

N=58  
RES.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

INTERACCIONES INMUNOGONADALES EN  
RATONES SIN VESÍCULAS SEMINALES

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A :  
JULIO LUIS CASAS FRANCO

MEXICO, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.

## I N D I C E

---

**CAPITULOS.****PAGINAS.**

---

<b>I.-INTRODUCCION.</b>	<b>3.</b>
<b>II.-ANTECEDENTES.</b>	<b>4.</b>
<b>2.1.- Interacciones inmunogonadales.</b>	<b>4.</b>
<b>2.2.- Interacciones neuroendócrino.</b> <b>inmunológicas.</b>	<b>8.</b>
<b>2.3.- Mecanismos propuestos.</b>	<b>13.</b>
<b>2.4.- Actividad inmunosupresora del</b> <b>plasma seminal.</b>	<b>16.</b>
<b>III.-OBJETIVO E HIPOTESIS.</b>	<b>19.</b>
<b>IV.-DISEÑO EXPERIMENTAL.</b>	<b>20.</b>
<b>4.1.- Extirpación de las vesículas seminales.</b>	<b>21.</b>
<b>4.2.- Estudio de la respuesta</b> <b>linfoproliferativa</b>	<b>22.</b>

V.-MATERIAL Y METODOS.	23.
5.1.- Animales.	23.
5.2.- Cultivo de células y estimulación con mitógeno.	23
5.3.- Análisis estadístico.	26.
VI.-RESULTADOS.	26.
VII.-DISCUSION.	30.
VIII.-CONCLUSIONES.	35.
IX.-RESUMEN.	36.
X.-BIBLIOGRAFIA.	37.

## CAPITULO I. INTRODUCCION

---

La respuesta del sistema inmunitario puede ser modificada por una larga serie de factores, los cuales son tanto de origen endógeno como exógeno. Entre estos últimos se pueden mencionar la exposición a radiaciones, la inhalación de vapores que contienen ciertos metales, la administración de algunos medicamentos y la ingestión de agua o alimentos en cuya composición química se encuentran elementos o sustancias que pueden influir sobre la inmunocompetencia. Entre los principales factores endógenos se encuentran las citocinas, las hormonas, los neurotransmisores, los mediadores de la anafilaxis que derivan del ácido araquidónico y algunos productos liberados por células malignas. Existe además una gran cantidad de segundos mensajeros que se ocupan de llevar la señal, inmunoestimulante o inmunosupresora, desde la matriz extracelular al núcleo de los linfocitos. Cada uno de esos factores puede actuar por diferentes mecanismos y provocar distintos grados de alteración inmunológica que, fundamentalmente, depende de las variables tiempo y cantidad. Por lo general, los factores endógenos actúan como inmunomoduladores y tienen actividades biológicas que pueden ser sinérgicas o antagónicas.

La suma de estas acciones contribuye a mantener la homeostasis del sistema inmunitario.

Entre las sustancias inmunomoduladoras endógenas de naturaleza hormonal, se encuentran los glucocorticoides, la tiroglobulina, la prolactina y los esteroides sexuales.

En relación a la actividad inmunomoduladora de estos últimos, se puede decir que las interacciones inmunogonadales han sido estudiadas desde hace varias décadas porque se las ha considerado importantes para la fecundación y la evolución del embarazo, así como por su relación con la aparición de algunas enfermedades autoinmunitarias y con algunos cambios bioquímicos e inmunológicos característicos del envejecimiento.

En este trabajo se estudia si existe una relación entre la inmunidad celular de un grupo de ratones y la actividad de sus vesículas seminales, las cuales son glándulas de secreción externa anexas al aparato reproductor masculino de los mamíferos.

Las vesículas seminales no son glándulas endócrinas que liberan hormonas y, por lo tanto, hasta ahora no han sido incluidas en los esquemas convencionales para explicar las interacciones inmunogonadales.

Sin embargo, en los últimos años, en el Departamento de Biología de la Facultad de Química se han realizado varias investigaciones cuyos resultados sugieren que, en animales de laboratorio sometidos a ciertas condiciones experimentales, existe una franca relación entre la falta o la atrofia (envejecimiento) de las vesículas seminales y la capacidad de los ratones para producir anticuerpos.

El objetivo de este trabajo es estudiar si la falta de las vesículas seminales influye también sobre la capacidad que tienen los linfocitos de los ratones para proliferar, después de su estimulación in vitro con el mitógeno Concanavalina A.

## CAPITULO II. ANTECEDENTES.

---

### 2.1.-Interacciones inmunogonadales.

Son relativamente recientes trabajos que nos han permitido conocer como el sistema inmunitario, antes considerado prácticamente autónomo, es capaz de interrelacionarse con todos o casi todos los sistemas del organismo. Dentro de esta nueva concepción del sistema inmunitario, las interacciones inmunogonadales han merecido particular importancia. (1).

Históricamente, las funciones de los órganos reproductivos e inmunológicos han sido conocidas como actividades biológicas independientes. La primera relación entre estos dos sistemas fue informada en 1898 por Calzolari, según la referencia de Grossman (1), el cual observó que los conejos castrados antes de su madurez sexual, tenían la glándula timo más grande que la de los animales control.

Esta primera observación no pudo ser interpretada porque, para esa fecha, se desconocía que el timo formaba parte del sistema inmunitario.

En las décadas siguientes se fueron acumulando una evidencia considerable, resultado de numerosos estudios en animales de laboratorio, a favor de que los estrógenos y los andrógenos sí pueden influir sobre la respuesta del sistema inmunológico y , además, tienen una función muy importante en la regulación del mismo y en la diferenciación de sus componentes celulares.

Así por ejemplo, cuando los animales son inyectados con grandes cantidades de andrógenos o estrógenos, pueden presentar una atrofia del timo y de los órganos linfoides secundarios (2).

