Las cepas susceptibles mostraron un perfil de activación específica desviado hacia Th1/Tc1 y en menor medida Th17/Tc17, mientras que mantenían una baja frecuencia de células Tr1 y Treg luego de la reestimulación con el autoantígeno. La cepa resistente se asoció a un perfil de respuesta Th17, además de una mayor frecuencia de células Tr1 y Treg en comparación con las cepas susceptibles. Se analizó también que ocurría en ratones NOD-IFN γ ^{-/-}, observándose que los mismos inducían un perfil de respuesta Th17 y eran resistentes a PAE (similar a lo encontrado en la cepa BALB/c). Como previamente fue analizado, la eliminación de células Treg en la fase inductora de las tres cepas (NOD, C57Bl/6 y BALB/c) se asoció con un incremento en el desvío de la respuesta inmune hacia el perfil de activación Th1, con una mayor frecuencia de células productoras de IFN γ en comparación con la misma cepa de ratones en el que las células Treg no fueron eliminadas. De manera que el desvío de la respuesta inmune hacia un perfil Th1, se correlacionó directamente con una mayor infiltración y daño tisular. Cabe destacar que la resistencia a PAE de ratones de la cepa NOD-IFN γ ^{-/-} en los que el perfil Th1/Tc1 no pudo ser inducido apoya estos resultados. Nuestros datos indican que independientemente de la base genética, el repertorio inmunológico y/o la predisposición genética al desarrollo de enfermedades autoinmunes, la activación de LT efectores específicos con un perfil Th1 se asocia con un mayor infiltrado leucocitario en el tejido prostático, mayor daño tisular y una mayor susceptibilidad a desarrollar PAE. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que las células Treg podrían controlar principalmente la inducción del perfil de

activación Th1 en nuestro modelo, ya que otros perfiles como Th17, Th2 y Tr1 no se vieron significativamente afectados por la eliminación transitoria de Treg en el momento de inducción de la respuesta autoinmune.

Utilizando ratones NOD-IFN γ ^{-/-} se obtuvieron interesantes resultados, ya que luego de la eliminación transitoria de células Treg en esta cepa se observó un incremento significativo en la frecuencia de células específicas con un perfil Th17/Tc17, aunque estos animales no desarrollaron infiltración leucocitaria y/o daño característico en tejido prostático. Estos resultados demuestran que la presencia de una cantidad determinada de células Treg no fue determinante para mantener la tolerancia hacia antígenos prostáticos en ratones NOD-IFN γ ^{-/-}, sino que lo fue la imposibilidad de generar un perfil de respuesta específica Th1/Tc1, perfil que en nuestro modelo tendría un rol patogénico.

Se ha reportado que la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunes es orquestada por diferentes perfiles de activación de LT. En algunas enfermedades se ha determinado que el perfil que está asociado al reclutamiento de células y a la inmunopatogénesis es principalmente el perfil Th1, mientras que en otras se ha determinado que el perfil Th17 es el principalmente involucrado. Se ha descrito que la deficiencia en la producción de la citoquina IL-17A o la administración de anticuerpos anti-IL-17A, inhiben el desarrollo de EAE en ratones (Komiyama Y., 2006). El diseño experimental de vacunas que inducen una respuesta humoral anti-IL-17A también ha demostrado ser eficaz en prevenir el desarrollo clínico e histológico de EAE (Uyttenhove C., 2006; Uyttenhove C., 2007). Por otro lado, el tratamiento con un antagonista de IL-23, una citoquina esencial en el mantenimiento y estabilización del perfil de respuesta Th17/Tc17, se asoció a una reducción significativa en el desarrollo de EAE e inflamación en el SNC (Chen Y., 2006). Los infiltrados leucocitarios dentro del SNC de ratones afectados con EAE o de pacientes con Esclerosis Múltiple (EM), durante la fase tardía de la enfermedad, presentan células con un perfil mixto Th17/Th1. En etapas avanzadas de la patología se ha encontrado la presencia de células Th17 y Th1 y se especula podría deberse a una migración tardía de LT con otros perfiles de activación, luego de que la inflamación en SNC perturba la barrera hematoencefálica favoreciendo el ingreso de células inmunes (Kebir H., 2007; Sallusto F., 2012). La importancia del perfil Th17 en el desarrollo de EAE, se ha evidenciado con experimentos que demuestran que ratones deficientes en la

producción de IFN γ y/o en la señalización a través del receptor de IFN γ desarrollan una respuesta inmune específica Th17 y Tc17 dominante la cual en varios modelos de EAE ha demostrado generar una patología más severa (Ferber I.A., 1996; Harrington L.E., 2006).

Las células Th17 también están implicadas en la patogénesis de otras enfermedades autoinmunes como Artritis Reumatoide (AR), psoriasis, entre otras (Wilke C.M., 2011). A pesar que ha sido demostrado que las células Th17 pueden ser importantes en el desarrollo de enfermedades como EAE y AR, la función de las células Th17 en la patogénesis asociada a otras enfermedades como la diabetes autoinmune, hepatitis autoinmune y tiroiditis autoinmune continua siendo un tópico de amplio debate. Se ha demostrado que el silenciamiento del gen de IL-17A en ratones de la cepa NOD genera una severidad reducida de EAE, mientras que no se ve afectada la susceptibilidad al desarrollo de diabetes autoinmune. Estos resultados sugieren que la función efectora de las células Th17 podría tener un rol importante en patologías como la EAE y podría ser prescindible en la patogénesis de otras como la diabetes autoinmune (Joseph J., 2012). En contraste con el trabajo de Joseph y colaboradores, algunos resultados obtenidos en modelos de diabetes sugieren un rol importante de las células Th17 en esta patología (Emamaullee J.A., 2009). Experimentos de transferencia adoptiva de LT específicos polarizados a un perfil Th17 demostraron que al igual que las células polarizadas a un perfil Th1, los LT Th17 son capaces de infiltrar el páncreas y transferir diabetes autoinmune (Emamaullee J.A., 2009). Sin embargo, grupos especializados en el tema han advertido posibles interpretaciones erróneas de los resultados, ya que posteriormente se ha demostrado que los LTh17 específicos transferidos a ratones receptores son capaces de infiltrar páncreas solo después de haber sido convertidos *in vivo* al perfil Th1 (Martin-Orozco N., 2009; Bending D., 2009). En los resultados presentados en esta tesis se han encontrado mayores frecuencias de células con un perfil Th17/Tc17 en las cepas resistentes BALB/c y NOD-IFN γ ^{-/-}, descartando la posibilidad de que estas células tengan un perfil inmunomodulatorio asociado a la coproducción con IL-10 (McGeachy M.J., 2007). Estos resultados sugieren que la función efectora Th17/Tc17 también sería prescindible en la patogénesis de prostatitis autoinmune, aportando un resultado novedoso ya que no existen reportes previos que hayan estudiado la implicancia de células Th17 específicas en el modelo estudiado.

En nuestro modelo experimental como en el de diabetes, los resultados demuestran que las células Th1 tienen un rol crucial en la patogénesis. En el caso de diabetes autoinmune, se ha demostrado que durante la fase de inducción el IFN γ puede ser detectado en el tejido y se incrementa durante la progresión de la enfermedad (Rabinovitch A., 1995). El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-IFN γ , ha demostrado reducir significativamente no sólo la incidencia sino también la severidad de diabetes autoinmune espontánea en ratones NOD (Debray-Sachs M., 1991). El hecho de que la inducción de LT específicos Th17 en ratones que poseen una base genética susceptible al desarrollo de enfermedades autoinmunes, pero que son deficientes en la producción de IFN γ (NOD-IFN $\gamma^{-/}$) no desarrollen un infiltrado leucocitario característico en la glándula prostática, nos permite sugerir que el IFN γ es una citoquina fundamental en nuestro modelo experimental. En base a esto se realizaron experimentos en los que ratones NOD-IFN $\gamma^{-/}$ inmunizados fueron tratados con rIFN γ *in vivo* durante la fase efectora de la respuesta inmune. Los animales tratados desarrollaron una mayor infiltración prostática de LT y de leucocitos en comparación con los animales inyectados con el vehículo. Estos resultados demostraron que la administración exógena de rIFN γ , se asociaba con mayor infiltración de LT y favorecía el reclutamiento al tejido prostático de otras células inmunes. Los resultados fueron interesantes, ya que aunque los animales habían recibido IFN γ sus LT no podían producir esta citoquina y a pesar de ello habían podido infiltrar la glándula prostática. Los resultados de estos experimentos indicaron que el IFN γ es una citoquina importante en el control de la migración de los LT hacia la glándula, demostrando que una vez que estos LT logran infiltrar el órgano, aunque ellos no pudieran producir dicha citoquina tenían la capacidad de generar un ambiente inflamatorio e inducir el reclutamiento de otras células inmunes al tejido. Estos resultados nos estimularon a estudiar moléculas que pudieran haber sido inducidas con el tratamiento con IFN γ que pudieran estar involucradas en la recirculación y tráfico de los linfocitos a los tejidos periféricos.

Se ha demostrado que las condiciones presentes en el medio en donde las células se activan y mantienen les confieren a estas la capacidad de adquirir ciertas propiedades que las identifican. Algunas de estas propiedades son la expresión de determinados factores de transcripción, la secreción de citoquinas particulares y también la expresión de receptores que les permitan re-circular y acceder a determinados tejidos. Entre los receptores de re-

circulación se encuentran los receptores de quimiocinas, los que son utilizados por las células inmunes para poder alcanzar los tejidos donde sus quimiocinas específicas están siendo expresadas. Como se indicó anteriormente, se ha descrito que algunos receptores de quimiocinas están fuertemente ligados a los perfiles de activaciones de los LT (Sallusto F., 2009). Como se detalló previamente la expresión de los receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5 está principalmente asociada al perfil Th1 (Groom J.R., 2011; Sallusto F., 1998), y la expresión de los receptores CCR3, CCR4 y CCR8 está asociada a linfocitos con un perfil Th2 (Sallusto F., 1997 y 1998), mientras que los linfocitos Th17 expresan preferencialmente el receptor CCR6 (Wang C., 2009; Reboldi A., 2009). Además existe evidencia de que todos los fenotipos pueden expresar más receptores de quimiocinas que los que aquí se han descrito, o compartir algunos entre ellos (Chang H.K., 2009). Los LT pueden también combinar la expresión de receptores de quimiocinas con moléculas de adhesión como por ejemplo integrinas ($\alpha 4\beta 7$, $\alpha 4\beta 1$ entre otras) y /o selectinas (PSGL-1) lo que les confiere mayores especificaciones de recirculación (Sigmundsdottir H., 2008).

Se ha demostrado que la expresión del receptor de quimiocina CXCR3 es inducido exclusivamente bajo señales que involucran la activación del factor de transcripción de T-bet (Lord G.M., 2005; Beima K.M., 2006). Por su parte la inducción de la expresión del factor T-bet en los LT es dependiente de la activación de STAT1 el cual se activa a través de la señalización del receptor de $\text{IFN}\gamma$ (Afkarian M., 2002; Groom J.R., 2011(b)). Se ha demostrado además que la expresión del receptor de quimiocina CCR5 está asociado a la activación del factor de transcripción STAT4, el cual es activado a través de la señalización del receptor de IL-12p70; sin embargo se ha comprobado que la señalización a través del receptor de $\text{IFN}\gamma$ es esencial para amplificar y estabilizar la inducción del receptor CCR5 de manera STAT4 dependiente a través de la inducción del receptor de IL-12p70 (Iwasaki M., 2001 (a); Iwasaki M., 2001(b)).

En el presente trabajo de tesis se demostró que los LT específicos de las cepas de ratones NOD y C57BL6 expresan principalmente los receptores asociados al perfil Th1 CXCR3 y CCR5, mientras que los LT específicos de las cepas de ratones BALB/c y NOD- $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ expresan principalmente el receptor CCR6 asociado al perfil Th17. Cabe remarcar que no se detectaron niveles importantes de LT específicos que expresaran el receptor CCR4 en ninguna de las cepas de ratones analizadas. Nuestros resultados demostraron que

la expresión de receptores de quimiocinas en la superficie de los LT específicos se asoció de manera directa con los perfiles de activación que habían sido determinados previamente y que indicaba la bibliografía (Groom J.R., 2011; Sallusto F., 1998; Sallusto F., 1997; Wang C., 2009; Reboldi A., 2009). En los experimentos en los que se eliminó de manera transitoria a las células Treg se observó un incremento de la respuesta inmune específica con un perfil Th1, y este incremento también se vio asociado de manera directa con una mayor expresión de los receptores CXCR3 y CCR5. Experimentos de transferencia adoptiva de LT purificados provenientes de ratones NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} a ratones receptores NOD-SCID demostraron que sólo los linfocitos provenientes de ratones NOD fueron capaces de infiltrar tejido prostático, pudiéndose relacionar la expresión de los receptores CXCR3 y CCR5 con la capacidad de alcanzar el tejido prostático. Se observó además que el tratamiento con rIFN γ en los cultivos específicos de células de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} inducía la expresión de los receptores CXCR3 y CCR5 en la superficie de los LT. Estos LT al ser transferidos de manera adoptiva, fueron capaces de infiltrar y reclutar células inmunes a la glándula prostática a pesar de no poder producir y secretar IFN γ .

En muchas de las enfermedades autoinmunes que están asociadas con ciertos perfiles de activación, su patogénesis también han sido asociadas a la expresión de los receptores de quimiocinas asociados a estos perfiles. En enfermedades como diabetes autoinmune y hepatitis autoinmune, en las que el perfil Th1 es predominante, se ha demostrado que las primeras células que llegan al tejido blanco en la fase efectora expresan los receptores CXCR3 y CCR5 (van Halteren A.G., 2005). Estos datos sugieren que el reclutamiento de diferentes perfiles y receptores a los diferentes tejidos generarían de alguna manera, una compartimentalización del reclutamiento de células inmunes.

