

Apoptosis en el testículo contralateral tras lesión testicular unilateral. Estudio experimental*

R.M. Paredes Esteban¹, R. Ramírez Chamond², J. Carracedo Añón², M. Rodríguez Portillo², J.I. Garrido Pérez³, J.M. Ocaña Losa³, F. Pizarro de Celis³

¹Sección de Cirugía Pediátrica, Hospital «Ciudad de Jaén», Jaén. ²Unidad de Investigación, Hospital Universitario «Reina Sofía», Córdoba. ³Servicio de Cirugía Infantil, Hospital Universitario «Reina Sofía», Córdoba.

RESUMEN: Introducción. Los resultados de estudios clínicos y experimentales demuestran que determinadas patologías testiculares unilaterales pueden causar infertilidad debido a la disrupción de la espermatogénesis. El mecanismo celular exacto responsable para estos cambios degenerativos no está claro.

Objetivo. Estudiar la viabilidad celular en el testículo contralateral tras provocar, experimentalmente, diversas agresiones testiculares unilaterales, comparándolo con un testículo normal.

Material y método. El estudio se realiza en seis grupos de 10 ratas macho Wistar en edad prepuberal, que fueron sometidas a agresión testicular unilateral y posterior orquiectomía del testículo contralateral a la lesión. Se valora la muerte celular por mecanismo de «apoptosis», utilizando un método para la detección de la fragmentación del ADN en citometría de flujo.

Resultados. Observamos un aumento de muerte celular por «apoptosis» en el testículo contralateral tras agresión testicular unilateral.

PALABRAS CLAVE: Autoinmunidad en el testículo; Cultivos celulares; Anticuerpos antiesperma; Apoptosis; Infertilidad masculina.

APOPTOSIS IN THE CONTRALATERAL TESTIS AFTER UNILATERAL TESTICULAR TORSION. EXPERIMENTAL STUDY

ABSTRACT: Introduction. The results of both clinical and experimental studies suggest that some testicular unilateral lesions cause infertility due to disruption of spermatogenesis. The cellular mechanism responsible for the degenerative changes is still unclear.

Objective. Study of the cellular viability in the contralateral testis after unilateral testis injuries.

Material and method. Six groups of 10 prepuberal Wistar rats subjected to unilateral testicular lesion. To identify the cellular death by «apoptosis» in situ, analysis of DNA fragmentation was performed in cytometric flow.

Results. The present study demonstrated an increase of the apoptosis in the contralateral testis after unilateral testicular lesion.

KEY WORDS: Autoimmunity testis; Cells cultures; Antisperm antibodies; Apoptosis; Male sterility.

Correspondencia: Rosa María Paredes Esteban, C/ Sauce 15, Urb. Azahar, 23006 Jaén.

*Trabajo parcialmente financiado por el FIS, nº expediente 96/5015.

Trabajo presentado en el XVI Congreso Panamericano de Cirugía Pediátrica, junio 1998.

INTRODUCCIÓN

Los resultados de estudios clínicos y experimentales demuestran que en determinadas patologías testiculares unilaterales se desarrolla una lesión en el testículo contralateral que puede comprometer la fertilidad masculina. El mecanismo etiopatogénico de la lesión no es del todo conocido, pero se han detectado anticuerpos antiesperma en estos pacientes que parecen jugar un papel importante en la esterilidad^(1, 2). Se piensa que tras la lesión unilateral testicular se desencadena una respuesta inmune humoral/celular que puede ser responsable de este fenómeno⁽³⁻⁵⁾. Esta respuesta se ha descrito también tras la realización de vasectomías⁽⁶⁾. Actualmente se sabe que el testículo es un lugar inmunológicamente privilegiado y que tras una lesión se produce una ruptura de la barrera hemato-testicular con liberación de células testiculares (haploides)⁽⁷⁾. El sistema inmunitario no las reconoce, por lo que se crean anticuerpos frente a dichas células^(7, 8).

El epitelio seminífero es un tejido altamente proliferativo en el que la degeneración de células germinales es una característica constante⁽⁹⁾. Recientes datos basados en análisis morfológicos han mostrado que las células germinales mueren espontáneamente por un mecanismo de muerte celular programada, «apoptosis»⁽⁹⁾, y que puede ser inducida experimentalmente en ratas^(10, 11).

