



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**EFECTO DE LA EXTIRPACION DE LAS VESICULAS
SEMINALES SOBRE LA RESPUESTA INMUNE EN
RATAS WISTAR (Rattus norvegicus)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A

MARIA DEL ROSARIO GONZALEZ VALLE

LOS REYES IZTACALA 1992

DEDICATORIA

A la memoria de mis abuelos:

Juanita e Isauro

por su ejemplo de honradez y amor.

A mi madre Columba por su amor durante toda mi vida, por ser madre y amiga, por tener siempre la palabra adecuada en cada momento, por ser modelo de virtud y de mujer.

A mi padre Gabino por su ejemplo y amor. Por hacer de mi vida lo que es y por todos sus sacrificios para la terminación de mis estudios.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar al M.C. José Rafael Jiménez Flores por haber dirigido esta tesis, así como por su invaluable cooperación, apoyo, ayuda y amistad.

A la M. en C. Leticia Moreno Fierros por el apoyo brindado para la terminación de esta tesis y por sus valiosos comentarios y revisión de la misma y a todo el personal del laboratorio del Dr. Fernando Enriquez Rincón del CINVESTAV.

Muy especialmente quiero hacer un reconocimiento al M.V.Z. Alfredo Ramírez Rubio y al P. de Biol. Manuel Benitez Soto por su valiosa amistad, consejos, cooperación, y ayuda durante el trabajo más pesado; ya que sin ellos no hubiera podido llegar a su termino la presente tesis.

A los revisores; por sus valiosos comentarios: M. en C. Martha O. Salcedo Alvarez, M. en C. Ramón Moreno y Biol. Julia Reyes Realí.

A la QBP Bertha Hashimoto por la sugerencia del tema de tesis y por todas sus enseñanzas como profesor, persona y amiga.

Al P. de Biol. Hugo Perales Vela por el apoyo, ayuda y amistad en todos los momentos; y muy especialmente al Biol. Rodolfo García Collazo por la transcripción de la presente; pero sobre todo por su amor, comprensión y apoyo.

I N D I C E

RESUMEN	
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	5
OBJETIVOS	10
METODOLOGIA	
- Modelo Experimental	12
- Inmunización	15
- Cuantificación de la respuesta a el antígeno particulado	17
- Cuantificación de la respuesta a el antígeno soluble	19
- Elisa directo (Titulo del conjugado)	21
- Elisa Indirecto (Cuantificación de la respuesta a la Ovoalbumina)	22
- Inmunodifusión doble "Método de öucherlony" (Cuantificación de la respuesta a la OVA)	24
RESULTADOS	25
DISCUSION	34
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFIA	43
APENDICE I	
- Soluciones	46
- Metodologias complementarias	48
- Instrumentos de Trabajo	51
APENDICE II	
- Abreviaturas	52

RESUMEN

Se utilizaron ratas Wistar macho (Rattus norvegicus) para estudiar el efecto de la extirpación de las vesículas seminales sobre la respuesta inmune primaria (IgM) para un antígeno particulado Glóbulos rojos de Carnero (GRC) y a un antígeno soluble Ovoalbumina (OVA) en una respuesta secundaria (IgG). Las ratas fueron separadas por edades 6, 9 y 12 meses. La respuesta a el antígeno particulado GRC se cuantificó por el método de Jerne modificado por Cunningham en células esplénicas; y la respuesta a el antígeno soluble (OVA) se cuantificó por el método de Elisa, midiendo el anticuerpo obtenido del suero hasta una dilución de 1:14000. Los resultados mostraron que la vesiculotomía seminal disminuye la respuesta primaria a un antígeno particulado (GRC) y secundaria a un antígeno soluble (OVA); además se comprobó que la edad influye en la calidad de la respuesta inmune (a mayor edad menor respuesta) para el antígeno particulado, pero este cambio no se demostró con la ovoalbumina.

INTRODUCCION

La evidencia acumulada establece que el sistema neuroendocrino puede modificar las funciones inmunes, demostrado através de diferentes trabajos experimentales, por ejemplo al extirpar o lesionar alguna de las glándulas del sistema neuroendocrino. Se provocan alteraciones en la competencia inmunológica del organismo (1,2,3,4). Así mismo se conocian cambios en el funcionamiento y organización del sistema inmune y en la diferenciación de las células T, B y macrófagos, por cambios en las concentraciones hormonales (1,2,3,4,5). Recientemente se observó la producción de hormonas, neuropéptidos y receptores hormonales por células del sistema inmune, propiciándose así las bases de estas interacciones, sugiriendo por lo tanto la existencia de un control recíproco, donde el sistema inmune también pueda modificar funciones neuroendocrinas formándose así un circuito bidireccional (1).

Los estrógenos y la testosterona son algunas de las hormonas relacionadas con el funcionamiento del sistema inmunocompetente, las cuales pueden modular, suprimir o estimular la actividad de la respuesta inmune. Se ha comprobado, que el balance hormonal influye en la actividad de linfocitos B, linfocitos T y células asesinas naturales (NK) de hembras y machos de ratón. Evidencias de estos cambios son las siguientes: experimentalmente se ha demostrado la presencia de receptores para estrógenos en la

membrana de las células mononucleares del bazo y timo; los receptores encontrados se han caracterizado y se sabe son proteínas. Una estimulación débil de los receptores estrogénicos para el 17- β estradiol sobre células NK disminuye el número de precursores de estas células (2). Así mismo se comprobó la presencia de receptores para andrógenos en timocitos maduros humanos en cultivo, al disminuir su actividad por adición de dihidrotestosterona (2,5,6,7,8,9).

Los estrógenos estimulan aumento en la producción de hemolisina, aumento en el índice fagocítico y modulación en la actividad y maduración de células T, los andrógenos estimulan la maduración y diferenciación de células B, así como la actividad de las células del epitelio tímico (2,5,6,7,8,9).

Además el efecto de las hormonas sexuales puede modificar la actividad de otras glándulas tan distantes como las submandibulares las cuales tienen acción supresora sobre el tejido linfoide. (10) Además el timo y el bazo involucionan por efecto de andrógenos y estrógenos, así como órganos linfoides periféricos pueden disminuir su población celular (2,5,6,7,10,11,12,13)

Evidencias directas e indirectas establecen diferencias entre ambos sexos en relación a la respuesta inmune. Por lo que se han postulado dos hipótesis para poder explicarlas. La primera

hace alusión a la existencia de genes activos ligados al cromosoma "X"; los cuáles deben regular las distintas clases de inmunoglobulinas, (14) la segunda hipótesis establece que la diferencia en la respuesta inmune entre hembras y machos es debida a los distintos tipos de hormonas sexuales que secretan (9,13,14,15)

De las diferencias que existen entre un sexo y otro en su respuesta inmune, se sabe que las hembras tienen aumentada la capacidad de responder de sus timocitos, son mas eficaces en presentar el antígeno, tienen mayor facilidad de reconocimiento de antígenos de histocompatibilidad, reacciones mixtas de linfocitos y en general son mas eficaces ante una respuesta primaria o secundaria de antígenos timo dependientes y timo independientes. Pero las hembras también tienen aumentada la susceptibilidad para presentar autoinmunidad producida por anticuerpos circulantes, así como por complejos inmunes (2,3,5,6,9,11,13,14).

Los machos aceptan aloinjertos más facilmente, su capacidad de tolerancia es mayor, aunque son más susceptibles a infecciones, bacterias patógenas y a inmunodeficiencias (2,3,5,6,11,13,14).

El semen de mamíferos macho ejerce un efecto supresor local sobre la respuesta inmune de la hembra durante el coito, para que

pueda llevarse a cabo la fecundación; lo cual se ha comprobado de manera indirecta (in vitro) al provocar por la adición de extractos de semen, supresión en la proliferación de células B y T, supresión de la actividad de células NK e inhibición de la actividad fagocítica de macrófagos. El efecto supresor se da por la acción de factores producidos por órganos secretores accesorios del tracto reproductivo (epidídimo, próstata y vesículas seminales) que conforman el plasma seminal, el cual es dependiente de los niveles de testosterona circulante (4,15,16,17,18,19).

ANTECEDENTES

Diferentes investigaciones han demostrado que secreciones del tracto reproductor de los machos contienen factores supresores sobre gran variedad de funciones inmunológicas. Dichas secreciones se producen en lugares específicos a partir de la pubertad y son dependientes de andrógenos; dan protección al esperma a lo largo del tracto genital de la hembra, por supresión de la proliferación de células B y T; en los casos donde la supresión es deficiente se manifiesta sensibilización inmunológica (4,14,15,16,17,18,19,20,21).

