

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DOBLE DIFUSION
Y LA CONTRAINMUNOELECTROFORESIS EN LA
INVESTIGACION DE ANTICUERPOS FRENTE AL
ESPERMA HUMANO.**

3418

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO
P R E S E N T A

JOSE MARTIN INOCENCIO TAPIA FLORES

1 9 7 4



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 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.

317

1974

~~XXXXXXXXXX~~

~~320~~

Tesis



QUIMICO

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE

SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE	Profa. Magdalena Acosta Segura
VOCAL	Profa. Socorro Cao Romero
SECRETARIO	Profa. Ernestina Ballesteros Rueda
1er. SUPLENTE	Prof. Guillermo Rendón Padilla
2o. SUPLENTE	Profa. Dea Coronado Perdomo

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Hospital Juárez S.S.A.

SUSTENTANTE:

José Martín Inocencio Tapia Flores

ASESOR:

Q.F.B. Magdalena Acosta Segura

SUPERVISOR TECNICO:

Dr. Santiago Fraga Ortega

A MIS PADRES:

Con inmenso cariño y gratitud

A MI HERMANO:

**A quién espero sirva de aliciente en
su futuro**

A MIS TIAS Y PRIMOS:

Con respeto

Agradezco infinitamente a la Srita. Q.F.B. Magdalena
Acosta Segura Profesora de la Facultad de Química su -
acertada asesoría

Al Sr. Dr. Santiago Fraga Ortega, Jefe del
Laboratorio del Hospital Juárez de la S.S.A. sus
valiosos consejos.

I N D I C E

	PAG .
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	3
MATERIAL Y METODOS	20
RESULTADOS	31
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFIA	33

I N T R O D U C C I O N

La importancia del fenómeno inmunológico en la infertilidad clínica ha llamado mucho la atención durante los últimos años. Se ha demostrado que la presencia de anticuerpos contra el semen humano causa la infertilidad.

Recientemente se ha polarizado el interés de manera considerable en la incidencia de anticuerpos contra los espermatozoides, tanto en varones con anormalidades seminales, como en las mujeres estériles. La formación de estos anticuerpos ocurre en forma natural y espontánea, pero en la actualidad, cuando los métodos anticonceptivos se extienden cada día más y ahora se cuentan por millones las mujeres que en todo el mundo siguen alguno de ellos, existe la posibilidad de inducir su formación en mujeres en las cuales el embarazo no es deseable, mediante la aplicación de una vacuna obtenida de semen humano.

Debido a que la esterilidad puede obedecer a la presencia de estos anticuerpos en cualquiera de los miembros de la pareja, además de que también pueden provocar un estado de esterilidad biológica temporal en la mujer fértil, es de gran importancia el contar con un método de laboratorio sencillo, reproducible y accesible para hacer la investigación y la valoración de estos anticuerpos para establecerla como prueba de rutina.

Sobre la base de la existencia de dichos anticuerpos-

frente al semen, y tomando en consideración que hay numerosos reportes sobre otros sistemas antígeno-anticuerpo, en los que se ha demostrado que la contrainmunoeléctroforesis posee una mayor sensibilidad que la doble difusión de Ouchterlony, nos avocamos en la presente tesis, a efectuar un estudio comparativo de estos dos métodos, con el fin de determinar cual es el que tiene una mayor sensibilidad para la detección de estos anti---cuerpos antiesperma humano, con el propósito de realizar su investigación en ambos cónyuges de un matrimonio estéril como -- una posible causa de esa infertilidad, así como también, el de ejercer un control de anticuerpos presentes en el suero de las mujeres inmunizadas con la vacuna preparada a partir de semen humano.

CAPITULO I.- GENERALIDADESA).- ANTIGENICIDAD DEL SEMEN

La antigenicidad del semen humano y de varios animales, ha sido ampliamente demostrado desde los experimentos de Metalnikoff y Landsteiner en 1899 y 1900, en que se demostró la producción de anticuerpos capaces de aglutinar e inmovilizar espermatozoides después de inyectar con semen humano a conejillos de indias. Posteriormente Baskin (1), en 1932, reportó que la mujer puede desarrollar anticuerpos contra el semen inyectado.

Como se sabe, existen varias causas de esterilidad en la mujer, a las que también hay que agregar la del fenómeno inmune. Se ha demostrado que el semen contiene antígenos capaces de inducir la formación de anticuerpos, detectables por pruebas serológicas. Pero estos anticuerpos no solamente se producen en mujeres, ya que Wilson (22) y Rümke (16) en 1954, en forma independiente describieron casos de hombres estériles, en cuyo suero y plasma seminal se encontró la presencia de espermaglutininas. En los dos casos descritos por Wilson, los espermatozoides de los pacientes se aglutinaban debido a la presencia de autoanticuerpos en su plasma seminal. El suero de estos pacientes tenía títulos de anticuerpos anti-esperma de 1:20 y 1:80 respectivamente. Wilson (22) reportó que

la esterilidad de estos dos hombres se debía a que los esper-
matozoides aglutinados perdían su movilidad y por lo tanto la-
habilidad de penetrar al óvulo.

Las variedades en cuanto a los tipos de aglutinación ya sea por la cabeza o por la cola del espermatozoide, se ob--
servan en las fases primarias, pero la aglutinación por la co-
la es la que predomina en los agrupamientos más grandes. Esta
variedad en la aglutinación, indica que existen diferencias en
tre los antígenos de la cabeza y de la cola de la célula esper
mática. Los sueros que contienen las aglutininas contra la ca
beza del espermatozoide, producen líneas de precipitación con-
el plasma seminal humano normal y con el azoospermico en la --
prueba de difusión en agar. Estas bandas de precipitación pue
den teñirse con negro de sudán, de lo cual se puede concluir -
que el antígeno participante en la aglutinación de cabeza con-
cabeza es una lipoproteína. La presencia de esta lipoproteína
en el plasma seminal azoospermico sugiere que es originalmente
una substancia del plasma seminal que se adhiere secundariamen
te a la superficie de las cabezas de los espermatozoides.

El hecho de que los autoanticuerpos antiesperma se -
formen en hombres con una obstrucción, es totalmente explica--
ble considerando que sabemos que los espermatozoides son antí-
genos capaces de inducir la formación de anticuerpos cuando en
tran en contacto con la circulación y estos espermatozoides --

pueden observarse en el intersticio, vasos linfáticos o aún en los capilares sanguíneos del epidídimo como resultado de esa - obstrucción.

