

22
5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado del Colegio de Ciencias
y Humanidades.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

**EFEECTO DE LOS ANDROGENOS SOBRE
LA RESPUESTA INMUNE HUMANA
IN VITRO.**

T E S I S

Que para obtener el grado de
**LICENCIATURA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA**
P r e s e n t a

OFELIA CHAVEZ DE LA LAMA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION GENERAL.

I. EL SISTEMA INMUNOLOGICO.	1
II. INMUNOENDOCRINOLOGIA.	8
A. RELACION TIMO-GONADAS.	8
B. DIFERENCIAS SEXUALES EN LA RESPUESTA INMUNE.	10
1. INDIVIDUOS INTACTOS.	11
2. INDIVIDUOS HORMONALMENTE ALTERADOS.	
a. GONADECTOMIA.	12
b. ADMINISTRACION DE HORMONAS SEXUALES.	13
1) Estrógenos.	13
2) Andrógenos.	15
3) Progesterona.	18
C. HORMONAS SEXUALES Y AUTOINMUNIDAD.	20
1. HUMANO.	20
2. MODELO MURINO NZB/NZW.	23
III. INTRODUCCION AL PROYECTO DE INVESTIGACION.	25
A. CARACTERISTICAS DEL SISTEMA DE ESTUDIO.	27
B. OBJETIVO.	31

METODOLOGIA.

I. INDIVIDUOS.	33
------------------------	----

II. OBTENCION Y AISLAMIENTO DE CELULAS.	33
III. MICROCULTIVO DE LINFOCITOS.	34
A. ESTIMULACION MITOGENICA.	34
B. DETERMINACION DE LA INCORPORACION DE NUCLEOTI-- DOS RADIOACTIVOS.	36
IV. ANALISIS DEL CICLO CELULAR.	37
A. ESTIMULACION MITOGENICA.	37
B. DETERMINACION DEL CONTENIDO CELULAR DE DNA.	37
V. PURIFICACION DE CELULAS T.	39
VI. IDENTIFICACION DE CELULAS PRECURSORAS POSTIMICAS.	40
VII. PRODUCCION DE IL-2.	41
VIII. MICROENSAYO DE ACTIVIDAD DE IL-2.	42
IX. ADICION DE IL-2 A CULTIVOS TRATADOS CON 5 α -DHT.	43
X. ESTADISTICA.	44

RESULTADOS.

I. EFECTO DE LOS ANDROGENOS SOBRE LA PROLIFERACION - DE LINFOCITOS NO ESTIMULADOS Y ESTIMULADOS CON -- PWM, PHA Y CON-A.	44
A. CURVA DOSIS-RESPUESTA A 5 α -DIHIDROTESTOSTERO NA.	
B. CURVA DOSIS-RESPUESTA A TESTOSTERONA.	

II. EFECTO DE LA 5 α - DHT SOBRE LAS CURVAS DOSIS-RES	
PUESTA A PWM, PHA Y CON-A.	52
III. EFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA TOMA DE TIMIDINA. .	55
IV. EFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA CINETICA DE PROLIFE	
RACION INDUCIDA POR PWM, PHA Y CON-A.	56
V. EFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE EL CICLO CELULAR DE --	
LINFOCITOS NO ESTIMULADOS Y ESTIMULADOS CON PWM, --	
PHA Y CON-A.	62
VI. EFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LAS POBLACIONES CELULA-	
RES.	71
A. EFECTO SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS PU--	
RIFICADOS T Y ESTIMULADOS CON PHA Y CON-A.	
B. EFECTO SOBRE LAS CELULAS PRECURSORAS POSTIMICAS.	
VII. EFECTO SOBRE LA PRODUCCION DE IL-2.	76
A. MICROENSAYO DE ACTIVIDAD DE IL-2.	
B. TRATAMIENTO DE LOS SOBRENADANTES CON CARBON.	
VIII. EFECTO DE LA ADICION DE IL-2 A CULTIVOS EN PRESEN--	
CIA DE 5 α -DHT, NO ESTIMULADOS Y ESTIMULADOS CON -	
PHA Y CON-A.	82
IX. EFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA PROLIFERACION DE LIN-	
FOCITOS EN EL SINDROME DE FEMINIZACION TESTICULAR -	
COMPLETA.	90
DISCUSION.	93
BIBLIOGRAFIA.	112

INTRODUCCION GENERAL

I. EL SISTEMA INMUNOLOGICO.

El sistema inmunológico es extremadamente complejo - con una gran variedad de funciones para mantener la homeostasis y la salud. Los componentes genéticos, celulares y moleculares del sistema inmunológico se combinan en una complicada red de comunicación capaz de ejercer múltiples efectos a partir de relativamente pocos tipos celulares. Los componentes celulares del sistema inmunológico incluyen a los linfocitos y a las células accesorias del sistema reticuloendotelial.

Los macrófagos tienen una variedad de funciones en la respuesta inmune. Juegan un papel fundamental en la distribución y en el procesamiento de antígenos y en su exposición a los linfocitos, por ser la principal célula fagocítica en el sistema monocito-macrófago. Secretan mediadores biológicamente activos capaces de regular el tipo y la magnitud de la respuesta de los linfocitos.

Los linfocitos son los componentes celulares antígeno-específicos del sistema inmune y se han identificado dos clases de linfocitos denominados T y B, que tienen diferentes capacidades funcionales.

Los linfocitos B dan origen a las células plasmáticas -

que son las sintetizadoras y secretoras de inmunoglobulinas. -- Las células B precursoras se designan $B\mu$, $B\gamma$, $B\alpha$, $B\delta$, -- $B\epsilon$, con base en las diferentes clases de inmunoglobulinas circ^ulantes IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. Dentro de la población de linfocitos B, se encuentran las células de memoria que son fun^ucionalmente importantes para el desarrollo rápido de las res^upuestas secundarias de anticuerpos consecutiva a una segunda exposición antigénica. Posiblemente también existen células B reguladoras, ya que se ha documentado la capacidad de moléculas de anticuerpo para regular la respuesta inmune, a través de retroalimentación (red idiotipo-antidiotipo).

Los linfocitos T se pueden dividir en dos categorías -- funcionales: células reguladoras y células efectoras:

1) Las células reguladoras pueden amplificar o inducir la respuesta (cooperadoras) o suprimir la respuesta (supresoras) de otros linfocitos T o B.

2) Las células efectoras son las responsables de las reacciones inmunes mediadas por células como la hipersensibilidad retardada, el rechazo de injertos y tumores y la eliminación de células infectadas por virus.

Por medio de fluorescencia, autorradiografía, rosetas con eritrocitos cubiertos con inmunoproteínas, etc., ha sido posible definir marcadores de superficie específicos para la detección de las subpoblaciones de células T. Estos marcadores de superficie de las células T reguladoras y otras características como su distribución en los órganos linfoides, los --

cambios porcentuales con la edad, la sensibilidad a teofilina o hidrocortisona y la respuesta al factor tímico sérico se encuentran resumidos en la Tabla 1. La Tabla 2 muestra las funciones en que participan estas subpoblaciones de células T.

La célula T cooperadora es capaz de ejercer efectos regulatorios positivos sobre las células B y estimular la diferenciación hacia la célula plasmática madura. La célula T cooperadora también ejerce inducción positiva sobre las precursoras de células T destinadas a transformarse en citotóxicas. Las células T cooperadoras participan en la inhibición por retroalimentación que se ha definido como la capacidad de una subpoblación de células T_{μ} para inducir a una subpoblación de células T_{γ} para ejercer supresión.

La célula T supresora inhibe la función de las células B o de las plasmáticas maduras, secretoras de inmunoglobulinas. La actividad de la célula T supresora puede interferir con la interacción entre las células T y B o con la activación de las células T cooperadoras o con la diferenciación de la célula B.

Las células precursoras postímicas o formadoras de rosetas con eritrocitos autólogos (T_{ar}) están constituidas por dos subpoblaciones. Una subpoblación, la $T_{ar} PNA^{+}$ posee la capacidad de unir aglutinina de cacahuete lo que indica su inmadurez, y otra subpoblación $T_{ar} PNA^{-}$ que perdió dicha capacidad. Las células T_{ar} son capaces de proliferar y generar células T_{μ} y T_{γ} espontáneamente o bajo el estímulo de factores tímicos, por lo que tienen la capacidad de generar supresión -

y son las precursoras de la citotoxicidad natural. Las células Tar participan en la inhibición por retroalimentación una vez que han recibido la señal de células T_H lo que ocasiona la proliferación y diferenciación de estas células en linfocitos T_H para inhibir la actividad de células T cooperadoras constituyendo un circuito de retroalimentación negativa (1). Las células Tar son las respondedoras en el cultivo mixto autólogo que es la respuesta blastogénica de las células T en respuesta a las células No-T del mismo individuo (2). A las células precursoras postmíticas recientemente se les ha adjudicado un papel en la producción de interleukina-2.

Las interacciones e influencias regulatorias entre las distintas poblaciones y subpoblaciones celulares del sistema inmunológico del humano se encuentran esquematizadas en la Figura 1.

TABLA 1

CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS EN EL HUMANO

CARACTERÍSTICAS	CÉLULAS T		
	COOPERADORAS (T _μ)	SUPRESORAS (T _γ)	PRECURSORAS (T _{AR})
1. DISTRIBUCIÓN EN ÓRGANOS LINFOIDES			
TIMO	3.0 ± 2.0	1.0 ± 1.0	73.2 ± 5.0
BAZO	13.0 ± 3.0	45.0 ± 6.0	49.3 ± 3.0
SANGRE PERIFÉRICA	40.0 ± 2.0	14.1 ± 2.0	22.2 ± 0.5
2. VARIACIONES CON LA EDAD			
RECIÉN NACIDOS	48.0 ± 2.0	13.6 ± 2.5	8.7 ± 2.0
ADULTOS JÓVENES	40.0 ± 3.0	30.0 ± 1.0	24.0 ± 0.1
ANCIANOS	35.2 ± 1.0	14.1 ± 2.0	22.2 ± 0.5
3. FORMACIÓN DE ROSETAS			
ERITROCITOS AUTÓLOGOS	—	—	+
ERITROCITOS DE CARNERO	+	+	+
4. RECEPTORES			
Fc _γ	—	+	—
Fc _μ	+	—	—
GRC DE ALTA AFINIDAD	+	—	+
GRC DE BAJA AFINIDAD	—	+	—
5. MARCADORES MONOCLONALES			
OKT3	+	+	+
OKT4	+	—	+
OKT5	—	+	—
OKT8	—	+	+
6. UNIÓN A AGLUTININA DE			
CACAHUATE	(—)	(—)	26.9 ± 3.0
7. ADHERENCIA A NYLON			
	<1	<2	90.5 ± 7.2
8. TINCIÓN DE ESTERASA			
NO ESPECÍFICA	+	—	+
9. SENSIBILIDAD A TEOFILINA			
	—	+	—
10. SENSIBILIDAD A CORTISONA			
IN VIVO (% DE REDUCCIÓN)	50.0 ± 4.0	< 3.0	85.2 ± 8.0
IN VITRO (% DE REDUCCIÓN)	3.0 ± 1.5	65.0 ± 2.0	82.9 ± 1.7
11. RESPUESTA AL FACTOR			
TÍMICO DEL SUERO	—	+	+

TABLA 2

PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS CELULAS T EN EL HUMANO

PROPIEDADES FUNCIONALES	CELULAS T		
	REGULADORAS		PRECURSORA
	COOPERADORA (T _μ)	SUPRESORA (T _γ)	RECURSORA (T _α)
RESPUESTA A MITOGENOS			
PHA	+	+	-
CON-A	-	+	+
COOPERACION	+	-	-
SUPRESION	-	+	-
INDUCCION DE CITOTOXICIDAD	+	-	-
INHIBICION POR RETROALIMENTACION	+	+	+
GENERACION DE SUPRESION	-	-	+
GENERACION DE CITOTOXICIDAD	-	-	+
RESPUESTA EN CULTIVO MIXTO AUTOLOGO	+	+	+
RESPUESTA EN CULTIVO MIXTO ALOGENICO	+	-	-

CIRCUITOS DE INMUNORREGULACION EN EL HUMANO

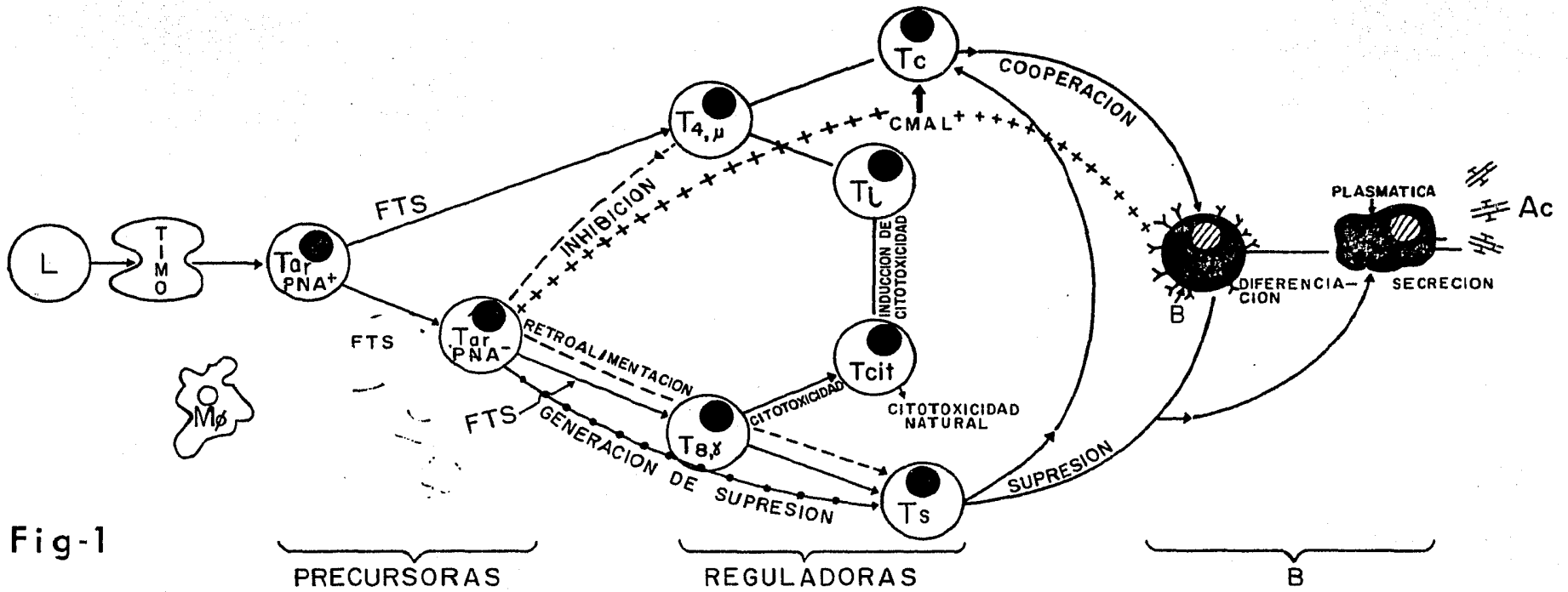


Fig-1

II. INMUNOENDOCRINOLOGIA.

En los últimos cinco años se ha creado una importante área de la ciencia, de naturaleza multidisciplinaria, que pretende investigar las interrelaciones entre el sistema endócrino y el inmunológico a través del estudio de los factores sexuales con respecto a las diferencias en la respuesta inmune y a su importancia en el desarrollo de la autoinmunidad.

La inmunoendocrinología está en sus comienzos y su significado en la inmunobiología y en la reumatología es muy importante, ya que permite esperar que, con este enfoque endócrino, se consiga un progreso significativo en la elucidación de las enfermedades autoinmunes y en el desarrollo de nuevas posibilidades diagnósticas y terapéuticas.

A. RELACION TIMO-GONADAS.

La información con la que se cuenta sobre la relación del sistema inmunológico con respecto al sistema endócrino trata sobre el efecto de los glucocorticoides sobre el timo y sus funciones y sobre las células linfoides circulantes. Es poco lo que se sabe en relación a la influencia de las hormonas sexuales sobre la función tímica y la respuesta inmunológica, a pesar de que desde 1898 se reportó la interrelación estrecha entre este órgano y las gónadas (3). Desde el ini-

cio se reconoció que la glándula del timo sufre una involución en ambos sexos después de la pubertad y en la aparición de la función gonadal adulta y que durante el embarazo y la lactancia sucede una involución reversible (4).

Cuando se aislaron las hormonas esteroides fue posible hacer una serie de estudios que demostraron que grandes dosis de andrógenos o estrógenos provocan una involución tímica. Los estudios de timectomía durante el período neonatal mostraron que hay una interacción recíproca entre las hormonas tímicas y el eje pituitario-ovárico en hembras. En 1969 Nishizuka y Sakakura reportaron que la timectomía neonatal en el ratón realizada entre los dos y cuatro días de edad resulta en una alta frecuencia de disgenesia ovárica por la rápida pérdida de oocitos y en un descenso subsecuente del número de folículos y de cuerpo lúteo (5). Ahora se sabe que la timectomía neonatal afecta el desarrollo ovárico en varias cepas de ratones y de híbridos, y también se ha reportado el desarrollo de tumores ováricos. Estos cambios en función ovárica pueden ser prevenidos por injertos o suspensiones celulares de timos, lo que indica la necesidad de la producción de substancias para la función normal. Por otro lado se sabe que los ratones atímicos congénitos del genotipo recesivo nu/nu presentan una deficiencia en el número de folículos y carecen generalmente de cuerpo lúteo (6).

Otros estudios han mostrado que el timo tiene un pa--

pel en el desarrollo ovárico en humanos, ya que la ataxia telangiectasia presenta un retraso en el desarrollo folicular (7). Los datos indican que existe un eje timo-pituitario ovárico en el humano; sin embargo, la naturaleza de la interacción entre el timo, la pituitaria y el ovario no se ha elucidado.

B. DIFERENCIAS SEXUALES EN LA RESPUESTA INMUNE.

Son ya bien conocidas en animales de experimentación la baja resistencia a infección y las respuestas inmunes más débiles de los machos comparadas a las de las hembras; sin embargo, los factores responsables de este fenómeno aún permanecen oscuros. Se han sugerido diferencias en los cromosomas sexuales y/o en las hormonas sexuales. Numerosos reportes han intentado relacionar estas diferencias en resistencias a infección y respuesta inmune con diferencias sexuales en la respuesta inmunológica. Estos se pueden organizar en dos categorías:

- 1) Estudios en individuos intactos.
- 2) Estudios en individuos hormonalmente alterados.

En la primera categoría se encuentran las observaciones sobre los niveles de inmunoglobulinas, la resistencia a infección y la respuesta inmune en machos y hembras intactos, -- así como las comparaciones entre hembras normales y las que se

encuentran en el ciclo menstrual o embarazadas. En la segunda categoría se encuentran los resultados de los experimentos en individuos gonadectomizados y de individuos cuyas células han sido expuestas a esteroides sexuales exógenos.

1. INDIVIDUOS INTACTOS.

Los datos de los diferentes laboratorios sobre individuos no tratados son consistentes. Casi todos los estudios comparan los niveles de inmunoglobulinas en hombres normales y mujeres y muestran que las mujeres tienen niveles más altos de IgM que los hombres (8, 9, 10). La gente de raza negra tiene niveles más altos de IgM que la de raza blanca y las mujeres negras tienen los niveles más altos de IgM (11) de todos los grupos. Con respecto a la IgG, la mayoría de los reportes muestran que las mujeres blancas tienen valores de IgG -- iguales a los de los varones blancos (10, 11, 12). Los valores de los negros exceden como grupo los valores de los varones blancos (10, 12).

Aunque generalmente se acepta una asociación entre los niveles de inmunoglobulinas y la capacidad inmunológica, los niveles de inmunoglobulinas no siempre indican protección contra la enfermedad ni una mejor actuación inmunológica. A pesar de ésto, la literatura muestra que los sexos son comparables en términos de susceptibilidad a la infección o respuesta inmune (13, 14) y que las mujeres intactas tienen una mayor resistencia a la infección y una respuesta inmune espe-

cífica más alta que los varones intactos (15, 16, 17).

Comparación con hembras normales en el ciclo ovulatorio o embarazadas: Se han llevado a cabo estudios tanto en animales como en humanos de hembras embarazadas versus no embarazadas y de hembras intactas en diferentes estadios del ciclo ovulatorio para determinar si las hormonas sexuales que existen naturalmente son las responsables de las respuestas inmunes aumentadas en ellas. Casi todos los reportes indican que el embarazo está asociado con una reducción en el número de células T o de su función (18, 19, 20). Aún no se ha aclarado si la inmunosupresión observada se debe a la presencia de gonadotrofinas, progestinas, fetoproteínas u otros factores. También se ha reportado que la función de la célula B se encuentra aumentada (18) y que existe una reversión del cociente B:T (20). Sin embargo, estos hallazgos son aún motivo de controversia. Durante el embarazo en humanos los niveles de IgA, IgM e IgG se deprimen en el segundo y tercer trimestres (21), en tanto que los niveles de IgE o permanecen inalterados o son variables. En ratones se ha observado que durante el ciclo, las respuestas a células T y B se encuentran elevadas cuando los niveles de estradiol son altos durante el proestro pero también cuando se han reportado estar bajos, durante el metestro (22).

2. INDIVIDUOS HORMONALMENTE ALTERADOS.

a. GONADECTOMIA. A partir de las respuestas inmunes incremen-

tadas (17, 23) se ha inferido que las hormonas sexuales masculinas son inmunosupresoras. Sin embargo, los experimentos de gonadectomía contienen varios problemas serios que hacen difícil la interpretación de los resultados: 1) Se ha visto que los efectos positivos o negativos de la gonadectomía son similares en los dos sexos. 2) Los resultados son variables dependiendo del laboratorio, puesto que unos muestran que la gonadectomía aumenta; otros que no tiene efecto; otros más que es deletérea con respecto a las respuestas inmunes y la resistencia a infección. 3) En los casos en los que se presenta inmunopotenciación o protección post-gonadectomía, ésta no persiste. 4) En muchos experimentos de gonadectomía no están incluidos los controles adecuados. 5) El reemplazo con hormonas seguido de la depleción, no revierte uniformemente los efectos de la gonadectomía.

b. ADMINISTRACION DE HORMONAS SEXUALES.

1) Estrógenos: Los efectos de la administración de hormonas femeninas o sus análogos sobre la respuesta inmune y la protección a la enfermedad constituye un área de controversia. La administración de estrógenos aumenta la respuesta a eritrocitos de carnero (24), retarda el descenso normal de títulos de anticuerpos (25) y protege a los ratones contra infecciones bacterianas (26, 27). Sin embargo, con dosis similares se han reportado los efectos contrarios. También se ha en

contrado que el estradiol incrementa las células formadoras de anticuerpos (28) y que el dietil-estibesterol incrementa la -- respuesta anafiláctica en rata (29). No obstante, el tratamiento con estrógenos no tiene efecto sobre otros ensayos y es claramente supresivo en las respuestas a *Escherichia coli* en cubayos (30), a pneumococo tipo 3 (31), eritrocitos de carnero (32) y células tumorales (33); es supresivo del rechazo de injertos en ratones (32, 34), de la inmunidad celular asociada a resistencia a *Toxoplasma gondii* (35) y de la hipersensibilidad re-- tardada característica de la poliartritis por adyuvante (36).

En ratones los niveles sostenidos de estrógenos llevan a la reducción de la actividad de la célula asesina "NK" (37). Los efectos de los estrógenos sobre los macrófagos no son conocidos, pero se cree que son mínimos dado que la concentración -- de estradiol en microgramos no inhibe la respuesta al factor -- inhibitorio de la migración de macrófagos "MIF".

La administración de estrógenos a ratones neonatos -- (32) o irradiados de manera subletal (34) no solamente deprime las respuestas inmunes sino que resulta en un grave deterioro de su desarrollo y en la muerte. En ratones, los compuestos -- estrogénicos causan involución tímica y un descenso en el número de células que en la glándula residen. En relación a los efectos de las hormonas sexuales sobre la disponibilidad de -- las células del sistema linfomieloide, la administración de es

trógenos produce efectos dramáticos. Grandes dosis de estrógenos conducen a granulocitopenia y a linfopenia (38). En los transplantes al tratar con estrógenos a ratones recipientes, letalmente irradiados y reconstruídos con células de médula ósea (34, 39), resulta en la muerte acelerada del huésped irradiado. También sucede cuando los donadores de células han sido tratados con estrógenos (39). Los estudios histológicos y hematológicos muestran que la muerte se debe a defecto de los precursores de linfocitos para proliferar (34). El tratamiento con estrógenos de las células del recipiendario o del donador reduce el número de colonias mielocíticas que se formarán en los bazos del recipiente después del transplante (40, 41).

2) Andrógenos: Los experimentos realizados sobre los efectos del tratamiento con andrógenos han dado el mismo tipo de resultados conflictivos y no aportan evidencia concluyente de que la testosterona es inmunosupresora.