Los factores supresores se encuentran en el plasma seminal el cual además de proporcionar un vehículo de transporte para el esperma durante el coito, forma una mezcla de componentes protéicos, lipídicos y glucosídicos ricos en fructosa, zinc, iodo, ácido acético, inositol, endorfinas, prostaglandinas, proteasas y enzimas hidrolíticas que contribuyen en la función del esperma durante la fertilización (15,16,19,22). Así mismo fluidos de próstata, epididimo y vesículas seminales (Tabla No.1) (23) tienen efecto supresor en la estimulación de células T, blastogénesis de esplenocitos y propiedades de macrófagos (15,16,19,20,22,24).

El plasma seminal tiene capacidad de suprimir "in vivo" e "in vitro" la respuesta inmune, la acción citolítica y de opsonización del complemento e incluso anticuerpos contra

esperma; la falta de estos inmunosupresores, así como su decremento provoca ciertos tipos de infertilidad. Estos inmunosupresores también contribuyen a la proliferación de bacterias, virus y neoplasias, tanto en el tracto reproductor de machos como en la vagina de hembras, donde además, se les atribuye actividad antitumoral. Por lo tanto es posible que el plasma seminal favorezca al desarrollo de infecciones virales por modificación de barreras de primer contacto y mecanismos específicos locales (4,14,15,16,20,21,22).

Reportes recientes muestran evidencia de la supresión del plasma seminal humano en células citotóxicas y NK in vitro. En ratones el plasma seminal ejerce supresión in vivo sobre la respuesta inmune primaria y secundaria, independientemente de la dosis del antígeno; proteínas del sistema del complemento, así como las células NK y macrófagos ven reducida su actividad (4,15,16,21).

Hasta el momento sólo se tiene descrita la función de supresión del plasma seminal, pero el mecanismo y la identificación del factor o factores que la ocasionan no están bien establecidos. Algunos trabajos como el de Marcus y colaboradores (1986) (15) reportan que la actividad supresora está en 2 ó 5 fracciones que encontró al purificar por gel el plasma seminal. Anderson (1982) (15) también estima y sugiere la presencia de dos o más factores inmunosupresores. Así mismo

Tarter y colaboradores (1986) (16) purificaron el extracto lipídico del plasma seminal y observaron que tiene efecto supresor sobre la actividad citotóxica de las células NK; por cromatografía se demostró la presencia de prostaglandinas a las que se les atribuyó acción supresora (20). Las prostaglandinas encontradas son la 19 hidoxiprostaglandina E 1 y 2 (19-OH-PGE1 y 19-OH-PGE2), las cuales se encuentran en alta concentración en el semen de primates. Es sugerente que la PGE2 tiene influencia negativa sobre la actividad citotóxica de las células NK y la 19-OH-PGE1 probablemente afecta la diferenciación inducida por interferón en estas células; se piensa que la actividad de células NK esta regulada relativamente de manera endógena por α -interferón (4,15,16,20).

Experimentalmente se ha comprobado que el fluido prostático de ratones inhibe la hemólisis mediada por complemento; los fluidos de epidídimo y vesículas seminales inhiben la acción de mitógenos sobre células T (15,24). Siendo el fluido de las vesículas seminales el más potente, ya que actúa por mecanismos distintos a los otros fluidos y aparentemente afecta intracelularmente de manera irreversible eventos donde se requiere síntesis de ADN (15). El fluido de las vesículas seminales inhibe la blastogénesis de células aisladas del bazo (15,24).

Se han purificado de las vesículas seminales algunos

factores como formas de bajo peso molecular, varias proteínas como la serie de proteínas SV-I a la SV-VI y las prostaglandinas E (19,21,22).

De las vesículas seminales proviene la mayor parte de las proteínas secretadas del plasma seminal humano, las cuales entre otras funciones contribuyen a la alcalinización de las secreciones vaginales, propiciando el pH adecuado para el esperma (19,22).

Una de estas proteínas secretada en grandes cantidades por el lumen de las vesículas seminales de rata es llamada SV-IV transcrita bajo control androgénico (19,22); tiene actividad inmunosupresora no especie específica, inhibe algunas propiedades de los macrófagos como quimiotaxis, fagocitosis y presentación del antígeno, así mismo tiene la capacidad de evitar la liberación masiva de mediadores de la inflamación (20,21,22,24).

García Tamayo y colaboradores en 1989 (4) estudiaron en ratas Wistar macho el efecto de la extirpación de las vesículas seminales al inmunizar las ratas intraperitonealmente con globulos rojos de carnero (GRC) cuando tenían edades entre 1 y 6 meses de edad, sacrificadas mas tarde para medir la respuesta de anticuerpos anti-GRC según la técnica de Cunningham. Obtuvieron reducción significativa en las células formadoras de anticuerpos (CFA), además, encontraron que las diferencias eran mayores a los

5 y 6 meses de edad. Posteriormente en 1991 el mismo grupo de investigadores (25) observaron que la falta de las vesículas seminales modificaba la resistencia de ratones Balb/c a la infección con Taenia crassiceps. Los resultados mostraron que a los 4 y 5 meses de la extirpación de las vesículas seminales, los animales duplicaban sus cargas parasitarias intraperitoneales y su respuesta inmune estaba alterada en forma independiente a la cisticercosis, así como sus reacciones de hipersensibilidad tardía y la respuesta de anticuerpos contra los antígenos del cisticerco estaban disminuidas. Por lo que ellos han concluido como resultado de sus trabajos que esto se debe a interacciones entre el sistema inmunitario y gonadal.

De acuerdo a la bibliografía reportada observamos que los fluidos de las glándulas accesorias al tracto reproductor masculino son de vital importancia para la fertilización, y que además, estos fluidos por sí solos son capaces de modificar el funcionamiento de la respuesta inmune. Pero es García y colaboradores quienes cuestionan el efecto de la extirpación de las vesículas seminales sobre la respuesta inmune, y este trabajo más que responder a esta interrogante, plantea nuevas preguntas, debido en gran parte por la aparente contradicción en la que cae, ya que de acuerdo a lo reportado por algunos autores, se esperaría encontrar que al practicar la vesiculotomía seminal la respuesta inmune aumentara, lo cual no ocurre y ya fue demostrado

por García Tamayo y colaboradores en 1989 y 1991 (4,25); estos artículos motivaron mi interés de ampliar estas observaciones y plantear un modelo experimental donde se estudiaron ratas de 6, 9 y 12 meses de edad, ya que según García T. y colaboradores (4,25) es a los 6 meses donde se observa mejor el efecto de la vesiculotomía seminal.

Por lo cual se plantearon los siguientes objetivos de la tesis.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Observar el efecto que sobre la respuesta inmune tiene la extirpación de las vesículas seminales en ratas Wistar cuando se inmuniza con antígenos soluble y particulado a 6, 9 y 12 meses de edad.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la producción de anticuerpos de clase IgM en células esplénicas contra un antígeno particulado (GRC), en ratas sin vesículas seminales, con cirugía y control de 6, 9 y 12 meses de edad.

Evaluar la producción de anticuerpos de clase IgG contra un antígeno soluble (OVA), en ratas sin vesículas seminales, con cirugía y control de 6, 9 y 12 meses de edad.

TABLA No.1 : Composición de la secreción de las vesículas seminales en humanos.

Componente	Valores normales por 100 ml
pH	7.29
Agua	89.0 g / 100 g
Potasio	17.8 meq/l
Fósforo	14.7 meq/l
Nitrógeno total	1280 mg
Nitrógeno no proteico	99 mg
Proteínas	7780 mg
Fructosa	315 mg
Acido citrico	125 mg
Vitamina C	5 mg

El índice de sodio en la secreción de las vesículas seminales es bajo, y elevado el de bicarbonato. El color amarillo de esta secreción se debe a la presencia de flavinas. Contiene algo de ergotioneína, generalmente menos de 0.1% de inositol y cantidades importantes de fructosa (en ratas no hay fructosa y en su lugar existe ácido cítrico), prostaglandinas y ácido ascórbico.

METODOLOGIA

MODELO EXPERIMENTAL

Se usaron 40 ratas macho Wistar (Rattus norvegicus) de 23 ± 2 días de edad, como modelo experimental repartidas en 8 grupos de 5 ratas cada uno y sacrificadas a los 6,9 y 12 meses de haber sido incluidas en el proyecto.

