

TRASTORNOS INMUNOLOGICOS INDUCIDOS POR MERCURIO EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO HUMANO

MERCURY-INDUCED IMMUNOLOGICAL DAMAGE IN MALE REPRODUCTIVE SYSTEM

SALVADOR JOSÉ PENNA VIDEAU

*Universidad de Oriente, Núcleo de Bolívar, Escuela de Ciencias de la Salud, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Grupo de Investigadores en Reproducción Humana, Ciudad Bolívar, Venezuela.
E-mail: pennav@yahoo.com*

RESUMEN

El Grupo de Investigadores en Reproducción Humana de la Universidad de Oriente posee una línea de investigación que evalúa los efectos del mercurio en el sistema reproductor masculino, empleando un modelo animal susceptible al metal. Se han demostrado lesiones inducidas por el metal por necrosis y apoptosis, relacionadas con alteraciones en la síntesis de testosterona. Las lesiones involucran una respuesta autoinmune hacia las células germinales y un incremento de la actividad Th1 al inicio y a los 7 meses de tratamiento. Por cuanto el mercurio es capaz de generar señales de peligro, se ha estudiado la expresión de proteínas de estrés (hsp) en células germinales y del sistema inmunológico, encontrándose elevación de las mismas en los animales tratados. Los resultados obtenidos hasta ahora apoyan la hipótesis de que dosis subtóxicas de mercurio son capaces de provocar daño directo e inducir respuestas de tipo celular y humoral, ocasionado daño del epitelio seminífero, por medio de varios factores, lo que podría prevenir, a largo plazo, la fecundación a largo plazo.

PALABRAS CLAVE: Testículo, inmunopatología, hsp, Th1.

ABSTRACT

The Group of Researchers on Human Reproduction from Universidad de Oriente has a research line that assesses the effects of mercury on the male reproductive system, using an animal model susceptible to the metal. Lesions induced by necrosis and apoptosis related to alterations in testosterone synthesis have been demonstrated. Injuries involve an autoimmune response to germ cells and an increased Th1 activity at baseline and 7 months of treatment. Since mercury is able to generate "danger" signals, the expression of stress proteins (hsp) in germ cells and the immune system have been studied, which are increased in the treated animals. The results obtained until now support the hypothesis that mercury at subtoxic doses is capable of inducing direct damage and humoral and cell-type responses, causing damage to the seminiferous epithelium, through several means, which could prevent the fertilization in the long term.

KEY WORDS: Testis, hsp, immunopathology, Th1.

Fisiología del Sistema Inmunológico

El propósito primordial del sistema inmunológico es diferenciar lo propio de lo extraño, para poder ayudar al organismo a sobrevivir en un medio hostil. En el primer mes de la gestación, se inicia la hematopoyesis, a partir de las células madre del saco vitelino, luego la médula ósea será el sitio principal donde ocurra este proceso. Las células hematopoyéticas se diferencian en granulocitos, monocitos, linfocitos (T, B y *Natural Killer* o NK), macrófagos y eritrocitos. Al segundo mes de gestación, los linfocitos destinados a diferenciarse en células T emigran hacia el timo, mientras que los destinados a ser células B madurarán en la médula ósea. Las células del sistema inmune están ampliamente distribuidas en una red que abarca la sangre, el timo, los ganglios linfáticos, el bazo, la piel y mucosas, estableciéndose una delicada y orquestada relación celular y molecular entre este sistema y el resto de los que componen el organismo (Huston 1997).

La falta de capacidad del sistema inmune para responder contra lo propio se denomina *tolerancia* e implica que los linfocitos no son activados por la interacción con los tejidos del individuo. Cuando esa incapacidad es adquirida durante la ontogenia de las células B o T, se denomina *tolerancia central*, mientras que se denomina *periférica* cuando es patológica. De acuerdo con esto, la *autoinmunidad* es el estado en el que se pierde la tolerancia a lo propio. Ya que no todas las respuestas autoinmunes son dañinas, el balance entre la tolerancia y la inmunidad es la base de la supervivencia (Huston 1997).

La inmunidad puede ser considerada como adaptativa (adquirida) o innata. Cuando el organismo emplea mecanismos de defensa no específicos contra antígenos se refiere a la innata. Esta incluye las barreras físicas como los epitelios, ácidos grasos presentes en la piel, moco y cilios, factores solubles como proteínas o la cascada del complemento, quimioquinas (que favorecen la migración

leucocitaria) y citoquinas (CK) (que modulan la función leucocitaria) y otros tipos de células diferentes a las T y B, como las células NK (Huston 1997).

Los mecanismos de defensa antígeno-específicos corresponden a la inmunidad adaptativa y están referidos a la función de las células T y B. El inicio de este tipo de respuesta requiere del reconocimiento de epítomos antigénicos por parte de estas células, así como de la expansión clonal y diferenciación de estos linfocitos antígeno-específicos en efectores de la respuesta inmune. Como resultado del arreglo al azar de los genes que codifican para el receptor de las células T (TCR) e inmunoglobulinas (Ig), se expresa un repertorio de receptores específicos de antígenos para las células T y B, respectivamente. Un hecho crucial para la inmunidad adaptativa es la capacidad de memoria, lo que permite montar una respuesta rápida ante la exposición al mismo antígeno. Los mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa no son mutuamente excluyentes sino que pueden ser complementarios. La activación por inmunoglobulinas de la vía clásica del complemento y la producción de citoquinas y quimioquinas que atraen y modulan las subpoblaciones de linfocitos T y B, son ejemplos de ello (Huston 1997).

La inmunidad adaptativa se divide en humoral y celular. La primera está mediada por anticuerpos e involucra el procesamiento antigénico por las células B, su posterior proliferación y diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Los anticuerpos o Ig se unen al antígeno favoreciendo su eliminación, sea cubriéndolo (opsonización) de manera que sea fagocitado fácilmente o bien activando una cascada de proteínas (Sistema de complemento) que provocan la lisis celular. La inmunidad celular está mediada por las células T, aunque las NK participan también en este tipo de reacciones provocando la lisis de células infectadas por virus y neoplásicas. Las citoquinas generadas por células T median también la inmunidad celular y facilitan la fagocitosis y lisis de microorganismos (bacterias y protozoarios) más efectivamente (Aickelin y Dasgupta 2005).

Durante la re-exposición ante un antígeno, algunas células del sistema inmune proliferan, siendo seleccionadas de aquellas que no lo hacen. Este proceso se denomina selección clonal. Implica varios mecanismos: las nuevas células son copias de sus progenitoras (Clon) sujetas a mecanismos de mutación rápida (hipermutación), se eliminan de los linfocitos recién diferenciados que expresan receptores autorreactivos y ocurre proliferación

y diferenciación al contacto de células maduras con los antígenos (Aickelin y Dasgupta 2005).

Existen leucocitos especializados en procesar y presentar antígenos, conocidas como células presentadoras de antígenos (CPA), para la respuesta adaptativa, como los monocitos, macrófagos, células de Langerhans, de Kupffer y dendríticas, las cuales expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) I y II, las cuales favorecen la presentación del antígeno mediante el reconocimiento por parte del TCR. Los macrófagos y monocitos interviene en las respuestas inflamatorias y granulomatosas, las de Langerhans y de Kupffer procesan antígenos en piel e hígado, respectivamente. Las células dendríticas se encuentran en el tejido linfóide y son las más potentes presentadoras de antígenos (Huster 1997).

Las subpoblaciones linfocitarias se diferencian fenotípicamente por la expresión de receptores de membrana. Las células T poseen el receptor heterodimérico TCR que une antígenos expuestos por las células presentadoras de antígenos, las células B expresan en su superficie inmunoglobulinas transmembrana que pueden unir antígenos no procesados, independientemente de las CPA. Las células NK son linfocitos granulares grandes, que no poseen TCR ni Ig, pero sí el receptor de la región Fc de IgG (FcγRIII) o moléculas de superficie (denominadas genéricamente CD, del inglés *Clusters of differentiation* o “claustrós de diferenciación”) como CD16 y CD56 (molécula de adhesión neurocelular-1). Mientras que las células T y B están involucradas en respuestas inmunes clonalmente específicas, las NK ejercen una respuesta inmune citotóxica innata contra células infectadas por virus y neoplásicas y cooperan con la respuesta adaptativa a través de la unión de Ig por su receptor y mediante la producción de citoquinas (Huster 1997).

El MHC codifica los antígenos leucocitarios humanos (HLA), que son la base molecular de la discriminación por parte de las células T. Existen dos tipos de moléculas HLA. Las HLA clase I y clase II son estructuras heterodiméricas de superficie y cuando unen y se acompañan de antígenos, propios o extraños, son reconocidas por el TCR. Hay tres genes principales HLA-I que codifican para las moléculas HLA-A, HLA-B o HLA-C las cuales, en asociación con la molécula no-transmembrana β_2 microglobulina, son expresadas prácticamente por todas las células nucleadas del organismo. Los péptidos antigénicos expuestos en asociación con las moléculas HLA-I son hidrolizados a partir de proteínas por las CPA (antígenos endógenos). En el citoplasma, los péptidos forman complejos asociados con proteínas provenientes del retículo endoplasmático,

como las HLA, son transportadas a través del aparato de Golgi en vesículas exocíticas para la expresión en la superficie celular. La síntesis endógena de proteínas indica que existe una fuente intracelular de genes, lo cual está ligado con la especificidad de las células T citotóxicas (CD8+) de reconocer antígenos virales, de bacterias intracelulares y tumorales, así como de rechazar transplantes cuando el TCR reconoce las moléculas HLA-I no propias como si estuvieran alteradas. Existen tres tipos de moléculas HLA-II: HLA-DP, HLA-DR y HLA-DQ, asociadas con reacciones de rechazo a transplantes e injertos, que son expresadas por todas las células nucleadas estimuladas con interferón-gamma (IFN- γ), como las CPA. Los péptidos antigénicos conjugados a estas moléculas provienen de proteínas fagocitadas o endocitadas por CPA. Esos antígenos exógenos, provenientes de bacterias, parásitos y partículas virales liberados de otras células, son hidrolizados en endosomas, los cuales se fusionan con la membrana plasmática, de manera que se expresan en la superficie como péptidos lineales asociados con las moléculas HLA-II (Huster 1997).

En el 90% de los linfocitos T el TCR está conformado por cadenas $\alpha\beta$ y el resto por cadenas $\gamma\delta$. Fenotípicamente, los primeros están compuestos por dos sub-poblaciones definidas por la expresión recíproca de moléculas CD4 o CD8, mientras que los linfocitos T $\gamma\delta$, no poseen ninguna de ellas. Las células T CD4+ reconocen antígenos presentados en el contexto de las moléculas HLA-II, mientras que las T CD8+, de las HLA-I. Cerca de dos tercios de la circulación periférica de células T son CD4+ y el otro tercio, CD8+. El 5 a 10% que representan las células T $\gamma\delta$ pueden ligar moléculas MHC no clásicas (Huster 1997).

Los linfocitos T modulan la respuesta del sistema inmune mediante mecanismos de cooperación o supresión-citotoxicidad, estando asociados con la expresión de moléculas CD4 y CD8, respectivamente aunque no en forma absoluta. Las sub-poblaciones de linfocitos T también pueden ser caracterizadas por las citoquinas que producen. Las células T nativas producen interleucinas (IL), como IL-2, cuando son activadas y se diferencian en otras sub-poblaciones que producen combinaciones diferentes de citoquinas: las que producen IL-2, IFN- γ y Factor de Necrosis Tumoral beta (TNF- β) se denominan células Th1, las que producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, se conocen

como Th2. Cuando los macrófagos producen IL-12 en el proceso de la presentación antigénica, se favorece la diferenciación hacia células Th1, por lo que el IFN- γ actúa como un agonista autocrino para este tipo celular, y como antagonista para las Th2. Como consecuencia de estos perfiles de secreción de citoquinas, se generan respuestas inmunes mediadas por células por células Th1 y humorales y alérgicas por las células Th2 (Fig. 1) (Huster 1997).

Durante su ontogenia, los linfocitos T sufren un proceso de censo en el timo, que se denomina selección negativa y que consiste en la destrucción de las células T autorreactivas, mientras que las que no, pueden dejar el timo. Esas células T maduras pueden circular por el cuerpo y protegerlo de antígenos extraños, ejerciendo así su función inmunológica (Aickelin y Dasgupta 2005).

Los linfocitos B están relacionados con la respuesta inmune de tipo humoral, mediante la producción de Ig. Durante su maduración ontogénica muestran un arreglo progresivo de cadenas pesadas y livianas de Ig, así como cambios en el fenotipo de la superficie celular. Las células B inmaduras expresan CD19 y CD20, CD10 y posteriormente IgM. Los linfocitos B maduros dejan de expresar CD10 y expresan simultáneamente IgM e IgD. Los linfocitos T pueden favorecer el *cambio de clase* de Ig mediante la interacción con los receptores de superficie de las células B, ocurriendo una señalización intracelular recíproca y la producción de citoquinas por parte de las células T. Los péptidos provenientes de la hidrólisis de los antígenos internalizados por los linfocitos B se presentan en el contexto de las moléculas HLA-II a las células TCD4+ mediante el TCR e involucrando la interacción del CD40 con su receptor. Luego de la activación de la célula T comienza su producción de citoquinas cuyos receptores están presentes en la membrana de las células B. La síntesis de IL-4 induce el cambio de clase hacia IgE e IgG, mientras que la del factor transformador del crecimiento beta (TGF- β) e IL-10, el cambio de clase hacia IgA, en cambio IFN- δ antagoniza el cambio hacia IgE, inducido por IL-4 (Huster 1997).

Las moléculas de Ig están formadas por dos cadenas pesadas y dos ligeras unidas por puentes disulfuro y la especificidad antigénica tiene su base en el polimorfismo de la región variable de cada cadena pesada y ligera que se conoce con el nombre de fracción ab (Fab), por su unión con el anticuerpo y está dotada de amplia flexibilidad.