Se ha demostrado que el perfil de activación Th1 con la consecuente expresión de CXCR3 podría ser esencial para que los LT alcancen el tejido pancreático. En base a esto, muchos grupos de investigación han diseñado estrategias para dilucidar este mecanismo. Se ha descrito que los LT específicos con diferentes perfiles de activación cuando eran transferidos a ratones receptores, tenían que convertirse a un perfil de activación Th1 para poder generar una infiltración pancreática e inducir diabetes (Martin-Orozco N., 2009; Bending D., 2009). Los resultados expuestos por Wan y colaboradores demostraron que la transferencia adoptiva de LT específicos con un perfil Th1 con una baja expresión del

receptor CXCR3 no tienen la capacidad funcional de transferir la patología a ratones receptores. En contraste, la transferencia adoptiva de LT específicos con un perfil Th1 con una alta expresión del receptor CXCR3 rápidamente fue capaz de inducir una infiltración característica y desarrollar la patología en los ratones receptores (Wan X., 2012). Otros autores han demostrado que la transferencia adoptiva de LT específicos con los perfiles Th1 o Th17 induce una infiltración muy similar, a pesar de que la transferencia adoptiva de LTh1 induce hiperglucemia a los 5 días y la transferencia de LTh17 mantienen a los ratones receptores normoglucémicos aún 21 días después de la transferencia (Wan X., 2012). En este modelo de diabetes, a diferencia de lo que ocurre en nuestro modelo, la ausencia de IFN γ genera una infiltración sin desarrollo de la patología, sugiriendo que la infiltración de la glándula pancreática no está asociada directamente con el desarrollo de diabetes. Por otro lado estos mismos autores han demostrado que los LT específicos Th17 a los que se les induce la expresión del receptor CXCR3 fueron capaces de inducir hiperglucemia en los animales receptores en iguales condiciones que los LTh1 (Wan X., 2012). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro modelo y sugieren que los receptores de migración y la especificidad de los LT podrían ser más importantes en el desarrollo de diabetes/prostatitis que el perfil de secreción de citoquinas de éstos.

Por otro lado, se ha reportado que los LT efectores que expresan el receptor de quimiocina CCR6 son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica con mayor facilidad que otros perfiles de LT efectores (Reboldi A., 2009; Sallusto F., 2012). La secreción de IL-17A dentro del SNC aumenta la permeabilidad de la barrera posibilitando el ingreso de un mayor número de células inmunes (Kebir H., 2007). En modelos animales de EAE se ha encontrado un incremento de LT efectores CCR6⁺ además de un incremento de su quimiocina específica CCL20 dentro del SNC de ratones afectados (Liston A., 2009). El grupo de trabajo de Liston y colaboradores han reportado que ratones deficientes en el receptor CCR6 tienen una menor severidad e incidencia al desarrollo de EAE, que ratones *wt*. En un modelo de EAE, la transferencia adoptiva de LT específicos a ratones receptores transfiere una severa EAE, mientras ratones receptores de LT específicos CCR6^{-/-} muestran una disminución significativa de la severidad y mortalidad de la patología (Pötzl J., 2008; Reboldi A., 2009). Por otro lado, la administración de un anticuerpo anti-CCR6 en la fase inductora también demostró tener un efecto protector, similar al obtenido con LT

deficientes en el receptor CCR6 (Liston A., 2009). Cabe destacar que este tratamiento no fue efectivo si la administración se producía en la fase efectora, indicando la importancia que tiene el eje de señalización en la fase inductora de la patología ya que el tratamiento durante la fase efectora reportó muy pocos efectos benéficos comprobados debido a la redundancia de señales (Liston A., 2009).

Las quimiocinas expresadas por los tejidos han sido implicadas en la regulación del tráfico leucocitario a los mismos de una manera específica de órgano. A pesar de que muchas quimiocinas son expresadas de manera constitutiva en ciertos tejidos, muchas otras pueden incrementarse o inducirse bajo señales determinadas por PAMPs, DAMPS, citoquinas, entre otras señales. En los últimos años se ha avanzado de manera significativa en la descripción de las quimiocinas que son expresadas en los diferentes tejidos en condiciones fisiológicas y frente a diferentes condiciones patológicas. Las quimiocinas expresadas dentro de los tejidos favorecen la llegada de las células que expresen los receptores específicos para éstas. Actualmente, la relación que existe entre estas moléculas quimioattractantes (expresadas en los tejidos) y sus receptores específicos (expresados en las células inmunes) está siendo ampliamente estudiada con el fin de elaborar nuevas terapias que puedan ser dirigidas de manera órgano-específicas (Sahin H., 2011; Okamoto M., 2012; Fahham D., 2012; Karash A.R., 2011; Zhang Y., 2012). Se ha descrito que este sistema es capaz de promover el reclutamiento de una gran variedad de células inmunes (LT, LB, macrófagos/monocitos, CD, neutrófilos, entre otras) a todos los tejidos del organismo. Este mecanismo de reclutamiento tiene una acción central en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes, no sólo direccionando el tráfico leucocitario a ciertos tejidos, sino también orientando la ubicación de los leucocitos dentro de los tejidos afectados (Ward S.G., 2009; Bono M.R., 2007).

En un gran número de enfermedades autoinmunes, se han determinado que la expresión de quimiocinas dentro de los tejidos afectados está alterada. Tanto en las enfermedades humanas como en modelos animales, se han encontrado elevadas cantidades de determinadas quimiocinas dependiendo el tejido afectado. Pacientes que cursan con un diagnóstico reciente de diabetes, tienen un fuerte incremento de CXCL10 y CXCR3 en los islotes lesionados de la glándula pancreática (Roep, B.O., 2009; Uno S., 2010). Estos resultados fueron corroborados en modelos animales donde no sólo se ha asociado el inicio

de la diabetes con una incrementada expresión de CXCL10 y CCL5, sino también con un influjo de células CXCR3 (Uno S., 2010). Por otro lado, ratones que tienen una incrementada expresión de CXCL10 en las células β pancreáticas exhiben una infiltración espontánea de LT CD4 y CD8 de manera peri-insular e intransular, aunque no desarrollan diabetes espontáneamente. Estos datos indicarían que CXCL10 induciría el reclutamiento de células de manera CXCR3 dependiente, aunque el reclutamiento de células T activadas (no específicas para antígenos pancreáticos) no es suficiente para inducir un proceso autoinmune (Rhode A., 2005). Sin embargo si a estos ratones que tienen una expresión pancreática incrementada de CXCL10 se les transfieren células específicas, estos desarrollan diabetes de manera acelerada y significativamente mayor que animales controles que expresan niveles fisiológicos de CXCL10 (Rhode A., 2005). Las quimiocinas tienen funciones quimioattractantes importantes para atraer células inmunes, pero también se sabe que tienen otras funciones en los tejidos donde son expresadas como por ejemplo reducir la proliferación de células β en el caso de CXCL10 y diabetes (Morimoto J., 2004). Si bien una expresión alterada de quimiocinas puede no inducir directamente el desarrollo de una enfermedad, podría favorecer directamente el reclutamiento de un gran número de células a los tejidos.

En la AR, se ha visto que los líquidos sinoviales de pacientes con esta patología tienen una alta concentración de CCL20, sobre todo en las etapas iniciales de la enfermedad, lo que sugiere que esta quimiocina sería muy importante para el reclutamiento celular inicial (Hirota K., 2007; van Humburg J.P., 2011). Por otro lado, existe evidencia de que en la fase efectora de la patología, tanto en ratones como en pacientes, la quimiocina CXCL10 podría ser la responsable del mantenimiento inflamatorio (Jude C., 2013; Yoshida S., 2012). Por otro lado, la señalización CCL20/CCR6 ha sido implicada en el reclutamiento de LT al SNC e intestino en condiciones inflamatorias (Wang C., 2009; Sallusto F., 2012). En el modelo inducido de EAE, la administración en la fase inductora de un fragmento de la quimiocina CCL20 (capaz de unirse al receptor CCR6 y bloquear su capacidad de unión a CCL20 endógeno) no sólo reduce significativamente el desarrollo y la incidencia de la patología, sino que también reduce el infiltrado leucocitario capaz de llegar al SNC y las lesiones en dentro del tejido (Sallusto F., 2012).

Muchos resultados sugieren que la señalización utilizada por CXCL10/CXCR3 desempeña un papel muy importante en el reclutamiento de las células T a sitios inflamados como ocurre en determinadas enfermedades infecciosas y autoinmunes, aunque también ha sido reportado que esta señalización tendría un rol fundamental en los procesos de rechazo a ciertos trasplantes (Liu M., 2011; Lee E.Y., 2009; Romagnani P., 2012). Este eje de señalización CXCL10/CXCR3 que ha sido implicado en diferentes enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes como psoriasis, enfermedad de inflamación intestinal, AR, uveítis autoinmune y diabetes, hasta ahora nunca había sido descrito en un modelo de prostatitis (Groom J.R., 2011; Lacotte S., 2009; Lee E.Y., 2009).

No existen reportes concluyentes acerca de la expresión fisiológica de quimiocinas en las glándulas prostáticas y tampoco cuales están involucradas en los procesos inflamatorios y los procesos de reclutamiento de células inmunes a tejido prostático. Nuestros resultados demostraron que las glándulas prostáticas de ratones NOD expresaron de manera fisiológica una mayor cantidad de las quimiocinas asociadas a los receptores CXCR3 y CCR5 en comparación con animales NOD-IFN γ ^{-/-}. Estos resultados sugieren que el tejido prostático de ratones susceptibles tiene una mayor expresión basal de quimiocinas, las cuales podrían estar implicadas en dirigir el tráfico leucocitario inicial hacia la glándula. Por otro lado, las glándulas prostáticas de los animales NOD autoinmunes incrementaron significativamente la expresión de quimiocinas CXCL10, CXCL11, CXCL9, CCL5, CCL3 y CCL20. Aunque muchas quimiocinas se vieron incrementadas de manera significativa, CXCL10 fue la principal quimiocina afectada. Los tejidos prostáticos provenientes del Grupo PAg de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} no mostraron un incremento significativo en la expresión de las quimiocinas asociadas a los receptores analizados como: CXCL10, CXCL11, CXCL9, CCL5, CCL3 y CCL20. Nuestros resultados nos permiten concluir que los tejidos prostáticos de ratones NOD en un estado fisiológico expresan ciertas citoquinas y quimiocinas inflamatorias de manera constitutiva y que este microambiente particular podría facilitar el reclutamiento de células del SI hacia la glándula prostática independientemente de su especificidad. Por otro lado, los ratones NOD-IFN γ ^{-/-} mostraron una baja expresión de citoquinas y quimiocinas en el microambiente prostático de manera fisiológica, sin generar una elevada expresión luego de las inmunizaciones. Los datos obtenidos sugieren que estos niveles bajos en la expresión de citoquina y quimiocinas

podrían estar implicados en la menor cantidad de leucocitos presentes en los tejidos prostáticos de ratones de esta cepa. En nuestro grupo de trabajo hemos demostrado que ratones machos de la cepa NOD desarrollan prostatitis de manera espontánea con el tiempo, la cual podría estar favorecida por este microambiente rico en quimiocinas, el cual podría actuar como iniciador del reclutamiento de células autoreactivas presentes en la periferia. Los ratones NOD luego de la inmunización, generan LT específicos con un perfil dominante Th1/Tc1 que expresan los receptores de migración necesarios para poder acceder al tejido prostático. La llegada de LT específicos podría inducir la activación de estos, desencadenando la liberación de citoquinas e inducción de una mayor cantidad de quimiocinas que podrían amplificar el proceso inflamatorio. Por el contrario, ratones NOD-IFN γ ^{-/-} luego de la inmunización, generan LT específicos con un perfil Th17/Tc17 dominante, que expresan principalmente el receptor CCR6, el cual podría no ser suficiente para acceder al tejido prostático e inducir un proceso inflamatorio. La inducción de LT específicos CCR6⁺ en combinación con una baja expresión de CCL20 y de otras quimiocinas que podrían reclutar de manera indirecta, podrían ser los mecanismos por los cuales estas células no son capaces de acceder al tejido prostático en los tiempos analizados. Aunque esto no excluye la posibilidad de que las células T específicas de estos animales no puedan alcanzar el tejido específico en escalas de tiempo más largos, y/o que inflamaciones transientes originadas por causas no relacionadas puedan generar un proceso de reclutamiento en esta cepa.