Se utilizaron 3 tratamientos diferentes; el primero formado por ratas sin vesículas seminales (A) como grupo experimental, el segundo fueron ratas con cirugía en la región abdominal y simulación de la extirpación de las vesículas seminales (B) como control para eliminar el efecto de la cirugía y el tercero fue formado con ratas que constituyeron el grupo control (C). los 3 grupos subdivididos en edades de 6, 9 y 12 meses. Se utilizaron para todos los grupos 2 antígenos para evidenciar el efecto de la vesiculotomía seminal, el antígeno particulado utilizado fue globulos rojos de carnero (GRC), cuantificando la respuesta primaria (IgM) en células esplénicas por la técnica de Jerne modificada por Cunningham, y el otro antígeno soluble la Ovoalbumina (OVA), cuantificando una respuesta secundaria (IgG) en suero, por el método de Elisa.

6 meses	9 meses	12 meses
A1 sin vesículas seminales	A2 sin vesículas seminales	A3 sin vesículas seminales
B1 * * *	B2 con vesículas seminales y cirugía	B3 con vesículas seminales y cirugía
C1 control	C2 control	C3 control

Se usó ketamina como anestésico, ajustándose la dosis a 135 mg por kg de peso; vía intraperitoneal, con efecto anestésico de 30 min. en promedio (26,27).

Las ratas del grupo A de 6,9 y 12 meses fueron sometidas a cirugía para extirparles las vesículas seminales.

Al grupo B de 9 y 12 meses se le practicó cirugía en la región ventro medial sin la extirpación de las vesículas seminales.

Para realizar la cirugía se colocaron a las ratas anestesiadas en un soporte especialmente diseñado (ver apéndice I) en posición supina y con inclinación cefálica. La cirugía en todos los casos se realizó previa depilación con Tioglicolato de Calcio en la región ventral del abdomen y antisepsia con benzal, se realizó una insición media de aproximadamente 2-3 cm de longitud, se incidió hasta cavidad abdominal, se identificaron las vesículas seminales, se traccionaron y se realizó un corte lo

más cercano a su base, verificando de no provocar sangrado, generalmente no se requirió de puntos hemostáticos y la pared abdominal se suturó en un sólo plano con puntos de Sarnoff con Dermalon 000.

El grupo C control de 6,9 y 12 meses no fue manipulado.

Todas las ratas fueron colocadas en el mismo ambiente:

FOTOPERIODO : 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

TEMPERATURA : 22 a 25 grados Celsius.

ALIMENTO : balanceado comercial marca purina. Ad libitum.

AGUA : hervida, esteril o con antibacteriano. Ad libitum.

CAMAS : aserrín estéril.

JAULAS : lavadas con agua iodada al 1%

INMUNIZACION

El esquema de inmunización fue programado de manera que se sacrificara una rata por día, se utilizaron dos antígenos, OVOALBUMINA (SIGMA No. A-5378) (OVA antígeno soluble) y GLOBULOS ROJOS DE CARNERO (ERIKAR Sangre de carnero desfibrinada en Citrato de Sodio) (GRC antígeno particulado).

Para el antígeno soluble (OVA) se realizaron cuatro inmunizaciones los días 0, 7, 14 y 21. Considerando el día 0, 30 días antes del sacrificio.

Para la primera inmunización se emulsificó adyuvante completo de Freund (SIGMA No.F-4258) (con OVA al 5%, 0.5 ml de cada uno para tener 1 ml; aplicado vía subcutánea en las cuatro regiones inguinales y el tórax.

En la segunda inmunización se usó adyuvante incompleto de Freund (SIGMA No.F-5506) y OVA al 5%, 0.5 ml de cada uno, aplicado de la misma forma que la primera inmunización.

La tercera y cuarta inmunización se realizó utilizando 1 ml de OVA al 1%, vía intravenosa.

El antígeno particulado se aplicó en una sola dosis, 1 ml de GRC al 10% vía intraperitoneal el día 23.

El sacrificio se realizó el día 30 de acuerdo al grupo al

cumplir: 6,9 y 12 meses, para obtención de células esplénicas y suero.

Al término del plazo, las ratas fueron anestesiadas con éter y depiladas con Tioglicolato de Calcio; se les practicó esplenectomía en condiciones de esterilidad cuidando de no provocar sangrado mediante hemostasis con pinza de Kelly o Craig en la arteria y vena esplénica.

Posteriormente se disecó la aorta abdominal en su porción terminal y se cateterizó con aguja hipodérmica del No. 20 para sangrado al blanco.

CUANTIFICACION DE LA RESPUESTA A EL ANTIGENO PARTICULADO

CUENTA DE CELULAS FORMADORAS DE PLACA (Técnica de Jerne modificada por Cunningham). Para cuantificar la respuesta al antígeno particulado.

Una vez obtenido el bazo se lavó con solución salina isotónica. Se tomó con pinzas y se colocó en un tamiz de organza, inyectándole 10 ml de solución de Hank, se practicó un corte transversal medio, obteniéndose dos porciones las cuáles fueron suavemente presionadas contra el tamiz, con ayuda de un émbolo de jeringa. La suspensión celular obtenida fue tamizada tres veces y centrifugada 10 min. a 2000 rpm.

A la pastilla celular se le aplicó un choque hipotónico con 3 ml de agua destilada fría resuspendiendo gentilmente 5 segundos y llevada a un volumen de 10 ml con solución de Hank.

Se centrifugó nuevamente 5 min. a 1500 rpm y el paquete celular obtenido fue resuspendido en 2 ml de solución de Hank.

Se sacó el porcentaje de viabilidad por incorporación de azul tripan y el número total de células se cuantificó en el hemocitómetro. Para ajustar la suspensión celular a 5 millones de células por ml.

Se tomaron 250 μ l de la suspensión celular ajustada y se mezcló con 150 μ l de GRC al 20% y 250 μ l de suero de cobayo sin diluir como fuente de complemento.

Con esta mezcla se llenaron las cámaras (ver apéndice I) dejándolas en incubación 10 min. a 37 grados Celsius y posteriormente se realizó el conteo de células formadoras de anticuerpos (28).

CUANTIFICACION DE LA RESPUESTA A EL ANTIGENO SOLUBLE

PREPARACION DEL CONJUGADO (Método para activación de peroxidasa por glutaraldehído).

Se disolviéron 10 mg de peroxidasa tipo VI (RZ-3.0) en 0.2ml de Buffer de Fosfatos 0.1 M a pH de 6.8 conteniendo 1.25% de glutaraldehído. Fue incubada la mezcla durante 12 horas a temperatura ambiente.

Se dializó dos días en bolsa de celulosa con poro 0.32 contra solución salina fisiológica (0.85%) con 2 cambios diarios, a 4 grados Celsius, para remover el glutaraldehído que no activó la peroxidasa.

Se mezcló 1 ml de la fracción gamma globulina (anti-gammaglobulina G de rata 5 mg/ml en Fosfatos salina) con 1 ml de la solución de peroxidasa activada y 0.1ml de Buffer carbonato-bicarbonato 1 M a pH de 9.5, la mezcla se incubó a 4 grados Celsius 24 horas.

Se agregó al conjugado 0.1 ml de Lisina 0.2 M y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se dializó en Fosfatos salina a pH de 7.2 durante 12 horas a 4 grados Celsius (a fin de bloquear los sitios libres de la enzima).

Se precipitó el conjugado (gamma globulina unida a la enzima) al adicionar un volumen igual de solución de sulfato de amonio saturado, e incubando 10 min. a temperatura ambiente, después se centrifugó el precipitado 15 min a 10000 rpm. Se diluyó la pastilla con sulfato de amonio al 50% de saturación llevándolo al volumen original al igual que al sobrenadante para verificar que no había ya gamma globulina. El precipitado se dejó incubando 10 min. a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 rpm 15 min. La pastilla se precipitó con sulfato de amonio al 50% de saturación, se incubó y se centrifugó de la manera indicada; finalmente se diluyó la pastilla en 1ml de Fosfatos salina. Se dejó dializándolo con Fosfatos salina a pH de 7.2 a 4 grados Celsius 2 días realizando 2 cambios diarios para eliminar el sulfato de amonio que pudiera haberse quedado.

El conjugado dializado fue centrifugado a 10000 rpm durante 20 min. y se esterilizó por filtración (filtro millipore 0.22 μ m), le fue adicionado un volumen igual de glicerol como conservador y se guardo a 4 grados Celsius hasta que fue utilizado (29).

ELISA DIRECTO (Titulo del conjugado)

Se utilizó una placa de 96 pozos para Elisa de poliestireno (NUNC) a la que se le agregaron 100 μ l de gama globulina de rata dejándose en incubación 2 días a 4 grados Celsius.

Se desechó la gama globulina de la placa y esta fue lavada 3 veces con Buffer fosfatos salina Tween al 0.05% pH de 7.4 (PBS-T). Se sacudió la placa para evitar que quedaran restos de PBS-T.

Se bloqueó la placa con 100 μ l de gelatina al 1% en PBS-T durante 1 hora a 37 grados Celsius. Se lavó la placa de la manera indicada anteriormente con PBS-T.

