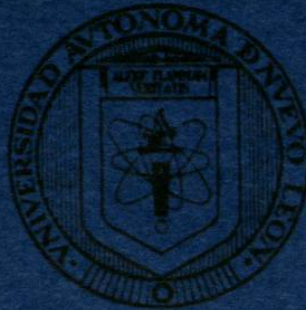


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-ANTIGENOS SEMINALES
INDUCIDOS POR VIA TRANSRECTAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN
CONEJOS Y SU LOCALIZACION EN LOS ORGANOS DEL APARATO
REPRODUCTOR.**

Por

MARISOL ESPINOZA RUIZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con especialidad en Inmunología

Junio, 1997

TM
QR18
.5
E8
C.1



1080071293

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-ANTIGENOS SEMINALES
INDUCIDOS POR VIA TRANSRECTAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN
CONEJOS Y SU LOCALIZACION EN LOS ORGANOS DEL APARATO
REPRODUCTOR.**

Por

MARISOL ESPINOZA RUIZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con especialidad en Inmunología

Junio, 1997

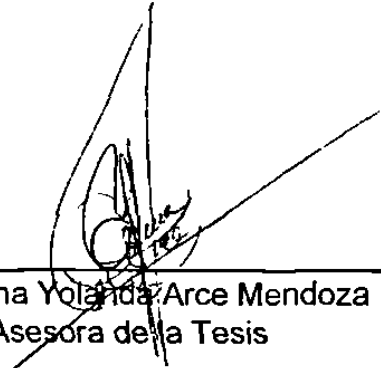


TM
QR186
.S
E8



**DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIANTIGENOS
SEMINALES INDUCIDOS POR VIA TRANSRECTAL
EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN CONEJOS
Y SU LOCALIZACION EN LOS ORGANOS
DEL APARATO REPRODUCTOR.**

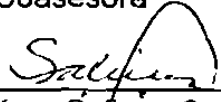
Aprobación de la Tesis:



Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza
Asesora de la Tesis

11/7/13

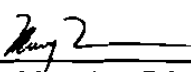
Dra. María Guadalupe Gallegos de Lerma
Coasesora



Dr. Mario César Salinas Carmona

Dr. Daniel González Spencer

M.C. Martha Merino Ruiz



Dra Ma. Esthela Morales Pérez
Secretaria Académica del Area Básica
Subdirección de Estudios de Posgrado

**DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-ANTIGENOS SEMINALES
INDUCIDOS POR VIA TRANSRECTAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN
CONEJOS Y SU LOCALIZACION EN LOS ORGANOS DEL APARATO
REPRODUCTOR.**

Presentado por: Q.F.B. Marisol Espinoza Ruíz

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Alma Y. Arce Mendoza y la coasesoría de la Dra. Guadalupe Gallegos de Lerma.

Asesor.



Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza.

Coasesor.



Dra. Guadalupe Gallegos de Lerma.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza por sus enseñanzas, por la confianza depositada en mi, por su afecto, paciencia y cariño y por enseñarme con su ejemplo, que aunque existen momentos difíciles siempre se puede salir adelante. Muchas gracias por todo.

A la Dra. Guadalupe Gallegos Dávila por aportarme parte de sus conocimientos, por su paciencia, por su amistad y cariño. Muchas gracias.

Al Dr. Mario César Salinas Carmona, por brindarme parte de sus conocimientos, por su paciencia y atención que tuvo conmigo. Por ser un verdadero ejemplo de dedicación.

A la M.C Martha Merino por su afecto y por el apoyo en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Daniel Julio González Spencer por su colaboración en la realización de la tesis.

A la TLC. Silvia Navarro por su tiempo y apoyo incondicional para la elaboración de los cortes histológicos y por su amistad y cariño. Muchas gracias.

Al M.V.Z José Luis Vásquez Juárez por su apoyo incondicional en el cuidado de los animales utilizados en este trabajo. Muchas gracias.