La similitud de los resultados obtenidos por Les-- lie y Quinlivan (9) cuando hicieron reaccionar alícuotas de to das las muestras de sueros inmunes preparados en conejos, con muestras de semen de todo un grupo de donadores y con otras no del grupo, puso de manifiesto que los anticuerpos son específi cos de especie. Además, los resultados negativos obtenidos -- por estos investigadores cuando pusieron a reaccionar semen de toro con sueros antiesperma humano preparados en conejo lo -- confirmaron.

B).- COMPOSICION QUIMICA Y ANTIGENICA DEL SEMEN

El contenido de proteínas totales del plasma seminal humano se encuentra entre el rango de 3.5 a 5.5 g/100 ml (17).

La presencia de proteínas séricas entre los constitu yentes del plasma seminal humano es conocida desde principios- de siglo. Sin embargo, la contribución de proteínas séricas a los constituyentes del plasma seminal es muy modesta, como se- ha confirmado electroforéticamente y las únicas bandas relacio nadas con las proteínas séricas son aquellas de la albúmina y- la transferrina. Aunque también se ha demostrado la presencia en fluido seminal de pequeñas cantidades de α_1 antitripsí--

na, ácido glucoproteico, y varias α_2 globulinas no identificadas e inmunoglobulinas IgA, IgM e IgG. El plasma seminal contiene también varias enzimas proteolíticas, tales como una aminopeptidasa, una proteasa con un pH óptimo de 7.5 y un pepsinógeno (17). Se cree que a la acción de estas enzimas proteolíticas se debe la licuefacción del semen.

En cuanto a la composición antigénica del semen, se puede decir que el plasma seminal humano contiene material -- muy antigénico. En realidad, el material antigénico se origina de los productos de fluído del tracto genital masculino -- más bién que de los espermatozoides mismos, ya que las eyaculaciones libres de espermatozoides muestran el mismo comportamiento inmunológico como el plasma seminal normal (20).

En la inmunoelectroforesis, efectuada por Hekman y Rümke (6), de plasma seminal humano normal con un suero antiplasma seminal humano preparado en conejo, reveló 11 líneas -- de precipitación, 3 de las cuales se encuentran también en -- plasma sanguíneo.



Fig. 1.- Dibujo esquemático del patrón inmunoelectroforético de plasma seminal humano normal (6).

- a).- Las líneas 3, 7 y 8 son antígenos que se originan en la glándula prostática.
- b).- Las líneas 5 y 6 son antígenos que se originan en las vesículas seminales.
- c).- La línea 9 dió reacción de identidad con algunos extractos de testículos y del epidídimo.
- d).- La línea 2 es de un componente sanguíneo.
- e).- Las líneas 1 y 4 no fueron identificadas.

Los principales antígenos del semen proceden de la glándula prostática y las vesículas seminales, tres y dos respectivamente. Uno de los antígenos de la próstata fué identificado como la fosfatasa ácida. Uno de los antígenos procedente de las vesículas seminales se identificó como lactoferrina, la proteína que contiene hierro que se encuentra en varias secreciones corporales, pero no en el plasma sanguíneo.

En una serie de reportes publicados desde 1956, Weil y cols. (18, 20, 21) descubrieron la relación entre los espermatozoides y el plasma seminal humano. En sus experimentos, el plasma seminal humano y los espermatozoides fueron inmunológicamente indistinguibles cuando se probaron con sueros contra ambos materiales. Además demostraron que el antígeno responsable de este fenómeno se originaba en las vesículas seminales y era tomado por el espermatozoide durante su paso a través de

las estructuras anexas del tracto genital masculino. Sugiriendo llamarlo el "antígeno que cubre al espermatozoide" (abreviado ACE). Este antígeno, forma una especie de cubierta, que provee al espermatozoide de propiedades antigénicas que dominan el caracter inmunológico de los espermatozoides seminales, propiedades que no están presentes en los espermatozoides testiculares (10). Su fijación al espermatozoide es muy firme, y sólo rastros de él pueden ser liberados por diferentes métodos físicos y químicos (18). Es totalmente estable bajo condiciones ordinarias, es destruido por ebullición, es insoluble en los solventes orgánicos comunes, tales como alcohol, éter, acetona y éter de petróleo. Este antígeno ha sido identificado como lactoferrina (6). Su presencia no puede ser atribuída al espermatozoide, ya que el semen de pacientes azoospermicos contiene una cantidad normal de lactoferrina.

Los isoantígenos de grupo sanguíneo A y B han sido demostrados en los espermatozoides de secretores, pero no en los de no secretores (3). Estos antígenos son evidentemente adquiridos del plasma seminal, ya que pudieron ser removidos mediante dos lavados de los espermatozoides (15).

C).- MECANISMOS DEL ESTIMULO ANTIGENICO

En la mujer, el estímulo antigénico se produce cuando las proteínas solubles del semen son absorvidas a través --

del epitelio vaginal o cervical, el cual debido al uso de anti--
conceptivos químicos o mecánicos locales, así como también por -
infecciones ocasionadas por bacterias, hongos o parásitos e in--
clusive por trastornos hormonales puede sufrir modificaciones y--
presentarse apto para que penetren a través de él estas proteí--
nas heterólogas, al llegar éstas al torrente circulatorio se pro--
duce el estímulo antigénico y comienza la síntesis de anticuer--
pos frente al semen. Estos anticuerpos son circulantes y tisula--
res aunque se encuentran también en los exudados vaginal y endo--
metrial. La manera de actuar de estos anticuerpos al entrar en -
contacto con los espermatozoides, para dar como resultado la in--
fertilidad puede explicarse de dos maneras fundamentalmente: al--
reaccionar con los espermatozoides los inmovilizan y consecue~~n~~t
mente no pueden emigrar de la vagina, si tal fenómeno no ocurre,
al llegar los espermatozoides al útero puede efectuarse ahí la -
reacción antígeno-anticuerpo, dando como resultado la destruc--
ción celular y como consecuencia de esta destrucción puede haber
liberación de histamina, que actúa sobre la musculatura lisa del
útero provocando contracciones que afectan también la migración--
de los espermatozoides.

