

Instituto Nacional de Endocrinología

TRATAMIENTO TÉRMICO Y ENZIMÁTICO SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA INDUCIDA POR FACTORES EPIDIDIMARIOS HUMANOS

Lic. Maydelín Frontela Noda,¹ Dr. Lorenzo Mallea Sánchez,² Dra. Sanda Yepe Oliveros³ y Dra. Ada Julia Machado Curvelo⁴

RESUMEN

Se estudió el efecto del tratamiento térmico y enzimático sobre la inhibición de la proliferación linfocitaria, inducida por un *pool* de homogeneizados de epidídimo humano obtenido de donantes cadáveres (n = 7). Se analizó cada muestra desde el punto de vista anatomopatológico, además se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford y la actividad inhibidora de la proliferación linfocitaria. Se incubaron alícuotas de 600 µL del homogeneizado a 30 °C, 37 °C y 55 °C durante 30 min, otras 2 alícuotas se trataron a temperatura ambiente durante 24 h y a 95 °C durante 1 min. Se hidrolizaron fracciones similares con tripsina (enzima/sustrato 1:5) y pronasa (enzima/sustrato 7,5:10) durante 3½ h a 37 °C. Se incluyeron en el ensayo de inhibición de la proliferación linfocitaria las muestras tratadas con calor o enzimáticamente y muestras no tratadas utilizadas como control. Los resultados obtenidos demuestran que los tratamientos térmicos aplicados no afectan las propiedades inhibitorias del homogeneizado. La digestión enzimática con tripsina provocó una pérdida de la capacidad inhibidora, sin embargo, esta no se modificó por acción de la pronasa. Se concluyó que en el epidídimo humano se producen factores termoestables de naturaleza protéica con capacidad para inhibir la proliferación linfocitaria.

Descriptores DeCS: EPIDIDIMO/inmunología; LINFOCITOS/inmunología; INMUNOCOMPETENCIA.

La ausencia de respuesta inmune en el tracto reproductor frente a las células germinales altamente inmunogénicas sugiere la existencia de mecanismos reguladores del sistema inmune local. Entre

las hipótesis que intentan explicar este fenómeno se encuentra la presencia de factores inmunosupresores en ese sitio.¹ El plasma seminal humano presenta actividad supresora sobre la mayoría de las células

¹ Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora.

² Especialista de I Grado en Inmunología. Investigador Agregado.

³ Especialista de I Grado en Inmunología.

⁴ Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica.

del sistema inmune^{2,3} y existen pruebas de que algunos de los factores inmunomoduladores encontrados en el semen son producidos en otros sitios del tracto reproductor masculino.^{4,5} Las sustancias que ejercen este efecto pueden ser de alto y bajo peso molecular y en este grupo se han descrito proteínas,^{6,7} poliaminas^{8,9} y prostaglandinas.⁴ En la actualidad no existe coincidencia acerca de la naturaleza, el tamaño molecular y las características físico-químicas de estos factores.

Es conocido que los espermatozoides experimentan cambios notables en sus propiedades antigénicas durante su paso por el epidídimo, como resultado del proceso de maduración. Aunque la inmunobiología de este órgano ha sido poco estudiada, se ha demostrado la existencia de abundantes macrófagos, linfocitos T CD₈⁺ y DC₄⁺,¹⁰ además de comprobarse que el epitelio es capaz de expresar el receptor para IgA secretada¹¹. Estos hallazgos sugieren que en este sitio operan mecanismos inmunoprotectores y regulatorios normales para la defensa contra las infecciones,¹² que en condiciones fisiológicas deben estar suprimidos para impedir una respuesta contra las células germinales.

En nuestro laboratorio se ha comprobado que los fluidos de las diferentes glándulas accesorias del aparato reproductor masculino de rata, inhiben la proliferación de linfocitos estimulados por lectinas, el efecto más potente se obtiene con el fluido epididimario. Posteriormente, se demostró que el epidídimo humano es una fuente de factores que inhiben la fagocitosis y la proliferación linfocitaria, se comprobó que en la inmunomodulación tienen lugar cambios en la producción de IL-2 e IFN-gamma.¹³ El objetivo de este trabajo fue iniciar la caracterización de las sustancias con acción inmunomoduladora

producidas por el epidídimo humano. Con este propósito se estudió el efecto de la temperatura y la digestión con proteasas sobre la actividad inhibidora de la proliferación linfocitaria.