A la Dra. Nancy Fernández por su colaboración en la manutención de los animales del estudio.

A Sonia Rosa Roblero Ochoa, por su apoyo incondicional en los momentos que la necesitaba. Muchas gracias Sonia.

A Irma Alicia, Silvita, Raúl, Blanquita y Alejandra, Abdías y Juan Carlos por su amistad y por su colaboración incondicional. Gracias muchachos.

A Isabel, Alberto, Betito, Sammi e Ivan por dejarme entrar a su mundo, por su amistad, su cariño y todo su amor. Muchísimas gracias.

A la maestra Alma Isabel Ramos Cano por sus consejos, su atención, y su amistad. Muchas gracias.

A todo el personal del Departamento de Inmunología, entre ellos: Carlitos, Frank, Lizzy, Aracely, Bety, Paty y Vero por su amistad y afecto hacia a mí. Muchas gracias a todos.

A Marthita Contreras por su amistad, su cariño y afecto. Gracias Marthita.

A Normita, Sonia, Socorrito, Elodia, Maru y Paty por su afecto y por estar siempre dispuestas a cooperar. Muchísimas gracias.

DEDICATORIA

A ti señor Jesús:

Porque en nuestros corazones has ocultado el precioso tesoro de nuestros deseos y aspiraciones y por permitirnos hacerlos realidad.

A Sergio:

Por estar conmigo en los momentos felices y tristes de la vida, por apoyarme siempre y por permitirme terminar de realizar este deseo.

A mi hijo Sergito:

Porque has llenado totalmente mi vida de amor y felicidad

A mis padres:

Elfido Espinoza y Gloria Ruíz de Espinoza, por el apoyo y amor que siempre me han brindado.

A mis hermanos:

Lupita, Elsi, Yoyis y Elfido por el amor y el cariño que siempre han tenido para mí.

A mis sobrinos:

Abril, Gerardo, Andrés, Julio, Chuy, Pepe, Manena, Angélica y Marisol porque siempre han llenado de amor mi vida.

A Ricardo:

Aunque ya no estás con nosotros te agradezco todo el afecto y apoyo que me diste. Dios te bendiga siempre.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	página
RESUMEN	x
1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL Y METODOS	11
3.1 Obtención de los antígenos	11
3.2. Análisis del semen de conejo y el semen humano mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	12
3.2.1 Preparación de geles	12
3.2.2 Electroforesis	13
3.2.3 Tinción con azul de Coomassie	14
3.3 Comparación antigénica entre el semen de conejo y el semen humano por inmunoelectrotransferencia (IET)	14
3.4 Inmunización por vía transrectal de conejos Nueva Zelanda con los diferentes antígenos	16
3.5 Estandarización de la técnica de hemaglutinación pasiva	17
3.5.1 Tanación de los glóbulos rojos de carnero (GRC)	17
3.5.2 Preparación del antígeno	18
3.5.3 Sensibilización de los GRC tanados	18
3.5.4 Preparación de sueros de los conejos problema	18
3.5.5. Titulación de anticuerpos anti-antígenos seminales	19
3.6 Determinación de la cinética de producción de anticuerpos anti-antígenos seminales	20
3.7 Patrón de reconocimiento antigénico por inmunoelectrotransferencia (IET)	20
3.7.1 Análisis de los antígenos mediante SDS-PAGE	20
3.7.1.1 Preparación de geles	20
3.7.1.2 SDS PAGE de los antígenos problema	20
3.7.2 IET de los antígenos problema	21
3.8 Detección por Inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-antígenos seminales en órganos del aparato reproductor de los conejos inmunizados por vía transrectal	23
3.8.1 Inmunofluorescencia directa	24
3.8.2. Inmunofluorescencia indirecta	25