En la criptorquidia y la torsión testicular se ha descrito un aumento de la apoptosis celular. Shikone, en 1994⁽¹²⁾, induce experimentalmente una criptorquidia y observa aumento de apoptosis. Resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo de trabajo tras realizar torsión testicular unilateral en un modelo experimental animal, observamos un incremento de apoptosis en el testículo contralateral en comparación con grupos controles⁽¹³⁾, con disminución y/o detención de la espermatogénesis. Los datos que se recogen en la literatura y nuestros resultados previos nos hacen pensar que la lesión testicular unilateral desencadenaría una reacción ¿inmune?, ¿inflamatoria?, con un aumento de muerte celular por apoptosis, disminución de la viabilidad celular, disminución de la espermatogénesis, y como consecuencia alteración de la fertilidad. Esta hipótesis constituye la base de nuestro trabajo.

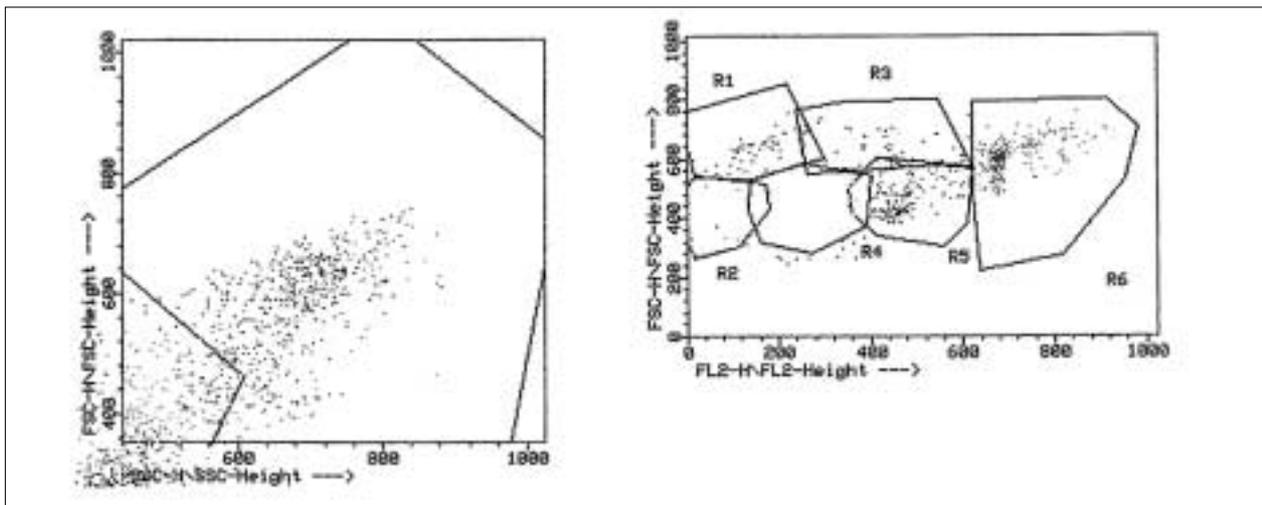


Figura 1. Valoración de apoptosis celular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se realiza el estudio en 60 ratas macho Wistar de 35-45 días de edad (prepuberales) elegidas aleatoriamente y distribuidas en grupos de de seis con 10 ratas cada grupo. Estos animales se someten a anestesia general por inyección intraperitoneal de 0,5 ml/kg de peso, de Nembutal⁽¹³⁾. A través de previa incisión escrotal paramedial, siempre en testículo izquierdo, se realizan distintas agresiones testiculares unilaterales:

- A) Grupo control en el que no se realiza agresión.
- B) Orquiectomía unilateral.
- C) Orquiectomía y conservación de teste en bolsa.
- D) Ligadura de vasos y cordón espermático.
- E) Manipulación testicular provocando reacción inflamatoria.
- F) Torsión testicular.

Los animales son devueltos a sus jaulas y se mantienen en el animalario 30-35 días, tiempo en que se realiza orquiectomía para estudio del testículo contralateral, sacrificando posteriormente al animal.

Cultivos celulares

Se realizan cultivos celulares de los testículos contralaterales en todos los grupos. Se seleccionan células testiculares, aisladas mediante dispersión mecánica, obteniendo cocultivos de células Sertoli-germinales. Se mantienen en incubadora con atmósferas de un 5% de CO₂ a 37°C. Las células se depositan en placas de cultivo de 96 pocillos en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina (2 mM), Hepes (20 nM), piruvato sódico (100 UI/ml) y antibióticos. Se determina la viabilidad celular por el método habitual con Tripán azul.

