

Valoración de la molécula FAS en el testículo contralateral tras torsión testicular unilateral. Estudio experimental en ratas*

R.M. Paredes Esteban, R. Ramírez Chamond, J. Carracedo Añón, M. Rodríguez Portillo

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

RESUMEN: Investigamos la implicación de la molécula FAS y BCL2 en la apoptosis de células testiculares que ocurre en el testículo contralateral tras torsión testicular unilateral. Se compara con un grupo control. El estudio se realiza en ratas macho Wistar en edad prepuberal. La determinación de FAS y BCL-2 se realiza en co-cultivos celulares obtenidos del testículo contralateral y de los testículos controles. La valoración de las moléculas se realiza por técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con la aplicación de anticuerpos monoclonales específicos y su expresión se determina en citometría de flujo según protocolo. Observamos un incremento de la expresión de FAS y disminución de BCL-2 en el testículo contralateral con respecto al grupo control. Este estudio indica que la expresión de FAS y BCL-2 puede estar implicada en la apoptosis celular que ocurre en el testículo contralateral en la torsión testicular unilateral.

PALABRAS CLAVE: Torsión testicular unilateral; FAS, BCL-2; Apoptosis.

VALORATION OF THE FAS IN THE CONTRALATERAL TESTIS AFTER UNILATERAL TESTICULAR TORSION. EXPERIMENTAL STUDY IN RATS

ABSTRACT: The role the FAS and BCL-2 in the apoptosis of testicular cells in the contralateral testis after unilateral testicular torsion, was investigated. We compared with control group. These experiments were performed in male Wistar rats prepuberal old. FAS and BCL-2 determination is realized in cells cultures of contralateral testis. Flow cytometry and immunohistochemistry studies, using a FAS and BCL-2 specific monoclonal antibody, were utilized to value FAS and BCL-2 expression on testicular cells following unilateral testicular torsion. We observed an increase of expression of FAS and decrease of BCL-2 in the contralateral testis in comparison with control group. The present results may indicate that the expression of this molecules is implicated in cellular apoptosis.

KEY WORDS: Unilateral testicular torsion; FAS, BCL-2; Apoptosis.

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

*Trabajo parcialmente financiado por el FIS. Número de expediente 96/5015. Trabajo presentado en el XXXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica.

Recibido: Agosto 2001

Aceptado: Noviembre 2001

INTRODUCCIÓN

En trabajos preliminares se ha descrito la afectación del testículo contralateral en la torsión testicular unilateral con alteración de la espermatogénesis, así como muerte celular por mecanismo de apoptosis o muerte celular programada (MCP)^(1, 2). Se ha demostrado además que la muerte celular espontánea de células germinales ocurre por un mecanismo de apoptosis⁽³⁻⁵⁾ al igual que la inducida experimentalmente^(2, 6). Sin embargo, el mecanismo por el que ocurre la apoptosis no se ha aclarado, aunque se supone mediado inmunológicamente. Recientes estudios han demostrado que el ojo, sistema nervioso central y testículo son lugares inmunológicamente privilegiados, siendo capaces de expresar la molécula FAS, que se sabe participante en el proceso de apoptosis celular^(7, 8).

Se trata de una proteína de superficie celular tipo I 36 KDa que induce apoptosis en células diana apropiadas al unirse al FAS-ligando, proteína de superficie celular tipo II. Esta molécula FAS se puede identificar por anticuerpos monoclonales y forma parte de una familia de proteínas de membrana que determina la suerte de algunos tipos de células de crecer o morir. Otros miembros de esta familia son el factor de necrosis tumoral (TNF) y receptores CD40 y CD30. La expresión de FAS está incrementada después de una activación mediada por antígenos y protege o evita que esa célula sea atacada por células mediadoras de la inflamación, pero, sin embargo, esa célula que ha aumentado la expresión de FAS morirá posteriormente por mecanismo de apoptosis⁽⁸⁾.

Otra molécula, la proteína BCL-2, que se encuentra en el interior de la célula, actúa de forma diferente al FAS, protege a la célula de morir por mecanismo de apoptosis^(9, 10). En este estudio, investigamos la expresión de FAS en cultivo de células testiculares obtenidas del testículo contralateral tras provocar una torsión testicular unilateral experimental.