Mientras que la administración de andrógenos a animales intactos o gonadectomizados disminuye la resistencia a infección y reduce las respuestas inmunes en muchos ensayos, en otros no tiene efecto o inclusive incrementa las respuestas inmunes y la resistencia a infección. El tratamiento con testosterona puede interferir con el desarrollo de la tiroiditis autoalérgica (42) pero no tiene efecto en la incidencia de artritis por adyuvante (36). En las respuestas inmunes los efectos de las hormonas son variables y parecen depender del laboratorio -

o del ensayo, así la testosterona puede incrementar o inhibir las respuestas a eritrocitos de carnero (43, 44), a dinitrofenil(DNP)(29) o células tumorales (33), pero no tiene efecto en la respuesta de injerto/huésped o rechazo de injertos (44). Los resultados del tratamiento con andrógenos en la tiroiditis auto-alérgica sugieren que en condiciones especiales los andrógenos pueden modificar la respuesta inmune actuando sobre las células supresoras (42).

La influencia más consistente ejercida por los andrógenos sobre el sistema inmune es la inmunosupresión producida en pollos. Después de la administración de andrógenos a embriones de pollo de 5 a 12 días, las respuestas a albúmina sérica bovina (BSA) (45, 46) endotoxina e influenza tipo A (46); a gammaglobulina humana, Brucella (46, 47) y dinitrofenil (DNP); a gammaglobulina bovina, eritrocitos de carnero y fago X (41), se suprimen en pollos recién nacidos (36) y de ocho meses (46). El tratamiento con testosterona detiene el crecimiento del ducto y la vesícula en la bursa (48), lo que resulta en involución, hipoplasia o agenesia, cuyos grados dependen del tiempo y de la dosis de andrógeno. La administración de andrógenos también produce atrofia cortical del timo (46). Si se transplanta una bursa normal a huéspedes tratados con testosterona, la bursa del huésped no se desarrolla, pero sí se encuentran precursores disponibles linfoides del huésped (49), lo que su-

giere que la acción inhibitoria de la testosterona se ejerce en el componente epitelial y no linfoideo de la bursa. Esta hipótesis se ve reforzada por los recientes hallazgos de células blanco para andrógeno entre los componentes no linfoides de la bursa (50).

En contraste con los efectos de los estrógenos sobre la médula ósea, los efectos estimulatorios de los andrógenos sobre la eritropoyesis y la granulopoyesis se encuentran bien documentados (51-55). Tanto en la línea eritroide (51, 52) como en la granulocítica (51, 53, 54) los andrógenos actúan no sólo sobre las células precursoras como la colonia eritroide de CFU-E (51) o la colonia granulocito/monocito CFU-C (53, 54). También actúan sobre las células precursoras menos diferenciadas como las células pluripotenciales CFU que dan lugar a todas las células de la sangre incluyendo los linfocitos (52, 53, 54-57).

Estudios anteriores han mostrado que por inyecciones múltiples de testosterona, el timo y la médula ósea se depletan temporalmente de células linfoides y que se desarrolla una linfocitosis transitoria, la cual va acompañada de un elevado hematocrito y de una granulocitosis sostenida (58). Debido a que en estos experimentos no ocurrió linfólisis, se infirió que los andrógenos estimulan la liberación de linfocitos

del timo y aceleran la diferenciación de las células de la médula ósea hacia las líneas eritroides y granulocíticas. Estudios recientes apoyan el hecho de que las células pluripotenciales pueden ser inducidas hacia su diferenciación final, dependiendo del ambiente, hacia las líneas eritroides, granulocíticas o linfoides por los andrógenos (55, 57).

Existe la hipótesis de que la inferioridad del sistema inmune de los machos, comparado al de las hembras, se debe a la variabilidad en la sensibilidad a andrógenos y no a la concentración de andrógenos en plasma. Los experimentos actuales, con ratones machos sanos y enfermos, muestran que existe una correlación entre la alta sensibilidad a andrógenos y un desempeño inmunológico inferior (59).

3) Progesterona: Hay experimentos recientes que sugieren que la progesterona prolonga la viabilidad de injertos homólogos de piel en monos rhesus o de corazón en ratas. Se cree que este esteroide es un inmunosupresor potente, ya que prolonga también la supervivencia de injertos de piel en ratas.

La progesterona no tiene efecto sobre los macrófagos. A bajas dosis estimula la producción de anticuerpos y a altas dosis se inhibe significativamente su formación. La progesterona parece tener un papel activo en la función tímica ya que el timo murino es capaz de metabolizarla por 20α -hidroxila-

ción. (60).

Basados en la literatura y tomando los argumentos en grupo, éstos apoyan que la testosterona y la progesterona son inmunosupresores y que los estrógenos son inmunopotenciadores. Sin embargo, no se pueden dar conclusiones unificadas con respecto al efecto de las hormonas sexuales en la respuesta inmune, ya que ni los andrógenos ni los estrógenos ejercen un efecto único y perdurable. Existen problemas tanto a nivel de experimentación como a nivel de interpretación puesto que hay un conjunto de factores que pueden influir en las respuestas a hormonas, como son: la dosis, el vehículo de suspensión de las hormonas, la vía de administración, la cepa, la edad o el estado fisiológico de los animales. También contribuye el hecho de que los andrógenos pueden servir como precursores de andrógenos. El diseño experimental es otro problema, pues las diferencias reales o aparentes pueden ser aumentadas o enmascaradas por diferencias en el intervalo entre el tratamiento de la hormona y el ensayo inmunológico y también por los métodos estadísticos que se utilizan para el análisis.

Con respecto al efecto de las hormonas sexuales sobre las funciones de los linfocitos humanos normales, probadas in vitro, los resultados son consistentes. Los linfocitos cultivados en presencia de suero de embarazadas o púérperas o con progesterona o estradiol (61-63), presentan una respuesta -- disminuida a PHA (61, 63), Con-A (61), cultivo mixto autólogo (63) (CMA) y PPD (62). La inmunosupresión in vitro no ocurre en células cultivadas con estriol o 16-hidroxiprogesterona --

(63). Cuando se añade testosterona a cultivos de linfocitos los resultados son los mismos que los observados con estradiol y progesterona (61-63). El estradiol en linfocitos de sangre periférica incrementa el número de células secretoras de anticuerpos determinadas por el ensayo de células formadoras de placa (64). La progesterona produce incremento en la actividad supresora inducida por Con-A (65).

C. HORMONAS SEXUALES Y AUTOINMUNIDAD:

1. MODELO MURINO NZB/NZW. La disponibilidad del modelo del ratón NZB/NZW F1, que tiene muchas de las características del lupus eritematoso generalizado humano (LEG), ha permitido estudiar la influencia tanto de los andrógenos como de los estrógenos y de los progestágenos en el proceso de la enfermedad.

Los ratones NZB/NZW F1 desarrollan espontáneamente enfermedad autoinmune (66, 67) caracterizada por la formación de anticuerpos a eritrocitos de carnero, a timocitos, a células T y ácidos nucleicos principalmente de una cadena (DNAss) y por el desarrollo de una glomerulonefritis por complejos inmunes fatal. En esta cepa, al igual que en el LEG humano, los ratones hembras B/W desarrollan la enfermedad más tempranamente que los machos (68, 69). Los anticuerpos sufren un cambio de IgM a IgG durante el curso de la enfermedad (70) que es anterior en las hembras. El desarrollo de anticuerpos a DNA está asociado con una morbilidad y mortalidad incrementadas.

No se cuenta con una explicación para las diferencias

relacionadas con el sexo. Una serie de investigaciones en el ratón B/W ha dado luz a esta pregunta y, para determinar el papel que las hormonas sexuales juegan en la expresión de la autoinmunidad, se han realizado experimentos de castración prepuberal y retardada únicamente o acompañada de la administración sostenida de varias hormonas sexuales. Se ha encontrado que la castración prepuberal de las hembras del ratón híbrido NZB/NZW no tiene influencia sobre la mortalidad, mientras que la castración prepuberal del macho B/W causa la muerte prematura y aumenta la formación de autoanticuerpos. La castración prepuberal combinada con la administración de estradiol (17- β) (E-2) aumenta la mortalidad y el desarrollo de autoanticuerpos y propicia la nefritis por complejos inmunes en los dos sexos. La mortalidad se redujo significativamente en machos castrados cuando se les trató con progesterona, aunque ambos sexos tuvieron los niveles más altos de autoanticuerpos. El tratamiento sostenido de testosterona y 5 α -DHT suprimió los parámetros autoinmunes. Los efectos supresivos de los andrógenos no se debieron a sus propiedades anabólicas. La terapia de andrógenos dada a hembras de tres meses intactas o de seis meses castradas incrementó significativamente la supervivencia sin afectar los niveles séricos de anticuerpos anti-DNA. Estos resultados demuestran que las hormonas sexuales modifican significativamente la enfermedad autoinmune en los ratones B/W; los andrógenos ejercen una influencia protectora en tanto que los estrógenos y en cierto grado la progesterona aceleran el proceso de la enfermedad (71, 72).

En las hembras NZB y en los machos castrados, los anticuerpos anti-celulas (73) también aparecen más tempranamente. Los machos producen títulos más bajos que las hembras. Esto no está relacionado con el cromosoma Y ya que las hembras a las que se les administró testosterona tuvieron la misma respuesta que los machos. Algunos investigadores han descrito -- una respuesta ligada al cromosoma X hacia ciertos polinucleótidos naturales y sintéticos, en ratones. Existe duda de si estas respuestas a anticuerpos están genéticamente controladas y la pregunta fundamental es cómo las hormonas sexuales modifican estos procesos.

Otros de los datos de las investigaciones sobre lupus murino sugieren un papel de los andrógenos en el desarrollo de la tolerancia inmunológica. Todas las cepas de ratones con LEG tienen una tolerancia inmune defectuosa y se piensa que este defecto se debe a la ausencia de andrógeno o a la ausencia de células respondedoras.

Muchos investigadores piensan que los estrógenos decrecen la función de la célula T supresora, mientras que los andrógenos incrementan la función de la célula T supresora y -- disminuyen la formación y remoción de complejos inmunes de la circulación.

El sitio de acción de los andrógenos según se ha reportado, es el timocito en virtud de que los andrógenos modulan las células en transición de la médula ósea al timo. Usando -- la 20 α -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (20 α -SDH) como un mar

cador de célula T, se ha encontrado un descenso en los timocitos y un incremento en las células T supresoras después de la administración de andrógenos (74).

2. HUMANO: Desde hace mucho tiempo, se ha sospechado que las hormonas sexuales juegan un papel muy importante en la enfermedad autoinmune, en el humano, por la mayor incidencia de mujeres, observada en casi todas las enfermedades del tejido conjuntivo. Aunque la evidencia apunta a una interacción de factores genéticos e infecciosos en la etiología de LEG (lupus eritematoso generalizado), cualquier teoría de la causa debe explicar el hecho de que la incidencia en mujeres después de la pubertad es de 9:1 hombre (75) y de que el embarazo (76) y los agentes estrogénicos afectan la expresión fenotípica de la enfermedad.

El LEG en el hombre es muy raro; es interesante el hecho de que se ha descrito el síndrome de Klinefelter (genotipo XXY) asociado a LEG, y se ha pensado que es más frecuente que en hombres normales (77). Se ha creído que los estrógenos promueven el proceso de la enfermedad ya que los hombres con síndrome de Klinefelter frecuentemente desarrollan ginecomastia y cáncer de mama y también pueden ser más propensos a desarrollar LEG. La ocurrencia de LEG en hombres con síndrome de Klinefelter también ha hecho surgir la pregunta de si la deficiencia de andrógenos es un factor predisponente de la enfermedad o si lo es la estimulación crónica estrogénica. Esta última se encuentra apoyada por el hecho de que un exceso de anticon

ceptivos orales estrogénicos parece agravar la enfermedad y de que la extirpación gonadal de una hembra monocigótica de una - pareja de gemelas previno la posibilidad de desarrollar LEG -- (78).

Estudios previos han indicado que a pesar de que la can tidad total de estrógenos recuperados en mujeres con LEG es -- normal, la actividad de estradiol puede resultar en una activi dad estrogénica incrementada puesto que se encontraron anorma- lidades en el patrón hormonal del metabolismo femenino. El me- tabolismo de estradiol en LEG, por medición de metabolitos uri- narios después de una inyección de estradiol tritiado, reveló - en los hombres una elevación de 16 α -hidroxiestrone, mientras que en las mujeres fue de 16 α -hidroxiestrone y de estriol - (79). La 16 α -hidroxiestrone parece ser altamente estrogénica a juzgar por parámetros tales como la unión al receptor de ci tosol de estrógenos, y su potente actividad uterotrónica en - la rata después de una administración sostenida y porque la - 16 α -hidroxiestrone tiene propiedades químicas únicas que ha- cen que se una covalentemente a una gran variedad de proteí- nas séricas y de componentes de membrana. Cuando se valoró el estado androgénico a los pacientes masculinos con LEG se en- contró que los niveles de testosterona en el suero, de hormo- na luteinizante y folículo-estimulante, eran normales (80).- No hubo hipogonadismo o deficiencia de andrógenos, por lo que se concluyó que éste no es un requisito necesario para el de- sarrollo de LEG en hombres. Estudios recientes han sugerido.- que los andrógenos en plasma de hembras con LEG son muy bajos,

y otros datos indican que la oxidación de la testosterona en mujeres con LEG es anormal (81). Los productos de la oxidación a C-17 de la testosterona pueden potencialmente volverse estrógenos. De ahí que el defecto contribuiría a elevar los niveles de estrógenos y a reducir los niveles de testosterona.

El LEG no es la única enfermedad reumática en la cual las hormonas sexuales tienen importancia. Se ha visto que la gravedad de la artritis reumatoide es menor en pacientes que utilizan anticonceptivos orales. Además, las pacientes con artritis reumatoide mejoran importantemente de la enfermedad o bien se les inactiva durante el embarazo.

III. INTRODUCCION AL PROYECTO DE INVESTIGACION.

Una de las líneas del programa de investigación que se lleva a cabo en el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, es la del estudio de la regulación de la red inmunológica, tanto en individuos normales, como en la enfermedad autoinmune.

El estudio sistemático que se ha realizado en el Departamento sobre los circuitos de inmunorregulación revela que existen alteraciones cuantitativas y funcionales de las células de los pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes. El estudio de los circuitos de inmunorregulación de lupus eritematoso generalizado (LEG), artritis reumatoide (AR), enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC), esclerosis generalizada progresiva (EGP), dermatopolimiositis y síndrome de --

Sjögren primario (SS) sustenta la teoría de que la autoinmunidad sucede por aberraciones inmunorregulatorias que son -- particulares de cada enfermedad.

En la regulación de la red inmunológica participan -- múltiples factores genéticos y virales, así como también linfocinas, hormonas sexuales y factores tímicos, cuyo papel -- tendrá que descubrirse antes de llegar a comprender los aspectos oscuros de cada una de las enfermedades autoinmunes.

En el Departamento se han realizado estudios sobre el papel del factor tímico sérico y se están llevando a cabo estudios sobre los factores genéticos y sobre el papel de las linfocinas interleukina - 1 e interleukina - 2 por lo que se decidió explorar el papel de las hormonas sexuales sobre la respuesta inmunológica del humano, puesto que casi toda la - información se ha circunscrito al sistema murino y han sido muy pocos los estudios que se han llevado a cabo sobre los -- efectos directos de éstas in vitro o in vivo en el hombre. Las hormonas sexuales juegan un complejo papel homeostático - sobre la función del linfocito. El estudio de la inmunoendo-- crinología en el humano seguramente revelará funciones importantes y aportará información sobre la regulación del sistema inmunológico normal así como de la enfermedad autoinmune. El conocimiento del papel de los andrógenos como posibles inmunosupresores podrá conducir a nuevos y efectivos tipos de terapia para el tratamiento de estas enfermedades.

A. CARACTERISTICAS DEL SISTEMA DE ESTUDIO.

El sistema que se seleccionó para el estudio fue el de la estimulación por lectinas mitogénicas (82), ya que ha servido como modelo para la investigación del sistema inmunológico y también para monitorizar el efecto de drogas inmunosupresoras.

Una de las características principales de las lectinas es la capacidad de interactuar con los linfocitos y estimular los a la inducción de la transformación blástica. Los cambios morfológicos y bioquímicos que suceden en los linfocitos estimulados por lectinas in vitro semejan a muchas de las reacciones inmunes inducidas por antígenos in vivo. Las células blásticas son capaces de sintetizar inmunoglobulinas de manera similar a las células estimuladas por antígenos in vitro. Sin embargo, en tanto que un antígeno particular estimula solamente una proporción reducida de linfocitos (0.02% - 0.1%), las lectinas estimulan una proporción considerable (30% - 60%). Las lectinas pertenecen al grupo de activadores policlonales y exhiben una pronunciada especificidad con respecto al tipo de linfocito que activa. Se ha encontrado especificidad tanto de especie como de clase para las células T y para las B. Las lectinas pueden inclusive distinguir entre subpoblaciones de linfocitos de la misma clase u órgano. El mitógeno de pokeweed (PWM) o fitolaca americana (*Phytolacca americana* p.m. = 134,000) estimula preferentemente células B, de manera T-dependiente. La Fitohemaglutinina (PHA) (*Phaseolus vulgaris*, p.m. = 120,000) estimula solamente linfocitos T y la Concanava--

lina-A (Con-A) (*Canavalia ensiformis*, p.m. = 102,000) estimula células T. La PHA y la Con-A no son capaces de estimular a poblaciones puras de linfocitos B; sin embargo, éstos pueden responder a estas lectinas cuando se encuentran en mezcla con células T.

Uno de los principales efectos de la interacción de las células con las lectinas es el de disparar a células latentes hacia un estado de crecimiento y proliferación. Los cambios que ocurren tempranamente son a nivel de membrana e incluyen un aumento en la permeabilidad para varios metabolitos, glucosa, aminoácidos y iones como el Ca y K, y una aceleración en el recambio de fosfolípidos de membrana. Los eventos intracelulares iniciales son la acetilación de histonas, la fosforilación de proteínas nucleares y la modificación del metabolismo de carbohidratos y lípidos. Después de 10 a 20 horas, la síntesis de RNA y proteína se acelera y se observan cambios morfológicos. A las 48 horas la síntesis activa de DNA comienza y las células entran a mitosis. La estimulación mitogénica se ha determinado por ensayos morfológicos, autorradiográficos y ahora se hace mediante la cuantificación de la incorporación de precursores radioactivos como la timidina, la uridina y la leucina marcadas, al DNA, RNA y proteína. En la actualidad se dispone de la citofluorografía, el sistema más sensible para cuantificar números absolutos de células que responden.

En la estimulación por un antígeno policlonal o un mitógeno, para que se lleve a cabo la proliferación, se requiere de distintas interacciones entre las células y los distin-

tos tipos de células. Algunas de ellas son mediadas por el contacto directo entre células (contacto entre membranas, -- eventos de presentación de antígenos) o por factores solubles llamados linfocinas que funcionan como señales de amplifica-- ción.

Se sabe que se requiere de la producción y acción de - la monocina interleukina-1 (IL-1) de macrófagos como una se-- gunda señal regulatoria de las células T cooperadoras activa-- das, para que produzcan una variedad de linfocinas inmunopo-- tenciadoras, como la interleukina-2 (IL-2). Para la prolife-- ración de la célula T, se requieren dos subpoblaciones: la de células productoras de IL-2 y una subpoblación de células T - activadas respondedoras de IL-2 que simultáneamente adquieren la capacidad de reaccionar a la IL-2 como resultado de la ac-- tivación con el mitógeno o antígeno. Esta capacidad de respues-- ta es mediada por la adquisición de receptores de superficie - para IL-2. La señal de proliferación es mediada por IL-2 y -- promueve la expansión de cualquier clona de célula T activa-- da (Figura 2).

A la interleukina-2 se le ha adscrito un amplio espec-- tro de acciones biológicas. Así, induce la proliferación de ti mocitos y aumenta la proliferación y generación de células T - citotóxicas por células T estimuladas con aloantígenos y en el proceso induce la síntesis de interferón. Contribuye como se-- ñal secundaria en la activación de células T cooperadoras antí

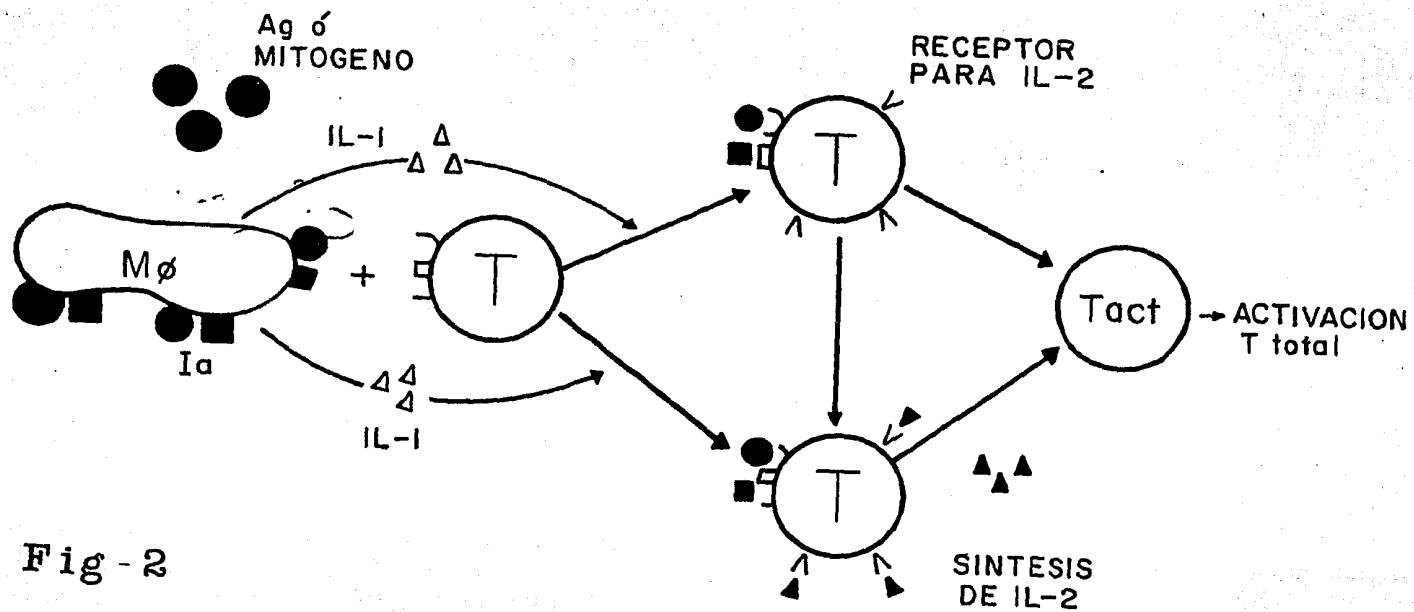


Fig - 2

geno-específicas y es capaz de tenerlas en cultivo durante - largo tiempo. Todas sus actividades son una manifestación se cundaria de un proceso común, que es la activación de linfocitos T.

Después de 72-96 horas de estimulación se detectan fun ciones diferenciadas de los linfocitos activados. Las diversas linfocinas activan diferentes células involucradas en una interacción en cascada cuyo resultado final es la generación de células T citotóxicas y la producción de inmunoglobulinas - por células B.

B. OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo fue el de investigar el -- papel que juegan los andrógenos testosterona y 5α -dihidrotes- tosterona sobre la respuesta inmune in vitro, de individuos -- jóvenes masculinos sanos, así como el de determinar sus efec- tos sobre ciertas funciones linfocitarias y establecer el ni- vel por medio del cual los ejercen analizando el mecanismo so- bre el sistema modelo anteriormente descrito de estimulación de la proliferación, en el que podrían manifestarse:

1) A nivel del proceso de activación de linfocitos, en cualquiera de sus etapas como por ejemplo, la síntesis de macromoléculas.

2) A nivel de la síntesis de mediadores inmunes, -- por un efecto sobre la producción de factores de crecimiento.

3) A nivel de las interacciones de las moléculas re

gulatorias sobre sus células blanco.

El primer nivel se analizó mediante el estudio de los efectos de los andrógenos sobre la proliferación en respuesta a los mitógenos de PWM, PHA y Con-A cuantificando la síntesis de macromoléculas por medio de la incorporación de timidina y uridina tritiadas al DNA y RNA. También se analizaron los efectos sobre las curvas dosis-respuesta a los mitógenos sobre la toma de timidina y los efectos sobre la cinética de proliferación. Se estudiaron las fases del ciclo celular que fueron susceptibles a los andrógenos mediante citofluorografía. El segundo nivel se estudió mediante la determinación del efecto de los andrógenos sobre la producción de interleukina-2 utilizando el microensayo de actividad de IL-2. Los experimentos de adición de IL-2 a cultivos tratados con hormona proporcionan información sobre los efectos de los andrógenos a este nivel.

MATERIAL Y METODOS

I. INDIVIDUOS.

Se estudiaron individuos masculinos jóvenes (edad: 16-33 años, $\bar{X} = 24$) que no estaban bajo tratamiento con medicamentos.

