

La modulación de la síntesis de IL-2 e IFN- γ por células mononucleadas humanas se asocia a la inmunosupresión fisiológica del fluido epididimario

Alain R Rodríguez-Orozco, MD, PhD;* Lorenzo E Mallea Sánchez, MD; Ada J Machado Curbelo, MD;** Biólogo, Víctor Cabrera Oliva, PhD;*** Química, María de los A Carbonell Viamontes****

RESUMEN

Fundamento y objetivo: La IL-2 y el IFN- γ desempeñan un importante papel en la activación y proliferación linfocitaria. El propósito de este estudio fue analizar si el efecto inhibidor del epidídimo humano sobre la respuesta inmune está relacionado con la modulación de la producción de IL-2 e IFN- γ . **Material y métodos:** Se obtuvieron células mononucleadas (*Ficoll-paque d = 1.077*) de sangre periférica de donantes sanos y fueron estimuladas con fluido proveniente de homogeneizados de epidídimos humanos de un donante de órganos y de un paciente sometido a castración quirúrgica. Una vez constatada la inhibición del crecimiento de las células mononucleadas se determinaron por ELISA, IL-2 e IFN- γ en los sobrenadantes de cultivos de células mononucleadas estimuladas con fluido epididimario y los resultados se expresaron como índices de inhibición o estimulación de la síntesis de estas citocinas. **Resultados:** El efecto inhibidor del fluido epididimario sobre la proliferación de células mononucleadas es independiente de la fuente de obtención de los homogeneizados y se asoció a una potente estimulación de la síntesis de IFN- γ , la cual mostró un máximo de $51.6 \times 10^3\%$ a la dilución 1/4 del fluido epididimario, y a la inhibición de la síntesis de IL-2, que alcanzó un máximo de 100%, a la dilución 1/4 de fluido epididimario. **Conclusiones:** La modulación de la síntesis de citocinas importantes en la respuesta inmune como IL-2 e IFN- γ es uno de los mecanismos por el que sustancias epididimarias pueden inhibir la respuesta inmune local.

Palabras clave: Interleucina 2, interferón- gamma, epidídimos humanos, inmunorregulación, proliferación celular.

ABSTRACT

Background and objective: IL-2 and IFN- γ play an important role in lymphocyte proliferation and activation. This study was undertaken to analyze if the inhibitory effect of the epididymal fluid on the immune response is associated with the modulation of the expression of IL-2 and IFN- γ . **Material and methods:** Mononuclear cells (*Ficoll-paque d = 1.077*) were isolated from blood from healthy donors and they were stimulated with epididymal fluid from everyone: an organ donor, and a man who was castrated by surgery. Once demonstrated the inhibition of proliferation of mononuclear cells, the levels of IL-2 and IFN- γ was determined by ELISA in supernatants of cultures of mononuclear cells stimulated with epididymal fluid and the results were expressed as inhibition or stimulation index.

* Laboratorio de Inmunología. División de Postgrado. Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. Instituto de Investigación Científica en Temas de Familia, Alergia e Inmunología. Morelia, Michoacán. México.

** Laboratorio de Inmunología de la Reproducción. Instituto Nacional de Endocrinología de La Habana, Cuba.

*** Subdirección de Investigaciones. Instituto Nacional del Deporte. La Habana, Cuba.

Results: The inhibitory effect of the epididymal fluid on the mononuclear cells proliferation was not associated with the source of the epididymus and it was associated with potent stimulation of the synthesis of IFN- γ up to 51.6×10^3 % in cells treated with 1/4 dilution of the epididymal fluid and with IL-2 synthesis inhibition up to 100% in cells treated with 1/4 dilution of the epididymal fluid.

Conclusions: The modulation of the synthesis of IL-2 and IFN- γ is one of the mechanisms involved in the inhibition of the local immune response by epididymal substances.

Key words: Interleukin 2, interferon-gamma, human epididymis, immune regulation, cell proliferation.

INTRODUCCIÓN

Es un hecho bien conocido que las células de la línea germinal del macho incluidos los espermatozoídes poseen antígenos que son extraños para el sistema inmune de la hembra; como éstos se expresan en la pubertad resultan también extraños para el sistema inmune del macho.¹

A pesar de esto, en la mayoría de los casos no se observa respuesta inmune de la hembra hacia los antígenos espermáticos del macho, ni respuesta autoinmune del macho contra dichos antígenos. Se ha propuesto que la falta de respuesta se debe a la presencia de factores inmunosupresores en el aparato reproductor.² Estos factores parecen provenir de las diferentes glándulas accesorias del aparato genital masculino, pues el fluido de próstata, vesículas seminales y epidídimo muestran actividad inmunosupresora *in Vitro*.³ En uno de nuestros laboratorios se comprobó que estos fluidos inhiben la proliferación de linfocitos estimulados por lectinas y la fagocitosis *in vitro*, y que el efecto más potente se obtiene con el fluido epididimario.

