

2ej
2



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**INVESTIGACION DE ANTICUERPOS ANTIESPERMA - HUMANO
POR EL METODO DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA**

TESIS MANCOMUNADA

**ANA ESTHER AGUILAR CARDENAS
MA. DEL SOCORRO S. MARTINEZ SAMPERIO**

CARRERA: QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Jurado asignado:

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

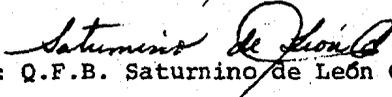
PRESIDENTE: Profa. Magdalena Acosta Segura
VOCAL: Profa. Ma. Dolores Lastra Azpilicueta
SECRETARIO: Prof. Saturnino de León Chapa
1er SUPLENTE: Profa. Guadalupe Vázquez Lizardi
2o SUPLENTE: Profa. Patricia Calderón Gómez

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 1-C

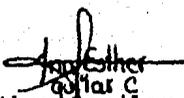
Facultad de Química

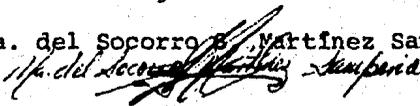
U. N. A. M.

Asesor del tema: Q.F.B.  Magdalena Acosta Segura


Supervisor técnico: Q.F.B. Saturnino de León Chapa

Sustentantes:


Ana Esther Aguilar Cárdenas

Ma. del Socorro B. Martínez Samperio


I N D I C E

CAPITULO I. DESCRIPCION DEL PROBLEMA E HIPOTESIS DEL TRABAJO.	1
CAPITULO II. GENERALIDADES.	3
1. Antecedentes.	3
1.1: Composición antigénica del semen.	5
1.2. Mecanismo de isoimmunidad contra antf- genos seminales.	8
1.3. Mecanismo de autoimmunidad contra antf genos seminales.	11
2. Frecuencia de la respuesta de tipo humoral.	13
2.1. Aspectos Clínicos:	18
3. Técnicas empleadas para la investigación de anticuerpos antiesperma.	19
4. Hemaglutinación indirecta.	24
CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL.	29
1. Diagrama.	29
2. Obtención del antígeno.	30
3. Contrainmunolectroforesis (CIEF).	32
4. Hemaglutinación indirecta (HI)..	34
4.1. Montaje de la técnica. Esquema para mi crotitulación.	37
4.2. Estabilización de los reactivos. Forma linización.	41

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION.	42
CAPITULO V. RESUMEN Y CONCLUSIONES.	45
CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA.	49

APENDICES

I. Métodos químicos.	57
1 Determinación de proteínas, método de <u>Biu</u> ret.	57
II. Métodos inmunológicos	
1 Determinación de sustancias de grupo del sistema ABO en plasma seminal.	62
2 Doble difusión radial. Técnica de <u>Ouchter</u> lony.	66
3 Técnica de coloración de los inmunopreci- pitados.	72
4 Obtención del suero inmune en conejos. ..	74
5 Contraelectroforesis	77
6 Hemaglutinación indirecta. Reactivos. . .	81
Solución de Alsever.	82
Amortiguador salino de fosfatos.	82
Acido tánico 1:20,000.	83

CAPITULO I

DESCRIPCION DEL PROBLEMA E HIPOTESIS DE TRABAJO

La vasectomía es uno de los procedimientos para el control de la natalidad que ha ganado terreno en los últimos años.

Posiblemente con el afán de que se extienda más, se ha llevado a cabo la difusión de que es reversible. Con respecto a ésto, la literatura reporta datos discordantes.

En unas fuentes se afirma que el procedimiento da lugar a una respuesta autoinmune lo que haría al paciente estéril; pero en otras se afirma que no hay consecuencias inmunológicas y en estas condiciones la vasectomía, si sería reversible.

La controversia se debe al hecho de que los métodos que son accesibles a los laboratorios clínicos muestran una enorme inespecificidad para la detección de anticuerpos antiesperma.

Por otra parte, los estudios de que se dispone se han realizado en un número muy reducido de pacientes y por lo tanto no son representativos.

Existen métodos muy específicos como la inmunofluorescencia (IF), la contrainmunolectroforesis (CIEF) y la inmunolectroforesis (IEF) que por requerir de equipo especial no están al alcance del común de los laboratorios clínicos.

En lo que respecta a la isoimmunidad en el estudio de parejas estériles, sucede lo mismo, es decir que se evalúan generalmente por técnicas inespecíficas dando - resultados controvertidos.

Para lograr la homogeneidad de criterios se hace - necesario estudiar un número mayor de pacientes empleando un método accesible a cualquier servicio de laboratorio y para ello se consideró que la hemaglutinación indirecta (HI), empleando eritrocitos de carnero recubiertos con plasma seminal, reúne las condiciones de poseer una alta especificidad y sensibilidad además de que es accesible a cualquier laboratorio clínico por no requerir equipo especial.

CAPITULO II

GENERALIDADES

1. ANTECEDENTES

Por primera vez en el año de 1677, Antoni Van Leeuwenhoek reportó la presencia de los espermatozoides en el semen humano (19) y el hecho de que el espermatozoide es antigénico fué descubierto en 1899 mediante la inoculación de éste en diferentes especies, basándose el descubrimiento en los estudios realizados por Landsteiner y Metchnikoff (36).

Metalnikoff en 1900 fué el primer investigador en obtener autoanticuerpos contra el espermatozoide, él inyectó a cuyos con espermatozoides homólogos (36).

En 1922 Meaker encontró en el suero de mujeres con infertilidad inexplicable (6,8) un factor con propiedades citotóxicas para el espermatozoide.

En 1954, Rümke reportó que el varón también puede producir anticuerpos en contra de éstos.

Cuando Franklin y Dukas, en 1964 reportaron una alta incidencia de actividad esperma-aglutinante en el suero de mujeres con problemas de concepción, se dirigió el interés en la isoimmunización al esperma como una posible causa de infertilidad (18).

Partiendo de esta base, en 1973 investigadores mexicanos produjeron una vacuna que se utilizó en mujeres provocándoles esterilidad temporal. (11, 26).

Con el conocimiento del papel antigénico de los espermatozoides, la posibilidad de consecuencias inmunológicas originadas después de una vasectomía ha conducido a estudios detallados sobre este problema (8).

Existen una variedad de métodos que se pueden usar para la detección de anticuerpos antiesperma. Durante 30 años la mayoría de los estudios han utilizado las técnicas de aglutinación e inmovilización espermática, obteniéndose mejores resultados con pruebas de inmunoprecipitación en gel.

Ultimamente con el fin de mejorar las técnicas para la investigación de anticuerpos antiesperma se han probado hemaglutinación indirecta y ELISA, (24,20).

1.1 Composición antigénica del semen

El semen está constituido por células altamente diferenciadas llamadas espermatozoides, suspendidas en un medio líquido denominado plasma seminal.

Los espermatozoides se forman a nivel de tubos seminíferos a partir de las espermatogonias, el proceso de transformación hasta llegar a espermatozoides se llama espermatoogénesis y está determinado por la acción de la hormona folículo estimulante (HFS), (26). El espermatozoide maduro, consta de cabeza oval, cuello, pieza media y cola (fig. No. 1), (18,26).

El plasma seminal además de servir de soporte a los espermatozoides, contiene las sustancias nutritivas para éstos. Está constituido por los líquidos del epidídimo, conducto deferente, vesículas seminales, próstata, glándulas bulbouretrales de Cowper y glándulas de Littré (26).

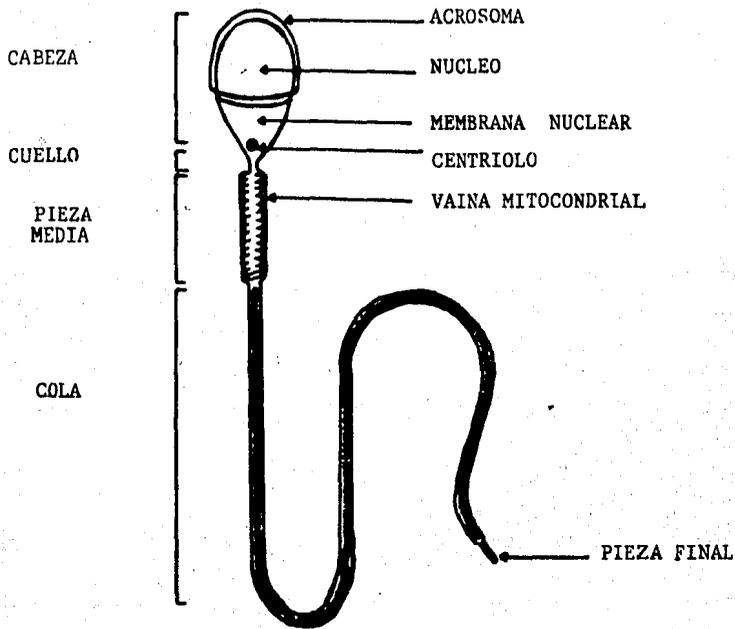
En cuanto a composición química, el semen contiene espermina, espermidina, fructosa, ac. ascórbico, ac. cítrico, colesterol, prostaglandinas, albúmina, IgG, IgA, IgM, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, alfa-2-globulinas; enzimas como fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, hialuronidasa, deshidrogenasa láctica; proteínas de transporte como ceruloplasmina y transferrina; iones Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , aminoácidos como ac. glutámico,

lisina e histidina. La colina, mucina y el tocoferol dan la característica fluorescente al semen (22,26,31).

La exposición al semen puede ocurrir en el hombre mismo produciendo autoinmunización y en la mujer causando isoinmunización (11,18).

Mediante métodos muy sensibles de inmunoprecipitación se han demostrado hasta 30 antígenos, los cuales pueden ser específicos del espermatozoide o contribución del plasma seminal cuyos antígenos revisten a la célula espermática.

Es necesario tomar en cuenta los antígenos de histocompatibilidad que pueden jugar un papel importante en el mecanismo de isoinmunización. Experimentalmente las enzimas espermáticas hialuronidasa y deshidrogenasa láctica también pueden ser inmunogénicas (18,31).



PARTES PRINCIPALES DEL ESPERMATOZOIDE

FIGURA No. 1

Los esquemas que aquí se representan tienen como base los de las referencias 18, 32 y 38.

1.2 Mecanismo de isoinmunidad contra antígenos seminales

Se divide el mecanismo en dos vías: vía de estimulación o aferente y vía de respuesta inmunológica o eferente.

VIA AFERENTE

Se ha encontrado una alta incidencia de anticuerpos anti-esperma asociada con infecciones vaginales por *Staphylococcus*, *Mycoplasma* y *Schistosoma*. Se propone que estos agentes infecciosos al provocar lesiones importantes como son las úlceras de cuello, permiten que los antígenos espermáticos y seminales sean procesados por los macrófagos y presentados a las células inmunocompetentes.

Las lesiones provocadas por dispositivos intrauterinos de igual manera facilitan el paso de proteínas seminales al torrente sanguíneo.

La presencia de anticuerpos anti-esperma en prostitutas se explica por las agresiones sexuales a que son sujetas y que frecuentemente les provoca graves lesiones.