Capítulo	página
4. RESULTADOS	
4.1 Determinación de proteínas a los antígenos de estudio	27
4.2 Análisis por SDS-PAGE del semen de conejo y el semen humano	27
4.3 Análisis por IET del semen de conejo y el semen humano	29
4.4 Cinética de producción de anticuerpos anti-antígenos seminales	29
4.5 Título de anticuerpos totales anti-antígenos seminales determinado por hemaglutinación pasiva	34
4.6 Determinación del patrón de reconocimiento por IET de los antígenos de estudio	37
4.7 Detección por inmunofluorescencia directa de los anticuerpos anti-antígenos seminales en órganos del aparato reproductor de los conejos inmunizados por vía transrectal	40
4.8 Detección por inmunofluorescencia indirecta de los anticuerpos anti-antígenos seminales en órganos del aparato reproductor de los conejos de estudio.	40
5. DISCUSION	41
6. CONCLUSIONES	51
7. BIBLIOGRAFIA	52
8. APENDICES	57
APENDICE A. EQUIPO	57
APENDICE B. REACTIVOS QUIMICOS	59
APENDICE C. PREPARACION DE REACTIVOS	61

x. RESUMEN

Marisol Espinoza Ruíz

Fecha de graduación: Junio, 1997

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-ANTIGENOS SEMINALES INDUCIDOS POR VIA TRANSRECTAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN CONEJOS Y SU LOCALIZACION EN LOS ORGANOS DEL APARATO REPRODUCTOR.

Numero de páginas: 66

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Inmunología.

Area de estudio: Inmunología

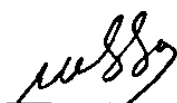
Propósito y Método del estudio: Sabemos que es poca la información que se tiene sobre la respuesta inmune por exposición a antígenos seminales por vía transrectal. Por ello consideramos importante estudiar la vía de inmunización transrectal con antígenos seminales, conocer si existe reactividad de los anticuerpos séricos inducidos por estos antígenos con los antígenos tisulares del aparato reproductor; así como, determinar el comportamiento inmunogénico de los antígenos seminales por esta vía de inmunización utilizando al conejo como modelo experimental. Se determinó el título de anticuerpos totales por hemaglutinación pasiva, así como el patrón antigénico por la técnica de Western blot. Se detectaron bandas proteicas cuyos rangos de peso molecular estaban entre 16 a 66 kDa, y los títulos de anticuerpos séricos detectados fueron de 128 a 512. No detectamos por inmunofluorescencia directa e indirecta antígenos seminales localizados en los tejidos problema de los conejos de ensayo.

Contribuciones y Conclusiones: La inmunización transrectal en conejos induce la producción de anticuerpos séricos contra antígenos seminales humanos; el semen es el antígeno que induce una producción de anticuerpos más elevada, además los anticuerpos producidos contra los tres antígenos analizados no reconocen a los antígenos tisulares de los órganos del aparato reproductor de los conejos de estudio.

Firma del asesor

Firma del coasesor


Dra. Alma Y. Ace Mendoza


Dra. Guadalupe Gallegos de Lerma

1. INTRODUCCION

Desde hace muchos años se sabe que el hombre puede producir anticuerpos contra antígenos seminales, como consecuencia de afecciones que involucran lesión del tejido testicular, infección de glándulas accesorias (particularmente próstata y vesículas seminales) u oclusión de la vía espermática, comprometiendo la barrera hematotesticular y causar autoinmunidad contra antígenos seminales y testiculares. Cerca del 10 al 15 % de los hombres infértiles presentan anticuerpos contra antígenos seminales. En más de dos terceras partes de los hombres con estos anticuerpos existen factores patológicos, los cuales incluyen prostatitis, vesiculitis seminal, epidídimo-orquitis y atrofia testicular secundaria a infección o trauma. En estos casos, la formación de anticuerpos presumiblemente es secundaria a ruptura u obstrucción del tracto genital con extravasación y reabsorción al intersticio de espermatozoides. Algunos factores que pueden producir estas alteraciones son: la exposición prolongada al calor o al frío, algunos pesticidas y medicamentos, golpes, lesiones, traumas quirúrgicos; así como alteraciones producidas por enfermedades infecciosas(1,2).