MÉTODOS

MUESTRAS

Obtuvimos el tejido epididimario humano de donantes cadáveres (rango de edad: 51-94 años; edad promedio: 65 años) y utilizamos un pequeño fragmento de cada órgano para el análisis anatómico-patológico, homogeneizamos el resto del tejido en equipo Polytron en medio de cultivo RPMI 1640 a razón de 5 mL de medio por gramo de peso húmedo. Luego centrifugamos el homogeneizado para eliminar el material particulado y al sobrenadante le determinamos la actividad inhibidora de la proliferación de linfocitos y la concentración de proteínas por el método de Bradford.¹⁴ Finalmente, unimos las muestras procesadas para formar un *pool* de homogeneizados de epidídimo humano (HEH) (n = 7).

EFFECTO DE LA TEMPERATURA

Incubamos alícuotas de 600 µL de HEH durante 30 min, a 30, 37, 45 y 55 °C. También incluimos una alícuota que se incubó a temperatura ambiente durante 24 h y otra a 95 °C durante 1 min. Como control empleamos una fracción conservada a -20 °C. Diluimos las fracciones tratadas en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino 10 % y las incluimos en el ensayo de inhibición de la proliferación linfocitaria.

DIGESTIÓN CON PROTEASAS

Liofilizamos alícuotas de 600 µL de HEH y las resuspendimos, independientemente, en soluciones de tripsina (Sigma) en tampón fosfato 0,03 M pH 8 (relación enzima/sustrato 1:5) y pronasa (Merck) en tampón fosfato 67 mM pH 7,4 (relación enzima/sustrato 7,5:10). Incubamos las alícuotas durante 3 1/2 h en un baño a 37 °C. Detuvimos la digestión por inactivación enzimática a 95 °C durante 1 min. Posteriormente, centrifugamos a 5 000 xg y colectamos el sobrenadante. Como control empleamos una fracción no tratada sometida al mismo procedimiento. Las alícuotas hidrolizadas las incluimos en el ensayo de inhibición de la proliferación linfocitaria.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS

Aislamos las células mononucleares de sangre periférica humana mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque. Cultivamos la suspensión celular en placas de 96 pozos a una concentración de 2×10^6 células/mL, en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10 % y estimuladas con PHA. Ensayamos los controles negativos y positivos por triplicado, mientras que las muestras (HEH sin tratar y sometido a diferentes tratamientos térmicos y enzimáticos) fue por duplicado o triplicado, según el caso. Cultivamos las células por 72 h a 37 °C en atmósfera saturada de CO₂ al 5 %, 6 h antes de finalizar la incubación, añadimos timidina tritiada 1µCi/pozo. Colectamos las células con un cosechador de células. La radiactividad incorporada por las células la

contamos en un espectrómetro β (LKB-Wallac) y el porcentaje de inhibición lo calculamos mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 1 - \frac{\text{x cpm (experimental)} - \text{x cpm (control negativo)}}{\text{x cpm (control positivo)} - \text{x cpm (control negativo)}} \times 100$$

RESULTADOS

Las muestras fueron analizadas por un patólogo para excluir aquéllas que presentaran signos neoplásicos o de infección, las utilizadas en este trabajo mostraban apariencia normal.

Los homogeneizados de epidídimo humano no mostraron variaciones significativas en la concentración de proteínas, sin embargo, la actividad inhibidora presentó una alta variabilidad, por ello sólo seleccionamos los homogeneizados con más del 50 % de actividad (n = 7) para formar el *pool* de HEH (tabla 1).

TABLA 1. Concentración de proteínas y actividad inhibidora de los homogeneizados de epidídimo humano

No. de caso	Concentración de proteínas (mg/mL)	Actividad inhibidora (%)
1	1,92	71
2	3,89	95
3	3,97	71
4	3,61	80
5	3,43	82
6	3,55	71
7	5,60	84
<i>Pool</i>	3,97	89

En la figura se observan los porcentajes de inhibición obtenidos después de tratamiento del HEH a diferentes temperaturas donde cada punto es la media

de los cpm de muestras triplicadas. Llevamos a cabo todos los tratamientos con el mismo *pool* de HEH, excepto el realizado a 95 °C donde empleamos otra preparación. Por esta razón los porcentajes de inhibición para esta curva fueron superiores, por la variabilidad de esta actividad discutida previamente. En todos los casos la inhibición tiene un comportamiento cualitativamente similar al de la muestra control.

En la tabla 2 mostramos el resultado del tratamiento enzimático de los homogeneizados. Obtuvimos los datos en 2 experimentos diferentes y son expresados como la media de los cpm de cultivos duplicados. Después de la digestión con tripsina, el HEH experimentó una disminución significativa de su capacidad inhibidora, sin embargo, la digestión con pronasa no alteró dicho efecto inmunosupresor del homogeneizado.