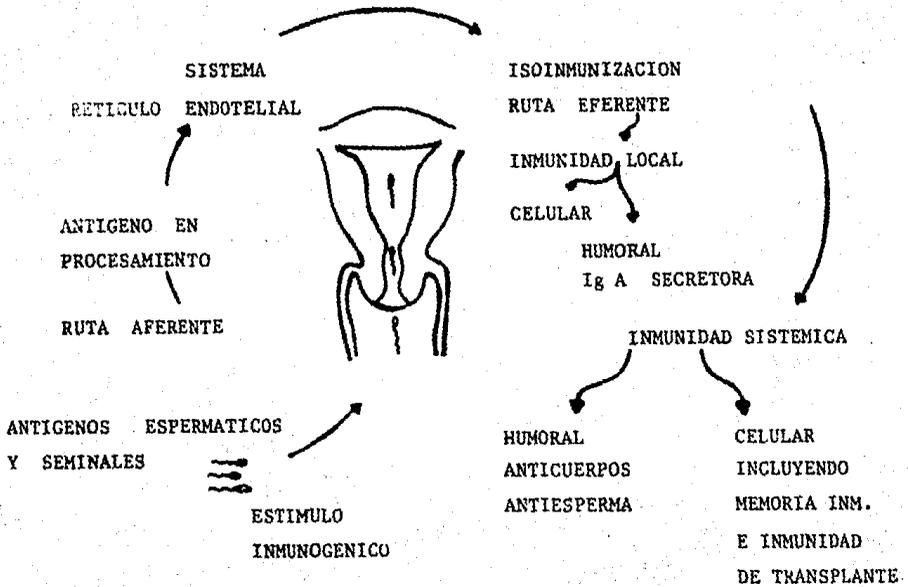
El uso de fármacos (por ejemplo anovulatorios) es otro factor que puede provocar cambios en la permeabilidad de la mucosa.

VIA EFERENTE

La respuesta inmune contra antígenos seminales es tanto humoral como celular presentándose una respuesta mayor y más rápida a nivel local. Se han realizado estudios experimentales de inmunización local en el tracto genital femenino, comprobándose su capacidad de respuesta inmune celular local y sistémica (reacciones de hipersensibilidad retardada, inmunidad de transplante y memoria inmunológica).

Además en el cervix, endometrio y trompas de falopio existe gran respuesta inmune secretora, representada por niveles altos de IgA secretora, pero poco se conoce de su relación contra antígenos seminales (6, 18), (Fig No. 2).

FIGURA No. 2



1.3 Mecanismo de autoinmunidad contra antígenos seminales

Existen diversas suposiciones para explicar la formación de autoanticuerpos seminales en el hombre (6,8,18,36).

El aparato reproductor masculino presenta una barrera testicular sanguínea, la cual es impermeable a proteínas séricas en condiciones normales, protegiendo al hombre de la sensibilización contra sus propios espermatozoides. El punto débil de esta barrera está dentro de la red testicular y túbulos eferentes. Esta barrera puede ser dañada por cirugía, infecciones, trauma y obstrucción de los túbulos y ductos. En tales condiciones los antígenos espermáticos interaccionan con el sistema inmune del huésped estimulando la producción de auto-anticuerpos e inmunidad celular (Fig. No. 3). Un ejemplo de este mecanismo puede ser la vasectomía, mediante la cual se altera la integridad del vaso deferente y por tanto podría provocar la sensibilización del individuo (8).

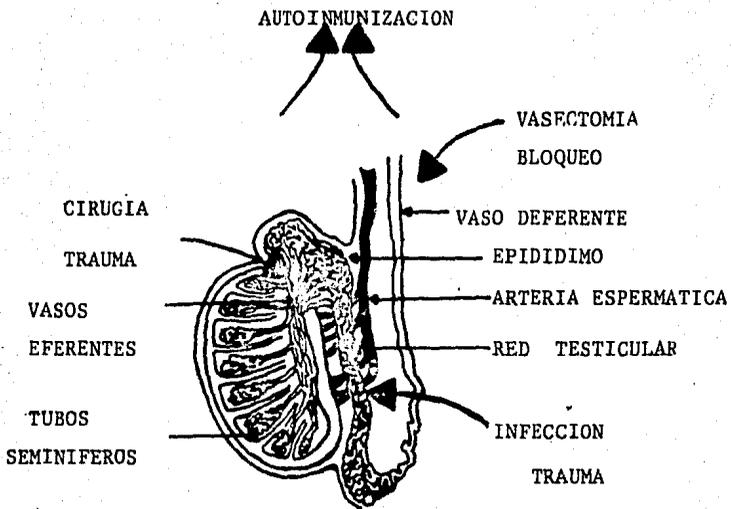


FIGURA No. 3

2. FRECUENCIA DE LA RESPUESTA DE TIPO HUMORAL

En los últimos años se ha reportado una incidencia mayor de anticuerpos antiesperma en el suero tanto de mujeres como hombres infértiles por Wilson, Rümke, Franklin, Dukes, Kibrick, Shulman y muchos otros.

El método más empleado para determinar la actividad humoral en contra del espermatozoide está basada en la aglutinación del espermatozoide en presencia de un suero proveniente de pacientes infértiles (Franklin y Dukes 1964) A la fecha existe una gran discrepancia en los resultados proporcionados por este método, ya que existen factores externos que provocan la aglutinación inespecífica del espermatozoide como lo son: agentes microbianos y químicos (23).

En un estudio realizado con el suero de mujeres infértiles (Jones 1973) (18), se compararon 2 técnicas: la microaglutinación (Franklin y Dukes) y el método desarrollado por Isojima o espermio-inmovilización (1968), ambas pruebas comúnmente usadas para la detección de anticuerpos antiesperma por la sencillez de su ejecución presentaron la desventaja de su gran inespecificidad.

La tabla No. 1 es un promedio de los resultados de 409 sueros estudiados.

Tabla No. 1

	TECNICA	
	Microaglutinación	Inmovilización
	% POSITIVIDAD	
Mujeres con infertilidad inexplicable primaria o secundaria	26.4	9.4
Mujeres embarazadas como controles negativos	18.0	0.0

Como se observa la técnica de microaglutinación tiene el inconveniente de dar resultados positivos en los sueros controles de mujeres embarazadas, en los que no se espera presencia de anticuerpos.

Boettcher (1970) demostró que la presencia de esteroides producía aglutinación espermática, con lo que se explica la presencia de resultados inespecíficos en la técnica.

En cambio, la ausencia de resultados positivos en los controles da a la técnica de inmovilización una mayor validez para la detección de inmunidad humoral antiespermática.

Los anticuerpos responsables de la espermoaglutinación y espermoinmovilización residen en las clases IgM e IgG (Isojima, Boettcher). La acción de anticuerpos inmobilizantes parece ser sobre el acrosoma y la pieza media del espermatozoide mediante cambios en la permeabilidad de la membrana (18).

Se ha utilizado la técnica de inmunofluorescencia indirecta en la investigación de anticuerpos antiesperma en mujeres infértiles (Hjort y Hansen, 1971). En 1961 Sutherland y Landing demostraron mediante esta técnica la presencia de anticuerpos contra el espermatozoide en prostitutas. En las investigaciones de Hjort y Hansen se encuentra que existen 4 modelos de inmunofluorescencia sobre el espermatozoide que involucran el acrosoma, segmento ecuatorial, membrana postnuclear y cola. Estudios posteriores usando la misma técnica han confirmado estos hallazgos.

Ellos localizaron 4 antígenos en el espermatozoide:

- sobre el acrosoma, el cual es específico del espermatozoide.
- sobre la membrana postnuclear, el cual es un antígeno de revestimiento
- sobre el segmento ecuatorial
- sobre la cola, otro antígeno específico del espermatozoide

Además encontraron que existía inmunofluorescencia tanto en los sueros en estudio como en los sueros control en diluciones menores a 1:16 por lo que a su criterio se consideraron resultados positivos los mayores a esta dilución.

La explicación de resultados positivos en los sueros controles negativos (sueros procedentes de niños o mujeres embarazadas), se fundamenta en la presencia de anticuerpos contra la lactoferrina, pues posiblemente su estructura es semejante a otro antígeno de revestimiento del espermatozoide designado como SCA (sperm coating antigen).

En la mayoría de las investigaciones realizadas en relación con la autoinmunidad hacia el espermatozoide se han encontrado anticuerpos espermoaglutinantes en el suero de los pacientes en estudio. Es muy frecuente encontrar títulos altos de estos anticuerpos en el suero de hombres infértiles. Empleando técnicas como la espermoinmovilización y hemaglutinación se ha corroborado la presencia de autoanticuerpos en contra del espermatozoide (6).

Los antígenos seminales involucrados en la autoinmunidad son similares a los que se describen en la isoimmunidad exceptuando los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad.

Utilizando diferentes técnicas se ha reportado una frecuencia del 3% al 20% de resultados positivos en hombres infértiles y del 0% al 5% en los controles. La discrepancia de los resultados es el reflejo de las diferencias en las técnicas utilizadas, de los pacientes seleccionados y el título considerado como reacción positiva que fluctúa entre 1:4 y 1:64. En la tabla No. 2 se describen algunos de los resultados de estas investigaciones (6).

Tabla No. 2

Investigador	Paciente estudiado	Técnica	% de resultados positivos
Gupta (1975)	hombres infértiles	macro - aglutinación	5.7%
	hombres vasectomizados	"	62.4%
	hombres infértiles	Hema - gluti - nación	2.9%
Husted (1975)	hombre infértil	macro - aglutinación	6.7%

2.1 Aspectos clínicos

Anafilaxis; este mecanismo de daño inmunológico es muy poco frecuente; Halpern 1976 reportó un caso de una mujer con anticuerpos IgE dirigidos contra glucoproteínas del plasma seminal (18).

En cuanto a la mayoría de los hombres con anticuerpos antiesperma se presentan antecedentes patológicos los cuales incluyen: trauma, prostatitis, vesiculitis seminal, epidídimo-orquitis y atrofia testicular.

Experimentalmente la producción de la orquitis involucra la presencia de altos títulos de anticuerpos antiesperma que pueden provocar al menos dos efectos clínicos; interferencia con la producción normal de espermatozoides y reducción en su potencial de migración.

3. TECNICAS EMPLEADAS PARA LA INVESTIGACION DE ANTICUERPOS ANTIESPERMA

Las primeras pruebas descritas para investigar anticuerpos antiesperma se basan en la aglutinación o inmovilización del espermatozoide (6, 18).

En la prueba de Franklin y Duker o microaglutinación espermática, se emplea una placa cóncava en la que se colocan el semen y el suero inactivado, efectuándose la reacción antígeno-anticuerpo. La aglutinación del esperma por el suero se observa al microscopio (20).

La aglutinación que se presenta es generalmente cabeza con cabeza pero puede ser cola con cola o cabeza con cola.

El hecho de que los espermatozoides sean fácilmente aglutinados en forma natural bajo una variedad de condiciones en ausencia de anticuerpos, dificulta la interpretación de los resultados (20).