Los antígenos seminales son: espermatozoides y plasma seminal; los espermatozoides, expresan antígenos desde que se encuentran en el testículo y se van adquiriendo antígenos nuevos a través del paso del espermatozoide por el aparato reproductor (1), por lo cual podemos encontrar antígenos propios del espermatozoide como son los del acrosoma, de la pieza intermedia y de la cola,

así también componentes no propios como algunas proteínas del plasma seminal que se adhieren al espermatozoide. Actualmente el único antígeno específico del espermatozoide bien caracterizado es la LDH-X, isoenzima de la Lactato deshidrogenasa (LDH) (3).

Por lo que se refiere al plasma seminal, sus antígenos son una mezcla de las secreciones producidas en su mayoría por la vesícula seminal y la próstata. Es rico en sustancias protéicas y enzimáticas, se ha reportado que posee actividad inmunosupresora. Algunas sustancias presentes en plasma seminal que poseen esta actividad son: prostaglandinas y poliaminas principalmente (4).

Los antígenos seminales pueden despertar autoinmunidad y causar infertilidad completa. Sin embargo estos antígenos no son inmunogénicos en el ambiente normal del aparato reproductor (5).

Los espermatozoides son producidos en los túbulos seminíferos a partir de la pubertad y aislados del sistema circulatorio por la barrera hematotesticular, esta barrera constituida por uniones ocluyentes entre las células de Sertoli, limita la llegada de inmunoglobulinas impidiendo el reconocimiento de los antígenos que se encuentran en el compartimento adluminal. La Rete testis, carece de una barrera hematotesticular, de tal forma que diversas sustancias incluyendo las inmunoglobulinas podrían pasar del torrente sanguíneo y ponerse en contacto con los elementos tisulares y luminales. Por lo tanto, hay un compartimiento testicular

muy protegido y otro menos protegido que está formado por la retehstis, los conductillos eferentes, el epididimo, conducto deferente y las glándulas anexas donde el aislamiento desaparece (6).

La respuesta inmune producida contra los antígenos seminales, ya sea el semen completo, plasma seminal o espermatozoides es de tipo T dependiente, es decir; que el macrófago reconoce al antígeno, lleva a cabo su actividad metabólica y presenta los epítopes junto con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II y otras moléculas coestimuladoras al receptor del linfocito T. Este último ya activado produce citocinas que activan la proliferación y diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas, con la consecuente producción de anticuerpos específicos contra los antígenos seminales. Estos anticuerpos pueden ser detectados en suero, fluido seminal o unidos a espermatozoides(3,5). Antiguamente se pensaba que los anticuerpos antiespermatozoides circulantes en sangre periférica eran representativos a los encontrados en plasma seminal o unidos a espermatozoides. Sin embargo numerosos investigadores han reportado que solo del 30-50 % de los casos en los cuales los anticuerpos se encuentran en el suero, también pueden estar unidos a espermatozoides (7). Cuando se presenta una respuesta inmune local, se pueden detectar principalmente dos tipos de inmunoglobulinas dentro del órgano reproductor masculino, la IgG y la IgA secretoria, el anticuerpo IgM se detecta solo cuando el estímulo es reciente o está presente, pero en condiciones normales no es detectable . En suero se pueden detectar los tres isotipos con predominancia de la

IgG. En plasma seminal, las inmunoglobulinas pueden estar presentes pero en concentraciones mucho menores que en suero y hay predominancia de la IgA (8).

Numerosas investigaciones han demostrado que los auto e isoanticuerpos dirigidos contra la superficie de los espermatozoides humanos pueden causar infertilidad por sus efectos inmovilizantes, aglutinantes y citotóxicos por fijación de complemento; efectos que pueden inhibir su penetración a través del moco cervical, y producir infertilidad inmunológica (9).