Aún no se conocen perfectamente todos los mecanismos que participan en las interacciones inmunogonadales. En este sentido, hasta ahora se han propuesto dos hipótesis. La primera sostiene que el control gonadal se ejerce directamente, a través de la información codificada en los cromosomas sexuales. La segunda propone que el control gonadal es indirecto, a través de las hormonas sexuales. Sea en una u otra forma, actualmente ya se ha demostrado que tanto los andrógenos como los estrógenos son moduladores de la respuesta inmunológica, ya que pueden provocar una estimulación y/o una inhibición de las principales actividades de los linfocitos (3).

Algunos estudios han demostrado que las hormonas gonadales regulan las interacciones entre las diferentes subpoblaciones de células del sistema inmunitario, promoviendo la maduración de los linfocitos T y B, incrementando la producción de anticuerpos o modulando la inmunidad celular (4). Numerosas observaciones clínicas y experimentales han comprobado que el sexo de los individuos influye significativamente sobre la frecuencia con la que se presentan ciertas patologías inmunológicas, particularmente en las enfermedades autoinmunitarias (5).

Las enfermedades autoinmunitarias son más frecuentes en las personas y animales de sexo femenino.



Diversos estudios han confirmado que la relación mujer : hombre se desvía significativamente hacia el sexo femenino, en el caso de la artritis reumatoide (3:1), el lupus eritematoso sistémico (10:1), el síndrome de Sjögren (9:1) y la tiroiditis de Hashimoto (9:1) (6).

Los resultados de algunos trabajos sugieren que las mujeres tienen una respuesta inmunológica más efectiva que la de los hombres, se ha observado que las mujeres presentan niveles más altos de IgG e IgM. De igual manera en el caso de los animales se ha observado que la respuesta humoral es más intensa en las hembras que en los machos (7).

Diferentes trabajos experimentales han mostrado que después de lesionar o extirpar las gónadas se presentan algunas alteraciones en la competencia inmunológica del animal. La influencia de las hormonas gonadales sobre el sistema inmune de los vertebrados ha sido estudiada particularmente en animales de sexo femenino. Los trabajos más extensos han investigado los ratones hembra con una predisposición genética a las enfermedades autoinmunes y a las alteraciones inmunológicas asociadas al embarazo y al envejecimiento (8).

El efecto modulador de los andrógenos y los estrógenos sobre la actividad inmunológica probablemente se debe a los receptores específicos para estas hormonas que existen sobre la membrana de las células linfoides. Los órganos linfoides más estudiados han sido el timo, los ganglios linfáticos y el bazo (9).

Las hormonas sexuales influyen sobre las funciones del timo, el cual es el órgano central del sistema inmunitario. Los estudios realizados hasta ahora establecen que el timo se encuentra controlado por los esteroides sexuales, los cuales pueden alterar la producción de las principales hormonas tímicas, en líneas generales se ha propuesto que los andrógenos aumentan y los estrógenos disminuyen la síntesis de las hormonas tímicas (10). A su vez, estas hormonas influyen sobre las respuestas, humoral y celular, del sistema inmunitario. De este modo, las hormonas gonadales tienen una actividad importante como moduladores de la respuesta inmunológica de los organismos vertebrados (11).

## 2.2.-Interacciones neuroendócrino-inmunológicas.

Tradicionalmente, el control de la respuesta inmunológica ha sido visto como el resultado de las interacciones entre una gran cantidad de células inmunocompetentes, las cuales expresan diferentes receptores y marcadores de membrana en la superficie y secretan numerosos factores de regulación conocidos como citocinas (12).

Se ha observado que los sistemas nervioso y endócrino también participan como moduladores de la respuesta inmunológica, entre otras acciones, los productos del sistema nervioso, neuropeptidos, somatostatina y los cambios celulares pueden influir sobre la maduración y el funcionamiento de los linfocitos T y B, así como sobre la producción de anticuerpos (13).

Lo anterior ha permitido proponer que los dos sistemas, nervioso y endócrino, son los que ejercen una inmunomodulación más activa y efectiva (14).

Los mecanismos por los cuales se presenta una inhibición o una estimulación neuroendocrinológica de la respuesta del sistema inmunitario no han sido completamente aclarados todavía. Una gran parte de la información acumulada en este sentido se apoya en las alteraciones inmunológicas observadas después de provocar lesiones o enfermedades del sistema neuroendócrino (15).

De acuerdo a los resultados obtenidos por diversos autores y tomando en cuenta el alto grado de versatilidad de las respuestas, tanto del sistema inmune como del sistema neuroendócrino, se puede sugerir que entre ellos existe una relación compleja que involucra diferentes tipos de células y estructuras capaces de emitir y recibir señales bidireccionalmente.

Hasta hace poco tiempo las principales interacciones entre los sistemas inmunitario y neuroendócrino, se relacionaban con la producción de las hormonas glucocorticoides en el curso de varias situaciones provocadas experimentalmente que representaban un stress para las personas o los animales de laboratorio.

Sin embargo, se ha demostrado que el sistema inmunitario puede presentar alteraciones en funciones debido a la interacción con numerosos productos sintetizados a diferentes niveles del eje hipotalámico -pituitario -gonadal (15). La mayoría de las células y los órganos que forman parte del sistema no escapan a la influencia neuroendócrina.