Se han demostrado alteraciones en la constitución del plasma seminal y en particular en la producción de citocinas en pacientes con enfermedades inflamatorias del aparato reproductor masculino y también en hombres infériles.⁴⁻⁶ Los efectos inmunosupresores *in vivo* e *in vitro* del plasma seminal son ejercidos sobre células T, B, NK y macrófagos y muchas de éstas provienen del epidídimo, de forma que resulta de interés su caracterización.

La IL-2 humana es producto de un gen situado en el cromosoma 4 y es una linfocina sintetizada y segregada primariamente por células NK, timocitos medulares activados y células T helper 1 (Th1) estimuladas por mitógenos o por interacción del complejo receptor de células T (TCR) con complejos sistema mayor de histocompatibilidad-antígeno en la superficie de células presentadoras de antígenos.⁷ La activación de las células Th induce la expresión del receptor de IL-2 y subsecuentemente la expansión de células T antígeno específicas; desde este punto de vista IL-2 es un factor autocrino, pero también actúa como estimulante paracrino influenciando la actividad de otras células del sistema inmune e incluso de estirpes celulares de otros

sistemas. En el sistema inmune estimula el crecimiento de células NK, actúa como factor estimulante del crecimiento de linfocitos B y estimula en ellos la producción de anticuerpos y potencia la función fagocítica de neutrófilos y macrófagos.^{7,8}

Las actividades biológicas de la IL-2 son mediadas por la unión de ésta a un receptor celular alfa (α), beta (β), gamma (γ) en el que las tres cadenas establecen contacto con el ligando.

El IFN γ es producido por células T CD8+, NK gamma delta y Th1 estimuladas por antígenos y mitógenos.⁵ Se ha identificado un receptor para interferón γ y su gen está localizado en el cromosoma 6 mientras que esta citocina es producida por un gen del cromosoma 12.^{7,8}

Los efectos inmunomodulatorios del IFN γ son diversos: en macrófagos y monocitos aumenta la expresión de MHC-1 aumenta la producción de IL-1, factor activador de plaquetas, peróxido de hidrógeno y protege a monocitos de las lisis mediadas por células LAK, regula negativamente la expresión de IL-8, con lipopolisacáridos e induce la producción de NO, lo que activa monocitos citotóxicos para regular negativamente la expresión del receptor del factor transformador del crecimiento beta (TGF- β), y estimula la subunidad γ del receptor de IL-2 (IL-2R). Es quimiotáctico para monocitos, aumenta la secreción de inmunoglobulina G2a (IgG2a) por células B estimuladas por lipopolisacáridos (LPS) y la inmunoglobulina G3 (IgG3) en células B no dependientes de T helper 2 (Th2).⁷ Su actividad antiviral y antiproliferativa ha sido explorada en numerosos ensayos clínicos, induce su propia expresión y su producción local se acompaña de inflamación, la cual puede acaecer en sitios distantes de aquéllos en los que se sintetizó lo que pudiera ser debido a su circulación o a la producción de éste por células que migran. El IFN- γ aumenta la expresión de ICAM-1 en células endoteliales, inhiben la proliferación celular, el crecimiento tumoral y la diferenciación de fibroblastos. Aumenta la diferenciación de células leucémicas monoblásticas y promielocíticas, aumenta la producción de endotoxinas inducidas por IL-1 en macrófagos, aumenta la generación de células T citotóxicas y la actividad NK. Estimula la diferenciación de células eritroleucémicas, la producción

de anticuerpos y la inmunidad celular. Potencia la acción del TNF en células endoteliales donde promueve la adhesión y extravasación celular a lo largo del endotelio vascular.^{7,8}

Debido al importante papel que el IFN γ y la IL-2 desempeñan sobre la proliferación y la activación linfocitaria se decide estudiar si el efecto inhibidor del epidídimo humano sobre la respuesta inmune está relacionado con la modulación de la producción de dichas citoquinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Materiales

RPMI 1640, Bicarbonato de sodio (NaHCO_3), hepes (N-2 hidroxyethylpiperazine- N-2 etanoisulfonic acid), glutamina, suero fetal bovino inactivado, cloruro de sodio (NaCl) y gradiente de concentración Ficoll Hypaque de Life Technologies, Grand Island, N. York; gentamicina, penicilina, estreptomicina y la fitohemaglutinina (PHA) de Gibco BRL. Life Technologies, Grand Island, N. Cork. Placas de 96 pocillos de Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA. Líquido de centelleo Scinttran, Timidina tritiada (^3H Timidita) con actividad específica 30 Ci/mmol de Amersham, Inglaterra, ácido fosfórico y etanol absoluto de la firma Merck (E. Merck, Darmstadt, Alemania). Albúmina bovina sérica (BSA) y azul brillante Coomasie de Sigma (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA).