II. OBTENCION Y AISLAMIENTO DE CELULAS.

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica venosa recién extraída en jeringas heparinizadas (10 IU/ml). La sangre se diluyó en un volumen igual de solución amortiguadora de salina fosfatos a pH de 7.4 (PBS). La mezcla se vertió sobre un gradiente de ficoll-hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden/Winthrop de México) y las células se separaron por centrifugación durante 15 minutos a 2,400 rpm. Los eritrocitos y granulocitos quedaron en la parte inferior del gradiente y las células mononucleares (CMN) se recuperaron de la interfase. Estas se lavaron tres veces con PBS por centrifugación a 1,200 rpm. durante 15 minutos. Las CMN se contaron en un hemocitómetro Neubauer y se les determinó viabilidad con tinción de azul tripano (Sigma, St. Louis Mo.).

Las CMN fueron resuspendidas en Medio Mínimo Esencial de Eagle (Grand Island Biological Company, Grand Island, New York) suplementado con una concentración final de 1% de L-glutamina (Sigma Chemical Company, St. Louis Mo.) y 1% de penicilina

lina (100 U/ml) estreptomycin (100 mg/ml) (MEM) y 10% de suero fetal de ternera libre de gamaglobulinas (SFT) (Grand Island Biological Company, Grand Island, New York) inactivado a 56°C por 30 minutos. El ph se ajustó a 7.4 con bicarbonato de sodio .5M.

Las hormonas esteroides androgénicas testosterona y 5 α -dihidrotestosterona (Steraloids Pauling, New York), purificadas y recristalizadas, se disolvieron inicialmente en metanol (Baker Analyzed) a una concentración de 2 mg/ml y se prepararon diluciones seriadas en metanol. Se colocaron alícuotas con concentraciones de las hormonas de .001 μ g, .01 μ g, .1 μ g, 1 μ g, 10 μ g y 50 μ g en un volumen de 10 a 25 μ l, en tubos de vidrio, y se dejaron a temperatura ambiente por un mínimo de tres horas, para la evaporación del solvente.

III. MICROCULTIVO DE LINFOCITOS.

A) ESTIMULACION MITOGENICA. En condiciones de esterilidad, la suspensión celular se ajustó a 2×10^6 células/ml de medio de cultivo y se resuspendió con las respectivas concentraciones de hormona. Se colocó una cantidad 0.1 ml conteniendo 2×10^5 células en cada pozo de placas de microcultivo de fondo plano (Costar, Cambridge, Mass.). Se añadió una cantidad de 0.1 ml de mitógenos resuspendidos en medio de cultivo a la concentración óptima probada previamente. El mitógeno de pokeweed o Fitolaca Americana (Gibco) se añadió

a una dilución final de 1:40. La Fitohemaglutinina (Difco, -- Detroit, Mich.) se utilizó a una dilución final de 1:1000. De una solución fresca de Concanavalina-A de 500 µg/ml se añadieron 1.25 µg por pozo. Los cultivos control de cada mitógeno se prepararon bajo idénticas condiciones sin la adición de esteroide a la suspensión celular. Se destinaron pozos para evaluar la reactividad espontánea. Los cultivos basales se prepararon para cada concentración de hormona sin adición de mitógeno. Cada condición experimental se realizó por triplicado.

En los experimentos destinados a evaluar la curva dosis respuesta a mitógenos en presencia de 5α-dihidrotestosterona, los tres mitógenos se utilizaron en diferentes concentraciones. Se probaron las siguientes diluciones iniciales de Fitolaca Americana: 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:100, 1:200. De Fitohemaglutinina se utilizaron diluciones de 1:100, 1:200, 1:400, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000. De Concavalina-A se utilizaron las concentraciones de 50 µg, 25 µg, 12.5 µg, 5 µg, 2.5 µg, 1.25 µg, .75 µg, 375 µg.

La incubación se llevó a cabo a 37°C en una atmósfera humidificada al 100% con 5% de CO₂ y 95% de aire, durante 66 horas de cultivo. En los experimentos específicos de cinética de proliferación en respuesta a estimulación mitogénica, se seleccionaron los tiempos de incubación de 18, 42, 66, 90, -- 114 y 138 horas.

B) DETERMINACION DE LA INCORPORACION DE NUCLEOTIDOS - RADIOACTIVOS. Los efectos estimulatorios de los mitógenos se evaluaron mediante la adición de 0.5 μC de timidina ^3H de una actividad específica de 6.7 Ci/mmol. y de uridina ^3H de una actividad específica de 25 Ci/mmol (New England Nuclear, Boston, Mass.), a cada pozo, 18 horas antes de terminar el período de cultivo.

Los experimentos específicos en que se marcaron los cultivos con cantidades crecientes de timidina extracelular desde 7.43×10^{-8} hasta 7.43×10^{-3} M. A la timidina tritida se le añadieron cantidades crecientes de timidina fría (Sigma, St. Louis, Mo.) para obtener las concentraciones entre 7.43×10^{-6} y 7.43×10^{-3} M.

Las células se cosecharon en papel filtro de fibra de vidrio (M.A. Bioproducts) con un cosechador MASH II automático (Microbiological Associates). Los discos se dejaron secar a temperatura ambiente y se colocaron en 5 ml de mezcla de centelleo líquido. (PPO 19.6 g (New England Nuclear, Boston, Mass.) POPOP .45 g, 3 lt de tolueno (Baker Analyzed) y 500 ml de alcohol etílico (Baker Analyzed). Se colocaron los viales en el espectrofotómetro de centelleo líquido para radiación β y se contaron durante un minuto.

Las cpm promedio de los filtros triplicados se calcularon y los resultados se expresan en cpm o en porcentaje de inhibición de la incorporación, del nucleótido radioactivo, con --

respecto a los cultivos control, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{porcentaje de inhibición} = 1 - \frac{\text{cpm control}}{\text{cpm tratado con } 5 \alpha \text{DHT}} \times 100$$

IV. ANALISIS DEL CICLO CELULAR.

A) ESTIMULACION MITOGENICA. En condiciones de esterilidad, se cultivaron 1×10^6 CMN en presencia de 5α -DHT (0.001 $\mu\text{g/ml}$ hasta 50 $\mu\text{g/ml}$) en un ml de MEM suplementado con 10% SFT. Los cultivos basales se prepararon para cada concentración de esteroide sin la adición de mitógeno. Los cultivos control se prepararon sin la adición de hormona. El mitógeno de PWM se utilizó a una dilución final de 1:160. La PHA fue añadida a una dilución final de 1:500 y la Con-A a una concentración final de 1.25 $\mu\text{g/ml}$. Todas las concentraciones de mitógenos habían sido previamente determinadas como óptimas para la respuesta de linfocitos en cultivo en tubo. Las células se cosecharon y fijaron a las 72 horas de cultivo con 70% de etanol (Baker Analyzed) y se conservaron a 4°C por un mínimo de 18 horas.

B) DETERMINACION DEL CONTENIDO CELULAR DE DNA. Las células fijadas con 70% de etanol se centrifugaron, decantaron y resuspendieron en un ml. de 40% de etanol. Para teñir el DNA nuclear, las células se centrifugaron y resuspendieron en un ml. de bromuro de etidio (Calbiochem, La Jolla, Ca.), fluoro-

cromo que se intercala en el DNA de doble hélice emitiendo fluorescencia de una longitud de onda 600 nm, disuelto en una solución al 1% de citrato de sodio, a una concentración de 5 µg/ml como fue descrito por Lepecq & Paoletti (84). Se utilizaron controles, a lo largo del estudio, consistentes en células digeridas con ribonucleasa (Sigma) para asegurarse de la especificidad de la tinción (85).

El análisis del contenido de DNA de las células permite la determinación de la fase del ciclo celular en que se encuentran en el momento de fijarlas. La cantidad de DNA intracelular aumenta secuencialmente con la progresión del ciclo celular de fase G_0 G_1 de reposo a fase S y G_2 de premitosis.

Para el análisis del contenido de DNA se utilizó un citofluorógrafo FC-200 (Ortho, Diagnostic Instruments, Westwood, Ma.) conectado a un osciloscopio con analizador de canales múltiples (86). En este equipo la fluorescencia es generada por cada célula al pasar por un flujo laminar de agua a través de un prisma de cuarzo, donde incide un rayo laser de argón de 488 nm, con filtros apropiados interpuestos. Las señales son capturadas por un fotomultiplicador y proyectadas en un osciloscopio donde se miden dos parámetros (intensidad de fluorescencia verde y fluorescencia roja) que determinan la posición de un punto que representa a cada célula. El citograma muestra células agrupadas por características comunes. El uso de umbrales electrónicos permite la eliminación automática de células muertas o de detritus celular. Se puede obte-

ner un histograma de la distribución celular de los citogramas en el analizador de canales y éste puede ser fotografiado.

El instrumento fue calibrado con timocitos de ternera fijados (Ortho) para el laser de argon. Los coeficientes de variación con estos controles fueron menores de dos. Todos los estudios fueron realizados bajo las mismas condiciones de intensidad del laser, ganancia, presión en el sistema y flujo. Un número de 10,000 células fue analizado por triplicado para cada condición experimental.

V. PURIFICACION DE CELULAS T.

Las poblaciones de células T purificadas se aislaron de CMN mediante la formación de rosetas E con eritrocitos de carnero. Las células se resuspendieron a una concentración final de 4×10^6 en 2 ml de MEM suplementado con 20% de SFT. A la suspensión celular se le añadió un volumen de una suspensión de eritrocitos de carnero al 4% (previamente lavados) y 0.5 ml de SFT. Las células se centrifugaron de 10,000 rpm durante 10 minutos y las rosetas se incubaron durante 18 horas. Después de este período las rosetas se suspendieron suavemente en frío y se colocaron sobre un gradiente de ficoll-hypaque y se centrifugaron a 1,400 rpm durante 40 minutos a 4°C. Las células No-T se recuperaron de la interfase. Las rosetas T se separaron en el fondo del tubo y se lisaron con agua desionizada. Tanto las células No-T como las T se lavaron tres veces en medio de cultivo.

Las células T se ajustaron a 2×10^6 /ml en MEM con 10% de SFT. Los cultivos de células T tratadas con 5α -DHT y estimuladas con PHA y Con-A se realizaron de manera idéntica a la descrita en microcultivo de linfocitos.

VI. IDENTIFICACION DE CELULAS PRECURSORAS POSTIMICAS.

Se identificaron y cuantificaron las células precursoras postímicas mediante su capacidad de formar rosetas con eritrocitos autólogos. Se incubó una suspensión celular de CMN a 2×10^6 en 0.2 ml de MEM con 0.5 ml de suero autólogo diluído en medio de cultivo en relación 1:5 durante 30 minutos a 40°C .

Las CMN se pusieron en contacto con las seis concentraciones de 5α -DHT y la incubación se llevó a cabo en presencia de la hormona. El control consistió en CMN sin adición de la hormona. Cada condición se preparó por duplicado. Al término de este período se añadieron 16×10^6 eritrocitos autólogos contenidos en 0.8 ml de MEM y se centrifugó la mezcla a 1,000 rpm durante cinco minutos. La mezcla se dejó incubando durante 18 horas a 4°C . Las rosetas se resuspendieron suavemente en frío y se tiñeron con tinción supravital (Stesheimer-Malbin). Inmediatamente se contaron en el hemocitómetro 300 linfocitos. Se consideró roseta a aquella que contenía una célula con tres o más eritrocitos. Se determinó el porcentaje de células formadoras de rosetas autólogas.

VII. PRODUCCION DE INTERLEUKINA-2.

Para producir interleukina-2 (87) se estimularon linfocitos de sangre periférica ajustados a 1×10^6 /ml en MEM suplementado con 5% de SFT con Fitohemaglutinina a una dilución final de 1:1,000 durante 48 horas a 37°C. Los cultivos control se prepararon sin poner a las células en contacto con la hormona esteroide. Las células también se incubaron en presencia de 5 α -dihidrotestosterona a las seis concentraciones. Se destinaron tubos para cuantificar la producción basal de IL-2 consistentes en células en medio de cultivo, sin mitógeno. A las 48 horas los sobrenadantes de cultivos se colectaron por centrifugación a 2,000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se filtraron por un disco de 0.45 μ m (Millipore Corporation, Bedford, Ma.) y se almacenaron a - 20°C hasta que se les realizó el ensayo de actividad de IL-2.

Tres series de sobrenadantes producidos en presencia de todas las concentraciones de 5 α -dihidrotestosterona fueron absorbidos con carbón lavado y activado/dextrán T-70 (Sigma) durante 30 minutos a 4°C con la finalidad de remover el posible esteroide libre. El carbón fue extraído por centrifugación a 3,000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Se produjo IL-2 de referencia en las mismas condiciones descritas anteriormente. Se efectuó un tratamiento para remover la posible lectina remanente que consistió en la incubación de 5 ml de sobrenadante con 0.1 ml de botón de eritrocitos de borrero (previamente lavados) durante una hora a 37°C. La mezcla

se centrifugó a 2,000 rpm y se recuperó el sobrenadante. El mismo procedimiento se repitió dos veces.

Para comparar la IL-2 producida en el laboratorio, se utilizó IL-2 comercial libre de lectinas (Associated Biomedic System, Buffalo, New York).

VIII. MICROENSAYO DE ACTIVIDAD DE INTERLEUKINA-2.

La actividad de interleukina-2 contenida en los sobrenadantes producidos como se describió anteriormente, fue determinada en un microensayo basado en el mantenimiento de la proliferación de células dependientes de IL-2. Para este propósito, se activaron células indicadoras mononucleares humanas normales a 1×10^6 /ml, con PHA a una dilución final de 1:1,000, durante 48 horas. Las células fueron lavadas varias veces con PBS y se sostuvieron en cultivo por lo menos durante nueve días en MEM con 10% de suero fetal suplementado con IL-2 libre de lectinas. Cada 72 horas se realizó el cambio de medio y la incubación se llevó a cabo a 37°C en botellas.

Las células se utilizaron tres días después de la última adición de IL-2. Las células activadas se lavaron y fueron resuspendidas en medio de cultivo con 10% de SFT y se sembraron por triplicado, 10^4 células en 100 μl en cada pozo de placas de microcultivo. Se añadieron los sobrenadantes que contenían IL-2, tanto los controles como los producidos con 5 α -dihidrotestosterona y los basales de cada concentración de hormo

na, a tres diluciones finales (1:2, 1:4, 1:8). Se incluyeron controles de IL-2 comercial libre de lectinas y de IL-2 de referencia. Cada condición experimental fue preparada por triplicado. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Después de este período de cultivo se les dio un pulso de 0.5 µCi de metil-³H timidina con una actividad específica de 6.7 Ci/mmol durante 12 horas adicionales de cultivo. Los cultivos se cosecharon y se determinó la incorporación de timidina tritiada. La proliferación de las células activadas inducida por la exposición a los sobrenadantes fue expresada como la media de las cpm de cultivos triplicados y como unidades de actividad.

IX. ADICION DE INTERLEUKINA-2 A CULTIVOS TRATADOS CON 5α-DHT NO ESTIMULADOS Y ESTIMULADOS CON PHA Y CON-A.

Se cultivaron linfocitos de sangre periférica en presencia de todas las concentraciones de 5 α-dihidrotestosterona en placas de microcultivo, tal y como se describió anteriormente. Los mitógenos se añadieron en 20 µl a concentraciones iniciales de 1/100 de PHA y de 1/4 de una solución de Con-A de 500 µg/ml. Tanto a los cultivos basales como a los estimulados con PHA y Con-A se les añadió IL-2 de referencia o comercial a tres diluciones finales de 1:2, 1:4, 1:8 desde el inicio del cultivo. La proliferación celular se determinó por incorporación de timidina tritiada al DNA a las 66 horas de cultivo. El pulso y la cosecha se llevaron a cabo de manera igual a la descrita.

X. ESTADISTICA.

Los resultados se analizaron mediante el análisis de regresión lineal.

RESULTADOS

I. EFFECTO DE LA TESTOSTERONA Y 5 α -DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS NO ESTIMULADOS Y ESTIMULADOS CON PWM, PHA Y CON-A.

En experimentos iniciales se caracterizó una curva de dosis-respuesta para testosterona y 5 α -dihidrotestosterona con niveles fisiológicos y farmacológicos de las hormonas, en concentraciones que fueron desde 0.001 $\mu\text{g/ml}$ hasta 50 $\mu\text{g/ml}$ y se cuantificó la respuesta a los mitógenos de Fitolaca Americana, Fitohemaglutinina y Concanavalina-A en células mononucleares de sangre periférica de sujetos jóvenes sanos, expuestas a la hormona esteroide desde el inicio del cultivo in vitro. Se calculó la \bar{X} de la incorporación de timidina tritiada a las 66 horas de cultivo para los seis niveles de concentración de hormona.

La Tabla 3 muestra los resultados de linfocitos cultivados en presencia de 5 α -DHT, no estimulados y de los estimulados con el mitógeno de Fitolaca Americana. Los cultivos no estimulados, basales, no presentaron incremento importante-

en la incorporación del precursor radioactivo (n=11). Sin embargo, estos linfocitos no estimulados y tratados con la hormona, sí fueron sensibles a la exposición de la 5α -DHT, indicando que la hormona per se tiene un efecto inhibitorio sobre la incorporación basal de timidina ^3H . En el caso de los cultivos control estimulados con el mitógeno de *Fitolaca Americana*, la media de incorporación de timidina tritiada (n=9) se elevó más de siete veces indicando una incrementada proliferación consecuente a la activación inducida por el mitógeno. En el caso de los mitógenos de Fitohemaglutinina (n=12) y Concanavalina A (n=12) (Tabla 4), el incremento en la incorporación fue de 13 y 11 veces respectivamente.

La presencia de 5α -dihidrotestosterona en los cultivos estimulados provocó una disminución gradual en la media de incorporación de timidina tritiada que fue progresivamente mayor a medida que aumentó la concentración de hormona y alcanzó un efecto máximo inhibitorio a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Se observó una variación considerable en el grado de inhibición de individuo a individuo. También existen diferencias en el grado de inhibición para los tres mitógenos. La 5α -dihidrotestosterona causó una inhibición dosis-dependiente de la proliferación inducida por los mitógenos de PWM, PHA y Con-A. Los coeficientes calculados del análisis de regresión lineal fueron: r de cultivos no estimulados = - 0.6944; r de PWM = - 0.8286; r de PHA = - 0.8901; r de Con-A = - 0.8771.

Es importante notar que las células en presencia de la concentración de 5 α -DHT de 0.1 $\mu\text{g/ml}$, al ser estimuladas con los tres mitógenos presentaron consistentemente una inhibición ligeramente menor de incorporación de timidina tritiada que la de la concentración inmediatamente anterior en la curva dosis-respuesta.

El efecto de la testosterona probado con todas las concentraciones, sobre la proliferación inducida por mitógeno fue el de una inhibición dosis-dependiente similar a la obtenida con 5 α -dihidrotestosterona y el mismo fenómeno a la concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$. (Datos no mostrados). Los coeficientes del análisis de regresión lineal fueron: r de cultivos no estimulados = - 0.8302 de PWM = - 0.9722; r de PHA = - 0.9589; r de Con-A = - 0.8523.

También fue evaluada la incorporación de uridina tritiada al RNA (n=3) en linfocitos no estimulados y estimulados con los mitógenos de PWM, PHA y Con-A en presencia de 5 α -DHT y los resultados fueron similares a los observados sobre la incorporación de timidina ^3H , ya que se encontró también una inhibición dosis-dependiente de 5 α -DHT de la incorporación de uridina ^3H y menor inhibición que la de concentraciones anteriores con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de 5 α -DHT. Los resultados obtenidos con las concentraciones de 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$ de 5 α -DHT se muestran en la Tabla 5.

La inhibición dosis-dependiente-mediada por los andrógenos testosterona y 5 α -dihidrotestosterona, de la prolifera-

TABLA 3

EFFECTO DE LA 5 α -DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS
NO ESTIMULADOS Y ESTIMULADOS CON FITOLACA AMERICANA

5 α -DHT (μ g/ML)	<u>NO ESTIMULADOS</u>		<u>FITOLACA AMERICANA</u>	
	<u>INCORPORACION 3H-T</u>	<u>% INHIBICION</u>	<u>INCORPORACION 3H-T</u>	<u>% INHIBICION</u>
CONTROL	3,250 \pm 1,287	0	22,962 \pm 5,897	0
0.001	2,826 \pm 1,239	13.1	22,014 \pm 5,846	4.13
0.01	1,944 \pm 952	40.2	18,572 \pm 5,063	19.2
0.1	1,707 \pm 834	47.5	18,640 \pm 4,657	18.8
1.0	1,660 \pm 1,086	49.0	17,401 \pm 4,930	24.2
10.0	1,601 \pm 1,189	50.7	14,358 \pm 3,660	37.4
50.0	757 \pm 481	76.7	10,593 \pm 2,329	53.8

TABLA 4

EFFECTO DE LA 5 α -DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS ESTIMULADOS CON FITOHEMAGLUTININA Y CONCANAVALINA-A

CONCENTRACION DE 5 α -DHT (μ g/ML)	CULTIVOS ESTIMULADOS			
	FITOHEMAGLUTININA		CONCANAVALINA-A	
	INCORPORACION 3 H-T	% INHIBICION	INCORPORACION 3 H-T	% INHIBICION
CONTROL	43,900 \pm 7,053	0	37,684 \pm 7,225	0
0.001	42,522 \pm 7,001	3.14	37,392 \pm 7,469	0.7
0.01	38,280 \pm 6,550	12.81	33,093 \pm 6,989	12.9
0.1	40,840 \pm 6,394	7.0	35,455 \pm 7,604	6.0
1.0	37,241 \pm 6,057	15.7	28,651 \pm 5,771	24.0
10.0	33,046 \pm 5,699	24.7	23,539 \pm 4,367	38.0
50.0	25,973 \pm 4,707	40.8	15,302 \pm 3,387	59.4

TABLA 5

EFFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA INCORPORACION DE URIDINA 3H DE
LINFOCITOS. NO ESTIMULADOS Y ESTIMULADOS CON PWM, PHA CON-A

CONCENTRACION DE 5 α DHT (μ g/ML)	CULTIVOS							
	NO ESTIMULADOS		PWM		PHA		CON-A	
	INC 3H-U	%INH	INC 3H-U	% INH	INC 3H-U	%INH	INC 3H-U	% INH
CONTROL	4,906	0	34,880	0	111,898		95,095	0
0.1	3,355	31.6	30,201	13.4	106,131	5.1	90,746	4.5
10.0	2,753	43.8	25,900	25.7	90,116	19.4	52,306	44.9
50.0	933	80.9	4,257	87.7	75,079	32.9	46,912	51.0

TABLA 3 EFECTO DE LA 5 α -DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS NO ESTIMULADOS Y ESTIMULADOS CON PWM.

Los valores representan la media \pm el error standard de las cpm de incorporación de timidina tritiada, a las 66 horas de cultivo de n=11 experimentos de cultivos no estimulados y n= 9 de cultivos estimulados con PWM. El porcentaje de inhibición se calculó con respecto al control. Coeficientes de regresión lineal: r de no estimulados = - 0.6944; r de estimulados con PWM = - 0.8286.

TABLA 4 EFECTO DE LA 5 α -DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS ESTIMULADOS CON PHA Y CON-A.

Los valores representan la media \pm el error standard de las cpm de incorporación de timidina tritiada a las 66 horas de cultivo de n=12 experimentos de PHA y de n=12 de Con-A. El porcentaje de inhibición se calculó con respecto al control. Coeficientes de regresión lineal: r de PHA = -0.8901; r de Con-A = - 0.8771.

TABLA 5 EFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA INCORPORACION DE URIDINA ^3H DE LINFOCITOS NO ESTIMULADOS Y ESTIMULADOS CON PWM, PHA Y CON-A.

Los valores son los cpm de incorporación de timidina tritiada de un experimento representativo de tres con resultados iguales. El porcentaje de inhibición se calculó con respecto al control. Coeficientes de regresión lineal: r de no estimulados = -0.8959; r de PWM = - 0.9895; r de PHA = - 0.9216; r de Con-A = 0.7826.

ción inducida por los mitógenos de PWM, PHA y Con-A a las 66 - horas de cultivo, cuantificada por incorporación de timidina y uridina tritiadas al DNA y RNA podría deberse a las siguientes causas:

- 1) Citotoxicidad resultante en muerte celular.
- 2) Interferencia de la hormona con los mitógenos.
- 3) Reducción en la disponibilidad de la timidina ³H hacia el interior de la célula como consecuencia de un bloqueo en la toma de timidina.
- 4) Alteración, retardo o desfasamiento en la cinética de proliferación normal.
- 5) Una fracción reducida de la población celular que procede a través del ciclo celular.

La posibilidad de que el efecto de la 5 α -dihidrotestosterona se debiera a daño o muerte celular, más que a una inhibición de la transformación blástica inducida por mitógeno se descartó por la observación de viabilidad celular mediante la técnica de exclusión de azul tripano. La viabilidad medida y la recuperación celular de los cultivos después de 66 horas de cultivo de estimulación mitógenica no se vió afectada por la exposición a la hormona, (Datos no mostrados) lo que indica -- que la inhibición de la proliferación mediada por andrógenos - no es debida a citotoxicidad resultante en muerte celular.

II. EFFECTO DE LA 5 α -DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LA CURVA DOSIS RESPUESTA A FITOLACA AMERICANA, FITOHEMAGLUTININA Y CONCA-NAVALINA A.