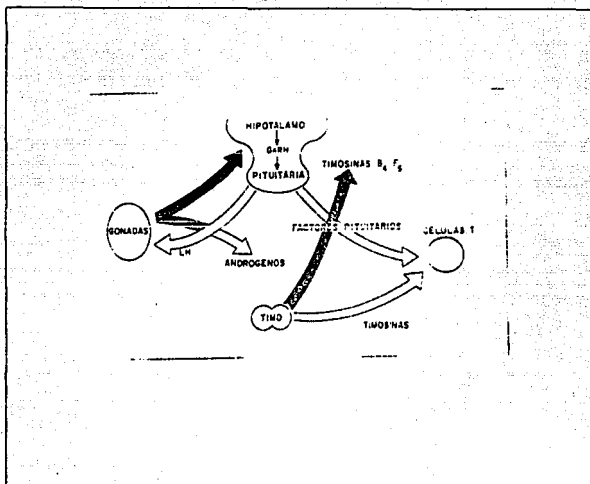


Fig.1 Esquema de las principales interacciones entre los sistemas inmunitario y endócrino.(26).

Por otro lado, tampoco el sistema endócrino se escapa a la influencia directa o indirecta de algunos productos del sistema inmunitario, como son las interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, la fracción S de la timosina y las timosinas  $\alpha_1$  y  $\beta_4$  (16).

Varias citocinas, como los IFN- $\alpha$  o  $\beta$  y las IL-1 e IL-6, pueden actuar directamente sobre el eje hipotalámico-pituitario. Sin embargo, ellos no son los únicos mediadores. (15) (figura No 1)

En esta relación bidireccional entre los sistema neuroendócrino e inmunológico también existen varios otros productos sintetizados por células del sistema neuroendócrino que representan señales de activación o son factores de regulación para la respuesta del sistema inmunitario. Tales son los casos de las hormonas peptídicas del crecimiento (GH), la prolactina (PRL), la hormona estimulante de corteza adrenal (ACTH) y la hormona estimulante del tiroides (TSH), que ayudan a mantener las relaciones existentes entre los dos sistemas (17) figura No 2.

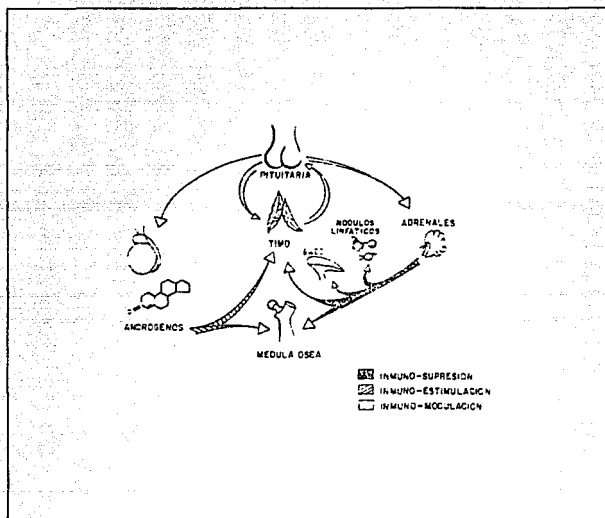


Fig.2. Esquema de las principales interacciones entre el sistema inmunitario y los productos de secreción del hipotálamo, la hipófisis y las gónadas. (1).

### 2.3.-Mecanismos propuestos.

La modulación del sistema inmunológico por el sistema gonadal se lleva a cabo mediante diversas interacciones, en las cuales pueden participar las diferentes hormonas sexuales, así como también las secreciones de las glándulas anexas al aparato reproductor masculino (18).

El esteroide sexual testosterona puede actuar a diferentes niveles del eje neuroendócrino-inmunológico, ya sea regulando la interacción de las gónadas con el hipotálamo y la pituitaria y con el sistema inmunitario, en donde actúa modificando principalmente el microambiente de la glándula tímica.

Por su parte, el plasma seminal contiene factores inmunosupresores que actúan a un nivel local, sobre la mucosa del aparato genital femenino, facilitando la reproducción ya que suprimen la sensibilización femenina por los antígenos del esperma (19).

Además, varios estudios recientes realizados sobre las vesículas seminales han demostrado que cuando faltan estas glándulas de secreción externa se produce una disminución en la producción de anticuerpos a nivel sistémico. (20) Hasta ahora no se conocen los mecanismos por los cuales la actividad de estas glándulas exócrinas se relaciona con la respuesta inmunitaria humoral.

Sin embargo, ha sido posible proponer algunas hipótesis que están fundamentadas principalmente en el conocimiento que se tiene sobre las principales actividades de las vesículas seminales como glándulas accesorias al aparato reproductor masculino.

La actividad inmunosupresora del plasma seminal (semen) ha sido relacionada con su contenido de productos secretados principalmente en la próstata y las vesículas seminales. Los factores inmunosupresores más conocidos del plasma seminal son las prostaglandinas, las poliaminas, los neurotransmisores y el zinc (21,22). Couthino y sus colaboradores (23), aislaron del líquido seminal una proteína que se comportaba como un agente inmunosupresor cuando su actividad biológica era probada in vivo e in vitro.

El zinc es uno de los componentes del plasma seminal que más ha llamado la atención, debido a dos características importantes. La primera es que las vesículas seminales contienen una gran cantidad de este elemento traza.

La segunda son las propiedades inmunomoduladoras que tiene el zinc en el organismo ya que él forma parte de una metalohormona tímica y es un cofactor esencial para numerosas enzimas (NPasa por ejemplo) necesarias para que se lleve a cabo la respuesta del sistema inmunitario (24).



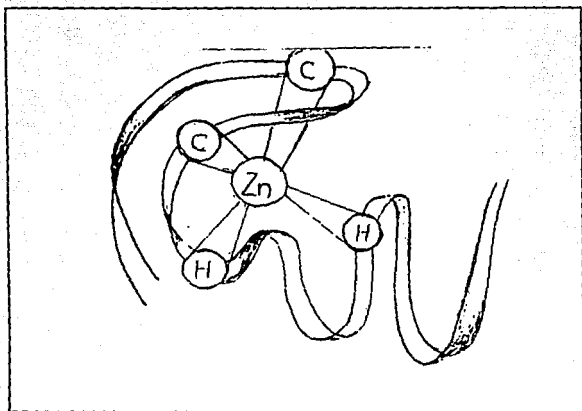


Fig.3. Esquema que representa la unión de un átomo de zinc a cuatro puntos diferentes de una cadena polipeptídica. De este modo el elemento traza influye sobre la conformación de la molécula y sobre la explicación de algunas de sus actividades biológicas (24).