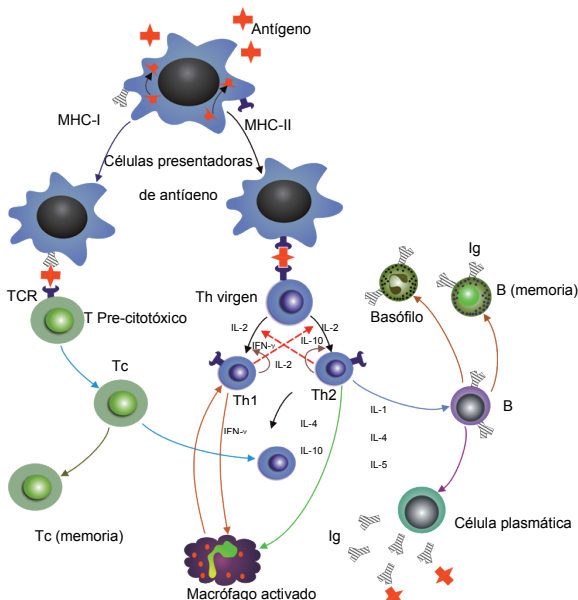


Figura 1. Regulación celular y humoral de la respuesta inmunológica.

La porción conformada por la unión de ambos tipos de cadenas y por sólo las cadenas pesadas se denomina fracción c (Fc), ya que cristaliza. Esta es responsable de la función efectora, ya que se puede unir a células, así como de la especificidad de cada tipo de Ig. Se conocen 5 isotipos de Ig: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD (Huster 1997).

Existe una cascada de proteínas plasmáticas, que se conoce como sistema de complemento, cuya activación por la inmunidad humoral, o mediada por anticuerpos, genera una serie de compuestos bioactivos que favorecen la opsonización, lisis osmótica de las células blanco y el reclutamiento de células fagocíticas. La unión a complejos antígeno-anticuerpos activa la vía clásica del complemento que implica la unión secuencial de C1, C4, C2 y C3 para activar posteriormente a las proteínas C5-C9 y formar el complejo de ataque de membrana que no es más que un grupo de proteínas que actúan como poros en la superficie celular, favoreciendo su muerte por trastornos en el volumen celular. La activación independiente de anticuerpos de la secuencia C5-C9 se conoce como vía alterna del complemento (Huster 1997).

Los linfocitos T citotóxicos y las células NK tienen la capacidad de inducir necrosis mediante el sistema de perforina/granzima o apoptosis a través de TNF y Fas ligando (FasL). El primero es un sistema similar al de la citólisis inducida por complemento, que forma poros en la membrana celular. En cambio el sistema TNF y FasL una vez que se unen a sus receptores respectivos inducen una transducción intracelular de señales que inducen la

degradación de los cromosomas. Se piensa que el sistema Fas-FasL juega un papel importante en el control de la autoinmunidad y en el mantenimiento del privilegio inmunológico en algunos tejidos (Huster 1997).

Regulación de la Respuesta Inmunológica en el Testículo

El testículo es considerado como un sitio anatómico inmunológicamente privilegiado, por cuanto tejidos inmunogénicos transplantados allí pueden sobrevivir por períodos prolongados en un ambiente que es inmunocompetente. Este órgano es un sitio inmunológicamente privilegiado poco usual, ya que posee un buen drenaje linfático, contiene células presentadoras de antígenos y no parece ser resistente a respuestas inflamatorias locales (Ksander y Streilen 1994).

La base para considerarlo privilegiado, es que el huésped puede evitar la generación de una respuesta inmune a los autoantígenos de las células germinales y su progenie, que se expresan en la pubertad, cuando ya el sistema inmunológico del individuo está maduro por lo que debería reconocerlos como no propios (Ksander y Streilen 1994).

El espermatozoide constituye, junto con las secreciones de las glándulas accesorias, un sistema antigénico complejo que aparece en la pubertad y que, a diferencia de otras células del organismo, es considerado como extraño comportándose como autoantigénico. Sin

embargo, la presencia de la barrera hemato-testicular previene el contacto con el sistema inmune, evitando su reconocimiento. Si la barrera se rompe, se producirán autoanticuerpos antiespermatozoides, provocando infertilidad de origen inmunológico (Hassoum *et al.* 1991).

Existen dos aspectos de la fisiología testicular inherentes a la regulación inmunológica que merecen especial atención. Ellos son: la presencia de la barrera hemato-testicular, así como los leucocitos y su proceso de activación para desencadenar una respuesta inmune (Setchell *et al.* 1990).

Considerándola desde el punto de vista inmunológico, la barrera hemato-testicular tiene dos funciones principales. En primer lugar, evita que anticuerpos circulantes alcancen el epitelio seminífero más allá de las uniones entre las células de Sertoli y, por otra parte, aísla del sistema inmunológico a las células germinales meióticas y post-meióticas que expresan autoantígenos. Sin embargo, se ha demostrado que algunos de esos antígenos se expresan en las células del compartimiento basal y son accesibles a los anticuerpos circulantes, al menos en cierto grado (Setchell *et al.* 1990, Yule *et al.* 1990).

La respuesta inmune normal está parcialmente regulada por la localización anatómica de las células del sistema inmune en los diferentes órganos de la economía. El tráfico de los leucocitos desde la sangre hacia los tejidos linfoides y los demás órganos es importante para la regulación inmune, ya que permite a las células inmunocompetentes interactuar con los antígenos localizados, procesados y presentados en los órganos linfoides (Setchell *et al.* 1990).

Los linfocitos pasan de la sangre a los órganos linfoides a través de células endoteliales especializadas, en las vénulas y en los ganglios linfáticos (transcitosis). A nivel testicular, la entrada también es regulada por la interacción de los linfocitos provenientes de los ganglios linfáticos regionales con las células endoteliales especializadas de los vasos sanguíneos. Sin embargo, existe un control en la migración de los linfocitos al testículo. En orquitis autoinmune experimental se ha demostrado que los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ no migran en cantidades significativas al testículo, observándose lo contrario para las células T cooperadoras CD4⁺, que median la respuesta autoinmune. Esto sugiere que el endotelio de la microvasculatura intersticial presenta selectividad en la adhesión de los linfocitos T (Setchell *et al.* 1990).

Además de los principales productos de secreción de los leucocitos, tales como las interleucinas (IL) 1 a 17, los Interferones (IFN) α , β , γ y los Factores de Necrosis Tumoral (TNF) α y β , se ha descrito que ellos secretan otros productos, como los derivados de la pro-opiomelanocortina, TGF β , Hormona estimulante de la Tiroides (TSH), Hormona de Crecimiento (GH), LH, GnRH y Factores parecidos a la Prolactina, que pueden afectar la función de las células testiculares. Por ejemplo, los factores parecidos a la LH y GnRH estimulan la esteroidogénesis en las células de Leydig, mientras que el IFN α y γ , la inhiben. Sin embargo, existen sustancias, como los productos parecidos a la Prolactina, cuyo efecto aún no se conoce (Maddocks *et al.* 1990, Setchell *et al.* 1990, Abbas *et al.* 1997).

Se ha sugerido que existe un control paracrino inmunorregulatorio, llevado a cabo por sustancias denominadas protectoras, producidas por las células de Sertoli y de Leydig. Estas sustancias inmunosupresoras son citoquinas antiinflamatorias, secretadas por células inmunológicamente competentes, como la IL-10, IL-13, IL-14 y TGF- β , entre otras, que inhiben la actividad proinflamatoria y activante de otras citoquinas como el factor de crecimiento de las células T α (TCGF α), la activina, la α -macroglobulina y la β -MSH (Mashburn y Kutteh 1994, revisado por Vivas *et al.* 2007).

Ensayos *in vivo* e *in vitro* han indicado que el privilegio inmune en el testículo es mantenido por las células de Sertoli y de Leydig, a través de la secreción de factores inmunosupresores que afectan las células del sistema inmune, ya que se unen a los linfocitos a través de receptores de membrana. Las células de Sertoli secretan Factor 1 de Crecimiento parecido a la Insulina IGF-1, IL-1, Inhibina, Activina, TGF- β , Transferrina, Factor beta de Crecimiento Neural (NGF- β), derivados de la pro-opiomelanocortina, Hormona Liberadora de la Tirotrofina (TRH), entre otros. Por su parte, las células de Leydig producen Hormona Estimulante de los Melanocitos (MSH), α - y β -Endorfinas, Met-Enkefalina, Hormona corticotrófica (ACTH), Arginina-Vasopresina y Factor de Crecimiento Neural (Pöllänen *et al.* 1990, Ksander y Streilen 1994).

Se ha demostrado que para algunos de estos péptidos existen receptores de superficie en la membrana de los linfocitos, indicando que pueden afectar la proliferación y quimiotaxis, la producción y la secreción de factores inmuno-reguladores de esas células. De esta manera, dichos factores intervienen en la supervivencia de trasplantes intratesticulares y en la protección de las

células germinales a una respuesta autoinmune (Pöllänen y Uksila 1990). El hecho de que los leucocitos puedan producir factores que afecten la esteroidogénesis y la espermatogénesis sugiere que la inhibición de la respuesta inmune en el testículo por productos testiculares puede tener otro significado, aparte de la protección a las células germinales autoantigénicas de un proceso autoinmune.

La IL-1 es secretada también por células germinales en desarrollo, como los espermatocitos y las espermátidas. Las de Sertoli secretan IL-1 bajo el influjo de lipopolisacárido bacteriano (LPS) inhibiendo la acción de FSH sobre la actividad aromatasa. Otro componente del sistema de IL-1, el antagonista del receptor (IL-1ra) también es sintetizado por la célula de Sertoli por estímulo de la FSH, LPS e IL-1, actuando como molécula antiinflamatoria ya que se une al receptor sin transmitir señal intracelular. La IL-6, de origen sertoliano se sintetiza por efecto de FSH; andrógenos y neuropéptidos y estimula la síntesis de transferrina por la célula de Sertoli, inhibe la síntesis de DNA en espermatocitos en fase meiótica y ejerce una función autocrina en las células de Sertoli durante la inflamación testicular (revisado por Vivas *et al.* 2007).

Así como IL-1, el TNF- α , producido por espermatocitos, espermátidas y macrófagos activados en testículo, inhibe la síntesis de andrógenos y posiblemente regula la espermatogénesis al impedir la activación de la muerte celular programada mediante la regulación de los niveles de FasL, el cual se expresa en la superficie de la célula de Sertoli. Esta molécula interviene en el mantenimiento del privilegio inmunológico del testículo al suprimir a los linfocitos T activados. En condiciones fisiológicas, la célula de Sertoli expresa FasL y señaliza a las células germinales positivas para Fas, controlando la población que puede soportar; en casos de lesión, incrementa la expresión de FasL para alcanzar un nuevo estado de equilibrio. La regulación aditiva de Fas en las células espermatogénicas es un proceso de autorregulación de aquellas destinadas a morir, a causa de un soporte inadecuado. El sistema Fas está regulado, además, por el IFN- γ (Lee *et al.* 1997, revisado por Vivas *et al.* 2007).

El factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF) es sintetizado por las células de Leydig y previene la secreción de inhibina por parte de las células de Sertoli, actuando en la regulación paracrina de los compartimientos intersticial e intratubular. En ratones homocigotos para el gen CSF-1, el Factor Estimulador de las Colonias de Fagocitos Mononucleares (CSF-1 o

M-CSF) se observa disminución de la fertilidad debido al mal funcionamiento de las células de Leydig causado por la mutación en el gen CSF-1, ocasionando disminución de la esteroidogénesis. IFN- α e IFN- β también inhiben la síntesis de andrógenos al inhibir la expresión de la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR) e IFN (revisado por Vivas *et al.* 2007).

En el testículo, normalmente no ocurre la activación de los linfocitos y, si se establece el contacto primario entre las células inmunológicas y el antígeno, no se genera una respuesta inmune (Pöllänen y Uksila, 1990). Cuando antígenos foráneos o autoantígenos testiculares alcanzan la circulación, son tomados por células presentadoras de antígenos como los macrófagos o células dendríticas del intersticio testicular, que expresan en su superficie antígenos codificados por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) tipo II. Estas células procesan el antígeno y lo transportan nuevamente a su superficie, para que sean reconocidos por los receptores para el antígeno de los linfocitos T, conocidos como TCR (Pöllänen y Uksila 1990).

El TCR consiste en dos cadenas polipeptídicas α y β , asociadas con un complejo de 5 proteínas que forman, junto con el CD3, una estructura de superficie ligada al receptor (Abbas *et al.* 1997, Roitt *et al.* 1998).

El proceso de activación de los linfocitos T requiere de dos señales. La primera se origina de la estimulación del TCR por el antígeno, o por anticuerpos contra el complejo receptor de la célula T o por lectinas. El estímulo es traducido al interior de la célula, probablemente por proteínas que unen Guanosintrifosfato (GTP). Esto induce la hidrólisis del fosfatidil-inositol en la membrana celular y provoca la liberación de calcio intracelular. La hidrólisis del inositol libera diacilglicerol, que activa a la proteinquinasa C, causa su traslocación a la membrana celular y subsecuentemente, la fosforilación del CD3 (Pöllänen y Uksila 1990).

La segunda señal es mediada por factores solubles. En este caso, la IL-1 β a través de mecanismos dependientes e independientes de la activación de las células T, activaría directamente a la proteinquinasa C (Pöllänen y Uksila 1990).