Tabla I Expresión de FAS y BCL-2

	Teste normal	Teste patológico
FAS	16%	40%
BCL-2	18%	10%

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realiza en 20 ratas macho Wistar de 25-35 días de edad divididas en dos grupos. Diez se utilizaron como grupo control y en las otras 10 se realizó torsión testicular unilateral realizando orquiectomía del testículo contralateral a los 25 días de la torsión. Realizamos cultivos celulares según protocolo⁽¹⁾. Se realiza estudio de apoptosis celular y marcaje de las moléculas mediante anticuerpos monoclonales específicos con técnica de IFI.

Estudio de apoptosis

La apoptosis en células testiculares fue estudiada por el método de marcador de ADN mediante por tinción con yoduro de propidio.

1. Se fija la suspensión celular con etanol al 70% frío, durante 30 minutos a 4 °C.
2. Se lava dos veces con PBS.
3. Se tiñe con yoduro de propidio a una concentración de 40 µg/ml en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y con agitación suave y constante.

Técnica de inmunofluorescencia indirecta

La determinación de la expresión de moléculas se realiza mediante el método de inmunofluorescencia indirecta utilizando dos anticuerpos monoclonales específicos, el Ac FAS/Apo-1 (Catbiochem Oveogen Research Products, Cambridge MA) y el BCL-2 (NCL-BCL-2) (Novocastra Laboratoires Ltd. Newcastle, UK). El estudio se realiza en cultivos celulares obtenidos del testículo contralateral tras la torsión unilateral experimental. La lectura se realiza en citómetro de flujo (Fasscan, Becton Dickinson).

PROCEDIMIENTO

Marcaje con el Ac monoclonal anti-FAS

Se recuperan las células testiculares del cultivo y se centrifugan en PBS (Phosphate Buffered Saline) a 1.200 revoluciones por minuto durante 5 minutos. Una vez recuperados los botones celulares, se suspenden las células en 50 µl de PBS-BSA a los que se les añadió el Ac monoclonal anti-FAS a una concentración de 2,5 ng/ml. Las células se incuban con el Ac monoclonal durante 30 minutos. Se lavan tres veces con PBS BSA 0,1% ázida sódica a temperatura ambiente y conjugados posteriormente con un anticuerpo secundario mar-

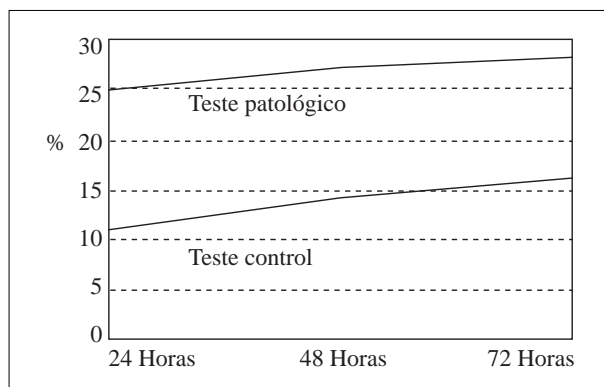


Figura 1. Valoración de apoptosis en cada grupo.

cado con fluoresceína (FITC). Tras 20 minutos de incubación, las células se lavan 3 veces con PBS BSA ázida y resuspendidas en tampón paraformaldehído al 1%. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo Fascon (Becton Dickinson) y analizadas con el software Pclisis II.

Marcaje con el Ac Mo anti-BCL-2/ o expresión de BCL-2

Se resuspenden las células en PBS al 0,5% de saponina. Se añade 10 µl de Ac monoclonal anti-BCL-2 a 90 nl de suspensión celular. Se incuba 30 minutos a 4 °C, se lava con PBS tres veces y se incuba con anticuerpo secundario conjugado con FITC. Para la expresión de BCL-2 es necesario realizar permeabilidad celular.