Algunos reportes indican que el microambiente prostático produce una gran variedad de quimiocinas de manera activa como consecuencia de las perturbaciones en la homeostasis del tejido normal (Macoska J.A., 2011). La glándula prostática es un órgano blanco de un variado número de alteraciones entre las que se encuentran procesos como el envejecimiento, la hiperplasia prostática y procesos patológicos como la prostatitis y el adenocarcinoma prostático. Algunos estudios realizados en pacientes con CP/CPPS han demostrado niveles elevados de un gran número de quimiocinas en los fluidos seminales de los mismos (Nadler R.B., 2000; Liu L., 2009). Las quimiocinas que se han descrito hasta el momento en los fluidos seminales de pacientes con CP/CPPS son CXCL5 y CXCL8, las cuales han demostrado tener un efecto quimioattractante y angiogénico (Nadler R.B., 2000; Liu L., 2009). Otros autores han observado en un modelo murino de PAE una correlación

entre la clínica de dolor pélvico y las quimiocinas CCL2 y CCL3 (Desireddi N., 2008; Quick M., 2012). Sin embargo muchas de estas quimiocinas que se incrementan aproximadamente unas 3 veces en las etapas tempranas, no son mantenidas ni persisten con el tiempo (Quick M., 2012). Recientes estudios han postulado que la citoquina inflamatoria IL-8 (o su análogo en ratón KC) podría ser un marcador de inflamación prostática (Koumantakis E., 1998; Lotti F., 2013). La IL-8 es una citoquina inflamatoria que tiene una importante función quimioattractante de neutrófilos y angiogénica. Se ha observado que pacientes que están cursando con un proceso de hiperplasia prostática benigna tienen elevados niveles de esta citoquina en los fluidos seminales, proponiéndola como un nuevo marcador predictivo de inflamaciones prostáticas (Penna G., 2007(b); Lotti F., 2013). Sin embargo y a pesar del interés de algunos autores por postular la presencia de esta citoquina en fluidos seminales como un posible marcador de inflamación prostática, hay que tener en cuenta que la secreción de este marcador no solo se produce por inflamación prostática, sino que la mayoría de los órganos del tracto genital masculino inflamados la producen (vesículas seminales, epidídimo, uretra, entre otros), lo que la convierte en un marcador poco específico (Koumantakis E., 1998; Harvey H.A., 2002; Al-Mously N., 2007). En relación a nuestros resultados, no se encontró una correlación entre la secreción de KC y la susceptibilidad a PAE, ya que ratones resistentes al desarrollo de PAE como BALB/c y NOD-IFN γ ^{-/-} presentaron niveles elevados de KC luego de la inmunización aunque no generaban una infiltración y lesión en dicha glándula. En este trabajo de tesis se analizaron los niveles de expresión de diferentes quimiocinas asociadas a los receptores CXCR3 y CCR5. No existen hasta el momento publicaciones que analicen los niveles de las mismas en los tejidos prostáticos y/o en los fluidos seminales de pacientes sanos y en pacientes con diagnóstico de CP/CPPS; lo cual sería muy interesante de abordar en futuros estudios.

El bloqueo de quimiocinas o de sus receptores específicos con anticuerpos monoclonales, moléculas peptídicas y no peptídicas son algunos diseños experimentales que se han ensayado en la búsqueda de tratamientos en enfermedades autoinmunes. Se ha demostrado que el bloqueo con un anticuerpo monoclonal anti-CXCL10 reduce la incidencia de diabetes en un modelo de diabetes inducida por infección viral (Christen U., 2003). Reportes recientes demuestran que el bloqueo de una sola quimiocina podría no ser

completamente funcional, ya que el sistema quimiocina/receptor de quimiocina es muy redundante (Coppeters K.T., 2013). Hay evidencias de que las terapias con anticuerpos monoclonales anti-CXCL10 no serían las más efectivas para reducir la severidad de diabetes, a pesar de que esta quimiocina es una de las primeras en expresarse dentro del tejido pancreático. La principal discusión acerca de esta terapia se plantea en que la administración debería ser muy cercana al tiempo en el cual se produce la injuria tisular. Se especula que los modelos experimentales exitosos con este tratamiento son debido a que se sabe con mucha certeza el momento en el cual se está induciendo la lesión y se está produciendo la quimiocina de manera aguda. Algunos autores han demostrado que la producción de anticuerpos neutralizantes específicos para CXCL10, generados a través de una vacunación con un plásmido que contiene la secuencia de CXCL10, suprime la diabetes espontánea que se genera en ratones NOD (Shigihara T., 2005). En este trabajo, se demuestra que la respuesta inmune en la periferia no se ve afectada y tampoco se reduce significativamente la llegada de células al páncreas, ya que se genera una peri-insulinitis, aunque sin desarrollar diabetes. Estos autores demuestran que el secuestro de CXCL10 en el microambiente pancreático tiene un importante efecto sobre la proliferación de las células β pancreáticas (Shigihara T., 2005; Morimoto J., 2004). Sin embargo, terapias basadas en la utilización de anticuerpos monoclonales anti-quimiocinas deberían ser evaluadas con mayor rigurosidad, ya que debido a la gran redundancia de quimiocinas, el bloqueo de una sola de ellas podría resultar ineficiente para eliminar el reclutamiento.

Se ha postulado que terapias que involucren el bloqueo de los receptores podrían tener mayor efectividad clínica. En el presente trabajo de tesis sólo la transferencia adoptiva de LT CXCR3⁺ se asoció con una infiltración de la glándula prostática y reclutamiento de células inmunes al tejido. Para conocer la importancia de la expresión de este receptor, se realizaron además experimentos de bloqueo, ya que no se podía dilucidar si los LT CXCR3⁺ que llegaban a la glándula prostática expresaban además otro receptor involucrado en la capacidad migratoria que no estaba siendo tenido en cuenta. Ha sido descrito que el antagonista mimético TAK-779 tiene la capacidad de unirse a los receptores CCR5 y CXCR3 de manera irreversible, sin alterar la funcionalidad de las células a las que se une (Ni J., 2009; Akashi S., 2005). El uso de este inhibidor demostró que el bloqueo de los receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5 generó una drástica

disminución en la llegada de LT y de leucocitos al tejido prostático, demostrando así el rol fundamental que tiene en la expresión de estos receptores de quimiocinas y sus ligandos en el tráfico de células inmunes hacia el tejido blanco.

Este inhibidor fue creado para ser utilizado como bloqueante de CCR5, una molécula utilizada como co-receptor en la entrada del virus de VIH en las células del SI (LT CD4 y macrófagos) (Baba M., 1999). Este inhibidor además ha demostrado ser efectivo en el bloqueo del receptor CXCR3 (Gao P., 2003). El antagonista TAK-779 ha demostrado tener un efectivo rol no solo en otros modelos de enfermedades autoinmunes, sino también en enfermedades inflamatorias severas y las fases agudas y crónicas de rechazo en ciertos tipos de trasplantes (Ni J., 2009; Akashi S., 2005; Kakuta Y., 2012; Kishi J., 2011).

El conocimiento acerca del eje de quimiocinas/receptores de quimiocinas involucrados en la migración linfocitaria hacia la glándula prostática podría ser muy útil para el diseño de posibles nuevas estrategias terapéuticas en las que se busque como objetivo atenuar el daño e inflamación prostática generada por el proceso autoinmune. Además, el avance en conocimiento en esta área podría tener implicancias muy importantes para el desarrollo de nuevas terapias que involucren a otras afecciones de la glándula como la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata.

En estudios realizados en biopsias de pacientes con cáncer prostático, se ha observado que células epiteliales prostáticas transformadas de estos pacientes expresan el receptor CXCR3 (Wu Q., 2012). De igual manera, líneas tumorales de células epiteliales prostáticas humanas y de ratón tienen elevada expresión de CXCR3 en la superficie y de manera intracelular (Wu Q., 2012). Algunos autores han sugerido que la expresión de estos receptores en las células tumorales tendría como objetivo la captación directa de las quimiocinas producidas en el tejido, con dicha captación las células tumorales por un lado evitarían la llegada de células inmunes al sitio e incrementarían su ciclo de proliferación (Wu Q., 2012; Zhang Y., 2012; Cambien B., 2011; Zhuo W., 2012; Domanska U.M., 2012). Otros grupos de investigadores han sugerido que la captación de estos ligandos actuaría de manera directa e indirecta sobre las células epiteliales y tumorales favoreciendo la proliferación no controlada de las mismas (Romagnani P, 2001; Kouroumalis A, 2005). La expresión de CXCR3 no sólo se ha observado en células tumorales prostáticas, sino

también en otros tipos tumorales. Se ha asociado la expresión de CXCR3 a la progresión y metástasis de cáncer de mama, colon, osteosarcoma y melanoma en modelos murinos (Ma X., 2009; Goldberg-Bittman L., 2004; Kawada K., 2004; Kawada K., 2007; Pradelli E., 2009; Cambien B., 2009). Por otro lado, la inhibición de CXCR3 y/o el silenciamiento del gen que codifica para CXCR3 en las células tumorales inhibió la metástasis en modelos murinos de cáncer de mama, colon, osteosarcoma y melanoma (Ma X., 2009; Kawada K., 2007; Kawada K., 2004; Walser T.C., 2006; Pradelli E., 2009). Sin embargo en modelos de metástasis de cáncer colonrectal a pulmón la administración de un inhibidor de CXCR3 no tuvo efecto (Cambien B., 2009). Algunos autores han postulado que la expresión *in vivo* de CXCR3 en las células epiteliales podría promover el desarrollo tumoral y la metástasis de una manera selectiva de órgano (Wu Q., 2012; Cambien B., 2009). Estos hallazgos advierten una situación compleja respecto a CXCR3 y procesos tumorales prostáticos ya que este receptor no sólo es expresado por células inmunes que podrían tener un rol beneficioso en la respuesta antitumoral, sino también por las mismas células tumorales.

En el caso de prostatitis autoinmune, la administración de un bloqueante de CXCR3 tuvo un efecto benéfico en la prevención de la llegada de células inmune patogénicas, mientras que la eliminación de Treg tuvo un efecto deletéreo ya que ratones susceptibles desarrollaron una prostatitis mucho más severa y ratones resistentes se transformaron en susceptibles. Teniendo en cuenta estos resultados, otra posible estrategia terapéutica podría involucrar la inducción de Treg que pudieran controlar el proceso autoinmune en próstata. En los últimos años se ha demostrado que las células Treg para poder realizar su función en un tejido periférico necesitan compartir ciertas características con las células efectoras que generan la inflamación. Se ha descrito que para que las células Treg puedan controlar a las inflamaciones mediadas por LT efectoras con un perfil Th1 necesitan inducir T-bet (aunque sea de manera transitoria) y expresar CXCR3 (Koch M.A., 2009; Campbell D.J., 2011). De la misma manera se ha demostrado que para que las células Treg cumplan su función modulando a las inflamaciones mediadas por LTh17 es necesario que ellas expresen el factor RoR γ t y el receptor CCR6 (Lochner M., 2008; Chaudhry A., 2009). La inducción de factores de transcripción asociados al perfil de activación inflamatorio Th1 o Th17 concomitantemente con Foxp3 es lo que se llama inducción de células Treg híbridas

(Foxp3⁺Tbet⁺ o Foxp3⁺RoRγt⁺), las no pierden su función regulatoria (Josefowicz S.Z., 2012). Se postula que la generación de estas células Treg híbridas sería fundamental para modular y suprimir las fases efectoras en las enfermedades autoinmunes. Los primeros hallazgos relacionados a este conocimiento fueron obtenidos en ratones *scurfy* (deficientes en el factor Foxp3). Estos animales tienen una activación exacerbada del perfil Th1 en la periferia lo que genera lesión en varios tejidos como las glándulas pancreáticas, tiroideas, prostática, piel, hígado, pulmón, testículo, ovario, entre otros (Kim J.M., 2007; Suscovich T.J., 2012). Se ha observado que la inflamación de estos animales es revertida por la transferencia adoptiva de células Treg provenientes de animales normales, pero si la transferencia de Treg proviene de animales deficientes en el factor T-bet la inflamación no se revierte (Koch M.A., 2009). Se ha determinado que ratones deficientes en T-bet, IRF4 o STAT3 poseen Treg Foxp3⁺ que no logran controlar respuestas Th1, Th2 y Th17 respectivamente (Zheng Y., 2009; Koch M.A., 2009; Chaudhry A., 2009; Josefowicz S.Z., 2012). La presencia de células Treg con fenotipos híbridos no sólo ha sido reportada en modelos animales sino también en patologías humanas (Wei G., 2009; Oldenhove G. 2009). Existen hipótesis que señalan que las células Treg que expresan factores de transcripción de Th, podrían ser las células encargadas de suprimir las funciones efectoras ese de tipo de respuesta determinada, postulando una especialización funcional para las células regulatorias (Josefowicz S.Z., 2012)

Se han reportado novedosos resultados en modelos animales en los que se utilizaron ratones deficientes en CXCR3. En el modelo de hepatitis autoinmune inducida a través de la administración i.v. de Concaivalina A, se ha demostrado la generación de una respuesta inmune aguda con una elevada producción de IFNγ sistémica, lo que genera un incremento significativo de una gran cantidad de quimiocinas en el tejido hepático. Se observó que los ratones deficientes en el receptor CXCR3 presentaban una patología exacerbada con mayor infiltración, lesión hepática y letalidad comparado con los ratones *wt* (Erhardt A., 2011). Los ratones CXCR3 deficientes tenían menor cantidad de Treg en hígado y una mayor cantidad de éstas en los ganglios drenantes, sugiriendo que las Treg habían sido retenidas en los ganglios linfáticos drenantes del hígado sin poder llegar al tejido blanco (Erhardt A., 2011). Se ha demostrado en un modelo murino de trasplante hepático, que la transferencia de células Treg CXCR3⁺ mejora la tolerancia al trasplante y al funcionamiento del tejido

debido a una mayor migración de células Treg al tejido hepático (Hasegawa H., 2008). Algunos resultados sugieren que la deficiencia en algunos receptores podría afectar más a las células Treg que a las células T efectoras. Diferentes autores han postulado que los LT efectoras podrían tener una expresión más variada de receptores de quimiocinas (CCR5, CXCR16, CCR4, CCR8, CCR2 entre otros), que los podrían asistir en el caso de que algunos de los receptores clásicos de cada perfil estén ausentes; mientras que las células Treg híbridas tendrían un menor repertorio de expresión de receptores, por lo que sólo podrían migrar de una manera dependiente de los receptores inducidos por los factores de transcripción clásicos de cada perfil.