El TGF β producido por las células de Sertoli inhibe el incremento del calcio citosólico, mientras que la ACTH secretada por las células de Leydig inhibe la hidrólisis del inositol de membrana, previniendo así algunos de los eventos de la cadena de activación linfocitaria. Con

respecto a la segunda señal, la IL-1 α , análoga a la IL-1 β y producida continuamente por las células de Sertoli, se une al mismo receptor, inhibiendo competitivamente la proliferación de las células T (Pöllanen y Uksila 1990).

Como resultado del incremento del calcio citoplasmático y de la activación de la proteinquinasa C, las células T comienzan a sintetizar IL-2 y a expresar receptores de superficie para IL-2 que, a su vez, puede ser inhibida por el TGF- β de las células de Sertoli y peritubulares. La unión de IL-2 a su receptor provoca que la célula termine de completar su ciclo celular, ejerciendo un efecto proliferativo (Fig. 2) (Pöllanen y Uksila 1990).

Todas estas evidencias sugieren que la activación linfocitaria es inhibida en el testículo por factores

producidos localmente y que, el comportamiento de los linfocitos en ese órgano, dependerá del efecto neto de los factores inmuno-reguladores sobre los eventos asociados con la activación de las células T (Pöllanen y Uksila 1990).

El estudio de la respuesta autoinmune a autoantígenos testiculares se ha realizado utilizando un modelo de orquitis autoinmune experimental, que se desarrolla inmunizando ratones con homogenizado testicular y adyuvante de Freund. Las lesiones características de la orquitis tales como infiltración leucocitaria, vasitis y aspermatogénesis, se evidencian aproximadamente dos semanas después de la inmunización y son mediadas por células T cooperadoras CD4+, pudiendo transferirse la respuesta autoinmune a través de este tipo de células (Yule *et al.* 1990, Ksander 1994).

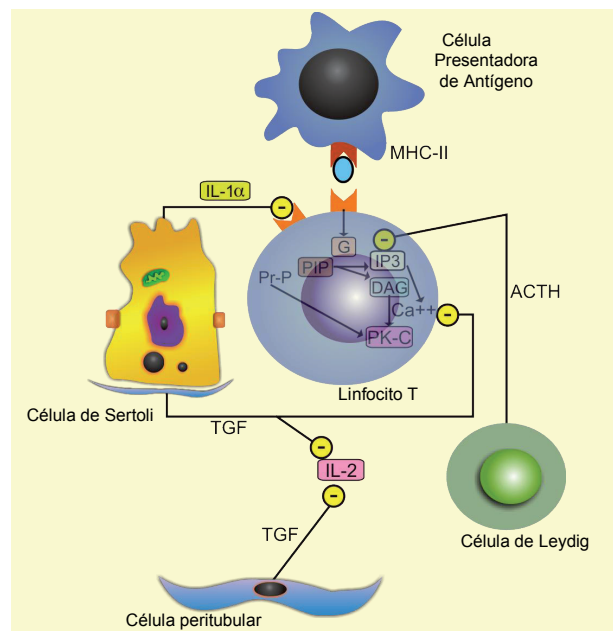


Figura 2. Regulación de la respuesta inmunológica en el testículo. Los eventos que conllevan a la activación del sistema inmunológico pueden ser modificados por señales emitidas por células del testículo como Sertoli, Leydig y peritubulares. (IL: Interleuquina, DAG: Diacilglicerol, PK-C: Proteinkinasa C, Pr-P: proteína fosforilada, IP3: inositol-3-fosfato, G: proteína G).

En el pasado no se les prestó atención a las células dendríticas en su función de presentadoras de antígeno, ya que su identificación era difícil al compartir marcadores con los macrófagos que también están presentes en el intersticio testicular. Sin embargo, hace poco se lograron identificar claramente empleando marcadores específicos como Ox62 y CD11c. A la luz del *modelo de peligro*, propuesto por Matzinger (1994), numerosas proteínas de estrés (hsp), entre las que se cuentan hsp 60 y hsp 70 pueden actuar como autoantígenos testiculares siendo esta una de las causas por las cuales podría ocurrir

activación de linfocitos autorreactivos, daño al testículo y alteración del privilegio inmunológico por pérdida de la tolerancia (Fig. 3). Al liberarse hsp 70 de las células necróticas, actuaría como una señal de peligro sobre las células dendríticas inmaduras, las cuales podrían disparar los mecanismos de autoinmunidad, una vez activada su maduración (Fijak y Meinhardt 2006).

Como ya se mencionó, existen células germinales que se encuentran fuera de la barrera hemato-testicular y que expresan autoantígenos. Los mecanismos por los cuales

se ha tratado de explicar la regulación inmune en este caso, son dos: el que propone la existencia de factores locales immuno-reguladores en el intersticio testicular que previenen la ocurrencia de una respuesta autoinmune y el otro, de tipo sistémico, que involucraría el fenómeno de autotolerancia, aplicable a cualquier autoantígeno específico para un órgano (Yule *et al.* 1990).

Existen numerosos factores que pueden interferir con las funciones propias del testículo, así como con la vigilancia inmunológica del órgano, por ejemplo: los tóxicos. Entre éstos se encuentran los metales pesados y en algunos países, incluido el nuestro, el Mercurio (Hg) ha cobrado importancia debido a los problemas ecológicos y sanitarios que está provocando (Bruhn *et al.* 1995, Leino y Lodenius 1995, Malm *et al.* 1995, Nakagawa 1995, Palheta y Taylor 1995).

Respuesta autoinmune testicular inducida por Mercurio

Se considera que el testículo es uno de los órganos que goza de privilegio inmunológico, por cuanto tejidos inmunogénicos transplantados allí, pueden sobrevivir por periodos prolongados en un ambiente que es inmunocompetente (Ksander y Streilen 1994). Sin embargo, existen muy pocos trabajos que hayan estudiado la acción y efectos del mercurio sobre este órgano desde un punto de vista inmunopatológico, a pesar de todas las evidencias acumuladas que indican que el metal afecta la función de las células del sistema inmune, con aumento de

las inmunoglobulinas séricas (incluyendo IgE), activación policlonal de linfocitos B y T y depósito de complejos inmunes que conduce a glomerulonefritis (revisado por Pelletier y Druet 1995, Rowley y Monestier, 2005).

El Grupo de Investigadores en Reproducción Humana de la Universidad de Oriente (GIRH-UDO) estudiando el efecto inmunopatológico del Hg sobre el testículo, ha demostrado que el metal induce la expresión de autoanticuerpos a los 30 días en células germinales y espermatozoides maduros de ratas tratadas con dosis subletales del metal.

Los autoanticuerpos aparecen con dosis tan bajas como de 0,01 µg/mL en túbulos seminíferos aparentemente sanos y dañados, a los 30 días de tratamiento, aún cuando las concentraciones de Hg⁺⁺ en suero y testículo son bajas comparadas con las de los 90 días, y cuando las concentración sérica de testosterona aún están dentro de límites normales (Penna 1996, Pocino *et al.* 2002).

Los autoanticuerpos, tanto del isotipo IgG como IgM, se distribuyen en forma variable en el espesor del epitelio germinal. En los túbulos aparentemente sanos, los anticuerpos se distribuyeron en las células germinales más inmaduras como las espermatogonias y también en espermatozoides y espermátidas. A su vez, en los túbulos más severamente lesionados, la inmunofluorescencia se detectó en las células descamadas al lumen de algunos de ellos y en el residuo del epitelio germinal, en otros.

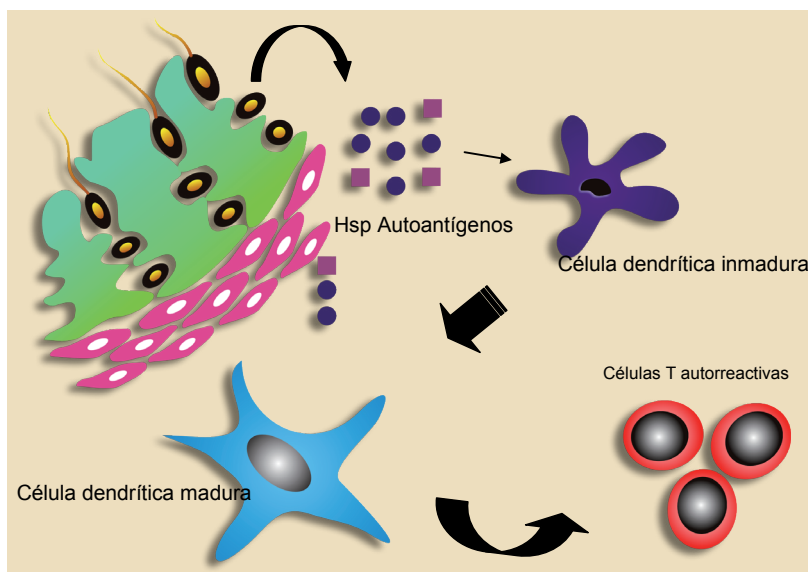


Figura 3. Mecanismos de activación de células presentadoras de antígeno (Dendríticas) en el intersticio testicular.

Los anticuerpos de tipo IgM e IgG en las ratas tratadas oralmente con Hg estaban dirigidos no sólo a los elementos más inmaduros del epitelio seminífero como las espermatogonias, sino también a los espermatocitos, espermátidas y a los espermatozoides (Fig. 4). Los autoanticuerpos aparecieron antes de que disminuyera la producción de testosterona, que actúa en la regulación de los mecanismos involucrados en el transporte de inmunoglobulinas al intersticio testicular y epididimario.

En los túbulos epididimarios también se detectan autoanticuerpos contra los espermatozoides ubicados en el lumen. Asimismo, en espermatozoides aislados de epidídimo se demuestra la presencia de anticuerpos tipo IgM e IgG, ubicados predominantemente en la cola.

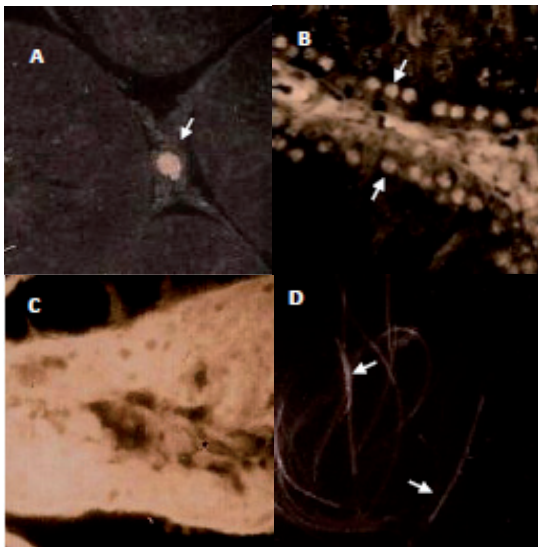


Figura 4. A. Testículo de un animal del grupo control, mostrando inmunofluorescencia en el interior de un vaso sanguíneo por la presencia de Ig (flecha). Autoanticuerpos detectados por inmunofluorescencia en ratas tratadas con dosis subletales de Hg por vía oral por 3 meses, dirigidos contra B: Espermatozoides de dos túbulos seminíferos aparentemente sanos (flechas) C: células germinales de un tubo seminífero dañado, y D: Espermatozoides aislados de la cauda epididimaria (flechas).

Estos resultados sugieren que Hg es capaz de inducir la expresión de autoanticuerpos de tipo IgM e IgG y que estos atraviesan el epitelio germinal hasta alcanzar finalmente al gameto maduro, probablemente a través de las células endoteliales intersticiales por mecanismos de transferencia paracelular, por transcitosis o por ambos mecanismos.

Esta respuesta no podría catalogarse como una orquitis autoinmune ya que no cumple con los requisitos de vasitis, aspermatogénesis e infiltrado leuco-linfocitario descritos por Yule *et al.* (1990). Sin embargo, puede

considerarse como una respuesta autoinmune.

Como el epidídimo es un reservorio de espermatozoides, la carga autoantigénica puede ser igual o mayor a la del testículo, sugiriendo que el riesgo de autoinmunización podría ser aún mayor en el epidídimo que en el testículo. Ese riesgo se incrementa por el hecho de que los linfocitos siempre están presentes en el epitelio epididimario, en comparación con el testículo normal, donde nunca se han observado linfocitos intraepiteliales (Pöllänen y Cooper 1994).

La presencia de linfocitos en el epitelio epididimario normal sugiere que el sistema inmune es capaz de detectar antígenos presentados por células MHC-II intraepiteliales, como las células principales que expresan este tipo de moléculas, o por células intersticiales. Así los autoantígenos germinales procedentes de espermatozoides degenerados de la luz del túbulo o de células espermatogénicas descamadas del testículo pueden ser presentadas por las células principales a los linfocitos intraepiteliales, que porbablemente penetran fácilmente la membrana basal por estar dentro del túbulo (Pöllänen y Cooper 1994).

Por cuanto este órgano sufre menos alteraciones que el testículo, probablemente el daño inducido por Hg⁺⁺ en las células peritubulares, pudo haber facilitado el paso de linfocitos al epitelio, permitiendo la presentación de autoantígenos de las células descamadas al lumen y de los espermatozoides, desencadenando así la generación de autoanticuerpos que posteriormente se evidenciaron no sólo a nivel de los espermatozoides epididimarios y testiculares, sino en las células del epitelio germinal.

Ya que los daños histológicos y la aparición de los anticuerpos se evidenciaron a partir de los 30 días, no podría decirse cuál evento precedió al otro. Por lo tanto, cabría pensar en tres posibilidades. La primera: que el daño inicial lo indujera el Hg sobre el epitelio germinal provocando la liberación de autoantígenos, en estado nativo o modificado, que activarían al sistema inmune. Segunda: que la afectación del Hg sobre el sistema inmune a través de la inducción de células autoreactivas y la activación de células B provocara la respuesta autoinmune que posteriormente se vería potenciada por el efecto directo del Hg sobre el epitelio germinal. Finalmente, podría ocurrir una combinación de los dos mecanismos anteriores.