RESULTADOS

El grado de MCP fue calculado por índice de apoptosis (porcentaje de células apoptóticas en relación con el total de células). El incremento de apoptosis en relación con el grupo control se observó desde las 0 hasta las 72 horas de la realización de los cultivos celulares (Fig. 1). Mediante IFI utilizando Ac monoclonal se demostró un incremento de la expresión de molécula FAS en las células del testículo contralateral a la torsión testicular unilateral. Este incremento fue del 40% ± frente al 16% ± del testículo normal. La expresión de BCL-2, por el contrario, se observó disminuida frente al grupo control. En el testículo supuestamente patológico fue del 10% frente al 18% en el testículo normal (Tabla I) y (Fig. 2).

DISCUSIÓN

En la actualidad se sabe que las células testiculares mueren espontáneamente por un mecanismo de apoptosis⁽³⁻⁵⁾. Esta apoptosis puede ser inducida además experimentalmente⁽¹¹⁾. Sin embargo, el mecanismo por el que se produce este fenómeno es poco conocido. Actualmente, se sabe que la ex-

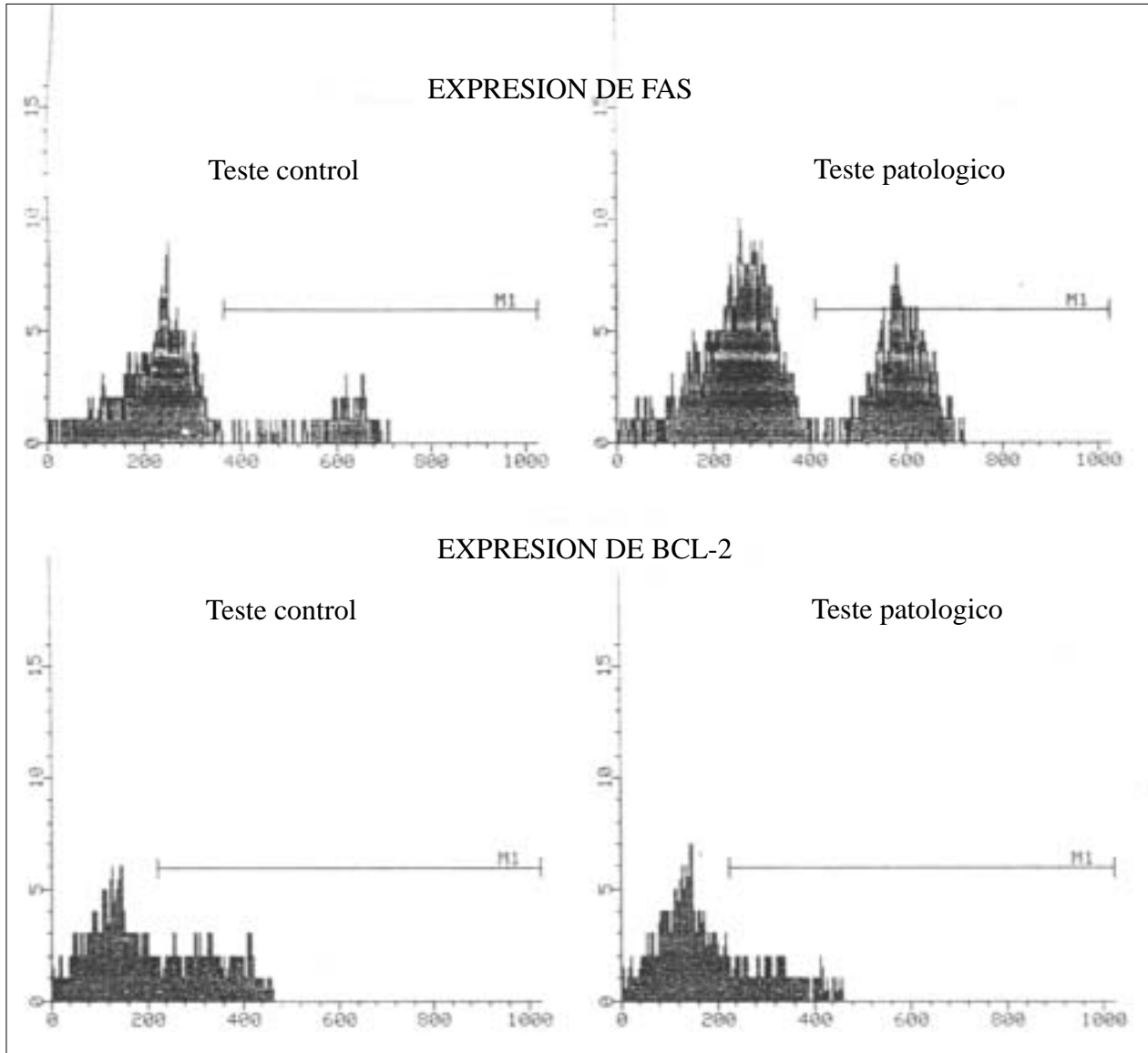


Figura 2. Expresión de FAS y BCL-2.