En el modelo de EAE inducido en ratones deficientes en el receptor CCR6, se observó una demora en el inicio de la patología, pero luego que la enfermedad se desencadenaba se generaba un mayor número de áreas lesionadas dentro SNC y una clínica más severa que en los animales *wt*. La mayor severidad reportada en los animales deficientes en el receptor CCR6 durante la fase efectora, se correlacionó con una reducida cantidad de células Treg dentro del SNC en comparación con los animales controles *wt* (Villares R., 2009). En este modelo experimental la transferencia de células Treg CCR6⁺ revirtió el proceso inflamatorio en el tejido. Yamada y colaboradores estudiaron el desarrollo de diabetes espontánea en ratones de la cepa NOD deficientes en el receptor CXCR3, observando que los mismos desarrollaban una diabetes más acelerada que los animales *wt* y que la misma se correlacionó con una menor cantidad de células Treg híbridas Foxp3⁺CXCR3⁺ en el páncreas. Estos resultados sugieren que la expresión del receptor CXCR3⁺ no sólo es importante en el desarrollo de LT efectoras, sino también es fundamental para que las células Treg puedan controlar las inflamaciones asociadas a este perfil (Yamada Y., 2012). En el presente trabajo de tesis, el bloqueo del receptor CXCR3 y CCR5 ha demostrado no sólo inhibir drásticamente la llegada de LT sino que también el reclutamiento de células inmunes del huésped al tejido prostático.

En la presente tesis se ha contribuido significativamente al conocimiento de los perfiles de activación de LT implicados en la patogénesis de prostatitis autoinmune. Se ha logrado avanzar en el conocimiento de las quimiocinas y de los receptores de quimiocinas implicados en la migración de los LT específicos hacia dicho tejido durante un proceso inflamatorio. Nuestros hallazgos demuestran que la expresión de los receptores CXCR3 y

CCR5 en la superficie de los LT es esencial para conferirle a éstos la capacidad de alcanzar el tejido prostático e inducir un microambiente que genere el reclutamiento de un mayor número de células. Continuar investigando el rol que cumplen los receptores de quimiocinas y las quimiocinas que están implicadas en el tráfico leucocitario a próstata, permitirá avanzar en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que puedan ser utilizadas en el tratamiento de patologías que tengan como blanco al tejido prostático.

Materiales y Métodos

Materiales y métodos

Obtención de mezcla de proteínas prostáticas (PAg).

Se utilizó una mezcla compleja de proteínas prostáticas (PAg) como fuente de antígenos para realizar las inmunizaciones. La mezcla de proteínas prostáticas fue preparada en el laboratorio a partir de próstatas de ratas Wistar trituradas y homogenizadas en un buffer conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, St Louis, Estados Unidos) mediante la utilización de un triturador mecánico Ultra-turrax. La suspensión fue centrifugada y ultracentrifugada a 100.000 x g durante 30 minutos, hasta obtener un sobrenadante, el cual contenía todas las proteínas solubles presentes en la glándula prostática. La concentración de proteínas en este sobrenadante fue determinada a través del método de Bradford (Bio-Rad, California; Estados Unidos).

Purificación de Prostateína (PSBP)

La purificación de PSBP fue realizada siguiendo el procedimiento descrito por Chen C., y colaboradores en 1982. El sobrenadante obtenido a partir de los homogenizados de glándula prostática de rata descrito previamente, fue cargado en una columna de Sepharosa Q para cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC). Las proteínas fueron eluidas a través de un gradiente salino de NaCl, para ser recolectadas en fracciones independientes. Cada fracción eluída fue analizada en una corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 15% con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y teñidas con azul de Coomassie. Las fracciones conteniendo las bandas de peso molecular de 18 y 22 kDa fueron tomadas y concentradas por filtros Centriprep (Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania). La pureza de las preparaciones de PSBP fue superior al 95% evaluada por inmunoblot utilizando un anticuerpo específico contra la subunidad C1 de la Prostateína (Maccioni, M., 1998). La purificación de PSBP estuvo libre de contaminantes como el Lipopolisacárido, determinado por el método de formación de coágulo, el cual posee una

sensibilidad de 0.03EU de LPS por mL (Charles River, Laboratories International, Wilmington, NY, Estados Unidos).

Cepas de ratones utilizadas

Los ratones de las cepas BALB/c y C57Bl/6 fueron adquiridos en la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Los animales NOD, NOD.129S7(B6)^{-IFN- γ tm1Ts} (NOD-IFN γ ^{-/-}) y NOD-SCID fueron gentilmente cedidos por los Dres Diane Mathis y Cristoph Benoist y enviados por el laboratorio Jackson (Bar Harbor, Estados Unidos). Los animales NOD-IFN γ ^{-/-} presentan una eliminación del gen que codifica para IFN γ que resulta en ausencia del ARNm y de la proteína. Los animales fueron mantenidos y endocriados en el bioterio del Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET) bajo condiciones libres de patógenos específicos y de acuerdo con los requisitos del comité ético institucional. Los animales se mantuvieron con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad a 20 °C bajo una humedad controlada.

Inducción de Prostatitis Autoinmune Experimental (PAE)

Ratones machos de 6 a 8 semanas de edad de las cepas BALB/c, C57Bl/6, NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} fueron inmunizados subcutáneamente con 300 ug/ratón de una mezcla de proteínas prostáticas (Grupo PAg) o solución fisiológica (Grupo Control) emulsificadas en CFA (Sigma-Aldrich), en un volumen de 150 uL por animal (Rivero V.E., 1998). El protocolo de inmunización constó de 2 dosis, la primera fue administrada en el día 0 y la segunda en el día 15 para ser sacrificados a los 24 días del esquema experimental.

Estudios histológicos de la glándula prostática

Los estudios histológicos de próstata fueron realizados a doble ciego y analizando distintas secciones de cada glándula. La clasificación fue realizada en cortes de glándulas prostáticas teñidos con Hematoxilina/Eosina (H/E) siguiendo criterios establecidos previamente (Motrich R.D., 2006). El grado de inflamación/lesión fue evaluado usando una escala que

incluyó los siguientes grados: negativo, leve, moderado, severo y muy severo. Se consideró negativo a aquellos cortes que no presentaron signos de inflamación; grado leve cuando los cortes mostraron alteraciones débiles con infiltración celular en zonas perivasculares; grado moderado cuando se observó infiltración celular moderada delimitada a zonas perivasculares, mostrando algunas células infiltrando el parénquima; grado severo cuando se observó una infiltración marcada de células asociadas a estructuras perivasculares y moderada infiltración del parénquima; grado muy severo cuando se detectó infiltración muy marcada en acúmulos perivasculares e infiltración marcada en el parénquima del tejido, mostrando hemorragia intraglandular.

Detección y localización de leucocitos intraprostáticos por IHQ

La técnica de IHQ se realizó en cortes de glándula prostáticas de ratones que habían sido fijadas y parafinadas. Las secciones de tejido fueron hidratadas, tratadas con un recuperador antigénico y bloqueadas para eliminar la actividad peroxidasa endógena con un buffer bloqueante (Dako cytomation, Glostrup, Dinamarca) según recomendaciones del fabricante. Los tejidos fueron incubados con un anticuerpo anti-CD45 pan-leucocitario (clon 30-F11) para determinar la presencia del infiltrado leucocitario dentro de los tejidos. Luego los vidrios fueron lavados e incubados con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (BD Bioscience; San Diego, CA, Estados Unidos). La detección colorimétrica se realizó utilizando el kit de detección DAB para esta técnica (BD Bioscience). Los vidrios fueron lavados y contra-teñidos con hematoxilina. Los cortes fueron analizados en un microscopio óptico (Axiolab, Zeiss, Jena, Alemania) a una magnificación de 200X.

Detección de leucocitos intra-prostáticos e intra-pancreáticos por Citometría de Flujo

Las glándulas prostáticas y pancreáticas provenientes de ratones de las diferentes cepas y en diferentes situaciones experimentales fueron obtenidas por extracción directa. Una vez extraídos los tejidos, estos fueron pesados y disgregados en medio RPMI (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) de manera mecánica y enzimática, a través

del agregado de 0,05 mg/ml Colagenasa tipo IV (Roche Diagnostic, Basilea, Switzerland) y 0,02 mg/ml de DNAsa I (Sigma-Aldrich) por 45 min a 37°C. Las suspensiones celulares generadas fueron lavadas con medio suplementado con Suero Bovino Fetal al 10% para inactivar a las enzimas y luego filtradas a través de filtros celulares con diferente tamaño de poro (70 y 40 μ m) para obtener una suspensión libre de restos tisulares (BD Bioscience). Los leucocitos vivos fueron contados en Cámara de Neubauer con Azul de Tripán. Luego las células fueron teñidas con los diferentes anticuerpos monoclonales (CD3, CD4, CD8, CD11b, F480 conjugados con diferentes fluorocromos) y analizadas utilizando el citómetro de flujo FACSCanto II (BD Bioscience). Para el análisis de los datos se utilizó el programa FlowJo (Tree Star).

Cultivos de células de bazo y ganglios linfáticos estimulados con autoantígeno y análisis de citoquinas en sobrenadantes.

Las células mononucleares de bazo y de ganglios linfáticos drenantes a la glándula prostática (paravertebrales y poplíteos) fueron obtenidas a partir de una disgregación mecánica sobre una malla para generar una suspensión celular homogénea. Luego las células mononucleares fueron separadas por un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich) con el fin de eliminar los eritrocitos, polimorfonucleares y células muertas. Las células obtenidas fueron resuspendidas en RPMI 1640 (Life Technologies,) suplementado con L-glutamina 2 mM, 50 μ g/ml Gentamicina, 50 mM 2 β mercaptoetanol y 10% de SBF (Life Technologies). Las células fueron contadas para luego ser añadidas en placas de cultivo de 96 pocillos en una densidad de 1×10^5 células por cada pocillo. Dichas células fueron incubadas 72 hs. en presencia de medio (condición Basal) o en presencia del autoantígeno PSBP (20 μ g/mL). Los sobrenadantes de los cultivos fueron recuperados a las 72 hs. para luego determinar la concentración de diferentes citoquinas como IFN γ , IL-17A, IL-13, IL-5, IL-4, IL-10 y TGF β (BD Bioscience y eBioscience) según las recomendaciones de los fabricantes mediante la técnica de ELISA.

Inmunomarcación de superficie e intracelular.

Se realizaron marcaciones *ex vivo* de células mononucleares de bazo y ganglios linfáticos drenantes de próstata luego de obtener suspensiones homogéneas de las mismas. Para ello las células fueron utilizando anticuerpos contra las siguientes moléculas de superficie: CD3, CD4, CD8, CD25, CD44, CD62L, CD11b, y F480 conjugados con diferentes fluorocromos.

Para evaluar los perfiles de células que se estaban induciendo luego de la inmunización, células mononucleares provenientes de bazo y ganglios fueron reestimuladas *in vitro* en presencia de medio o con PSBP durante 72 hs. Luego de los cultivos re estimulación las células fueron recogidas y marcadas con anticuerpos específicos para diferentes marcadores de superficie y analizadas por citometría de flujo. Los marcadores de superficie que fueron utilizados en los cultivos de reestimulación son: CD3, CD4, CD8, CD25, CD44, CD62L, CD11b, CXCR3, CCR5, CCR6, CCR4 y CCR3 conjugados con diferentes fluorocromos.

Para evaluar células Treg se realizaron marcaciones intracelulares de Foxp3. Para ello células *ex vivo* o provenientes de los cultivos de re estimulación fueron marcadas para las moléculas de superficie CD4 y CD25, fijadas y permeabilizadas con un kit de fijación y permeabilización para Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos). Luego de ser permeabilizadas las células fueron marcadas con el anticuerpo monoclonal anti-Foxp3 (clon FJK-16s) conjugado a los fluorocromos PE o APC. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro FacsCanto II (BD Bioscience) y los datos fueron analizaron utilizando el programa FlowJo (Tree Star).

Para determinar la producción de citoquinas intracelulares células provenientes de los cultivos de reestimulación fueron estimuladas con 10 ng/ml de PMA y 1 µg/ml de Ionomicina (Sigma-Aldrich) durante 5 hs. Para evitar la secreción de las citoquinas y poder detectarlas dentro de las células, se agregó 10 µg/ml de Brefeldina A (Sigma-Aldrich) durante la últimas 4 hs de activación. Las células fueron levantadas de los cultivos y teñidas con anticuerpos contra diferentes moléculas de superficie para luego ser fijadas y permeabilizadas con buffer de fijado y permeabilizado para citoquinas (BD Bioscience). Luego de ser permeabilizadas, las células fueron marcadas con los anticuerpos anti-IFN γ

(clon XMG1.2), anti-IL-17A (clon TC11-18H10) y anti-IL-10 (clon JES5-16E3) conjugados a diferentes fluorocromos.

Para cada uno de los casos, las células fueron marcadas con los respectivos anticuerpos monoclonales durante 1 hora a 4 °C en buffer de citometría. Previamente a ser adquiridas fueron resuspendidas en líquido diluyente de citometría FACS flow (BD Bioscience). Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSCantoII (BD Bioscience) para luego ser analizados utilizando el programa FlowJo (Tree Star).

Expresión de citoquinas y quimiocinas en la glándula prostática

Las glándulas prostáticas provenientes de los Grupos Control y PAg de ratones de las cepas de NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} fueron obtenidas en el día 24 del esquema experimental. Las glándulas prostáticas fueron disgregadas en un buffer de lisis conteniendo inhibidores de proteasas (Ray Biotech, Norcross, GA) y homogenizadas con Ultra-Turrax hasta generar una suspensión homogénea según indicaciones del fabricante. La concentración de proteínas fue cuantificada utilizando el método de Bradford y suspensiones de 300 ug de proteínas totales de las diferentes condiciones fueron adicionadas a las membranas comerciales Protein Array Kit. (Ray Biotech). Todos los ensayos fueron realizados de acuerdo a las estrictas instrucciones del fabricante y los datos se analizaron utilizando el programa específicamente recomendado por el fabricante.