Para la determinación cuantitativa de IL-2 e INF- γ se utilizaron juegos de reactivos de la firma R and D (Quantikine TM Comercial Immunoassays R and D Systems, Minneapolis, USA) que se leyeron en equipo.

2. Obtención de la muestra biológica

Los bloques de testículos y epidídimos se obtuvieron de 10 hombres, 8 de los cuales estaban comprendidos entre los 50 y 62 años, uno de 35 años y uno de 85 años, todos con antecedentes de fertilidad y no sometidos a tratamiento con hormonas esteroideas antes de la extracción de los órganos. Todos los órganos obtenidos presentaron aspecto macroscópico normal.

3. Preparación de los homogeneizados de epidídimo

Para la preparación de los homogeneizados de epidídimo se tomaron los bloques de testículo y epidídimo de 8 hombres de menos de 3 horas de fallecidos, en las salas de disección de los hospitales Calixto García y Hermanos Almejeiras; de un paciente sometido a castración quirúrgica como tratamiento para el adenocarcinoma prostático en el Hospital Manuel Fajardo, y de un paciente donante de órganos

en el Hospital Calixto García, todos estos hospitales pertenecen al Ministerio de Salud Pública de La Habana, Cuba. Los órganos fueron obtenidos bajo consentimiento de pacientes o familiares de los fallecidos y el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de las instituciones participantes.

Los bloques de testículos y epidídimo se conservaron a 4 °C en medio RPMI 1640 suplementado con penicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), fungizona (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y hepes (20 mM), pH 7.4 a partir de su extracción y fueron transportados en frascos estériles y sellados hasta el cuarto de cultivo de células del Instituto Nacional de Endocrinología de Cuba en un tiempo no mayor de 24 horas, sitio donde se realizó la disección de los epidídimos en flujo laminar.

Los epidídimos disectados bajo condiciones estériles se lavaron repetidamente por centrifugación a 4,500 rpm en solución salina estéril (NaCl 0.9%) durante 15 minutos a 4 °C, hasta obtener un sobrenadante incoloro. Los tejidos aislados fueron fragmentados individualmente sobre placas Petri y luego suspendidos en medio RPMI 1640 a razón de 10 mL de medio por gramo de peso húmedo del órgano, condiciones éstas en que los homogeneizados epididimarios muestran mayor actividad inhibidora de la proliferación linfocitaria (resultados no publicados, Laboratorio de Inmunología de la Reproducción, INEN).

Los epidídimos fueron homogeneizados por separado en un equipo Politrón (Cinemática, Suiza) por espacio de 45 segundos a máxima velocidad. Los homogeneizados se centrifugaron durante 30 minutos a 4,000 rpm en centrífuga Eppendorf. Los sobrenadantes obtenidos se esterilizaron por filtración en membranas Millipore de 0.2 μm , con esto se logró eliminar el material particular. Las muestras así obtenidas se congelaron a 20 °C en alícuotas de 400 μL hasta su procesamiento.

4. Determinación de la concentración de proteínas totales en los homogeneizados de epidídimo

La concentración de proteínas totales en los homogeneizados de epidídimo se determinó de acuerdo al método de Bradford⁹ utilizando albúmina bovina sérica como patrón.

Como los homogeneizados estaban suspendidos en RPMI 1640 se utilizó este diluente como control negativo adicional del ensayo.

5. Separación de células mononucleadas de sangre periférica

Las células mononucleadas se obtuvieron a partir de sangre venosa heparinizada de donantes sanos mediante centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hipa-

que, 20 mL de sangre se diluyeron mezclando suavemente, con 20 mL de RPMI 1640 libre de suero en tubos de centrífuga cónicos de plástico de 50 mL. Se añadieron 20 mL de la solución Ficoll-Hipaque sobre de las cuales se dejaron caer –lentamente y por las paredes 20 mL de sangre diluida. Los tubos se centrifugaron a 2,500 rpm durante 30 minutos en una centrífuga Damon (Damon-D 600 DPRF, ICE, USA) a 20 °C. El anillo de las células mononucleadas formando entre las dos superficies se recolectó por succión con una pipeta. Las células se lavaron tres veces con medio RPMI 1640 sin suero, por centrifugación a 1,500 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Las células se suspendieron finalmente en 5 mL de RPMI suplementado con antibióticos y suero fetal bovino inactivado al 10%. La variabilidad celular se determinó por conteo de las células que excluyeron una solución de azul de tripán al 0.4%. La suspensión celular se ajustó a una concentración final de 2×10^6 células/mL.

6. Determinación en los homogeneizados de epidídimo humano de la actividad inhibidora de la proliferación linfocitaria

La actividad inhibidora de la proliferación linfocitaria se determinó por incubación en placas de 96 pocosillos de diferentes diluciones de los homogeneizados (1/64, 1/32, 1/16, 1/8, 1/4) con células linfocitarias.