Los autoanticuerpos de tipo IgM e IgG atraviesan el epitelio germinal hasta alcanzar finalmente al

gameto maduro, probablemente a través de las células endoteliales intersticiales (por mecanismos de transferencia paracelular, por transcitosis o por ambos), por la rete testis y por presentación antigénica de células MHC-II; como las células principales del epidídimo a los linfocitos intraepiteliales.

El GIRH profundizando en los mecanismos inmunológicos involucrados en el desarrollo de una respuesta autoinmune en el testículo ha evaluado la intervención de interleuquinas 4 e IFN- γ como indicadores de la activación de células Th1 o Th2, así como la expresión de proteínas de estrés (hsp).

Citoquinas (Th₁, Th₂) inducidas por mercurio

Las citoquinas (CK) son moléculas de naturaleza protéica liberadas por un número de células linfohematopoyéticas y otras células, para llevar a cabo funciones específicas, fundamentalmente de manera paracrina o autocrina. Hay una serie de sustancias que han sido descritas como CK, cuyo papel en la función reproductora ya ha sido explorado. Las CK se clasifican en diferentes grupos: Interferón (IFN) tipo α , β , y γ , Interleuquinas (IL) IL-1 a IL-18, Factor Estimulante de Colonias (CSF), TGF- β , TNF α y β y Quimioquinas. La mayoría de las CK que regulan eventos reproductivos, como IL-1, 2 y 6, GM-CSF, TNF α y γ , tienen un peso molecular de 15 a 60 kd y algunas están glicosiladas. Estas sustancias actúan como reguladores de una variedad de eventos fisiológicos y patológicos, como la inflamación. Originalmente fueron clasificadas en dos grandes grupos: monoquinas (productos de monocitos/macrófagos) y linfoquinas (productos de linfocitos), pero como estas sustancias se producen no solamente en esos linajes celulares, se les ha dado el nombre común de citoquinas. Estas sustancias tienen receptores no sólo en glóbulos blancos sino también en otros tipos celulares, como en el sistema reproductor y, de esta manera, el sistema inmune afecta la función endocrina y se establece una comunicación celular bidireccional que une al sistema inmunológico con el sistema endocrino reproductor (Ben-Rafael y Orvieto 1992, Robertson *et al.* 1992, Rutanen 1993).

Una de las familias de las citoquinas atrae leucocitos al sitio de daño tisular, por lo que se las ha denominado "quimioquinas" (contracción de citoquinas quimiotácticas). Son pequeños péptidos de 70-80 aa con una homología del 20-50% en el nivel de aminoácidos. Estas sustancias son producidas por una gran variedad de linajes celulares en respuesta a irritantes exógenos o

mediadores endógenos y actúan sobre subpoblaciones linfocitarias, que a su vez liberan proteasas y otros mediadores del proceso inflamatorio. Existen tres subfamilias de quimioquinas, la alfa o CXC, cuyos residuos de cisteína están separados por un aminoácido y la beta o CC, en la que los dos residuos están adyacentes. Recientemente se identificó una nueva sub-familia, llamada Linfotactina, que es similar a las anteriores, pero que conserva dos de las cuatro cisteínas (García-Velazco y Arici 1999).

La CXC actúa como quimiotáctica para neutrófilos, mientras que la CC sobre monocitos y linfocitos T, así como eosinófilos y células cebadas. La CXC más estudiada ha sido la IL-8, que activa neutrófilos y tiene receptores de superficie en los neutrófilos humanos (IL-8RA y IL-8RB). Su producción es favorecida por IL-1 y TNF- α , mientras que los corticosteroides inhiben la transcripción del gen que codifica la proteína. La primera CC descrita fue la proteína inflamatoria de macrófago 1 (MCP-1/MCAF), que es producida no sólo por macrófagos y linfocitos T, sino por otros linfocitos y, células epiteliales y plaquetas. Las quimioquinas inducen quimiotaxis, degranulación y estallido respiratorio por distintas vías de señalización intracelular, como activación de fosfolipasa C y liberación de calcio intracelular (García-Velazco y Arici 1999).

En cualquier situación donde se produce un daño celular como en el caso de una exposición a sustancias tóxicas, las citoquinas realizan el control del proceso inflamatorio, migración y agregación de células inmunocompetentes al sitio afectado (WHO 1991, Bagenstose *et al.* 1999). Las citoquinas regulan esta respuesta al mercurio así como los acontecimientos inflamatorios que se producen (Ring *et al.* 1999).

Como ya se mencionó, la presentación del antígeno depende del MHC-II, que es necesaria para la activación de las células T CD₄. También se requiere de dos señales: la unión del receptor de la célula T al complejo antigénico-péptido (MHC) a través del Complejo proteico CD₃ y la señal coestimulante de la unión de la proteína CD₂₈ que se fija a dos proteínas B7. Junto a estas dos señales se induce a las células Th, para que comience a secretar IL-2, factor mitógeno muy potente para los linfocitos T que resulta esencial para la proliferación en la inmunidad celular. Además de esta citoquina, las células Th activadas secretan otras citoquinas, tal como la IL-4, necesarias en la proliferación y función de las células Th₂ y las células citotóxicas (Tc), en el aumento de la expresión de proteínas MHC-II y crecimiento y diferenciación de la función de

los eosinófilos, mastocitos y las células B. Estas células B constituyen el principal tipo celular que participa en la inmunidad humoral (Abbas 1997, Roitt *et al.* 1998).

Varios estudios han proporcionado evidencias de que citoquinas como IL-4 producida por los linfocitos Th₂ protegen contra la glomerulonefritis cuando experimenta una supresión en el proceso de infiltración de los neutrófilos y retraso en el tipo de hipersensibilidad retardada en tejido renal (Kitching *et al.* 1998, Saleem *et al.* 1998). La activación policlonal de las células inducidas por nefropatía mercurial está asociada con elevados niveles de citoquinas en circulación, derivadas de las células T. IL-4 juega un papel importante en la inducción proliferativa de las células B específicas en la fase inicial de la intoxicación por HgCl₂ (Bagenstose 1999a).

Por otra parte, el Interferón gamma IFN-γ sintetizado por los linfocitos Th₁ promueve la lesión renal mediada inmunológicamente por sus acciones estimuladoras y proinflamatorias. En el ratón, IFN-γ es responsable de la regulación aditiva de MHC clase I y II glomerular, así como de la expresión de moléculas de Adhesión, activación de macrófagos y linfocitos y la liberación de mediadores de la inflamación (Billiau 1996, Huang *et al.* 1997).

IFN-γ e IL-4, son linfoquinas con efectos mutuamente antagonistas, estimulando diferentes funciones efectoras. IL-4 es un tipo de citoquina fácilmente inducida durante las primeras horas del tratamiento con mercurio antes que se produzca la respuesta de IFN-γ. En otro estudio similar, se observó la producción de IL-4 e IFN-γ en células esplénicas de ratas tratadas con HgCl₂, detectándose a las 30 h la producción de IFN-γ, mientras que la producción de IL-4 comienza luego de las 30 h. El nivel máximo de expresión de IL-4 ocurre a las 48 h de la inyección con HgCl₂, pero esta sobre-regulación de los niveles basales se alcanza a los 10 días (Gillespie 1995).

Es indudable que el mercurio induce la activación de las células T dependientes y secundariamente a la activación de las células B. Esto sugiere que las funciones de las células T cooperadoras, son esenciales en el desarrollo de las manifestaciones autoinmunes inducidas por el HgCl₂; lo que produce una activación policlonal secuencial de las células B, induciendo la producción de autoanticuerpos y finalmente daño tisular, como glomerulonefritis (Jiang y Möller 1995). En este proceso autoinmune hay un cambio de balance inmunoregulatorio hacia la respuesta Th₂. Esto cambia el dogma de las células Th₂ asociadas con un

compartimiento autoagresivo, mientras que las células Th₁ el papel regulatorio; en algunas circunstancias se pueden invertir dichas funciones (Mathieson 1995).

El incremento en suero de IgG e IgE en ratas Brown Norway, tratadas con bicloruro de mercurio sugiere que las células Th₂ representan un papel importante en la patogénesis de este síndrome. El daño ocasionado por HgCl₂ induce la activación de células B, mediada por la producción de IL-4, promoviendo cambio de clase hacia esos isotipos (Bagenstose *et al.* 1999a).

La administración de HgCl₂ por vía oral, durante 30, 60 y 90 días a ratas *Sprague-Dawley* a concentraciones 0,01, 0,05 y 0,1 µg/mL; produce un aumento en el contenido del metal en suero, testículo y epidídimo. Desde el punto de vista inmunológico, las lesiones testiculares y epididimarias están asociadas con una respuesta autoinmune mediada por autoanticuerpos IgG e IgM dirigidos contra espermatozoides, espermatozonias y espermatozoides maduros y sin infiltrado de células inmunocompetentes en el intersticio testicular (Penna 1996, Pocino *et al.* 2002, Penna *et al.* 2009).

En vista de esos hallazgos y dado que el HgCl₂ altera tanto a la respuesta humoral como celular del sistema inmune, el Grupo de Investigadores en Reproducción Humana de la Universidad de Oriente, decidió evaluar la participación de la respuesta inmune humoral y celular sistémica en la mediación de la respuesta autoinmune observada en testículo. Para ello se determinaron, mediante ELISA, los niveles de IL-4 e IFN-γ, considerados como indicadores fenotípicos Th₂ y Th₁, respectivamente (Mosmann *et al.* 1986, Abbas *et al.* 1996) en sueros de las ratas expuestas crónicamente a dosis sub-tóxicas de mercurio.

La administración oral de mercurio provocó disminución de los niveles de IL-4 e incremento en los niveles de IFN-γ. Sin embargo, como esta diferencia no fue estadísticamente significativa, se analizaron las variaciones de los niveles de citoquinas en el tiempo (2 y 7 meses), observándose un alto nivel de IFN-γ en los animales que habían recibido mercurio, en comparación con los controles (Fig.5).

Con respecto a los hallazgos inmunopatológicos previamente descritos (Penna, 1996, Pocino *et al.* 2002) a los 60 días, en los que están presentes autoanticuerpos contra células germinales y espermatozoides, los niveles de IFN-γ fueron significativamente más bajos en las ratas tratadas con mercurio que en los animales control.

La administración de mercurio pueda dar lugar a resistencia, representada por altos niveles de IFN- γ , similar a lo observado en ratas de la cepa LEW y ratones de la cepa H-2^s. Tanto las ratas Sprague Dawley, como las ratas LEW son susceptibles de desarrollar enfermedades autoinmunes mediadas por una respuesta de las células tipo Th₁, mientras que las ratas Brown Norway (BN), Dorus Zadel Black (DZB) y ratones BALB/C, presentan susceptibilidad a la respuesta de tipo Th₂, estimulada por HgCl₂ (Bigazzi 2001, Wensky *et al.* 2001).

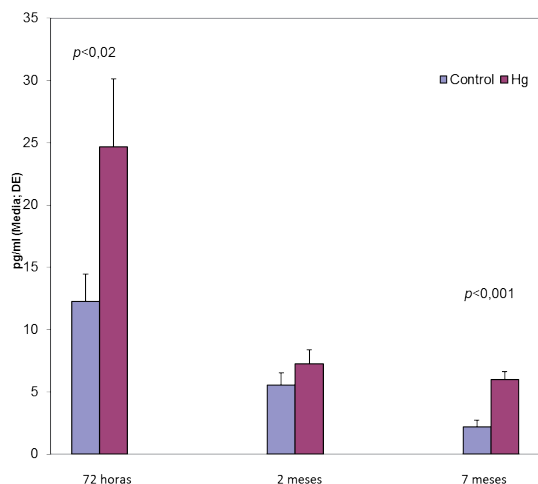


Figura 5. Valores séricos de IFN-g (pg/mL) en ratas Sprague Dawley tratadas con 0,05 µg/mL de HgCl₂

En ratas LEW esta actividad del HgCl₂ se ha explicado como resultado de un aumento de los niveles basales de IFN- γ e IL-12, en comparación con las BN, que presentan una inhibición de estas citoquinas; sin embargo, hay una activación proliferativa de IL-4, que no ocurre en la cepa resistente LEW y *Sprague Dawley*. De modo que la respuesta inmune difiere de acuerdo con el genotipo y la resistencia, lo que puede ser debido, en parte a los altos niveles basales de citoquinas Th₁ ó a un fallo de la regulación aditiva de Th₂. Existen datos convincentes de que el reconocimiento de los auto-antígenos por las células Th₁, conduce a la destrucción de órganos, mientras que las Th₂ autorreactivas, son menos dañinas y aún protectoras en algunos desórdenes autoinmunitarios (Bagenstose *et al.* 1999b).

Los resultados anteriormente descritos indican que los efectos provocados por la administración crónica de HgCl₂ (para los días 60 y 90 post tratamiento) en la cepa Sprague-Dawley muestran congruencia con un estado de susceptibilidad inmunológica, con reducción o ausencia de la expresión de IFN- γ y presencia de IgG e IgM dirigidos contra espermatoцитos, espermatoгонias y, espermatozoides (Penna 1996, Pocino *et al.* 2002).

Para nuestro conocimiento, es la primera vez que se relacionan los niveles séricos de citoquinas en ratas Sprague Dawley tratadas con HgCl₂ con alteraciones en el sistema reproductor masculino.

A pesar de que no hemos demostrado cambios en la expresión de IL-4, existen evidencias de que esta CK mantiene sus niveles constantes en ratas BN tratadas, inicialmente con dosis estándar y posteriormente bajas de HgCl₂, lo que se asocia con un estado de resistencia sin desarrollo de síndrome autoinmune y que, una vez que se inicia el descenso gradual de la expresión e INF- γ , ocurre una discreta regulación aditiva de su expresión y de los niveles séricos de IgE, a partir del día 20 de tratamiento (Szeto *et al.* 1996). Asimismo, en ese mismo modelo experimental se ha demostrado que la expresión de esta CK ocurre tempranamente, entre los días 4 y 10 de la enfermedad (Gillespie *et al.* 1995).

