

# Apoptosis en el testículo criptorquídico. Implicación de la molécula FAS en su modulación

R.M. Paredes Esteban, R. Ramírez Chamond, B. Velasco Sánchez, C. Cuevas, J. Rodríguez Vargas,  
M. Marín Hidalgo, M. García Ruiz

*Sección de Cirugía Infantil. Hospital «Ciudad de Jaén». Servicio de Anatomía Patológica. Hospital «Ciudad de Jaén». Jaén.  
Unidad de Investigación. Hospital Universitario «Reina Sofía». Córdoba.*

**RESUMEN:** La degeneración celular que ocurre en la criptorquidia con alteración de la espermatogénesis normal se produce por un mecanismo de «apoptosis» o muerte celular programada. Son varias las vías que activan o modulan dicha apoptosis y entre ellas la vía mediada inmunológicamente por reacción antígeno-anticuerpo. Cuando la muerte por apoptosis se produce por vía inmúnológica, una molécula «FAS» es la implicada en la modulación de dicha apoptosis. En este trabajo investigamos el papel que la molécula FAS tiene en el incremento de apoptosis en el artículo criptorquídico. El estudio se realiza en biopsias testiculares de pacientes criptorquídicos tomadas durante la orquidopexia, y la determinación de FAS se realiza por técnicas de inmunohistoquímica. Los resultados obtenidos indican que la molécula FAS no parece tener una clara implicación en la modulación de la apoptosis en el testículo criptorquídico.

**PALABRAS CLAVE:** Criptorquidia; Apoptosis; FAS; BCL-2; Testículo.

## APOPTOSIS IN THE CRYPTORCHIDISM. ROLE OF THE FAS PROTEIN IN IT'S MODULATION

**ABSTRACT:** The cellular degeneration, present at the cryptorchidism leads to a malfunction in the spermatogenesis and it's due to cellular apoptosis (programed cellular death). This process is turned on and modulated by different ways. One of then is mediated by Ag-Ac reactions and a protein called FAS seems to have an important role in it's modulation. We studied the relation between FAS an the increased apoptosis in undescended testics. Testicular biopsies were done in cryptorchid patients during orchidopexy and FAS was meassured by immune-techniques. Our results seem to dismiss FAS as a modulation apoptosis factor in the cryptorchidism.

**KEY WORDS:** Cryptorchidism; Apoptosis; FAS; BCL2; Testicle.

## INTRODUCCIÓN

El epitelio seminífero es un tejido altamente proliferativo en el que la degeneración de las células germinales es una

**Correspondencia:** Rosa María Paredes Esteban, C/ Puerta de Martos, 65, Residencial «Castillo de Jaén», Casa 65, 23005 Jaén.

Recibido: Mayo 2000

Aceptado: Noviembre 2000

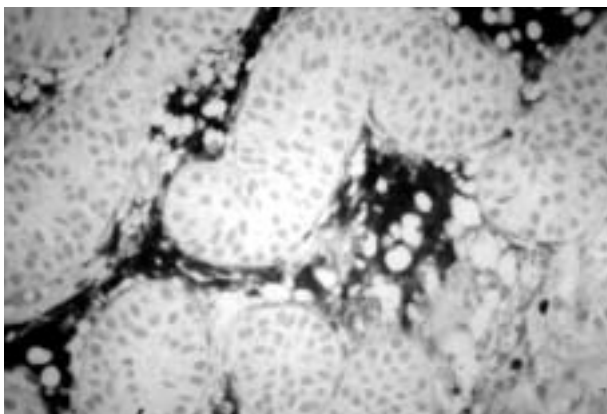
característica constante<sup>(1, 2)</sup>. Recientes estudios basados en análisis morfológicos, han demostrado que las células germinales mueren espontáneamente por un mecanismo de «apoptosis» o muerte celular programada<sup>(3-5)</sup>. El testículo al igual que el ojo, y el SNC, son lugares inmunológicamente privilegiados, siendo capaces de expresar las moléculas FAS que se sabe participante en la modulación del proceso de apoptosis celular<sup>(6, 7)</sup>. En algunos procesos patológicos del testículo tales como la criptorquidia inducida experimentalmente<sup>(8-10)</sup> y en el testículo contralateral a una torsión testicular unilateral, se ha observado un incremento de apoptosis celular<sup>(11)</sup>. Aunque en este último proceso el mecanismo que modula la apoptosis está mediado inmunológicamente y modulado por la vía FAS<sup>(12)</sup>, el mecanismo que activa la apoptosis en el testículo criptorquídico no se reconoce actualmente.