Ciertas condiciones experimentales podrían explicar la variación individual en el grado de inhibición de la transformación blástica, causado por la hormona. La concentración de mitógeno podría ser importante, y la posible interferencia de la hormona con los mitógenos sobre la membrana del linfocito. Además la 5 α -dihidrotestosterona podría causar un desfase--- miento de las curvas dosis-respuesta individuales a mitógenos y una alteración de la concentración óptima, para obtener la máxima respuesta proliferativa.

Con el objetivo de aclarar todo lo anterior, se estimularon linfocitos con concentraciones variables de los mitógenos. Para ésto se utilizaron la Fitolaca Americana en diluciones que fueron desde 1:10 final hasta 1:400; la Fitohe--- glutinina desde una dilución 1:100 hasta una 1:8000 final y la Concanavalina A desde 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hasta 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se deter--- minó la incorporación de timidina tritiada tanto en cultivos control como en presencia de 5 α -dihidrotestosterona a las do--- sis de .1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a las 66 horas de culti--- vo en nueve individuos.

Como se muestra en la Figura 3 la menor estimulación--- ocurrió tanto en las dosis muy concentradas como en las máxi---

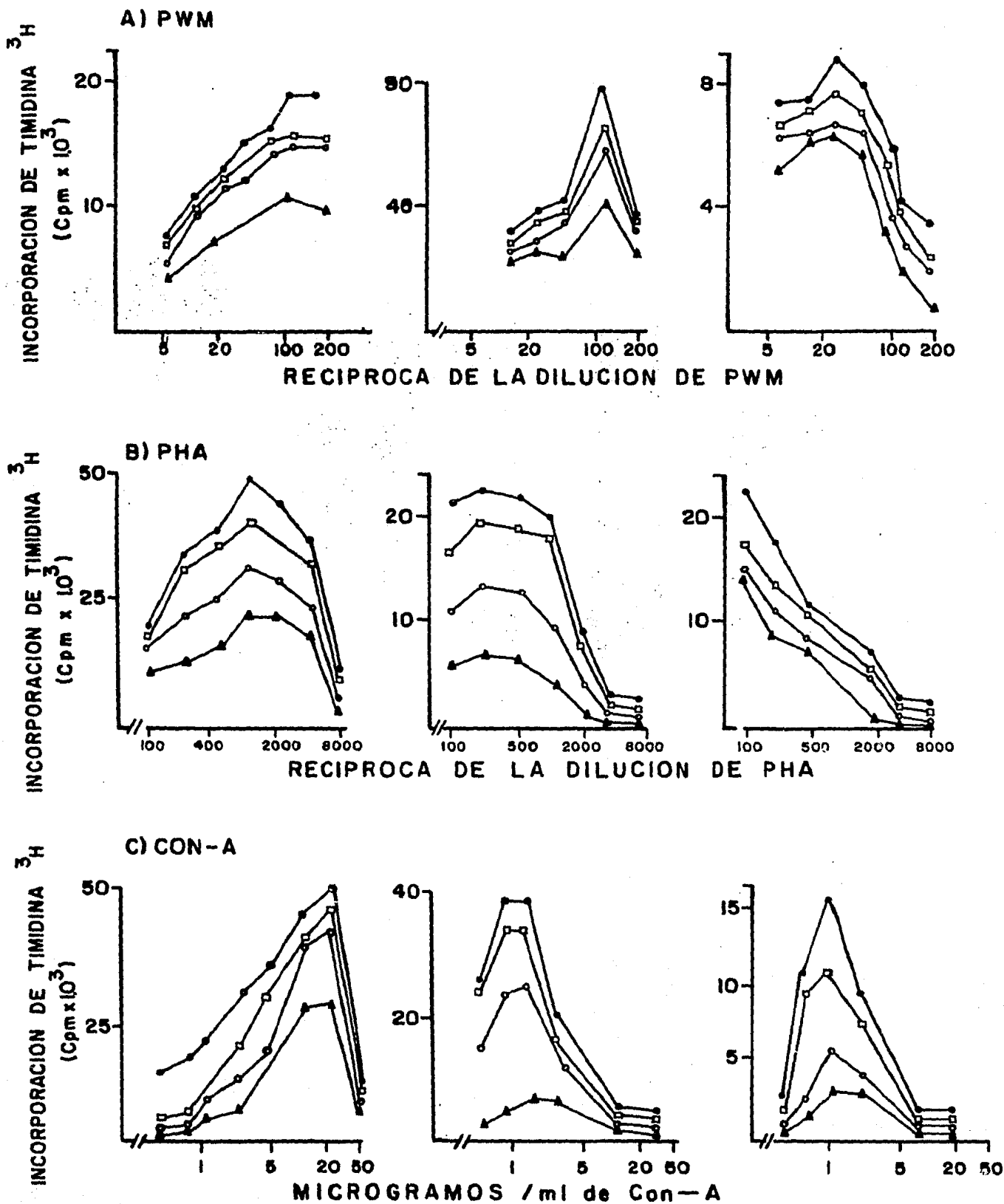
mas diluciones de cada uno de los tres mitógenos. Como era de esperarse hubo diferencias de individuo a individuo tanto en la concentración óptima como en la magnitud de la respuesta y en las curvas dosis-respuesta a los tres mitógenos. La presencia de 5α -DHT a concentraciones de .1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ resultó en una inhibición dosis-dependiente de 5α -DHT de la proliferación con respecto al control, en todos y cada uno de los puntos fijos de concentración de mitógeno. Se observaron también para una misma dosis de 5α -DHT pequeñas diferencias en la magnitud de la inhibición a las diferentes diluciones de mitógeno en un mismo individuo. Sin embargo, es importante el hecho de que no hubo desfaseamiento ni modificación alguna en cada curva dosis-respuesta individual ni en la dilución óptima causada por la presencia de .1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de 5α -DHT y que el fenómeno de inhibición dependiente de la hormona persiste a lo largo de toda la curva de concentración de PWM, PHA y Con-A, lo que descarta que éste se debiera a la interferencia de la hormona con el mitógeno.

FIGURA 3. CURVA DOSIS-RESPUESTA A MITOGENOS EN PRESENCIA DE 5α -DHT.

Los valores representan las cpm de incorporación de $^3\text{H-T}$ a las 66 horas de cultivo de tres experimentos individuales para cada uno de los mitógenos en presencia de 5α -DHT. (●) Control; (◻) 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; (◐) 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (▲).

Fig-3

EFFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LAS CURVAS DOSIS- RESPUESTA A MITOGENOS



III. EFFECTO DE LA 5 α -DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LA TOMA DE TIMIDINA.

También se consideró la posibilidad de que la reducción en la incorporación de timidina tritiada observada, inducida por 5 α -DHT pudiera deberse a un bloqueo en la toma de timidina extracelular hacia la poza de precursores de DNA y que el efecto fuera secundario a un descenso en la cantidad de precursor radioactivo que estuviera entrando a las células.

En un intento por observar si el efecto inhibitorio podría ser sobrepuesto, se incubaron linfocitos no estimulados y estimulados con PWM, PHA y CON-A en presencia de 5 α -dihidrotestosterona a concentraciones de 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$ y se marcaron a las 66 horas de cultivo con cantidades crecientes de timidina tritiada desde 7.43×10^{-8} M hasta 7.43×10^{-3} para observar si a concentraciones crecientes el efecto podría ser revertido.

Como lo muestra la Figura 4 a medida que la concentración de timidina extracelular fue incrementada la cantidad incorporada al DNA por los cultivos control fue mayor. Las células tratadas con la hormona incrementaron también su incorporación pero mantuvieron la misma reducción de la incorporación dosis-dependiente de 5 α -DHT con respecto a los valores control en el caso de los tres mitógenos y en cada una de las concentraciones de timidina utilizadas.

Por los resultados anteriores se concluye que el efec-

to inhibitorio inducido por 5α -DHT no puede ser sobrepuesto por concentraciones crecientes de timidina, que no es ejercido a nivel de la toma de timidina hacia el interior de la célula y que debe representar un efecto separado sobre los sistemas de síntesis de DNA.

IV. EFECTO DE LA 5α -DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LA CINÉTICA DE PROLIFERACION DE LINFOCITOS ESTIMULADOS CON PWM, PHA Y CON-A.

Con el objetivo de determinar si la inhibición dosis-dependiente de 5α -DHT de la transformación blástica observada a las 66 horas de cultivo, se debía a una anticipación a un retardo o a un desfase en la cinética de proliferación normal, causado por la hormona, se llevaron a cabo estudios del patrón cinético de incorporación de timidina ^3H en linfocitos estimulados con los mitógenos de PWM, PHA y Con-A cada 24 horas a lo largo de un período de seis días de cultivo en presencia de 5α -DHT (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), desde el inicio del cultivo.

Como se observa en la Figura 5 las cinéticas se pueden dividir arbitrariamente en cuatro fases:

1) Una fase lag sin cambio significativo en la incorporación de timidina.

2) Una fase de rápido ascenso en la toma de timidina.

3) Una fase de incremento log-linear.

4) Una fase de declinación no linear.

La proliferación inducida por el mitógeno de *Fitolaca Americana* tuvo el pico de máxima respuesta a las 90 horas de cultivo tanto en los cultivos control como los tratados con hormona. La adición de 5α -DHT a las concentraciones de 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$ afectó la magnitud de la respuesta proliferativa causando un decremento de un 3%, 20% y 41% respectivamente, el día de máxima respuesta. Sin embargo, las curvas de los cultivos tratados con hormona presentaron el mismo comportamiento, paralelo al de la curva control. (Figura 5-A).

La proliferación inducida por Fitoheماغlutinina fue de mayor magnitud que la inducida por PWM (Figura 5-B). A las 66 horas el control tuvo el pico de máxima respuesta. La proliferación de las células cultivadas en presencia de 5α -DHT (0.1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$ no resultó en un desfase en el curso de su cinética, ni en el día de máxima estimulación; pero sí se vió reducida en un 3%, 20% y 36% respectivamente en relación al control del tercer día y mostró inhibición durante todos los días de cultivo.

La estimulación inducida por Concanavalina-A (Figura 5-C) en presencia de 5α -DHT resultó en una inhibición dosis-dependiente de la incorporación de timidina tritiada, en todos los días de cultivo, que fue de un 10%, 54% y 67% con respecto al control, para las dosis de 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ y

50 $\mu\text{g/ml}$ de $5\alpha\text{-DHT}$, a las 90 horas de cultivo, día del pico de respuesta óptima. No se encontró alteración de la cinética de proliferación de las células tratadas, comparada con la de controles normales.

Los experimentos realizados ($n=3$) con las mismas concentraciones de testosterona durante tres días en cultivos estimulados con PWM, PHA y Con-A dieron resultados similares sin presentar un retardo o desfase en la cinética de proliferación. (Datos no mostrados).

En otros experimentos se estudió el efecto de la $5\alpha\text{-DHT}$ sobre el patrón cinético de incorporación de uridina tritiada a linfocitos estimulados con los tres mitógenos, cada 24 horas, a lo largo de un período de cuatro días de cultivo, en presencia de .1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$ de $5\alpha\text{-DHT}$. (Datos no mostrados). En los cultivos control se observó una incorporación de uridina ^3H de mayor magnitud que la incorporación de timidina ^3H . Los picos de máxima incorporación se obtuvieron a las 66 horas. Los cultivos en presencia de $5\alpha\text{-DHT}$ presentaron inhibición dosis-dependiente de $5\alpha\text{-DHT}$ de la incorporación de uridina ^3H durante todos los días de cultivo, sin ninguna alteración en la cinética de proliferación comparada con lo obtenido en sus respectivos cultivos control.

Los datos anteriores indican que la reducción en la incorporación de nucleótidos marcados más que ser resultante bloqueo de una alteración o desfase en la cinética de proliferación normal, posiblemente representa una supresión real de la síntesis de RNA y de DNA.

EFFECTO DE LA 5- α DHT SOBRE LA TOMA DE TIMIDINA

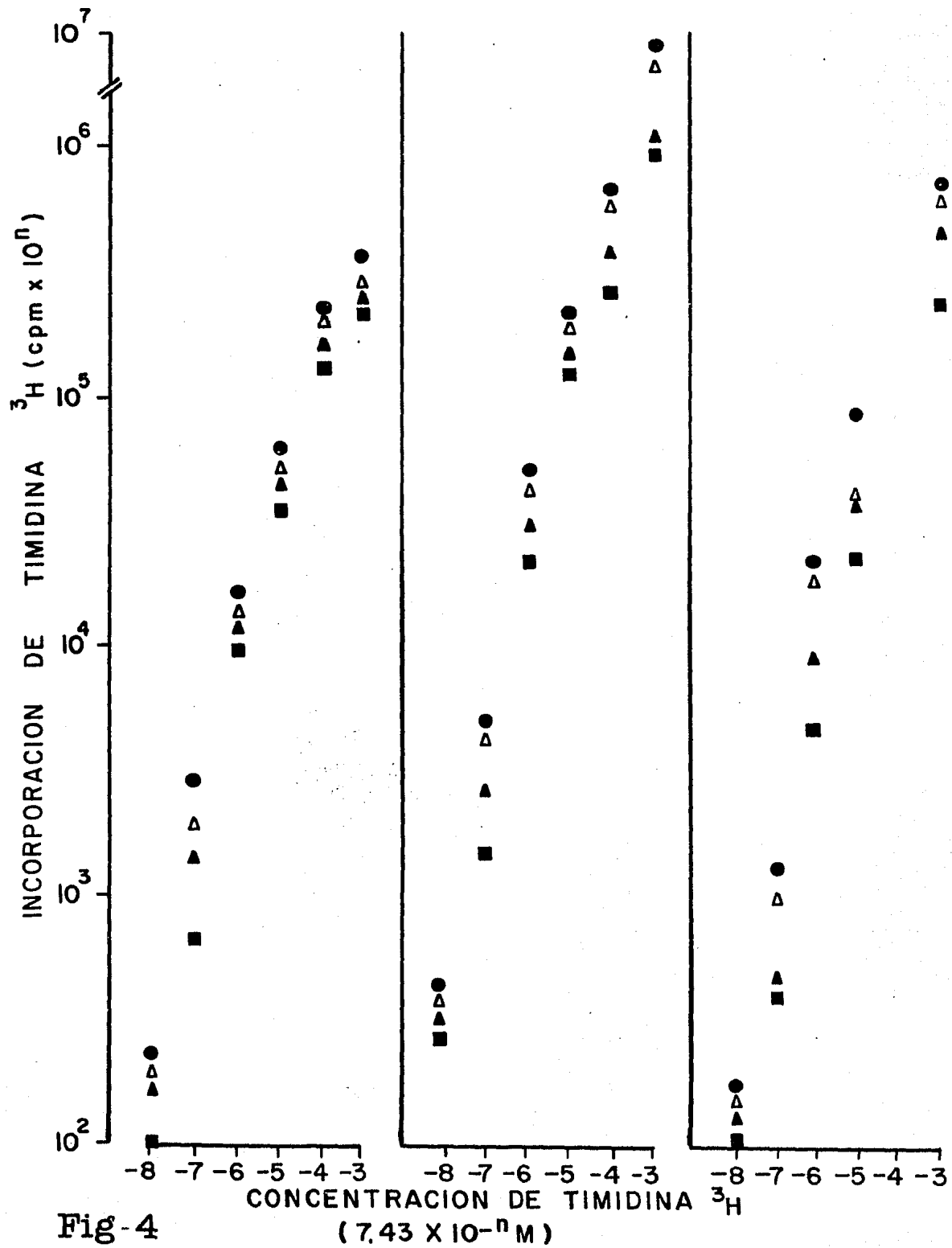


Fig-4

Fig-5

EFFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION DE LINFOCITOS ESTIMULADOS

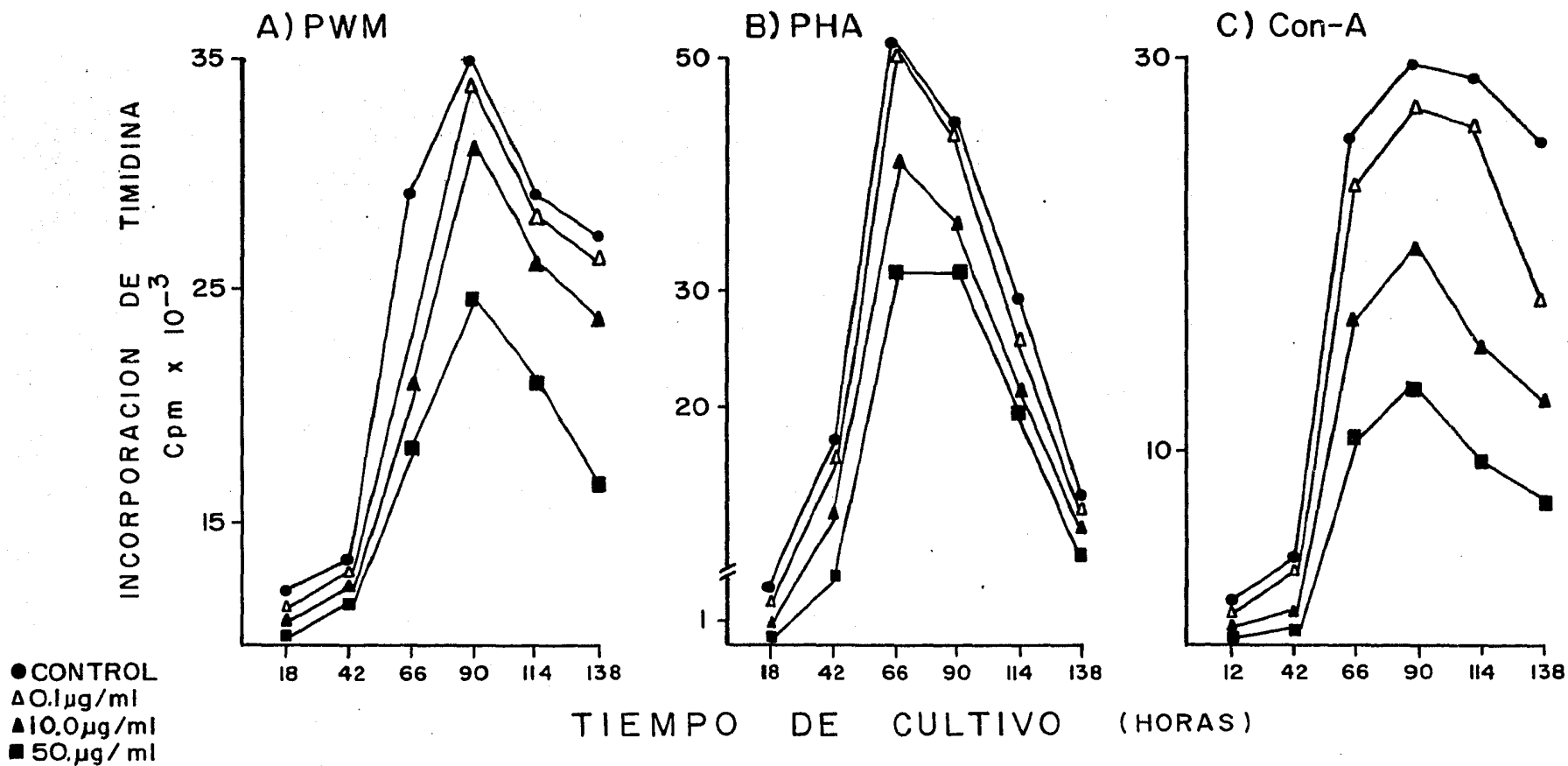


FIGURA 4. EFEECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA TOMA DE TIMIDINA.

Los valores representan la media de las cpm de incorporación de timidina ^3H a las 66 horas de cultivo de un experimento representativo de tres iguales de células estimuladas con A) PWM, B) PHA y C) Con-A en presencia de 5 α -DHT: (●) Control; (Δ) 0.1 $\mu\text{g/ml}$; (\blacktriangle) 10.0 $\mu\text{g/ml}$; (\blacksquare) 50 $\mu\text{g/ml}$. Las cpm representan la radioactividad específica calculada.

FIGURA 5. EFEECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA CINÉTICA DE PROLIFERACION DE LINFOCITOS ESTIMULADOS.

Análisis cinético de la respuesta proliferativa a mitógenos durante seis días de cultivo: A) PWM, B) PHA, C) Con-A. Los valores son la media de las cpm de incorporación de timidina ^3H de seis experimentos para cada mitógeno conducidos en presencia de 5 α -DHT: (●) Control; (Δ) 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de 5 α -DHT; (\blacktriangle) 10.0 $\mu\text{g/ml}$ de 5 α -DHT; (\blacksquare) 50.0 $\mu\text{g/ml}$ de 5 α -DHT. Se omitió la delineación del error standard que nunca fue mayor del 15% en cualquier punto y a cualquier concentración de hormona.

V. EFFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE EL CICLO CELULAR DE LINFOCITOS - NO ESTIMULADOS Y ESTIMULADOS CON PWM, PHA y CON-A.

En vista de que la correlación entre la incorporación de nucleótidos tritiados y la síntesis de RNA y DNA es extremadamente compleja, puesto que involucra posibles diferencias en la degradación del precursor marcado, en el transporte del nucleósido al interior de la célula y en los niveles de las pozas endógenas de timidina y uridina; un ensayo más completo sobre el número de células que responden a los mitógenos entrando al ciclo celular, es la enumeración de blastos y de células en fase de Síntesis.

La inhibición en la incorporación de timidina tritiada causada por la hormona podría deberse a que solamente una fracción reducida de la población celular procedió hacia el ciclo celular. Para estudiar esta posibilidad se cultivaron células nonucleares completas en presencia de 5 α -DHT y se estimularon con PWM, PHA y Con-A, durante 72 horas, y se analizó su contenido de DNA para determinar la fase del ciclo celular en la que se encontraban.

Las células recién extraídas de individuos sanos presentaron un contenido de DNA que corresponde a las fases G_0G_1 del ciclo celular. Cuando los linfocitos fueron estimulados con los mitógenos, éstos abandonaron el estado G_0 . Este cambio se acompañó de un incremento en fluorescencia celular con valores mayores de 600 nm y también de un incremento en la --

proporción de células que atravesaron la fase G_0G_1 y entraron a las fases de S y G_2 del ciclo celular. (Datos no mostrados). La Figura 6 muestra un ejemplo representativo de lo que ocurrió con los tres mitógenos, cuando los cultivos se condujeron en presencia de 5 α -DHT. A las concentraciones menores, de 0.001 μ g/ml, 0.01 μ g/ml y .1 μ g/ml, los histogramas de distribución celular mostraron todavía una cantidad incrementada de valores mayores de 600nm indicando que una proporción elevada de células progresaron a través de las fases de S y G_2 del ciclo celular, mientras que a concentraciones mayores de 5 α -DHT, de 1.0 μ g/ml, 10 μ g/ml y 50 μ g/ml, los histogramas mostraron un pico definido de células con valores menores de 600nm, indicando que una proporción mayor de células permanecían aún en las fases G_0G_1 del ciclo celular.

Las Tablas 6 y 7 muestran los porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular tanto de los controles como de los cultivos conducidos en presencia de 5 α -DHT, no estimulados, así como también de los estimulados. Las células no estimuladas control mostraron a las 72 horas de cultivo un leve incremento en el porcentaje de ellas en fase S, que se puede atribuir a una activación espontánea de algunos linfocitos, que frecuentemente ocurre después de tres días de cultivo in vitro. Los cultivos estimulados con mitógenos mostraron un mayor incremento de las células en fase de Síntesis. La presencia de la 5 α -DHT sobre la proliferación basal, y más aún sobre la estimulada por PWM, PHA y Con-A re-

sultó en un descenso significativo del porcentaje de células en las regiones de fase S y G_2^+M a expensas de un incremento de las células en fase G_0G_1 . La inhibición del porcentaje de células en fase S y G_2^+M fue dosis-dependiente de 5α -DHT (r de cultivos no estimulados = - 0.8119; r de PWM = - 0.8167; r de PHA = - 0.7420; r de Con-A = - 0.6904). En términos cinéticos estos resultados indican que la 5α -DHT produce un bloqueo en la progresión del ciclo celular, causando un arresto de las células en la frontera G_1/S .

La Figura 7 muestra el comportamiento cinético de los cultivos estimulados con PHA y Con-A durante seis días de cultivo. Las curvas muestran que el porcentaje de células en fase de Síntesis aumenta con el tiempo de incubación alcanzando su pico de máxima respuesta proliferativa a las 120 y 72 horas - respectivamente. Las células en fase S aumentan a expensas de las células en fase G_0G_1 (no mostradas) ya que éstas disminuyen con el tiempo de cultivo. El tratamiento con 5α -DHT disminuyó en porcentaje de células en fase S de manera dosis-dependiente sin mostrar ningún desfase en la cinética de proliferación con respecto a los controles, ni tampoco una recuperación del bloqueo inducido por la hormona, en los últimos días de cultivo.