En la prueba de Kibrick o macroaglutinación, se utilizan espermatozoides suspendidos en un medio que contiene gelatina; el suero problema se coloca en tubos de ensayo, en dilución seriada y se agrega una cantidad constante de la suspensión de espermatozoides. La aglutinación se observa macroscópicamente. La adición de gelatina tiene por objeto disminuir las cargas eléctricas de

repulsión favoreciendo la aglutinación, pero no elimina interferencias por microorganismos o por hormonas sexuales esteroides que pueden modificar la aglutinación del espermatozoide, dando resultados falsos positivos o negativos (6,20,23).

Isojima y col. (1969) desarrollaron una prueba de inmovilización de los espermatozoides que es dependiente del complemento. En esta prueba, el suero inactivado se agrega a semen fresco y complemento; la movilidad espermática se expresa como la relación entre el número de espermatozoides inmóviles después de incubación por 1 h. a 37°C, comparado con un testigo negativo constituido por un suero normal, semen fresco y complemento; una proporción mayor de 2:1 se considera positiva (16,36).

Otra prueba es la inmunofluorescencia indirecta que comprende dos etapas; en la primera se prepara el antígeno mediante una extensión de espermatozoides sobre un portaobjetos, se fija con metanol, después se añade el suero del paciente se incuba y se lava para eliminar todas las proteínas que no reaccionaron.

En la segunda etapa la preparación se cubre con suero anti-gamma globulina humana marcado con fluoresceína, que reaccionará a su vez con el anticuerpo fijado al antígeno; se incuba y se lava para eliminar los anticuerpos libres.

Esta prueba presenta resultados inespecíficos en diluciones menores 1:16 y su uso está limitado a los laboratorios que cuenten con el microscopio de fluorescencia.

En cuanto a las reacciones de inmunoprecipitación se tiene que la doble difusión en gel, según Ouchterlony desde que fué descrita por su autor en 1949, ha sido aplicada al estudio de un gran número de sistemas antígeno-anticuerpo; entre ellos se encuentra la investigación de anticuerpos antiesperma (2,11,12).

La reacción se lleva a cabo en el seno de un gel de agar en el que antígeno y anticuerpo se difunden en forma radial, en el sitio donde se encuentren cantidades equivalentes se forman bandas de inmunoprecipitado (1,2).

Esta prueba presenta una mayor sensibilidad comparándola con las técnicas de aglutinación e inmovilización; además de que su ejecución es fácil, los resultados son reproducibles y fáciles de interpretar (25).

Buscando una mayor sensibilidad en los métodos para la investigación y cuantificación de los anticuerpos frente al semen humano se aplicó la técnica de contra-inmunolectroforesis (CIEF). Empleando un gel de agar cargado negativamente, los anticuerpos cuya carga neta

es muy baja se desplazan hacia el cátodo por el flujo endosmótico del amortiguador. Colocando el anticuerpo en el polo positivo y el antígeno en el polo negativo, al encontrarse ambos, se lleva a cabo la reacción de precipitación (39).

Por su parte la mayor sensibilidad en CIEF comparado con la doble difusión en gel se explica de la siguiente manera: cuando se efectúa la doble difusión tanto el antígeno como el anticuerpo se difunden en forma "radial" en cambio en la contraelectroforesis antígeno y anticuerpo emigran en una zona más restringida, concentrándose uno hacia el otro dando más sensibilidad por evitar pérdida de reactivos.

Mathur y Fudenberg estudiaron las técnicas de hemaglutinación indirecta y microcitotoxicidad en su afán de encontrar métodos suficientemente sensibles, específicos y que incluyan procedimientos que pueden ser de rutina en los laboratorios de inmunología (23).

La técnica de microcitotoxicidad propuesta por Mathur y Fudenberg puede ser considerada como modificación del método original de Hammerlynck y Rümke (35).

Consiste en hacer reaccionar una suspensión de espermatozoides previamente tratados con diacetilfluoresceína, con diluciones del suero del paciente en presen-

cia de complemento. Los espermatozoides vivos presentan fluorescencia de color verde, mientras que las células muertas tienen un color anaranjado; los resultados se observan empleando el microscopio de fluorescencia (31).

Lo más reciente fué reportado por L. Mettler al emplear la técnica inmunoenzimática (ELISA) a la investigación de anticuerpos antiesperma, la cual consiste en acoplar los antígenos espermáticos a una fase sólida (celulosa, las concavidades de una placa de lucita o bien a esferas de plástico), poniéndolos en contacto con el suero problema. Se mantiene la mezcla en incubación 2 horas a 37°C, seguida de lavados con amortiguador salino de fosfatos.

Después de este tratamiento se agrega antigamma - globulina humana marcada con peroxidasa, se incuba 1 hora a 37°C y se lava con amortiguador. Para el revelado de la reacción se utiliza como sustrato peróxido de hidrógeno y o-fenilén diamina, la intensidad del color producido se mide espectrofotométricamente a 492 nm.

Los valores de absorbancia obtenidos en los sueros problema se interpolan en la curva de referencia que se realiza con sueros hiperinmunes obtenidos en conejos (24).

4. HEMAGLUTINACION INDIRECTA

La aglutinación de un antígeno forme por su anticuerpo es una forma clásica y simple de investigar y cuantificar los anticuerpos en suero. Así en el caso de algunos antígenos solubles éstos pueden ser adsorbidos sobre materiales inertes como partículas de bentonita o látex y de esta manera actuar como antígenos formes y dar la reacción de aglutinación. Cuando se recurre al artificio de adsorber a los antígenos en partículas inertes, a este procedimiento se le llama aglutinación indirecta o pasiva (15).

En la hemaglutinación indirecta se utilizan como soporte del Ag o del Ac eritrocitos de carnero o humanos tipo "O", debido a que son fáciles de obtener y de conservar en el laboratorio bajo ciertas condiciones, durante por lo menos 15 días. Otra ventaja que ofrecen es que fijan espontáneamente a su superficie a polisacáridos y proteínas antigénicas, cualidad que se incrementa cuando los eritrocitos son tratados con sustancias como el ácido tánico, glutaraldehído o formalina (9,38).

Esta técnica en general se considera altamente sensible y fácil de realizar, por lo que su empleo se ha difundido ampliamente para el diagnóstico de un gran número de enfermedades.

Siendo crítica la carga eléctrica de la partícula y del agente para sensibilizar (Ag o Ac), la adsorción o acoplamiento del antígeno a los glóbulos rojos puede favorecerse por el tratamiento con ciertas sustancias, como en el caso de tratamiento con ácido tánico lo que mejora la capacidad de adsorción de los eritrocitos por el antígeno mediante fuerzas electrostáticas.

También el ácido tánico actúa aumentando la aglutinabilidad de los glóbulos rojos y estabilizando su membrana.

Otra forma simple y efectiva de unión del antígeno a los eritrocitos es mediante enlaces covalentes favorecido por el uso de compuestos como bencidina bis-diazoada difluoro dinitrobenzoceno y cloruro cromoico (15).

El fundamento de la técnica de hemaglutinación indirecta para la semicuantificación de anticuerpos consiste en utilizar eritrocitos de carnero como soporte para el antígeno; se hacen reaccionar cantidades constantes de la suspensión de eritrocitos sensibilizados con el antígeno frente a diluciones seriadas del suero problema, (Esquema No. 4).

Las inmunoglobulinas específicas para el antígeno aglutinarán a los eritrocitos. La dilución más alta de suero que produce una hemaglutinación clara representa el título de anticuerpos (9).

En este procedimiento los eritrocitos de carnero se lavan con amortiguador salino de fosfatos pH=7.2 se tratan primero con ácido tánico diluido 1:20,000 incubando 15 min. a 37°C y se lavan las células con amortiguador. Finalmente los eritrocitos sensibilizados se hacen reaccionar con el suero en estudio, llevándose a cabo la reacción de hemaglutinación si hay presencia de anticuerpos contra el antígeno (9,15,38).

Como algunos sueros humanos contienen anticuerpos heterófilos capaces de aglutinar eritrocitos de carnero es necesario incluir en la técnica un control de los sueros problema con eritrocitos tanados sin sensibilizar (9, 38).

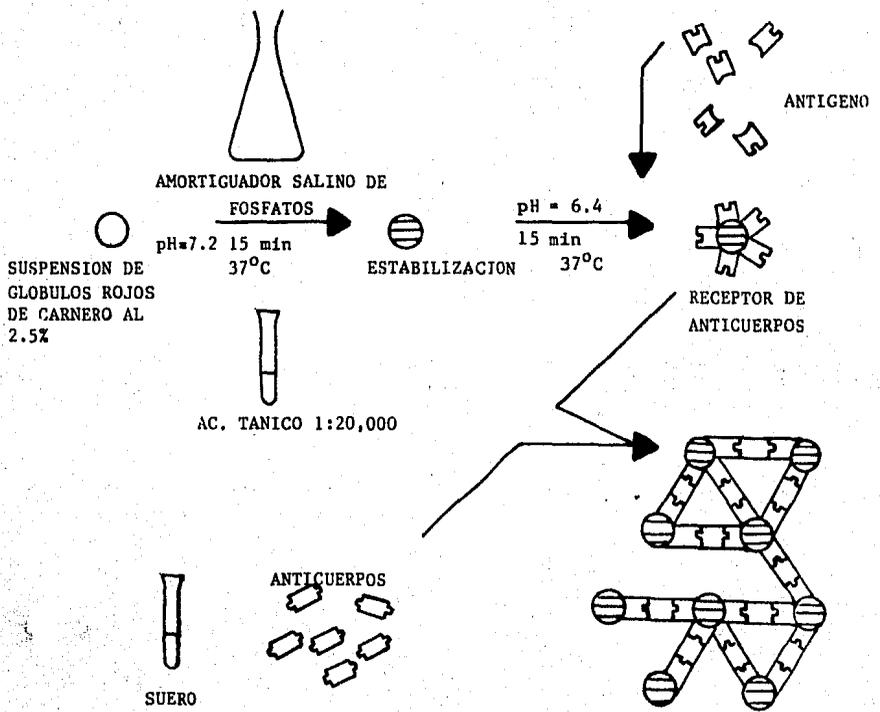
La técnica puede realizarse en tubo (macrotécnica) o en placa de microtitulación con fondo en "U" (microtécnica). Para pruebas más sensibles se utilizan tubos, pero esto implica un mayor gasto en reactivos y que tratándose de las comercializadas representa un precio elevado, por lo tanto se usa con mayor frecuencia placa de microtitulación con la cual hay una gran sensibilidad y un ahorro

considerable de reactivos (9).

Para la microtécnica se requiere cierto equipo especial; placas de microtitulación, micropipetas y microdilutores; pero con la ventaja de su alta sensibilidad y su fácil manejo.

Los eritrocitos sensibilizados pueden emplearse por un tiempo limitado, para preservarlos y poder almacenarlos existen varios métodos como el tratamiento con formaldehído y cuando se desea una mayor vigencia del reactivo la liofilización (9, 15).

Sobre la investigación de anticuerpos antiesperma hay reportes de autores como Gupta, Southam, Mathur y Fudenberg que aplicaron la técnica de hemaglutinación indirecta (6,23), en la búsqueda de una mayor sensibilidad y especificidad que no encontraban en las técnicas tradicionales de aglutinación.