El objetivo de nuestro trabajo es, por lo tanto, evaluar las señales moleculares que controlan este fenómeno, estudiando la implicación de la molécula FAS en el mismo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realiza en 30 pacientes intervenidos de criptorquidia unilateral a los que se tomó biopsia testicular durante la orquidopexia. Dicha biopsia fue tomada previo consentimiento de los padres. Las muestras fueron divididas en dos. Una parte se introdujo en glutaraldehído para valoración de apoptosis con microscopía electrónica (ME) y la otra mitad en solución de Bouin, para inclusión en parafina y estudio inmunohistoquímico con la utilización de anticuerpos (Acs) monoclonales.

Estudio inmunohistoquímico: se realiza sobre cortes de la muestra incluida en parafina según técnica protocolizada, utilizando como Acs monoclonales una IgG-3 anti-FAS de la casa VITRO y el Ac anti-BCL-2 de la casa DAKO. Se utilizó como revelador -Dako Techmate/Dab Diamino Benzidina. Los cortes obtenidos de los bloques de parafina se colocan en porta adhesivos 1 hora a 60°C, se desparafinan con xilol



**Figura 1.** Inmunotinción con Ac anti-FAS: IgG3. Se observa la negatividad de la tinción dentro de los túbulos seminíferos. Ligerísima tinción en intersticio.



**Figura 2.** Inmunotinción con Ac anti-BCL-2. Negatividad de la tinción dentro de los túbulos. Muy ligera tinción en intersticio.

y se hidratan con alcohol. Se mantienen en TBS. Desmascarador de antígenos -Retrieval en olla de presión durante 2 minutos. Se montan en la máquina Horizon Techmate de Dako y se incuban los anticuerpos primarios (IgG-3 y anti-BCL-2) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Los resultados fueron valorados como tinción negativa<sup>(0)</sup>, moderadamente positiva (+) y positiva (++) , comparados con un control.

La edad de los pacientes estaba entre 2-9 años y a todos presentaban criptorquidia unilateral con testículo en canal inguinal. El estudio ultraestructural (ME) demostró un incremento de apoptosis celular en todos los testículos criptorquídicos<sup>(13)</sup>, afectando túbulos seminíferos de forma focalizada dentro de un mismo testículo y con lesión también focalizada dentro de un mismo túbulo. El análisis inmunohistoquímico para la expresión de FAS utilizando Ac monoclonal tipo IgG revela que la expresión de FAS en las criptorquidias es negativa en el 80%. En algunas muestras la tinción fue moderadamente positiva (20%) pero a nivel del intersticio y no dentro de los túbulos seminíferos (Fig. 1). La tinción de BCL-2 fue también negativa en un 83% y sólo en un 17% la tinción ligeramente positiva pero también a nivel intersticio (Fig. 2). No observamos correlación entre el incremento de apoptosis celular en las muestras con la tinción de FAS en las mismas.

## DISCUSIÓN

Varios estudios han demostrado que en la criptorquidia inducida experimentalmente, se observa un incremento de degeneración en las células germinales por mecanismo de apoptosis<sup>(8-10)</sup>. Sin embargo, el mecanismo que modula este proceso en el testículo criptorquídico no es del todo conocido. La apoptosis celular es una muerte celular programada (MCP), en

la que se produce una fragmentación del ADN con conservación de la membrana nuclear<sup>(14)</sup>. Esta MCP ocurre en células expuestas a señales activadas específicamente que son liberadas vía antígeno-receptor y moduladas por la molécula FAS. Sin embargo, existen otras vías alternativas de activación no mediadas inmunológicamente como son: moléculas inmunosupresoras endógenas (glucocorticoide, factor transformador del crecimiento...), moléculas citotóxicas efectoras (factor de necrosis tumoral), deficiencia de factores tróficos, drogas citotóxicas y daño físico leve (temperatura elevada)<sup>(15, 16)</sup>. El FAS es una molécula de superficie celular que se incrementa después de una activación mediada inmunológicamente (Ag-Ac)<sup>(17)</sup>. La alta expresión de FAS protege o evita que esa célula sea atacada, por ejemplo, por mediadores de la inflamación; sin embargo, la célula a la que defiende morirá posteriormente por apoptosis. La molécula BCL-2 se encuentra en el interior de la célula, participa también en la apoptosis mediada inmunológicamente y protege a la célula de morir por apoptosis<sup>(7, 18, 19)</sup>. En la actualidad son ya numerosos los trabajos que demuestran el incremento de apoptosis en el testículo criptorquídico, si bien todos ellos según la revisión bibliográfica realizada, se han realizado en teste criptorquídicos inducidos experimentalmente en ratas<sup>(8-10)</sup>. Por el contrario, se ha realizado pocos estudios, por el momento, para esclarecer que señales modulan este incremento de apoptosis en el testículo criptorquídico. Nuestro estudio se ha basado fundamentalmente en intentar conocer si la degeneración celular que ocurre en el testículo criptorquídico está mediada inmunológicamente y modulada por la molécula FAS. No hemos encontrado relación entre el grado de apoptosis y la expresión de FAS en las muestras. La tinción para BCL-2 ha sido también negativa. Estos resultados nos hacen pensar que si bien existen numerosos trabajos en los que se piensa que la afectación del testículo contralateral en la criptorquidia está mediado por un proceso inmunológico con la aparición de anticuerpos antisperma<sup>(20)</sup>, la degeneración celular que ocurre en el testículo criptorquídico parece no estar modulada vía FAS y, por lo tanto, mediada in-