Se agregaron 100 μ l por pozo de las diluciones del conjugado en PBS-T antigama globulina G de rata-peroxidasa (1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:6000, 1:8000, 1:10000, 1:12000, 1:16000, 1:24000, 1:32000, 1:48000 y 1:64000) y se incubó la placa 2 horas a 37 grados Celsius en oscuridad. Se lavó la placa con PBS-T.

Se agregó 100 μ l de sustrato por pozo y se incubó en oscuridad 10 min. a temperatura ambiente. Se paró la reacción enzima--sustrato con 25 μ l de ácido sulfurico 4N y se leyó a 492 nm (29).

El título del conjugado fue 1:10000.

ELISA INDIRECTO (Cuantificación de la respuesta a la OVA)

Se utilizaron placas de 96 pozos para Elisa (NUNC y CORNING) las cuales fueron cubiertas con la OVA 20 µg en 100 µl en Buffer de fosfatos por cada pozo durante 3 horas a 37 grados Celsius.

Se lavó la placa con Buffer fosfatos salina Tween al 0.05% pH de 7.4 (PBS-T) 3 veces. Se sacudió la placa para eliminar restos de PBS-T.

La placa fue bloqueada con gelatina y albumina sérica bovina al 1% en PBS-T a 4 grados Celsius 12 horas. Se quitó la gelatina y albumina sérica bovina con PBS-T caliente y lavando nuevamente con PBS-T.

Se pusieron 100 µl de las diluciones del suero problema durante 3 horas a 37 grados Celsius (1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:10000, 1:12000, 1:14000 y 1:16000).

Se lavó la placa con PBS-T.

Se colocaron 100 µl del conjugado por pozo (antigama globulina G de Rata-Peroxidasa) a una dilución de 1:10000 y se incubó 12 horas a 4 grados Celsius.

Se lavó la placa de la manera indicada con PBS-T.

Se pusieron 100 µl de sustrato por pozo y se incubó 4 min. a temperatura ambiente. La reacción enzima--sustrato fue detenida

con 25 μ l de ácido sulfúrico 4N. Se realizaron las lecturas a 492 nm (29).

INMUNODIFUSION DOBLE "METODO DE ÖUCHTERLONY" (Cuantificación de la respuesta a la OVA).

Se barnizaron placas de cristal desengarsadas con una solución de agarosa al 0.1% y se dejaron desecar a temperatura ambiente.

Las placas secas fueron cubiertas con un solución de agarosa al 1% en solución salina pH 7.2 y se dejaron gelificar a 4 grados Celsius.

Se realizaron las perforaciones en el gel, removiendo con un aplicador el agar residual.

Se hicieron 6 pozos; 5 de ellos formando un círculo y llenados con los sueros problema, el pozo restante fué hecho en el centro y llenado con el antígeno (OVA).

Se incubaron a 4 grados Celsius durante 48 horas y se observaron las bandas de precipitación formadas (33).

RESULTADOS

A partir de las células aisladas del bazo se determinaron células formadoras de anticuerpos (CFA) de clase IgM en una respuesta primaria contra un antígeno particulado como los glóbulos rojos de carnero (GRC) utilizando la técnica de Jerne modificada por Cunningham (28) de una suspensión de 5 millones de células esplénicas por ml. Al realizar el conteo de CFA para los 8 grupos de ratas observamos que las cuentas de CFA de las ratas sin vesículas seminales a los 6, 9 y 12 meses de edad son menores que las cuentas de CFA de las ratas control y de las ratas que se les practicó cirugía abdominal a los 6, 9 y 12 meses. (Tabla No. 2 y gráfica No. 1)

A los 6 meses de edad las ratas con vesiculotomía seminal (A1) no muestran cuentas diferentes a las de las ratas de 9 meses con vesiculotomía seminal (A2) pero es notorio el decremento en la cantidad de CFA en ratas de 12 meses vesiculotomizadas (A3). Las ratas control de 9 meses (C2) muestran las cuentas mayores de CFA comparadas con las ratas control de 6 y 12 meses (C1 y C3), donde también observamos la mayor de las diferencias con respecto a la edad. Esto se reafirma al observar las cuentas de CFA de las ratas con cirugía y sin extirpación de las vesículas seminales de 9 y 12 meses (B2 y B3) donde nuevamente se observa una mejor respuesta a los 9 meses (B2) que a los 12 meses (B3) (Tabla No. 2 y gráfica No. 1).

Al realizar la prueba de ANOVA de 2 factores se confirmó lo anteriormente escrito donde se observa diferencia significativa entre las ratas vesiculotomizadas, ratas control y ratas con cirugía abdominal y sin extirpación de las vesículas seminales al cuantificar la respuesta primaria a un antígeno particulado (GRC) con una $P > 0.01$; ya que la F calculada (25.414) fue mayor que la F de tablas tanto para 90, 95 y 99 de confianza ($0.10=2.49$, $0.05=3.32$ y $0.01=5.39$); así mismo al observar las cuentas de CFA y los datos que da la prueba de ANOVA, vemos que las edades estudiadas de 6, 9 y 12 meses tienen diferencias significativas con una $P > 0.01$; en este caso la F calculada (52.844) también es mayor que la F de tablas para 90, 95 y 99 de confianza ($0.10=2.49$, $0.05=3.32$ y $0.01=5.39$). Además el mismo estadístico muestra que no existe interacción entre la edad y el tratamiento ya que la F de tablas ($0.10=2.14$, $0.05=2.69$ y $0.01=4.02$) fue mayor en estos casos con respecto a la F calculada (1.320).

La tabla No.4 y la gráfica No. 2 muestran la absorbancia a 492 nm de anticuerpos de clase IgG en una respuesta secundaria contra un antígeno soluble como la OVA en una dilución 1:14000 del suero de las ratas que conforman los grupos de estudio, medidos por la técnica de Elisa (29). Las ratas sin vesículas seminales (A) tienen una absorbancia menor de anticuerpos anti-OVA que las ratas control (C) y con cirugía sin extirpación de las vesículas seminales (B) a los 6 y 9 meses; pero a los 12

meses el grupo control (C3) es el que muestra la absorbancia menor de anticuerpos contra OVA, le sigue el de las ratas sin vesículas seminales (A3) y la absorbancia mayor de anticuerpos anti-OVA en esta edad es para las ratas con cirugía abdominal (B3).

La prueba de ANOVA de 2 factores realizada, muestra que realmente existe diferencia significativa entre los tratamientos (Vesiculotomía seminal, cirugía y control) ya que la F calculada (4.422) es mayor que la F de tablas para 90 (0.10=2.39) y 95 (0.05=3.15) de confianza por lo que tiene una $P < 0.01$. Además el estadístico demuestra tal como se observa en la gráfica No. 2 que no existe diferencia significativa para la absorbancia de la IgG anti OVA a las edades de 6, 9 y 12 meses porque su F calculada (0.273) es menor para 90 (0.10=2.39), 95 (0.05=3.15) y 99 (0.01=4.98) de confianza. Pero existe interacción entre el tratamiento y la edad (F calculada = 2.333) para 90 (0.10=2.04), 95 (0.05=2.53) y 99 (0.01=3.65) de confianza con una $P > 0.10$ (ya que la F calculada es mayor que la F de tablas).

El método Ouchterlony (33) evidenció la presencia en suero de anticuerpos totales anti-OVA en las ratas que componen todos los grupos de estudio.

TABLA No.2 : Media y desviación de las células formadoras de anticuerpos (CFA) contra glóbulos rojos (GRC), de una suspensión de 5 millones de células esplénicas por ml.

Meses de edad	A sin vesículas seminales	B con cirugía	C control
6	A1=236198 ± 37532		C1=450817 ± 91451
9	A2=260847 ± 112804	B2=631738 ± 183831	C2=848528 ± 253572
12	A3=71034 ± 15213	B3=116449 ± 40322	C3=227077 ± 86073

TABLA No. 3 : Resultados de la prueba de ANOVA de dos factores para las células formadoras de anticuerpos (CFA) de clase IgM contra glóbulos rojos de carnero (GRC). Debido a que las varianzas no son homogéneas se realizó la transformación logarítmica.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada
Experimentación	8	1649411.470		
Factor Tratamiento	2	537255.857	268627.929	F=23.861 *
Factor Edad	2	1017696.312	508848.156	F=45.199 *
Interacción edad y tratamiento	4	94459.301	23614.825	F=2.098 **
Error	30	337738.040	11257.935	
Total	38	1987149.510		

* Para el factor tratamiento y edad la F calculada fue 23.861 y 45.199 respectivamente mucho mayores que las F de tablas.