Depleción *in vivo* de células Treg en la fase inductora de PAE

Ratones machos de 6 a 8 semanas de edad de las cepas BALB/c, C57Bl/6, NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} fueron tratados un día previo al inicio del esquema experimental de inmunización por vía intravenosa (i.v.) con anticuerpos monoclonales. Para la depleción de células CD25⁺, se administró 500 ug/ratón de un anticuerpo monoclonal anti-CD25 clon PC61 (IgG α CD25), mientras que como control se administró 500 ug/ratón de un anticuerpo IgG control clon Ycate (IgG Control). Los grupos de animales IgG α CD25 y IgG Control de

cada una de las cepas en estudio, fueron inmunizados y sacrificados siguiendo el esquema experimental de inmunización ya descrito. La eficiencia de depleción de células Treg fue evaluada sacrificando algunos ratones testigo de cada cepa y analizando la presencia de linfocitos con fenotipo Treg a las 24, 48 y 72 horas post inyección. Se estudiaron muestras de ganglios linfáticos y bazo de los animales que recibieron los anticuerpos. La detección de células Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ fue determinada a través de la marcación de superficie de las células con un anticuerpo monoclonal anti-CD4 (RM4-5) y anti-CD25 (clon 7D4) en combinación con la marcación intracelular del factor de transcripción de Foxp3 (Stephens L.A., 2005; Zelenay S., 2005). El porcentaje de eficiencia de la depleción fue calculada a través el uso de la formula $[1 - (\text{Treg}_{\alpha CD25} / \text{Treg}_{\text{IgG control}})] \times 100$.

Administración *in vivo* de rIFN γ a ratones NOD-IFN γ ^{-/-} en la fase efectora de PAE.

Ratones de la cepa NOD-IFN γ ^{-/-} fueron inmunizados al día 0 y 15 con PAg emulsificados en CFA siguiendo el esquema experimental. Los ratones inmunizados fueron separados en 2 grupos experimentales para ser tratados de manera intraperitoneal (i.p.) con 1×10^4 U/día de rIFN γ (Grupo PAg + rIFN γ) o con Albumina sérica bovina 0,1% en PBS (Grupo PAg + vehículo) en los días 17, 19, 20 y 22 del esquema experimental. Los animales fueron sacrificados en el día 24 del esquema experimental de inmunización y se realizaron diferentes ensayos.

Transferencia adoptiva de células CD3⁺ a ratones NOD-SCID

Ratones de las cepas NOD y NOD-IFN γ ^{-/-} fueron inmunizados según el protocolo y sacrificados en el día 24 del esquema experimental. Se obtuvieron los bazos y se realizaron cultivos de re-estimulación *in vitro* en presencia de PSBP durante 72 hs. Luego del estímulo las células fueron lavadas y teñidas con anticuerpos específicos anti-CD3. Luego de la marcación, las células se lavaron y fueron purificadas en base a la expresión de CD3 utilizando el equipo FACS Aria II cell-sorter (BD Biosciences). Se obtuvo una pureza de separación mayor al 98% en las fracciones. Luego de la separación, las células fueron

contadas y resuspendidas en una concentración de 1×10^6 células en 100 μ l de solución fisiológica estéril y apirógena. Las células fueron inyectadas de manera i.v. en ratones receptores NOD-SCID (deficientes en LT y LB). La presencia de LT CD3⁺ en próstata, bazo y ganglios linfáticos de los ratones receptores NOD-SCID fue evaluada a los 15 y 30 días post-transferencia.

Transferencia adoptiva de células CD3⁺ de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} tratadas *in vitro* con rIFN γ a ratones NOD-SCID

Células mononucleares esplénicas provenientes del Grupo PAg de ratones NOD-IFN γ ^{-/-} fueron amplificadas *in vitro* en presencia de PSBP o de PSBP en combinación con rIFN γ [1000 pg/ml] (PeproTech, Mexico DF, Mexico) durante 72 hs. Luego de la amplificación “*in vitro*” las células fueron lavadas y teñidas en base a marcadores de superficie con anticuerpos específicos anti-CD3. Las células fueron separadas por FACS Aria II cell-sorter (BD Biosciences) obteniéndose una pureza de separación mayor al 98% en las fracciones. Un millón de células CD3⁺ resuspendidas en solución fisiológica fueron inyectados de manera i.v. en ratones receptores NOD-SCID. La presencia de LT CD3⁺ en próstata, bazo y ganglios linfáticos de los ratones receptores NOD-SCID fue evaluada a los 15 y 30 días post-transferencia.

Transferencia adoptiva de células CD3⁺CXCR3⁻ y CD3⁺CXCR3⁺ a ratones NOD-SCID

Células mononucleares esplénicas provenientes del Grupo PAg de ratones NOD fueron amplificadas *in vitro* en presencia de PSBP por 72 hs. Luego de la amplificación “*in vitro*” las células fueron lavadas y teñidas en base a marcadores de superficie con anticuerpos específicos anti-CD3 y anti-CXCR3. Las células fueron separadas en base a las moléculas de superficie por FACS Aria II cell-sorter (BD Biosciences), obteniéndose 2 fracciones LT: CD3⁺CXCR3⁻ y CD3⁺CXCR3⁺, con una pureza de separación mayor al 98% en las fracciones separadas. Un millón de células CD3⁺CXCR3⁻ y $3,5 \times 10^5$ células CD3⁺CXCR3⁺

fueron suspendidas en solución fisiológica e inyectadas de manera i.v. en ratones receptores NOD-SCID. La presencia de LT CD3⁺ en las glándulas prostáticas de los ratones receptores NOD-SCID fue evaluada a los 30 días post-transferencia.

Transferencia adoptiva de LT CD3⁺ y tratamiento con el inhibidor TAK-779

Células mononucleares esplénicas provenientes del Grupo PAg de ratones NOD fueron amplificadas *in vitro* en presencia de PSBP durante 72 hs. Las células fueron separadas utilizando un FACS Aria II cell-sorter (BD Biosciences) en base a la expresión de molécula CD3 en la superficie de las células. 1×10^6 LT CD3⁺ fueron inyectados de manera i.v. en ratones receptores NOD-SCID. Los ratones NOD-SCID fueron separados en 2 grupos a partir del día 1 de transferencia y tratados cada 48 horas mediante una inyección por vía i.p. con solución fisiológica o de TAK-779 (150 ug/día/ratón). La presencia de LT CD3⁺ dentro de la glándula prostática y pancreática de los ratones receptores fue evaluada a los 30 días post transferencia adoptiva. La dosis de TAK-779 (programa de HIV del NIH) fue aplicada en base a datos reportados previamente en bibliografía, donde demostraron la dosis suficiente para generar una inhibición irreversible del receptor sin alterar la funcionalidad de las células T (Ni J., 2009; Akashi S., 2005; Suzaki Y., 2008)

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante la aplicación de test estadísticos de ANOVA de una o dos vías, dependiendo las factores de variabilidad presentes en los datos de cada experimento. Los test estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). Valores de $*p < 0,05$; $**p < 0,005$; $***p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Bibliografía

Bibliografía

Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, Jiang S, Kuchroo VK, Mathis D, Roncarolo MG, Rudensky AY, Sakaguchi S, Shevach EM, Vignali DA, Ziegler SF. **Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature.** Nat Immunol. 2013; 14(4):307-8.

Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. **T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells.** Nat Immunol. 2002; 3(6):549-57.

Akashi S, Sho M, Kashizuka H, Hamada K, Ikeda N, Kuzumoto Y, Tsurui Y, Nomi T, Mizuno T, Kanehiro H, Hisanaga M, Ko S, Nakajima Y. **A novel small-molecule compound targeting CCR5 and CXCR3 prevents acute and chronic allograft rejection.** Transplantation. 2005; 80(3):378-84

Alard P, Manirarora JN, Parnell SA, Hudkins JL, Clark SL, Kosiewicz MM. **Deficiency in NOD antigen-presenting cell function may be responsible for suboptimal CD4+ CD25+ T-cell-mediated regulation and type 1 diabetes development in NOD mice.** Diabetes. 2006; 55:2098–2105.

Al-Mously, N., Eley, A. **Interaction of Chlamydia trachomatis serovarE with male genital tract epithelium results in secretion of proinflammatory cytokines.** J. Med. Microbiol. 2007; 56, 1025–1032

Apostolou I, Verginis P, Kretschmer K, Polansky J, Hühn J, von Boehmer H. **Peripherally induced Treg: mode, stability, and role in specific tolerance.** J Clin Immunol, 2008; (6) 619–624

Baba M, Nishimura O, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Iizawa Y, et al. **A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity.** Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96(10):5698–5703.

Batista FD, Harwood NE. **The who, how and where of antigen presentation to B cells.** Nat Rev Immunol. 2009; 9(1):15-27.

Beima KM, Miazgowicz MM, Lewis MD, Yan PS, Huang TH, Weinmann AS. **T-bet binding to newly identified target gene promoters is cell type-independent but results**

in variable context-dependent functional effects. J Biol Chem. 2006; 281(17):11992-2000.

Bending D, De la Peña H, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B, Cooke A. **Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice.** J Clin Invest. 2009; 119(3):565-72

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. **The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3.** Nat. Genet. 2001; 27:20–21

Bierklund Johansen, T.E., and Weidner, W. **Understanding chronic pelvic pain síndrome.** Curr Opin Urol. 2002; 12:63-67.

Bilate AM, Lafaille JJ. **Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance.** Annu Rev Immunol. 2012; 30:733-58.

Bluestone JA, Mackay CR, O'Shea JJ, Stockinger B. **The functional plasticity of T cell subsets.** Nat Rev Immunol. 2009; 9(11):811-6.

Bonecchi R, Galliera E, Borroni EM, Corsi MM, Locati M, Mantovani A. **Chemokines and chemokine receptors: an overview.** Front Biosci. 2009; 14:540-51.

Bono MR, Elgueta R, Sauma D, Pino K, Osorio F, Michea P, Fierro A, Roseblatt M. **The essential role of chemokines in the selective regulation of lymphocyte homing.** Cytokine & Growth Factor Reviews. 2007; 18; 33-43

Bradley LM. **Migration and T-lymphocyte effector function.** Curr Opin Immunol. 2003; 15(3):343-8.

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. **Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse.** Nat. Genet. 2001; 27:68–73

Cambien B, Karimjee BF, Richard-Fiardo P, Bziouech H, Barthel R, Millet MA, Martini V, Birnbaum D, Scoazec JY, Abello J, Al Saati T, Johnson MG, Sullivan TJ, Medina JC, Collins TL, Schmid-Alliana A, Schmid-Antomarchi H. **Organ-specific inhibition of metastatic colon carcinoma by CXCR3 antagonism.** Br J Cancer 2009, 100:1755-64.

Cambien B, Richard-Fiardo P, Karimjee BF, Martini V, Ferrua B, Pitard B, Schmid-Antomarchi H, Schmid-Alliana A. **CCL5 neutralization restricts cancer growth and**

potentiates the targeting of PDGFR β in colorectal carcinoma. PLoS One. 2011; 6(12):e28842.

Campbell DJ, Koch MA. **Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells.** Nat Rev Immunol. 2011; 11(2):119-30

Carrero R, Cerrada I, Lledó E, Dopazo J, García-García F, Rubio MP, Trigueros C, Dorronsoro A, Ruiz-Sauri A, Montero JA, Sepúlveda P. **IL1 β induces mesenchymal stem cells migration and leucocyte chemotaxis through NF- κ B.** Stem Cell Rev. 2012; (3):905-16.

Casola A , Henderson A , Liu T, Garofalo GP, and Brasier AR. **Regulation of RANTES promoter activation in alveolar epithelial cells after cytokine stimulation.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002; 283: L1280–L1290,

Chandrasekar B, Deobagkar-Lele M, Victor ES, and Nandi D. **Regulation of Chemokines, CCL3 and CCL4, by Interferon γ and Nitric Oxide Synthase 2 in Mouse Macrophages and During Salmonella enterica Serovar Typhimurium Infection.** J Infect Dis. 2013; 207(10):1556-68.

Chang H. Kim. **Migration and Function of Th17 Cells.** Inflamm Allergy Drug Targets. 2009; 8(3):221-8.

Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, Alt FW. **RAG-2 deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement.** Cell. 1992; 68: 855-867

Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, Rudensky AY. **CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner.** Science. 2009; 326:986-991

Chen C, Schilling K, Hiipakka RA, Huang IY, Liao S. **Prostate alfa protein. Isolation and characterisation of the polipeptide components and cholesterol binding.** J Biol. Chem. 1982; 257: 116-121

Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, Blumenschein W, Churakovsa T, Low J, Presta L, Hunter CA, Kastelein RA, Cua DJ. **Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis.** J Clin Invest. 2006; 116(5):1317-26.

Christen U, McGavern DB, Luster AD, von Herrath MG, Oldstone MB. **Among CXCR3 chemokines, IFN-gamma-inducible protein of 10 kDa (CXC chemokine ligand (CXCL) 10) but not monokine induced by IFN-gamma (CXCL9) imprints a pattern**

for the subsequent development of autoimmune disease. J Immunol. 2003; 171(12):6838-45.

Cohen JM, Fagin AP, Hariton E, Niska JR, Pierce MW, Kuriyama A, Whelan JS, Jackson JL, Dimitrakoff JD. **Therapeutic intervention for chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS): a systematic review and meta-analysis.** PLoS One. 2012; 7(8):e41941.