Para explicar cómo HgCl₂ induce la expresión de IL-4 en las ratas Sprague Dawley, estudios realizados indican que los altos niveles de grupos thioles favorecen la respuesta inmunitaria tipo Th₁ y los bajos niveles, a las respuestas de Th₂. En particular, las células T CD4⁺ de las ratas LEW tienen niveles más altos de grupos thioles que aquellas BN (Bagenstose *et al.* 1999b). Se cree, por tanto, que los grupos SH, son moléculas determinantes que disminuyen la producción de IL-4 y la síntesis de IgE inducida por IL-4 (Jeannin *et al.* 1995).

Informes recientes complementan esta información y hacen pensar que existe una relación entre inducción por mercurio y los niveles de glutatión (GSH). El GSH influye también en el equilibrio de la célula T tipo Th₁/Th₂. N-Acetil-l-Cisteína (NAC), es un precursor antioxidante de GSH, que puede disminuir los niveles de IL-4 en las células T en sangre periférica y también la producción in vitro de IgE e IgG en las células mononucleares de sangre periférica humana. Cuando se administra NAC oralmente a ratones, puede disminuir la producción de albúmina, IgE e IgG y, en consecuencia, reducirse la respuesta Th₂ (Bagenstose *et al.* 1999b).

Se ha determinado que la incapacidad en las ratas BN para producir una respuesta Th₁ adecuada, es consecuencia de defectos existentes en el compartimiento de las células T. Tanto las células T CD4⁺ y CD8⁺, están implicadas, pero la población CD8⁺ contribuye fuertemente con este defecto. Esta alteración parece ser independiente del MHC y, además, los productos derivados de las APC como el óxido nítrico (NO) no parecen estar implicados directamente en la polarización

de la respuesta inmunológica. La expresión elevada de IL-4, no es responsable de la disminución en la producción de INF- γ por las células T en la cepa BN; sin embargo, es necesaria para su síntesis tanto en esa cepa con ratas LEW (Cautain *et al.* 2002).

Estos nuevos hallazgos pudieran explicar lo sucedido en nuestro modelo experimental, en cuanto la susceptibilidad evidenciada por el daño testicular, ocasionado por el HgCl₂, observándose un incremento en los niveles de IFN- γ en la fase inicial del tratamiento y a los 210 días. Esto puede asociarse con una reducción de la respuesta Th1, que permitiría el desarrollo del daño tisular mediado por una respuesta autoinmune, aún cuando la respuesta Th2, en términos de los niveles de IL-4, no fue detectable en nuestra investigación.

Ya que el Hg induce muerte celular por apoptosis y necrosis en el epitelio germinal es posible que la liberación antígenos de las células necróticas puedan actuar como “señales de peligro” favoreciendo así la expresión de autoanticuerpos dirigidos contra el linaje espermatogénico. Como representantes de esas señales se han postulado a las proteínas de estrés.

Proteínas de Choque Térmico (hsp) o Proteínas de Estrés

Un aspecto integral de la evolución de los organismos lo constituye la capacidad de los mismos de enfrentar y sobrevivir a cambios adversos en su medio ambiente. En el reino animal existen numerosos ejemplos de organismos que han evolucionado de maneras únicas que les permiten la continua supervivencia en un ambiente, que la mayoría de las veces es hostil e incompatible con el mantenimiento de la vida. A diferencia de los cambios únicos que ocurren en el animal como un todo, para permitirle la aclimatación a variaciones ambientales, las células de todos los organismos parecen emplear un mecanismo de defensa común y ubicuo. Así, las células procariotas y eucariotas responden al estrés o a agentes estresantes físicos y químicos, aumentando de manera rápida, vigorosa y transitoria, la transcripción de genes específicos que codifican para una pequeña clase de proteínas llamadas Proteínas de estrés (hsp) (Morimoto *et al.* 1990). Algunas de este grupo están presentes en cantidades menores bajo condiciones normales, en células no sometidas a estrés; ya que están involucradas en numerosas rutas bioquímicas básicas y esenciales por sus funciones críticas en la fisiología, crecimiento y desarrollo de la célula normal. Sin embargo, como consecuencia de condiciones estresantes aumentan su

expresión y se acumulan en las células hasta alcanzar, en algunos casos, altas concentraciones. Esta respuesta sirve como mecanismo adaptativo o de sobrevivencia que involucra una reprogramación rápida pero transitoria de la actividad metabólica celular para proteger macromoléculas celulares críticas, con el fin de que la célula pueda reanudar sus funciones fisiológicas normales durante la fase de recuperación o de reparación, una vez que el evento estresante cesa (Welch 1992).

Las hsp se han agrupado en familias, las cuales se han clasificado en atención a sus pesos moleculares. Las hsp de alto peso molecular son aquellas cuyos pesos oscilan entre 100 a 110kD, la familia hsp90 entre 83-90 kD, la familia hsp70, entre 66-78kD; la familia hsp60 presente en bacterias, mitocondrias y cloroplastos y que se han denominado “chaperoninas” por su papel en el plegamiento y ensamblaje de proteínas; y por último, la familia de hsp pequeñas, que está constituida por un grupo diverso de proteínas con pesos moleculares que van de 15 a 30 kD. Algunas integrantes de este grupo son constitutivas y en condiciones normales están presentes en bajas cantidades en células no sometidas a estrés; ya que están involucradas en numerosas rutas bioquímicas básicas y esenciales, y tienen papeles críticos en la fisiología, crecimiento y desarrollo de la célula normal. Sin embargo, como consecuencia de condiciones estresantes aumentan su expresión y se acumulan en las células hasta alcanzar, en algunos casos, altos niveles. Por otro lado, otras integrantes de las diferentes familias de las hsp sólo se inducen en condiciones de estrés (revisado por Morimoto *et al.* 1990, Latchman 1998).

El papel primordial que tradicionalmente se les ha asignado a las hsp es el de chaperonas moleculares porque regulan las funciones de otras proteínas, por su unión a ellas modulando su función, transporte y su estado conformacional (Morimoto *et al.* 1990, Latchman 1998).

La respuesta al estrés es universal, y altamente conservada en la línea evolutiva pudiendo inducirse por innumerables agentes físicos y químicos e infecciosos (Welch 1992). Se ha observado en diversos tipos de organismos, desde las archaeobacteria a eubacterias, levaduras, plantas, invertebrados y vertebrados, incluyendo al humano. A pesar de que existen diferencias en el número y pesos moleculares de las hsp expresadas entre ellos, es destacable la similitud con la que se ha mantenido la respuesta, desde el punto de vista ontogénico. Las comparaciones de las secuencias génicas que codifican para hsp en *E. coli*, plantas, levaduras, *Drosophila* y el hombre, así como el uso de técnicas

inmunológicas para probar similitudes estructurales de hsp entre especies filogenéticamente distantes han demostrado que estas moléculas exhiben un alto grado de homología, representando las proteínas más altamente conservadas en la naturaleza (Morimoto *et al.* 1990)

Originalmente este tipo de respuesta se describió asociada con hipertermia, por lo que se las llamó “proteínas de choque térmico” del inglés *heat shock proteins*. No obstante, posteriormente se describieron numerosos agentes físicos y químicos, que van desde la hipertermia, hipoxia, irradiación ultravioleta, etanol, peróxido de hidrógeno, entre otros, hasta condiciones fisiopatológicas que incluyen trauma tisular, isquemia e infecciones por virus y microbianas capaces de inducir su expresión, por lo que su nombre se generalizó a proteínas de estrés (Morimoto *et al.* 1999).

Los mecanismos exactos por los cuales la célula reconoce cambios en su medio ambiente y activa la respuesta de estrés no están totalmente claros, pero los diferentes agentes que inducen esta respuesta comparten la capacidad de promover la desnaturalización de proteínas. Tampoco está claro si todos los inductores actúan por vías independientes o alternativamente, convergen en un solo punto de una sola vía (Morimoto *et al.* 1999, Goering *et al.* 2000).

La regulación de la transcripción de los genes de las hsp se realiza por la interacción entre los factores de transcripción con los elementos en las regiones promotoras de los genes de las hsp (HSFs). En vertebrados se han identificado cuatro tipos de HSFs. De ellas, la HSF1 y HSF2 se expresan ubicuamente y están conservadas (Pockley 2003)

Por lo general, las hsp son intracelulares en los eucariotas y son liberadas a partir de células necróticas, pero no apoptóticas y esto denota daño tisular no fisiológico y, por lo tanto genera una respuesta inflamatoria. Así, la liberación de las hsp extracelularmente induce la expresión de moléculas de adhesión celular y vascular, e interleuquinas de las células vasculares y de los macrófagos y la secreción de IL pro-inflamatorias como IL-1b, IL-6 y TNF- α desde los monocitos. Se cree que esta respuesta esté relacionada con su capacidad de generar una respuesta inmune innata y pro-inflamatoria adaptativa que implique la muerte celular. Sin embargo, a pesar de que han sido postuladas como “señales de peligro” pueden encontrarse en circulación sanguínea periférica de sujetos sanos, no habiendo aún una explicación satisfactoria sobre el punto (Pockley 2003). Se cree que la liberación de complejos

extracelulares de hsp con péptidos son detectados por las células presentadoras de antígeno uniéndose al receptor CD91 y en los órganos linfoides, son presentados a las células inmunocompetentes T, siendo activadas para iniciar la destrucción de las células que presentan estos complejos (Wallin *et al.* 2002).

Ante una situación de estrés celular, ocurre replegamiento de las proteínas dañadas y hasta degradación de las mismas; si el nivel de estrés incrementa o si las nuevas hsp son incapaces de proteger las organelas vitales, ocurre muerte celular por apoptosis. Ya en condiciones extremas, como la disminución intracelular de ATP o en presencia de altos niveles de radicales libres en la célula, ocurre muerte por necrosis, de manera que ambos tipos de muerte celular pueden estar interrelacionadas mediante el estrés. Estos dos sistemas son considerados como los responsables del “bienestar” del organismo y como respuestas celulares a las injurias ambientales (Punyiczki y Fésüs 1998).

Las hsp tienen un efecto protector en la supervivencia celular, relacionado con el retardo en la activación de la apoptosis, que involucra mecanismos tales como el transporte de organelas y el ensamblaje de ciertas proteínas relacionadas con la apoptosis como p53 o myc, pudiendo actuar también sobre algunas enzimas como proteasas, nucleasas y transglutaminasas. La hsp 70 actúa protegiendo a la mitocondria del daño oxidativo y, otras como las proteínas de estrés propiamente dichas (sHsps), actúan regulando la apoptosis mediante la actividad de bcl-2 y de la familia ced9, que interfieren con el estrés oxidativo. Se ha propuesto que la respuesta al estrés y la apoptosis convergen en una cascada común de fosforilación, cuyos miembros son inducidos por calor, radicales libres, estrés osmótico, TNF- α , IL1, lipopolisacáridos, factores de crecimiento o ceramida. Esta molécula puede acelerar la fosforilación de la proteinkinasa activada por ceramida, que transmite señales y regula la proliferación y los procesos inflamatorios (Punyiczki y Fésüs 1998).

Inducción de hsp por Mercurio

Los metales pesados, entre ellos el mercurio, son potentes inductores de la respuesta de estrés. Así, se ha descrito que el Hg es capaz de inducir hsp tanto *in vivo* como *in vitro* (Goering y Fisher 1995). Sin embargo, al comparar estas hsp con aquellas inducidas por hipertermia, se observan diferencias en cuanto a las familias de hsp estimuladas, que pueden deberse parcialmente al sistema experimental utilizado. Así, se ha descrito que el espectro de proteínas inducidas en células embrionarias

de *Drosophila* es idéntico tras tratamiento con Hg o por calor. Por el contrario, en células de *Candida albicans* expuestas al metal se inducen las hsp 81, 84 y 88, de las cuales sólo una coincide con las diferentes hsp inducidas por hipertemia (revisado por Goering y Fisher 1995).

Se ha demostrado que la administración de Hg *in vivo* produce daños en el riñón, con alteraciones en la expresión de diferentes productos génicos, que dependen de la dosis y el tiempo de tratamiento y que se evidencian por el aumento en la síntesis de hsp y la inhibición de la síntesis de proteínas constitutivas. La inyección de Hg en ratas, induce un aumento en la síntesis de novo de las proteínas de 43, 70, 90 y 110kDa en riñón. Esta inducción es órgano-específica ya que el Hg no induce estas proteínas en hígado. Evidencias funcionales e histopatológicas indican que estos cambios en la síntesis de proteínas renales son rápidos, ya que se detectan entre 2-4 h de administrado el metal y ocurren previo al daño renal visible, sugiriendo que la inducción de hsp en riñones de ratas tratadas con HgCl₂, pudiera estar relacionada con la nefrotoxicidad descrita con este metal (Goering *et al.* 1992). La inhibición concomitante de la síntesis de otras proteínas constitutivas de riñón, como son las proteínas de 38 y 68kDa, pudiera ser suficiente para causar cambios mayores en ciertas rutas metabólicas, que determinarán el inicio de la toxicidad del mercurio.

Se han propuesto mecanismos diferentes por los cuales los metales inducen a las hsp. Uno de ellos propone que la inducción es mediada a través de daño oxidativo sobre las membranas celulares o el DNA, por la generación de radicales libres por la formación de peróxidos lipídicos. Un segundo mecanismo propone que la inducción de hsp envuelve eliminación de grupos de tioles intracelulares, por reacción del metal con grupos sulfhidrilos. Un tercer mecanismo propone la inducción por proteotoxicidad debida a la generación de proteínas aberrantes o desnaturalizadas (revisado por Goering y Fisher 1995).