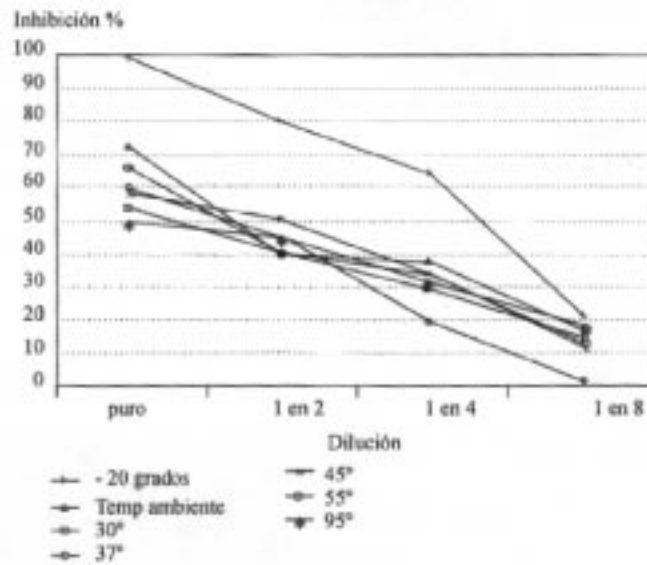


FIG. Efecto de la temperatura sobre la actividad inhibidora de la proliferación linfocitaria del homogeneizado a diferentes diluciones

TABLA 2. Efecto del tratamiento enzimático sobre la actividad inhibidora del HEH

Tratamiento	Experimento 1		Experimento 2	
	cpm ± S	Porcentaje de inhibición	cpm ± S	Porcentaje de inhibición
Tripsina	5 244 ± 377	34	6 031 ± 0	3
Pronasa	1 327 ± 96	76	128 ± 16	100
Muestra control	2 134 ± 165	74	1 186 ± 239	81

DISCUSIÓN

El testículo y el epidídimo están sometidos a cambios de temperatura provocados por diferentes factores, como son la postura, la temperatura ambiental, factores ocupacionales y de estilo de vida y enfermedades como el varicocele.¹⁵ Podemos sugerir que la termoestabilidad por los factores inmunosupresores epididimarios puede tener relevancia para el mantenimiento de la inmunorregulación en este órgano.

El hecho que la tripsina afecte la capacidad inhibidora del homogeneizado epididimario y la pronasa no, se explica por las diferentes especificidades de sus respectivas acciones enzimáticas. La tripsina hidroliza los enlaces donde están comprometidos los grupos carboxílicos de los aminoácidos básicos L-lisina y L-arginina y la pronasa es una mezcla de exo- y endopeptidasas que contiene al menos 4 serino-endopeptidasas. Podemos suponer que la tripsina hidroliza enlaces peptídicos que contribuyen a la conformación tridimensional del sitio donde reside la actividad de los factores inhibidores producidos por el epidídimo, ya que es

conocido que la actividad biológica de una proteína depende de dicha conformación espacial.¹⁶ La disminución de la actividad biológica del HEH bajo la acción de al menos una de las proteasas usadas demuestra que en los procesos de inmunomodulación en el epidídimo humano participan sustancias de naturaleza proteica.

Junto a la existencia de un activo sistema inmune de mucosas en el tracto reproductor masculino,¹⁷ en algunos órganos como el epidídimo, se ha encontrado actividad inmunosupresora en el fluido que ellos producen^{5,18} y linfocitos T CD8+ intraepiteliales, que representan una población de células supresoras encargadas de regular las reacciones inmunes contra los antígenos del esperma.¹⁹ Nuestros resultados son compatibles con estos hallazgos y sugieren que dentro de los factores responsables de la inhibición de la proliferación linfocitaria se encuentran sustancias termoestables de naturaleza proteica que pueden ser proteínas de membrana liberadas durante la homogenización o proteínas solubles producidas por las células epiteliales epididimarias o por células inmunocompetentes residentes en el tracto reproductor masculino.