De acuerdo con Franklin y Duke (5) el 78.9% de las pacient
es que no muestran causas orgánicas de esterilidad poseen anti--
cuerpos circulantes frente al semen y también se ha demostrado -
que el 3% de los hombres estériles poseen anticuerpos frente a -

sus propios espermatozoides (16); algunos de estos pacientes -- presentan destrucción de los conductos deferentes, han padecido cistitis o prostatitis inflamatorias severas, han sido sometidos a biopsias testiculares o a cirugía de la glándula prostática y algunos más son aparentemente normales.

D).- MÉTODOS PARA LA INVESTIGACION Y CUANTIFICACION DE LOS ANTICUERPOS ANTIESPERMA HUMANO.

Al efectuar la revisión de la literatura sobre la metodología para la investigación de anticuerpos frente al semen, -- existe una gran discrepancia en lo reportado por diversos autores en cuanto a la sensibilidad y reproducibilidad de los resultados. Entre las técnicas más comunmente empleadas pueden -- citarse:

- 1.- Reacciones de inmovilización de los espermatozoides.
- 2.- Reacciones de aglutinación de los espermatozoides.
- 3.- Pruebas de inmunoprecipitación por la técnica de la doble - difusión de Ouchterlony.
- 4.- Inmunolectroforesis.
- 5.- Contraínmunolectroforesis.

1.- REACCION DE INMOVILIZACION DE LOS ESPERMATOZOIDEOS (9).

Para este tipo de reacción se puede emplear tanto suero -- sanguíneo como secreción vaginal. Para esta prueba se tiene que emplear semen fresco, de no más de 60 minutos de obtenido y que al inicio de la prueba muestre como mínimo el 80% de las célu--

las móviles. La prueba se realiza en tubos de ensaye de 9 x 75-mm en donde se colocan: dos gotas de semen, dos gotas de suero sanguíneo o de exudado vaginal y dos gotas de solución salina isotónica. Con cada muestra de semen debe correrse un tubo testigo con el objeto de evaluar la inmovilización espontánea de los espermatozoides. En este tubo testigo se colocan: dos gotas de semen, dos gotas de suero normal y dos gotas de solución salina isotónica. Todos los tubos se agitan para mezclar su contenido y se dejan reposar a temperatura ambiente. Las lecturas se hacen tomando muestras de las mezclas a intervalos de 15 minutos, tomando una gota con una asa calibrada de 4mm de diámetro que se coloca entre porta y cubreobjetos observándose al microscopio con aumento de 400 diámetros. Para determinar el porcentaje de inmovilización se cuentan 100 espermatozoides, anotando al mismo tiempo cuantos de ellos estaban inmovilizados. Las observaciones se hacen simultáneamente en las muestras problema y en los testigos para poder diferenciar la pérdida de la movilidad debida a los anticuerpos. Los resultados se interpretan en % de movilidad -- y se puede establecer la relación:

$$\frac{\% \text{ de inmovilización en el problema}}{\% \text{ de inmovilización en el testigo}} = \text{Indice de inmovilización.}$$

Las pruebas se interpretan como positivas cuando este índice es sensiblemente mayor de 1, expresando en cada caso ---

cuánto tiempo había transcurrido desde la iniciación de la --- prueba y el tiempo en que se hizo la lectura.

Se toma como punto final de la prueba cuando el testigo muestre ya inmóviles el 50% de los espermatozoides, lo que ge-neralmente se presenta entre 2 y 3 horas después de iniciada - la prueba. En los casos positivos, se puede hacer la cuantifi-cación de los anticuerpos presentes mediante diluciones del -- suero o del exudado en incrementos de dos con solución salina. Se considera como el título de la reacción, la máxima dilución que dé un índice de inmovilización de más de 1.

La técnica se puede considerar simple en su ejecución, - pero tiene como inconvenientes que se dedica mucho tiempo para hacer las lecturas cada 15 minutos contando los espermatozoi--des, tanto de los testigos como de los problemas, para determi-nar el índice de inmovilización. Por otro lado, la lectura es relativamente difícil puesto que los espermatozoides están cam-biando de posición constantemente, especialmente al principio- de la prueba y resulta fácil confundir células que ya se conta-ron y volverlas a contar, lo que falsea los resultados. Pero- la objeción más importante es la necesidad de contar siempre - con semen fresco, de no menos de 60 minutos de obtenido y cu--yos espermatozoides muestren movilidad en por lo menos el 80%.

2.- Reacciones de aglutinación de los espermatozoides (5.9).

Para llevar a cabo esta reacción de aglutinación se em

plean tubos de ensaye de 9 x 75 mm, en los que se coloca una gota de esperma y 0.5 ml de suero sanguíneo problema. Esta prueba no se realiza con exudado vaginal, ya que la gran cantidad de células epiteliales, leucocitos y detritus dificultan mucho la observación, por lo que se hace únicamente con suero sanguíneo. En cada prueba se corren dos testigos: uno positivo constituido por una mezcla de una gota de semen y 0.5 ml de suero inmune preparado en conejo y un control negativo constituido por una mezcla de una gota de semen y 0.5 ml de suero normal. Los tubos se agitan para mezclar perfectamente su contenido y se colocan en baño de agua a 37 °C y se observan durante 3 horas.

Las observaciones se hacen tomando una gota de cada tubo, problema y controles, con una asa calibrada de 4 mm de diámetro, colocando la gota entre cubre y portaobjetos observándola al microscopio con un aumento de 400 diámetros. Las reacciones se consideran positivas cuando se observan acúmulos de dos o más espermatozoides, haciendo caso omiso de aglutinaciones de espermatozoides con otras células, leucocitos, celdillas epiteliales o detritus. Las lecturas se realizan a intervalos de 60 minutos.

Estas reacciones de aglutinación son difíciles de interpretar ya que con frecuencia, aún en los testigos negativos, se observan acúmulos de espermatozoides con otras células. En

conclusión, este tipo de reacciones son fáciles de ejecutar y no requieren del uso de semen fresco, pero son de difícil interpretación.

Técnica de aglutinación macroscópica en un medio de gelatina (12.16).