F (2,30) para 0.10 =2.49 , para 0.05=3.32 y para 0.01=5.39 con una P >0.01.

** La interacción de la edad y el tratamiento da una F de 2.098 y los F de tablas fueron mayores.

F (4,30) para 0.10=2.14, para 0.05=2.69 y para 0.01=4.02, por lo que no hay diferencia significativa.

TABLA No. 4 : Media y desviación estandar de la absorbancia de el titulo de anticuerpos IgG contra Ovoalbumina (OVA) dilución 1:14000

Meses de edad	A sin vesiculas seminales	B con cirugía	C control
6	A1=1.2383 ± 0.385		C1=1.5381 ± 0.259
9	A2=1.0553 ± 0.341	B2=1.4509 ± 0.512	C2=1.6327 ± 0.449
12	A3=1.4226 ± 0.458	B3=1.7249 ± 0.414	C3=1.2621 ± 0.352

TABLA No. 5 : Valores de la tabla de ANOVA de dos factores para la absorbancia de el titulo de anticuerpos IgG contra ovoalbumina (OVA) dilución 1:14000. Se realizó la transformación de raíz cuadrada para que las varianzas fueran homogéneas.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada
Experimentación	8	0.616		
Factor Tratamiento	2	0.292	0.146	F=4.422 *
Factor Edad	2	0.018	0.009	F=0.273 *
Interacción Tratamiento y edad	4	0.306	0.077	F=2.337 **
Error	69	2.273	0.033	
Total	77	2.889		

* La F calculada para el tratamiento (4.422) fué mayor que las F de tablas, con una P <0.01

F (2,69) para 0.10 =2.39 , para 0.05=3.15 y para 0.01=4.9

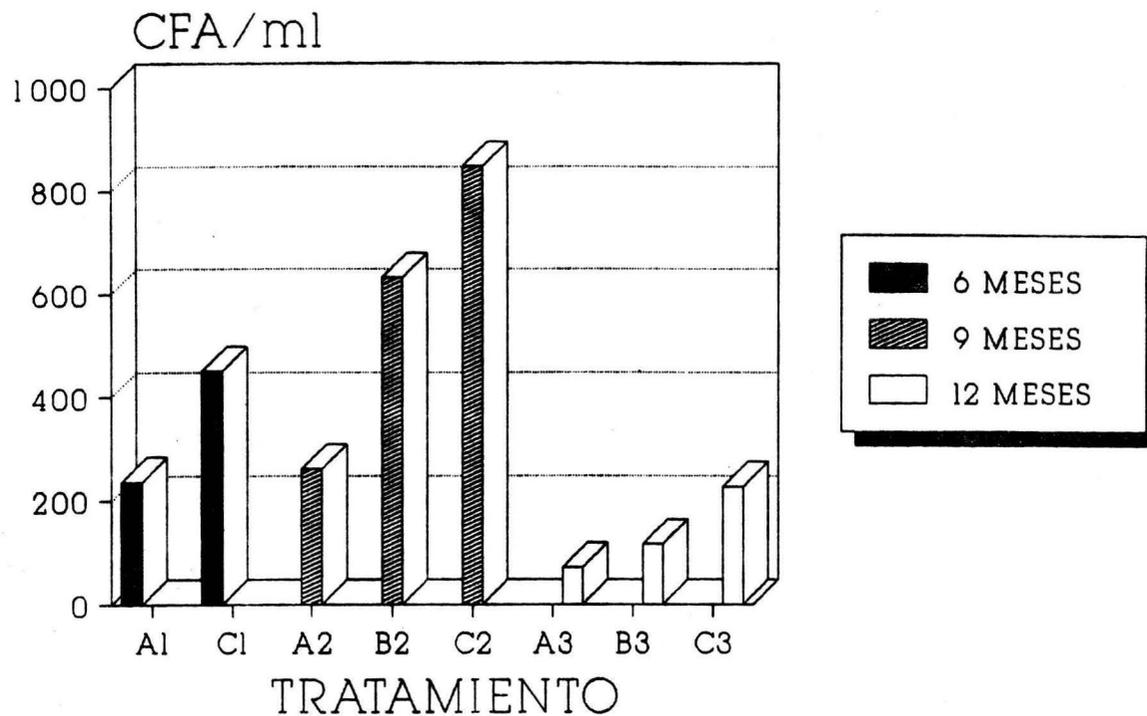
* La F calculada para la edad (0.273) fue muy pequeña en comparación con las F de tablas, por lo cual no fue significativa

F (2,69) para 0.10 =2.39 , para 0.05=3.15 y para 0.01=4.9

** La F calculada de la interacción de la edad y el tratamiento (2.333) es mayor que las F de tablas, con una P >0.10.

F (4,69) para 0.10=2.04 , para 0.05=2.53 y para 0.01=3.65

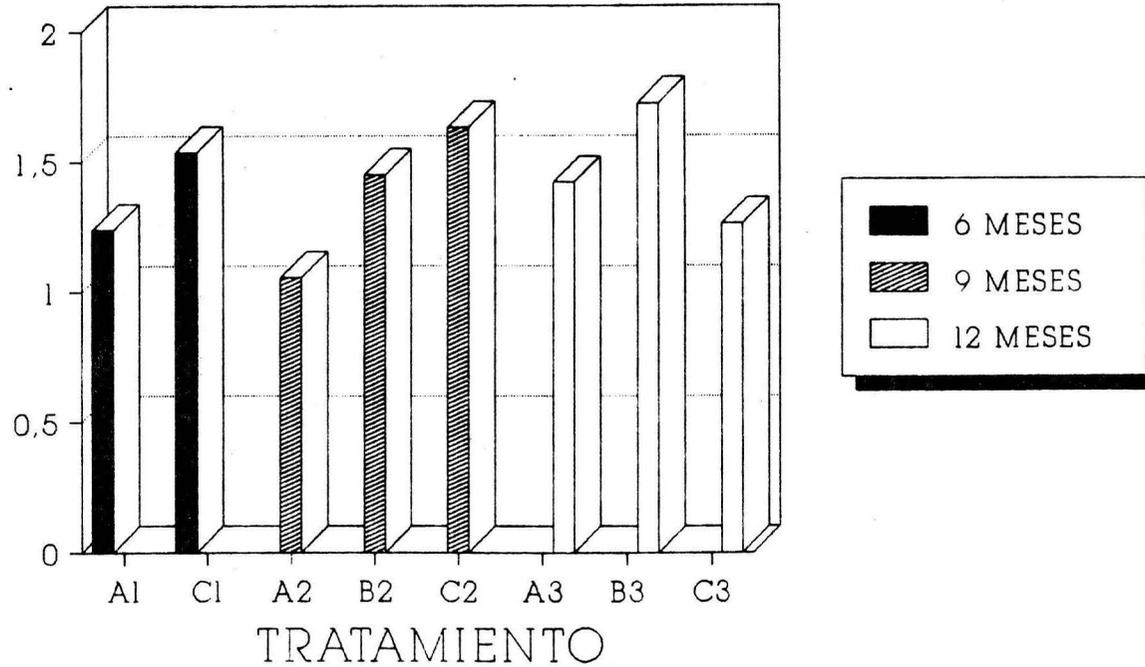
CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS



GRAFICA 1. CFA de clase IgM AntiGRC en Ratas Vesiculotomizadas (A) con Cirugía Abdominal (B) y Control (C).

ANTICUERPOS ANTI-OVA

ABS. A 492 NM DE IgG ANTI-OVA



GRAFICA 2. Absorbancia de IgG Anti-OVA de una diluc. de Suero 1:14000 en Ratas sin Vesículas(A) con Cirugía(B) y Control(C)

DISCUSION

Las glándulas accesorias del aparato reproductor masculino no se han estudiado lo suficiente a pesar de su importancia ya que el fluido que ellas secretan forma parte del semen, el cual confiere supresión de la respuesta inmune local en el momento de la cópula con la hembra (15,22,21).

Además los trabajos de diferentes autores concluyen que si se lesiona o extirpa alguna de las glándulas del eje neuroendócrino se provocan alteraciones en la competencia inmunológica del organismo (3,4,6,12).

Por lo anterior resulta interesante observar en el presente trabajo el efecto de la extirpación de las vesículas seminales de ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) durante los primeros 23 ± 2 días, período durante el cual aún no son funcionales (4); las ratas fueron sacrificadas a los 6,9 y 12 meses de edad y se cuantificó su respuesta a un antígeno particulado globulos rojos de carnero (GRC) para una respuesta primaria y ante un antígeno soluble ovoalbumina (OVA) para una respuesta secundaria.