Coppieters KT, Amirian N, Pagni PP, Jones CB, Wiberg A, Lasch S, Hintermann E, Christen U, von Herrath MG. **Functional redundancy of CXCR3/CXCL10 signaling in the recruitment of diabetogenic CTL to pancreatic islets in a virally induced autoimmune diabetes model.** Diabetes. 2013 Feb 22. Epub ahead of print

Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. **Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?.** Immunity. 2009; 30, 626–635

D'Alise AM, Auyeung V, Feuerer M, Nishio J, Fontenot J, Benoist C, Mathis D. **The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(50):19857-62.

Davis MM, Bjorkman PJ. **T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.** Nature. 1988, 334-395-402

Debray-Sachs, M., C. Carnaud, C. Boitard, H. Cohen, I. Gresser, P. Bedossa, and J. F. Bach. **Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN. J.** Autoimmun. 1991; 4(2):237-48.

Dejaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M. **Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases.** Immunology. 2006; 117(3):289-300.

Demengeot J, Zelenay S, Moraes-Fontes MF, Caramalho I, Coutinho A. **Regulatory T cells in microbial infection.** Springer Semin Immunopathol, 2006; 28 (1) 41–50

Desireddi, N. V., P. L. Campbell, J. A. Stern, R. Sobkoviak, S. Chuai, S. Shahrara, P. Thumbikat, R. M. Pope, J. R. Landis, A. E. Koch, A. J. Schaeffer. **Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1alpha as possible biomarkers for the chronic pelvic pain syndrome.** J Urol. 2008; 179: 1857-62.

Domanska UM, Timmer-Bosscha H, Nagengast WB, Oude Munnink TH, Kruijzinga RC, Ananias HJ, Kliphuis NM, Huls G, De Vries EG, de Jong IJ, Walenkamp AM. **CXCR4 inhibition with AMD3100 sensitizes prostate cancer to docetaxel chemotherapy.** Neoplasia. 2012; 14(8):709-18.

- Domingue GJ Sr, Hellstrom WJ. **Prostatitis**. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(4):604-13.
- Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. **Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system**. Immunol Rev. 2009; 229(1):152-72.
- Emamaullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, Shapiro AM. **Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice**. Diabetes. 2009; 58(6):1302-11.
- Erhardt A, Wegscheid C, Claass B, Carambia A, Herkel J, Mittrücker HW, Panzer U, Tiegs G. **CXCR3 deficiency exacerbates liver disease and abrogates tolerance in a mouse model of immune-mediated hepatitis**. J Immunol. 2011; 186(9):5284-93.
- Ezekowitz RAB, Hoffmann JA. **Innate immunity**. Curr Opin Immunol. 1996; 8(1):1-2.
- Fahham D, Weiss ID, Abraham M, Beider K, Hanna W, Shlomai Z, Eizenberg O, Zamir G, Izhar U, Shapira OM, Peled A, Wald O. **In vitro and in vivo therapeutic efficacy of CXCR4 antagonist BKT140 against human non-small cell lung cancer**. J Thorac Cardiovasc Surg. 2012; 144(5):1167-1175
- Fannig LJ, Connor AM, Wu GE. **Development of the immunoglobulin repertoire**. Clin. Immunol Immunopathol. 1996; 79:1-14.
- Fearon DT, Locksley RM. **The instructive role of innate immunity in the acquired immune response**. Science. 1996; 272(5258):50-3. Review.
- Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG. **Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)**. J Immunol. 1996; 156(1):5-7
- Feuerer M, Jiang W, Holler PD, Satpathy A, Campbell C, Bogue M, Mathis D, Benoist C. **Enhanced thymic selection of FoxP3-regulatory T cells in the NODmouse model of autoimmune diabetes**. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104:18181–18186.
- Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. **Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation**. J Exp Med. 2000; 192(7):1027-34.
- Gao GF, Tormo J, Gerth UC, Wyer JR, McMichael AJ, Stuart DI, Bell JI, Jones EY, Jakobsen BK. **Crystal structure of the complex between human CD8 α (alpha) and HLA-A2**. Nature. 1997; 387(6633):630-4.

Gao P, Zhou XY, Yashiro-Ohtani Y, Yang YF, Sugimoto N, Ono S, et al. **The unique target specificity of a nonpeptide chemokine receptor antagonist: selective blockade of two Th1 chemokine receptors CCR5 and CXCR3.** *J Leukoc Biol.* 2003; 73(2):273–280.

Garg AD, Martin S, Golab J, Agostinis P. **Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation.** *Cell Death Differ.* 2013 May 17. Epub ahead of print

Goldberg-Bittman L, Neumark E, Sagi-Assif O, Azenshtein E, Meshel T, Witz IP, Ben-Baruch A: **The expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand, CXCL10, in human breast adenocarcinoma cell lines.** *Immunol Lett.* 2004; 92:171-8.

Goodnow CC. **Multistep pathogenesis of autoimmune disease.** *Cell.* 2007; 130(1):25-35.

Grinberg-Bleyer Y, Saadoun D, Baeyens A, Billiard F, Goldstein JD, Grégoire S, Martin GH, Elhage R, Derian N, Carpentier W, Marodon G, Klatzmann D, Piaggio E, Salomon BL. **Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs.** *J Clin Invest.* 2010; 120(12):4558-68.

Groom JR and Luster AD. **CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions.** *Immunol Cell Biol.* 2011(a); 89, 207–215

Groom JR and Luster AD. **CXCR3 in T cell function.** *Exp Cell Res.* 2011(b); 10; 317(5):620-31.

Habermacher GM, Chason JT and Schaeffer AJ: **Prostatitis/chronic pelvic pain syndrome.** *Annu Rev Med.* 2006; 57: 195.

Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. **Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage.** *Curr Opin Immunol.* 2006; 18(3):349-56.

Harvey, H.A., Post, D.M., Apicella, M.A. **Immortalization of human urethral epithelial cells: a model for the study of the pathogenesis of and the inflammatory cytokine response to Neisseria gonorrhoeae infection.** *Infect. Immun.* 2002; 70, 5808–5815.

Hasegawa H, Inoue A, Kohno M, Lei J, Miyazaki T, Yoshie O, Nose M, Yasukawa M. **Therapeutic effect of CXCR3-expressing regulatory T cells on liver, lung and intestinal damages in a murine acute GVHD model.** *Gene Ther.* 2008; 15(3):171-82.

Hedegaard CJ, Krakauer M, Bendtzen K, Lund H, Sellebjerg F, Nielsen CH. **T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis.** *Immunology.* 2008; 125:161–169.

Henriques A, Gomes V, Duarte C, Pedreiro S, Carvalheiro T, Areias M, Caseiro A, Gabriel AJ, Laranjeira P, Pais ML, da Silva JA, Paiva A. **Distribution and functional plasticity of**

peripheral blood Th(c)17 and Th(c)1 in rheumatoid arthritis. Rheumatol Int. 2013 Feb 15. Epub ahead of print

Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, Yamaguchi T, Nomura T, Ito H, Nakamura T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. **Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model.** J Exp Med. 2007; 204(12):2803-12.

Hori S, Sakaguchi S. **Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells.** Microbes Infect. 2004; 6:745-751.

Hori S. **The Foxp3 interactome: a network perspective of T(reg) cells.** Nat Immunol. 2012; 13(10): 943-5.

Horie I, Abiru N, Sakamoto H, Iwakura Y, Nagayama Y. **Induction of autoimmune thyroiditis by depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells in thyroiditis-resistant IL-17, but not interferon-gamma receptor, knockout nonobese diabetic-H2h4 mice.** Endocrinology. 2011; 152(11):4448-54.

Hua VN y Schaeffer AJ. **Acute and chronic prostatitis.** Med. Clin. N. Am. 2004; 88:483-494.

Huber M, Heink S, Pagenstecher A, Reinhard K, Ritter J, Visekruna A, Guralnik A, Bollig N, Jeltsch K, Heinemann C, Wittmann E, Buch T, Prazeres da Costa O, Brüstle A, Brenner D, Mak TW, Mittrücker HW, Tackenberg B, Kamradt T, Lohoff M. **IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis.** J Clin Invest. 2013; 123(1):247-60.

Iwamoto S, Kido M, Aoki N, Nishiura H, Maruoka R, Ikeda A, Okazaki T, Chiba T, Watanabe N. **TNF- α is essential in the induction of fatal autoimmune hepatitis in mice through upregulation of hepatic CCL20 expression.** Clin Immunol. 2013; 146(1):15-25.

Iwasaki M, Mukai T, Gao P, Park WR, Nakajima C, Tomura M, Fujiwara H, Hamaoka T. **A critical role for IL-12 in CCR5 induction on T cell receptor-triggered mouse CD4(+) and CD8(+) T cells.** Eur J Immunol. 2001(b); 31(8):2411-20.

Iwasaki M, Mukai T, Nakajima C, Yang YF, Gao P, Yamaguchi N, Tomura M, Fujiwara H, Hamaoka T. **A mandatory role for STAT4 in IL-12 induction of mouse T cell CCR5.** J Immunol. 2001(a); 167(12):6877-83.

Jones SA, Sutton CE, Cua D, Mills KH. **Therapeutic potential of targeting IL-17.** Nat Immunol. 2012; 13(11):1022-5.

Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. **Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function.** *Annu Rev Immunol.* 2012; 30:531-64.

Joseph J, Bittner S, Kaiser FM, Wiendl H, Kissler S. **IL-17 silencing does not protect nonobese diabetic mice from autoimmune diabetes.** *J Immunol.* 2012; 188(1):216-21.

Jude C, Dejica D, Samasca G, Balacescu L, Balacescu O. **Soluble CD163 serum levels are elevated and correlated with IL-12 and CXCL10 in patients with long-standing rheumatoid arthritis.** *Rheumatol Int.* 2013; 33(4):1031-7.

Kakuta Y, Okumi M, Miyagawa S, Tsutahara K, Abe T, Yazawa K, Matsunami K, Otsuka H, Takahara S, Nonomura N. **Blocking of CCR5 and CXCR3 suppresses the infiltration of macrophages in acute renal allograft rejection.** *Transplantation.* 2012; 93(1):24-31

Kao CY, Huang F, Chen Y, Thai P, Wachi S, Kim C, Tam L, Wu R. **Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-kappaB-dependent signaling pathway.** *J Immunol.* 2005; 175(10):6676-85.

Karash AR, Gilchrist A. **Therapeutic potential of CCR1 antagonists for multiple myeloma.** *Future Med Chem.* 2011; (15):1889-908.

Kawada K, Hosogi H, Sonoshita M, Sakashita H, Manabe T, Shimahara Y, Sakai Y, Takabayashi A, Oshima M, Taketo MM: **Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes.** *Oncogene.* 2007; 26:4679-88.

Kawada K, Sonoshita M, Sakashita H, Takabayashi A, Yamaoka Y, Manabe T, Inaba K, Minato N, Oshima M, Taketo MM: **Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes.** *Cancer Res.* 2004; 64:4010-7.

Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, et al. **Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation.** *Nat Med.* 2007; 13:1173–1175.

Keetch DW, Humphrey P, Ratliff TL. **Development of a mouse model for nonbacterial prostatitis.** *J Urol.* 1994; 152:247–50.

Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. **Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice.** *Nat. Immunol.* 2007; 8:191–97

Kishi J, Nishioka Y, Kuwahara T, Kakiuchi S, Azuma M, Aono Y, Makino H, Kinoshita K, Kishi M, Batmunkh R, Uehara H, Izumi K, Sone S. **Blockade of Th1 chemokine**

receptors ameliorates pulmonary granulomatosis in mice. Eur Respir J. 2011; 38(2):415-24.

Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. **The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation.** Nat Immunol. 2009; 10(6):595-602

Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. **IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis.** J Immunol. 2006; 177(1):566-73.

Koumantakis, E., Matalliotakis, I., Kyriakou, D., Fragouli, Y., Relakis, K. **Increased levels of interleukin-8 in human seminal plasma.** Andrologia. 1998; 30, 339–343.

Kouroumalis A, Nibbs RJ, Aptel H, Wright KL, Kolios G, Ward SG: **The chemokines CXCL9, CXCL10, and CXCL11 differentially stimulate G alpha i-independent signaling and actin responses in human intestinal myofibroblasts.** J Immunol. 2005; 175:5403-11

Krieger JN, Nyberg L Jr, Nickel JC. **NIH consensus definition and classification of prostatitis.** JAMA. 1999; 282:236-237.

Lacotte S, Brun S, Muller S, Dumortier H. **CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases.** Ann N Y Acad Sci. 2009; 1173:310-7.

Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, Hamann A, Wagner H, Huehn J, Sparwasser T: **Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease.** J Exp Med. 2007; 204:57-63

Lee EY, Lee ZH, Song YW. **CXCL10 and autoimmune diseases.** Autoimmun Rev. 2009; 8(5):379-83.

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. **CD28/B7 system of T cell costimulation.** Annu Rev Immunol. 1996; 14:233-58. Review.

Lewis M, Tarlton JF, Cose S. **Memory versus naive T-cell migration.** Immunol Cell Biol. 2008; 86(3):226-31.

Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, Chatila TA. **Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3.** Nat Immunol. 2007; 8(4):359-68.

Liston A, Kohler RE, Townley S, Haylock-Jacobs S, Comerford I, Caon AC, Webster J, Harrison JM, Swann J, Clark-Lewis I, Korner H, McColl SR. **Inhibition of CCR6 Function Reduces the Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis via Effects on the Priming Phase of the Immune Response.** J Immunol. 2009; 182:3121–3130.

Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, Stiles JK. **CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications.** Cytokine Growth Factor Rev. 2011 Jun; 22(3):121-30

Liu, L., Li, Q., Han, P., Li, X., Zeng, H., Zhu, Y., Wei, Q. **Evaluation of interleukin-8 in expressed prostatic secretion as a reliable biomarker of inflammation in benign prostatic hyperplasia.** Urology. 2009; 74, 340–344.