Las células fueron contadas en hemocitómetro y se ajustaron a una concentración final de 2×10^5 células por pozo. La concentración de PHA añadida a los cultivos fue de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la cual se estimó óptima en experimentos previos. Se usó siempre como diluente RPMI 1640 + suero fetal bovino inactivado 10%.

Muestras y controles se montaron por sextuplicado y se añadieron a la placa en los siguientes volúmenes.

	Células	Medio	PHA	Homogeneizado
Control -	100 μL	150 μL	–	–
Control +	100 μL	50 μL	100 μL	–
Muestras	100 μL	–	100 μL	50 μL

Las placas se incubaron durante 72 horas a 37 °C, en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. A las 66 horas de cultivo, se añadió 20 L de timidina tritiada a razón 1 ci por pozo, se usó como diluente RPMI 1640 + SFBI 10%, y en la mañana siguiente, las células se cosecharon en un equipo Skatron (Noruega). La radiactividad se determinó en un contador de radiaciones β (LKB, Suecia).

El porcentaje de inhibición de la proliferación linfocitaria se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$1 - \frac{\text{cpm media muestras} - \text{cpm media controles negativos}}{\text{cpm media controles positivos} - \text{cpm media controles negativos}} \times 100\%$$

7. Determinación de las concentraciones de IL-2 e IFN- γ .

Para la determinación de las concentraciones de IL-2 e IFN- γ producidas por células incubadas en presencia de los homogeneizados epididimarios; cultivos como los antes descritos; a los que no se les dio el pulso de ³H Timidina se centrifugaron a 14,000 rpm durante 14 minutos en centrífuga Eppendorf. Los sobrenadantes se conservaron a – 20 °C hasta que se realizaron las determinaciones de IL-2 e IFN- γ por ELISA.

A los controles referidos en los cultivos, se añadieron dos controles negativos adicionales: homogeneizados puros y RPMI + SFBI 10%.

Muestras y controles se montaron en la placa de cultivo por sextuplicado y por triplicado en los ELISA y los niveles de inhibición o estimulación de la síntesis de IL-2 e IFN- γ se expresaron en veces X dadas las altas cifras del analito encontradas en las muestras y el valor tendiente a 0 de los controles negativos. En este cálculo se usó la fórmula.

$$1 - \frac{\text{concentración muestras} - \text{concentración controles negativos}}{\text{concentración controles positivos} - \text{concentración controles negativos}} \times 100\%$$

RESULTADOS

En el cuadro I se relaciona la edad de los casos estudiados y la fuente de obtención de los epidídimos. El 80% de los casos estaba entre 50 y 62 años de edad y la fuente de obtención más utilizada fue la de cadáveres (80%).

La media y la desviación estándar de las determinaciones de proteínas totales determinadas por el método Bradford fue de 854 ± 137 . El coeficiente de variación estimado para este grupo de determinaciones fue del 16%.

Los resultados de los ensayos de transformación blástica para los homogeneizados epididimarios de los casos 2 y 8 produjeron una inhibición similar, la cual resultó superior al 50% a la dilución 1/4. No se estimó necesario evaluar los 8 restantes homogeneizados, obtenidos de cadáveres, fuente trabajada en nuestro laboratorio en ocasiones anteriores y donde se han encontrado resultados similares.

La curva patrón para la determinación de IL-2 mostró los siguientes parámetros: $r = 0.998$, pendiente = 0.14 e intercepto en el eje de las $y = 0.93$, lo que se consideró adecuado para las mediciones que se efectuaron.

Los niveles de IL-2 en los sobrenadantes de cultivos resultaron no detectables en los controles negativos. Los cultivos de células mononucleadas estimulados con sobrenadantes de los homogeneizados epididimarios mostraron una inhibición de la producción de IL-2

Cuadro I. Edad de los pacientes y fuente de obtención de los epidídimos en los casos estudiados.

Casos	Edad	Fuente de obtención
1	53	Cadáver
2	58	Castración
3	55	Cadáver
4	58	Cadáver
5	85	Cadáver
6	62	Cadáver
7	52	Cadáver
8	35	Donante de órganos
9	56	Cadáver
10	56	Cadáver

Cuadro II. Porcentajes de inhibición de la producción de IL-2 en cultivos de células mononucleadas de sangre periférica, estimulados con fitohemaglutinina y sobrenadantes de homogeneizados de epidídimos humanos.