#### 2.4.-Actividad inmunosupresora del plasma seminal.

El plasma seminal está compuesto por una mezcla de secreciones que proceden de varias glándulas anexas al tracto reproductor masculino. Entre estas se encuentra el epididimo, las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbo uretrales.

Algunos de los componentes del plasma seminal más conocidos son las transglutaminasas, uteroglobulinas, receptores para la porción poliaminas, prostaglandinas E ( $PGE_2$ ),  $\beta_2$ -microglobulina y zinc (21). (figura No 3)

Numerosos estudios realizados *in vitro* han demostrado la participación de dichos elementos en la supresión de algunas actividades inmunológicas. El plasma seminal, por ejemplo, suprime la actividad de las células NK, reduce la activación del sistema complemento y, además, tiene un efecto inhibitor sobre la unión de la porción Fc de los anticuerpos IgG con sus receptores que se encuentran sobre la superficie de la membrana de numerosas células (24,25)

La inmunosupresión inducida por los factores presentes en el semen no se lleva a cabo en una forma sistémica, si no que más bien parece que se ejerce solamente sobre la superficie de las mucosas.

De este modo, el plasma seminal provoca un abatimiento de los mecanismos defensivos locales y, a ese nivel, permite la supervivencia de los espermatozoides e impide la sensibilización de la mujer con los antígenos de histocompatibilidad paternos .

Otras investigaciones han demostrado que el plasma seminal también puede interferir, directa o indirectamente, con las actividades de las principales poblaciones de células del sistema inmunitario, como los linfocitos T, B y NK y/o los macrófagos (21).

Por otra parte, se han publicado varios estudios cuyos resultados demuestran que el plasma seminal posee una potente actividad inmunosupresora in vitro.

Diferentes trabajos experimentales han demostrado que después de extirpar cualquier glándula primaria del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal, se observan algunas alteraciones en la competencia inmunológica del animal (8,17).

Dentro del sistema gonadal masculino, la actividad secretora de los órganos anexos (próstata, vesículas seminales y glándulas bulbo uretrales) depende principalmente de las hormonas gonadales e hipofisarias (prolactina, por ejemplo) así como de la acción de varios neuropéptidos, que tienen una concentración elevada en las secreciones de las vesículas seminales (26,27).

Las secreciones de las glándulas anexas al aparato no habían sido relacionadas con las funciones del tejido linfoide hasta que descubrieron las actividades inmunosupresoras del plasma seminal.

Otros estudios comprobaron que las glándulas seminales influyen sobre la competencia inmunológica de los linfocitos esplénicos ya que la extirpación experimental de las vesículas disminuye la capacidad de esas células para sintetizar anticuerpos.

Estos resultados sirvieron para proponer que las vesículas seminales son glándulas accesorias de secreción externa que, sin embargo, parecen participar activamente en las interacciones entre los sistema neuroendócrino e inmunológico (8, 18).

### CAPITULO III. OBJETIVO E HIPOTESIS.

---

El presente trabajo tiene como objetivo conocer si la extirpación de las vesículas seminales puede o no comprometer la respuesta proliferativa de los linfocitos T de ratones Balb/c.

La hipótesis propone que la extirpación de las vesículas seminales disminuye la respuesta proliferativa de los linfocitos estimulados in vitro con el mitógeno Con-A.

#### CAPITULO IV. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

---

Se trabajo con dos grupos de animales, sometidos a diferentes condiciones experimentales, a los cuales se les midió la misma respuesta de sus linfocitos esplénicos, tal como se indica en el cuadro siguiente.

---

GRUPO	CONDICION	NUMERO	MEDICION
1.-	ANIMALES SIN VESICULAS SEMINALES. EDAD DE 4 MESES. (sin vs).	10	LINFOPROLIFERACION <u>IN VITRO.</u>
2.-	ANIMALES CON VESICULAS SEMINALES. EDAD DE 4 MESES. (con vs).	10	LINFOPROLIFERACION <u>IN VITRO.</u>

---

El trabajo se dividió en dos partes. En el curso de la primera se extirparon las vesiculas seminales de un grupo de ratones Balb/c de tres semanas de edad. En otro grupo de ratones del mismo sexo y edad, se realizó la misma intervención quirúrgica pero sin extirpar las glándulas seminales.

En la segunda parte del trabajo, cuatro meses más tarde, se procedió a sacrificar los animales y obtener sus células esplénicas para estudiar *in vitro* su respuesta proliferativa después del estímulo con la Concanavalina A (Con A), midiendo la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina.

#### 4.1- Extirpación de las vesículas seminales.

La extirpación quirúrgica se realizó cuando los ratones macho tenían 3 semanas de edad, cuando todavía no habían madurado sexualmente y aún era escasa la irrigación vascular de sus tejidos.

Es decir, De acuerdo al diseño del experimento, las vesículas seminales fueron extirpadas antes de que ocurriera su maduración y se iniciara su actividad secretora.

El procedimiento quirúrgico se llevó a cabo previa anestesia de los animales y limpieza de la piel con una solución antiséptica. Una vez realizada la incisión en la piel, se procedió a cortar longitudinalmente la pared muscular y el peritoneo contiguo en la mitad inferior del abdomen de los ratones. Al quedar expuesta la cavidad abdominal, las glándulas se localizan, desplazando la vejiga hacia fuera y abajo. La insición para extirpar las vesículas seminales se hizo lo más cercano posible al tejido prostático.