Antes de empezar la discusión de los resultados obtenidos, es conveniente aclarar que la ausencia del grupo B1 con cirugía abdominal y con vesículas seminales de 6 meses; se debió a que se había planeado el esquema de inmunización para sacrificar 2 ratas diarias, pero por el tiempo de la metodología experimental no se

pudo realizar y se perdió el grupo B1.

Gracias a que se contaba con ratas de reserva, se pudo reorganizar el calendario de inmunización y el protocolo de sacrificio, sin embargo el grupo B1 no fue posible recuperarlo. Al analizar la ausencia de este, se llegó a la conclusión que podría ser equiparado con el grupo C1 (Control sin manipulación) ya que ambos formaban grupos control con respecto al grupo A1 sin vesículas seminales. Esta decisión se apoya en los trabajos realizados por García T.(4) donde demuestra que no existe diferencia significativa entre los grupos con cirugía y control a los 6 meses de edad en animales inmunizados con GRC y el trabajo de Cooper (35) comprueba que no hay alteración postoperatoria en la respuesta inmune, debido a la cirugía y al anestésico.

Aclarado lo anterior observamos que los resultados obtenidos para las ratas con vesiculotomía seminal a los 6,9 y 12 meses ven reducidas las cuentas de células esplénicas que producen anticuerpos anti-GRC de clase IgM, estos resultados concuerdan con lo hayado por García T. y colaboradores (4,25) a diferencia que el observó ratas de 1 a 6 meses, pero se denota que la extripación de las vesículas seminales disminuye la respuesta ante GRC no importando la edad de la rata.

García T. hace referencia a el aumento en la cuenta de CFA con la edad desde el 10. al 60. mes, y mis resultados demuestran

que en las tres edades estudiadas (6, 9 y 12 meses) hay diferencia; al 6o. mes las cuentas de CFA son menores que las de 9 meses donde se observa la mejor respuesta para los 3 tratamientos (control, cirugía y sin vesículas seminales). A los 12 meses se observa decremento en la cantidad de CFA para los 3 grupos.

Lo anterior revela que la edad es un factor importante en la respuesta de CFA de clase IgM contra GRC en una respuesta primaria.

Al cuantificar la respuesta de anticuerpos de clase IgG contra OVA (en una respuesta secundaria) se observó que las ratas sin vesículas seminales tienen disminuida su respuesta en suero indistintamente de la edad, aunque a los 12 meses se observó inesperadamente que el grupo control (C3) es el que tienen el título más bajo de anticuerpos anti-OVA y el grupo con cirugía abdominal (B3) es el que tiene mejor respuesta.

La diferencia entre los grupos control y con cirugía no la podemos atribuir al anestésico ni a la operación ya que no existe efecto supresor en la respuesta primaria y secundaria en la formación de anticuerpos anti-GRC por el uso de anestésico, así como lo demostró Cooper en 1974 (35); también describió que no existe diferencia significativa en la producción de IgM e IgG ante un antígeno timo dependiente o timo independiente en el

tiempo postoperatorio. La diferencia que encuentro probablemente se deba a el propio modelo experimental.

La depresión de la síntesis de anticuerpos como una reacción secundaria de la vesiculotomía seminal se mantuvo en las 3 edades (6, 9 y 12 meses) sin tener repercusiones aparentes.

La diferencia encontrada en la respuesta a la OVA y GRC, la podemos atribuir a que se están cuantificando dos inmunoglobulinas diferentes; IgM e IgG, así como dos respuestas en la primaria como lo dice su nombre se dá sólo una inmunización (GRC) y en la respuesta secundaria se dan varios refuerzos, utilizando adyuvantes para la OVA (antígeno soluble) (33 y 36). Por lo tanto la naturaleza del antígeno y la clase de presentación y reconocimiento deberá de influir en la calidad de la respuesta.

No debemos olvidar que existe evidencia suficiente para sugerir la presencia de inmunomoduladores en el plasma seminal de todos los mamíferos incluyendo a el hombre (4,14,15,16,17,18,19,20,21). El plasma seminal es producto de la secreción del epidídimo, próstata y vesículas seminales, las cuales han sido estudiadas en diversas ocasiones y se ha comprobado la presencia de éstos (4,15,17,18,19,20,21,22,24).

Por lo tanto al extirpar las vesículas seminales se elimina la presencia de ciertos inmunomoduladores, ocasionando en el

modelo estudiado la disminución en la respuesta inmune primaria a un antígeno particulado (GRC) y secundaria a un antígeno soluble (OVA): coincidiendo con los trabajos de Garcia T. (1989 y 1991) (4,25).

Además en base a los conocimientos actuales sabemos que la célula T reconoce fragmentos antigénicos sobre las células presentadoras de los antígenos (CPA), que previamente han procesado el antígeno y asociado a proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La célula T madura reconoce y responde a los epitopos antigénicos presentados por la CPA, los epitopos antigénicos inmunodominantes deben tener 2 regiones una hidrofóbica reconocida por el MHC y otra hidrofílica reconocida por el receptor de la célula T (TCR). La unión del antígeno con la molécula del MHC reacciona relativamente con baja afinidad en la superficie de la CPA donde tiene íntimo contacto con el TCR dándose el complejo TCR-antígeno-MHC; además se requiere la interacción de las células por moléculas accesorias como CD4 y CD8, que interactúan con regiones del MHC de clase II y clase I respectivamente. Existen otras moléculas en la superficie de las células T que podríamos agrupar de forma genérica como moléculas de adhesión, pertenecen a diferentes familias, principalmente integrinas, posiblemente intercrinas, receptores Fc y receptores del complemento; que en conjunto permiten el reconocimiento y generan las señales de transmisión y

activación de la membrana plasmática de la célula T. La activación de la célula T se inicia con la fosforilación de la cadena epsilon del CD3 mediados por protein-quinasa C, de esta estimulación resulta un rápido incremento intracelular de calcio, activación de segundos mensajeros como inositol 1,4,5 trifosfato (1,4,5-IP) y 1,2 diacilglicerol (DAG); otro evento observado en la activación de la célula T es el incremento del pH intracelular (por activación de Na^+/H^+), y fluctuaciones de niveles de nucleotidos cíclicos (AMPc y GMPc). El reconocimiento del antígeno específico implica la activación de una amplia gama de genes que codifican para la expresión de múltiples proteínas que participan como efectoras y reguladoras de la respuesta inmune; que promueven la activación y diferenciación de diferentes células que a su vez secretan inmunoglobulinas y otras moléculas efectoras.

Los mecanismos anteriormente descritos debieron haberse llevado a cabo para ambos antígenos GRC y OVA en mi modelo experimental.

El o los cambios secundarios a la extirpación de las vesículas seminales pudieron haberse dado cuando menos en alguno de los puntos de la respuesta inmune que ha continuación menciono:

1.- En las CPA por alteraciones en el reconocimiento,

procesamiento y presentación debido a:

- disminución en el número de células
- defecto del citoesqueleto (alteración de endocitosis)
- alteraciones de vesículas endocíticas y sistemas enzimáticos
- defecto del tráfico de moléculas de clase I y II

2.- Defecto en el reconocimiento de linfocito T por:

- modificaciones del heterodímero α y β de TCR
- modificaciones del complejo del CD3 y otras moléculas de adhesión

3.- Defecto en la activación de linfocitos debido a:

- proteínas cinasas
- nucleótidos cíclicos
- efectos iónicos
- citocinas

4.- Defecto en las moléculas efectoras o en sus receptores (citocinas).

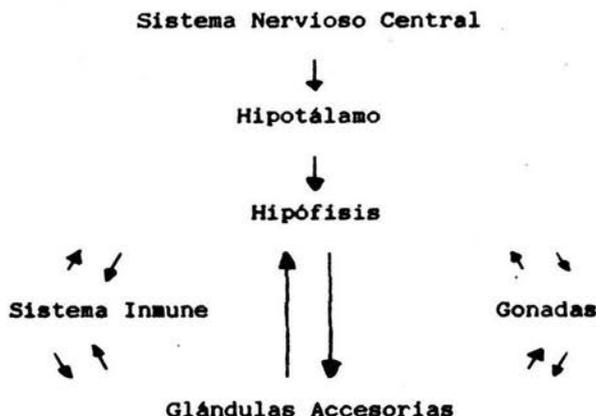
5.- Alteraciones en la activación, expresión y diferenciación de clones B y cantidad y calidad de anticuerpos producidos.