Homogeneizados	Dilución	% de inhibición IL-2 (Veces X)
1	1/8	58.1
	1/4	60.3
2	1/8	–
	1/4	56.7
3	1/8	44
	1/4	100
4	1/8	70.6
	1/4	80.3
5	1/8	6
	1/4	34.3
6	1/8	32
	1/4	42.8
7	1/8	57.7
	1/4	91.2
8	1/8	0
	1/4	52
9	1/8	42.3
	1/4	100
10	1/8	100
	1/4	100

en forma dosis-dependiente. Al valorar los porcentajes de inhibición para las muestras: a dilución 1/4 se obtuvieron valores del 100% hasta el 34%. A la dilución 1/8 también se obtuvo un rango amplio de variación, éste fue de 80% hasta 0 (*Cuadro II*).

El análisis de la curva patrón para la determinación del IFN- γ arrojó un coeficiente de regresión $r = 0.997$, pendiente = 1.14 e interceptó en el eje de las $y = 0.77$, por lo que se admitió ésta para hacer las determinaciones propuestas.

Los niveles de IFN- γ en los sobrenadantes de cultivos fueron no detectables en los controles negativos.

Los cultivos con muestras a las concentraciones 1/64, luego de diluirse 20 veces en RPMI + SFBI 10% mostraron un máximo de estimulación de producción de IFN- γ de 5.7x y un mínimo de 1.4x. Luego de diluirse 1,000 veces los cultivos con concentración 1/4 de los homogeneizados se obtuvo un máximo de estimulación de la producción de IFN- γ de 51.6x y un mínimo de 13.8x (*Cuadro III*).

Al relacionarse los porcentajes de inhibición de la producción de IL-2 y los porcentajes de estimulación de la producción de IFN- γ en los cultivos trabajados a dilución 1/4 de los sobrenadantes de los homogeneizados, se observó un comportamiento variable de for-

Cuadro III. Nivel de estimulación de la producción de IFN- γ en cultivos de células mononucleadas de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina y sobrenadantes de homogeneizados de epidídimos humanos.

Homogeneizados	Dilución	Nivel de estimulación IFN- γ (Veces X)
1	1/64	1.4 x 20
	1/4	39.6 x 10 ³
2	1/64	2 x 20
	1/4	13.8 x 10 ³
3	1/64	2.9 x 20
	1/4	14.7 x 10 ³
4	1/64	2.3 x 20
	1/4	30.8 x 10 ³
5	1/64	2.3 x 20
	1/4	22.9 x 10 ³
6	1/64	2 x 20
	1/4	41.5 x 10 ³
7	1/64	2.4 x 20
	1/4	41.5 x 10 ³
8	1/64	5.7 x 20
	1/4	26.6 x 10 ³
9	1/64	2.8 x 20
	1/4	51.6 x 10 ³
10	1/64	3.1 x 20
	1/4	21 x 10 ³

ma que en homogeneizados con altos porcentajes de inhibición de la producción de IL-2 (100%) se encontraron niveles variables de la producción de IFN-γ que fueron 14.7x, 51.6x y 21x para los homogeneizados 3.9 y 10 respectivamente; y los menores niveles de estimulación de la producción de IFN-γ, se correspondieron con porcentajes de inhibición de IL-2 de 56.7 y 100% en los homogeneizados 2 y 3 (*Cuadros II y III*).

Aunque en los distintos casos estudiados se observaron diferencias cuantitativas con respecto a la inhibición de la producción de IL-2 y la estimulación de la producción de IFN-γ, en todos los casos el efecto cualitativo fue el mismo, una marcada inhibición de la producción de IL-2 y una potente estimulación de la producción de IFN-γ.

DISCUSIÓN

Se conoce que el semen es rico en proteínas, que muchas de éstas son de origen epididimario, y se caracterizan por su dependencia de hormonas esteroideas particularmente andrógenos, también se ha comentado sobre su papel en la maduración espermatíca y en la fertilización y se ha referido el hecho que no coinciden las correlaciones entre los niveles de hormonas y citocinas del plasma seminal con las correlaciones entre estas citocinas y hormonas en suero,¹⁰ esto apunta a la necesidad de profundizar en el estudio de los mecanismos que regulan la síntesis de citocinas en el plasma seminal por su implicación en cáncer, autoinmunidad y en la salud reproductiva.

Las diferencias entre las concentraciones de proteínas encontradas no son atribuibles al procedimiento ni a la fuente de obtención, tampoco a efectos de dilución de las muestras, éstas se deben a variaciones biológicas individuales.

Como era de esperar, en el ensayo de transformación blástica se encontró una inhibición de la proliferación linfocitaria asociada al aumento en la concentración de sobrenadantes de los homogeneizados.

Se obtuvieron niveles de inhibición similares para los dos homogeneizados procesados, uno proveniente de un donante de órganos y otro proveniente de un sujeto sometido a castración quirúrgica. Similar comportamiento ha sido visto en experiencias anteriores efectuadas en uno de nuestros laboratorios, éstas se realizaron mayoritariamente a partir de órganos de cadáveres y de pacientes sometidos a castración quirúrgica (datos no publicados por el laboratorio de Inmunología de la Reproducción del Instituto Nacional de Endocrinología de Cuba, INEN); internacionalmente son estas las fuentes más usadas para estudios de este tipo.³ No se consideró necesario repetir la experiencia en los casos en que los órganos fueron obtenidos de cadáveres.