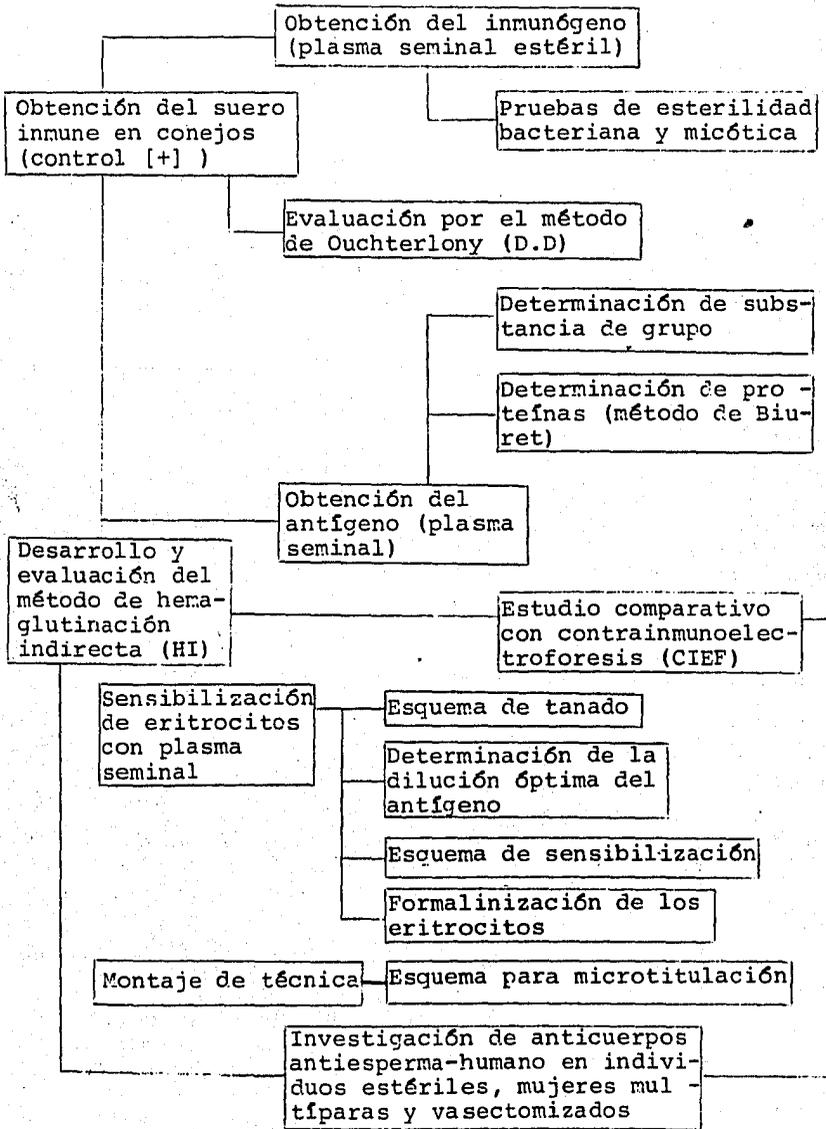
FUNDAMENTO DE LA REACCION DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA

ESQUEMA No. 4

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

1. DIAGRAMA



2. OBTENCION DEL ANTIGENO

Se utilizó en las técnicas de doble difusión (DD), hemaglutinación indirecta (HI) y conrainmunolectroforesis (CIEF).

El semen se obtuvo recolectando las muestras sobrantes de espermatobioscopias con resultados normales, del centro hospitalario "20 de noviembre" del ISSSTE, de la Unidad de Gineco Obstetricia del Centro Médico Nacional y de la Clínica 32 del IMSS.

Las muestras se mantuvieron congeladas por separado hasta tener un buen número de ellas, (aproximadamente 60 muestras de 2 ml cada una).

Posteriormente se descongelaron y se centrifugaron a 3 000 rpm durante 20 min para poder determinar en el plasma seminal la presencia de sustancias de grupo A y B mediante reacciones de inhibición de la aglutinación (Apéndice II-1).

Sólo se conservaron las muestras que carecieron de sustancias de grupo sanguíneo. Esto es necesario pues la sustancia de grupo presente en el plasma seminal de individuos secretores se podría adsorber en los glóbulos rojos de carnero que se emplearon en la técnica de hemaglutinación indirecta y posteriormente reaccionaría con las isoaglutininas presentes en los sueros en estudio.

Una vez comprobada la ausencia de sustancias de grupo se formó un lote, mezclando todas las muestras.

Se tomó una muestra de 1 ml y se determinó la cantidad de protefna en el plasma seminal por el método de Biuret (Apéndice I-1, la concentración fué de 0.035g/dl

Se distribuyó el plasma seminal (P.S.) en alícuotas de 0.5 ml que se mantuvieron en congelación hasta su uso.

Para el desarrollo y evaluación de la técnica propuesta, fué necesario obtener suero inmune de conejos. Este suero se utilizó como control positivo. Para esto se recolectó el semen de muestras de espermatobioscopias con resultados normales, en los mismos centros hospitalarios (Apéndice II-4).

3. CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF)

Se realizó un estudio comparativo con CIEF porque se ha comprobado que es una técnica inmunológica muy sensible y confiable en la investigación de anticuerpos frente al semen (2), (Esquema No. 5).

Para cada corrimiento electroforético (Apéndice II-5):

Se descongeló un frasco con plasma seminal y se prepararon diluciones seriadas de 0.5 ml en solución salina hasta una dilución 1:1280.

Las condiciones para cada corrimiento fueron:

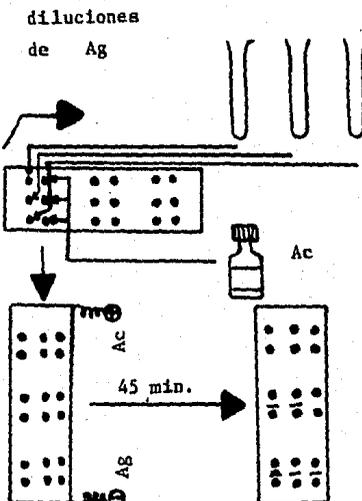
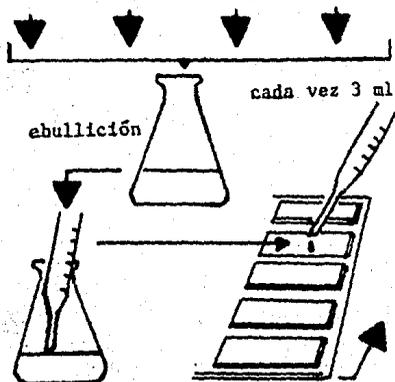
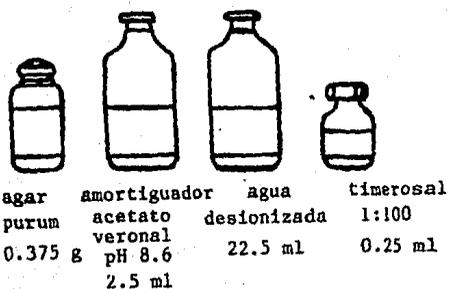
potencial 9 v/cm .

amortiguador para la cámara pH=8.6 $\mu = 0.05$

tiempo de corrimiento 45 min

Se probaron los sueros positivos determinándose el título de ellos, los resultados fueron los siguientes:

CIEF	título
Suero (+) 1	1:160
Suero (+) 2	1:80
Suero (+) 3	1:10
Suero (+) 4	1:160



PROCESO DE TRABAJO
 EN CIEF

ESQUEMA No. 5

4. HEMAGLUTINACION INDIRECTA (HI)

En la técnica se utilizaron glóbulos rojos de carnero (GRC) como soporte del antígeno.

En condiciones estériles se tomó 10 ml de sangre en solución de Alsever, se centrifugó a 2 000 rpm durante 3 min, desechando el sobrenadante y se lavó 3 veces con amortiguador salino de fosfatos (ASF) pH=7.2 y se preparó la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2.5%.

30 ml de la suspensión de GRC al 2.5% se trataron con el mismo volumen de una solución de ac. tánico 1:20,000, incubando 15 min a 37°C en un baño de agua (Apéndice II-6).

Se centrifugaron a 2 000 rpm durante 5 min. Se lavó 3 veces con amortiguador salino de fosfatos pH 7.2.

Se restituyó el paquete con el mismo volumen (30 ml) pero ahora con ASF pH=6.4

Para determinar la dilución óptima de antígeno se descongeló plasma seminal y se prepararon diluciones 1:10 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 con amortiguador salino de fosfatos pH=6.4, (Esquema No. 6).

Se procedió a sensibilizar los glóbulos rojos con cada dilución de antígeno de la siguiente forma:

A cada dilución se le agregó el mismo volumen de glóbulos rojos al 2.5% tanados, dejando como control un volumen de glóbulos rojos sin antígeno.

Se incubaron los tubos a 37°C durante 15 min y se centrifugaron 5 min a 2 000 rpm. Se lavaron 3 veces con amortiguador salino de fosfatos pH=7.2 con suero normal de conejo (SNC) al 1%.

Finalmente se restituyeron las células sensibilizadas con ASF pH=7.2 + SNC 1% para tener una concentración al 1.5%.

La dilución 1:80 de plasma seminal fué la dilución óptima de antígeno pues esta fué la dilución más baja de antígeno que dio el título más elevado 1:16384 con los sueros inmunes y además no dio reacción con el suero negativo.

Se observó que las diluciones 1:10, 1:20, 1:40 dieron reacción con el suero negativo.

HI	título
Suero (+) 1	1:16384
Suero (+) 2	1:16384
Suero (+) 3	1:16384
Suero (+) 4	1:16384

HEMAGLUTINACION INDIRECTA

Placa problema: GRC sensibilizados

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
suero (+) 1	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○] sueros positivos
suero (+) 2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○] control negativo	
suero (+) 3	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
suero (+) 4	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
suero (-) NC	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○] control de diluyente
diluyente	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		1: 8 16 32 64 128						16384						

Placa control: GRC sin sensibilizar

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
suero (+) 1	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○] control para Ac heterófilos
suero (+) 2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○] control de GR.	
suero (+) 3	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
suero (+) 4	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
suero (-) NC	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○] control de GR.
diluyente	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		1: 8 16 32 64 128						16384						

DETERMINACION DE LA DILUCION OPTIMA DE ANTIGENO

ESQUEMA No. 6

4.1 Montaje de la técnica. Esquema para microtitulación

Se utilizaron placas de microtitulación con fondo en "U" los sueros problema y sueros controles (+) y (-) se inactivaron a 56°C en baño maría 30 min. Se realizó una dilución inicial de los sueros, 1:8 pues se observó que a diluciones menores se obtuvieron reacciones inespecíficas.

Para cada placa se manejó un control (+), un control (-), el control del diluyente (ASF pH=7.2 + SNC 1%) y la placa control en la cual se utilizaron GRC sin sensibilizar, la cual sirvió para los controles de anticuerpos heterófilos y glóbulos rojos, (Esquema No. 8).

Se depositó 0.025 ml del diluyente a partir del pozo 2 en todas las hileras para los sueros. En la hilera del control del diluyente se comenzó desde el pozo 1.

A continuación se agregó 0.05 ml de las diluciones 1:8 de los sueros, en los pozos 1 de cada hilera, menos en la hilera del control del diluyente.