La pared muscular y el peritoneo se suturaron en un solo plano con Catgut 4-0 y, al final, la piel se suturó con seda negra quirúrgica 4-0.

#### 4.2-Estudio de la respuesta linfoproliferativa in vitro.

El estudio de la respuesta linfoproliferativa se realizó cuatro meses después de la intervención quirúrgica, mediante la prueba de incorporación de  $^3$ [H]-timidina al núcleo, para medir la intensidad de la estimulación de los linfocitos esplénicos cultivados en presencia de Concanavalina-A.



## CAPITULO V. MATERIAL Y METODOS .

---

### 5.1- Animales .

Se utilizaron ratones Balb/c, machos, recién nacidos, que fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Química (UNAM), en donde permanecieron durante el transcurso del experimento bajo las mismas condiciones, con alimento (Bluebonnet, Brand) y agua ad libitum.

### 5.2- Cultivo de Células y estimulación con el mitógeno.

Los animales de cuatro meses fueron sacrificados por dislocación cervical. Bajo condiciones de esterilidad, se les abrió la cavidad abdominal y se procedió a extirpar bazo.

Las células de este órgano linfoide se perfundió con 5 ml de solución salina balanceada (BSS) estéril sobre una caja Petri estéril.

Las células fueron lavadas dos veces con BSS y posteriormente suspendidas en una solución hemolizante de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 80 % y Tris base al 20 %, con el propósito de eliminar glóbulos rojos y facilitar el conteo de células viables.

Una vez eliminados los eritrocitos, las células mononucleares esplénicas se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (HY CLONE LABORATORIES Inc., USA, 430-1800 EA) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FLOW Laboratories Inc., USA, A-1115-D) que había sido previamente inactivado 30 minutos, a 56C, y al cual se añadió Penicilina-Estreptomicina al 1% (Microlab, Mexico), aminoácidos no

esenciales al 0.5% (Microlab, Mxico), L-glutamina 200 mM al 0.5 % y 25mM (HEPES Microlab, Mxico). El medio de cultivo se mantuvo a 4 C y fue suplementado el día de su uso, bajo condiciones de esterilidad.

La viabilidad de las células se determinó por exclusión del colorante azul tripano, preparado al 0.4 % en SSI (Sigma, Chemical, T-6146, Co. U.S.A.) El número de células necesario para los experimentos fue determinado mediante un conteo bajo microscopio, con un ocular 40X, utilizando la cuadrícula de una cámara de Neubauer. Una vez contadas las células viables, se ajustó una suspensión de tal forma que el número de células deseado 300 000 siempre quedara en un volumen de 100  $\mu$ l.

Se añadieron 100  $\mu$ l de cada suspensión de células esplénicas más 100  $\mu$ l de medio de cultivo RPMI 1640 recién suplementado en 6 pozos de 300  $\mu$ l de una microplaca (Costar, U.S.A. 3896).

La estimulación de las células fue realizada al añadir 100  $\mu$ l del mitógeno Con-A IV a una concentración de 2  $\mu$ g/ml (Sigma Chemical Co., USA) a cada tres pozos de los seis en donde se había repartido la suspensión celular de cada animal. A los tres pozos restantes no se les añadió mitógeno.

La microplaca se mantuvo en incubación durante 72 horas a 37 C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, con 19.7% de humedad.

Después de 54 horas de cultivo, se añadió 1  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]-timidina en cada pozo (TRA 120 Batch 325 ) Posteriormente se incubó la microplaca 18 horas a 37C bajo las mismas condiciones de atmósfera y humedad que ya han sido mencionadas.

Las células se procesaron en un cosechador (modelo 24 V-BRANDEL, USA) que depositó el contenido de cada pozo sobre el papel de fibra de vidrio (WHATMAN, USA) con poros de  $0.4 \mu$ . Las tiras de papel se dejaron secar a temperatura ambiente y, posteriormente, fueron separadas e introducidas en viales (WHEATON, USA) de 20 ml que contenían 5 ml de líquido de centelleo compuesto por 2.5 difenil oxazol y PPOPOP, (bis (2-(5-fenil oxazol))) benceno. Estas dos sustancias se disolvieron en tolueno y la solución se mantuvo a  $4^{\circ}C$ .

La radiactividad fue medida en un contador de centelleo (TRI-CARB 300, PACKARD, USA). Las lecturas fueron registradas como cuentas por minuto (cpm). Cada muestra de células esplénicas fue cultivada y estimulada por sextuplicado, de modo que, por cada animal utilizado, al final se obtuvieron tres lecturas de la incorporación de timidina por las células estimuladas y otras tres lecturas de la incorporación del isótopo en condiciones basales.

#### 5.4- Análisis estadístico.

La heterogenicidad de las varianzas se demostró por la prueba de la  $\chi^2$  de Bartlett (28).

Para establecer el grado de significancia de las diferencias entre las medias de los dos grupos estudiados, se utilizó la prueba t de Student, con el agregado de Welch (28) de dos colas, para muestras independientes de tamaño diferente y con varianzas no homogéneas, con un nivel de corte al 95%.

Prueba de t de Student-Welch.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}}$$

Donde,  $\bar{X}$  es la media,  $S^2$  la varianza y n el tamaño de las muestras.

Prueba de Bartlett.

$$X_B^2 = \frac{\left[ \ln \frac{\sum s^2 (n-1)}{\sum (n-1)} \right] \sum (n-1) - \sum \ln s^2 (n-1)}{1 + \frac{K+1}{3(K-1)(N-K)}}$$

donde,  $\ln$  es logaritmo natural,  $s^2$  es la varianza,  $n$  el tamaño de la muestra,  $K$  el número de grupos y  $N$  el tamaño total o sumatoria de las muestras.