Citometría de flujo

Mediante este estudio comparamos la viabilidad de las células testiculares en co-cultivos a las 24, 48 y 72 horas en todos los grupos. El estudio de apoptosis se realiza con un análisis en citómetro de flujo según protocolo valorando la captación de fluorocromos selectivos para ADN (bromuro de etidio). Este método nos permite cuantificar diferentes estadios de apoptosis: 1) células con baja captación de fluorocromos que se corresponden con aquellas que están en un estadio precoz de apoptosis; 2) células cuya captación de fluorocromos por el ADN aparece con una intensidad de fluorescencia elevada, conservan su estructura normal (no apoptóticas); y 3) células con una intensidad de fluorescencia intermedia pero cuyo ADN está totalmente desestructurado (células apoptóticas). Los resultados se expresan en gráficos en los que se recoge complejidad/tamaño y complejidad/fluorescencia (Fig. 1). El grupo de células llamadas R1 de menor complejidad y menor captación de fluorescencia corresponderían a las células vivas, las R2+R4 a las células en vía de apoptosis, las R3+R5 a células apoptóticas, y las R6 son células muertas pero no apoptóticas (son las que se tiñen más sin pérdida o fragmentación del ADN).

RESULTADOS

Mediante dispersión mecánica hemos obtenido co-cultivos de células testiculares, consiguiendo una vida media de los mismos de 14 días sin añadir factores adicionales para mejorar las condiciones del cultivo.

Observamos comportamiento diferente entre los cultivos celulares de los distintos grupos y quedan reflejados en las siguientes gráficas.

En la figura 2 se refleja el número de células vivas en cada grupo a las 24, 48 y 72 horas de provocar la lesión. En la fi-

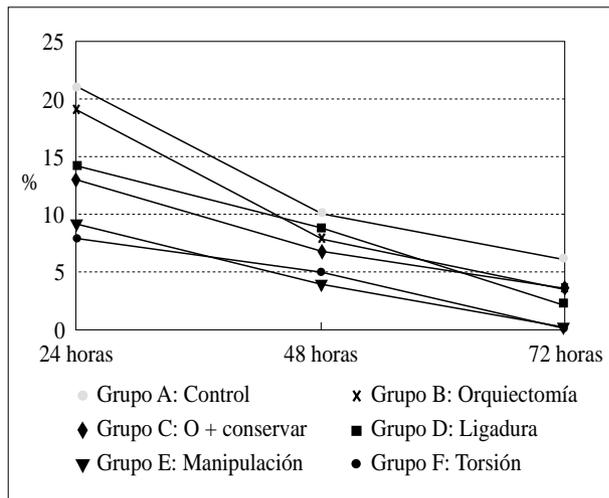


Figura 2. Valoración de R1 en cada grupo.

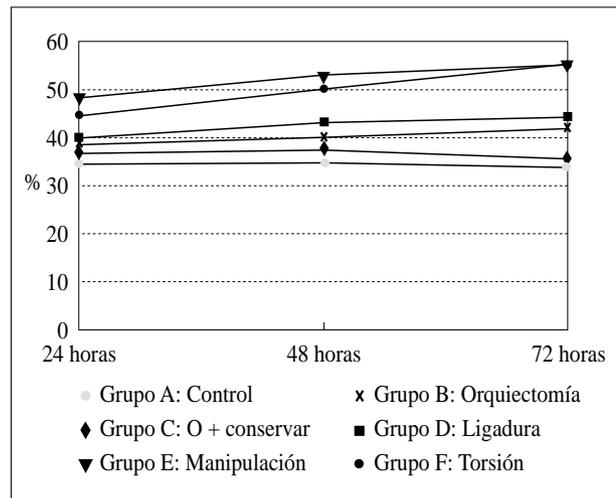


Figura 3. Valoración de R2 + R4 en cada grupo.

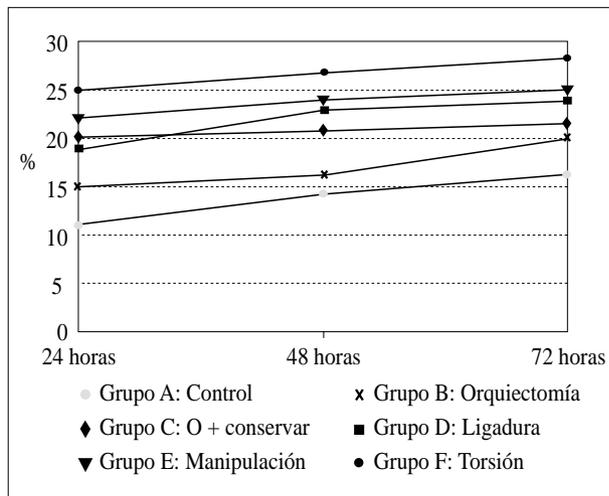


Figura 4. Valoración de R3 + R5 en cada grupo.