presión de una proteína de superficie de membrana de tamaño molecular 45 KDa parece estar implicada en el proceso de apoptosis. Esta molécula puede expresarse en varios tejidos: testículo, ojo, y sistema inmune, es decir, lugares inmunológicamente privilegiados. Cuando una célula expresa la molécula FAS muere al final por un mecanismo de apoptosis⁽⁸⁾. Por otro lado, la molécula BCL-2 protege a la célula de dicha muerte, el incremento de la misma evita la apoptosis y el descenso la permite^(9, 10). Al observar incremento de la expresión de FAS y de la apoptosis en el testículo contralateral tras torsión testicular unilateral, pensamos en que exista una relación apoptosis-FAS en el testículo⁽¹¹⁾, lo que apoyaría el mecanismo inmunológico de la lesión en el testículo contralateral. La expresión de FAS ocurre en el testículo normal al igual que el proceso de apoptosis pero en un pequeño grado. Al inducir experimentalmente una lesión en un tes-

tículo aumenta la expresión de FAS que produce un aumento proporcional de apoptosis⁽¹¹⁾. Aunque en trabajos previos no se ha podido demostrar claramente la relación FAS-apoptosis, se sabe que el FAS se produce como mecanismo de defensa de las células frente a agresiones (ej.: reacción inflamatoria) al ligarse al FAS-ligando que expresa la célula que ataca. Al unirse destruye la célula agresora pero el resultado final es la muerte de la célula por suicidio o apoptosis. La expresión de FAS está incrementada tras una activación mediada por antígenos, lo que apoyaría que la afectación del testículo contralateral a torsión testicular está mediada inmunológicamente⁽¹²⁾. Nuestra hipótesis es la siguiente:

Tras la torsión testicular unilateral se desarrolla la ruptura de la barrera hemato-testicular desencadenándose una reacción inmune mediada por antígenos, así como una reacción inflamatorias que atacarían a las células testiculares. Éstas en

un intento de defenderse expesarían un aumento de FAS para destruir la célula que ataca (uniéndose al FAS-ligando) pero inevitablemente moriría posteriormente por un mecanismo de apoptosis o suicidio celular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Paredes RM, Ramírez R, Carracedo J, Hervás J, Garrido JI, Ocaña JM. Torsión testicular experimental: efecto en el testículo contralateral. *Cirugía Pediátrica* 1999;**12**:152-154.
2. Paredes RM, Ramírez R, Carracedo J, Rodríguez M, Garrido JI, Ocaña JM. Apoptosis en el testículo contralateral tras lesión testicular unilateral. Estudio experimental. *Cirugía Pediátrica* 2000;**13**:3-6.
3. De Rooij DG, Lok D. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster. II. Differentiating spermatogonia. *Anat Rec* 1987;**217**:131.
4. Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJW. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 1995;**136**:5.
5. Brinkworth MH, Weinbauer GF, Schlatt S, Nieschlag E. Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adults rats. *J Reprod Fertil* 1995;**105**:25.
6. 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**:1995.
7. Bellgrau 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.
8. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993;**14**:126.
9. Nagata S, Golstein P. The FAS death factor. *Science* 1995;**267**:1449.
10. Woodle E, Kulkarni S. Programmed cell death. *Transplantation* 1998;**66**:681-691.
11. Ogi S, Tanji N, Yokoyama M, Takeuchi M, Terada N. Involvement of FAS in the apoptosis of mouse germ cell induced by experimental cryptorchidism. *Urol Res* 1998;**26**:17-21.
12. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. FAS ligand-induced apoptosis is a mechanism of immune privilege. *Science* 1995;**270**:1189-1192.