Luego de reproducir este efecto "in vitro" se consideró que las muestras eran susceptibles de ser evaluadas bajo la hipótesis que eran capaces de inducir la modulación de IL-2 e IFN-γ por linfocitos del cultivo.

Varios mecanismos pudieran explicar en el plano teórico la inhibición de la proliferación linfocitaria que producen factores presentes en los homogeneizados epididimarios; en la presente experiencia dos de ellos pudieran responder al problema.

Uno de ellos sería alguna interferencia con el mecanismo de la proliferación celular que se produce cuando los linfocitos en cultivo son estimulados con un mitógeno o con un antígeno específico; dicha inducción es consecuencia del efecto de citocinas promotoras de la diferenciación y proliferación celular como es el caso de IL-2. La acción de la IL-2 puede ser bloqueada por la supresión de su síntesis o por la disminución de su expresión del receptor específico de alta afinidad para dicha molécula.

En este trabajo no se evaluó esta última posibilidad pero sí se comprobó que los homogeneizados epididimarios producen una fuerte inhibición de la producción de IL-2 que es dependiente de la concentración de homogeneizado añadida.

Es interesante el hecho de que cuando células mononucleares de sangre periférica estimuladas con mitógeno son co-cultivadas con células de coriocarcinoma se produce una inhibición de la síntesis de IL-2.¹¹ Las células de coriocarcinoma son derivadas de tejido placentario tumoral y se ha observado que la placenta presenta una proteína inmunosupresora que también se encuentra en el semen,² por lo que pudiera postularse que la supresión de la síntesis de IL-2 observada en los experimentos esté mediada por esta sustancia o alguna otra con ella relacionada.

El otro mecanismo que probablemente pueda explicar la inhibición de la linfoproliferación constatada en este trabajo es la inducción de apoptosis. La muerte celular programada es un importante mecanismo de control de la respuesta inmune y es uno de los que permiten que determinados lugares anatómicos sean sitios inmunológicamente privilegiados.

Se conoce que el ligando para el receptor Fas, inductor de apoptosis se expresa en las células de Sertoli del testículo y en epitelio de tubos seminíferos y que la expresión del sistema Fas es susceptible de regulación por citocinas.¹² Es posible que el epidídimo produzca un factor inductor de la apoptosis, ya sea que éste se exprese en la membrana celular y sea liberado por la homogeneización o que sea producido en forma soluble.

El resultado que más llama la atención en este estudio es la fuerte estimulación de la producción de IFN-γ que provoca el homogeneizado del epidídimo. Pudiera parecer contradictorio que esto coincida con

la inhibición de la proliferación celular y de la producción de IL-2, ambas citocinas son productos de células Th1. Sin embargo, se ha observado que los estímulos que aumentan la producción de IFN- γ no aumentan la de IL-2 o incluso la inhiben¹³ y también que la inducción de la proliferación celular puede manifestarse sin producción de IFN- γ ,¹⁴ de ahí que pueda plantearse que los fenómenos de la producción de IFN- γ y proliferación celular pueden transcurrir en sentidos divergentes. De hecho algunas experiencias indican que el IFN- γ desencadena la apoptosis de células T. Se ha demostrado que cuando los taquizóitos de *Toxoplasma gondii* son cultivados con monocitos, estos últimos producen una sustancia que inhibe la síntesis de ADN en linfocitos estimulados por mitógenos y que esta acción inhibidora es mediada por IFN- γ ,¹⁵ otros resultados indican que este factor monocitario podría ser la IL-15, que además compite con la IL-2 por la unión al receptor de esta última.¹⁶

Se ha observado que el entrecruzamiento de receptores CD4 en la membrana de linfocitos T estimula la producción de IFN- γ , el que a su vez aumenta la expresión del mediador de apoptosis Fas o CD95 y de hecho éste desencadena la apoptosis de las células así estimuladas. La neutralización del IFN- γ inhibe la apoptosis inducida por el entrecruzamiento de la molécula CD4 y esta inhibición se correlaciona con una regulación negativa de Fas en la membrana celular.¹³ Tal consideración apunta hacia un mecanismo fisiológico de regulación del destino celular dependiente del IFN- γ .