Ha sido importante el interés que han generado las hsp, lo que se traduce en publicaciones en diversas áreas que abarcan aspectos bioquímicos, genéticos, fisiológicos, patológicos, clínicos e inmunológicos ya que, con respecto a este último se ha evidenciado que las hsp ejercen numerosas funciones como en el procesamiento y presentación de antígenos, la inflamación en enfermedades inflamatorias, en inmunidad anti-neoplásica, en infecciones ya que constituyen antígenos relevantes contra los que se dirige la respuesta inmune, así como en la inducción de autoinmunidad. Asimismo,

se cree que la expresión de hsp propias por encima de un nivel crítico o bien por tiempo prolongado puede romper la tolerancia desencadenando autoinmunidad (Lamb *et al.* 1989, Kaufmann y Schoel 1994, Frostergård 1997, van Eden *et al.* 2003).

Se han propuesto a las hsp como la interfase entre la tolerancia y la autoinmunidad (Winfield y Jarjour 1991), por cuanto constituyen un blanco importante en enfermedades infecciosas, con homólogos muy similares que podrían generar una respuesta autoinmune por reacción cruzada entre epítomos, como ha sido demostrado, por ejemplo, en la infertilidad por factor tubárico en mujeres infectadas por *Chlamydia trachomatis* (Neuer *et al.* 2000)

Proteínas de estrés y testículo

Las hsp no sólo cumplen una función de protección en los casos en que existen condiciones adversas al organismo, sino que también se expresan en tejidos normales y están involucradas en los procesos celulares normales como el crecimiento y desarrollo o progresión a través del ciclo celular (Neuer *et al.* 2000). Con respecto a esto, cabe destacar que en condiciones normales se han identificado y caracterizado diversas hsp en células testiculares, existiendo consenso, sobre la expresión de diferentes miembros de las familias de las hsp60, 70 y 90 (revisado por Ogi *et al.* 1999). Algunas de estas se expresan constitutivamente, otras están reguladas en las diferentes etapas del desarrollo, algunas son específicas del testículo, y otras sólo son expresadas en situaciones de estrés. Más aún, la expresión de las hsp es un evento altamente regulado en la espermatogénesis, y se han reportado notables diferencias en las hsp expresadas, que dependen de la línea celular considerada y de su etapa de desarrollo y diferenciación (Sarge y Cullen 1997).

Las hsp se expresan diferencialmente en los diferentes tipos de células espermatogénicas a fin de cubrir sus necesidades específicas. Durante la espermatogénesis las células germinales sufren marcadas alteraciones en la expresión génica, lo que resulta en cambios tanto en el tipo como en la cantidad de proteínas presentes en cada tipo de célula germinal, por lo que se ha sugerido que las hsp expresadas específicamente en el testículo, van a cumplir una función de chaperonas moleculares de aquellas proteínas propias de cada estadio de las células espermatogénicas (Sarge y Cullen 1997, Ogi *et al.* 1999).

En ratas adultas, la hsp 90 se encuentra en el citoplasma de las espermatogonias y los espermatoцитos en pre-leptoteno y leptoteno muestran una alta reactividad, siendo

muy baja la expresión en espermatoцитos secundarios y espermátidas y nula en espermatozoides. Esto indica que su expresión se reduce gradualmente durante la espermatogénesis. Se conoce que hsp 90 se asocia con varios receptores de hormonas esteroideas que no se unen con DNA, lo cual podría concordar con el hecho de un alto número de receptores de hormonas esteroideas están presentes en las células germinales premeióticas (Ohsako *et al.* 1995). Se sabe que hsp90 es responsable del mantenimiento en estado inactivo del receptor nuclear de andrógenos. Al separarse esta proteína del complejo, se descubren los dominios funcionales del receptor, necesarios para el transporte nuclear, dimerización y unión con el DNA (Weinbauer *et al.* 2001).

En humanos, la deficiencia en la expresión de algunas hsp está asociada con trastornos en la espermatogénesis como en los bloqueos madurativos y en el síndrome de células de Sertoli sólo (Son *et al.* 2000)

Al igual que otros tipos de células, las testiculares sintetizan rápidamente hsp, en respuesta a estímulos ambientales adversos, como en el caso de hipertermia, determinando cambios en los patrones de hsp expresados, con respecto a los presentes en condiciones normales. Con respecto a esto, se han descrito diferentes hsp cuya expresión está regulada por el desarrollo y no aumentan en su expresión por tratamiento con calor. No obstante, existe otro grupo de hsp cuya expresión aumenta en las células tras exposición a elevadas temperatura. Es importante señalar, que en muchas especies la temperatura de los testículos debe mantenerse significativamente por debajo que aquella de los tejidos del resto del cuerpo. Así en mamíferos, la temperatura de los testículos es de 30°C mientras que la del resto de los tejidos es de 37°C (Sarge y Cullen 1997). Las hsp inducibles por el estrés complementan las funciones normales de las hsp constitutivas y expresadas durante el desarrollo, de manera de proteger procesos celulares críticos como son la síntesis de proteínas o el ciclo celular, por lo tanto las proteínas de estrés constituyen una respuesta fisiológica al estrés exógeno y servirían para prevenir que éste conduzca a efectos adversos (Dix y Hong 1998).

Existen evidencias de modelos experimentales diferentes a testículo que han indicado que, por encima de un cierto umbral (sea exposición crónica al agente estresante o altas concentraciones de proteínas celulares desnaturalizadas), las hsp no continúan desempeñando su papel protector a pesar de estar sobre-expresadas, lo que se traduce en daño celular, que puede incluso conducir a la muerte de las células con alteraciones en los órganos

implicados (Goering *et al.* 2000).

Como ya se ha expuesto, el GIRH ha demostrado que la administración de dosis subtóxicas de HgCl₂ por vía oral a ratas de la cepa Sprague-Dawley, conduce al depósito del metal en testículo y epidídimo induciendo daño progresivo en estos órganos (Penna *et al.* 2009). Asimismo, provoca la aparición de autoanticuerpos tanto de tipo IgG como IgM en el espesor del epitelio tubular de testículo y dirigidos contra espermatozoides ubicados en el lumen de los túbulos y aislados del epidídimo (Penna 1996, Pocino *et al.* 2002).

Ya que el Hg puede inducir una respuesta de estrés, con el consecuente aumento en la expresión de hsp y/o modificaciones sustanciales en las hsp expresadas normalmente en células espermatogénicas, y debido además, a que estos cambios pudieran explicar las alteraciones descritas arriba e inducidas por el mercurio en el tracto reproductor masculino, nos propusimos investigar las posibles modificaciones en la expresión de hsp60, 70 y 90 en células de testículo y de epidídimo obtenidas de ratas tratadas con dosis subtóxicas de HgCl₂, con el objeto de caracterizar mejor los mecanismos involucrados en la inducción de los daños mediados por el Hg sobre testículo y epidídimo. Por otro lado, decidimos estudiar también la expresión de estas hsp en células de timo, bazo y ganglios linfáticos a fin de analizar las posibles modificaciones en órganos del sistema inmune por la exposición al metal y asociarlas con las del sistema reproductor masculino.

La ingesta de mercurio, aún en concentraciones subtóxicas, es capaz de inducir en períodos tempranos del tratamiento, un aumento en la expresión intracelular de las hsp60, 70 y 90, así como en la expresión de hsp60 en la superficie de poblaciones celulares aisladas de testículo y epidídimo en el sistema reproductor masculino, y de timo y bazo en el sistema inmunológico. Cabe destacar que en muchos casos, las células de animales a los que se les administró 0,05 µg de HgCl₂ por vía oral, expresaron niveles de hsp similares e incluso mayores a los detectados en células de animales controles, que habían sido tratadas con hipertermia.

Se ha propuesto que las diferencias en la inducción de proteínas de estrés pueden reflejar diferencias en los mecanismos de acción por los cuales metales específicos producen toxicidad (Goering *et al.* 2000). Estos estudios contribuyen a explicar en parte algunos de nuestros resultados: En primer lugar, cuando se analiza la expresión de hsp60 en la superficie celular o de las hsp60, 70 y 90 a nivel intracelular, se puede ver que los niveles

de las mismas variaban sustancialmente en los diferentes órganos obtenidos de los animales control. En segundo lugar, la hipertermia no indujo mayor expresión de hsp intracelulares o de superficie, en todos los tipos celulares analizados, independientemente de que provinieran de animales tratados con Hg o de animales control.

Se ha demostrado que la inducción de hsp por agentes químicos *in vivo*, ocurre en los sitios de daño tisular (revisado por Goering *et al.* 2000). En un estudio de hepatotoxicidad por cocaína, se demostró que sólo los hepatocitos con marcados cambios histológicos acumulaban hsp 25 y 70 inducibles (Salminen *et al.* 1997). Asimismo, en un estudio de nefritis inducida por mercurio se describió aumento en la acumulación de hsp72 y grp94, varias horas antes o conjuntamente con el desarrollo de la nefrosis, demostrándose una correlación positiva entre la acumulación de algunas proteínas de estrés y el daño agudo inducido por Hg en células de riñón. A pesar de esto, mediante inmunohistoquímica se describe que la síntesis de hsp ocurre predominantemente en células intactas, sugiriendo que las mismas son más resistentes al daño, debido a las propiedades citoprotectoras de las hsp inducibles. La falta de acumulación de hsp en las células que sufren daño, pudiera estar relacionada con desarrollo de daño celular irreversible, antes de que se sintetizen las hsp adecuadas (Goering *et al.* 2000). Esto ha llevado a proponer que la incapacidad de tejidos específicos de expresar hsp en niveles adecuados para conferir protección y contrarrestar la situación estresante, pudiera estar relacionada con la susceptibilidad de estos tejidos a sufrir daño por agentes tóxicos (Fisher *et al.* 1995).

Las hsp han despertado un gran interés, desde el punto de vista inmunológico. Por un lado, las hsp bacterianas atrajeron atención por ser moléculas altamente inmunogénicas capaces de activar un gran número de células T. Por otra parte, se ha descrito que las hsp pueden actuar como transportadoras de péptidos antigénicos derivados de células infectadas por virus y células tumorales, por lo que se ha propuesto que las hsp pueden presentar antígeno (Wallin *et al.* 2002). En tal sentido se ha descrito que las hsp en general y la hsp70 y 90 en particular, unen péptidos inmunogénicos tanto *in vivo* como *in vitro*, constituyendo estos complejos hsp-péptido un punto alternativo de reconocimiento antígeno-específico en diversos sistemas (Gullo y Teoh 2004).

También se ha considerado desde hace algún tiempo, a las hsp como mediadoras de autoinmunidad. Se ha demostrado asociación entre una expresión aberrante de hsp propias y enfermedad (revisado por Wu *et al.*

2001), conduciendo a la producción de autoanticuerpos contra hsp en pacientes con enfermedades inflamatorias, desórdenes autoinmunes, hipertensión, aterosclerosis, o también después de diferentes infecciones por virus, bacterias, micobacterias y parásitos (Kaufmann y Schoel 1994, Frostegård *et al.* 1997, Wu *et al.* 2001). Un ejemplo de esto serían los altos títulos de anticuerpos contra hsp65 descritos en diversas enfermedades crónicas inflamatorias y autoinmunes que incluyen la artritis reumatoide, artritis juvenil, diabetes tipo 1, escleroderma, psoriasis y Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (revisado por Frostegård *et al.* 1997).

Esto sugiere que, independientemente de los péptidos asociados, las hsp son proteínas muy inmunogénicas que pueden actuar activando la inmunidad innata (Wallin *et al.* 2002). La liberación de hsp seguida por la captación, procesamiento y presentación de péptidos asociados por parte de las CPA podrían sensibilizar eficientemente a las células T circulantes ya que actuarían como chaperonas y como señales para la maduración de las CPA y pérdida de la tolerancia, en el caso particular del testículo (Milani *et al.* 2002, Fijak y Meinhardt 2006).

Con respecto a los mecanismos de defensa innatos, las hsp actúan señalando “peligro” a las CPA, como macrófagos y células dendríticas, tal como se ha demostrado para las hsp60 y 70. En relación con esto, recientemente se han descrito receptores para las hsp en las CPA, como son el CD14, los receptores Toll y el CD91. El CD14 une a las hsp60 y 70, los receptores Toll unen un amplio rango de moléculas biológicas entre las cuales se encuentran miembros de la familia de las hsp. Así, el TLR2 y el TLR4 unen hsp60 y hsp70. Por otro lado, el CD91 que es un receptor para α 2-macroglobulina, también une a miembros de la hsp90 humana (van Eden *et al.* 2003).

Además, se ha propuesto que el sistema inmunológico no sólo tiene que decidir contra que tiene que responder, sino que además tiene que seleccionar el tipo de respuesta adecuada para el agente agresor, y en esto el sistema inmunológico pudiera no ser el último en controlar la inmunidad, sino que lo serían los tejidos (Matzinger 2002). Cuando el tejido está sano, hay tolerancia, mientras que en el caso de tejidos estresados estos estimularían inmunidad y pudieran determinar también el tipo de respuesta efectora a desarrollarse. Con respecto a esto, cabe señalarse que desde hace tiempo se sabe que las células de ciertos tejidos van a tener influencia en la respuesta local generada, como es el caso del tipo de respuestas que se inducen en piel o en mucosas. Por otro

lado, existen órganos que tienen poblaciones especiales de linfocitos con una diversidad limitada de sus receptores y que se han descrito como “linfocitos innatos” ya que responden a moléculas de estrés propias más que contra los agentes extraños reconocidos por los “linfocitos adaptativos” (Matzinger 2002).