Fig-6

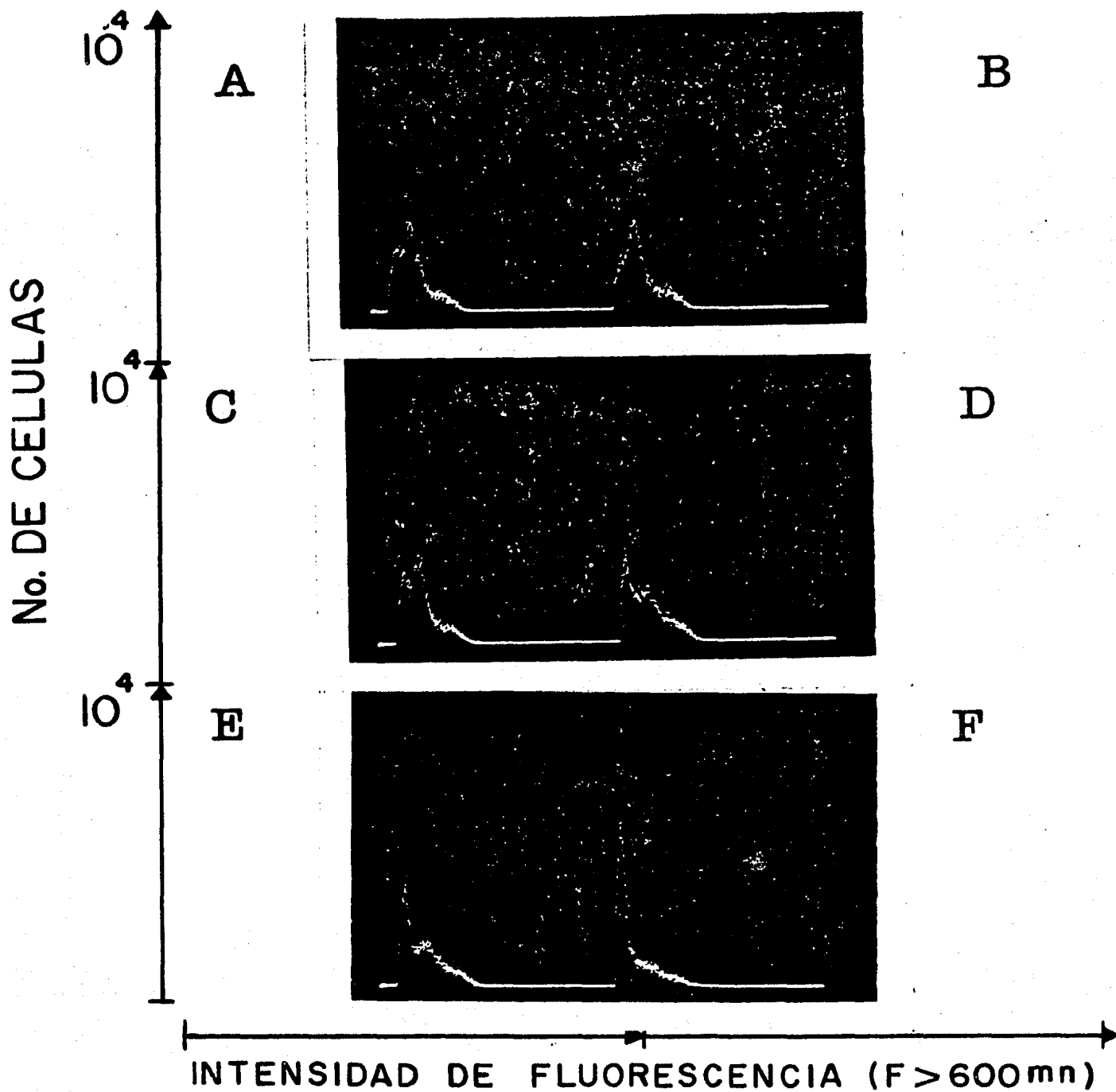


TABLA 6

EFFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LOS PORCENTAJES DE LINFOCITOS NO ESTIMULADOS Y ESTIMULADOS EN FASES DE REPOSO (G₀+G₁) O FASES ACTIVAS (S Y G₂ + M) DEL CICLO CELULAR

CONCENTRACION 5- α DHT (μ g/ML)	NO ESTIMULADAS			ESTIMULADOS CON PWM		
	FASE DEL CICLO CELULAR			FASE DEL CICLO CELULAR		
	G ₀ +G ₁	S	G ₂ + M	G ₀ +G ₁	S	G ₂ + M
CONTROL	86.2 \pm 3.2	12.0 \pm 2.7	1.8 \pm 0.6	75.9 \pm 1.7	22.3 \pm 1.7	3.4 \pm 0.4
0.001	85.4 \pm 3.2	12.8 \pm 2.5	2.1 \pm 0.8	79.5 \pm 2.4	18.4 \pm 2.7	3.0 \pm 0.5
0.01	84.9 \pm 2.5	13.9 \pm 2.1	3.0 \pm 1.3	80.7 \pm 2.0	16.9 \pm 2.0	3.4 \pm 0.3
0.1	87.0 \pm 1.9	11.8 \pm 1.7	1.5 \pm 0.3	80.9 \pm 2.5	16.7 \pm 2.6	3.3 \pm 0.3
1.0	85.7 \pm 1.7	12.9 \pm 1.6	1.7 \pm 0.3	82.7 \pm 2.9	15.0 \pm 2.8	2.9 \pm 0.5
10.0	88.4 \pm 2.7	10.5 \pm 2.6	1.3 \pm 0.2	84.1 \pm 2.3	13.8 \pm 2.2	2.8 \pm 0.4
50.0	89.6 \pm 2.2	9.5 \pm 2.2	1.1 \pm 0.2	88.3 \pm 2.0	10.0 \pm 1.6	2.0 \pm 0.4

TABLA 7

EFFECTO DE LA 5 α DHT SOBRE LOS PORCENTAJES DE LINFOCITOS ESTIMULADOS CON PHA Y CON-A
EN FASES DE REPOSO (G₀+G₁) O FASES ACTIVAS (S Y G₂ M) DEL CICLO CELULAR

<u>5α-DHT</u> <u>CONCENTRACION</u> <u>(μg/ML)</u>	<u>FITHEMAGLUTININA</u>			<u>CONCAVALINA-A</u>		
	<u>FASE DEL CICLO CELULAR</u>			<u>FASE DEL CICLO CELULAR</u>		
	<u>G₀+G₁</u>	<u>S</u>	<u>G₂+M</u>	<u>G₀+G₁</u>	<u>S</u>	<u>G₂+M</u>
CONTROL	54.1 \pm 4.1	36.5 \pm 3.9	8.7 \pm 0.8	62.8 \pm 4.3	34.4 \pm 4.0	4.1 \pm 0.8
0.001	56.2 \pm 3.2	35.1 \pm 3.3	7.7 \pm 1.3	68.0 \pm 4.1	30.2 \pm 4.5	3.5 \pm 0.7
0.01	58.6 \pm 3.4	32.3 \pm 3.4	7.6 \pm 1.2	70.2 \pm 5.2	27.7 \pm 5.1	2.9 \pm 0.6
0.1	62.0 \pm 3.4	30.5 \pm 3.2	7.3 \pm 1.0	66.8 \pm 4.3	26.9 \pm 3.4	4.1 \pm 0.8
1.0	63.0 \pm 4.7	26.6 \pm 3.2	6.3 \pm 0.9	72.4 \pm 3.6	24.0 \pm 3.5	3.7 \pm 0.8
10.0	69.2 \pm 2.7	24.6 \pm 2.5	6.2 \pm 0.6	74.3 \pm 3.3	20.8 \pm 2.7	2.5 \pm 0.6
50.0	71.1 \pm 3.0	22.4 \pm 3.1	6.0 \pm 0.6	76.5 \pm 2.4	21.2 \pm 2.3	2.7 \pm 0.7

Fig 7 EFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE EL CICLO CELULAR

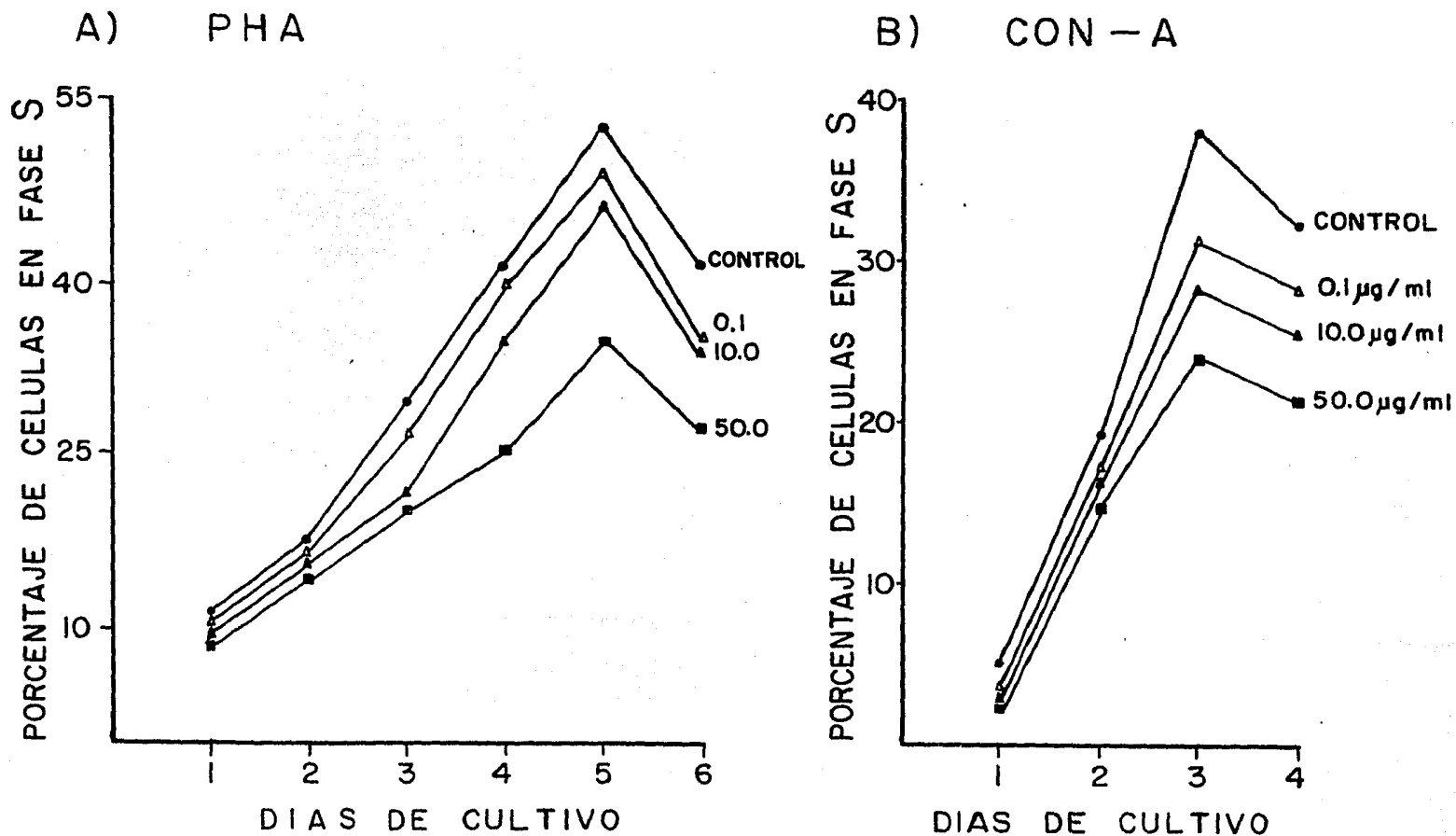


FIGURA 6 Histogramas de distribución de frecuencia que representan los valores de fluorescencia roja de linfocitos estimulados con PHA, a las 96 horas de cultivo teñidos con bromuro de etidio. A) Control, A) 0.001 $\mu\text{g/ml}$ de 5 α -DHT, B) 0.01 $\mu\text{g/ml}$ de 5 α -DHT, C) -- 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de 5 α -DHT, muestran una proporción considerable de células proyectadas hacia valores de fluorescencia roja mayores de 600 nm, lo que indica que hay progresión hacia las fases S y G_2 del ciclo celular. D) 1.0 $\mu\text{g/ml}$, E) 10 $\mu\text{g/ml}$, F) 50 $\mu\text{g/ml}$ de -- 5 α -DHT muestran un pico mayor de células con valores de fluorescencia roja menores de 600 nm lo que indica un arresto del ciclo celular en las fases G_0G_1 . Cada histograma representa 10,000 células.

TABLA 6 EFEECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LOS PORCENTAJES DE CELULAS EN FASES DE REPOSO (G_0G_1) O FASES ACTIVAS (S Y G_2^+M) DEL CICLO CELULAR DE CULTIVOS NO ESTIMULADOS Y ESTIMULADOS CON PWM.

Los valores representan la media \pm el error standard del porcentaje de células dentro de las fases particulares, basados en una cuenta triplicado total de 10^5 células por cada condición experimental de cultivos no estimulados : n = 7 experimentos. Cultivos estimulados con PWM: n=7 experimentos. Coeficientes de análisis de regresión lineal: r=-0.8119 de cultivos no estimulados: r=-0.8167 de PWM.

TABLA 7 EFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LOS PORCENTAJES DE CELULAS EN FASES DE REPOSO (G_0G_1) O FASES ACTIVAS DEL CICLO CELULAR DE CULTIVOS ESTIMULADOS CON PHA Y CON-A.

Los valores representan la media \pm el error standard del porcentaje de células dentro de las fases particulares basados en una cuenta triplicado total de 10^5 células por cada condición experimental de: Cultivos estimulados con PHA: n=9 experimentos. Cultivos estimulados con Con-A: n=7 experimentos. Coeficientes del análisis de regresión lineal: r de cultivos estimulados con PHA = -0.7420; r de cultivos estimulados con Con-A = -0.6904.

FIGURA 7 EFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE EL PORCENTAJE DE CELULAS EN SINTESIS DE LA CINETICA DEL CICLO CELULAR.

Los valores con la media del porcentaje de células en Síntesis cuantificados cada 24 horas durante un período de seis y cuatro días en cultivos estimulados con PHA = 6 experimentos y en cultivos estimulados con Con-A = tres experimentos, en presencia de 5 α -DHT (●) Control; (Δ) 0.1 $\mu\text{g/ml}$; (\blacktriangle) 10.0 $\mu\text{g/ml}$; (\blacksquare) 50 $\mu\text{g/ml}$. Se omitió la delineación del error standard.

VI. EFFECTO DE LA 5 α -DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LAS POBLACIONES CELULARES. EFFECTO SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS T PURIFICADOS Y ESTIMULADOS CON PHA Y CON-A.

Con el objetivo de investigar sobre qué población celular de las células mononucleares completas ejerce la 5 α -DHT su efecto inhibitorio, se aislaron y purificaron células T y No-T.

Las células T se trataron con todas las concentraciones de 5 α -DHT y se estimularon con los mitógenos de PHA y Con-A. Invariablemente se encontró una inhibición de las células T estimuladas con ambos mitógenos. En la Tabla 8 se muestra el efecto solamente de las concentraciones de 0.1 μ g/ml, 10 μ g/ml y 50 μ g/ml sobre la incorporación de timidina tritiada. La inhibición fue dosis-dependiente de 5 α -DHT, idéntica a la encontrada sobre células mononucleares completas lo que indica que el efecto inhibitorio en CMN se ejerce preferentemente sobre las células T.

Las células No-T incorporan solamente niveles basales de timidina 3 H, por lo que no se puede descartar completamente que los andrógenos no tengan algún efecto sobre las células No-T. La reconstitución en la mezcla T+No-T en relación 3:1, al ser expuesta a la 5 α -DHT, resultó en la misma inhibición dosis-dependiente de la transformación blástica como la de células mononucleares completas. (Datos no mostrados).

EFFECTO SOBRE LAS CELULAS PRECURSORAS POSTIMICAS.

Se investigó el efecto de la 5 α -dihidrotestosterona -

sobre la subpoblación de células T precursoras postmíticas, que se identificaron por su capacidad de formar rosetas con eritrocitos autólogos. Como lo muestra la Tabla 9, el valor del control de individuos sanos presentó un 25.0% de células formadoras de rosetas autólogas. La adición de 5α -DHT a células mononucleares completas durante 18 horas de incubación a 4°C , no provocó ningún cambio significativo en la cantidad de rosetas formadas excepto en la concentración de $0.1\ \mu\text{g/ml}$ donde hubo un incremento en el porcentaje de células T o precursoras postmíticas del 30% del total generalmente encontrado en individuos jóvenes normales.

TABLA 8

EFEECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA PROLIFERACION
DE LINFOCITOS T PURIFICADOS

CONCENTRACION DE 5 α -DHT (μ g/ML)	ESTIMULO			
	FITOHEMAGLUTININA		CONCANAVALINA-A	
	INC. 3 H-T	% INH.	INC. 3 H-T	% INH.
CONTROL	43,761 \pm 16,373	0	10,409 \pm 4,060	0
0.1	41,041 \pm 13,080	6.2	8,078 \pm 3,482	22.4
10.0	36,524 \pm 12,680	16.5	7,188 \pm 2,733	31.0
50.0	26,272 \pm 13,777	40.0	4,301 \pm 1,643	58.7

TABLA 9

EFFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LAS CELULAS PRECURSORAS POSTIMICAS

<u>5α-DHT</u>	<u>CELULAS Tar</u>
<u>(μg/ML)</u>	<u>% ROSETAS</u>
CONTROL	25.0
0.001	24.7
0.01	26.1
0.1	32.1
1.0	23.0
10.0	24.7
50.0	22.9

TABLA 8 EFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS.

Los valores representan las cpm de incorporación de timidina ^3H a las 66 horas de cultivo de condiciones experimentales realizadas por triplicado y son la media + el error standard de cinco experimentos. Coeficientes de análisis de regresión lineal: r de PHA = - 0.9747; r de Con-A = - 0.9027.

TABLA 9 EFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LAS CELULAS PRECURSORAS POSTIMICAS.

Los valores son la media de la cuenta por duplicado de rosetas autólogas de cinco experimentos, a las 18 horas de incubación a 4°C.

VII. EFFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA PRODUCCION DE IL-2.

En virtud de que la 5 α -DHT ejerce un efecto inhibitorio sobre la población celular T y sobre su proliferación inducida por PHA y Con-A y basándose en el modelo anteriormente citado, donde el factor que realmente media la proliferación inducida por mitógenos T-dependientes es la interleukina-2, los efectos de los andrógenos podrían manifestarse a otros dos niveles:

- 1) A nivel de la producción de IL-2.
- 2) A nivel de la célula respondedora de IL-2.

Para investigar si los efectos inhibitorios de la 5 α -dihidrotestosterona podrían deberse a la supresión de la producción de interleukina-2 se produjeron sobrenadantes de linfocitos estimulados con PHA durante 48 horas, cultivados en presencia de 5 α -DHT (0.001 μ g/ml hasta 50 μ g/ml) y se les realizó un microensayo para la determinación de la actividad de IL-2.

Los cultivos basales, de linfocitos no estimulados, en presencia de todas las concentraciones de 5 α -DHT no produjeron IL-2 y solamente incorporaron niveles basales de timidina tritiada. (Datos no mostrados).

Las células activadas, indicadoras del microensayo, presentaron una proliferación dependiente del título de sobrenadante de IL-2 colectado de cultivos control, al que fueron expuestas, siendo la dilución 1:2 la que causó mayor proliferación, la dilución 1:4 un valor intermedio y la dilución 1:8

una proliferación reducida. (Tabla 10). El valor de proliferación obtenido en estos experimentos es consistente con lo descrito por otros autores en donde las células T indicadoras, dependientes de IL-2 incorporan aproximadamente 10,000 cpm de ^3H -Tdr en presencia de una concentración saturante de IL-2.

Los sobrenadantes producidos por células en presencia de $5\ \alpha$ -DHT causaron también un incremento en la proliferación de las células activadas, título-dependiente de la dilución de IL-2, sin embargo mostraron una reducción en la actividad de IL-2 comparada con la producida por sus respectivos cultivos control. La inhibición de la actividad de IL-2 inducida por $5\ \alpha$ -DHT fue dosis-dependiente y se encontró a las tres diluciones del sobrenadante aún cuando en este caso también la concentración de $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ presentó menor inhibición que las concentraciones inferiores (r de $1:2 = -0.7032$; r de $1:4 = -0.5876$; r de $1:8 = -0.7677$).

Fue considerada la posibilidad de que la inhibición de la actividad de IL-2, encontrada a través de la reducción de la proliferación de las células activadas indicadoras del microensayo, pudiera deberse a los efectos de hormona remanente presente en los sobrenadantes (producidos en presencia de $5\ \alpha$ -DHT) a los que fueron expuestas. Para descartar esta posibilidad, tres series de sobrenadantes producidos en presencia de $5\ \alpha$ -DHT fueron absorbidos con carbón-dextran, para extraer la posible hormona remanente.

La actividad presente en sobrenadantes colectados de -

cultivos control, producidos en ausencia de 5α -DHT, fue asignada en forma arbitraria el valor de una unidad de actividad de IL-2 y promovió la incorporación de 9,880 cpm de $^3\text{H-Tdr}$ por 10^4 células activadas, a la dilución de IL-2 de 1:2. Los valores de actividad de IL-2 de los sobrenadantes control producidos fueron similares a los obtenidos con IL-2 comercial o de referencia. El tratamiento de tres series de sobrenadantes con carbón dextran causó la pérdida de no más de 0.7 unidades de actividad de IL-2. (Tabla 11). Las unidades de actividad de IL-2 a la dilución 1:2 de los sobrenadantes producidos en presencia de 5α -DHT y absorbidos con carbón-dextran comparadas con las de su respectivo control, mostraron que persiste la misma inhibición de la proliferación de las células indicadas que la observada con los sobrenadantes no absorbidos y de la misma manera dosis-dependiente de la concentración de 5α -DHT utilizada al producirlos (r de sobrenadantes no absorbidos = -0.7032; r de sobrenadantes absorbidos = -0.6368).

Los resultados anteriores indican que la inhibición de la actividad de interleukina-2 no está asociada a la presencia de esteroide libre en los sobrenadantes de cultivo producidos en presencia de 5α -DHT y sólo puede ser adscrita a la inhibición de la producción de IL-2 mediada por 5α -dihidrotestosterona.

TABLA 10

EFFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA PRODUCCION DE INTERLEUKINA-2

5 α -DHT CONCENTRACION (μ g/ML)	ACTIVIDAD DE LOS SOBRENADANTES		
	DILUCIONES		
	1:2	1:4	1:8
CONTROL	9880 \pm 1853	9836 \pm 2734	8170 \pm 3513
0.001	7833 \pm 2114	7494 \pm 1211	4821 \pm 3696
.01	7478 \pm 1208	6913 \pm 1630	5491 \pm 1354
0.1	8200 \pm 1656	7971 \pm 1771	5974 \pm 1733
1.0	7147 \pm 1489	5860 \pm 2401	5073 \pm 1235
10.0	5755 \pm 82	5597 \pm 1788	3748 \pm 802
50.0	5280 \pm 835	5179 \pm 1390	2088 \pm 1674

TABLA 11

EFFECTO DE LA ABSORCION CON CARBON DE LOS SOBRENADANTES
SOBRE LA ACTIVIDAD DE IL-2

CONCENTRACION DE 5 α -DHT (μ g/ML)	PRODUCCION DE IL-2			
	SOBRENADANTES NO ABSORBIDOS		SOBRENADANTES ABSORBIDOS	
	UNIDADES	% INHIBICION	UNIDADES	% INHIBICION
IL-2 REFERENCIA	1.01		1.09	
CONTROL	1.00	0	1.0	0
0.001	0.79	20.7	0.72	28.0
0.01	0.75	24.4	0.67	32.0
0.10	0.82	17.1	0.74	25.8
1.0	0.72	27.7	0.68	32.0
10.0	0.58	41.8	0.59	40.7
50.0	0.53	46.6	0.50	50.1

TABLA 10 EFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA PRODUCCION DE INTERLEUKINA-2.

Los valores representan la media \pm el error standard de las cpm de incorporación de timidina ^3H de nueve experimentos, de células activadas expuestas a sobrenadantes que contienen IL-2 (producidos en presencia de 5 α -DHT) a las diluciones 1:2, 1:4 y 1:8. Coeficientes de análisis de regresión lineal: r de 1:2 = -0.7032; r de 1:4 = -0.5876; r de 1:8 = -0.7677.

TABLA 11 EFECTO DE LA ABSORCION DE LOS SOBRENADANTES CON CARBON ACTIVADO, SOBRE LA ACTIVIDAD DE IL-2.

Se calcularon las unidades de IL-2 y el porcentaje de inhibición de los sobrenadantes producidos en presencia de 5 α -DHT con respecto al control y son la media de nueve experimentos. Los sobrenadantes control absorbidos con carbón activado promovieron la incorporación de 9,891 cpm de $^3\text{H-T}$ por lo que se le adjudicó también el valor de una unidad de IL-2. Las unidades de IL-2 de los sobrenadantes absorbidos son la media de las cpm de tres experimentos.

VIII. EFEECTO DE LA ADICION DE IL-2 A CULTIVOS EN PRESENCIA DE 5 α -DHT, NO ESTIMULADOS Y ESTIMULADOS CON PHA Y CON-A.

Si una de las manifestaciones subyacentes a la inhibición de la proliferación de linfocitos inducida por 5 α -dihidrotestosterona, fue la inhibición de la producción de interleukina-2, se esperaría que la adición de IL-2 a cultivos tratados con 5 α -DHT y estimulados con mitógenos resultara en un reestablecimiento de la proliferación normal inducida por mitógenos.