6.- Alteraciones de otros mecanismos de regulación:

- fenómenos de supresión
- red idiotipo anti-idiotipo

La base de las explicaciones dadas es la interacción e

intercomunicación existente entre el sistema neuroendócrino y el sistema inmune, a través de neuropeptidos, hormonas y receptores hormonales que fluyen por el circuito bidireccional que conforman. Sugiero además que la comunicación existente no se limita únicamente a las gónadas, sino que además involucra glándulas accesorias como las vesículas seminales, pues si bien son reguladas por andrógenos también podrían estimular o suprimir su actividad; es decir funcionar como moduladores e influir en la actividad del sistema inmunocompetente y conformar un circuito más amplio de lo que se ha propuesto hasta el momento; por lo que sugiero la siguiente modificación al modelo de Blalock (1). Aclarando que quedan muchas interrogantes del papel de las vesículas seminales y la respuesta inmune.



CONCLUSIONES

1.- La vesiculotomía seminal neonatal disminuye a los 6, 9 y 12 meses la producción de células formadoras de anticuerpos de clase IgM contra glóbulos rojos de carnero (antígeno particulado) en una respuesta primaria.

2.- En una respuesta primaria para ratas de 6, 9 y 12 meses la edad influye sobre la cantidad de anticuerpos de clase IgM producidos contra un antígeno particulado (GRC).

3.- La extirpación de las vesículas seminales disminuye a los 6 y 9 meses la producción de IgG en una respuesta secundaria contra un antígeno soluble como la ovoalbumina, pero no a los 12 meses.

4.- En una respuesta secundaria (IgG) contra ovoalbumina, la edad (6, 9 y 12 meses) no tiene influencia en el título de anticuerpos producidos.

5.- La vesicultomía seminal afecta de manera directa o indirecta la inmunidad sistémica en mi modelo experimental.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Blalock J. et al (1985) Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic systems. *Journal of Immunology* 135: 858-861.
- 2.-Cohen M. et al (1983) Sex steroid receptors in peripheral cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT-8 positive cells. *The Journal of Immunology*. 131:6, 2767-2771.
- 3.-Eidinger D. et al (1982) Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. *The Journal of Experimental Medicine*. 136:1098-1116.
- 4.-García T. et al (1989) Disminución de la respuesta primaria de anticuerpos en ratas sin vesículas seminales. *La Revista de Investigación Clínica*. 41:25-29.
- 5.-Yacob W. et al (1984) Sex associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *The Journal of Immunology*. 132:2, 656-661.
- 6.-Morton J. et al (1981) Androgen sensitivity and autoimmunity. Influence of sex and testosterone on the humoral immune response of autoimmune and non-autoimmune mouse strains to sheep erythrocytes. *Immunology*. 44:661-669.
- 7.-Fujii H. et al (1975) Effect of a single administration of testosterone on the immune response and lymphoid tissues in mice. *Cellular Immunology*. 20:315-326.
- 8.-Kurt S. et al (1955) Effect of estrogen and cortisone on immune hemoantibodies in mice of inbred strains. *Journal Immunology*. 74:479-484.
- 9.-Terres G. et al (1986) A quantitative difference in the immune response between male and female mice. *Journal of Immunology*. 127:1, 664-667.
- 10.-Kongshavn P. et al (1972) Immunosuppressive effect of male mouse submandibular gland extracts on plaque forming cells in mice: abolition by orchidectomy. *Immunology*. 22:227-230.
- 11.-Batchelor J. et al (1965) The influence of sex upon the antibody response to an incompatible tumor. *Immunology*. 9:553-564.

12.-Castro J. (1974) Orchidectomy and the immune response. II Response of orchidectomized mice to antigens. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 185:437-451.

13.-Dumont F. et al (1982) Prepubertal orchidectomy induces thymic abnormalities in aging (NZBxSJL) F1 male mice. *The Journal of Immunology.* 129:4, 1642-1648.

14.-Moreno L. (1986) Variación de la respuesta específica de anticuerpos IgA e IgM debida al sexo, en ratas. Tesis-UNAM. México. 165pp.

15.-Anderson D. et al (1982) Immunosuppressive effects of mouse seminal plasma components in vivo and in vitro. *The Journal of Immunology.* 128:2, 535-539.

16.-Tarter T. et al (1986) Suppression of natural killer cell activity by human seminal plasma in vitro identification of 19-OH-PGE as the suppressor factor. *The Journal of Immunology.* 136:8(15), 2862-2867.

17.-Thaddeus M. et al (1981) Male reproductive function and semen. ed. Springer-Verlag. United States of America. 171-336 pp.

18.-Young W. (1961) Sex and internal secretions. 3a ed. Ed. The Williams and Wilkins Co. Vol. I United States of America 366-448 pp.

19.-Knobil E. (1988) The physiology of reproduction. Vol I ed. Raven Press 743-744 pp.

20.-Emoto M. et al (1990) Biological functions of mouse seminal vesicle fluid. *Archives of andrology* 24:35-40.

21.-Galdiero F. (1989) Inhibition of macrophage phagocytic activity by SV-IV, a major protein secreted from the rat seminal vesicle epithelium. *J. Rep. Immunology.* 16:269-284.

22.-Metafora S. et al (1989) Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of a major protein secreted from the epithelium of the rat seminal vesicles. *Biochemical Pharmacology.* 38:1 121-131.

23.-Diem K. (1971) *Tablas científicas.* 6a ed. Ciba-Geigy. Suiza. pp. 16.

24.-Herr J. et al (1989) Purification of low molecular weight forms of seminal vesicle specific antigen by immunoaffinity chromatography on bound monoclonal antibody MHS-5.

Journal of Reproductive Immunology. 16:99-113.

25.-García T. et al (1991) La extirpación de las vesículas seminales modifica la respuesta inmunológica de ratones infectados con *Taenia crassiceps*. Memorias del IX Congreso Nacional de Inmunología. Cartel No. 137.

26.-Fox J. et al (1984) Laboratory Animal Medicine. ed Academic Press Inc. United States of America. 545-548 pp.

27.-Hafez E. (1970) Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animal. ed. Lea and Febiger. United states of America. 346-348 pp.

28.-Cunningham A. et al (1968) Further improvements in the plaque for detecting single antibody forming cells. Immunology. 14:599.

29.-Mishell B. et al (1980) Selected methods in cellular immunology. ed. WH. Freeman and Company. United States of America. 1-27 y 69-123 pp.

30.-Bustamante Y. et al (1978) Manual de prácticas de inmunología. IPN-ENCB. México. 33-47 pp.

31.-Weir D. et al (1978) Handbook of experimental immunology. Vol I 3a ed. Ed. Blackwell Scientific Publications 19.7-19.13 pp.

32.-Voller A. et al. (1981) Techniques in Clinical Immunology Cap. 8. Ed. Thompson R. ed Blackwell Scientific Publications. 157-169 pp.

33.-Jiménez Z.L. (1983) Manual de prácticas de Inmunología. Departamento de Inmunología. E.N.C.B. I.P.N. 141pp.

34.-Sokal R., Rohlf J. (1969) Biometría. H. Blume. España.

35.-Cooper a. et al (1974) Depression of Immunological Responses due to Surgery. Immunology 27:393-399.

36.-Roitt M. et al (1985) Immunology. Churchill-Lingstone. 5a.ed. E.E.U.U. 5.1-5.10.

37.-Kovacs W. et al (1987) Androgen receptors in human thymocytes. Journal of Immunology 139: 490-492.

38.-O'Dorisio et al (1990) Neuropeptides and Immunoepitopes messengers in a neuroimmune axis. The New York Academy Sciences. E.E.U.U. 1-6 pp.

APENDICE I

SOLUCIONES

SOLUCION SALINA ISOTONICA

8.5 gramos de NaCl se diluyen en agua destilada y son llevados a un volumen final de 1 000 ml.

SOLUCION DE HANK

Glucosa	1.00 gramo
NaCl	8.00 gramos
KCl	0.40 gramos
CaCl	0.14 gramos
MgSO ₄	0.10 gramos
MgCl ₂	0.10 gramos
Fosfato monopotásico	0.06 gramos
Fosfato disodico	0.06 gramos
Bicarbonato de sodio	0.06 gramos
Rojo fenol	0.02 gramos

Se afora con agua destilada a 1 000 ml y el pH se ajusta a 7.2 con bicarbonato y se esteriliza por filtración con millipore de 0.22 μ m.

AZUL TRIPAN

Se mezclan cuatro partes de azul tripan al 0.2% con una parte de solución salina al 4.25%.

BUFFER DE FOSFATOS 0.1M pH 6.8

Fosfato de sodio monobásico 2M	2.4 ml
Fosfato de sodio dibásico 0.2M	26.0 ml

Se afora a 100 ml con agua destilada.

BUFFER DE CARBONATO-BICARBONATO pH 9.6

Carbonato de sodio	1.59 g
Bicarbonato de sodio	2.93 g

Se afora a 1000 ml con agua destilada y se guarda a temperatura ambiente no mas de 2 días.