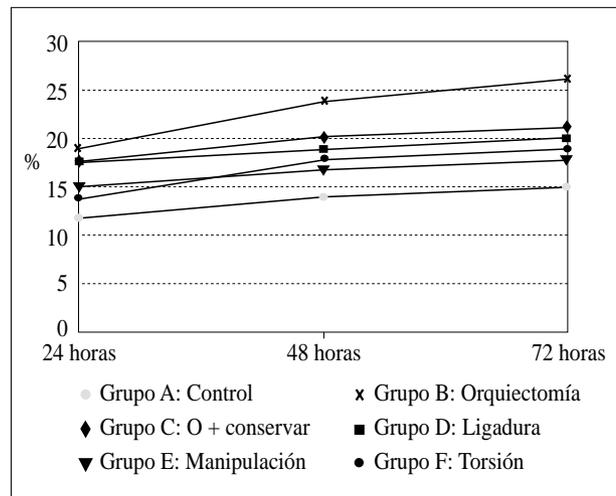


Figura 5. Valoración de R6 en cada grupo.

En la figura 3 se puede ver el número de células en vías de apoptosis a las 24, 48 y 72 horas; en la figura 4 se constata el número de células apoptóticas en los mismos intervalos de tiempo; y en la figura 5 se ve el número de células muertas no apoptóticas.

Observamos que en las lesiones más agudas pero menos duraderas en tiempo como la orquiectomía, el comportamiento del testículo contralateral es parecido al grupo control. El número de células vivas disminuye sólo un 2%. Por el contrario, en las lesiones menos agudas pero más duraderas como manipulación y torsión (especialmente la primera) el número de células vivas disminuye del 50 al 60% en las primeras 24 horas en base a un aumento de las células apoptóticas. Por otra parte, otro grupo de lesiones intermedias, no tan agudas ni tan duraderas, se comportan de manera intermedia, con disminución de la viabilidad celular (40%), pero sin aumento tan importante de apoptosis.

DISCUSIÓN

La reacción inmune frente al testículo contralateral tras lesión testicular unilateral puede ser humoral y/o celular⁽³⁻⁵⁾. Dondero y cols.⁽¹⁴⁾ observan una alteración en la inmunidad celular tras torsión testicular unilateral. Se han encontrado evidencias de reacción inmune celular en pacientes con testículo atrófico. In vitro, los linfocitos T aislados del testículo atrófico secretan un factor inhibidor de los macrófagos en presencia de espermatozoides. En estos pacientes se pueden detectar inmunoglobulinas citotóxicas contra las células espermatozoides. A su vez la isquemia testicular desencadena una reacción inmune con la formación de anticuerpos antiesperma citotóxicos, aglutinantes e inmovilizantes^(3, 15). Se ha observado en ratas sujetas a torsión testicular anticuerpos antiesperma⁽¹⁾ y Urry los detecta en los pa-

cientes criptorquídicos⁽²⁾. Basados en un mecanismo inmune como causa de la lesión en el testículo contralateral, algunos autores protegen el testículo contralateral tras torsión testicular unilateral en ratas, mediante administración de globulina antilinfocítica y esplenectomía, así como por la administración de agentes inmunosupresores en el momento de la torsión^(16, 17). Estas terapias incluyen hidrocortisona, ciclosporina A y azatioprina. Esta afectación del testículo contralateral en respuesta a una reacción inmune puede ser llamada orquitis inmunológica. Este hecho es apoyado además por la demostración de que la lesión tisular puede ser inducida en animales de laboratorio por inmunización con material antigénico aislado del suero, por inyección subcutánea de células singénicas⁽¹⁷⁾.

Por lo tanto, según los trabajos publicados en la literatura, la afectación, bien congénita, adquirida o provocada de un testículo puede producir una reacción inmune humoral y/o celular que puede llegar a producir afectación del testículo contralateral. Por otra parte, en determinadas lesiones testiculares se ha descrito muerte celular por «apoptosis» (muerte celular programada, suicidio celular)⁽⁸⁾. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo apoyan las publicaciones anteriores. En todos nuestros grupos observamos un aumento variable de muerte celular por «apoptosis», dependiendo de la lesión testicular unilateral provocada. Estos datos los interpretamos de la siguiente forma.