Se cargaron los microdilutores en los pozos 1 de cada hilera transfiriendo 0.025 ml de los siguientes pozos, se mezcló y nuevamente se transfirió repitiendo el proceso hasta el último pozo del cual se descartó 0.025 ml.

Ya hechas las diluciones de los sueros se agregó 0.025 ml de glóbulos rojos de carnero sensibilizados a todos los pozos. A la placa control se le agregó la suspensión de GRC no sensibilizados.

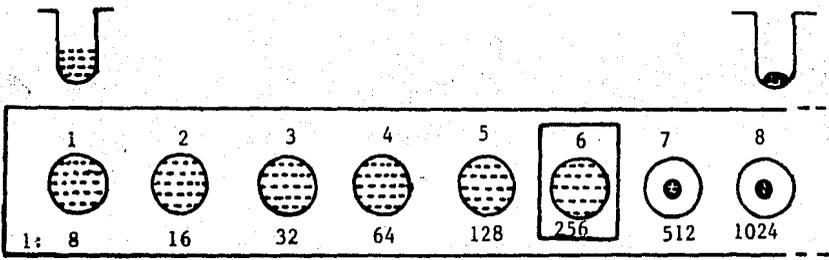
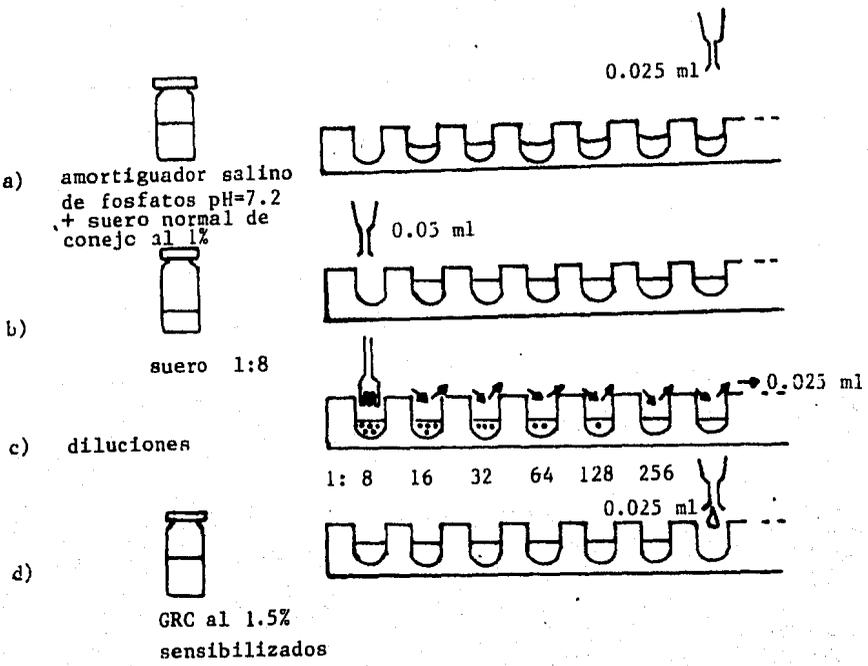
Inmediatamente se agitaron en un rotor durante 5 minutos y posteriormente se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas.

Un resultado positivo ocurre cuando los eritrocitos aglutinan en forma homogénea en la coquead. En un resultado negativo se forma un botón en el fondo del pozo.

La dilución más alta de suero que muestra una hemaglutinación clara se considera como punto final de la reacción y representa el título de anticuerpos. (Esquema No. 7).

En el caso de presencia de anticuerpos heterófilos fué necesario repetir la prueba con el suero previamente absorbido con glóbulos rojos de carnero.

Los sueros de personas estériles, mujeres multíparas e individuos vasectomizados fueron gentilmente proporcionados por la Unidad de Gineco-Obstetricia del Centro Médico Nacional, por la Clínica 32 del IMSS y en su mayor parte por el laboratorio particular del Dr. Luir Rodríguez Villa, jefe del laboratorio del Sanatorio Español.



TITULO

HEMAGLUTINACION INDIRECTA
MICROTECNICA

ESQUEMA No. 7

HEMAGLUTINACION INDIRECTA

Placa problema: GRC sensibilizados con dil. óptima de Ag

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
suero	1	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	} problemas	
suero	2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
suero	3	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
suero	4	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
suero	5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
suero (+)	1	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	} control positivo		
suero (-)	1	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		} control negativo	
diluyente		H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	} control de diluyente		
		1: 8 16 32 64 128					16384								

Placa control: GRC sin sensibilizar

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
suero	1	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	} control para Ac heterófilos	
suero	2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
suero	3	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
suero	4	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
suero	5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
suero (+)	1	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	} control de GR		
suero (-)	1	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
diluyente		H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
		1: 8 16 32 64 128					16384								

APLICACION DEL METODO EN SUEROS PROBLEMA

ESQUEMA No. 8

4.2 Estabilización de los reactivos. Formalinización

A una suspensión de GR (30 ml) sensibilizados con plasma seminal y al mismo volumen de células no sensibilizadas (control negativo de antígeno heterófilo), se les agregó lentamente, gota a gota, 3 ml de formalina al 40%.

Se dejó reposar 18 horas a 4°C, al cabo de este período se agregó nuevamente el mismo volumen de formalina.

Al tercer día se retiró el sobrenadante resuspendiendo las células formalinizadas al volumen original con amortiguador salino de fosfatos pH = 7.2 + SNC 1% llevando la suspensión al 1.5%. Finalmente se agregaron 3 gotas de formalina al 40%.

Las células así tratadas tienen un tiempo de vigencia aproximado de 6 meses y el título máximo obtenido con los sueros hiperinmunes fue 1:2,048.

CAPITULO IV

RESULTADOS

MATERIAL ESTUDIADO

- A) 5 sueros de conejos inmunizados
con plasma seminal humano,
como control (+)
- B) 1 suero inmune de fuente comer-
cial
- C) 1 suero control (+) humano
- D) 11 sueros procedentes de niños,
como control (-)
- E) 100 sueros de personas estériles,
sin causa orgánica
- F) 50 sueros de mujeres múltiparas
- G) 2 sueros de individuos vasecto-
mizados

RESULTADOS

Resultados obtenidos en los sueros humanos estudiados por la técnica de hemaglutinación indirecta:

Personas estériles no se detectaron anticuerpos
antiesperma

Mujeres multíparas un suero positivo en 50
muestras, título 1:32

Individuos vasecto- no se detectaron anticuerpos
mizados antiesperma

Por CIEF y doble difusión no se detectaron anticuerpos -
antiesperma en los sueros estudiados.

Controles positivos utilizados en el desarrollo de la -
técnica:

Sueros de conejos título 1:16,384
inmunizados con
plasma seminal hu-
mano.

DISCUSION

Solo se encontraron anticuerpos antiesperma en uno de 50 sueros procedentes de mujeres multiparas, el título encontrado fué 1:32. Se estudiaron 100 muestras de pacientes infértiles y no se detectaron anticuerpos antiesperma, seguramente porque la infertilidad se debía a otros motivos por lo que se considera necesario trabajar con una población mayor restringida a aquellos pacientes en los cuales se han excluido otras posibles causas de infertilidad.

En el caso de los individuos vasectomizados solo se pudo estudiar un número muy pequeño de muestras.

En el suero con resultado positivo no se detectaron anticuerpos antiesperma por las técnicas de inmunoprecipitación pues era necesario al menos un título 1:100 en hemaglutinación indirecta para que se obtuvieran bandas de precipitación.

CAPITULO V

RESUMEN

En el presente trabajo se aplicó la técnica de hemaglutinación indirecta para la investigación de anticuerpos antiesperma-humano, en sueros con alta probabilidad de presentarlos como son los procedentes de personas estériles, mujeres multíparas e individuos vasectomizados; utilizando las técnicas de doble difusión y contraímmunoelectroforesis como métodos de comparación.

Se planeó desarrollar la técnica de hemaglutinación en este sistema inmunológico por ser un método accesible a cualquier laboratorio ya que su ejecución es sencilla, no requiere de un equipo complicado y tiene una gran sensibilidad.

Para el desarrollo y evaluación de la técnica propuesta se obtuvieron sueros inmunes de conejos, estos sueros se utilizaron como controles positivos .

Lo siguiente fué la recolección del antígeno (plasma seminal), obtenido de espermatozoides pero empleando sólo las que carecían de sustancias de grupo A, y B. Para conocer la concentración de proteínas antigénicas se determinó su concentración por el método de Biuret.

Como controles negativos se utilizaron sueros procedentes de niños.

Después se realizó el montaje de la técnica. Se emplearon eritrocitos de carnero sensibilizados con plasma seminal para lo cual, se procedió al tanado de las células y posteriormente se buscó la dilución óptima del antígeno para sensibilizarlos.

Con todo lo anterior se procedió a evaluar el esquema de microtitulación, empleando los controles positivos, los sueros negativos y además un control del diluyente y una placa duplicado pero utilizando eritrocitos de carnero sin sensibilizar, que sirvió como control para anticuerpos heterófilos y control de eritrocitos.

El estudio se hizo comparativo con CIEF, pero los resultados de esta técnica fueron similares en cuanto a sensibilidad con doble difusión radial.

Esto se debe a que la contraelectroforesis es especialmente susceptible a cualquier cambio en factores como pH y fuerza iónica del amortiguador, voltaje e intensidad de corriente aplicados, temperatura, grosor del gel, etc; lo que se evita al tener un cuidado extremo de estas variables y con el manejo continuo de la técnica.

La sensibilidad de la técnica de hemaglutinación indirecta fué 100 veces mayor que las pruebas de inmunoprecipitación en gel, empleando para sensibilizar a los glóbulos rojos de carnero, una dilución 1:80 de plasma seminal con una concentración de proteínas de 0.035 g/dl.

Después se realizó el montaje de la técnica. Se emplearon eritrocitos de carnero sensibilizados con plasma seminal para lo cual, se procedió al tanado de las células y posteriormente se buscó la dilución óptima del antígeno para sensibilizarlos.

Con todo lo anterior se procedió a evaluar el esquema de microtitulación, empleando los controles positivos, los sueros negativos y además un control del diluyente y una placa duplicado pero utilizando eritrocitos de carnero sin sensibilizar, que sirvió como control para anticuerpos heterófilos y control de eritrocitos.

El estudio se hizo comparativo con CIEF, pero los resultados de esta técnica fueron similares en cuanto a sensibilidad con doble difusión radial.

Esto se debe a que la contrainmunolectroforesis es especialmente susceptible a cualquier cambio en factores como pH y fuerza iónica del amortiguador, voltaje e intensidad de corriente aplicados, temperatura, grosor del gel, etc; lo que se evita al tener un cuidado extremo de estas variables y con el manejo continuo de la técnica.

La sensibilidad de la técnica de hemaglutinación indirecta fué 100 veces mayor que las pruebas de inmunoprecipitación en gel, empleando para sensibilizar a los glóbulos rojos de carnero, una dilución 1:80 de plasma seminal con una concentración de proteínas de 0.035 g/dl.

Una vez que se tuvieron estandarizadas todas las condiciones se procedió a aplicar el estudio en la investigación de anticuerpos antiesperma-humano en sueros de personas estériles, vasectomizadas y multíparas.