Con este propósito, cultivos de linfocitos en presencia de 5 α -DHT no estimulados o estimulados con PHA y Con-A, se suplementaron con IL-2 de referencia (libre de lectina), - con tres diluciones seriadas. Los resultados se encuentran - detallados en las Figuras 8, 9, 10 en términos de incorporación de ³H-T a las 66 horas de cultivo.

Los cultivos de linfocitos basales, no mostraron un incremento importante en la incorporación de ³H-T pero sí presentaron una sensibilidad a 5 α -DHT dosis-dependiente, al ser expuestos a la hormona. La adición de IL-2 a los cultivos en presencia de todas las concentraciones de 5 α -DHT no estimulados resultó en un incremento altamente significativo, de la proliferación, medido por incorporación de timidina tritiada, con todas las diluciones de IL-2 de manera título-dependiente, inclusive en presencia de todas las concentraciones de 5 α -DHT. Sin embargo la presencia de la hormona causó la misma inhibi-

ción dosis-dependiente de 5α -DHT, con respecto a sus respectivos controles, en los cultivos suplementados con interleukina-2, que la observada en ausencia de IL-2. (Figura 8).

Como se describió en experimentos iniciales (Tabla 3) la estimulación con PHA en presencia de 5α -DHT resultó en una inhibición dosis-dependiente de la incorporación de $^3\text{H-T}$ inducida por el mitógeno. La adición de IL-2 (principalmente a la dilución 1:2), incrementó discretamente los niveles de incorporación inducidos por el mitógeno, en todas las concentraciones de 5α -DHT. Este discreto incremento si se debió a la IL-2 añadida ya que se encontró que es título dependiente de IL-2. Sin embargo, el efecto de la IL-2 no se pudo aclarar de mejor forma ya que se vió enmascarado por el efecto máximo estimulador de la PHA donde el sistema consigue su óptima capacidad de respuesta. Sin embargo, en presencia de la hormona se encontró una inhibición de la proliferación en los cultivos suplementados (con las tres diluciones de IL-2), aún cuando contenían la misma cantidad de IL-2 que sus respectivos controles. Esta inhibición fue dosis-dependiente de 5α -DHT, igual a la observada en ausencia de IL-2 con coeficientes de regresión de: $r = -0.9015$ de PHA; $r = -0.9229$ de PHA + IL-2-1:2; $r = -0.9372$ de PHA + IL-2-1:4; $r = -0.9466$ de PHA + IL-2-1:8.

De manera similar se observó una inhibición dosis-dependiente de la proliferación de linfocitos inducida por Concanavalina-A en cultivos conducidos en presencia de las distin-

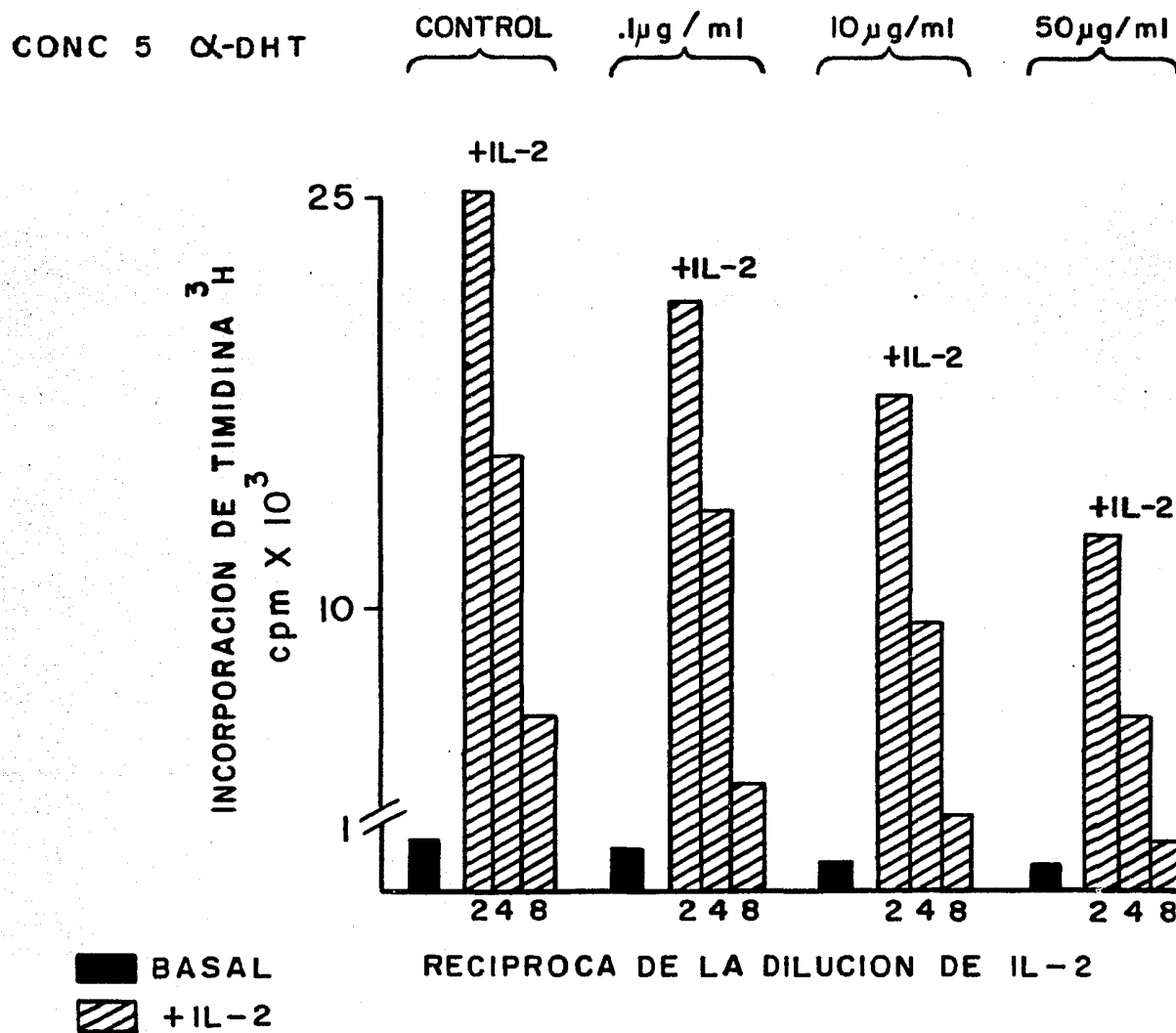
tas concentraciones de 5 α -DHT. (Figura 9). La adición de -- IL-2 a cultivos estimulados con Con-A representó un incremento título-dependiente de IL-2 en la proliferación inducida -- por el mitógeno, del orden del 30% aproximadamente a la dilución de IL-2 de 1:2, a lo largo de todos los niveles de concentración de 5 α -DHT. En ausencia de IL-2 a la dosis de 10 μ g/ml se observó una inhibición también aproximadamente del 30%, mientras que al añadirle IL-2 resultó en una óptima estimulación igual a la del valor del control sin IL-2. La interleukina-2 fue capaz de sobreponer el efecto inhibitorio - inducido por 5 α -DHT de los linfocitos estimulados con Con-A desde la dosis de 0.001 μ g/ml hasta la de 10 μ g/ml de 5 α -DHT. Sin embargo, la suplementación de IL-2, a los tres títulos, a los cultivos tratados con hormona y estimulados con Con-A, resultó en la misma inhibición dosis-dependiente de 5 α -DHT de la incorporación de 3 H-T que la encontrada en ausencia de IL-2 (r de Con-A = -0.9299; r de Con-A+ IL-2-1:2 = -0.8191; r de Con-A + IL-2-1:4 = -0.9734; r de Con-A + IL-2-1:8 = -0.9274).

El incremento en la proliferación tanto en los controles de cultivos no estimulados y estimulados con PHA y Con-A, así como de los cultivos tratados con hormona, al suplementarse con IL-2, no se puede atribuir a una estimulación ocasionada por lectina libre presente en la IL-2 de referencia adicionada, ya que ésta fue tratada para la remoción de posible PHA remanente con la que fueron producidos los sobrenadantes. Además la adición de IL-2 comercial, libre de lectinas a contro-

les y a cultivos en presencia de 5 α -DHT no estimulados y estimulados con PHA y Con-A dio resultados idénticos. (Datos no mostrados).

FIGURA 8 EFFECTO DE LA ADICION DE IL-2 A CULTIVOS NO ESTIMULADOS EN PRESENCIA DE 5 α -DHT. Las barras representan la media de los cpm de incorporación de $^3\text{H-T}$ a las 66 horas de cultivo de ocho experimentos. Se omitió la delineación del error standard. La Figura solamente muestra los resultados de los linfocitos cultivados en presencia de 5 α -DHT de 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 10.0 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$ y medio de cultivo (\square) y de los cultivados en presencia de estas mismas concentraciones + IL-2 (diluciones 1:2, 1:4, 1:8). Los coeficientes de regresión lineal del incremento título dependiente para cada concentración fueron: r del control + IL-2 = - 0.9870; r de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ + IL-2 = - 0.9346; r de 10.0 $\mu\text{g/ml}$ + IL-2 = - 0.9562; r de 50 $\mu\text{g/ml}$ + IL-2 = - 0.9015. Los coeficientes de regresión lineal de la inhibición dosis-dependiente de 5 α -DHT se calcularon a partir de todas las concentraciones de hormona y fueron: r de cultivos no estimulados en presencia de 5 α -DHT = - 0.8742; r de cultivos no estimulados tratados con 5 α -DHT + IL-2 - 1:2 = - 0.9008 r de cultivos no estimulados tratados con 5 α -DHT + IL-2 - 1:4 = - 0.8878 ; r de cultivos no estimulados en presencia de 5 α -DHT + IL-2 - 1:8 = - 0.8347

Fig-8 ADICION DE IL-2 A CULTIVOS NO-ESTIMULADOS EN PRESENCIA DE 5 α -DHT



ADICION DE IL-2 A CULTIVOS EN PRESENCIA DE 5 α -DHT ESTIMULADOS CON PHA

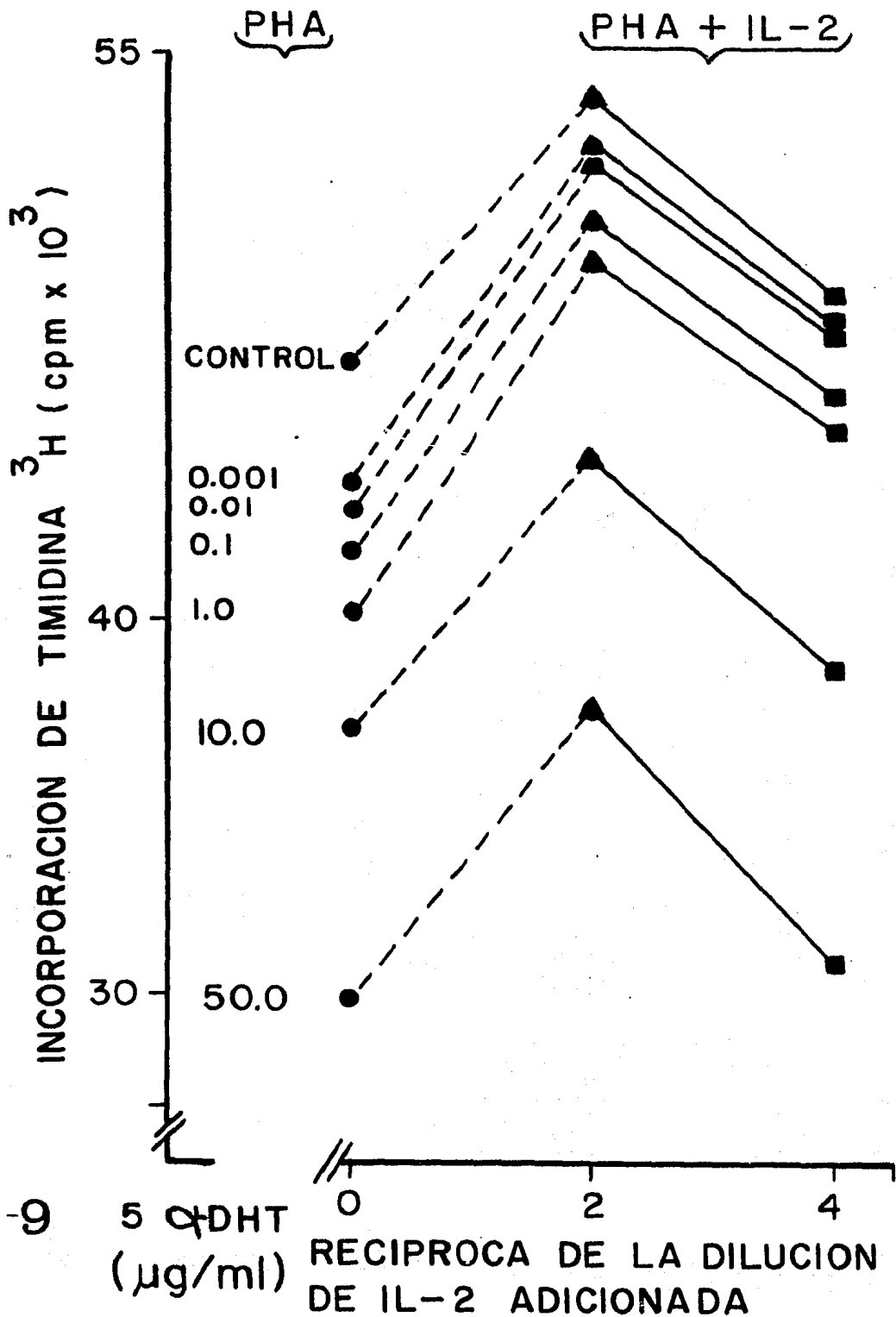


Fig-9

ADICION DE IL-2 A CELULAS ESTIMULADAS CON Con-A EN PRESENCIA DE 5- α DHT

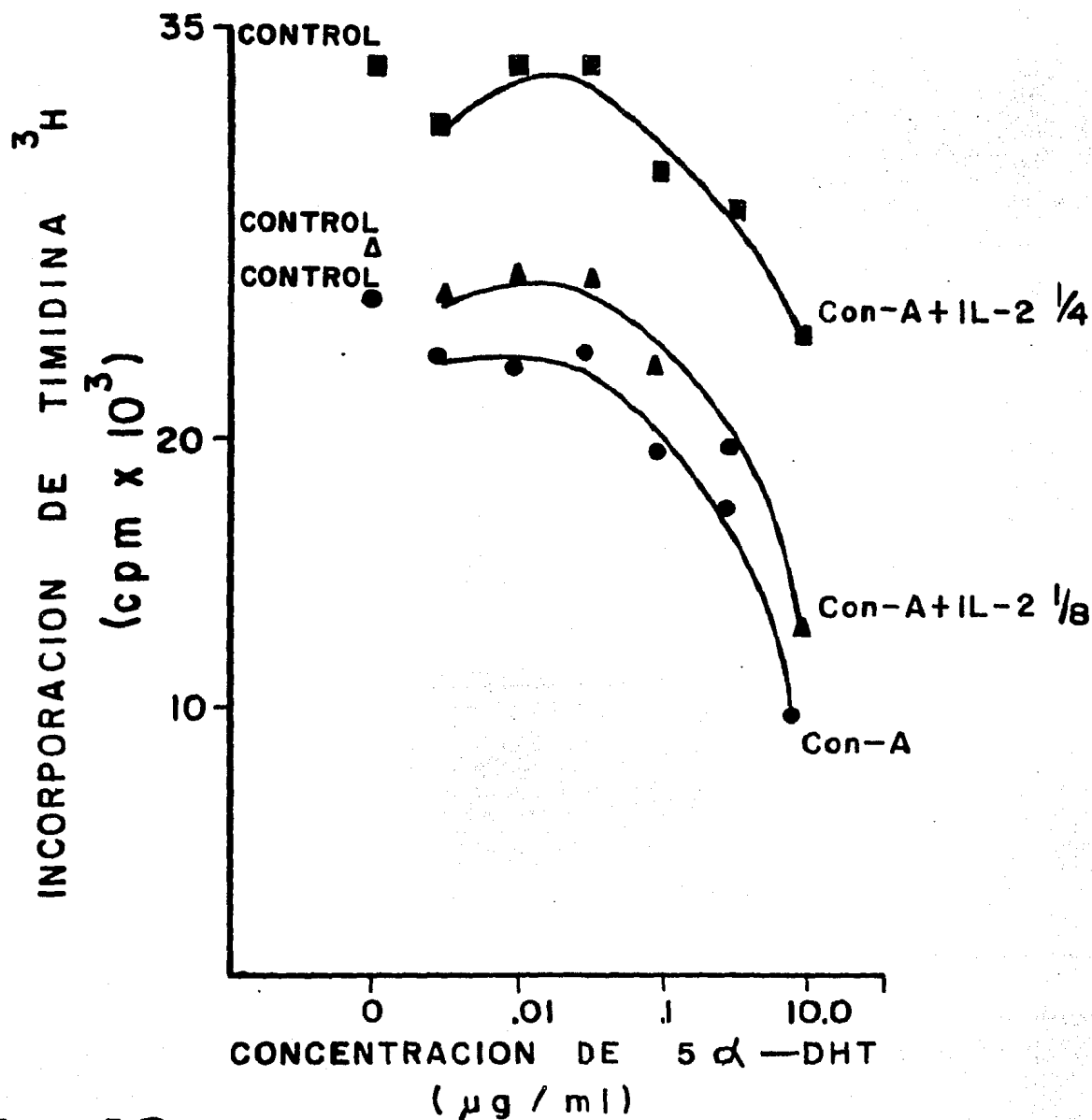


Fig-10

CON PHA EN PRESENCIA DE 5 α -DHT.

Cada punto representa la media de las cpm de incorporación de $^3\text{H-T}$ a las 66 horas de cultivo de tres experimentos de: cultivos estimulados con PHA en presencia de 5 α -DHT (\bullet) y de cultivos tratados con 5 α -DHT y estimulados con PHA + IL-2 - 1:2 (\blacktriangle) y IL-2 1/4 (\blacksquare). Los datos de adición de IL-2 1:8 no se muestran en la Figura pero de los coeficientes de regresión lineal del incremento título-dependiente para cada concentración de hormona, se calcularon a partir de las tres diluciones de IL-2. Coeficientes de regresión lineal de la adición de IL-2 = del control + IL-2 = - 0.9963; r de 0.001 $\mu\text{g/ml}$ + IL-2 = -0.9741; r de 0.01 $\mu\text{g/ml}$ + IL-2 = - 0.9977; r de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ + IL-2 = - 0.9994; de 10 $\mu\text{g/ml}$ + IL-2 = - 0.8766; r de 50.0 $\mu\text{g/ml}$ + IL-2 = - 0.9683. La línea punteada muestra el incremento causado a la adición de IL-2 1/2. Se omitió la delineación del error estándar.

FIGURA 10 EFEECTO DE LA ADICION DE IL-2 A CULTIVOS ESTIMULADOSCON CON-A EN PRESENCIA DE 5 α -DHT.

Las curvas representan la media de incorporación de $^3\text{H-T}$ a las 66 horas de cultivo de tres experimentos. Los cultivos fueron conducidos en presencia de todas las concentraciones de 5 α -DHT estimulados con Con-A (\bullet) y en presencia de 5 α -DHT estimulados con Con-A + IL-2 - 1:4 (\blacksquare) y 1:8 (\blacktriangle). La adición de IL-2 a la dilución 1:2 no se muestra en la Figura por ser similar a la 1:4.

IX. EFEECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS EN EL SINDROME DE FEMINIZACION TESTICULAR COMPLETA.

Con el objetivo de investigar si los efectos inhibitorios de la proliferación de linfocitos de sangre periférica de individuos normales, ejercidos por testosterona y 5 α -dihidrotestosterona, pudieran estar mediados a través de un mecanismo que involucrara un receptor de andrógenos en linfocitos, se decidió estudiar el efecto de la 5 α -DHT sobre la respuesta inmune in vitro en el Síndrome de Feminización Testicular Completa (SFTC).

En este síndrome el sexo cromosómico, gonadal y endocrino es masculino, mientras que el sexo fenotípico es femenino. Se ha identificado una anomalía molecular resultante de una mutación ligada al cromosoma X que determina la ausencia completa de unión de andrógenos a receptores específicos de citosol. Se seleccionó un paciente de SFTC (edad = 16 años) en el que el diagnóstico había sido previamente establecido en base a las características clínicas, el perfil endocrino, la morfología gonadal y los estudios metabólicos y al que paralelamente se le había realizado el ensayo de unión de ^3H -DHT al receptor de citosol y la unión nuclear de DHT en fibroblastos -- cultivados de epitelio genital, lo que se analizó por centrifugación en gradiente de sacarosa. Los resultados de esos experimentos corroboraron en este paciente, la ausencia completa de unión de ^3H -DHT a nivel de citosol y nuclear.

Se estudió el efecto de la 5α -DHT sobre la proliferación de linfocitos de sangre periférica de este paciente con SFTC, que fueron estimulados con los mitógenos de PWM, PHA y Con-A en presencia de todas las concentraciones de la hormona. (Tabla 12). A las 66 horas de cultivo no se encontró la inhibición dosis-dependiente de 5α -DHT de la incorporación de timidina tritiada con respecto al control sin hormona, con las concentraciones desde 0.001 $\mu\text{g/ml}$ hasta la de 10.0 $\mu\text{g/ml}$, como la observada en los experimentos con linfocitos de individuos normales, descritos en este trabajo. El mismo fenómeno ocurrió al cuantificar la incorporación de uridina ^3H en la proliferación de linfocitos. Este paciente tampoco presentó la reducción en el porcentaje de células en síntesis al estimular sus linfocitos con los tres mitógenos. Los resultados sobre ciclo celular fueron corroborados en experimentos con células de otros dos pacientes.

Estos datos preliminares sugieren que a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ se ejerce un efecto de tipo farmacológico sobre los linfocitos como consecuencia de la alta concentración de hormona pero que a las concentraciones desde 0.001 $\mu\text{g/ml}$ hasta la de 10.0 $\mu\text{g/ml}$ los efectos inhibitorios de los andrógenos sobre la proliferación de linfocitos de individuos normales podrían estar mediados a través de un receptor de andrógenos en linfocitos.

TABLA 12

EFFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS DE UN
PACIENTE CON FEMINIZACION TESTICULAR

CONCENTRACION 5 α -DHT (μ g/ML)	CULTIVOS ESTIMULADOS		
	PWM	PHA	CON-A
	% INHIBICION	% INHIBICION	% INHIBICIÓN
CONTROL	0	0	0
0.001	0	0	0
0.01	0	0	0
0.1	0	0	0
1.0	0	0	0
10.0	0	0	0
50.0	70.7	36.3	59.2

TABLA 12. EFFECTO DE LA 5 α -DHT SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS DE UN PACIENTE CON SINDROME DE FEMINIZACION TESTICULAR COMPLETA.

El porcentaje de inhibición se calculó con respecto a las cpm incorporadas del cultivo control.

DISCUSION

Los resultados del presente trabajo aportan evidencia - de que los andrógenos ejercen inmunosupresión sobre las funciones de los linfocitos humanos, in vitro. La inhibición de la respuesta proliferativa de células estimuladas con mitógenos ocurre fundamentalmente por:

Una supresión generalizada del metabolismo celular y -- una reducción en el porcentaje de células que se encuentran en fase de Síntesis de DNA y en fase $G_2 M$, resultante de un blo-- queo en la fase G_0G_1 del ciclo celular. Este efecto se ejerce preferentemente sobre la población celular T, con una conse--- ciente inhibición de la producción de interleukina-2 y con -- efectos adicionales sobre la capacidad de las células para res-- ponder a la IL-2 exógena, todo lo cual conduce a una disminuí-- da proliferación celular.

La testosterona y la 5 α -dihidrotestosterona (0.001 - $\mu\text{g/ml}$) a 50 $\mu\text{g/ml}$) mediaron una inhibición dosis-dependiente - de la incorporación de timidina ^3H y uridina ^3H , en linfocitos no estimulados y estimulados con los mitógenos de PWM, PHA y - Con-A. El hecho de que la viabilidad de los cultivos tratados con hormona y la de los controles fuera esencialmente idéntica indica que las diferencias en la proliferación no son debidas a un efecto citotóxico de los andrógenos sobre los linfocitos que resulte en muerte celular.