Lo BK, Yu M, Zloty D, Cowan B, Shapiro J, McElwee KJ. **CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas.** Am J Pathol. 2010; 176:2435-46.

Lochner M, Peduto L, Cherrier M, Sawa S, Langa F, Varona R, Riethmacher D, Si-Tahar M, Di Santo JP, Eberl G. **In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+RORgammat+ T cells.** J Exp Med. 2008; 205(6):1381-93.

Long SA, Buckner JH. **CD4+FOXP3+ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game.** J Immunol. 2011; 187(5):2061-6.

Lord GM, Rao RM, Choe H, Sullivan BM, Lichtman AH, Luscinskas FW et al. **T-bet is required for optimal proinflammatory CD4+ T-cell trafficking.** Blood. 2005; 106: 3432–3439.

Lotti F, Maggi M. **Interleukin 8 and the male genital tract.** J Reprod Immunol. 2013; S0165-0378(13)00046-6.

Lotti, F., Corona, G., Mancini, M., Filimberti, E., Degli Innocenti, S., Colpi, G.M., Baldi, E., Noci, I., Forti, G., Adorini, L., Maggi, M. **Ultra-sonographic and clinical correlates of seminal plasma interleukin-8 levels in patients attending an andrology clinic for infertility.** Int. J. Androl. 2011(a) 34, 600–613.

Lu P, Nakamoto Y, Nemoto-Sasaki Y, Fujii C, Wang H, Hashii M, Ohmoto Y, Kaneko S, Kobayashi K, Mukaida N. **Potential interaction between CCR1 and its ligand, CCL3, induced by endogenously produced interleukin-1 in human hepatomas.** Am J Pathol. 2003; 162(4):1249-58.

Ma X, Norsworthy K, Kundu N, Rodgers WH, Gimotty PA, Goloubeva O, Lipsky M, Li Y, Holt D, Fulton A: **CXCR3 expression is associated with poor survival in breast cancer and promotes metastasis in a murine model.** Mol Cancer Ther. 2009; 8:490-8.

Maccioni M, Rivero VE, Riera CM. **Prostatein (or rat prostatic steroid binding protein) is a major autoantigen in experimental autoimmune prostatitis.** Clin Exp Immunol. 1998; 112(2):159-65.

Macoska JA. **Chemokines and BPH/LUTS.** Differentiation. 2011; 82: 253-260

Majumder S, Zhou LZ, Chaturvedi P, Babcock G, Aras S, Ransohoff RM. **p48/STAT-1alpha-containing complexes play a predominant role in induction of IFN-gamma-inducible protein, 10 kDa (IP-10) by IFN-gamma alone or in synergy with TNF-alpha.** J Immunol. 1998; 161(9):4736-44.

Maloy KJ, Powrie F. **Regulatory T cells in the control of immune pathology.** Nat Immunol, 2001; 2, 816–822

Martin-Orozco N, Chung Y, Chang SH, Wang YH, Dong C. **Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells.** Eur J Immunol. 2009; 39(1):216-24

McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. **TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology.** Nat Immunol. 2007; 8(12):1390-7.

Mellanby RJ, Thomas D, Phillips JM, Cooke A. **Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells.** Immunology. 2007; 121(1):15-28.

Monteiro JP, Farache J, Mercadante AC, Mignaco JA, Bonamino M, Bonomo A. **Pathogenic effector T cell enrichment overcomes regulatory T cell control and generates autoimmune gastritis.** J Immunol. 2008; 181(9):5895-903.

Morimoto J, Yoneyama H, Shimada A, Shigihara T, Yamada S, Oikawa Y, Matsushima K, Saruta T, Narumi S. **CXC chemokine ligand 10 neutralization suppresses the occurrence of diabetes in nonobese diabetic mice through enhanced beta cell proliferation without affecting insulinitis.** J Immunol. 2004; 173(11):7017-24.

Mortier A, Van Damme J, Proost P. **Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability.** Immunol Lett. 2012; 145(1-2):2-9.

Motrich RD, Maccioni M, Molina R, Tissera A, Olmedo J, Riera CM, Rivero VE. **Presence of INF γ secreting lymphocytes specific to prostate in a group of chronic prostatitis patients.** Clin Immunol. 2005 (a); 116(2):149-57.

Motrich RD, Maccioni M, Molina R, Tissera A, Olmedo J, Riera CM, Rivero VE. **Reduced semen quality in chronic prostatitis patients that have cellular autoimmune response to prostate antigens.** Hum Reprod. 2005 (b); 20(9):2567-72.

Motrich RD, Maccioni M, Riera CM, Rivero VE Scandinavian J immunol. **Autoimmune prostatitis: state of the art.** Scand J Immunol. 2007; 66(2-3):217-27.

Motrich RD, Ponce A, Gatti G, Mackern Oberti, JP, Maccioni M, Rivero VE. **Pathogenic consequences in semen quality of an autoimmune response against the prostate gland: from animal models to human disease.** J Immunol. 2006; 15; 177(2):957-67

Motrich RD, van Etten E, Baeke F, Riera CM; Mathieu C, Rivero VE. **A Crucial Role of INF γ in Experimental Autoimmune Prostatitis.** J Urol. 2010; 183(3):1213-20

Nadler RB, Koch AE, Calhoun EA, Campbell PL, Pruden DL, Bennett CL, Yarnold PR, Schaeffer AJ. **IL-1 β and TNF- α in prostatic secretions are indicators in the Evaluation of men with chronic prostatitis.** J Urol. 2000; 164(1):214-8

Nakayamada S, Takahashi H, Kanno Y, O'Shea JJ. **Helper T cell diversity and plasticity.** Curr Opin Immunol. 2012; 24(3):297-302.

Ni J, Zhu YN, Zhong XG, Ding Y, Hou LF, Tong XK, Tang W, Ono S, Yang YF, Zuo JP. **The chemokine receptor antagonist, TAK-779, decreased experimental autoimmune encephalomyelitis by reducing inflammatory cell migration into the central nervous system, without affecting T cell function.** Br J Pharmacol. 2009; 158(8):2046-56.

Nickel JC, Shoskes DA, Wagenlehner FM. **Management of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS): the studies, the evidence, and the impact.** World J Urol. 2013 Apr 9. Epub ahead of print

Nikolich-Zugich J, Slifka MK, Messaoudi I. **The many important facets of T-cell repertoire diversity.** Nat Rev Immunol. 2004; 4(2):123-32.

Nossal GJ. **Negative selection of lymphocytes.** Cell. 1994; 76(2):229-39.

Ohmori Y, Schreiber RD, Hamilton TA. **Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB.** J Biol Chem. 1997; 272(23):14899-907.

Okamoto M, Fuchigami M, Suzuki T, Watanabe N. **A novel C-C chemokine receptor 2 antagonist prevents progression of albuminuria and atherosclerosis in mouse models.** Biol Pharm Bull. 2012; 35(11):2069-74.

Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert EA, Hall JA, Chou D, L. Dos Santos, O'Brien S, Blank R, Lamb E, Natarajan S. **Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection.** Immunity. 2009; 31(5):772-86.

Oo YH, Adams DH. **The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver.** J Autoimmun. 2010; (1):45-54.

Oo YH, Banz V, Kavanagh D, Liaskou E, Withers DR, Humphreys E, Reynolds GM, Lee-Turner L, Kalia N, Hubscher SG, Klenerman P, Eksteen B, Adams DH. **CXCR3-dependent recruitment and CCR6-mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver.** J Hepatol. 2012; 57(5):1044-51.

O'Shea JJ, Paul WE. **Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells.** Science. 2010; 327(5969):1098-102.

Penna G, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Mariani R, Giarratana N, De Carli E, Fibbi B, Adorini L. **Spontaneous and prostatic steroid binding protein peptide-induced autoimmune prostatitis in the nonobese diabetic mouse.** J Immunol. 2007(a); 179(3):1559-67.

Penna, G., Mondaini, N., Amuchastegui, S., Degli Innocenti, S., Carini, M., Giubilei, G., Fibbi, B., Colli, E., Maggi, M., Adorini, L. **Seminalplasma cytokines and chemokines in prostate inflammation: inter-leukin 8 as a predictive biomarker in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and benign prostatic hyperplasia.** Eur. Urol. 2007(b); 51,524–533.

Polychronakos C, Li Q. **Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects.** Nat Rev Genet. 2011; 12:781–92.

Pötzl J, Botteron C, Tausch E, Pedré X, Mueller AM, Männel DN, Lechner A. **Tracing functional antigen-specific CCR6 Th17 cells after vaccination.** PLoS One. 2008; 3(8):e2951.

Pradelli E, Karimjee-Soilihi B, Michiels JF, Ricci JE, Millet MA, Vandebos F, Sullivan TJ, Collins TL, Johnson MG, Medina JC, et al: **Antagonism of chemokine receptor CXCR3 inhibits osteosarcoma metastasis to lungs.** Int J Cancer. 2009; 125:2586-94.

Quick, M. L., S. Mukherjee, C. N. Rudick, J. D. Done, A. J. Schaeffer, P. Thumbikat. **CCL2 and CCL3 are essential mediators of pelvic pain in experimental autoimmune prostatitis.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012; 303(6):R580-9.

Rabinovitch, A., W. L. Suarez-Pinzon, O. Sorensen, R. C. Bleackley, and R. F. Power. **IFN- γ gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice.** *J. Immunol.* 1995; 154:4874.

Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B, Sallusto F. **C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE.** *Nat Immunol.* 2009; 10:514–523

Reibman J, Hsu Y, Chen LC, Bleck B, Gordon T. **Airway epithelial cells release MIP-3 α /CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003; (6):648-54.

Rhode A, Pauza ME, Barral AM, Rodrigo E, Oldstone MB, von Herrath MG, Christen U. **Islet-specific expression of CXCL10 causes spontaneous islet infiltration and accelerates diabetes development.** *J Immunol.* 2005; 175(6):3516-24.

Rivero VE, Cailleau C, Depiante-Depaoli M, Riera CM, Carnaud C. **Non-obese diabetic (NOD) mice are genetically susceptible to experimental autoimmune prostatitis (EAP).** *J Autoimmun.* 1998; 11(6):603-10.

Rivero VE, Motrich RD, Maccioni M, Riera CM. **Autoimmune etiology in chronic prostatitis syndrome: an advance in the understanding of this pathology.** *Crit Rev Immunol.* 2007; 27(1):33-46.

Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J. **Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells.** *J Exp Med.* 2004; 200: 725–735.

Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, Hood LE, Aderem A. **The evolution of vertebrate Toll-like receptors.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102 (27): 9577-82.

Roep BO, Kleijwegt FS, van Halteren AG, Bonato V, Boggi U, Vendrame F, Marchetti P, Dotta F. **Islet inflammation and CXCL10 in recent-onset type 1 diabetes.** *Clin Exp Immunol.* 2010; 159 (3):338-43.

Romagnani P, Annunziato F, Lasagni L, Lazzeri E, Beltrame C, Francalanci M, Uguccioni M, Galli G, Cosmi L, Maurenzig L, Baggiolini M, Maggi E, Romagnani S, Serio M. **Cell**

cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest.* 2001; 107:53-63

Romagnani P, Crescioli C. **CXCL10: a candidate biomarker in transplantation.** *Clin Chim Acta.* 2012; 413(17-18):1364-73.

Rotondi M, Chiovato L, Romagnani S, Serio M, Romagnani P. **Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases.** *Endocr Rev.* 2007; 28 (5):492-520.

Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, Treuting P, Siewe L, Roers A, Henderson WR Jr, Muller W, Rudensky AY. **Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces.** *Immunity.* 2008; 28(4):546-58.

Rudick CN, Schaeffer AJ, Thumbikat P. **Experimental autoimmune prostatitis induces chronic pelvic pain.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 294(4):R1268-75.

Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. **How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors.** *Annu Rev Immunol.* 2006; 24:419-66.

Sahin H, Berres ML, Wasmuth HE. **Therapeutic potential of chemokine receptor antagonists for liver disease.** *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2011; 4(4):503-13.

Sakaguchi S. **Regulatory T cells: history and perspective.** *Methods Mol Biol.* 2011; 707:3-17.

Sakaguchi S: **Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses.** *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:531-562.

Sallusto F, Impellizzieri D, Basso C, Laroni A, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B. **T-cell trafficking in the central nervous system.** *Immunol Rev.* 2012; 248(1):216-27

Sallusto F, Lanzavecchia A. **Heterogeneity of CD4⁺ memory T cells: functional modules for tailored immunity.** *Eur J Immunol.* 2009; 39(8):2076-82.

Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. **Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes.** *J Exp Med.* 1998; 187(6):875-83.

Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. **Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells.** *Science.* 1997; Sep 26; 277(5334):2005-7.

Sarkar SA, Lee CE, Victorino F, Nguyen TT, Walters JA, Burrack A, Eberlein J, Hildemann SK, Homann D. **Expression and regulation of chemokines in murine and human type 1 diabetes.** *Diabetes*. 2012; 61 (2):436-46.

Savinov AY, Wong FS, Chervonsky AV. **IFN-gamma affects homing of diabetogenic T cells.** *J Immunol*. 2001; 167(11):6637-43.

Schaeffer A.J: Clinical practice. **Chronic prostatitis and the chronic pelvic pain syndrome.** *N Engl J Med*. 2006; 355: 1690.

Shigihara T, Shimada A, Oikawa Y, Yoneyama H, Kanazawa Y, Okubo Y, Matsushima K, Yamato E, Miyazaki J, Kasuga A, Saruta T, Narumi S. **CXCL10 DNA vaccination prevents spontaneous diabetes through enhanced beta cell proliferation in NOD mice.** *J Immunol*. 2005; 175(12):8401-8.