Una vez que se ha producido la licuefacción del semen de los donadores, y dentro del período de intensa movilidad de los espermatozoides, el semen se diluye con solución de Baker de amortiguador de glucosa hasta obtener una concentración de 40 millones de espermatozoides por ml. Este espermatozoides diluido se mezcla con un volumen igual de gelatina al 10% en solución salina isotónica o en solución de Baker. Un volumen de este antígeno se adiciona a un volumen igual de suero inactivado. La mezcla se coloca en un tubo pequeño de precipitación (5 x 45 mm) y se incuba por 2 horas a 37 °C. Las reacciones se leen a la hora y a las 2 horas. Macroscópicamente las reacciones positivas muestran acúmulos de espermatozoides aglutinados. La sedimentación rápida es impedida por la viscosidad del medio de gelatina. La inactivación del suero que va a ser probado previene la aglutinación inespecífica que algunas veces se observa ligeramente en suero fresco normal. Para los exámenes de rutina los sueros se prueban sin diluir y en diluciones de 1:4 en solución salina, para eliminar un posible efecto de prozona, que algunas veces se observa con sueros sin diluir.

Esta técnica en gelatina parece ser un método sensible y seguro, pero requiere de ciertas condiciones. Los espermatozoides para la prueba deben tener una movilidad alta, ya que sólo el esperma móvil da una aglutinación específica. El número de espermatozoides en el semen sin diluir deberá ser mayor de 100 millones/ml, de tal manera que pueda hacerse la dilución y tener un número suficiente de espermatozoides. Además, con el plasma seminal concentrado, la turbidez hace difícil leer el punto final de la titulación. Es necesario usar gelatina fresca; ya que cuando se mantiene mucho tiempo a temperatura ambiente, la gelatina se vuelve menos viscosa y disminuye su pH. En un medio con un pH menor de 7, el espermatozoide pierde su movilidad.

3.- Doble difusión en gel de Ouchterlony (9, 13).

Para llevar a cabo la prueba de doble difusión en dos dimensiones, mejor conocida como prueba de Ouchterlony, se cortan o moldean en agar sobre una superficie plana, un cierto número de pozos. El número, posición y forma de estos pozos se puede modificar, pero los pozos cuadrados o rectangulares tienen la ventaja de formar ángulos rectos entre las bandas de precipitación vecinas en sistemas comparativos. Los pozos se llenan con soluciones apropiadas de antígenos y sueros, se cubren para evitar la evaporación, y se observan periódicamente durante varios días. Cabe encontrar bandas de precipitación a las 24 horas apro

ximadamente.

La facilidad con la cual se puede reconocer la identidad o diferencia serológica de dos antígenos constituye la principal ventaja de la prueba de Ouchterlony respecto a otros estudios de inmunodifusión.

El arco de precipitación formado por difusión a partir de pozos del mismo tamaño es cóncavo alrededor del pozo que contiene la sustancia de difusión más lenta.

4.- Inmunolectroforesis.

Para esta técnica se emplean portaobjetos comunes perfectamente lavados con mezcla crómica y enjuagados con agua destilada que se conservan en alcohol hasta el momento de emplearse. Estos portas se sellan con agar al 2.5% en agua bidestilada, se colocan en una superficie nivelada, se cubren con 3 ml de agarosa disuelta en amortiguador de dietilbarbituratoacetato de sodio pH 8.6 $\mu = 0.1$, procurando que el agar cubra hasta los extremos de la placa. Se deja solidificar el agar y se le hacen dos cortes longitudinales de 2 mm de ancho a lo largo de la placa y un corte circular de 2 mm de diámetro en el centro. La cámara de electroforesis se llena con amortiguador de dietilbarbituratoacetato de sodio pH 8.6 $\mu = 0.1$. Las placas se colocan en la cámara y se conectan con el amortiguador mediante tiras de papel filtro.

En la perforación circular del centro se coloca una gota de semen, se hace el corrimiento electroforético durante 45 minutos a 50 mA, como un potencial de 3 V/cm. Al término del corrimiento electroforético se retira el agar de los cortes longitudinales y uno de los canales se llena con suero control positivo y el otro con el suero en estudio. Los portas ya cargados se dejan en una caja humidificante, y a temperatura ambiente durante 24 horas, al cabo de las cuales se hace la lectura de los arcos de precipitación.

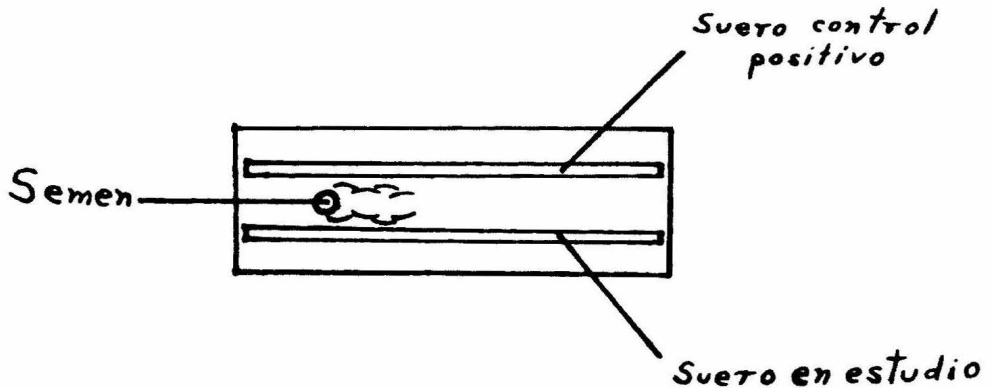


Fig. 2.- Dibujo esquemático de los portaobjetos para inmunoelectroforesis.

5.- Contrainmunolectroforesis

La contrainmunolectroforesis ha recibido también los nombres de inmunoelectroforesis cruzada y de inmunoelectroosmoféresis. A pesar de tan complicados nombres, es un método sencillo, que se basa en dos hechos:

- 1) el rápido desplazamiento de ciertos antígenos hacia el ánodo, inducido por la corriente electroforética; y
- 2) la movilización de las inmunoglobulinas hacia el cátodo, -- bajo el efecto de la electroendósmosis.

La mayor sensibilidad de la contrainmunolectrofore---
sis, en comparación con la doble difusión en gel, la podemos ex
plicar de la siguiente manera:

el antígeno y el anticuerpo se difunden en forma radial desde -
el pozo en que se colocan y solamente cuando entran en contacto
se producen las bandas de inmunoprecipitado, ahora bién, cuando
se tienen cantidades pequeñas, ya sea del antígeno o del anti--
cuerpo, al efectuarse esta difusión el reactivo que se encuen--
tra en pequeña cantidad se "diluye" todavía más al difundirse -
en la zona que no es de reacción (parte superior de la fig. 3),
en tanto que, cuando se aplica la corriente eléctrica se forza-
a ambos reactivos a emigrar uno hacia otro (parte inferior de -
la fig. 3), con lo cual se logra que todo el reactivo que se en
cuentra en pequeña cantidad reaccione, aumentándose por lo tan-
to la sensibilidad del método.