La variabilidad de individuo a individuo en el grado de

supresión inducido por 5α -DHT, a una concentración fija de - mitógeno, se explica por las diferencias en sus concentraciones óptimas y en sus curvas dosis-respuesta para PWM, PHA y Con-A, ya que se encontraron diferencias en la magnitud de la inhibición a concentraciones variables de mitógeno, para un mismo individuo y entre individuos. La interferencia de la hormona con los mitógenos quedó excluida puesto que las curvas dosis-respuesta se conservaron sin alteración en la presencia de 5α -DHT. El efecto inhibitorio de la 5α -DHT sobre la proliferación no se debió a una reducción en la disponibilidad de la timidina ^3H hacia el interior de las células, hacia la poza de nucleótidos para incorporación al DNA que resultara de un bloqueo en la toma de timidina ^3H . Los resultados muestran que el efecto inhibitorio sobre los linfocitos no estimulados y estimulados con PWM, PHA y Con-A no pudo ser revertido al añadir cantidades crecientes de timidina extracelular. Al aumentar la concentración de timidina, se observó un incremento en la incorporación; sin embargo, se encontró la misma inhibición dosis-dependiente de 5α -DHT con respecto al control, al marcar con todas las concentraciones de timidina. Esto demuestra que el efecto inhibitorio no fue a nivel de bloqueo de la toma de timidina extracelular, sino un efecto diferente sobre los procesos de incorporación de timidina al DNA y sobre los sistemas sintetizadores de DNA. Los estudios del patrón cinético de respuesta proliferativa a PWM, PHA y Con-A durante un período de cultivo de seis días muestran que la estimulación con mitógenos, en presencia de 5α -DHT, resulta en una inhibi-

ción dosis-dependiente de la incorporación en todos los días de cultivo, y presentan un curso y pico de máxima respuesta igual a los de sus respectivos cultivos control. Esto indica que el efecto inhibitorio más que deberse a una alteración, -retardo o desfase en la cinética de proliferación normal refleja una supresión de la síntesis de DNA.

Las observaciones del ciclo celular confirman que el efecto de los andrógenos sobre la proliferación se debe a que sólo una fracción reducida de la población celular procedió - a través de ciclo celular efecto indicado por una reducción - dosis-dependiente de 5 α -DHT del porcentaje de células en fase S y G₂M resultante de un bloqueo en la transición de fase G₀G₁ a S con una acumulación concomitante de las células en - fase G₀G₁, todo lo que ocurre durante todos los días de cultivo y que nunca se recupera. En favor de estos resultados está un reporte reciente (88), que demuestra que en pollos, el tratamiento con andrógenos resulta en una disminución de células de la Bursa de Fabricio en fases S y G₂M y en un incremento de la fase G₁, durante todos los días de tratamiento, lo que apoya que el efecto de los andrógenos sobre el ciclo celular es similar en las dos especies.

Los andrógenos ejercieron sus efectos sobre la población celular T por supresión de la síntesis de macromoléculas, ya que los linfocitos T purificados presentaron una inhibición dosis-dependiente de 5 α -DHT de la proliferación inducida por PHA y Con-A -similar a la de células mononucleares completas-,

lo que sugiere que el efecto se ejerce preferentemente sobre células T. En favor de estos resultados se ha reportado que la adición de testosterona en concentraciones fisiológicas a cultivos de linfocitos humanos estimulados con PWM, no tiene efecto sobre la diferenciación de la célula B (64).

La 5α -dihidrotestosterona también ejerció un efecto estimulatorio de la proliferación de las células precursoras postímicas a la concentración de $0.1\ \mu\text{g/ml}$, la cual provocó un incremento de casi el 30% del total de células formadoras de rosetas autólogas (Tar) normalmente presentes en CMN completas de individuos jóvenes. Este dato preliminar apoya la idea de que los andrógenos a ciertas concentraciones podrían contribuir a la inmunorregulación estimulando la proliferación o diferenciación de ciertas subpoblaciones de linfocitos.

Los resultados también demuestran que los andrógenos pueden contribuir a la regulación de la síntesis de moléculas inmunorregulatorias importantes como las linfocinas, puesto que los efectos también se manifestaron a nivel de la producción de IL-2. Los experimentos detallados en este reporte muestran que los sobrenadantes producidos por estimulación con PHA durante 48 horas, en presencia de 5α -DHT, presentaron una reducción dosis-dependiente de hormona de la actividad de IL-2-medida por el microensayo de actividad de IL-2. La inhibición de la proliferación celular de las células dependientes de IL-2 indicadoras, al ser expuestas a los sobrenadantes pro-

ducidos que contenían IL-2, se demostró que no estaba asociada a la presencia de hormona remanente en los sobrenadantes producidos en presencia de 5 α -DHT y que solamente puede ser adscrita a una inhibición dosis-dependiente de la producción de IL-2.

Es importante el hecho de que a la concentración de -- 0.1 μ g/ml de 5 α -DHT se encontró una menor inhibición de la producción de IL-2, a las tres diluciones de sobrenadante probadas, que la inhibición obtenida con concentraciones inferiores de hormona.

Curiosamente también con 0.1 μ g/ml de 5 α -DHT se observó un efecto estimulador de la proliferación de las células precursoras postmíticas. Basándose en la reciente información en la que se involucra a las células precursoras postmíticas en la producción de IL-2, posiblemente se podría correlacionar la mayor producción de IL-2 con el incremento en las células Tar, ambos fenómenos resultantes de la incubación con esta concentración, lo que explicaría el que en los experimentos en los que se cuantificó la proliferación, estimulando con los tres mitógenos en presencia de 5 α -DHT, se encontrara consistentemente mayor incorporación tanto de timidina como de uridina tritiadas, es decir, menor inhibición de la proliferación, en esta concentración, que en la observada con las concentraciones inferiores en la curva dosis-respuesta.

Hasta aquí los resultados apuntaban hacia dos posibles mecanismos por medio de los cuales los andrógenos ejercen sus

efectos inmunosupresores:

1) La presencia de los andrógenos podría tener un efecto drástico sobre la producción de IL-2, que se vería reflejado en una disminuída proliferación de linfocitos.

2) El efecto primario podría ser el de inhibición del metabolismo celular, con una consecuente reducción en la producción de IL-2 que también condujera una disminuída proliferación.

Para aclarar esta pregunta se probó la capacidad de la IL-2 para reestablecer la proliferación normal en cultivos tratados con 5α -DHT. Los resultados de los experimentos mostraron que la adición de IL-2 a cultivos no estimulados resultó en un incremento altamente significativo de la proliferación con todas las diluciones de IL-2, inclusive en presencia de 5α -DHT. Sin embargo, estos cultivos presentaron la misma inhibición dosis-dependiente de 5α -DHT, que la observada en ausencia de IL-2. El incremento en proliferación no se pudo atribuir a estimulación por lectina libre presente en la IL-2 de referencia adicionada, en virtud de que ésta había sido tratada para la remoción de la posible PHA presente y de que además la adición de IL-2 comercial libre de lectinas dio idénticos resultados. Aunque varios reportes han mostrado que la IL-2 no tiene efecto mitogénico sobre linfocitos no estimulados (89,90,91) y que sólo es absorbida por células T activadas (92,93,94), estos resultados se pueden explicar debido a que también se ha descrito que las células T en reposo, dentro de la CMN comple-

tas pueden adquirir la capacidad de respuesta in vitro a IL-2 al interactuar con antígenos HLA-Dr en células estimuladoras, así como proliferar con IL-2 exógena (95, 96). Cuando las células T se han vuelto sensibles a IL-2, su concentración es la única variable que determina el grado de proliferación.

La suplementación de IL-2 a cultivos tratados con 5α -DHT y estimulados con PHA y Con-A resultó en un reestablecimiento parcial de la proliferación normal, dependiente del título de IL-2. Sin embargo, se observó la misma inhibición dosis-dependiente de 5α -DHT que la encontrada en la ausencia de IL-2. Estos resultados de adición de IL-2 sugieren que el mecanismo de inmunosupresión mediado por andrógenos sucede a nivel de la producción de IL-2 subsecuente a la inhibición de la síntesis de macromoléculas de células T, productoras de IL-2, a través de efectos sobre la capacidad de las células T para responder a la IL-2 exógena, todo lo cual conduce a una disminución de la proliferación celular.

Los estudios sobre el efecto de las hormonas esteroi--
des sexuales y no sexuales, sobre la respuesta inmunológica -
del humano in vitro, mostraron inicialmente que todos ellos -
inhiben la transformación blástica inducida por mitógenos o en
cultivo mixto, de manera similar. Sin embargo, los resultados
de este trabajo con respecto al efecto de los andrógenos y en
comparación con otros reportes sobre el efecto del estradiol,-
la progesterona y los glucocorticoides dejan en claro que los
esteroides ejercen sus efectos por mecanismos diferentes.

El estradiol (100 μM) inhibe la incorporación de timi-
dina tritiada y su remoción de los cultivos resulta en una re-
cuperación parcial de la capacidad para la respuesta mitogéni-
ca, mientras que su adición tardía resulta en una supresión --
significativa de la transformación blástica. El estradiol redu-
ce el cociente $\text{Inc}^3\text{H-T}/\text{índice de marcaje}$, lo que se ha inter--
pretado como factor de influencia ya sobre la actividad especí-
fica de las pozas de timidina, ya sobre la velocidad de replica-
ción o bien sobre ambas (61).

Por su parte, la progesterona suprime la incorporación
de $^3\text{H-T}$ y la síntesis de DNA cuando se añade a un cultivo esti-
mulado con mitógeno o a un cultivo mixto alogénico durante to-
do el período de incubación. Se ha visto que los efectos de la
progesterona son reversibles y que bloquean la toma de timidi-

na extracelular, lo cual se ha interpretado como indicativo de un efecto generalizado sobre la membrana del linfocito que puede estar relacionado con la capacidad de inhibir el proceso inicial de activación de la célula histoincompatible que participa in vivo en las respuestas inmunes mediadas por células (63).

Esto se ha tomado como un posible modelo para el estudio de la interacción de las células maternas con las fetales, durante el embarazo. Tanto el feto como la placenta se encuentran expuestos a concentraciones altas de progesterona, comparadas con las que existen en sangre periférica. Es posible -- que los linfocitos pasen a través de la placenta y no se activen al entrar en contacto con el trofoblasto, que es antigénicamente extraño, debido a los altos niveles de progesterona que se generan del propio trofoblasto y por otro lado la reactividad de los linfocitos en la circulación materna no se veía - afectada por los bajos niveles de progesterona presentes. Una supresión localizada de la progesterona sobre las respuestas - inflamatorias o inmunes mediadas por células permitirían al -- sistema inmune materno permanecer intacto y funcionando adecuadamente, al proporcionar un sitio protegido para el desarrollo del feto.

Los resultados obtenidos en relación a la inmunosupresión inducida por glucocorticoides, muestran que está mediada por receptores específicos para esteroides. Los glucocorticoides, al entrar en contacto con linfocitos de timo de ratón o de sangre periférica de humanos, forman inmediatamente comple-

jos hormona-receptor. La estimulación mitogénica o antigénica, en un lapso de 24 horas, conduce a un incremento en el número de receptores por célula. Este incremento se cree que refleja las variaciones en las fases del ciclo celular y que se debe parcialmente a la sincronización de la poza de células en una fase particular del ciclo celular en la que existe un alto contenido de receptores. Los complejos hormona-receptor citoplásmicos se unen al núcleo donde se induce la síntesis de RNAm para la síntesis de proteínas específicas, que rápidamente inhiben el transporte de glucosa y la incorporación de acetato en lípidos. Más lentamente se inhibe el metabolismo de DNA, RNA y proteína -- cuantificado por la incorporación de nucleótidos radioactivos. Concentraciones farmacológicas de dexametasona inhiben la producción de factor de crecimiento y la proliferación celular T. A diferencia de lo que sucede con los andrógenos, la suplementación de factor de crecimiento resulta en una completa restauración de la proliferación normal. El efecto se ejerce a través de receptores específicos y resulta en un bloqueo de la expansión clonal, necesaria para la amplificación de la respuesta. - (97).

Cualquiera que sea el mecanismo por medio del cual las hormonas sexuales ejercen sus efectos, un mecanismo fisiológico debería involucrar un receptor de hormona sexual. En animales ya se han encontrado receptores de hormonas sexuales en células de tejidos linfoides. Por el método de autorradiografía se ha demostrado unión tanto de estrógenos como de andrógenos a las -

células de la Bursa de Fabricio (50). Las hormonas aparecen en mayores concentraciones en el componente epitelial de la bursa, más que en el componente linfoide. Además, existen reportes de receptores de superficie para hormonas sexuales en linfocitos de timo de rata (98) y también se ha demostrado -- que los timos de ratones de cepas normales tienen receptores específicos para 5α -DHT (99), mismos que se encuentran probablemente en el epitelio tímico, el componente endócrino del timo. Los esteroides sexuales podrían actuar a nivel del epitelio tímico y tener influencia sobre la actividad del linfocito, creando un circuito endócrino entre productos gonadales y la producción de hormonas tímicas.

En humanos, no se ha considerado la existencia plausible de receptores de hormonas sexuales en células linfoides -- como un posible mecanismo por medio del cual sean mediados -- sus efectos. En favor de la posibilidad de que los linfocitos podrían responder a los andrógenos vía un mecanismo mediado -- por un receptor, está la evidencia preliminar encontrada en un paciente con Síndrome de Feminización Testicular; paciente a -- quien previamente se le había demostrado la ausencia total de receptores para 5α -DHT en fibroblastos de epitelio genital -- (100) y que no presentó la inhibición de la respuesta prolifera -- tiva en respuesta a mitógenos, de linfocitos expuestos a la hormona, desde la concentración de $0.001 \mu\text{g/ml}$ hasta la de -- $10 \mu\text{g/ml}$, como se observó en individuos normales. Estos resultados apoyan la posibilidad de que la acción inhibitoria de --

los andrógenos sobre los linfocitos humanos normales, en estas concentraciones pudiera ser mediada a través de un receptor de andrógenos.

Además existe un único reporte preliminar que indica la presencia de receptores de andrógenos en linfocitos de sangre periférica (101). El análisis de Scatchard de la unión de ^3H -DHT al citosol demostró un tipo de unión saturable y de alta afinidad con una K_d de $3.4 \pm 1.6 \times 10^9$ y una capacidad máxima de unión de 378 ± 110 sitios/célula.

La importancia que pudiera tener un receptor de andrógenos en linfocitos humanos no es clara, ya que no se ha estudiado su relación con los diferentes estadios fisiológicos. Sin embargo, la trascendencia de los receptores de hormonas sexuales en células linfoides es enorme y éstos deben ser investigados para llegar a una mejor comprensión de las interacciones entre el sistema endócrino y el inmunológico.

Los conocimientos en relación al efecto inmunosupresor e inmunopotenciador de los andrógenos, estrógenos y progestágenos sobre la respuesta inmune pueden aún tener mayor importancia si se toma en cuenta que existen enzimas encargadas de metabolizar hormonas sexuales, en células linfoides, tanto de animales como de humanos, que pueden jugar un papel importante en los mecanismos de regulación del sistema inmunológico.

En el ratón se han reportado actividades enzimáticas

relacionadas con el metabolismo de esteroides sexuales como la de 5 α -reductasa, que reduce progesterona a su derivado 5 α -pregnane-3, 20 diona (60). Hallazgos recientes sugieren que en el cobayo, los macrófagos peritoneales pueden ser un sitio de conversión extraglandular de androstendiona en andrógenos potentes (102).

Recientemente se demostró la presencia de la enzima 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (20 α -SDH) en linfocitos, que reduce la progesterona a 20 α -hidroxipreg-4-en-3-ona (60). La especificidad de la expresión de la 20 α -SDH se ha inferido por una variedad de experimentos in vivo e in vitro. La actividad se detecta en una variedad de tejidos linfoides. En el bazo y en los nódulos linfáticos, la actividad se asocia a la población de linfocitos T, Thy 1⁺, y en el timo, con la población tímica medular hidrocortisona-resistente Thy 1⁺. La actividad de la 20 α -SDH también se encuentra en linfocitos de médula ósea. En otros tejidos linfoides, sin embargo, la actividad se encuentra asociada con el linfoblasto Thy 1⁻.

Los ratones atímicos tienen niveles reducidos de 20 α -SDH en el bazo. En los ratones nu/nu o timentomizados, la actividad se encuentra en la médula ósea.

En el medio de cultivo de células T activadas con mitógeno o aloantígeno existe un factor soluble que induce la actividad de la 20 α -SDH, cuya actividad es funcionalmente diferente a la de otras linfocinas, por lo que se le propuso el nombre de interleukina-3 (IL-3). Los resultados sugieren que la 20 α -SDH es inducida de novo en una población respondedora y

que no se debe a una amplificación de una población 20α -SDH positiva. La IL-3 es capaz de inducir la proliferación de -- linfocitos esplénicos. La IL-3, en condiciones apropiadas de cultivo, puede promover el establecimiento de células T tipo-cooperadoras y promueve la diferenciación de células Thy 1^+ y de las células respondedoras de IL-2 a partir de cultivos ini-- cialmente Thy 1^- y posiblemente promueve el crecimiento de -- células cebadas/basófilos.

La pregunta esencial sobre el papel de la IL-3 in vi-- vo es la de su relación con la 20α -SDH y con la diferenciación de linfocitos. Dentro de una gran variedad de líneas celula-- res que tienen características y/o fenotipos funcionales defi-- nidos, solamente tres tipos expresan 20α -SDH. Los macrófa-- gos, las células B, las líneas eritroides y los granulocitos maduros son 20α -SDH negativas. Las líneas tipo cooperadoras Thy 1^+ , Lyt 1^+ , 2^- y las citotóxicas Thy 1^+ , Lyt 1^- , 2^+ son 20α -SDH positivas. Las líneas clonadas con propiedades de - basófilos/célula cebada son 20α -SDH positivas. Las células - NK (Thy 1^+) comparten muchas propiedades de los basófilos o de las células cebadas. La ausencia de 20α -SDH en ratones atí-- micos sugiere que las líneas asociadas con la diferenciación de la célula T primariamente expresan 20α -SDH, ya que otras líneas hematopoyéticas sí se diferencian normalmente en es-- tos ratones. Además, la 20α -SDH no se encuentra en el híga-- do fetal que es el sitio primario de diferenciación de la lí-- nea eritroide y mieloide. Por todas estas razones parece ---

ser que la $20\ \alpha$ -SDH es un marcador específico de células T, - que los tipos celulares funcionales que la expresan derivan - de una línea común, definida por la $20\ \alpha$ -SDH, y que probable- mente es también un marcador de la diferenciación de la célu- la cebada/basófilo (103).

El conocimiento sobre la diferenciación de los linfo- citos es limitado, pero el concepto de la $20\ \alpha$ -SDH, junto con el concepto de IL-3 como linfoquina única que regula la pro- liferación y diferenciación de ciertas poblaciones celulares, pueden colaborar para la comprensión de estos aspectos.

Los linfocitos humanos son también sitios potencia- les de metabolismo periférico de esteroides y de hormonas - sexuales. Se ha demostrado la existencia de actividad de -- $20\ \alpha$ y $20\ \beta$ -hidroxiesteroide- oxidorreductasa y de actividad de $5\ \alpha$ -reductasa inferidas por metabolismo de cortisol a -- 11β , 17 , $20\ \alpha$, 21-tetrahidroxi-4-pregnen-3-ona; 11β , 17 , - 20β , 21-tetrahidroxi-4-pregnen-3-ona y de $3\ \alpha$ 11β , 17 , 21- tetrahidroxi- $5\ \beta$ -pregnan-20-ona. (104). También se ha de- mostrado actividad de $7\ \alpha$ hidroxilasa por la conversión de -- dehidroepiandrosterona a $7\ \alpha$ -hidroxidehidro-epiandroste- rona en linfocitos humanos (105). Además se ha encontrado un sistema inducible de $16\ \alpha$ -hidroxilasa que convierte el $17=\beta$ estradiol a estriol (106, 107).

La androstendiona es una prohormona circulante en el humano, y se metaboliza en tejidos extraglandulares hacia --

estróna y testosterona (108, 109). Los linfocitos son un sitio de conversión de androstendiona a esteroides potentes en el humano (110). La incubación de androstendiona tritriada -- con linfocitos humanos de sangre periférica ha permitido inferir la presencia de las siguientes enzimas: 1) 17β -hidroxisteroide oxidoreductasa expresada en la formación de testosterona y 5α -dihidrotestosterona a partir de androstendiona; --- 2) 5α -reductasa que metaboliza la androstendiona a 5α -androstan-3, 17-diona, 5α -dihidrotestosterona, androsterona e -- isoandrosterona; 3) 3α -hidroxisteroide oxidoreductasa que forma, a partir de androstendiona, androsterona; 4) 3β -hidroxiesteroide oxidoreductasa que metaboliza la androstendiona - a isoandrosterona.

No se conoce la trascendencia que puede tener el hecho de que existan enzimas metabolizadoras de andrógenos en linfocitos humanos; sin embargo, su reciente descubrimiento le da mayor relevancia a los resultados de este trabajo, ya que éstas pueden jugar un papel en la regulación del sistema inmunológico a través de la formación in situ de andrógenos potentes-como la testosterona y la 5α -dihidrotestosterona- por reducción de androstendiona circulante. Esta conversión es de suprema importancia no solamente por ser una fuente de hormonas biológicamente activas, sino también porque estos a su vez ejercen efectos fisiológicos dentro de las células -- donde son formadas; además de que representa una manera de - afectar las funciones linfocitarias. Sería interesante que

se llevaron a cabo estudios sobre las enzimas involucradas en metabolizar hormonas sexuales y su contribución en el complejo mecanismo regulatorio que opera en la respuesta inmune, así como que se investigaran en condiciones donde podrían encontrarse alteradas, en ciertas enfermedades como las autoinmunes.

Recientemente ha adquirido una gran importancia el papel que juegan las hormonas sexuales en los mecanismos regulatorios que involucran la producción y utilización de los moduladores tipo hormona (interleukinas) y de las hormonas tíficas, en relación con la autoinmunidad. En todas las cepas autoinmunes de ratones NZB/NZW híbridos MRL - lpr , C57B16 (11,112) se ha encontrado una deficiencia de IL-2. En dos cepas de ratones, la presencia del gene lpr resulta tanto en una deficiencia de IL-2 como en síndrome lúpico (113). Existe evidencia preliminar que los andrógenos mantienen la actividad de IL-2 en lupus murino (114). Un enfoque endocrinológico puede proporcionar claridad sobre nuevas posibilidades diagnósticas y terapéuticas para enfrentarse con las enfermedades autoinmunes.

Además, Dosch y Shore (115) han postulado la hipótesis de que la producción y respuesta a interleukina-2 por las células T se encuentra alterada en las enfermedades autoinmunes en el hombre. En el departamento se ha publicado evidencia de una disminución de la producción de y de la respuesta a IL-2 de células T activadas de pacientes con LEG. (116). Se sabe que la IL-2 mantiene la proliferación de la célula T bajo estímulo mitógeno (117), así como la respuesta en cultivo mixto -

autólogo (118). También contribuye a la generación de citotoxicidad natural (95) y a la abolición de la función supresora inducida por Con-A (119). Puede también contribuir a la promoción de la función cooperadora inducida por Con-A (120), y a la maduración de las células precursoras postmíticas (121). Todas estas funciones se han encontrado alteradas en LEG. También se ha reportado por parte del laboratorio que existe un defecto cualitativo y cuantitativo en las células precursoras postmíticas en el LEG y que éste puede ser corregido parcialmente por el factor tímico sérico (123).

También se cuenta con los hallazgos del departamento en relación a la producción y respuesta a IL-2 por células T de sangre periférica de pacientes con varias enfermedades del tejido conjuntivo (122) incluyendo la Esclerosis Generalizada Progresiva, la Artritis Reumatoide, la Enfermedad Mixta del Tejido Conjuntivo, el Síndrome de Sjogren y la Dermatopolimiositis que apoyan, junto con los estudios de los circuitos inmunorregulatorios realizados en el departamento, la teoría de que la autoinmunidad sucede por alteraciones particulares de cada enfermedad. Estos estudios, además, correlacionan bien con los de las células precursoras postmíticas (123, 124, 125) así como con su papel en la producción de IL-2 (126).

En suma, nuestro conocimiento presente sobre los sitios de interacción de las hormonas sexuales sobre la respuesta inmune es muy limitado. Existen muchos sitios sobre los cuales los esteroides sexuales pueden actuar sobre las respuestas ce-

lulares , así como sobre las humorales. Las hormonas sexuales podrían actuar sobre el timo, otros tejidos linfoides y sobre las células circulantes. En la interacción seguramente juegan un papel muy importante los receptores específicos y las enzimas metabolizadoras de hormonas sexuales que probablemente contribuyen a la inmunorregulación modificando la síntesis de otras hormonas -como las tímicas- y la producción de factores de crecimiento que influyan en la proliferación o diferenciación de poblaciones particulares de linfocitos y en sus funciones especializadas.

En vista de que se han realizado un número muy reducido de estudios en relación al efecto de las hormonas sexuales en la respuesta inmune en humanos, espero que este trabajo preliminar renueve el interés en la nueva área de la inmunoendocrinología. La inmunología y la endocrinología han alcanzado el nivel de madurez necesario para el estudio de sus interacciones bidireccionales, tanto en la regulación de la homeostasis, como en las alteraciones que suceden en la enfermedad. La inmunoendocrinología proveerá también nuevos enfoques en la fisiopatología y la terapéutica en relación al tratamiento de las enfermedades autoinmunes.