Tal es el caso de los linfocitos $T\gamma/\delta$ que tienen un sesgo en su reactividad hacia las proteínas de estrés, sean autólogas o de origen microbiano, y representan del 1-10% de las células T en sangre periférica, pero constituyen el principal tipo de células T en piel, intestino delgado y en los órganos reproductores donde se ha propuesto que realizan una importante función de “vigilancia”. En ese sentido, estos linfocitos representan del 33-50% de las células T en semen (Winfield y Jarjour 1991, Kauffman 1991, Muñoz *et al.* 1992, Witkin *et al.* 1996). Por otro lado, se ha propuesto que en una respuesta de estrés, las hsp producidas van a activar a células $T\gamma/\delta$ y que éstas pudieran generar autoinmunidad de diversas maneras, incluyendo la activación de linfocitos B autoreactivos productores de autoanticuerpos (Born *et al.* 1990, Winfield y Jarjour 1991)

Otra alternativa sería la especificidad de los autoanticuerpos detectados en ratas que recibieron Hg por vía oral, es que estos estén dirigidos contra antígenos propios que por asociación con las hsp sobre-expresadas pasaran a constituir neo-antígenos capaces de inducir una respuesta inmunitaria. Entre las diferentes hipótesis propuestas para explicar la formación de neo-antígenos están aquellas provenientes de estudios relacionados con apoptosis. El estrés ambiental (hipertermia, luz ultravioleta, rayos X) es un potente inductor de la muerte celular por apoptosis (Kyriakis *et al.* 1996, Samali y Orrenius 1998). Se ha sugerido que las proteínas modificadas, por proteólisis o por fosforilación, durante la apoptosis son los blancos preferidos para inducir respuestas de autoanticuerpos, probablemente debido a que algunos autoantígenos se concentran en las ampollas de la membrana, que se forman en la superficie de las células apoptóticas. De hecho, la inmunización de ratones con células apoptóticas conduce a la producción de autoanticuerpos (Zhang *et al.* 1996, Mevorach *et al.* 1998).

Con respecto a esto y, como ya ha sido expuesto, es importante recordar que el Hg interfiere con las funciones protectoras de la barrera hemato-testicular y la esteroidogénica, al afectar a las células de Sertoli y de Leydig, respectivamente (Penna *et al.* 2004).

Un hecho interesante es que hsp90 y hsp70 están

relacionadas con el mantenimiento de la integridad del receptor para hormonas esteroideas, el cual es un receptor citoplasmático (Kimmings y MacRae 2000). La sobre-expresión de estas hsp a nivel citosólico, como consecuencia del tratamiento con Hg, pudiera determinar alteraciones en el normal funcionamiento de dicho receptor. Esto podría contribuir con las posibles alteraciones a nivel del tracto reproductor masculino, ya que por un lado, habría menores niveles de testosterona, ocasionada por una menor producción de la misma, y por otro lado, una menor funcionalidad biológica de esta hormona, por alteraciones del receptor (Fig. 6).

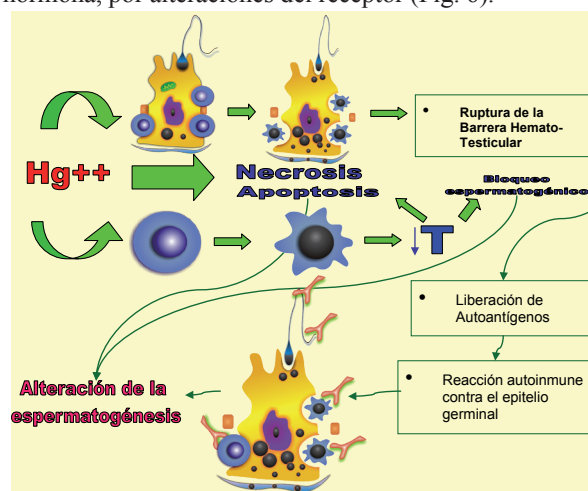


Figura 6. Posibles mecanismos de alteración de la respuesta inmune y de las funciones testiculares por efecto del Mercurio.

Se ha sugerido que una disminución en los niveles de testosterona puede determinar una mayor apoptosis, debido a un aumento del estrés oxidativo en los tejidos. De hecho, se ha demostrado que la suplementación con testosterona es capaz de suprimir los efectos deletéreos del envejecimiento en el tracto masculino debidos a apoptosis (Bustos-Obregón y Esponda 2004).

La administración de mercurio induce la expresión temprana de hsp60, 70 y 90 intracelular y de hsp60 en la superficie de las células de los órganos del sistema reproductor y del sistema inmunitario y determina la inducción de autoanticuerpos tanto de tipo IgM como IgG, que reaccionan con células de todo el linaje germinal y con espermatozoides maduros, lo que sugeriría que el daño testicular y epididimario observado, pudiera ser mediado por estos anticuerpos (Penna 1996, Pocino *et al.* 2002, Pocino y Penna 2007).

Nuevas hipótesis

Desconocemos exactamente la especificidad de

los autoanticuerpos dirigidos contra los componentes testiculares o los espermatozoides maduros, descritos con anterioridad en los animales a los que se les administró Hg por vía oral, sin embargo es muy tentador sugerir diferentes posibilidades, en las cuales estarían implicadas las hsp. Una posibilidad es que estos autoanticuerpos dirigidos contra componentes del sistema reproductor masculino, sean específicos contra hsp. En este sentido, tal como ya se ha mencionado, innumerables trabajos han descrito la presencia de anticuerpos específicos contra hsp en diferentes enfermedades. Muchas investigaciones han sugerido que los autoanticuerpos contra las hsp pudieran tener significación en la generación, formación y pronóstico de diferentes enfermedades. Por ejemplo se ha descrito una relación directa entre anticuerpos contra hsp65 y aterosclerosis (Xu 2001).

Matzinger (1994) ha propuesto que las CPA se activan por señales de alarma o de “peligro” provenientes de células dañadas o lesionadas tales como aquellas expuestas a patógenos, toxinas, daños mecánicos, entre otros. Desde su propuesta inicial, se han descrito muchas señales de peligro que incluyen a las hsp. Estas señales pueden ser constitutivas o inducibles, intracelulares o secretadas o incluso presentes en la matriz extracelular, lo que es importante es que estas señales de peligro no deben ser enviadas por células sanas o aquellas en vía de una muerte fisiológica normal. Los miembros de la familia de las hsp son candidatos ideales ya que potencialmente señalan daño tisular o estrés celular al sistema inmunitario al sobre-expresarse rápidamente durante diversas formas de estrés celular y ser liberadas del tejido dañado (Wallin *et al.* 2002).

Con respecto a la autoinmunidad, la Teoría del Peligro propone que, dado que el estrés celular puede producir una respuesta inmunológica, algunas enfermedades autoinmunes pueden ser causadas por mutación de algunos genes que controlan la muerte fisiológica normal y el proceso de “limpieza” o por agentes patógenos o toxinas que causan estrés celular o muerte. En estos casos, el sistema inmunitario no estaría fallando, sino que estaría realizando su trabajo de responder a las señales de alarma, pero en detrimento del hospedador (Matzinger 2002).

Al presente no sabemos si el aumento en la apoptosis, observado a nivel del sistema reproductor masculino, en las ratas que reciben Hg por vía oral, está relacionado con una expresión inadecuada de hsp para contrarrestar los efectos del agente estresante crónico, o si esta apoptosis estaría relacionada con la posible inducción de anticuerpos dirigidos contra las hsp expresadas en las células de ese

sistema.

Basados en nuestros resultados y en trabajos previos descritos en la literatura, proponemos que la administración de Hg, induce un aumento en la expresión de hsp en forma sistémica, las cuales van a actuar como moléculas señalizadoras y/o activadoras de linfocitos T, conduciendo a la ruptura de la tolerancia inmunológica.

Esta activación de los linfocitos T, acompañada con fallas en la regulación inmunitaria, conduciría a la estimulación policlonal de linfocitos B con producción de autoanticuerpos, algunos de ellos dirigidos contra antígenos propios expresados en células espermáticas. Estos anticuerpos pudieran ser específicos contra hsp exclusivamente o ser anticuerpos con reactividad cruzada frente a componentes celulares de testículo y epidídimo, que posiblemente variaron su conformación química, formando neo-antígenos por asociación con las hsp inducidas.

Por otro lado, a nivel local en testículo habría una síntesis aumentada de hsp por efecto del Hg depositado en el órgano, entre otros. Esta sobre-expresión de hsp en tejidos sería reconocida por los autoanticuerpos estimulados formando complejos antígeno-anticuerpo, que pueden conducir a muerte celular determinando o potenciando las lesiones testiculares y epididimarias descritas previamente. En todo este proceso, la alteración de las células de Leydig determinaría la disminución en la producción de testosterona, la cual potenciaría las alteraciones existentes en la regulación de la respuesta inmunitaria (Fig. 7).

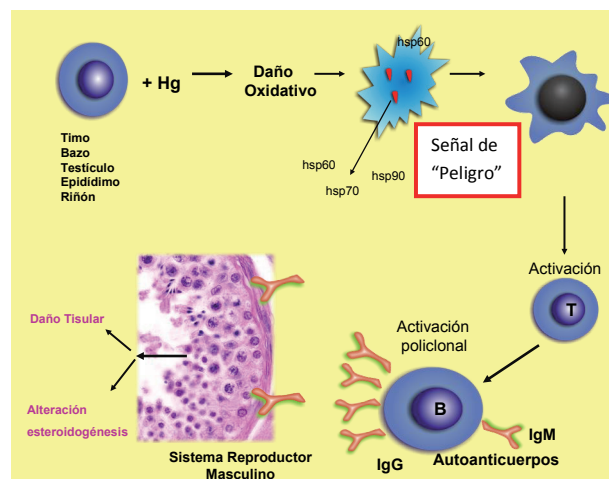


Figura 7. El Hg ocasiona daño celular que, según la Teoría de Peligro induce señales como la expresión de hsp que activarían la respuesta inmunológica contra epítomos de las células del epitelio germinal y contra las hsp.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos hasta ahora apoyan la hipótesis de que el Hg, aún a dosis subtóxicas, es capaz de provocar daño directo en células del sistema reproductor masculino e inducir respuesta de tipo celular y humoral, ocasionando daño del epitelio seminífero, por medio de varios factores, entre los que se cuentan las proteínas de estrés, lo que podría prevenir, a largo plazo, la fecundación.

AGRADECIMIENTOS

Al Grupo de Investigadores en Reproducción Humana: Marisol Pocino, Maria Moreno de Marval, Julman Cermeño, Aminta Cardozo, Marisa Gonsálves, Isabel Hernández, Julmery Cermeño y María Granadillo. A German Delgadillo por su valiosa ayuda en el diseño y digitalización de las ilustraciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS AK, MURPHY KM, SHER A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383:787-793.
- ABBAS AK, LICHTMAN A, POBER J. 1997. *Cellular and molecular Immunology*. 3 ed. Philadelphia: WB Saunders.
- AICKELIN U, DASGUPTA D. 2005. Artificial Immune Systems Tutorial. In: Burke E, Kendall G, editors. *Search Methodologies - Introductory Tutorials in Optimization and Decision Support Techniques*. Kluwer; p 375-399.
- BAGENSTOSE LM, SALGAME P, MONESTIR M. 1999a. Cytokine regulation of a rodent model of mercuric chloride-induced autoimmunity. *Environ. Health Perspective*. 107:807-810.
- BAGENSTOSE LM, SALGAME P, MONESTIER M. 1999b. Murine mercury-induced Autoimmunity: a model of chemically related autoimmunity in humans. *Immunol. Research*. 20:67-78.
- BEN-RAFAEL Z, ORVIETO R. 1992. Cytokines--involvement in reproduction. *Fertil. Steril*. 58:1093-1099.
- BIGAZZI P. 2001. Autoinmunidad inducida por metales. In: Lahita R, Chiorazzi N, Reeves W. (Edit). *Tratado de las enfermedades autoinmunitarias*. Mexico: McGraw Hill Interamericana. Cap 41; p 809-840.
- BILLIAU A. 1996. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv. Immunol*. 62:61-130.
- BORN W, HAPP MA, DALLAS A, REARDON C, KUBO R, SHINNICK T, BRENNAN P, O'BRIEN R. 1990. Recognition of heat shock proteins and gd cell function. *Immunol. Today*. 11:30-43.
- BUSTOS-OBREGÓN E, ESPONDA P. 2004. Ageing induces apoptosis and increases hsp 70 stress protein in the epididymis of Octon degus. *Int. J. Morphol*. 22:29-34.
- BRUHN C, RODRÍGUEZ A, BARRIOS C, JARAMILLO V, GRAS N, BECERRA J, NUÑEZ E, REYES O. 1995. Mercurio en el cabello de embarazadas y madres lactantes chilenas. *Bol. Oficina Sanit. Panam*. 119:405-414.
- CAUTAIN B, DAMOISEAUX J, BERNARD I, XYSTRAKIS E, FOURNIE E, VAN BREDA VRIESMAN P, DRUET P, SAOUDI A. 2002. The CD8 T cell compartment plays a dominant role in the deficiency of Brown-Norway rats to mount a proper type 1 immune response. *J. Immunol*. 168:162-170.
- DIX DJ, HONG RL. 1998. Protective mechanisms in germ cells: Stress proteins in spermatogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol*. 444:137-143.
- ERNST E, LAURITSEN J. 1991. Effect of organic and inorganic mercury on human sperm motility. *Pharmacol. Toxicol*. 69:440-444.
- FIJAK M, MEINHARDT A. 2006. The testis in immune privilege. *Immunol. Rev*. 213:66-81.
- FISHER BR, HEREDIA DJ, BROWN K. 1995. Induction of hsp72 in heat-treated rat embryos: A tissue-specific response. *Teratology*. 52:90-100.
- FROSTEGÅRD J, LEMNE C, ANDERSSON B, VAN DER ZEE R, ROLF KIESSLING R, DE FAIRE U. 1997. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with borderline hypertension. *Hypertension*. 29:40-48.
- GARCÍA-VELASCO JA, ARICI A. 1999. Chemokines and human reproduction. *Fertil. Steril*. 71:983-993.
- GILLESPIE K, QASIM F, TIBBATTS L, THIRU S, OLIVIERA