Grados de libertad (gl) según el agregado de Welch.

$$gl = \frac{\left[ \frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right]^2}{\frac{\left[ \frac{s_1^2}{n_1 - 1} \right]^2}{n_1} + \frac{\left[ \frac{s_2^2}{n_2 - 1} \right]^2}{n_2}} - 2$$

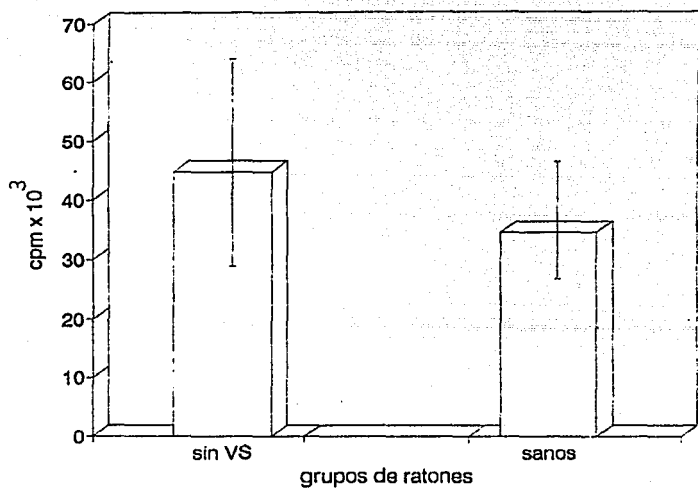
donde,  $gl$  son los grados de libertad,  $s^2$  las varianzas y  $n$  el tamaño de las muestras.

## CAPITULO 6. RESULTADOS

Los valores del promedio y de los índices de estimulación fueron superiores en los cultivos de linfocitos de los ratones sin vesículas seminales, como se puede observar en las Tablas 1 y 2, así como en la grafica 1. Sin embargo, el análisis estadístico de los resultados reveló que estas diferencias no eran significativas ( $p > 0.05$ ). Por consiguiente, en el grupo de animales estudiados, la extirpación de las glándulas seminales no modificó significativamente, cuatro meses después de la intervención quirúrgica, la respuesta proliferativa de los linfocitos esplénicos estimulados con la Concanavalina A. De acuerdo a los resultados del análisis estadístico, se rechaza la hipótesis de trabajo ( $H_a$ ) y se acepta la hipótesis de nulidad ( $H_0$ ).

TABLA 1. INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA AL NÚCLEO DE LOS LINFOCITOS, ESTIMULADOS CON Con-A. (cpm).

ratones	N	$\bar{X}$ (*)	S (**)
con VS	9	34,508	9,543.3
sin VS	10	44,810	17,214.9



(\*) cpm, después de restar la lectura promedio que fue obtenida de los linfocitos que no fueron estimulados. Los promedios de las lecturas basales de las células no estimuladas, fueron 3304 y 3942 cpm para los linfocitos de los ratones sin vesículas seminales y para los de los ratones control, respectivamente.

(\*\*) desviación estandard.

---

TABLA 2. ÍNDICE DE ESTIMULACIÓN DE LOS LINFOCITOS, DESPUÉS DE EXTIRPAR LAS VESÍCULAS SEMINALES.

---

ratones	N	$\bar{X}$ (*)	S (**)
con VS	9	11.05	7.80
sin VS	10	16.64	12.27

---

(\*) Valores obtenidos después de dividir las cpm en los cultivos de los linfocitos estimulados entre las cpm de sus respectivos controles que no habían sido estimulados, tanto en el grupo de los ratones sin vesículas seminales como en el grupo de los ratones sanos.

(\*\*) Desviación estandard.



## CAPITULO VII.- DISCUSION.

---

Los resultados del presente trabajo muestran que, cuatro meses después de la extirpación quirúrgica de las vesículas seminales, los ratones Balb/c no modificaron la respuesta proliferativa de sus linfocitos esplénicos cuando éstos fueron estimulados con el mitógeno Con-A. Los resultados coinciden con los que habían sido publicados en un estudio previo realizado con ratas Wistar, en las cuales se observó que los linfocitos esplénicos de los animales operados podían provocar una reacción injerto contra huésped (GVH) de la misma intensidad que la inducida con los linfocitos esplénicos de los animales normales (B).

Sin embargo, estos dos resultados, obtenidos al explorar la inmunidad celular de roedores sin vesículas seminales, contrastan significativamente las observaciones realizadas al estudiar la respuesta de anticuerpos en animales sometidos a las mismas condiciones experimentales. Tanto en las ratas como en los ratones inmunizados con glóbulos rojos de carnero (GRC), albúmina y lipopolisacáridos (LPS) o infectados con Taenia crassiceps, diferentes grupos de investigadores han encontrado que la falta de las vesículas seminales provoca una reducción significativa en la producción de anticuerpos contra los inmunógenos mencionados y los antígenos del parásito.

Hace varios años, Byfield y Howard (29) observaron que los linfocitos de los ratones de una cepa, caracterizada por tener deprimida su producción de anticuerpos, conservaban intacta su capacidad para inducir una reacción GvH. Ya que las reacciones GvH dependen de la competencia de los linfocitos T del animal donador, los autores consideran que las dos respuestas, humoral y celular, se habían desarrollado en una forma independiente y expresaban la actividad de dos subpoblaciones de linfocitos diferentes que se encontraban modulados por factores distintos.

El caso anterior ejemplifica la importancia de los factores moduladores. Aunque el sistema inmunitario se conserve normal, es posible que su respuesta se incremente o se deprima transitoriamente a causa de diversos cambios, fisiológicos o patológicos, que pueden ocurrir en los mecanismos encargados de modular la inmunidad.

De ahí la importancia de los factores moduladores que pueden influir, positiva o negativamente, sobre la intensidad de la respuesta del sistema inmunitario. Todos ellos pueden tener varios mecanismos de acción diferentes que han sido estudiados extensamente durante los últimos años. La modulación de la inmunidad (a través del sistema nervioso, las hormonas o los componentes de la dieta) constituye un capítulo nuevo de la inmunología, que rápidamente ha aumentado su extensión y su complejidad.