Finalmente como método para estabilizar los reactivos, se trataron con formaldehído. Se probaron con los sueros hiperinmunes los cuales dieron títulos 8 veces más bajos con los glóbulos rojos formalinizados pero la estabilidad de las células se prolongó durante los 6 meses que duró el estudio.

CONCLUSIONES

La hemaglutinación indirecta es aplicable a la investigación de anticuerpos frente al semen como lo demuestran los resultados de este trabajo.

Es una técnica sensible, reproducible, sencilla; rápida, la cantidad de reactivos que utiliza es mínima con la opción de prolongar su estabilidad por el tratamiento a los glóbulos rojos.

Al compararse con técnicas de inmunoprecipitación su sensibilidad fué 100 veces mayor.

A manera de prueba piloto el método se aplicó en la búsqueda de anticuerpos antiesperma en sueros humanos, - obteniéndose solo un caso positivo en la población de mujeres multíparas.

Esta técnica queda ya lista para su aplicación al estudio de sueros de individuos vasectomizados para lograr así dilucidar si en este procedimiento se produce una respuesta autoinmune y con qué frecuencia sucede.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

1. Acosta, M. Manual de ejercicios de laboratorio, Inmunología General. Fac. Química. UNAM. (1981).
2. Acosta, M., Fraga, S., Fraga, F. y Fraga, F. La investigación de anticuerpos frente al semen por contraelectroforesis Medicina (Méx.), Tomo IV /33-39 (1975).
3. Ada, G., Basten, A. y Janes, W. Prospects for developing vaccines to control fertility. Nature. 317/6035/288-289 (1985).
4. Alexander, N. Immunological aspects of vasectomy. in Boettcher (Ed), Immunological influence in human fertility, Academic Press, (1977).
5. Barret, J. Inmunología, Ed. Interamericana. Méx. (1985).
6. Beer, A., Neaves, W. Antigenic status of semen from the viewpoints of the female and male. Fertil. Steril. 29/3-22 (1978).

7. Cuenca, I., Salas, M. Investigación de anticuerpos - antiespermatozoide en pacientes - vasectomizados y parejas infértiles. Licenciatura, Q.F.B., Fac. - Química, UNAM. 1981.
8. Edwards. R. Immunity and control of human - fertility. in Scott, J. and Jones W. (Eds) Immunology of human re- production, Academic Press, N.Y. (1976).
9. Fawcett, D. Interpretation of the sequelae of vasectomy. in Lepow, I. and Cro - zier, R. (Eds), Vasectomy. Immu- nologic and pathophysiologic effects in animals and man, Aca- demic Press, N.Y. (1979).
10. Manual de prácticas de Inmunolo- - gía Aplicada. Fac. Química. UNAM. (1982).
11. Fraga, S., Acosta, M., Fraga, F. y Fraga, F. Aspectos técnicos de la preparación de una

vacuna antiesperma-humano.

Medicina (Méx). Tomo LIII / 490 -
495 (1973).

12. Fraga, S., Acosta, M., Fraga, F. y Fraga, F. La presencia de anticuerpos frente al semen - como causa de infertilidad.

Medicina (Méx). Tomo LIII/483-489
(1973).

13. Ham, A.

Tratado de Histología. Octava Edición. Ed. Interamericana. Méx.
361, 939. 1984.

14. Hess, E.

Studies on the immune system in human vasectomy, in Lepow, I. and Crozier, R. (Eds), Vasectomy. Immunologic and pathophysiologic effects in animals and man, Academic press, N.Y. (1979).

15. Herberth. W.

Passive haemagglutination with special reference to the tanned cell technique. in Weir (Ed), Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Oxford, (1973).

16. Isojima, S., Liand, T. S. y Ashitaka, Y. Immunologic analysis of sperm immobilizing factor found in sera of women with unexplained sterility. Am. J. Obst. Gynec. 101/677-683 (1968).
17. James, K, Hargreave, T. Immunosupresion by seminal plasma and its posible clinical significance. Immunology Today. 5/12/357-363 (1984).
18. Jones, W. Immunological aspects of infertility. in Scott, J. and Jones, W. (Eds), Immunology of human reproduction, Academic Press, N.Y. (1976).
19. Kremer, L. Antoni Van Leeuwenhoek, the founder of "spermatology". in Boettcher (Eds), Immunological influence on human fertility, Academic Press, (1977).
20. Kibrick, S., Belding, D. Methods for the detection of antibodies against mammalian

spermatozoa. Fertil. Steril. 3/
419, 430 (1952).

21. Kolk, A. Isolation of sperm specific auto-antigens. in Lepow, I. and Crozier. R. (Eds), Vasectomy. Immunologic and pathophysiologic effects in animals and man. Academic Press, N.Y. (1979).
22. Lennert, K. Schöder, H. y Mondorf, W. Sobre la inmunología del líquido prostático. Minerva Médica. 61/86/ 194-153 (1970).
23. Mathur, S., Fudenberg, H. Antibodies to sperm as a causative factor in human infertility: a response. Immunology Today 2/ii/oct. (1981).
24. Paul, S., Baukloh, V. y Mettler, L. Enzyme-linked immunosorbent assays for sperm antibody detection and antigenic analysis. J. Immunol. Methods. 56 /2/ 193-199 (1983).
25. Raghupathy, R. Assays for sperm antibodies. Immunology Today. 3/2/30 (1982).

26. Rodríguez, L. Estudio del líquido seminal. Bioquímica. IV/26/ 941-946 (1982).
27. Rodríguez, L. Espermatobioscopia indirecta. Rev. Méx. Pat. Clfn. XXX /1/ 1-18 (1980).
28. Roitt, I. Essential immunology. Cuarta Edición. Blackwell Scientific Publications. Oxford. (1980).
29. Rumke, Ph. Immunologic studies in long-term follow up of vasectomized men. in Lepow, I. and Crozier, R. (Eds), Vasectomy. Immunologic and pathophysiological effects in animals and man, Academic Pres, N.Y. (1979).
30. Scarselli, G. Incidence of antiespermatozoal antibodies in sera and seminal plasma from male partners of infertile couples. in Boettcher (Ed), Immunological influence on human fertility, Academic Press. (1977)

31. Schultze, H., Hermans, J. Molecular biology of human protein. Ed. Elsevier Publishing Company. The Netherlands. Vol. 1. 548-852. (1966).
32. Schwich, G., Störico, K. Hojas de laboratorio. Reactivos Behringwerke. Méx. 1964.
33. Stites, D., Stobo J. y Fundenberg, H. Inmunología básica y clínica. Quinta Edición. Editorial El Manual Moderno. Méx. (1985).
34. Shearer, G., Hurtenbach, U. Is sperm immunosuppressive in male homosexuals and vasectomized men? Immunology Today 3/6/ 153 (1982).
35. Shulman, S. Antibodies to sperm as a causative factor in human infertility. Immunology Today. 2/123-4/jul (1981).
36. Shulman, S. Immunologic barriers to fertility. Obstet. Gynec Survey. 27/8/553-606 (1972).

37. Stirrat, G. Leucocyte therapy for recurrent spontaneous abortion. Immunology Today. 5/11/318 (1984).
38. Sociedad Mexicana de Parasitología, A. C. Manual del curso teórico-práctico "Métodos inmunoserológicos para el diagnóstico de las parasitosis". Méx. (1978).
39. Tietz, N. Química Clínica moderna. Ed. Interamericana. Méx.
40. Tung, K. Antisperm antibody in vasectomy: studies in human and guinea pig. in Lepow, J. and Crozier, R. (Eds) Vasectomy. Immunologic and patho - physiologic effects in animals and man, Academic Press, N. Y. (1979)
41. Wegman, T. Reassurance on immune effects of vasectomy. Immunology Today. 5/2/33 (1984).

APENDICE 1
METODOS QUIMICOS

1. DETERMINACION DE PROTEINAS METODO DE BIURET

1.1 Fundamento

Las proteínas y los péptidos forman en solución moderadamente alcalina con iones Cu^{++} , un complejo de color violeta. Esta reacción llamada reacción de Biuret ocurre entre el ión Cu^{++} y los grupos $-\text{C}=\text{O}$ y $=\text{N}-\text{H}$ de las uniones peptídicas; un ión cúprico se enlaza a 4-6 uniones peptídicas por enlaces coordinados, cuanto mayor es la cantidad de proteína presente, tanto más uniones peptídicas hay disponibles para la reacción.

La intensidad de color producido es proporcional al número de uniones peptídicas que intervienen en la reacción de Biuret como base de un método colorimétrico simple y rápido para la determinación de proteínas.

Se dispone de gran número de modificaciones del procedimiento; pero el principio es similar, variando en porcentajes y en la formulación del reactivo usado para formar el color de Biuret; con la mayoría de los métodos se pueden determinar proteínas en el intervalo de 0.5 a 15 mg de proteínas en la porción alícuota que se mide (39).

1.2 Equipo:

espectrofotómetro

balanza analítica

1.3 Material:

tubos de ensayo 12X75 mm (4)

tubos de ensayo 13X100 mm (6)

pipeta de 10 ml

pipeta de 5 ml

pipeta de 0.1 ml

gradilla

espátula

matraz aforado de 10 ml

matraz aforado de 100 ml

matraz aforado de 200 ml

probeta de 100 ml

frascos ambar (3)

1.4 Reactivos:

Reactivo de Biuret

- diluyente de Biuret

Se disuelve 1.0 g de KI en 200 ml de NaOH 0.25 N

- reactivo de Biuret

Se disuelven 1.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en 8 ml. de agua.

Se prepara una solución con 4.5 g de tartrato de

sodio y potasio tetrahidratado en 70 ml de diluyente

de Biuret y se agrega lentamente agitando, la solución de CuSO_4 .

Ambas soluciones deben estar a temperatura ambiente cuando se mezclen. Se afora a 100 ml con diluyente de Biuret (Biuret concentrado).

Para el Biuret de trabajo se diluye 1:5 con diluyente de Biuret.

Solución patrón de albúmina sérica bovina 6 g/dl.

Se pesan 0.6 g de albúmina purificada y se disuelven en 5 ml. de solución salina isotónica aforando a 10 ml.

1.5 Método:

- Preparación de la curva patrón:

En tubos de ensayo de 12X75 mm, se preparan a partir de la solución patrón de 6 g/dl., 3 diluciones para tener 4 puntos de la curva, de la siguiente manera:

ml patrón concentrado	ml sol. salina isotónica	concentración final
0.1	-	6.0 g/dl
0.3	0.1	4.5 g/dl
0.1	0.1	3.0 g/dl
0.1	0.2	1.5 g/dl

Se separa una muestra de 0.2 ml del lote de plasma seminal que se va a usar como antígeno.

En tubos de ensayo de 13X100, se miden 0.1 ml de la muestra de antígeno así como 0.1 ml. de c/u de las diluciones del patrón, para correr la curva y el problema al mismo tiempo, como sigue:

	p a t r ó n				problema	blanco
	1	2	3	4		
patrón 6.0 g/dl	0.1ml	-	-	-	-	-
4.5 "	-	0.1ml	-	-	-	-
3.0 "	-	-	0.1ml	-	-	-
1.5 "	-	-	-	0.1ml	-	-
plasma seminal	-	-	-	-	0.1ml	-
H ₂ O destilada	-	-	-	-	-	0.1ml
react. Biuret	5.0ml	5.0ml	5.0ml	5.0ml	5.0ml	5.0ml
Mezclar, reposo 30 min. a t° amb. Leer D.O. a 545 nm						

1.6 Interpretación

- Se grafica la D.O. contra la concentración usando papel milimétrico
- Por interpolación del valor de D.O. del problema en la curva patrón se obtiene la concentración de proteína del antígeno en g/dl.

DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES EN PLASMA SEMINAL

El contenido de proteínas del plasma seminal que se utilizó como antígeno fué de 2.8 g/dl. determinado por el método de Biuret y mediante la siguiente curva patrón:

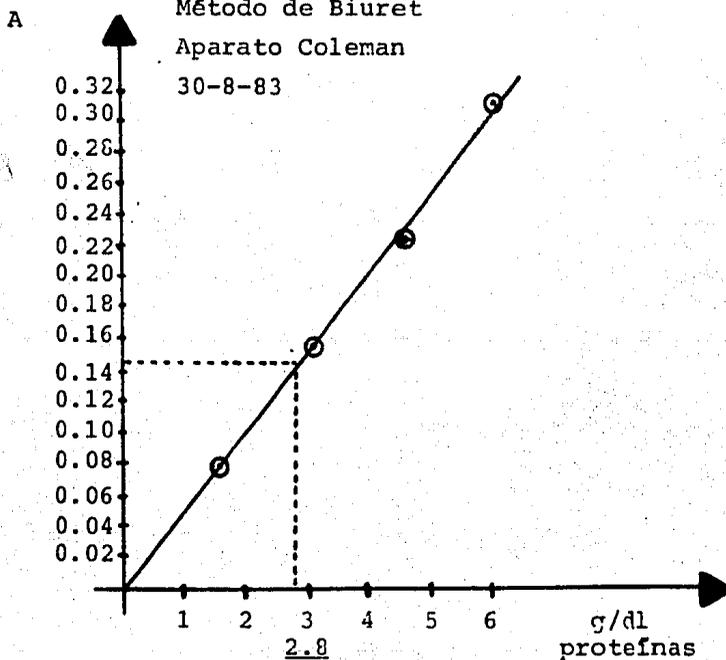
concentración g/dl	absorbancia
6.0	0.310
4.5	0.220
3.0	0.150
1.5	0.075
plasma seminal	0.145

Determinación protefnas en plasma seminal

Método de Biuret

Aparato Coleman

30-8-83



APENDICE II
METODOS INMUNOQUIMICOS

1. DETERMINACION DE SUBSTANCIAS DE GRUPO SANGUINEO
DEL SISTEMA ABO EN PLASMA SEMINAL

1.1 Fundamento

Básicamente este sistema está formado por los grupos A, B, AB y O. En la sangre de los individuos pertenecientes al grupo A se encuentra el antígeno eritrocítico A y aglutininas anti B. En el grupo B, se encuentra el aglutinógeno B y las aglutininas anti A, el grupo AB posee ambos aglutinógenos y carece de aglutininas en tanto que el grupo O carece de aglutinógenos y posee aglutininas anti A y anti B (1).

Las sustancias A y B no solo se presentan en su forma soluble en alcohol contenidas en eritrocitos y otras células del organismo, sino también pueden existir como sustancias hidrosolubles y entonces se les puede detectar además de en las células, en los líquidos y secreciones del organismo. Aproximadamente el 80% de la raza blanca secretan estas sustancias, por lo que se les llama "secretores" y para su detección se utilizan reacciones de inhibición de la aglutinación (1,10).

El plasma seminal de un individuo secretor contiene sustancias A o B o ambas, estas sustancias neutralizan a los sueros anti A y anti B e inhiben la aglutinación de

los eritrocitos A o B.

La presencia de substancia de grupo sanguíneo está indicada por la inhibición de la aglutinación de los eritrocitos. Los testigos constituidos por suero anti A o suero anti B más los glóbulos rojos respectivos deberán mostrar aglutinación franca.

1.2 Equipo

centrifuga clínica

reloj de intervalos

1.3 Material

Tubos de ensaye 12X75 mm (20)

tubos cónicos (2)

pipetas de 1 ml. (4)

gradilla

frascos ampula (4)

1.4 Reactivos

Suspensión al 2% de eritrocitos grupo A

Se mide 1 ml. de sangre total del grupo A en un tubo cónico y se centrifuga a 2,000 rpm durante 5 min.

Se lava 3 veces con solución salina isotónica.

Para 25 ml de suspensión, se mide 0.5 ml del paquete de eritrocitos lavados aforando a 25 ml. con solución salina isotónica.

Suspensión al 2% de eritrocitos grupo B

Se prepara en la misma forma que la anterior.

Suero Anti A y suero anti B 1:4

Por cada volumen del suero comercial medido se agregan 3 volúmenes de solución salina isotónica.

1.5 Método

- Las muestras de semen se centrifugan. En una gradilla se coloca el doble de tubos de ensayo de acuerdo al número de muestras, se deposita 1 gota de plasma seminal en cada tubo, a dos últimos tubos de los agrega en lugar de plasma seminal, una gota de solución salina isotónica, estos tubos servirán como testigos de la aglutinación.
- Se dividen los tubos en dos series. A una serie se le agrega 1 gota de suero anti A 1:4 y a la otra serie suero anti B 1:4.
- Se mezcla perfectamente el contenido de los tubos y se dejan reposar a temperatura ambiente durante exactamente 10 minutos.
- Después se agrega a todos los tubos 1 gota de la suspensión de eritrocitos del grupo A o del grupo B según corresponda. Se mezcla y se dejan reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifuga a 1000 rpm durante 1 minuto. Se remueven suavemente los eritrocitos sedimentados y se observa si existe aglutinación macroscópica.

1.6 Interpretación

grupo sanguíneo	substancias presentes
AB	H, A Y B
A	H, A
B	H, B
O	H

2. DOBLE DIFUSION RADIAL. TECNICA DE OUCHTERLONY

2.1 Fundamento

Es una técnica extremadamente útil por la sencillez de su realización, se basa en el principio de que el antígeno y el anticuerpo se difunden en forma radial a través de un medio semisólido de agar purificado disuelto en amortiguador acetato-veronal; en el lugar donde el antígeno y su anticuerpo se encuentran en concentraciones equivalentes se forma una banda de precipitación (2,11).

En el caso de probar un antígeno constituido por una mezcla de fracciones antigénicas frente a una mezcla de anticuerpos se forman varias bandas y cada una corresponde a una fracción antigénica diferente (1).

La velocidad de difusión de los reactivos es una función de la concentración (c), del área de superficie disponible para la difusión (A), del grosor del medio de difusión (d) y de la constante de difusión de la sustancia (K). Esta relación se conoce como ley de Fick y está expresada por:

$$v = \frac{KAc}{d}$$

La constante de difusión K, depende a su vez del peso molecular y estructura de la sustancia, así como de su solubilidad y grado de ionización.

2.2 Equipo:

balanza analítica

2.3 Material:

portaobjetos (12)

horadador 4 mm de diámetro

capilares (10)

placa de vidrio

nivel de gota

plantilla para perforación

tripié con tela de alambre

mechero

probeta de 50 ml.

pipeta de 10 ml.

tubos de ensayo 13X100 mm (12)

recipiente con tapa, para cámara húmeda

tubos con tapón de rosca (2)

matraz Erlenmeyer 125 ml.

2.4 Reactivos:

Amortiguador acetato veronal pH=8.6 $\mu=0.1$

Se disuelve un frasco de amortiguador pH=8.6 $\mu=0.1$
(de fuente comercial) en un litro de agua desionizada.

Agar al 1.5% en amortiguador acetato-veronal pH=8.6
 $\mu = 0.05$

Para 25 ml. se pesan 0.375 g de agar purum, se colocan en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. El amortiguador tiene una fuerza iónica de 0.1 y para las placas se requiere a $\mu=0.05$, se miden 12.5 ml. de amortiguador a $\mu=0.1$ y se afora a 25 ml. con agua desionizada. Los 25 ml. se agregan al agar pesado, además se agregan 0.25 ml. de timerosal 1:100 como conservador. Se calienta el agar, en baño de agua hirviente hasta su completa disolución, después se coloca en tubos de 13X100 depositando 3 ml. en cada tubo, se tapan con parafilm, se rotulan y se guardan en refrigeración hasta su uso.

Agar al 0.5% para sellar

Para 20 ml. se pesa 0.1 g de agar purum, se colocan en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. que contenga 20 ml. de agua destilada, disolver calentando en baño de agua hirviente, se agregan 0.2 ml. de timerosal 1:100 como conservador. Se guarda en tubos con tapón de rosca y se refrigera hasta su uso.

2.5 Método:

- Preparación de las placas:

Sellado de portaobjetos. Los portaobjetos perfectamente limpios se desengrasan en una mezcla de etanol/acetona. Para sellarlos se barnizan con el agar al 0.5% fundido y

se dejan solidificar a temperatura ambiente.

Se funde el agar al 1.5% de los tubos, se enfrían a 80°C, se colocan en una superficie nivelada y se vacían 3 ml. uniformemente sobre cada portaobjetos de manera que quede una capa homogénea, se deja solidificar perfectamente el gel de agar.

Se prepara una cámara húmeda para las placas y se colocan en refrigeración durante 15 min.

Se coloca una laminilla sobre la plantilla y con el horador se perfora el gel en forma de roseta es decir uno central y seis periféricos, se retiran los cilindros de gel. En cada portaobjeto, se pueden practicar dos rosetas,

Esquema No. 9

- Inmunodifusión:

Con capilares diferentes, se colocan las diluciones del plasma seminal en la periferia siguiendo el sentido de las manecillas del reloj y el suero hiperinmune en el pozo central de manera que se llenen completamente y sin derramar - su contenido.

Se colocan las laminillas en cámara húmeda a temperatura ambiente 24-48 h.

Se hace la lectura y se registran los resultados.

2.6 Interpretación

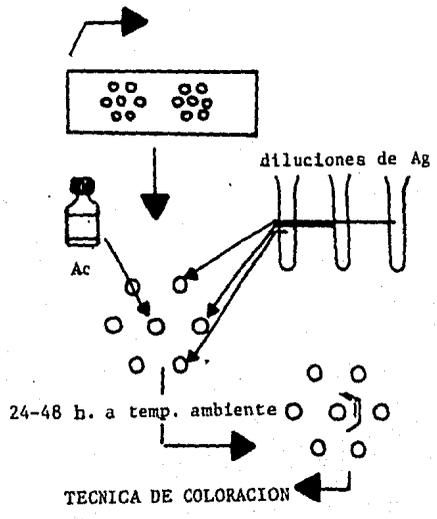
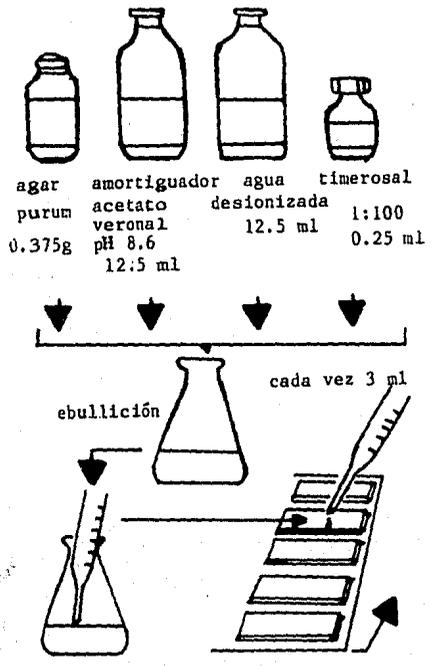
Se registran las bandas de precipitación que aparecen.