munológicamente. Estos resultados coinciden con el trabajo realizado por Ogi en 1998<sup>(21)</sup>. Hasta el momento los trabajos realizados sobre el tema son escasos. Consideramos que otras vías alternativas diferentes a la inmunológica pueden modular el incremento de degeneración celular (apoptosis) en el testículo criptorquídico, siendo éstas objetivo de estudios futuros.

## BIBLIOGRAFÍA

- De Roij DG, Okabe N, Nishimura Y. Arrest of spermatogonial differentiation in jsd/jsd, S117 H/s117 H and criptorchidid mice. *Biol Reprod* 1999;**61**:842-847.
- Kerr JB. Spontaneous degeneration of cell germ in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J Reprod Fertil* 1992;**95**:825.
- Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapainamen J, Parvinen M, Hsueh AJW. Apoptosis in testis germinal cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stage. *Endocrinology* 1995;**136**:5.
- Henriksen K, Hakovirta H, Parvinen M. In situ quantification of stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: effects of short-term experimental cryptorchidism. *Int J Androl* 1995;**18**:256.
- Shikone T, Billig H, Hsueh AJW. Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biol Reprod* 1994;**51**:865.
- Bellgrand D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 1995;**377**:630-632.
- Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Okazi S, Nakao K, Nagata S. Expression of the FAS ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol* 1995;**154**:3806.
- Ito K, Takemura K, Gotoh H, Kurohmaru H, Hayashi Y. Apoptosis-like cell death in experimentally-induced cryptorchidism in adult mice. *J Vet Med Sci* 1997;**59**:353-359.
- Wang Z, Todari T, Watanabe Y, Toki A, Ogura K, Miyamoto O, Toyoshima T, Itano T. Germ-cell degeneration in experimental unilateral in cryptorchidism: role of apoptosis. *Pediatr Surg Int* 1998;**14**:9-13.
- Angelopoulos R, Dadoune JP. Apoptosis in normal and pathological spermatogenesis. *Contracept Fertil-Sex* 1999;**27**:99-106.
- Paredes RM, Ramírez R, Carracedo J, Rodríguez M, Garrido JJ, Ocaña JM. Apoptosis en el testículo contralateral tras lesión testicular unilateral. Estudio experimental. *Cir Pediatr* 2000;**13**:3-6.
- Paredes RM, Carracedo J, Ramírez R. *Valoración de la molécula FAS en el testículo contralateral en la torsión testicular unilateral. Estudio experimental*. Trabajo presentado en el XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica, 1999.
- Paredes RM, Cuevas C, Rafel E, Velasco B, Rodríguez J, García M. *Valoración de las lesiones en el testículo criptorquídico. Estudio anatomopatológico y ultraestructural*. Trabajo presentado en el XX-XIII Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica, 1999.
- Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993;**14**:126.
- Kroemer G. *Adv Immunol* 1995;**58**:211.
- Yin Y, Hawkins KL, De Wolf WC, Morgentaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl* 1997;**18**:159-165.
- Nagata S, Golstein P. The FAS death factor. *Science* 1995;**267**:1449.
- Watanabe, Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NC, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in FAS antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1999;**356**:314.
- Woodle E, Kulkarni S. Programed cell death. *Transplantation* 1988;**66**:681-691.
- Urry RL, Carrel DT, Starr NT, Snow BW, Arddelton RG. The incidence of anti-sperm antibodies in infertility patients with a history of cryptorchidism. *J Urol* 1994;**151**:381-383.
- Ogi S, Tanji N, Takeuchi M, Terada N. Involvement of FAS in the apoptosis of mouse germ cells induced by experimental cryptorchidism. *Urol Res* 1998;**26**:17-21.