Se han descrito una serie de técnicas para determinar la presencia de anticuerpos anti-espermatozoides circulantes en suero o plasma seminal como las de radioinmunoanálisis (RIA) y las inmunoenzimáticas (ELISA). Estas pruebas son altamente sensibles, específicas y cuantitativas, pueden determinar el isotipo de la inmunoglobulina pero no la región de enlace al espermatozoide (8,10). También hay pruebas que detectan anticuerpos unidos a los espermatozoides como la de inmunofluorescencia (IF) inmunobeads (perlas de gelatina sensibilizadas) y MAR-Test (Reacción de aglutinación) las cuales pueden detectar inmunoglobulinas adheridas a la superficie del espermatozoide y determinar su isotipo (11). La tecnología inmunológica con anticuerpos monoclonales ha permitido detectar cambios antigénicos en la superficie del espermatozoide durante el tránsito epididímal. Se sabe que estos cambios durante el proceso de maduración espermática son importantes para los procesos de fertilización (12).

En 1978, Rümke correlacionó el grado de fertilidad con la concentración sérica de anticuerpos aglutinantes IgG fijadores del complemento contra los espermatozoides, refiriendo que estos anticuerpos pueden alcanzar el fluido seminal a través de la próstata, si se produce una alteración local en el aparato reproductor masculino. Estos anticuerpos anti-espermatozoides pueden mezclarse en el semen y ocasionar trastornos en la fertilidad (13).

Hirischsen y col. en 1985, obtuvieron 9 clonas a partir de la fusión de células de mieloma de ratón NS-1 con células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con espermatozoides lavados de origen humano. Las 9 clonas producían anticuerpos monoclonales (Acm) dirigidos contra antígenos espermáticos. Mediante estudios de IF, estos Acm mostraron unión específica contra la cabeza acrosomal, contra el segmento ecuatorial y contra la pieza intermedia. Estos autores sugieren que los Acm producidos podrían ser utilizados como un método inmunológico anticonceptivo (14).

M.S Liu, Y. Yang y col. purificaron un anticuerpo monoclonal (HS-63) dirigido contra una fracción proteica de aproximadamente 42-50 Kda. Con este anticuerpo se purificó el antígeno por cromatografía de afinidad y cromatografía por intercambio iónico y el antígeno ya purificado fue utilizado para inmunizar ratones y conejos. El antisuero producido inhibió la fertilización in vitro de oocitos de ratón y de conejos con espermatozoides humanos, así como la penetración de la zona

pelúcida en hamster. Por inmunofluorescencia estos autores detectaron que éste antígeno formaba parte del acrosoma del espermatozoide humano. Estos resultados sugieren que el anticuerpo monoclonal HS-63 reaccionaba con el antígeno acrosomal espermático específico y que podría ser un buen candidato para el desarrollo de vacunas anticonceptivas en humanos y otros animales (15).

Clarcke, G.N y Col. en 1986 estudiaron el efecto de anticuerpos antiespermatozoides (provenientes de suero y plasma seminal de individuos con infertilidad inmunológica) sobre el proceso de fertilización in vitro de oocitos humanos. Los espermatozoides eran provenientes de individuos sanos, estos espermatozoides se incubaron con plasma seminal y suero de los individuos infértiles (la determinación de anticuerpos se hizo por Immunobeads, determinando los isotipos IgG e IgA). Los resultados obtenidos indicaron que los autoanticuerpos espermáticos de la clase IgA presente en plasma seminal interferían con la fertilización in vitro en un 72% de los casos y en el caso de la IgG sérica interferían en un 27%. Los autores concluyeron que los anticuerpos antiespermatozoides producidos en suero y plasma seminal, estaban dirigidos contra diferentes regiones del espermatozoide, y que el isotipo IgA estaba más involucrado en el proceso de infertilidad inmunológica que la IgG (16).