Si es necesario, las laminillas se pueden teñir.

La presencia de bandas de precipitación entre el antígeno y el suero, se considera como una reacción positiva.

El título de anticuerpos estará dado por la dilución más alta que da bandas de precipitación definidas.

PROCESO DE TRABAJO
 PARA LAS PRUEBAS DE DIFUSION
 EN GEL, SEGUN OUCHTERLONY



ESQUEMA No. 9

3. TECNICA DE COLORACION DE LOS INMUNOPRECIPITADOS

3.1 Fundamento:

La técnica de coloración se basa en la capacidad que tienen las proteínas para captar colorantes como el negro de amido y rojo de Ponceau, así como en la facilidad de estos colorantes para penetrar a través del gel de agar (33,38).

3.2 Equipo:

balanza analítica
reloj de intervalos

3.3 Material:

probeta 100 ml.
matraz aforado de 1,000 ml.
cajas de Coplin (3)
pinzas millipore

3.4 Reactivos:

Solución salina isotónica (0.85%)
Solución de ac. acético al 2%
Colorante: negro de amido 10 B. Se pesan 0.5 g de negro de amido 10 B y se disuelven en 100 ml de metanol-ácido acético glacial (9:1)
Mezcla metanol-ácido acético glacial (9:1)

3.5 Método:

3.5.1 Eliminación de las proteínas que no reaccionaron

Las placas de agar se lavan con solución salina isotónica y agitación durante 6 h.

Las placas de agar lavadas se recubren con tiras de papel filtro humedecidas, evitando que queden burbujas de aire. Se dejan secar a temperatura ambiente de 24 a 48 h. Se quitan las tiras de papel de las placas de agar y se colocan 5 min. en ácido acético al 2%.

3.5.2 Tinción:

Se colocan las laminillas en la caja de Coplin que contiene el colorante negro de amido, durante 2 min.

3.5.3 Decoloración:

Se escurre el colorante y se sumergen las laminillas en metanol-ácido acético glacial 9:1 durante 15 min.

Se hacen varios cambios hasta que el gel de agar quede incoloro y solo las bandas de precipitación estén teñidas.

4. OBTENCION DEL SUERO INMUNE EN CONEJOS

Este suero se utilizó como control positivo para la evaluación del método desarrollado.

OBTENCION DEL INMUNOGENO

El semen se obtuvo recolectando las muestras sobrantes de espermatobioscopias con resultados normales, del centro hospitalario "20 de noviembre" del ISSSTE, de la Unidad de Gineco Obstetricia del Centro Médico Nacional y de la Clínica 32 del IMSS.

Las muestras se mantuvieron congeladas hasta tener un volumen apreciable, se descongelaron y se centrifugaron 2 veces a 3,000 rpm. durante 20 minutos para eliminar la mayor cantidad posible de espermatozoides obteniéndose así el plasma seminal.

Se formó un lote, mezclando las muestras centrifugadas, el cual se esterilizó por filtración en Seitz. Del filtrado estéril se separó una muestra de 4 ml. para realizar la prueba de esterilidad bacteriana y micótica; para esto se sembraron muestras de 0.5 ml. en tubos conteniendo 16 ml de medio de tioglicolato fluido (USP), así como tubos conteniendo el mismo volumen pero de medio Saboureaud líquido (USP), los primeros se incubaron a 32-35°C durante 7 días y los de Saboureaud a temperatura ambiente durante 14 días. Diariamente se hizo la observación de los tubos para evidenciar cualquier indicio de desarrollo bacteriano o de hongos. Como no hubo desarrollo se procedió a la inmunización de los conejos.

ESQUEMA DE INMUNIZACION

Se inocularon 5 conejos, siguiéndose el esquema de inmunización que se describe en la tabla No. 3

TABLA No. 3

dfa	plasma seminal humano (ml)	adyuvante completo de Freund (ml)	vía de administración
1	0.5	0.5	intramuscular
8	1.0	1.0	intramuscular
15	0.2 (1:10)	-	endovenosa
16	0.5 (1:10)	-	endovenosa
17	1.0 (1:10)	-	endovenosa
18	0.2	-	endovenosa
19	0.5	-	endovenosa
20	1.0	-	endovenosa

Al término del esquema de inmunización, se dejó descansar a los animales durante una semana y se procedió a hacer la sangría de prueba; la respuesta individual en los animales se evaluó por el método de Ouchterlony en su modalidad semicuantitativa. En los casos en que la prueba dió un título bajo, fue necesario aplicar 2 dosis más de plasma seminal de 2 ml. cada una por vía intraperitoneal a intervalos de una semana entre la primera y la segunda.

Si el resultado de la prueba fué satisfactorio, se sangró a los conejos por punción cardíaca. Se dejó coagular la sangre, se separó el suero al cual se le adicionó 1 ml. de solución de timerosal 1:100 por cada 100 ml. de suero como

conservador y se mantuvo en congelación en alfcuotas de 0.5 ml. y 1 ml.

EVALUACION DE LOS SUEROS INMUNES POR EL METODO DE OUCHTERLONY

La evaluación final de los sueros fue la siguiente:

	suero: 1	2	3	4
Al término del esq. de inmunización	1:40	1:20	1:40	1:40
Refuerzos				
Evaluación final	1:160	1:80	1:40	1:160

Se pudieron observar hasta 3 bandas de precipitación.

5. CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF)

5.1 Fundamento:

Es una técnica que puede aplicarse a las reacciones de inmunoprecipitación siempre que el antígeno tenga una movilidad eléctrica con predominio negativo.

El antígeno se mueve hacia el ánodo en el campo eléctrico y los anticuerpos que tienen una carga eléctrica muy baja se mueven hacia el cátodo debido al fenómeno electroendosmótico del amortiguador; cuando los dos se unen se forma una o varias líneas de precipitación visibles en el medio de soporte (agarosa, gel de agar purificado). En comparación con el método de Ouchterlony la contrainmuno-electroforesis se caracteriza por la mayor rapidez en la formación de los precipitados (45-60 min) y por su mayor grado de sensibilidad (concentra a todos los componentes inmunológicos en un solo lugar).

5.2 Equipo:

balanza analítica

cámara de electroforesis

fuelle poder

5.3 Material:

portaobjetos (12)

horadador 2 mm de diámetro

capilares (5)
placa de vidrio
nivel de gota
plantilla para perforación
tripié con tela de alambre
mechero
probeta de 50 ml
pipeta de 10 ml
tubos de ensayo 13X100 mm (12)
recipiente con tapa, para cámara húmeda
matraz Erlenmeyer 125 ml
tiras de papel Whatman No. 1 de 2.5 cm X 4.5 cm (24)

5.4 Reactivos

Amortiguador acetato-veronal pH=8.6 $\mu=0.1$ (ver Apéndice II-2).

Agar al 1.5% en amortiguador acetato veronal pH=8.6
 $\mu=0.01$

Se pesan 0.375 g de agar. El amortiguador está preparado con $\mu=0.1$, se miden 2.5 ml y se afora a 25 ml con agua desionizada para tener la fuerza iónica deseada. Se agregan 0.25 ml de timerosal 1:100 como conservador.

Agar al 0.5% para sellar (ver Apéndice II-2)

Amortiguador acetato-veronal pH=8.6 $\mu=0.05$

Se diluye 1:5 el amortiguador concentrado.

5.5 Método:

- Preparación de las placas

Sellado de portaobjetos. Los portaobjetos perfectamente limpios se desengrasan en una mezcla de etanol/acetona. Para sellarlos se barnizan con el agar al 0.5% fundido y se dejan solidificar a temperatura ambiente.

Se funde el agar, se enfría a 80°C se colocan en una superficie nivelada y se depositan 3 ml uniformemente sobre cada portaobjetos de manera que quede una capa homogénea, se deja solidificar perfectamente el gel de agar.

Se prepara la cámara húmeda para las placas y se colocan en refrigeración durante 15 min.

Se coloca una laminilla sobre la plantilla y con el horador se perfora el gel en forma de filas por pares y se retiran los cilindros de gel. En cada portaobjetos se pueden practicar 9 pares de pozos. Esquema No. 5 Con capilares diferentes, se colocan las diluciones del plasma seminal en una de las filas de pozos y en los pozos opuestos los sueros.

- Electroforesis

Se llena la cámara con amortiguador acetato-veronal $\text{pH}=8.6$ $\mu=0.05$.

Se colocan las placas, poniendo el antígeno en el lado del cátodo. El contacto entre el amortiguador y el gel de agar se establece mediante tiras de papel filtro

Whatman No. 1

Se aplica un potencial de 9 v/cm durante 45 min.

5.6 Interpretación

La presencia de bandas de precipitación entre el antígeno y el suero, se considera como una reacción positiva.

El título de anticuerpos estará dado por la dilución más alta de antígeno que al reaccionar con el suero de bandas de precipitación definidas.

6. HEMAGLUTINACION INDIRECTA. REACTIVOS

Solución de Alsever

Para preparar 100 ml de Alsever se pesa:

glucosa: 2.05 g
 citrato de sodio: 0.80 g
 ac. cítrico: 0.055 g
 NaCl: 0.42 g

Se afora a 100 ml con agua destilada. Se reparte en 3 matraces Erlenmeyer de 125 ml depositando 27 ml de solución de Alsever en cada uno; se tapan con torunda de algodón y gasa y se esterilizan a 121°C durante 10 min.

Se guardan los matraces en refrigeración hasta su uso
 Amortiguador salino de fosfatos

Soluciones concentradas

Na_2HPO_4 0.15 M	KH_2PO_4 0.15 M	NaCl 0.15 M
Na_2HPO_4 21.3 g se afora al 1,000 mililitros	KH_2PO_4 20.4 g se afora a 1,000 mililitros	NaCl 8.8 g se afora a 1,000 mililitros

TABLA No. 4

Para 200 ml de amortiguador salino de fosfatos (ASF)
 pH = 7.2, se mezclan:

KH_2PO_4	0.15 M	24 ml
Na_2HPO_4	0.15 M	76 ml
NaCl	0.15 M	100 ml

Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 0.1 N

Para 200 ml de amortiguador salino de fosfatos (ASF)

pH = 6.4, se mezclan:

KH_2PO_4	0.15 M	67.7 ml
Na_2HPO_4	0.15 M	32.3 ml
NaCl	0.15 M	100.0 ml

Se ajusta el pH a 6.4 con HCl 0.1 N

Ac. tánico 1:20,000

Se pesan 10 mg de ácido tánico agregando 10 ml de amortiguador salino de fosfatos pH=7.2 quedando una solución 1:1,000.

Se miden 1.5 ml de la dilución 1:1,000 y se agregan 28.5 ml del amortiguador (solución 1:20,000)