Esto es posible realizarlo con cualquier antígeno que--
migre del cátodo hacia el ánodo, ya que si su movilidad es ----
igual a la de los anticuerpos (ánodo hacia el cátodo), no es po
sible aplicar el método de la contrainmunolectroforesis.

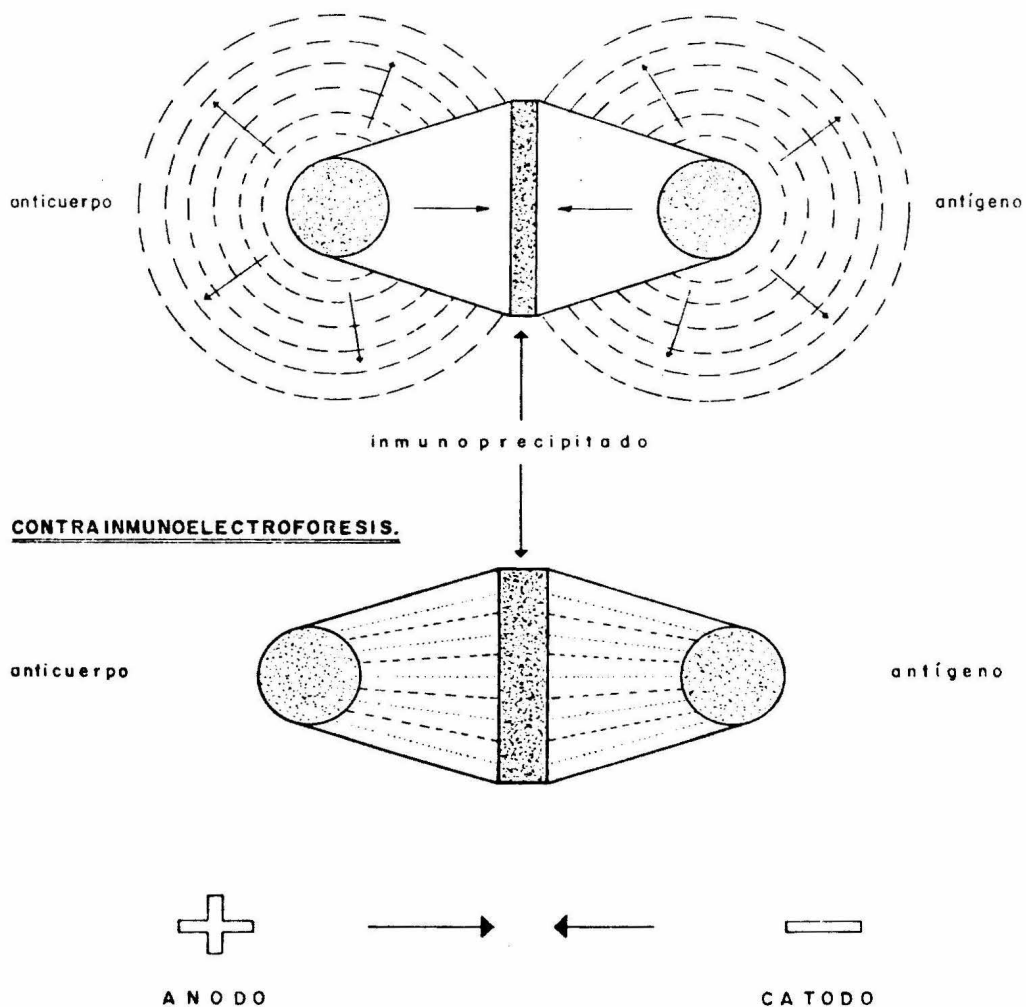


Fig. 3.- Dibujo esquemático de la difusión en gel tanto del antígeno como de los anticuerpos en ambos métodos.

CAPITULO II.- M A T E R I A L Y M E T O D O S.A.- METODO DE LA DOBLE DIFUSION DE OUCHTERLONY.Equipo:

Cajas de plástico de 3 x 3 cm y de 1 cm de altura con tapa.

Plantilla.

Nivel de gota.

Cortador circular de metal de 3 mm de diámetro.

Aplicadores de madera.

Pipeta de 10 ml.

Pipetas capilares.

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Caja húmeda.

Reactivos necesarios:

- 1.- Amortiguador de barbital pH 8.6, $\mu = 0.05$.
- 2.- Amortiguador de barbital pH 8.6, $\mu = 0.01$.
- 3.- Gel de agar al 1.5% disuelto en amortiguador de barbital --
pH 8.6 $\mu = 0.01$.

Preparación de reactivos:

- 1.- Amortiguador de barbital pH 8.6 $\mu = 0.05$.

Se pesan 1.84g. de ácido dietil barbitúrico, los cuales se disuelven en aproximadamente 400 ml de agua bidestilada-caliente casi a ebullición, después se le agregan 10.4g. de dietil barbiturato de sodio, se disuelven, se deja enfriar a tempe

ratura ambiente y se afora a un litro con agua bidestilada. Se le ajusta el pH a 8.6 con HCl 0.1 N.

2.- Amortiguador de barbital pH 8.6 $\mu = 0.01$.

Se diluye el amortiguador anterior 1:5 con agua bi--destilada.

Material Biológico:

- a).- Semen total.
- b).- Sueros control positivo preparados en conejos.
- c).- Sueros control negativo.
- d).- Sueros problema.

Preparación de los sueros control positivo.