En 1990, Sristava, P.N y col. obtuvieron semen de conejo (por medio de una vagina artificial) lo sonicaron y obtuvieron las membranas acrosomales, las

cuales fueron inyectadas por vía subcutánea junto con adyuvante completo de Freund a conejos machos. Después de una serie de inmunizaciones se sangraron a los conejos, los sueros fueron inactivados y adsorbidos con los espermatozoides sin las membranas acrosomales. Posteriormente se incubaron junto con espermatozoides normales de conejo y después se llevo a cabo la fertilización in vitro con estos espermatozoides en oocitos de conejo. Estos autores determinaron que los anticuerpos anti-espermatozoides, dirigidos específicamente contra la membrana interna del acrosoma de espermatozoides de conejo, inhibía la fertilización in vitro de óvulos de conejo (17).

Se ha investigado, si la exposición al semen después del contacto anal u oral en los hombres homosexuales o bisexuales es capaz de inducir la formación de anticuerpos antiespermatozoides en los sueros de varones homosexuales(18). Wolff y col. estudiaron por el método de ELISA la presencia de los anticuerpos antiespermatozoides en 3 diferentes grupos de pacientes con padecimientos dermatológicos, andrológicos y un tercer grupo de homosexuales sanos. Encontraron una incidencia del 4% en el primer grupo; 9.6% en el segundo grupo y 28% en individuos homosexuales.El mayor porcentaje de anticuerpos detectados en el último grupo pudiera estar relacionado con el grado de promiscuidad y la activación local por antígenos seminales (19).

En 1990, Mulhall y col. determinaron los isotipos de los anticuerpos anti-espermatozoides presentes en los sueros de individuos homosexuales y encontraron que un 10 % de los anticuerpos eran del tipo IgG y un 3.3% del IgA. La presencia de dichos anticuerpos fue asociada con la práctica homosexual. En hombres homosexuales célibes, quienes practicaban sólo intercambio oral los resultados fueron negativos. Por lo tanto el depósito de células alogénicas y componentes del plasma seminal en un individuo homosexual durante la actividad sexual en forma repetida, puede inducir la estimulación del sistema inmune contra antígenos del semen, leucocitos y microorganismos (20).

En 1992. Arce y col. reportaron la incidencia de anticuerpos contra antígenos seminales en individuos homosexuales sanos, e individuos heterosexuales. Estos autores encontraron una alta incidencia de anticuerpos anti-antígenos seminales en los homosexuales sanos (X Enc. de Inv. Biomed. Fac. de Med. U.A.N.L).

En 1994. Borraz y Arce determinaron las fracciones inmunodominantes del semen por inmunoelectrotransferencia en individuos homosexuales sanos e infectados con el virus del VIH. Los resultados revelaron que los sueros de los sujetos homosexuales sanos reconocieron las bandas de 80, 66, 45, 36, 32 y 18 kDa y los isotipos encontrados fueron IgG e IgM. En el caso de los sueros de los sujetos con VIH, éstos reconocieron menos fracciones proteicas (66, 32 y 18)

kDa, cuyos isotipos involucrados fueron IgG e IgM como en el grupo de estudio anterior (22) .

Actualmente sabemos que sí se producen anticuerpos contra antígenos seminales inducidos por mucosa rectal, pero no sabemos si estos anticuerpos pueden reconocer a los antígenos tisulares de los órganos del aparato reproductor y causar algún daño y que por lo tanto estos anticuerpos, estén relacionados con el fenómeno de infertilidad inmunológica, en los individuos que practican dicha actividad sexual.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Demostrar en un modelo experimental en conejos la producción de anticuerpos séricos contra antígenos seminales humanos aplicados por vía transrectal, así como la presencia de estos anticuerpos en órganos del aparato reproductor de los animales en experimentación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Determinar por la técnica de hemaglutinación pasiva la presencia de anticuerpos séricos totales anti-antígenos seminales.