BIBLIOGRAFIA

1. Palacios, R., Alarcón Segovia, D., Llorente, L., Ruiz Argue--
lles, A., Díaz Jouanen, E.: Human posthymic precursor cells -
in health and disease. I. Characterization of the autologous
rosette-forming T cells as posthymic precursors. *Immunology* 42:
127, 1981.
2. Palacios, R., Llorente, L., Alarcón Segovia, D.: Autologous --
rosette forming cells as the responding cells in human --
autologous mixed lymphocyte reaction. *J. Clin. Invest.* 65:1527,
1980.
3. Calzolari, A.: Recherches experimentales sur un rapport proba-
ble entre la fonction du thymus et celles des testicules. *Arch.*
Ital. Biol. Torino 30:71, 1898.
4. Brouha, L., Collin, R.: Equilibre hormonal et gravidite. *Ann.*
Physicochem. Biol. 11:773, 1935.
5. Nishizuka, Y., Sakakura, T.: Thymus and reproductive sex-linked
dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. --
Science 166:753, 1969.
6. Shire, J.G.M., Pantelouris, E.M.: Comparison of endocrine func-
tion in normal and genetically athymic mice. *J. Coomp. Biochem.*
Physiol. 47A:93, 1974.
7. Miller, E. M., Chatten, J.: Ovarian changes in ataxia telange-
ctasia. *Acta Med. Scand.* 56:559, 1967.
8. Butterwoth, M., McClellan, B., Allansmith, M.: Influence of --
sex on immunoglobulin levels. *Nature* 214:1244, 1967.
9. Stoop, J.W., Zegers, B.J.M., Sander, P.C., Ballieux, R.E.: --
Serum immunoglobulin levels in healthy children and adults. -
Clin. Exp. Immunol. 4:101, 1969.
10. Buckley, C.E., III Dorsey, F.C.: Serum immunoglobulin levels
throughout the life-span of healthy man. *Ann. Intern. Med.* 75:
673, 1971.
11. Lichtman, M.A., Vaughan, J.H., Hones, C.G.: The distribution of
serum immunoglobulins, anti-G globulins (rheumatoid factors) -
and antinuclear antibodies in white and negro subjects in --
Evans County. Georgia. *Arthritis Rheum.* 10:204, 1967.
12. Karayalcen, G., Rosner, F., Sawitzky, A.: Quantitative serum -
immunoglobulins in healthy negroes. *N.Y. State. J. Med.* 73:751,
1973.

13. Washburn, T.C., Medearis, D.N., Childs, B.: Sex differences - in susceptibility to infections. *Pediatrics* 35:57,1965.
14. Goble, F.C., Konopka, E.A.: Sex as a factor in infectious -- disease. *Trans. N.Y.Acad. Sci.* 35:325,1971.
15. Ainbender, E., Berger Weisinger, R., Hevazy, M., Hodes, H.I.: Difference in the immunoglobulin class of poliantibody in the serum of men and women. *J. Immunol.* 101:92,1968.
16. Michaels, R.H., Rogers, K.D.: A sex difference in immunologic responsiveness. *Pediatrics* 47:120,1971.
17. Eidinger, D., Garret, T.J.: Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell -- differentiation. *J.Exp. Med.* 136:1098,1972.
18. Fabris, N., Piantonelli, L., Muzzioli, M.: Differentiated -- effect of pregnancy or gestagen on humoral and cell mediated immunity. *Clin. Exp. Immunol.* 28:306,1977.
19. Burrells, G., Wells, P.W., Sutherland, A.D.: Reactivity of -- ovine lymphocytes to phytohemagglutinin and pokeweed mitogen -- during pregnancy and in the immediate post-parturient period. *Clin. Exp. Immunol.* 33:410,1978.
20. Strelkauskas, A.K., Davies, I.J., Dray, S.: Longitudinal -- studies showing alterations in the levels and functional -- response of T and B lymphocytes in human pregnancy. *Clin.Exp. Immunol.* 32:531,1978.
21. Amino, N., Tanizawa, O., Miyai, K., Taraka, F., Hayashi, C. - Kawashima, M., Ichihara, K.: Changes of serum immunoglobulins IgG, IgA, IgM, IgE during pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 52:415, 1978.
22. Krzych, U., Strausser, H. R., Dreasler, J.P., Goldstein, A.L.: Quantitative differences in the immune responses during various stages of the estrous cycle in female Balb/C mice. *J.Immunol.* 121:1603,1978.
23. Castro,E.J.: Orchidectomy of the immune response. I. Effect of orchidectomy on lymphoid tissues in mice. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 185:425,1974.
24. Stern, K., Davidson, I.: Effect of estrogen and cortisone on - immune hemoantibodies in mice and inbred strains. *J.Immunol.* 74:479,1955.
25. Feigen, G.A., Fraser, R.G., Peterson, N.S.: Sex hormones and the immune response. II. Perturbation of antibody production - by stradiol-17. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 57:488,1978.

26. Wheeler, D., Hurst, E.W.: The effect of sex on bacterial infections in mice and on chemotherapy of one of them. *J. Pathol. Bacteriol.* 82:117,1961.
27. Nicol, T., Bilbey, D.L.J., Charles, L.M., Cordingley, J. L., - Roberts, B.V.J.: Oestrogen: the natural stimulant of body -- defense. *J. Endocrinol.* 30:277,1964.
28. Kenny, J.F., Pangburn, P.C., Trail, G.: Effect of estradiol on immune competence: in vivo and in vitro studies. *Infect. Imm.* 13:448,1976.
29. Oettgen, H.F., Binaghi, R.A, Benacerraf, B.: The effect of -- various hormones of the serum level of anaphylactic antibody in the rat. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 29:131,1966.
30. Toivanen, P.: Effect of estrogens on the humoral antibody -- response in guinea pigs. *Ann. Med. Exp. Immunol.* 45:152,1967.
31. Sijevic, V.S., Warr, G.M.: Activity of the reticuloendothelial system and the antibody response. III. The fate of type III - pneumococcal polysaccharide and the antibody response. *Immunology* 27:1009,1974.
32. Reilly, R.W., Thompson, J.S., Bielski, R.K., Severson, C.D.: Estradiol induced wasting syndrome in neonatal mice. *J. Immunol.* 98:321,1967.
33. Batchelor, J.R.,: Hormonal control of antibody formation. --- Regulation of the antibody response. Edited by B. Vinader. -- Springfield, Charles C. Thomas, pp. 276,1968.
34. Thompson, J.S., Crawford, M.K., Reilly, R.W., Severson, C.D.: The effect of estrogenic hormones on immune responses in normal and irradiated mice. *J. Immunol.* 98:331,1967.
35. Killas, C., Henry, L.: Effect of sex hormones on the immune - system of guinea pigs and on the development of toxoplasmic -- lesions in non-lymphoid organs. *Clin. Exp. Immunol.* 36:16,1979.
36. Mueller, M.N., Kappas, A.: Estrogen pharmacology II. Suppression of experimental immune poly arthritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. - Med.* 117:845,1964.
37. Seaman, W.E., Blackman, N.A., Gendhart, P., Roubenean, J. R., Loeb, J.H., Talal, N.: Bestrandive reduces natural killer cells in mice. *J. Immunol.* 121:2193,1978.
38. Dougherty, T.F.: Effect of hormones on lymphatic tissue. *Physiol. Rev.* 32:379,1952.
39. Thompson, J.S., Reilly, R.W., Russe, H.P., Kappas, A.: Effect -

- of estradiol on bone marrow transplantation in lethally -- irradiated mice. *Nature* 265, 1964.
40. Fried, W., Tickler, T., Dennenberg, I., Barone, J., Wang, F.: Effects of estrogens on hematopoietic stem cells and hematopoiesis of mice. *J. Lab. Clin. Med.* 83:807, 1974.
 41. Jenkins, V. K., Upton, A. C., Odell, T.T. Jr.: Effect of estradiol on splenic hematopoietic cells in irradiated mice. *J. Cell. Physiol.* 73:149,1969.
 42. Kappas, A., Jone, H.E.J., Roitt, I.M.: Effects of steroid sex hormones on immunological phenomena. *Nature* 198:902,1963.
 43. Healy, J.W., Neeman, S.: Hemolysin response of rats treated -- neonatally with steroids. *Endocrinology* 80:762,1976.
 44. Fiju, H., Nawa, Y., Tsuchuya, H., Malsono, K., Fukumoto, T., Fokuda, S., Kotani, M.: Effects of single administration of -- testosterone on the immune response and lymphoid tissues in -- mice. *Cellular Immunol.* 20:315,1975.
 45. Mueller, A.P., Wolfe, H.R., Meyer, R.K.: Precipitin production in chickens. XXI. Antibody production in bursectomized chickens and in chickens injected with 19-nortestosterone on the fifth -- day of incubation. *J. Immunol.* 85: 172,1960.
 46. Warner, N.L., Szenberg, A., Burnet, F.M.: The immunological role of different lymphoid organs in the chicken. I. Dissociation of immunological responsiveness. *Aust. J. Biol. Exp. Med. Sci.* 40: 373, 1962.
 47. Warnerm N. L., Uhr, J. W., Thorbecke, J., Ovary, Z.: Immunoglobulins antibodies and the bursa of Fabricius. Induction of -- aggamaglobulinemia and the loss of antibody forming capacity by hormonal bursectomy. *J. Immunol.* 103:1317,1969.
 48. Meyer, R. K., Rao, M.A., Aspinall, R. L.: Inhibition of the -- development of the bursa of Fabricius in the embryos of the -- common fowl by 19 nortestosterone. *Endocrinology* 64:890,1959.
 49. Moore, M.A.S., Owen, J.T.T.: Experimental studies on the --- development of the bursa of Fabricius. *Dev. Biol.* 14:40,1966.
 50. Gasc, J.M., Sor, M., Stumpf, W.E.: Androgen target cells in the bursa of Fabricius of the chick embryo. Autoradiographic -- localization. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 160:55,1979.
 51. Shahidi, N.T.: Androgen therapy in children with aplastic anemia. *Aplastic Anemia. Proceedings of the First International --- Symposium on aplastic anemia, held in Kyoto. Edited by Shibino, Takaku, F., Shahidi, N.T., Baltimore, University Park Press, -- pp. 409, 1978.*

52. Jepson, J.H., Leonard, R.A., Gorshein, D., Gardner, F.H., - Besa, E.: Review of the induction of cycling erythropoietin sensitive cells by androgens and their 5 H-metabolites. *Bio-medicine* 20:262,1974.
53. Udupa, K.B., Reissmann, K. R.: Acceleration of granulopoietic recovery by androgenic steroids in mice made neutropenic by cytotoxic drugs. *Cancer Res.* 34:2517,1974.
54. Rosenblum, A. L., Carbone, P.P.: Androgenic hormones and human granulopoiesis in vitro. *Blood* 43:351,1974.
55. Byron, J.W.: Effect of steroids on the cycling hemopoietic -- stem cells. *Nature* 228:1204,1970.
56. Byron, J.W.: Manipulation of the cell cycle of the hemopoietic stem cell. *Exp. Hematol.* 3:44,1975.
57. Byron, J.W.: Analysis of receptor mechanisms involved in the - hemopoietic effects of androgens: use of the Tfm mutant. *Exp. Hematol.* 5:429,1977.
58. Frey-Wettstein, Craddock, C.G.: Testosterone induced depletion of thymus and marrow lymphocytes as related to lymphopoiesis - and hematopoiesis. *Blood* 35:257, 1970.
59. Cohn, D.A.: High sensitivity to androgen as a contributing -- factor in sex differences in the immune response. *Arthritis -- and Rheum.* 22:1218,1979.
60. Weinstein, Y., Lindner, H.R., Eckstein, B.: Thymus metabolizes progesterone. Possible enzymatic marker for T lymphocytes. -- *Nature* 266:632,1977.
61. Mendelsohn, J., Multer, M.M., Bernheim, J.L.: Inhibition of -- human lymphocyte stimulation by steroid hormones: cytokinetic mechanisms. *Clin. Exp. Immunol.* 27:407,1977.
62. Wyle, F.A., Kent, J.R.: Immunosuppression by sex steroid --- hormones. I. The effect of PHA and PPD stimulated lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 27:407,1977.
63. Clemens, L.E., Siiteri, P.K., Stites, D.P.: Mechanism of -- immunosuppression of progesterone on maternal lymphocyte -- activation during pregnancy. *J. Immunol.* 122:1978, 1979.
64. Paavonen, T., Andersson, C. L., Adlercreutz, H.: Sex hormone - regulation of in vitro immune response. *J. Exp. Med.* 154:1935, 1981.
65. Holdstock, G., Bette, F., Chastenay, Krawitt, E.L.: Effects of testosterone, estradiol and progesterone on immune regulation. *Clin. Exp. Immunol.* 47:499, 1982.

66. Talal, N., Steinberg, A.D.: Pathogenesis of autoimmunity in - New Zealand. Black Mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 64:79, 1979.
67. Lambert, P.H., Dixon, F. J.: Pathogenesis of the glomerulone--phritis of NZB/NZW mice. *J. Exp. Med.* 127:507, 1968.
68. Talal, N.: Disordered immunologic regulation and autoimmunity. *Transplant. Rev.* 31: 240, 1976.
69. Fernández, G., Yunis, E.J., Good, R.A.: Age and genetic --- influence on immunity in NZB and autoimmune-resistant mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 6:318, 1976.
70. Papoian, R., Pillarisetty, R., Talal, N.: Immunologic regulation of spontaneous antibodies to DNA and RNA. II. Sequential switch from IgM to IgG in NZB/NZW F1 mice. *Immunology* 32:75,1977.
71. Roubinian, J.R., Papoian,R., Talal, N.: Androgenic hormones -- modulate autoantibody responses and improve survival in murine lupus. *J. Clin. Invest.* 59:1066,1977.
72. Milez, K.A., Boegen, W.A., Steinberg, A.D.: Therapeutics studies in New Zealand mice.VII. Successfull androgen treatment of NZB/ NZW F1 females of different ages. *Arthritis Rheum.* 23:41,1980.
73. Raveche, E., Klassen, L.W., Steinberg, A.D.: Sex difference in formation of anti-T cell antibodies. *Nature* 263:415,1976.
74. Weinstein, Y., Berkovich, Z.: Testosterone effect on bone marrow, thymus, and suppressor T cells in the NZB/NZW F1. Its relevance to autoimmunity. *J. Immunol.* 126:998,1981.
75. Masi, A.T., Kaslow, R.A.: Sex effects in systemic lupus erythe--matusus. *Arthritis Rheum.* 21: 480, 1978.
76. Frajman, M., Díaz-jouanen, E., Alcocer-Varela, J., Fishbein,E., Guevara, M., Alarcón-Segovia, D.: Effect of pregnancy on --- circulating T cells from patients with systemic lupus erythema--tosis. Correction of T-cell suppression and autologous mixed -- lymphocyte responses. *Clinica Immunology and Immunopathology* 29, 1983.
77. Stern, R., Fishman, J., Brusman, H., Kunkel, H.G.: Systemic -- lupus erythematosus associated with Klinefelter's syndrome.
78. Yodum, W.M.,Grossman, J., Waterhouse, C., Abraham, N.G., Allyn, G., Condemi, J.: Monozygotic twins discordant for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 18:1983,1975.
79. Lahita, R.G., Bradlow, H.L., Kunkel,G.H., Fishman, J.:Alterations of estrogen metabolism in SLE. *Arthritis Rheum.* 22:1195,1979.
80. Stahl, N., Decker, L.J.: Androgenic status of males with --

- systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheum.* 21:665,1978.
81. Lahita, R.O., Bradlow, L., Kunkel, H.O.: Testosterone oxidation in SLE. *Abstract Arth. Rheum.* 26 (Supl.) 570.
 82. *The Antigens. Vol. IV. Chapter 7.* Edited by Michael Sela. -- Academic Press. Inc. New York, San Francisco, London, 1977.
 83. Farrar, J.F., Benjamín, R.W., Hilfcher, L.M., Howerd, M., Farrar, L.W., Fuller-Farrar, J.: Interleukins and Lymphocyte -- activation. *Immunological Review* 63:129, 1982.
 84. Lepecq, Paoletti, C.A.: Fluorescent complex between ethidium-- bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 27:87.
 85. Darzynkiewics, Z., Traganos, F., Sharpless, T., Melamed, M.R.: Interphase and metaphase chromatin: different stainability of DNA with acridine orange after treatment with low pH. *Exp. -- Cell. Res.* 100: 201, 1977.
 86. Melamed, M.R., Kamentsky, L.A.: Automated cytology. *Int. Rev. Esp. Pathol.* 14:205.
 87. Bonnard, G.D., Yasaka, K., Maca, R.D.: Continued growth of -- functional human T cell growth factor. *Cell Immunol.* 51:390,1980.
 88. Coulson, B.P., Thornlhwarte, T.J., Shafor, F.D. and Seaver, S. S.: Modulation of glucocorticoid hormone receptor levels in -- chicken lymphoid tissue following treatment with androgens in vivo. *J. Steroid. Biochem.* 17:1,1982.
 89. Smith, K.A., Gilles, S., Baker, P.E., McKenzie, D., Ruscetti, W.: C-cell growth factor mediated T-cell proliferation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 332:423,1979.
 90. Coutinho, A., Larsson, E.L., Grovvik, K.O., Andersson, J.: -- Studies on lymphocyte activation. II. Targets cells for conca- navalin-A induced growth factors. *Eur. J. Immunol.* 9:587,1979.
 91. Bonnard, G.D., Yasaka, , Jacobson, D.: Ligand-activated T-cell growth factor-induced proliferation: absorption of T-cell -- growth factor by activated T-cells. *J. Immunol.* 123:2704,1979.
 92. Larsson, E.L.: Mechanism of T-cell activation. II. Antigen and lectin dependent acquisition of responsiveness to TCGF is a -- nonmitogenic active response of resting T-cells. *J. Immunol.* 126: 1323,1981.
 93. Smith, K.A.: T-cell growth factor. *Immunol. Rev.* 51:337,1980.
 94. Smith, A., Baker, P.E., Gillis, S., Ruscetti, F.W.: Functional -- and molecular characteristics of T-cell growth factor. *Mol. -- Immunol.* 17:579,1980.

95. Palacios, R., Moller, G., Claesson, L., Peterson, P.A.: - HLA-Dr antigens induce proliferation and cytotoxicity of T cells against haptenated (TNP & FITC) self structures).
96. Palacios, R., Claesson, L., Moller, G., Peterson, P.A., - Moller, E.: Role of HLA-Dr antigens in the autologous -- mixed lymphocyte reaction. I. The heavy nonpolimorphic - chain renders resting T cells sensitive to interleukin-2 and both the heavy and the light polimorphic chains --- participate actively in the production of growth factor.
97. Gillis, S., Crabtree, G.R. and Smith, K.A.: Glucocorticoid induced inhibition of T-cell growth factor production. I. The effect of mitogen-induced lymphocyte proliferation. J. Immunol. 123:,1624,1979.
98. Grosman, C.J., Taylor, B.B., Sholiton, L.J.: Rat thymic - dihydrotestosterone receptor. Preparation, location and - physiochemical properties. Steroids. 34: 539, 1979.
99. Talal, N., Roubinian, J.R., Dauphines, M.J., Jones, L.A., Siiteri, P.K.: Effect of sex hormones on spontaneous auto-immune disease in NZB/NZW hybrid mice. Proceedings of the first International Congress of Immunopharmacology. (July/August 1980, Brighton, England). Edited by J.W. Hadden et al, London Academic Press.
100. Medina, M., Chávez, B., Pérez-Palacios, G.: Defective --- Androgen action at the cellular level in the androgen -- resistance syndromes. I. Differences between the complete and incomplete testicular feminization syndromes. J. Clin. Endocrinol & Met. 53: 1243, 1981.
101. Vigersky, R., Shohet, R., Rice, M., Cole, D., Light, J., -- Poplack, D.
102. Milewich, L., Chen, T.G., Lyons, C., Tucker, T., Uhr, W.J. Mac Donald, P.: Metabolism of androstenedione by guinea-pig peritoneal macrophages: synthesis of testosterone and 5 -reduced metabolites. J. Steroid Biochem. 17:61,1982.
103. Inhle, N.J., Rebar, L., Keller, J., Lee, J.C., Hapel, J.A.: Interleukina and lymphocyte activation. Interleukin 3: Possible roles in the regulation of lymphocyte differentiation and growth. Immunological Reviews 63: 1982.
104. Jenkins, J.S., Kemp, N.H.: Metabolism of cortisol by human leukemic cells. J. Clin. Endocrinol. Metab. 29:1217,1969.
105. Wynne, K., Kraft, N.: 7-Hydroxilation by dehydroespiandros-terone by a human lymphoblastoid cell line. J. Steroid -- Biochem. 9:1189,1978.
106. Muijsson, I.E., Coomes, M.L., Cantrell, E.T., Anderson, D.E.

- Busbee, D.L.: Induction of 16 α -hydroxylase in cultured -- human lymphocytes. *Biochem. Genetics* 13:501,1975.
107. Mason, W.L., Muijsson-Arnold I.E., McKenzie, M., Cantrell, E.T., Busbee, D.L.: Steroid hydroxylase induction in --- cultured lymphocytes, effects of menstrual cycle. *Steroids* 31:1,1978.
108. Edman, C.D., Aiman, E.J., Prter, J.C., MacDonald, P.C.: - Identification of estrogen product of extraglandular aroma tization of plasma androstendione. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130:439,1978.
109. Bardin, C.W., Lipsett, M.B.: Testosterone and androstendione blood production rates in normal women and women with -- idiopathic hirsutism of polycystic ovaries. *J. Clin. --- Invest.* 36:891, 1967.
110. Milewich, L., Whisenant, G.M., Sawyer, K.M.: Androstendio- ne metabolism by human lymphocytes. *J. Steroid. Biochem.* 81, 1981.
111. Wofsy, D., Dauphinee, M.J., Kepper, S.B., Talal, N.: --- Deficient interleukin-2 activity in MRL/Mp-Lpr/lpr mice.
112. Wofsy, D., Murphy, E.D., Roths, J.B., Dauphinee, M.J., -- Kepper, S.B., Talal, N.: Deficient interleukin-2 activity in MRL/Mp and C57B1=1/6J mice bearing the l^{pr} gene. *J.Exp. Med.* 154:1671,1981.
113. Talal, N., Dauphinee, M.J., Wofsy, D., Kepper, S.B., Roths, J., Murphy, E.: Defective interleukin-2 activity on --- C57BL/6 mice bearing the gene l^{pr} for autoimmunity and lymphoproliferation. (Abstract). *Fed. Proc.* 40: 1059,1981.
114. Dauphinee, M.J., Kepper, S., Roths, K., Wofsy, D., Talal, N.: Androgen treatment of autoimmune NZB/W mice enhance - IL-2 production. *Arthritis Rheum.* 24 (Suppl): 564,1981.
115. Dosch, H. Shore, A.: Hypothesis: the role of interleukins in lymphoiesis; importance in autoimmune disease. *J. Rheumatol.* 9:353,1982.
116. Alcocer-Varela, J., Alarcón-Segovia, D.: Decreased production of an response to interleukin-2 by cultured lymphocytes -- from patients with systemic lupus erythematosus. *J.Clin. - Invest.* 69:1383,1982.
117. Paetkan, V., Shaw, J., Mills, G., Caplan, B.: Cellular -- origins and target of costimulator (IL-2). *Immunol. Rev.* 51:157, 1980.
118. Palacios, R., Moller, G.: T cella growth factor abrogates concanavalin-A induced supressor cell function. *J.Exp. Med.*

153:1360,1981.

119. Palacios, R., Claesson, L., Moller, G., Peterson, P.A., Moller, E.: Role of HLA-Dr antigens in autologous mixed lymphocyte reaction. The invariant heavy chain but not the polymorphic light chain renders T cells sensitive to interleukin-2 and participate actively in the production of the growth factor. Eur. J. Immunol, 1982.
120. Watson, J., Aarden, L., Shzw, J., Paetkan, V.: Molecular and quantitative analysis of helper T cell replacing factors on the induction of antigen-sensitive B and T lymphocytes. J. Immunol. 122:1633,1979.
121. Stutman, O., Lallime, E., Gillis, S., Miller, R.: Role of interleukin-2 in postthymic maturation of T cells. Behring Institute Millerlungen 67:95, 1980.
122. Alcocer-Varela, J., Laffon, A., Alarcón-Segovia, D.: Differences in the production of and/or response to interleukin-2 by lymphocytes from patients with the various connective tissue diseases. (Submitted for publication).
123. Palacios, R., Alarcón-Segovia, D., Llorente, L., et al: Human postthymic precursor cells in health and disease. II. Their loss and dysfunction in systemic lupus erythematosus and their partial correction with serum thymic factor. J.Clin. Lab. Immunol. 5:71-80, 1981.
124. Alarcón-Segovia, D., Palacios, R.: Human postthymic precursor cells in health and disease. IV. Abnormalities in immunoregulatory T cell circuits in mixed connective tissue disease. Arthritis Rheum. 24:1486-1494, 1981.
125. Alarcón-Segovia, D., Palacios, R., Ibáñez de Kasep, G.: Human precursor cells in health and disease. VII. Immunoregulatory circuits of the peripheral blood mononuclear cells from patients with Progressive Systemic Sclerosis. J. Clin. Lab. Immunol. 5:143-148, 1981.
126. Fishbein, E., Alcocer-Varela, J., Alarcón-Segovia, D.: Cellular basis of the production of and response to interleukin-2 in man: role of autologous rosette-forming T cell subsets defined with monoclonal antibodies. Immunol. (En prensa).