Algunas de las actividades de las vesículas han sido ubicadas en este contexto. Estas glándulas no solamente participan en el proceso de la fecundación sino que también pueden ser incluidas en la red de interacciones que relacionan los sistemas gonadal e inmunitario.

Los resultados publicados en trabajos previos han permitido proponer que esas glándulas anexas al aparato reproductor masculino son necesarias para que se lleve a cabo una producción adecuada de anticuerpos.

La extirpación temprana de las vesículas seminales ( en roedores que tienen menos de un mes de edad) provoca una declinación gradual de la síntesis de inmunoglobulinas, lo cual se manifiesta en una forma evidente y estadísticamente significativa cuatro meses después de la intervención quirúrgica. Los resultados del presente trabajo apoyan el punto de vista en favor de que la falta de las vesículas seminales solamente deprime la respuesta de los linfocitos B y no interfieren la respuesta de los linfocitos T. Hasta ahora, en la literatura revisada, no se han encontrado trabajos que estudien los mecanismos por los cuales se lleva a cabo este efecto inmunomodulador selectivo.

Sin embargo, la información recopilada sobre las interacciones inmunogonadales (parte de la cual ha sido revisada en el segundo capítulo de la Tesis) , permite proponer que la falta de las vesículas seminales modifica, al menos, dos de los mecanismos que participan en la modulación de la inmunidad.

Uno de ellos puede ser el de la inmunomodulación hormonal. Esta proposición se puede sostener porque las vesículas seminales, lo mismo que la próstata, contienen receptores para la hormona hipofisaria prolactina (PROL). Existen varios trabajos que demuestran como la PROL es necesaria para el desarrollo normal y para la expresión de las principales actividades de las glándulas anexas al aparato reproductor masculino.

Entre estas últimas se pueden mencionar la captación de zinc, la cual se encuentra aumentada después de la administración de PROL y de la hormona estimulante de las células intersticiales.

La asociación inmunogonadal se justifica en este caso porque los linfocitos también poseen receptores para la PROL y por que algunos cambios en la producción de esta hormona han sido correlacionados con varias alteraciones en la modulación de la respuesta inmunitaria.

Como se puede observar, aunque se acepte la relación entre PROL e inmunidad, no está aclarado el o los mecanismos por los cuales la hormona influya sobre la actividad de los linfocitos, ni tampoco las subpoblaciones que son susceptibles. De todos modos, es evidente que al extirpar las vesículas seminales se elimina una parte importante de los receptores gonadales que tienen los ratones para la PROL.

Este hecho puede repercutir, de alguna manera, sobre la interacción que normalmente debe existir entre PROL y linfocitos o influir sobre la tasa de producción de la hormona por la hipófisis.

Otro mecanismo inmunomodulador que, hipotéticamente, podría estar alterado en los animales operados de nuestro experimento, es la relación que existe entre la concentración de zinc en los tejidos y la calidad de la respuesta del sistema inmunitario. El zinc es un elemento esencial para la multiplicación y el funcionamiento de los linfocitos, de tal modo que cuando su concentración disminuye o aumenta, por arriba o por abajo de unos límites sumamente estrechos, se modifican la calidad y la intensidad de la respuesta inmunitaria.

El zinc es necesario para el timo porque la timulina es una metalhormona figura 3, y además, resulta igualmente necesario para las vesículas seminales porque el líquido seminal contiene una elevada cantidad de este elemento traza junto con otros tejidos pero principalmente el timo.

Algunos resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que la concentración de zinc en el timo disminuye después de la extirpación de las vesículas seminales. Si esto se puede confirmar más adelante, se podría establecer una relación evidente entre la extirpación de las glándulas anexas, el metabolismo del zinc y las alteraciones inmunológicas de los animales sin vesículas seminales.

Sin embargo, todavía no se tiene la suficiente cantidad de resultados como para apoyar algún mecanismo de inmunomodulación concreto que explique la participación de las vesículas seminales en la modulación de la respuesta inmunitaria.

## CAPITULO VIII.- CONCLUSIONES.

---

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

1.- La extirpación de las vesículas seminales de los ratones machos Balb/c no modificó, en una forma estadísticamente significativa la respuesta proliferativa de los linfocitos estimulados in vitro con Con-A.

2.- Los resultados obtenidos confirman los resultados de trabajos anteriores en los cuales se había observado que la extirpación de las vesículas seminales no modifica la respuesta de los linfocitos T contra células alogénicas .

3.- Como los linfocitos de los animales sin vesículas seminales mostraron una tendencia, no significativa, a incorporar mayor cantidad de timidina tritiada que los linfocitos de los controles y como, además, el número de animales estudiado fue muy pequeño, sería conveniente repetir este estudio utilizando una mayor cantidad de ratones y sacrificándolos a diferentes tiempos, desde 1 a 6 meses de edad.

4.- Las interacciones inmunogonadales representan un capítulo sumamente importante de la inmunología. Los resultados obtenidos permiten definir los objetivos que pueden tener los siguientes estudios sobre las relaciones entre las vesículas seminales y la competencia inmunológica.

## CAPITULO IX.-RESUMEN.

---

El presente trabajo tuvo como objetivos si la falta de las vesículas seminales, influyen o no sobre la capacidad que tienen los linfocitos, de los ratones para proliferar, después de su estimulación, in vitro con un mitógeno Concanavalina-A.