Estos sueros se prepararon en conejos de 3 kg. de peso que recibieron una inyección por vía intramuscular constituida por una mezcla de 0.5 ml de semen, 0.5 ml de adyuvante de --- Freund y 2 mg de bacilos tuberculosos muertos. Una semana después recibieron otra inyección por vía intramuscular constituída por una mezcla de 1.0 ml de semen, 1.0 ml de adyuvante y 2-mg de bacilos tuberculosos muertos. Transcurrida una semana - desde la segunda inyección se procedió a aplicar una serie de 6 inyecciones por vía endovenosa, una diariamente, para los 3- primeros días se empleó como inóculo semen diluido 1:10 con so- lución salina isotónica y los volúmenes fueron 0.2, 0.5 y 1.0- ml desde el cuarto día se aplicó semen sin diluir y los volúme- nes inyectados fueron iguales a los anteriores. Se dejaron ---

transcurrir 7 días y se procedió a hacer una sangría de prueba para determinar la existencia de anticuerpos por reacciones de doble difusión de Ouchterlony y por contrainmunolectroforesis. Los sueros obtenidos se absorbieron con suero humano, se les ~~se~~ adicionó mertiolato a tener una concentración final de - - - - 1:10,000 y se conservaron en congelación hasta su empleo; ha-- biéndose envasado en volúmenes de 1.0 ml en frascos perfectamente tapados.

Preparación de las diluciones de semen.

Para realizar las diluciones de semen, se emplea el amortiguador de barbital pH 8.6 μ = 0.01. Para ello se utilizan doce tubos de 13 x 100 mm, en cada uno de los cuales se colo-- can 0.5 ml del amortiguador, al primero de ellos se le agrega 0.5 ml de la muestra de semen, se mezcla perfectamente y de és ta, que es la dilución 1:2, se toman 0.5 ml y se pasan a un se gundo tubo para tener una dilución de 1:4, se mezcla bien, se-- toman 0.5 ml y se pasan a un tercero para hacer la dilución 1:8 y así sucesivamente hasta el tubo número doce, en el cual ten-- dremos una dilución de semen de 1:2048. Estas diluciones se -- preparan en el momento de su empleo.

Método:

1.- Las cajas de plástico perfectamente limpias, se colocan so bre una superficie nivelada y se les vacían 2.5 ml de agar di-- suelto en amortiguador de barbital pH 8.6 μ = 0.01

2.- Se deja solidificar el agar un poco, y se colocan en el refrigerador por unos 15 a 20 minutos aproximadamente para acelerar su completa solidificación.

3.- Mediante el cortador circular y guiándose por la plantilla, se hacen siete perforaciones de 3 mm de diámetro, una central y seis periféricas a una distancia entre los bordes de 3 mm.

4.- Con un aplicador de madera roto se retira el agar de los cortes.

5.- Por medio de pipetas capilares, se coloca en el pozo cen--tral el suero en estudio y en los seis pozos periféricos si---guiendo el sentido de las manecillas del reloj, se deposita en el primero semen total y en los cinco restantes las diluciones del mismo. En otra caja de plástico se coloca el mismo suero - problema y las otras diluciones de semen siguiendo el mismo -- sentido, es decir, por cada suero en estudio se preparan dos - cajas ya que se tienen doce diluciones de semen.

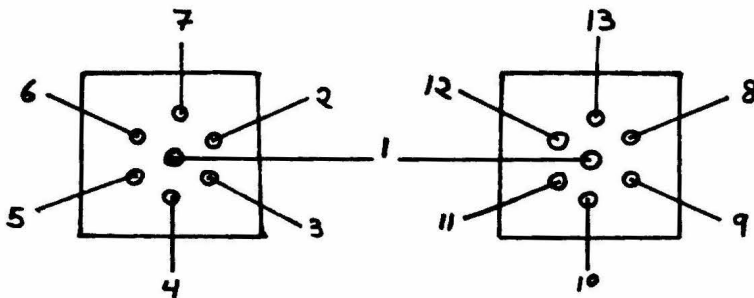


Fig. 4.- Dibujo esquemático de las cajas de plástico.

1.- Suero problema	8.- Dilución 1:64
2.- Semen total	9.- " 1:128
3.- Dilución 1:2	10.- " 1:256
4.- " 1:4	11.- " 1:512
5.- " 1:8	12.- " 1:1024
6.- " 1:16	13.- " 1:2048
7.- " 1:32	

6.- Las cajas perfectamente tapadas se dejan a temperatura ambiente en una caja húmeda con el fin de evitar que se seque el agar, para efectuar la lectura a las 24-48 hrs., observándolas sobre un fondo obscuro y con iluminación lateral para detectar la formación de las bandas de precipitación.

7.- La máxima dilución que nos presente una banda de precipitación definida, será el título de la reacción.

B.- CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

Equipo: :

Aparato de electroforesis.

Placas de vidrio común de 9 x 18.5 cm.

Nivel de gota.

Tiras de papel filtro Whatman No. 1 de 18 x 5 cm.

Plantilla.

Cortador circular de metal de 3 mm de diámetro.

Una brocha pequeña

Aplicadores de madera.

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

Pipetas de 1 y 10 ml.

Pipetas capilares.

Reactivos necesarios:

- 1.- Amortiguador de barbital pH 8.6, $\mu = 0.05$
- 2.- Amortiguador de barbital pH 8.6, $\mu = 0.01$
- 3.- Gel de agarosa al 1.5% en amortiguador de barbital pH 8.6 -
 $\mu = 0.01$.
- 4.- Gel de agar al 2.5% en agua bidestilada.

Material Biológico:

- a).- Semen total.
- b).- Sueros control positivo preparados en conejo.
- c).- Sueros control negativo.
- d).- Sueros problema.

Preparación de reactivos:

Los amortiguadores, las diluciones de semen y los --
sueros control positivos y negativos son los mismos que para -
la doble difusión en gel.

Método:Preparación de placas:

- 1.- Las placas de vidrio perfectamente limpias y desengrasadas se barnizan mediante una brocha pequeña con el gel de agar al-
2.5% en agua bidestilada, para que cuando se practiquen los --
cortes, los fondos queden sellados, evitando pasar la brocha -
dos veces por el mismo lugar. Las placas así preparadas pueden
guardarse durante varios días.
- 2.- La placa ya sellada se coloca sobre una superficie perfec-

tamente nivelada y se les vacían encima 28 ml aproximadamente de gel de agarosa al 1.5% en amortiguador de barbital pH 8.6 - $\mu = 0.01$.

3.- Se deja solidificar el gel a temperatura ambiente y después la placa se coloca en el refrigerador por unos 20 minutos aproximadamente para lograr la solidificación completa del gel de agarosa.

4.- Mediante el cortador circular y guiándose por la plantilla se hacen tres filas pares de pozos, dejando una distancia de 5 mm entre los bordes de los dos pozos pares.