- 2) Determinar por inmunoelectrotransferencia (Western blot), el patrón inmunodominante de reconocimiento antigénico de los anticuerpos séricos totales anti-antígenos seminales inducidos por vía transrectal.

- 3) Verificar la presencia de anticuerpos anti-antígenos seminales, en órganos del aparato reproductor de los conejos inmunizados por vía transrectal.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 OBTENCION DE LOS ANTIGENOS.

En una primera etapa intentamos preparar los antígenos seminales a partir del semen de los propios conejos, aplicando las técnicas de obtención de semen de conejo recomendadas en la literatura, pero luego de tres meses de aplicarlas, no obtuvimos los resultados adecuados, por una parte por la dificultad para lograr la emisión del eyaculado y por otra por el volumen obtenido del mismo. La literatura reporta un volumen promedio de 800 microlitros de semen eyaculado (23,24). En vista de lo anterior, y habiendo verificado la existencia de cierta similitud electroforética y antigénica entre el semen de conejo y el semen humano, decidimos utilizar el semen humano como antígeno. Para la obtención de los antígenos se utilizó una mezcla de semen de 20 donadores aparentemente sanos, con seminograma normal, esta mezcla se dividió en dos partes iguales para obtener tres fracciones: la primera parte se sonicó (semen completo) a 30, 60 y 90 ciclos/ segundos (fracción 1); la segunda parte se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos y se separó el plasma seminal (fracción 2) de los espermatozoides. Las células espermáticas se lavaron tres veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS pH 7.2) y después de lavadas, fueron sonicadas en la forma anteriormente mencionada (fracción 3). Previamente tanto al semen

completo como a los espermatozoides lavados se les ajustó una concentración espermática de 1×10^8 espermatozoides/ml (25). A las dos fracciones sonicadas y al plasma seminal se les determinaron proteínas por el método de Lowry. Posteriormente se realizaron alícuotas de los antígenos y se guardaron en un congelador de -20°C hasta su uso.

3.2 ANALISIS DEL SEMEN DE CONEJO Y EL SEMEN HUMANO EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE).

3.2.1 Preparación de geles.

Se prepararon geles de poliacrilamida con SDS (dodecil sulfato de sodio) en gradiente de acuerdo al sistema discontinuo de Laemmli (26) en geles planos, con un gel de empaquetamiento 5% T, 2.7% C, pH 6.8 y un gel separador en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8. cuyas dimensiones fueron 7 cm X 10 cm X 0.75 mm de grosor.

El gel de empaquetamiento al 5% T, 2.7% C, pH 6.8; se preparó a partir de la mezcla de las siguientes soluciones:

	Gel al 5%
Solución patrón de acrilamida- bis-acrilamida al 30% T, 2.7% C	0.499ml
Agua bidestilada	1.980ml
Amortiguador Tris-HCl pH 6.8	0.375ml
SDS al 10%	0.030ml
Persulfato de amonio al 10% ..	.0.105ml
TEMED.....	.0.003ml

El gel de corrimiento para geles de poliacrilamida con SDS en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8 se preparó con la ayuda de un dispositivo generador de gradientes de 2 columnas, conectadas a una bomba peristáltica. Se utilizaron las siguientes soluciones:

	Columna A	Columna B
	10%	18%
Solución patrón de acrilamida		
bis-acrilamida al 30% T, 2.7% C	0.720 ml	1.259ml
Agua bidestilada.	0.874 ml	0.190ml
Amortiguador Tris-HCl pH 8.8	0.396 ml	0.396ml
Glicerol al 50%	0.144 ml	0.222ml
SDS al 10%	0.020 ml	0.020ml
Persulfato de amonio al 10%	0.007 ml	0.007ml
TEMED	0.001 ml	0.001ml