Se ha reportado que las cadenas α y β del receptor de IFN- γ son moduladas independientemente en la superficie de células T luego de la estimulación de éstas y que dependiendo de su expresión el IFN- γ toma parte en la dirección de la respuesta celular hacia la apoptosis o hacia la proliferación.¹⁷

Según esta experiencia, linfocitos de sangre periférica, no estimulados, expresan bajos niveles de ambas cadenas del receptor de IFN- γ . Luego de la estimulación primaria se sobreexpresa transitoriamente la cadena α , antes de que los linfocitos entren a la etapa de síntesis del ciclo celular, si éstos son co-cultivados con IL-2 y ocurre una reacción con mitógenos o anticuerpos anti CD3, ambas cadenas del receptor de IFN- γ se sobreexpresan y la célula va hacia la apoptosis. Esta apoptosis es inhibida si el IFN- γ interactúa sólo con la cadena α del receptor, cuando ésta se sobreexpresó inicialmente. El bloqueo de ésta inhibe la apoptosis y restablece la capacidad proliferativa. Según otros autores la IL-2 puede ser la señal que sobreregula la expresión de las cadenas α y β del receptor de IFN- γ y desde este criterio serían más susceptibles de esta actividad regulatoria los linfocitos T maduros.¹⁷

En ratones se han reportado efectos antiproliferativos del IFN- γ en células Th 2 pero no en Th 1, dependiendo de la expresión de la cadena β del receptor de IFN- γ lo cual sólo tiene lugar en linfocitos murinos Th 2. La pérdida de esta cadena confiere a las células Th 1 un estado de resistencia a las señales de activación inducidas por IFN- γ .^{18,19}

Si esto ocurriese en humanos podría pensarse que la apoptosis en los cultivos de linfocitos estimulados con sobrenadante de los homogeneizados epididimarios y con PHA; es predominantemente de células Th 2 y que quedan disponibles aún un buen número de células Th 1 capaces de producir grandes cantidades de IFN- γ .

Aun cuando la IL-2 juega un papel central en la activación de los linfocitos T²⁰ y Fas interviene en la transducción de señales de activación,²¹ se sugiere que una secreción fisiológica de IFN- γ y su unión a la cadena α del receptor de IFN- γ puede regular la expresión de la cadena α del receptor de IL-2 y de Fas, pues la expresión de ambos es inhibida por la neutralización del efecto del IFN- γ que se produce al bloquear la cadena α de su receptor.¹³

De acuerdo a esto, el bloqueo temprano de la cadena α del receptor de IFN- γ pudiera regular negativamente la expresión de la cadena α del receptor de IL-2, lo que pudiera explicar en parte la actividad antiproliferativa mediada por IFN- γ . En este trabajo no se dispone de datos suficientes para apoyar esta hipótesis.

Se ha observado también que el IFN- γ induce apoptosis de linfocitos T estimulados en ausencia de células accesorias y en presencia de grandes cantidades de IL-2.²²

Sobre el papel compartido del IFN- γ e IL-2 en la regulación de la apoptosis resulta interesante señalar que las cadenas α de los receptores del IFN- γ e IL-2 están sobreregulados en la superficie de linfocitos T que están en apoptosis.^{23,24}

Varios estímulos, sin embargo pueden regular la cadena α del receptor del IFN- γ y otras señales de crecimiento pueden determinar indirectamente si el IFN- γ promueve la proliferación o apoptosis.

De tal forma los fenómenos: producción de IFN- γ y proliferación linfocitaria pueden ocurrir con relativa independencia y la asociación de estos fenómenos a la modulación de la producción de IL-2 necesita de estudios cinéticos y de activación celular.

Que no haya una total inhibición de la proliferación linfocitaria aun cuando la inhibición de la producción de IL-2 sea muy elevada se explicaría porque no es éste el único factor de proliferación linfocitaria y el aumento de IFN- γ en los cultivos, a pesar de estar muriendo un número considerable de células podría explicarse por una acumulación de éste en el medio de cultivo, producto de células que ya murieron y de

otras, predominantemente Th 1 que aparecen en cada ciclo celular. La otra fuente probable de IFN- γ sería a partir de células NK presentes en los cultivos celulares, aunque de por sí solo no parece explicar los altos niveles de inducción de esta citocina, por su escaso número en sangre periférica. Tal hipótesis es susceptible de contrastación.

CONCLUSIONES

Todo lo anterior nos permite postular que el epidíodo humano produce uno o más factores que ejercen un papel modulador en la función del sistema inmune del aparato reproductor y que este papel es ejercido al menos en parte a través de sus efectos sobre la producción de citocinas fundamentales en la respuesta inmune como IL-2 e IFN- γ . La dirección en que se ejerce este efecto inmunomodulador parece ser dependiente de circunstancias particulares como el estado de activación en que se encuentran las células del sistema inmune en ese lugar y momento. Esta complejidad en la regulación de la respuesta inmune no es privativa del sistema inmune local del aparato reproductor, en realidad lo mismo se ha observado cuando se ha examinado rigurosamente cualquier fenómeno biológico en que participe el sistema inmune. Resulta atractiva la idea de aislar el factor o los factores responsables de los efectos observados por su impacto en la inmunopatogenia de enfermedades autoinmunes y de transmisión sexual así como en la regulación de la fertilidad y en la inmunoprotección de mucosas contra patógenos.