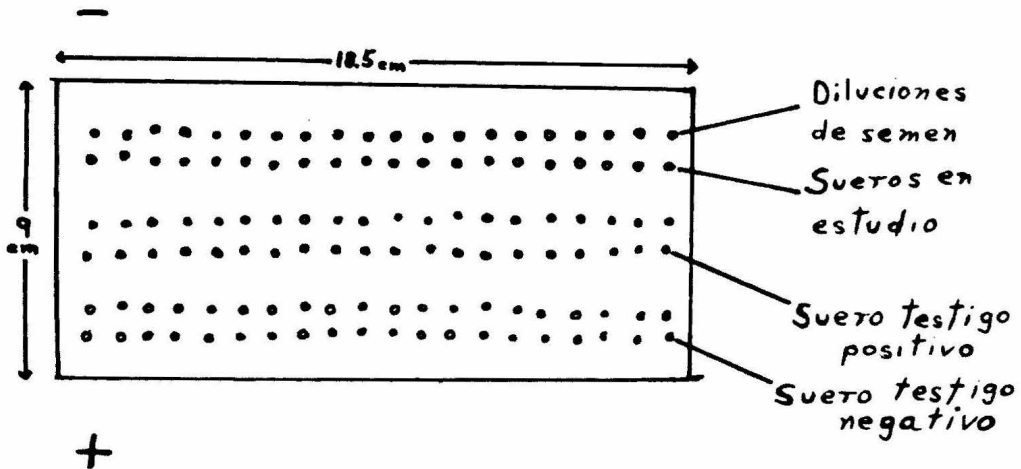


Fig. 5.- Dibujo esquemático de las placas para contrainmuno-electroforesis.

5.- Mediante un aplicador de madera roto, se retira el gel de los cortes.

Cargado de placas:

Por medio de pipetas capilares, se procede a llenar una fila horizontal de pozos con semen, empezando por la dilución más baja, hasta llegar a semen s/d, mientras que en la fi la de pozos opuestos se coloca el suero en estudio sin diluir. Los pozos deberán llenarse al ras de manera que no queden semi-llenos ni que tampoco se derrame su contenido.

Corrimiento electroforético:

- 1.- Los dos compartimientos de la cámara de electroforesis, se llenan con amortiguador de barbital pH 8.6 $\mu = 0.05$, que debe estar al mismo nivel en ambas secciones (este amortiguador se debe cambiar cada dos corrimientos electroforéticos).
- 2.- La placa ya cargada se coloca en el soporte de la cámara y se hace el contacto entre ella y el amortiguador mediante las tiras de papel filtro Whatman No. 1.
- 3.- Se conecta la cámara de electroforesis a la fuente de poder, colocando los sueros del lado del ánodo (+) y el semen del lado del cátodo (-).
- 4.- Se aplica corriente eléctrica durante 30 minutos a una intensidad de 160 v y a 16 mA.
- 5.- Una vez terminado el corrimiento electroforético, la placa se saca de la cámara y se hace la lectura observándola sobre un fondo oscuro y con iluminación lateral buscando las bandas de precipitación.

6.- La máxima dilución que nos presente aún una banda de precipitación definida, será el título de la reacción.

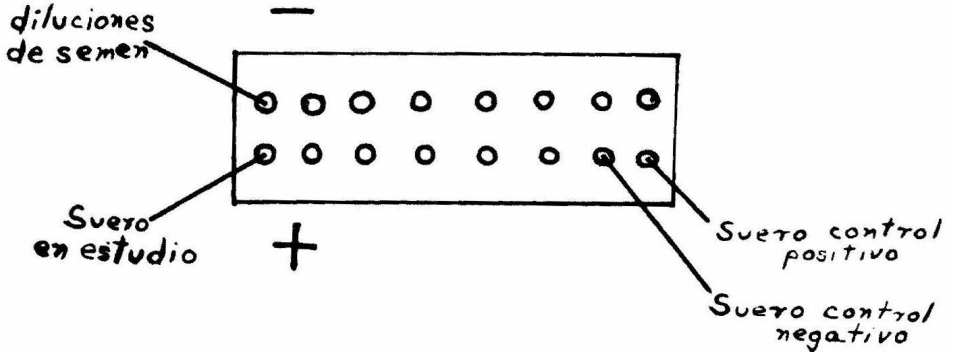
Cuando no se tienen suficientes muestras de sueros - como para llenar una placa, y con el objeto de poder aprovechar al máximo esa placa, hemos estado corriendo simultáneamente -- otros sueros para la detección de otro tipo de anticuerpos como son: para amiba, antígeno Australia y α_1 fetoproteína.

Ahora bién, en caso de tener una o dos muestras de - suero problema y no teniendo otro tipo de sueros que probar, - así como también con el fin de ahorrar agarosa, los corrimientos electroforéticos pueden realizarse en portaobjetos comunes, los cuales perfectamente limpios y desengrasados, se barnizan - mediante la brocha pequeña con el gel de agar al 2.5% en agua - hidestilada, y sobre una superficie nivelada se les vacían encima 4.5 ml de agarosa en amortiguador de barbital pH 8.6 = - $\mu = 0.01$, el cual se deja solidificar a temperatura ambiente y después se colocan en el refrigerador de 10 a 15 minutos para lograr la solidificación completa del gel de agarosa.

Con el cortador circular de metal y guiándose por la plantilla, se hacen en cada portaobjeto dos filas de 8 pozos - dejando una distancia de 5 mm entre los bordes de los pozos pares.

Una fila se llena con diluciones de semen y 6 pozos - de la fila opuesta se llenan con suero problema, otro pozo con un suero control negativo y el último con un suero control po-

sitivo.



El portaobjeto se coloca sobre una placa de vidrio común de 9 x 18.5 cm, ya que los soportes de la cámara de electroforesis están muy separados y se hace el contacto entre el portaobjeto y el amortiguador de la cámara mediante tiras de papel filtro Whatman No. 1 de 14 x 7.5 cm humedecidas en el amortiguador.

Se conecta la cámara a la fuente de poder, y se le aplica corriente eléctrica durante 30 minutos a una intensidad de 160 V y a 16 mA.

Cuando se ha terminado el corrimiento electroforético, se hace la lectura observando el portaobjeto sobre un fondo oscuro y con iluminación lateral buscando la formación de las bandas de precipitación.