SUMMARY

The effect of the thermal and enzymatic treatment on the inhibition of the lymphocytic proliferation induced by a pool of homogenates of human epididymis obtained from dead donors was studied. Each sample was analyzed from the anatomopathological point of view. The concentration of proteins was also determined by the Bradford's method, as well as the inhibitory activity of the lymphocytic proliferation. Aliquots of 600 L of the homogenates were incubated at 30 °C, 37 °C and 55 °C during 30 minutes. Other 2 aliquots were treated at room temperature for 24 hours and at 95 °C during 1 minute. Similar fractions were hydrolyzed with tripsine (enzyme/substrate 1:5) and pronase (enzyme/substrate 7.5:10) during 3 1/2 hours at 37 °C. The samples treated with heat or enzymatically and the non-treated samples used as control were included in the lymphocytic proliferation inhibition test. The results show that the thermal treatments applied do not affect the inhibitory properties of the homogenates. The enzymatic digestion with tripsine produced a loss of the inhibitory capacity.

However, no modification was observed with pronase. It was concluded that thermostable factors of protein nature with capacity to inhibit the lymphocytic proliferation are produced in the human epididymis.

Subject headings: EPIDIDYMIS/immunology; LYMPHOCYTES/immunology; IMMUNOCOMPETENCE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hedger MP. The testis: an «immunologically suppressed» tissue? *Reprod Fertil Dev* 1987;1:75-9.
2. James K, Hargreave TB. Immunosuppression by seminal plasma and its possible clinical significance. *Immunol Today* 1984;5:357.
3. Marcus ZH, Misgav N, Zacut H. Inhibition of natural killer cell activity by a fraction of human seminal plasma. *IRCS Med Sci* 1984;12:897.
4. Ablin RJ, Barktus JM, Polgar J. Effect of human seminal plasma on the lytic activity of natural killer cells and presumptive identification of participant macromolecules. *Am J Reprod Immunol* 1990;24:15-21.
5. Anderson DJ, Tartar TH. Immunosuppressive effects of mouse seminal plasma components "in vivo" and "in vitro". *J Immunol* 1982;128:535-9.
6. Bouvet JP, Couderc J, Quan CP, Pires R, D'Azambuja A, Pillot J. Delineation between T and B-suppressive molecules from human seminal plasma: I. Partial characterization of a 180 kD protein inhibiting the B response to T-independent antigens. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988;18:87-93.
7. Bouvet JP, Couderc J, Pillot J. In vivo and in vitro immunosuppression in mice by a 100-110 kD fraction from boar seminal plasma. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987;14:135-40.
8. Quan CP, Roux C, Pillot J, Bouvet JP. Delineation between T and B suppressive molecules from human seminal plasma: II. Spermine is the major suppressor of T-lymphocytes «in vitro». *Am J Reprod Immunol* 1990;22:64-9.
9. Maayan R, Zukerman Z, Shohat B. Oxidation of polyamines in human seminal plasma: a possible role in immunological infertility. *Ach Androl* 1995;34:95-9.
10. Hooper P, Smythe E, Richards RC, Howard CV, Lynch RV, Lewis-Jones DI. Total number of immunocompetent cells in the normal rat epididymis and after vasectomy. *J Reprod Fertil* 1995;104:193-8.
11. Anderson DJ, Pudney J. Mucosal immune defense against HIV-1 in the male urogenital tract. *Vac Res* 1992;1:143-50.
12. Pudney J, Anderson DH. Organization of immunocompetent cells and their function in the male reproductive tract. En: Griffin PD, Johnson PM, eds. *Local Immunity in Reproductive Tract Tissues*. Oxford-New York: Oxford University Press. 1993:131-45.
13. Rodríguez A, Mallea L, Machado AJ. Inhibición de la respuesta inmune por modulación de la síntesis de IL-2 e IFN-gamma. *Avan Biotecnol Moderna* 1997;4:N32.
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation protein-dye binding. *Ann Biochem* 1976;72:248-54.
15. Mieusset R, Bujan L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Intern J Androl* 1995;18:169-84.
16. Lehninger AL. *Bioquímica*. 2 ed. Barcelona: Ediciones Omega, 1979:128.
17. Anderson DJ. The importance of mucosal immunology to problems in human reproduction. *Reprod Immunol* 1996;31:3-19.
18. Harkins H, Anderson DJ. Seminal plasma factor(s) released by sperm inhibit cytotoxic activity of "natural killer", (NK) lymphoid cells. *Biol Reprod* 1984;30(Suppl):139.
19. Ritchie AWS, Hargreave TB, James K, Chisholm GD. Intra-epithelial lymphocytes in the normal epididymis: a mechanism for tolerance to sperm auto-antigens. *Br J Urol* 1984;56:79-83.

Recibido: 25 de mayo de 1998. Aprobado: 4 de enero de 1999.

Lic. *Maydelín Frontela Noda*. Instituto Nacional de Endocrinología, Zapata y D, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 10400.