REFERENCIAS

- O'Rand MG, Romrell LJ. Appearance of cell surface auto and isoantigens during spermatogenesis in the rabbit. *Rev Biol* 1997; 55: 246-58.
- Alexander NJ, Anderson DJ. Immunology of semen. *Fertil Steril* 1987; 47: 192-96.
- Anderson DJ, Tarter TH. Immunosuppressive effects of mouse seminal plasma components "in vivo" e "in vitro". *J Immunol* 1982; 128: 535-39.
- Frenette G, Legare C, Saez F, Sullivan R. Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 575-82.
- Kocak I, Dundar M, Yenisey C, Serter M, Gunaydin G. Pro-inflammatory cytokine response of the fluid contents of spermatozoa and epididymal cysts. *Androl* 2002; 34: 112-15.
- Evaluation of the cytokines in genital secretions of patients with chronic prostatitis. *Arch Ital Urol Androl* 2003; 75: 179-86.
- Catalog R&D System*. Minneapolis, 1995.
- Cytokine Bulletin*. Spring 1995. R&D System. Minneapolis, 1995.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Sterzl I, Hampl R, Hill M, Hrdá P, Matucha P. Immunomodulatory cytokines in human seminal plasma correlate with immunomodulatory steroids. *Steroids* 2003; 68: 725-31.
- Jarvis JN, Zhao L, Moore HT, Long PM, Vani Gutta P. Regulation of cytokine mRNA expression by human choriocarcinoma JAR cell. *Cell Immunol* 1996; 168: 251-257.
- Riccioli A, Starace D, D'Alessio A, Starac G, Padula F, De Cesaris P et al. TNF-alpha and IFN-gamma regulate expression and function of the Fas system in the seminiferous epithelium. *J Immunol* 2000; 165(2): 743-9.
- Oyaizu N, McCloskey TW, Than S, Hu R, Kalyanaraman VS, Pahwa S. Cross-linking of CD4 molecules up regulates Fas antigen expression in lymphocytes by inducing IFN- γ and tumor TNF- α secretion. *Blood* 1994; 84: 2622-25.
- Arase H, N Arase; T Saito. IFN- γ production by Natural Killer (NK) cells and NK 1.1 + T cells upon NKR-P1 cross-linking. *J Exp Med* 1996; 183: 2391-96.
- Channon JY, LH Kasper. *Toxoplasma gondii* induced immune suppression by human peripheral blood monocytes. Role of IFN- γ . *Infect Immunol* 1996; 64: 1181-89.
- Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, Marien MJ, Boiani N, Grabstein K et al. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of IFN- γ by natural killer cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1995; 96: 2575-92.
- Novelli F, Bernabe P, Ozmen L, Rigomonti L, Allione A, Pestka S et al. Switching on of the proliferation or apoptosis of activated human T lymphocytes by IFN- γ is correlated with the differential expression of the alpha and beta chains of its receptor. *J Immunol* 1996; 157: 1938-43.
- Pernis A, Gupta S, Gollob KJ, Garfein E, Coffman RL, Schindler C et al. Lack of IFN- γ receptor β -chain and the prevention of IFN- γ signalling in Th1 cells. *Science* 1995; 269: 245-49.
- Bach EA, Szabo SJ, Dighe AS, Ashkenazi A, Aquet M, Murphy KM et al. Ligand-induced autoregulation of IFN- γ receptor β -chain expression in T helper cells subsets. *Science* 1995; 270: 1215-18.
- Smith KA. Cytokines in the nineties. *Eur Cytokine Net* 1990; 1: 7-10.
- Alderson MR, Armitage RJ, Marakowski E, Tough TW, Roux E, Schooley K et al. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med* 1993; 178: 2231-36.
- Liu Y, CA Janeway. IFN- γ plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self tolerance. *J Exp Med* 1988; 172: 1735-39.
- Novelli F, Di Pierro F, Francia Di Celle P, Bertini S, Affadati P, Garotta G et al. Environmental signals influencing expression of the IFN- γ receptor on human T cells control whether IFN- γ promotes proliferation or apoptosis. *J Immunol* 1994; 152: 496-501.
- Kishimoto HC, Surb D, Sprent J. Upregulation of surface markers on dying thymocytes. *J Exp Med* 1995; 181: 649-652.

Dirección para correspondencia:

Dr. Alain R Rodríguez-Orozco.
División de Postgrado. Facultad de
Medicina "Dr Ignacio Chávez". Universidad
Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
Rafael Carrillo esquina Salvador González
Herrejón s/n. Bosque Cuauhtémoc. Colonia
Centro. 58000. PO Box 136. Morelia.
Michoacán, México. Tel + 443 3120014
ext 229. E-mail: arorozco@hotmail.com