Sigmundsdottir H, Butcher EC. **Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking.** *Nat Immunol*. 2008; 9(9):981-7.

Stephens LA, Gray D, Anderton SM. **CD4+CD25+ regulatory T cells limit the risk of autoimmune disease arising from T cell receptor crossreactivity.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(48):17418-23.

Suscovitch TJ, Perdue NR, Campbell DJ. **Type-1 immunity drives early lethality in scurfy mice.** *Eur J Immunol*. 2012; 42(9):2305-10.

Suzaki Y, Hamada K, Nomi T, Ito T, Sho M, Kai Y, Nakajima Y, Kimura H. **A small-molecule compound targeting CCR5 and CXCR3 prevents airway hyperresponsiveness and inflammation.** *Eur Respir J*. 2008; 31 (4): 783

Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, Piccirillo CA, Salomon BL, Bluestone JA. **Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmunedestruction.** *Immunity*. 2008; 28(5):687-97.

Thomas DC, Mellanby RJ, Cooke A. **Functional waning of naturally occurring CD4₊ regulatory T-cells contributes to the onset of autoimmune diabetes:** *Diabetes*. 2007; 57:113–123.

Thomas DC, Mellanby RJ, Phillips JM, Cooke A. **An early age-related increase in the frequency of CD4⁺ Foxp3⁺ cells in BDC2.5NOD mice.** *Immunology*. 2007; 121(4):565-76.

Uno S, Imagawa A, Saisho K, Okita K, Iwahashi H, Hanafusa T, Shimomura I. **Expression of chemokines, CXC chemokine ligand 10 (CXCL10) and CXCR3 in the inflamed islets of patients with recent-onset autoimmune type 1 diabetes.** *Endocr J.* 2010; 57(11):991-6.

Uyttenhove C, Sommereyns C, Théate I, Michiels T, Van Snick J. **Anti-IL-17A autovaccination prevents clinical and histological manifestations of experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1110:330-6.

Uyttenhove C, Van Snick J. **Development of an anti-IL-17A auto-vaccine that prevents experimental auto-immune encephalomyelitis.** *Eur J Immunol.* 2006; 36(11):2868-74.

van Halteren AG, Kardol MJ, Mulder A, Roep BO. **Homing of human autoreactive T cells into pancreatic tissue of NOD-scid mice.** *Diabetologia.* 2005; 48(1):75-82.

van Hamburg JP, Asmawidjaja PS, Davelaar N, Mus AM, Colin EM, Hazes JM, Dolhain RJ, Lubberts E. **Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production.** *Arthritis Rheum.* 2011; 63(1):73-83.

Villares R, Cadenas V, Lozano M, Almonacid L, Zaballos A, Martínez-A C, Varona R. **CCR6 regulates EAE pathogenesis by controlling regulatory CD4+ T-cell recruitment to target tissues.** *Eur J Immunol.* 2009; 39(6):1671-81.

Waldmann H, Adams E, Fairchild P, Cobbold S. **Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue.** *Immunol Rev,* 212 (2006), pp. 301–313

Waldmann T.A. **The arrangement of immunoglobulin and T- cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders.** *Adv Immunol.* 1987; 40: 247-321.

Walker JA, Barlow JL, McKenzie AN. **Innate lymphoid cells--how did we miss them?.** *Nat Rev Immunol.* 2013; (2):75-87.

Walser TC, Rifat S, Ma X, Kundu N, Ward C, Goloubeva O, Johnson MG, Medina JC, Collins TL, Fulton AM: **Antagonism of CXCR3 inhibits lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer.** *Cancer Res.* 2006; 66:7701-7.

Wan X, Guloglu FB, VanMorlan AM, Rowland LM, Jain R, Haymaker CL, Cascio JA, Dhakal M, Hoeman CM, Tartar DM, Zaghouani H. **Mechanisms underlying antigen-specific tolerance of stable and convertible Th17 cells during suppression of autoimmune diabetes.** *Diabetes.* 2012; 61(8):2054-65.

Wan YY, Flavell RA. **Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression.** *Nature*. 2007; 445:766–770

Wang C, Kang SG, Lee J, Sun Z, Kim CH. **The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut.** *Mucosal Immunol*. 2009; 2(2):173–83

Ward SG, Marelli-Berg FM. **Mechanisms of chemokine and antigen-dependent T-lymphocyte navigation.** *Biochem. J*. 2009; 418:13–27.

Wei G, Wei L, Zhu J, Zang C, Hu-Li J, Yao Z, Cui K, Kanno Y, Roh TY, Watford WT et al. **Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells.** *Immunity*. 2009; 30(1):155–67

Weiss JM, Bilate AM, Gobert M, Ding Y, Curotto de Lafaille MA, Parkhurst CN, Xiong H, Dolpady J, Frey AB, Ruocco MG, Yang Y, Floess S, Huehn J, Oh S, Li MO, Niec RE, Rudensky AY, Dustin ML, Littman DR, Lafaille JJ. **Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells.** *J Exp Med*. 2012; 209(10):1723–42

Wilke CM, Bishop K, Fox D, Zou W. **Deciphering the role of Th17 cells in human disease.** *Trends Immunol*. 2011; 32(12):603–11.

Williams LM, Rudensky AY. **Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3.** *Nat Immunol*. 2007; 8 (3) 277–284

Wing JB, Sakaguchi S. **Multiple treg suppressive modules and their adaptability.** *Front Immunol*. 2012; 3:178.

Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. **CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function.** *Science*. 2008; 322(5899):271–5.

Wing K, Sakaguchi S. **Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity.** *Nat Immunol*. 2010; 11(1):7–13.

Wu AJ, Hua H, Munson SH, McDevitt HO. **Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(19):12287–92.

Wu H, Kwong PD, Hendrickson WA. **Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4.** *Nature.* 1997; 387(6632):527-30.

Wu Q, Dhir R, Wells A. **Altered CXCR3 isoform expression regulates prostate cancer cell migration and invasion.** *Mol Cancer.* 2012; 11:3.

Xu H, Firdawes S, Yamamoto A, Zhao Y, Ihara Y, Uehara S, Matsunami K, Otsuka H, Fukuzawa M, Miyagawa S. **Effects of blocking the chemokine receptors, CCR5 and CXCR3, With TAK-779 in a rat small intestinal transplantation model.** *Transplantation.* 2008; 86(12):1810-7.

Yamada Y, Okubo Y, Shimada A, Oikawa Y, Yamada S, Narumi S, Matsushima K, Itoh H. **Acceleration of diabetes development in CXC chemokine receptor 3 (CXCR3)-deficient NOD mice.** *Diabetologia.* 2012; 55(8):2238-45.

Yamamoto J, Adachi Y, Onoue Y, Adachi YS, Okabe Y, Itazawa T et al. **Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effector populations within circulating CD4+ T cells.** *J Leukoc Biol.* 2000; 68: 568–574

Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, et al. **CCR6 Regulates the Migration of Inflammatory and Regulatory T Cells.** *J Immunol.* 2008; 181:8391–8401.

Yen HR, Harris TJ, Wada S, Grosso JF, Getnet D, Goldberg MV, Liang KL, Bruno TC, Pyle KJ, Chan SL, Anders RA, Trimble CL, Adler AJ, Lin TY, Pardoll DM, Huang CT, Drake CG. **Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity.** *J Immunol.* 2009; 183(11): 7161-8.

Yoshida S, Arakawa F, Higuchi F, Ishibashi Y, Goto M, Sugita Y, Nomura Y, Niino D, Shimizu K, Aoki R, Hashikawa K, Kimura Y, Yasuda K, Tashiro K, Kuhara S, Nagata K, Ohshima K. **Gene expression analysis of rheumatoid arthritis synovial lining regions by cDNA microarray combined with laser microdissection: up-regulation of inflammation-associated STAT1, IRF1, CXCL9, CXCL10, and CCL5.** *Scand J Rheumatol.* 2011; 41(3):170-9.

Zelenay S, Lopes-Carvalho T, Caramalho I, Moraes-Fontes MF, Rebelo M, Demengeot J. **Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(11):4091-6.

Zhang Y, Arnatt CK, Zhang F, Wang J, Haney KM, Fang X. **The potential role of anibamine, a natural product CCR5 antagonist, and its analogues as leads toward development of anti-ovarian cancer agents.** *Bioorg Med Chem Lett.* 2012; 22(15):5093-7.

Zheng Y, Chaudhry A, Kas A, deRoos P, Kim JM, Chu TT, Corcoran L, Treuting P, Klein U, Rudensky AY: **Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses.** Nature. 2009; 458:351-356.

Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. **Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells.** Nature. 2007; 445(7130):936-40.

Zhou X, Bailey-Bucktrout S, Jeker LT, Bluestone JA. **Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells.** Curr Opin Immunol. 2009; 21:281–5.

Zhu J, Paul WE. **Heterogeneity and plasticity of T helper cells.** Cell Res. 2010 (a); 20(1):4-12.

Zhu J, Yamane H, Paul WE. **Differentiation of effector CD4 T cell populations.** Annu Rev Immunol. 2010(b); 28:445-89.

Zhu J, Paul WE. **Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors.** Immunol Rev. 2010 (c); 238(1):247-62.

Zhuo W, Jia L, Song N, Lu XA, Ding Y, Wang X, Song X, Fu Y, Luo Y. **The CXCL12-CXCR4 chemokine pathway: a novel axis regulates lymphangiogenesis.** Clin Cancer Res. 2012; 18(19):5387-98.

Ziegler SF. **FOXP3: of mice and men.** Annu Rev Immunol. 2006; 24:209-26.

Producción científica

Producción científica derivada de la presente tesis

Publicaciones científicas en revistas con arbitraje

1. “Expression of CXCR3 on specific T cells is essential for homing to the prostate gland in an experimental model of Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome.”
Breser, ML; Motrich, RD; Sanchez, LR; Mackern-Oberti, JP; Rivero, VE.
J. Immunol. 2013; 190(7):3121-33.
2. “Effects of regulatory T cells in Experimental Autoimmune Prostatitis model.”
Breser, ML; Lino, A; Martins, A; Mohr, E; Paiva,R; Motrich, R; Demengeot, J;
Rivero, V. *Manuscrito en preparación.*

Premio obtenido

1. Premio “Leonardo Satz” de la Sociedad Argentina de Inmunología al trabajo: **“La expresión de los receptores CXCR3 y CCR5 es importante para que las células T específicas prostáticas adquieran homing a próstata”**. **Breser ML**; Andreani V; Bertotto ME; Maccioni M; Rivero V.E., como tercer mejor trabajo en la LIX Reunión Científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Tucumán, Argentina. **Octubre de 2011.**

Publicaciones a congresos

Nacionales

1. *“Prostatitis autoinmune experimental en dos cepas de ratones con diferente susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad”.*

Breser ML, Mackern-Oberti JP, Motrich RD, Maccioni M, Rivero VE.

LVI Reunión Anual de la SAI -XI Jornada Científica del Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo. La Falda, Argentina. **Octubre 2008.**

2. *“Specific T cells and cytokine production in an Experimental Autoimmune Prostatitis model (EAP)”.*

Breser ML, Mackern-Oberti JP, Motrich RD, Maccioni M, Rivero VE.

LIV Reunión Científica Anual SAIC-LVII Reunión Científica Anual SAI. Mar del Plata, Argentina. **Diciembre 2009.**

3. *“La expresión de los receptores CXCR3 y CCR5 es importante para que las células T específicas prostáticas adquieran homing a próstata”.*

Breser ML; Andreani V; Bertotto ME; Maccioni M; Rivero VE.

LIX Reunión Científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Tucumán, Argentina. **Octubre de 2011.**

4. *“La deficiencia de IL12p70, pero no de IL4, confiere resistencia al desarrollo de prostatitis autoinmune experimental.”*

Motrich, R; **Breser, M**; Sanchez, L; Altamirano, A; Rivero V.

LVII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)-LX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2012.

5. *“Bloqueo de CXCR3 y CCR5 reduce la infiltración de las glándulas pancreática, tiroidea y prostática en ratones scurfy.”*

Breser, M; Martins, A; Lino, A; Paiva, R; Motrich, R; Demengeot, J; Rivero, V.

LVII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)-LX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2012.

6. *“Depleción de células T regulatorias in vivo incrementa la susceptibilidad al desarrollo de prostatitis autoinmune experimental en diferentes cepas de animales.”*

Breser, M; Lino, A; Mohr, E; Motrich, R; Sanchez, L; Demengeot, J; Rivero, V.

LVII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)-LX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2012.

Internacionales

1. *“Specific T cells and cytokine production in an Experimental Autoimmune Prostatitis model (EAP)”*.

Breser ML, Mackern-Oberti JP, Motrich RD, Maccioni M, Rivero VE.

Trabajo presentado en el VII Congreso Latinoamericano de Inmunología. Viña del Mar, Chile. **Noviembre 2009**.

2. *“Rol of INF γ , IL17 and IL10 producing cells in an experimental model of autoimmune prostatitis”*.

Breser ML; Bertotto ME; Mackern-Oberti JP; Sanchez L; Maccioni M; Rivero VE.

1° Congreso Franco-Argentino de Inmunología. XIII Jornada Científica del Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo, 3° Jornadas Argentinas de Inmunodeficiencias Primarias Buenos Aires, Argentina. **Noviembre de 2010**.

3. *“Susceptibility of mice deficient for IL17 receptor to the development of experimental autoimmune prostatitis”.*

Breser ML; Bertotto ME; Maccioni M; Rivero VE.

1° Congreso Franco-Argentino de Inmunología. XIII Jornada Científica del Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo, 3° Jornadas Argentinas de Inmunodeficiencias Primarias Buenos Aires, Argentina. **Noviembre de 2010.**