BUFFER DE FOSFATOS SALINA - TWEEN 0.05% pH 7.4

NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	2.9 g
KCl	0.2 g
Tween 20	0.5 ml

Se afora a 1000 ml con agua destilada.

SUSTRATO PARA LA PEROXIDASA

Acido cítrico 0.1M	2.43 ml
Fosfato de sodio 0.2M	2.57 ml
Agua destilada	5.00 ml

Se mezcla con agitación constante y se agrega
Ortofenilendiamina 4.00 mg

Finalmente se adiciona

Peróxido de hidrógeno	4.00 µl
-----------------------	---------

BUFFER DE BARBITURATOS 0.1 M, pH 8.6

Barbiturato de sodio 0.1 M	500.5 ml
Acido clorhídrico 0.1 M	149.5 ml
Agua destilada	350.0 ml

METODOLOGIAS COMPLEMENTARIAS

PURIFICACION DE GAMMA GLOBULINA

Esta metodología se utilizó para purificar la gamma globulina de rata usada como antígeno en el esquema de inmunización de conejo y para purificar la δ -globulina de conejo conteniendo anti-IgG de rata.

A 50 ml de suero de rata se le adiciona lentamente y con agitación constante 50 ml de sulfato de amonio saturado a pH 7.8. Se ajusta el pH a 7.8 con NaOH 2N y se mantiene con agitación constante durante 10 a 15 min después de terminada la adición de sulfato de amonio.

Posteriormente se centrifuga la suspensión a temperatura ambiente 15 min. a 3500 rpm.

El precipitado se disuelve con solución salina a pH 7.8 y se lleva a un volumen de 50 ml, se le adiciona lentamente y con agitación constante 25 ml de sulfato de amonio saturado a pH 7.8. Se ajusta el pH a 7.8 con NaOH 2N y se mantiene con agitación constante durante 10 a 15 min después de terminada la adición de sulfato de amonio. Posteriormente se centrifuga la suspensión a temperatura ambiente 15 min. a 3500 rpm.

Se realiza el procedimiento tres veces y en la tercera ocasión se sustituye el disolvente del precipitado por solución salina amortiguador de boratos y se lleva a un volumen de 20 ml.

Se dializa contra solución salina amortiguador de boratos a 4 grados Celsius y se mantiene con agitación constante durante el fin de semana, con dos cambios diarios.

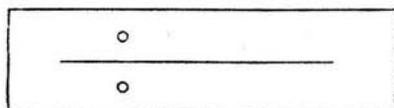
Terminada la diálisis se saca la muestra, se centrifuga a 2500 rpm durante 10 min.

Se determina la concentración de proteínas por el método de Bradford y finalmente se agrega merthiolate (a una concentración final de 0.01%) y se guarda en refrigeración.

La pureza de la gamma globulina se comprueba utilizando el método electroforético.

INMUNOELECTROFORESIS.

Se prepara una solución de agar al 1% en buffer de barbituratos 0.1 M, pH 8.6 y con ella se cubre la placa para electroforesis; se deja gelificar el agar a temperatura ambiente y se realizan las perforaciones necesarias de acuerdo al esquema.



Se extrae de las perforaciones circulares el agar y se coloca en el primer pozo la gamma globulina de rata y en el segundo pozo se coloca suero total de rata el cual debe estar teñido con azul de bromofenol para que sirva como indicador del corrimiento.

Se prepara la cámara para electroforesis utilizando barbituratos como buffer de corrimiento y se conecta a la fuente de poder ajustando la corriente a 8 ó 10 volts/cm de gel.

Después de que la muestra se haya desplazado 4 cm, se suspende la corriente y la cámara se desconecta.

Se retira la placa y se quita el agar de la canal y en ella se deposita el antisuero antigamma globulina de rata. Se coloca la placa en una cámara húmeda y se deja 48 horas a 4 grados Celsius. Después de ese tiempo se observan las bandas de precipitación.

Este método se utilizó para verificar la pureza de la gamma globulina de rata que fue utilizada como antígeno en el esquema de inmunización del conejo y para la gamma globulina de conejo anti-IgG de rata.

ESQUEMA DE INMUNIZACION CONTRA GAMMA GLOBULINA DE RATA EN CONEJO.

DIA CERO. Gamma globulina de rata 0.5 ml y adyuvante completo de Freund 0.5ml vía subcutánea en sitios múltiples del lomo.

DIA SIETE. Gamma globulina de rata 0.5 ml y adyuvante incompleto de Freund 0.5ml inyectado de la misma forma que el anterior.

DIA QUINCE. Gamma globulina de rata agregada al 33 % 1ml via intramuscular en varios sitios del lomo.

DIA DIESISEIS Y DIESISITE. Se aplica el antígeno (gamma globulina de rata) de la misma forma que el día quince.

DIA VEINTISIETE. Se aplica el antígeno igual que el día siete.

DIA TREINTA Y UNO. Sangrado al blanco.

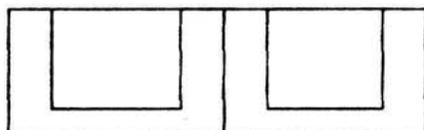
La gamma globulina de conejo se purifico del suero de la misma forma que se purificó la gamma globulina de rata.

INTRUMENTOS DE TRABAJO

ELABORACION DE LA CAMARA PARA CUANTIFICACION DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS

Las cámaras se hacen utilizando portaobjetos y cubreobjetos limpios, desengrasados y estériles.

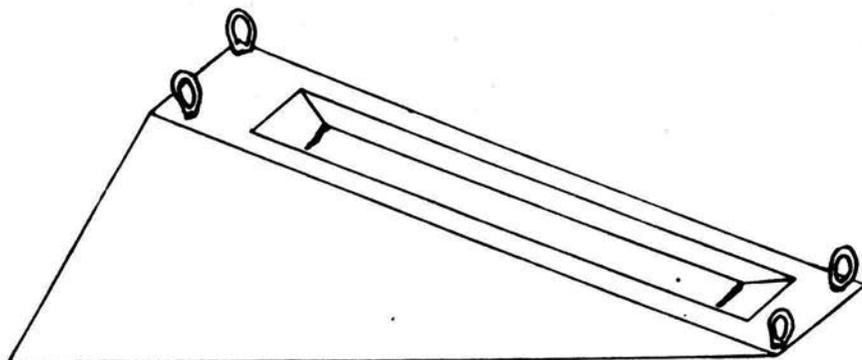
En el portaobjetos se colocan tiras de masking-tape de doble cara adherente en los sitios que indica la figura.



Se presiona el adhesivo para que se adhiera y se coloca sobre este un cubreobjetos abarcando el área libre del masking-tape.

Deben cubrirse los bordes del cubreobjetos con parafina para asegurar el sellado de las cámaras, estas tienen capacidad de 68 μ l y una área de 2538 campos a un aumento de 40X con un ocular de 10X en el microscopio óptico.

ESQUEMA DEL SOPORTE UTILIZADO DURANTE LA CIRUGIA.



La rata se colocó en posición supina con inclinación cefálica y se sujetó con ligas a las cuatro argollas del soporte.

APENDICE II

ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO

OVA	Ovoalbumina
GRC	Glóbulos rojos de carnero
NK	Células asesinas naturales
19-OH-PEG1	19-Hidroxi-prostaglandina E tipo 1
19-OH-PGE2	19-Hidroxi-prostaglandina E tipo 2
PGE2	Prostaglandina E tipo 2
ADN	Acido desoxi-ribonucleico
CFA	Células Formadoras de Anticuerpos
GRUPO A	Ratas con vesiculotomía seminal
GRUPO B	Ratas con cirugía abdominal
GRUPO C	Ratas control
IgM	Inmunoglobulina de clase M
IgG	Inmunoglobulina de clase G
ELISA	Inmuno ensayo enzimático
A1	Ratas de 6 meses vesiculotomizadas
A2	Ratas de 9 meses vesiculotomizadas
A3	Ratas de 12 meses vesiculotomizadas
B1	Ratas de 6 meses con cirugía abdominal
B2	Ratas de 9 meses con cirugía abdominal
B3	Ratas de 12 meses con cirugía abdominal

C1	Ratas de 6 meses control
C2	Ratas de 9 meses control
C3	Ratas de 12 meses control
PBS-T	Buffer Fosfatos Salina - Tween
ANOVA	Análisis de Varianza
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CPA	Células Presentadoras del Antígeno
CD4	Receptor de linfocito T cooperador
CD8	Receptor de linfocito T citotóxico
CD3	Receptor de linfocito T
1,4,5-IP	Inositol 1,4,5 trifosfato
DAG	1,2 Diacilglicerol
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
GMPc	Guanidin monofosfato cíclico