Las lesiones testiculares más agresivas y menos duraderas en el tiempo (orquiectomía) desarrollarían una respuesta predominantemente del tipo inmune celular, con mínima afectación en testículo contralateral y muerte celular por un mecanismo diferente al de apoptosis (necrosis). Las menos agresivas pero más continuas desarrollarían una respuesta predominantemente inmune humoral con formación de anticuerpos y muerte celular por «apoptosis» (manipulación, torsión). Existiría siempre un solapamiento entre ambas.

Estos resultados preliminares nos hacen pensar que las células testiculares y espermatozoides en contraste a otras células del organismo, son consideradas como extrañas y pueden comportarse como autoantígenos. Sin embargo, la existencia de una barrera hemato-testicular previene todo contacto de estas células con el sistema inmune⁽⁷⁾. Cuando existe una patología testicular o bien se produce una agresión sobre un testículo se produce la ruptura de esa barrera hemato-testicular. En unos casos se produciría la lesión en el testículo contralateral por actuar las células del testículo lesionado como células antigénicas, con formación de anticuerpos antiesperma y antitesticulares; en éstos se desencadenaría una reacción inflamatoria desarrollándose una reacción inmune-celular o humoral. Todo ello podría comprometer posteriormente la fertilidad en grado variable, permanente o temporal, según la agresión testicular inicial.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson JB, Cooper MJ, Thomas WEG, Williamson J. Impaired spermatogenesis in testes at risk of torsion. *Br J Surg* 1986;**73**:847-849.
- Urry RL, Carrell DT, Starr NT, Snow BW, Middleton RG. The incidence of antisperm antibodies in infertility patients with a history of cryptorchidism. *J Urol* 1994;**151**:381-383.
- Harrison RG, Lewis-Jones DI, Moreno de Marvall MJ, Connolly RC. Mechanism of damage to the contralateral testis in rats with an ischaemic testis. *Lancet* 1981;**2**:723-725.
- Nagler HM, De Vere White R. The effect of testicular torsion on the contralateral testis. *J Urol* 1982;**128**.
- Sakamoto Y, Matsumoto T, Mizunoe Y, Haraoka M, Sakamoto M, Kumezawa J. Testicular injury induces cell-mediated autoimmune response to testis. *J Urol* 1995;**153**(4):1316-1320.
- McDonald SW, Halliday J. Cell-mediated immune response after vasectomy in rats. *J Reprod Fertil* 1992;**96**(2):529-535.
- Sanjuán S, De Sande F, Molina M, Gimeno R, Miró A. Respuesta inmunológica en la torsión testicular. *Actas Urol Esp* 1994;**18**(3):249-252.
- Hassou K. Immunological causes of male infertility a propos des causes immunologiques de l'infertilité masculine. *Allerg Immunol (Paris)* 1991;**23**(4):121-125.
- Callard GV, Jorgense JC, Redding JM. Biochemical analysis of programmed cell death during premeiotic stages of spermatogenesis in vivo and in vitro. *Dev Genet* 1995;**16**(2):140-147.
- Hakan B, Itsuko F, Catherine R, Juha T, Mart. Apoptosis in testis germ cells: Developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 1996;**136** (1):5-12.
- Troiano L, Fustini MF, Lovato E, Frasoldati A, Malorni W, Capri M, Grassilli E, Marrama P, Franceschi C. Apoptosis and spermatogenesis from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;**15**,202(3):1315-1321.
- Shikone T, Billig H, Hsueh AJ. Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biol Reprod* 1994;**51**(5):865-872.
- Paredes RM, Ocaña Losa JM, Ramírez Chamond R, Carracedo Añón J, Salas Molina J, Hervas Rodríguez J, Garrido Pérez JJ, García Ruiz M. *Unilateral testicular torsion. Study of the lesion in the contralateral testis*. Reunión Hispano-Polaca de Cirugía Pediátrica. Polonia, octubre 1997.
- Dondero F, Lenzi A, Picardo M, Pastores R, Valesini G. Cell mediated antisperm immunity. *Andrologia* 1980;**12**:25-29.
- Itoh M, Miki T, Takeuchi Y, Miyaka M, De Rodij DG. Immunohistological localization of autoantigens detected by serum autoantibodies from mice with experimental autoimmune orchitis without using adjuvants. *Arch Androl* 1994;**32**(1):45-52.
- Lewis-Jones DI, Lynch RV, Kerrigan DD, Davies I. Long-term study of the immuno-pathological consequences of sympathetic orchioepithia in the rat. *J Reprod Fertil* 1987;**80**:641-647.
- Pakyz RE, Heindel RM, Kallish M, Cosentino MJ. Spermatic cord torsion: Effects of ciclosporine and prednisone on fertility and the contralateral testis in the rat. *J Androl* 1990;**11**:401-408.