Método de tinción:

En los casos en que las bandas de precipitación no son suficientemente claras o cuando se les quiere hacer más visibles para tomarles fotografías, se pueden teñir con negro de

amida. Para ello las placas de vidrio, los portaobjetos o lascajas de plástico, se lavan durante 24 hrs., con solución salina isotónica, cambiándola con frecuencia para eliminar todas las proteínas que no reaccionaron. Después de los lavados, se cubren durante 5 minutos con una solución de negro de amida -- preparada con 1.0g del colorante disuelto en una mezcla de 100 ml de ácido acético glacial y 900 ml de metanol. Después de la tinción se lavan con mezcla ácido acético-metanol (3/9) para eliminar el exceso de colorante y destacar las líneas de precipitación.

CAPITULO III.- R E S U L T A D O S.

No. de muestras.-	Doble difusión.	Contrainmuno- electroforesis.	Incremento en la sensi- bilidad.
54	negt.	negt.	---
1	negt.	1:8	8
4	negt.	1:16	16
2	negt.	1:32	32
1	negt.	1:64	64
1	1:1	1:32	32
1	1:1	1:64	64
1	1:8	1:64	8
2	1:16	1:128	8
1	1:16	1:256	16
1	1:32	1:512	16
4	1:32	1:1024	32
1	1:64	1:512	8
2	1:64	1:1024	16

CAPITULO IV./ C O N C L U S I O N E S.

- 1.- Tomando como base los resultados obtenidos, la contrainmuno electroforesis mostró ser 64 veces más sensible para la - detección de los anticuerpos antiesperma humano, que el mé todo de la doble difusión de Ouchterlony.
- 2.- La contrainmuno electroforesis mostró ser un método especí- fico, ya que al probarlo con sueros frescos de recién naci- dos se obtuvieron siempre resultados negativos.
- 3.- Se trata además de una técnica sencilla, que puede desarro- llarse fácilmente, la única desventaja es de que se requie- re de un aparato de electroforesis.
- 4.- Es también un método rápido, ya que en 40 minutos aproxima- damente puede obtenerse el resultado.
- 5.- Tiene la ventaja de que en una misma placa de gel pueden - correrse varias muestras, ya sea para la investigación de- los anticuerpos antiesperma, o para la detección de otro - tipo de anticuerpos, como por ejemplo: para amiba, antíge- no Australia y α_1 fetoproteína.
- 6.- En resumen, se trata de una técnica segura y de alta sensi- bilidad, de fácil aplicación en el laboratorio clínico.

CAPITULO V.-

B I B L I O G R A F I A.

- 1.- Baskin M.J., 1932. Temporary sterilization by the injection of human spermatozoa. Amer. J. Obstet. Gynec. 24:892.
- 2.- Boettcher B., 1968.- Correlation between human ABO blood -- group antigens in seminal plasma and on seminal spermatozoa. J. Reprod. Fert. 16:49.
- 3.- Edwards R. G., L. C. Ferguson and R.R.A. Coombs, 1964.- - - Blood group antigens on human spermatozoa. J. Reprod. Fer-- til. 7:153.
- 4.- Fernández-Collazo E. and E. Thierer, 1972.- Action of ABO - antisera on human spermatozoa. Fertil. Steril. 23:376.
- 5.- Franklin R.R. and C.D. Dukes, 1964.- Antispermatozoal anti body and unexplained infertility. Amer. J. Obstet. Gynec. - 89:6.
- 6.- Hekman A. and P. Rümke, 1968.- The antigens of human semi-- nal plasma. With special reference to lactoferrin as a - -- spermatozoa-coating antigen. Fertil. Steril. 20:312.
- 7.- Hirschhäuser C. and S. Baudner, 1972.- Immunologic locali-- zation of the human seminal plasma protease inhibitor in -- human spermatozoa. Fertil. Steril. 23:393.
- 8.- Landsteiner K. and P. Levine, 1926.- On group specific - -- substances in human spermatozoa. J. Immunol. 12:415.
- 9.- Leslie W.G., M.D. Quinlivan and R. Fox, 1966.- Antigen-anti body reactions with human semen. Fertil. Steril. 17:722.

- 10.-Lippiello L.A., F. El-Rubaye and A.J. Weil, 1968.- Human -- spermatozoa-coating antigen. Fertil. Steril. 19:991.
- 11.- Mancini R.E., M.D. Gutiérrez and E. Fernández-Collazo, - - 1971.- Immunohistochemical localization of antigens in hu-- man spermatozoa. Fertil. Steril. 22:475.
- 12.- Nakabayashi N.T., E.Tyler and A. Tyler, 1961.- Immunologic aspects of human infertility. Fertil. Steril. 12:544.
- 13.- Ouchterlony O., 1970.- Handbook of immunodifusion and in--- munolectroforesis. 1st Ed. Ann Arbor-Humphrey Science Pu-- blishers Inc. England.
- 14.- Quinlivan W.L.G., S.P. Masouredis, M.E. Dupuy and M. - -- Elliot, 1962.- Rho (D) antigen content of human spermato- - zoa. Immunology 5:267.
- 15.- Rangnekar K.N. and S.S. Rao, 1970.- The source of blood --- antigens on human spermatozoa and their significance. Int.- Arch. Allerg. 37:49.
- 16.- Rümke P.H. and G. Hellinga, 1959.- Autoantibodies against- spermatozoa in sterile men, Amer. J. Clin. Path. 32:357.
- 17.- Schultze H.E. and J.F. Heremans, 1966.- Molecular Biology of Human Proteins. Vol. I, 1st Ed. Elsevier Publishing Co., Amsterdam-London-New York, 848.
- 18.- Weil A.J., 1965.- The spermatozoa-coating antigen (SCA) - of the seminal vesicle. Ann. N.Y. Acad. Sci. 124:267.
- 19.- Weil A.J., 1967.- Antigens of the seminal plasma. J. Re- -

prod. Fertil. Suppl. 2:25.

20.-Weil A.J., Kotsevalov and L. Wilson, 1956.- Antigens of --
human seminal plasma. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92:606.

21.-Weil A.J. and Rodenburg J.M., 1962.- The seminal vesicle -
as the source of the spermatozoa-coating antigen of semi--
nal plasma. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109:567.

22.-Wilson L., 1954.- Sperm agglutinins in human semen and - -
blood. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85:652.