- D, MATHIESON PW. 1995. Interleukin-4 gene expression in mercury-induced autoimmunity. *Scand. J. Immunol.* 41:268-272.
- GOERING PL, FISHER BR. 1995. Metals and stress proteins. *In: Goyer RA, Cherian MG. (Edit). Toxicology of metals. Biochemical aspects. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer; p 129-150.*
- GOERING PL, FISHER BR, NREN BT, PAPACONSTANTINEAU A, ROJKO JL, MARLER RJ. 2000. Mercury induces regional and cell-specific stress protein expression in rat kidney. *Toxicol. Sci.* 53:447-457.
- GOERING PL, FISHER BR, CHAUDHARY PP, DICK CA. 1992. Relationship between stress protein induction in rat kidney by mercuric chloride and nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 113:184-191.
- GULLO CA, TEOH G. 2004. Heat shock proteins: to present or not, that is the question. *Immunol. Lett.* 94:1-10.
- HASSOUM S, DROUET M, LE SELLIN J, BONNEAU J, SABBAAH A. 1991. A propos des causes immunologiques de l'infertilité masculine. *Allerg. Immunol. (Paris).* 23(4):121-125.
- HUANG XR, TIPPING PG, SHUO L, HOLDSWORTH SR. 1997. Th1 responsiveness to nephritogenic antigens determines susceptibility to crescentic glomerulonephritis in mice. *Kidney Int.* 51:94-103.
- HUSTON D. 1997. The biology of the immune system. *JAMA.* 278:1804-1814.
- JEANNIN P, DELNESTE Y, LECOANET-HENCHOZ S, GAUCHAT J, LIFE P, HOLMES D, BONNEFOY J. 1995. Thiols decrease human interleukin (IL) 4 production and IL-4-induced immunoglobulin synthesis. *J. Exp. Med.* 182:1785-1792.
- JIANG Y, MÖLLER G. 1995. In vitro effect of HgCl₂ on murine lymphocytes. I preferable activation of CD4⁺ T cells in a responder strain. *J. Immunol.* 154:3318-3146.
- KAUFMANN SHE, KABELITZ D. 1991. Gamma/Delta T lymphocytes and heat shock proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 167:191-207.
- KAUFMANN SHE, SCHOEL B. 1994. Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self. *In: Morimoto RI, Tissières A, Georgopoulos C. (Edit). The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; p 495-531.*
- KIMMINS S, MACRAE TH. 2000. Maturation of steroid receptors: an example of functional cooperation among molecular chaperones and their associated proteins. *Cell Stress Chaperones.* 5:76-86.
- KITCHING AR, TIPPING PG, MUTCH DA, HUANG XR, HOLDSWORTH SR. 1998. Interleukin-4 deficiency enhances Th1 responses and crescentic glomerulonephritis in mice. *Kidney Int.* 53:112-118.
- KSANDER B, STREILEIN W. 1994. Regulation of the immune response within privileged sites. *In: Mechanisms of immune regulation. Granstein R. (Edit). Chem. Immunol.* 88:117-145.
- KYRIAKIS J, AVRUCH J. 1996. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays.* 18:567-577.
- LAMB JR, BAL V, MENDEZ-SAMPEIRO P, MEHLERT A, SO A, ROTHBARD J, JINDAL S, YOUNG RA, YOUNG DB. 1989. Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *Int. Immunol.* 1:1-8.
- LATCHMAN DS. 1998. Heat shock proteins. Protective effect and potential therapeutic use. *Int. J. Mol. Med.* 2:375-381.
- LEE J, RICHBURG J, YOUNKIN S, BOEKELHEIDE K. 1997. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology.* 138:2081-2088.
- LEINO T, LODENIUS M. 1995. Human hair mercury in Tucuruí area, State of Pará, Brazil. *Sci. Total Environ.* 175:119-125.
- MADDOCKS S, PARVINEN M, SÖDER O, PUNNONEN J, PÖLLANEN P. 1990. Regulation of the testis. *J. Reprod. Immunol.* 18:33-50.
- MALM O, BRANCHES F, AKAGI H, CASTRO M, PFEIFFER W, HARADA M, BASTOS W, KATO H. 1995. Mercury and Methylmercury in fish and human hair from

- the Tapajos river basin. Brazil. Sci. Total Environ. 175:141-150.
- MARSHBURN PB, KUTTEH WH. 1994. The role of antisperm antibodies in infertility. Fertil. Steril. 62:799-811.
- MATHIESON P. 1995. Mercury: god of Th2 cells? Clin. Exp. Immunol. 102:229-230.
- MATZINGER P. 2002. The Danger Model: A renewed sense of self. Science. 296:301-305.
- MATZINGER P. 1994. Tolerance, danger and the extended family. Ann. Rev. Immunol. 12:991-1045.
- MEVORACH D, ZHOU J, SONG X, ELKON K. 1998. Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. J. Exp. Med. 188:387-392.
- MILANI V, NOESSNER E, GHOSE S, KUPPNER M, AHRENS B, SCHARNER A, GASTPAR R, ISSELS RD. 2002. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. Int. J. Hyperthermia. 18:563-575.
- MOHAMED M, BURBACHER T, MOTTET N. 1987. Effect of methyl mercury on testicular functions in *Macaca fascicularis* monkeys. Pharmacol. Toxicol. 60:20-36.
- MORIMOTO RI, TISSIÈRES A, GEORGOPOULOS C. 1990. The stress response, function of the proteins, and perspectives. In: Morimoto RI, Tissièrès A, Georgopoulos E. (Edit). The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; p 1-36.
- MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA, COFFMAN RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. 136:2348-2357.
- MUÑOZ MG, POSNETT DN, WITKIN SS. 1992. Enrichment of gd T lymphocytes in human semen; relation between gd T cell concentration and antisperm antibody status. J. Reproduct. Immunol. 22:47-57.
- NAKAGAWA R. 1995. Studies on the levels in atmospheric concentrations of mercury in Japan. Chemosphere. 31:2669-2676.
- NEUER A, SPANDORFER SD, GIRALDO P, DIETERLE S, ROSENWAKS Z, WITKIN SS. 2000. The role of heat shock proteins in reproduction. Hum. Reprod. Update. 6:149-159.
- NG T, LIU W. 1989. Toxic effect of heavy metals on cells isolated from the rat adrenal and testis. In Vitro Cell Dev. Biol. 26:24-28.
- OGI S, TANJI N, ISEDA T, YOKOYAMA M. 1999. Expression of heat shock proteins in developing and degenerating rat testis. Arch. Androl. 43:163-171.
- OHSAKO S, BUNICK D, HAYASHI Y. 1995. Immunocytochemical observation of the 90 KD heat shock protein (HSP90): high expression in primordial and pre-meiotic germ cells of male and female rat gonads. J. Histochem. Cytochem. 43:67-76.
- PALHETA D, TAYLOR A. 1995. Mercury in environmental and biological samples from gold mining in the Amazon region of Brazil. Sci. Total Environ. 168:63-69.
- PELLETIER L, DRUET P. 1995. Immunotoxicology of metals. In: Toxicology of metals. Biochemical aspects. Goyer RA, Cherian MG. (Edit). Handbook of Experimental Pharmacology. Springer; 115:77-92.
- PENNA S. 1996. Autoanticuerpos testiculares en ratas Sprague-Dawley inducidos por la ingestión de dosis subletales de HgCl₂. [Tesis de Grado MSc] Caracas: IVIC.
- PENNA S, CARDOZO A, BARRETO H. 2004. Mercury (HgCl₂) as an inducer of apoptosis in seminiferous epithelium. Andrologia. 36(S1):200.
- PENNA S, POCINO M, MARVAL MJ, LLORETA J, GALLARDO L, VILA J. 2009. Modifications in rat testicular morphology and increases in IFN-gamma serum levels by the oral administration of subtoxic doses of mercuric chloride. Syst. Biol. Reprod. Med. 55(2):69-84.
- POCINO M, PENNA S. 2007. Oral administration of sublethal doses of HgCl₂ increases the expression of heat-shock proteins (hsp) in reproductive and lymphoid organs and IFN- γ serum levels in rats.

- Proceedings of the 13th International Congress of Immunology. Aug 21-25; Rio de Janeiro, Brazil.
- POCINO M, PENNA S, MARVAL MJ, LLORETA J, GALLARDO L. 2002. Oral administration of sublethal doses of mercury induces morphological and immunological modifications in testis with alterations in testosterone production in rats. *Brain Behav. Immun.* 16 (S1):207.
- POCKLEY AG. 2003. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet.* 362(9382):469-476.
- PÖLLANEN P, UKSILA J. 1990. Activation of the immune system in the testis. *J. Reprod. Immunol.* 18:77-87.
- PUNYICZKI M, FÉSÜS L. 1998. Heat shock and apoptosis. The two defense systems of the organism may have overlapping molecular elements. *Stress of Life: From molecules to man. Ann. New York Acad. Sci.* 851:67-74.
- RING G, DAI Z, SALEEM S, BADDOURA F, LAKKIS F. 1999. Increased susceptibility to immunologically mediated glomerulonephritis in IFN- γ deficient mice. *J. Immunol.* 163:2243-2248.
- ROBERTSON SA, BRÄNNSTRÖM M, SEAMARK RF. 1992. Cytokines in rodent reproduction and the cytokine-endocrine interaction. *Curr. Opin. Immunol.* 4:585-590.
- ROITT I, BROSTOFF J, MALE D. 1998. *Immunology*. 5ta. ed. Mosby Edit. pp 423.
- ROWLEY B, MONESTIER M. 2005. Mechanisms of heavy-metal autoimmunity. *Mol. Immunol.* 42:833-838.
- RUTANEN EM. 1993. Cytokines in reproduction. *Ann. Med.* 25:343-347.
- SALEEM S, DAI Z, COELHO SN, KONIECZNY BT, ASSMANN KJ, BADDOURA FK, LAKKIS FG. 1998. IL-4 is an endogenous inhibitor of neutrophil influx and subsequent pathology in acute antibody-mediated inflammation. *J. Immunol.* 160:979-984.
- SALMINEN WF JR, ROBERTS SM, FENNA M, VOELLMY R. 1997. Heat-shock protein induction in murine liver after acute treatment with cocaine. *Hepatology.* 25:1147-1153.
- SAMALI A, ORRENIUS S. 1998. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones.* 3:228-236.
- SARGE KD, CULLEN KE. 1997. Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis. *Cell Mol. Life Sci.* 53:191-197.
- SETCHELL B, UKSILA J, MADDOCKS S, PÖLLANEN P. 1990. Testis physiology relevant to immunoregulation. *J. Reprod. Immunol.* 18:19-32.
- SON WY, HAN CT, HWANG SH, LEE JH, KIM S, KIM YC. 2000. Repression of hspA2 messenger RNA in human testes with abnormal spermatogenesis. *Fertil. Steril.* 73:1138-1144.
- SWEET L, ZELIKOFF J. 2001. Toxicology and immunotoxicology of mercury: A comparative review in fish and humans. *J. Toxicol. Environ. Health B.* 4:161-205.
- SZETO K, GILLESPIE K, MATHIESON P. 1999. Low-Dose Mercuric Chloride Induces Resistance in Brown Norway Rats to Further Mercuric Chloride by Up-Regulation of Interferon- γ . *Scand. J. Immunol.* 50:195-201.
- VAN EDEN W, KOETS A, VAN KOOTEN P, PRAKKEN B, VAN DER ZEE R. 2003. Immunopotentiating heat shock proteins: negotiators between innate danger and control of autoimmunity. *Vaccine.* 21:897-901.
- VIVAS G, LOZANO J, VELASCO J. 2007. Regulación inmunotesticular y citoquinas. *Invest. Clin.* 48:107-121.
- WALLIN RPA, LUNDQVIST A, MORÉ SH, VON BONIN A, KIESSLING R, LJUNGGREN HF. 2002. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* 23:130-135.
- WEINBAUER GF, GROMLL J, SIMINO M, NIESCHLAG E. 2001. Physiology of testicular function. *In: Nieschlag E, Behre HM (Edit). Andrology. Male Reproductive health and dysfunction.* Berlin: Springer; p 23- 61.
- WELCH WJ. 1992. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* 72:1063-1081.
- WENSKY A, GARIBALDI M, LAFAILLE J. 2001. The role of

- IFN- γ in the production of Th2 subpopulations: Implications for variable Th2-mediated pathologies in autoimmunity. *J. Immunol.* 167:3074-3081.
- WINFIELD JB, JARJOUR WN. 1991. Stress proteins, Autoimmunity, and autoimmune diseases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 167:161-189.
- WITKIN SS, JEREMIAS J, BONGIOVANNI AM, MUÑOZ MG. 1996. Immune regulation in the male genital tract. *Infect. Dis. Obst. Gynecol.* 4:131-135.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). 1991. Environmental Health criteria 118. Inorganic Mercury. Geneva.
- WU T, CHEN S, XIAO C, WANG C, PAN O, WANG Z, XIE M, MAO Z, WU Y, TANGUAY RM. 2001. Presence of antibody against the inducible Hsp71 in patients with acute heat-induced illness. *Cell Stress Chaperones* 6:113-120.
- XU Q. 2001. Heat shock proteins and atherosclerosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 31:283-284.
- YULE T, MAHI-BROWN C, TUNG K. 1990. Role of testicular autoantigens and influence of lymphokines in testicular autoimmune disease. *J. Reprod. Immunol.* 18:89-103.
- ZHANG C, AO A, SETH A, SCHLOSSMAN A. 1996. A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J. Immunol.* 157:3980-3987.