Los resultados demuestran que, cuatro meses después de la extirpación quirúrgica de las vesículas seminales, los ratones Balb/c no modificaron la respuesta proliferativa de sus linfocitos esplénicos cuando estos fueron estimulados, sin embargo estos resultados, obtenidos al explorar la inmunidad celular de roedores sin vesículas seminales, contrastan con otras observaciones realizadas al estudiar la respuesta de anticuerpos en animales sometidos a las mismas condiciones experimentales, por provocar una reducción significativa en la producción de anticuerpos contra una variedad de inmunógenos y antígenos de *Taenia crassiceps*.

Sin embargo, nuevamente todavía no se tiene una cantidad de resultados suficientes como para apoyar algún mecanismo de inmunomodulación concreto que explique la participación de las vesículas seminales en la modulación de la respuesta inmunitaria. Más aún cuando los resultados del presente trabajo indican que, después de la extirpación quirúrgica de las glándulas no se modifica la respuesta proliferativa de los linfocitos T aunque se encuentre significativamente deprimida la producción de anticuerpos.

CAPITULO X. BIBLIOGRAFIA.

---

- 1.- Grossman, J. C.: Interactions between the gonadal and the immunosystem. Science , 227: 257-261, 1985.
- 2.- Ansar Ahmed, S.; Dauphine, M.J.: Effect of short-term administration of sex hormones on normal and autoimmune mice. J. Immunol, 134: 204-209, 1984.
- 3.- Cohen, J.H.M.; Daniel, L.: Sex steroid receptors in peripheral T cells: Absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells. J. Immunol, 131: 2767-2771, 1983.
- 4.- Piarpaoli, W.; Sorokin, E.: Hormones thymus and lymphocyte functions. Experientia, 28: 1385-1389, 1972.
- 5.- Barry, M.; Manuel M.D.: Immuncendocrine interactions and autoimmunity. New Engl, J. Med, 322: 1739-1741, 1990.
- 6.- Ahmed Ansar, S.; Penhale, W.J.: Sex hormones immune responses and autoimmune diseases. Am. J. Pathol, 121: 531-551, 1985.



7.- StHoeger, Z.V.; Chiorazzi, N.: Regulation of the immune response by sex hormones. J. Immunol, 141: 91-97, 1988.

8.- Garcia Tamayo, F.; Ocampo Lujano, A.: Interacciones entre los sistemas inmunitario y gonadal. Ciencia, 42: 155-169, 1991.

9.- Donal, G.; Levine, J.D.; Edward, J.: Modulation of immunity and hypersensit by sensory neuropeptides. J. Immunol, 132: 1601-1603, 1984.

10.- Lan, G.; Barr.; Kenneth, W. Pyke.; Pearce, P.: Thymic sensitivity to sex hormones develops pos-natally ; anin vivo and in vitro study. J. Immunol, 132: 1095-1099, 1984.

11.- Foitt, I.M.; Brostoff, J.; Male ,D.: Immunology.  
Gover Medical Publishing .1989.

12.- Marx, J.L.: The immune system belongs in the body.  
Science , 227; 1190-1192, 1985.

13.- Meites, J.; Fichard ,W.: Relation of neuroendocrine system to the reproductive decline in aging rats and human subjects.  
Fed. Proc, 39; 3168-3172, 1980.

14.- Basedovsky ,D.H.; Del Rey, A. E.: Immune-neuroendocrine interaccions. J. Immunol, 135; 750-754, 1985.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 15.- Edwin, J.; Blalock.: A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems.  
Physiol. Rev, 69:1-32, 1989.
- 16.- Mann, T.: Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction.  
J.Reprod. Fert, 37: 179- 188 , 1974.
- 17.- Thomas , I.K.; Erickson, K.L.: Seminal plasma inhibits lymphocyte response to T-dependent and-independent antigens.  
Immunol, 52:721-725, 1984.
- 18.- García Tamayo, F.; Hernández , R. Ocampo , L.A.: Disminución de la respuesta primaria de anticuerpos en ratas sin vesículas seminales. Rev. Invest. Clin, 41: 25-29, 1989.
- 19.- Keith, J.; Hargreave, T.B.: Immunosupresion by seminal plasma and its possible clinical significance. Immunol, today, 5: 357-360, 1984.
- 20.- Leake, A.; Geofrey, D.; Chrisolm, A.: subcellular distribution of zinc in the benign and malignant human prostate: evidence for a direct zinc androgen interaction. Act. Endocrinol, 105: 281-288, 1984.

21.- Coutinho, A.; Prakash,C.: Inhibition of in vitro immune responses by a fraction from seminal plasma. Sca.J. Immunol, 5:77-85, 1976.

22.- Cunningham-Rundles, R.; Bockman,S.: Physiological and pharmacological effects of zinc on immune response. Ann. N.Y. Sci, 71: 113-122, 1981.

23.- Poubinian, J.S.; Talal,J.S.: Effects of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. J.Exp.Med, 147: 1568-1583, 1978.

24.- Barkey,J.; Shani,T.: Characterization of the specific binding of prolactin to binding sites in the seminal vesicle of the rat. J.Endocrinol, 80: 205-214, 1985.

25.- Gunn, A.S.; Gould,C.T.: The effect of growth hormone and prolactin preparations on the control by interstitial cell-stimulating hormone of uptake of <sup>65</sup>Zn by the rat dorsolateral prostate. J. Endocrinol, 32: 205-214, 1985.

26.- Berczi, I.: Pituitary function and immunity.  
C.R.C. Press, Florida, 1986.

27.- Ishizaka, K.; Kall's, P.: Neuroimmunoenndocrinology.  
Progress in allergy, Karger-basel, N.Y., 43: 84-193, 1988.

28.- Castilla, S; Cravioto, L.J.:

Estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud. trillas, S.A., 279-280, M xico, 1991.

29.- Byfield, E.P.; Howard, G.J.: Equivalent graft versus-host reactivitu of spleen cells from two lines of mice genetically selected for high and low humoral antibody formation.  
Transplantation, 14: 133-135. 1972.