3.2.2 Electroforesis.

Se sometieron a electroforesis una muestra de marcadores de baja movilidad relativa (Mr) SDS-7L (albúmina sérica bovina de 66 kDa, albúmina de huevo de 45 kDa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de 36 kDa, anhidrasa carbónica de 29 kDa, tripsinógeno de 24 kDa y alfa-lactoalbúmina de 14 kDa) y una muestra de semen de conejo y una de semen humano. Estas muestras, por separado se mezclaron con amortiguador de muestra 4X para condiciones desnaturalizantes (contiene SDS y 2-B mercaptoetanol) y se calentaron por 2 min. en agua hirviendo. Como amortiguador de corrimiento se utilizó tris 25 mM, glicina 192 mM con SDS al

0.1%. El gel se sometió a un precorrimento de 50 volts durante 20 min. antes de aplicar las muestras.

La electroforesis se realizó a 80 volts para el gel de empaquetamiento y 150 volts para el gel de separación hasta que el colorante (azul de bromofenol) alcanzó el límite del gel.

Una vez terminada la electroforesis el gel se tiñó con azul de Coomassie .

3.2.3 Tinción con azul de Coomassie.

El gel se sumergió en solución colorante de azul de Coomassie (0.1% de azul de Coomassie, 40% de metanol y 10% de ácido acético) por 30 min; posteriormente se colocó en solución desteñidora (40% de metanol y 10% de ácido acético) hasta que se decoloró el gel por completo y solamente quedaron las bandas teñidas.

3.3 COMPARACION ANTIGENICA ENTRE EL SEMEN DE CONEJO Y EL SEMEN HUMANO POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET).

La inmunoelectrotransferencia se realizó de acuerdo a la técnica de Towbin (27). Se preparó un minigel de poliacrilamida con SDS en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8, con un gel de empaquetamiento al 5% T, 2.7% C, pH 6.8 y se colocó un peine de 6 carriles de 0.6 cm cada uno. Las muestras de los antígenos problema (semen de conejo y semen humano) se sometieron a SDS-PAGE. Al término de la electroforesis se cortó parte del gel que contenía cada una

de las muestras para teñirlas con azul de Coomassie y el resto de las proteínas contenidas en el gel se transfirieron a papel de nitrocelulosa durante una hora a un voltaje constante de 100 volts a 4°C, con agitación constante. Como amortiguador de transferencia se utilizó tris 25 mM, glicina 192 mM con 20% de metanol. El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se colocó en solución bloqueadora (leche Svelty al 5% en PBS 0.1 M, pH 7.4) por una hora a 37°C y posteriormente se realizó un lavado de 10 minutos con la solución de lavado (PBS 0.1 M pH 7.4 con tween 20 1:1000).

El papel de nitrocelulosa con las fracciones proteicas transferidas fueron incubadas durante 15 horas a 4°C con el suero de un conejo inmunizado con semen humano y adyuvante completo de Freund, el cual se diluyó 1:25 con la solución diluyente (leche Svelty al 1.0% en PBS 0.1 M pH 7.4 con tween 20 1:1000). Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min. cada uno con la solución de lavado mencionada anteriormente. El papel de nitrocelulosa se incubó durante 2 horas y con agitación constante con IgG de cabra anti-gammaglobulinas de conejo conjugada a peroxidasa diluída 1:1000, enseguida se realizaron 3 lavados de 10 min. cada uno y posteriormente se expusieron a la solución cromógeno-substrato (10 mg de 3'3-diaminobenzidina en 20 ml de PBS 0.1 M pH 7.4 con 40 ml de peróxido de hidrógeno al 30%). La reacción se detuvo con 5 ml de HCl 1N. El papel se enjuagó con agua bidestilada y se secó colocando sobre papel absorbente.

3.4 INMUNIZACION POR VIA TRANSRECTAL DE LOS CONEJOS NUEVA ZELANDA CON LOS DIFERENTES ANTIGENOS.

Se utilizaron 12 conejos machos Nueva Zelanda de doce meses de edad; antes de cada inmunización se les dejó en ayuno durante 12 horas, permitiéndoles tomar solamente agua. Los conejos fueron organizados en cuatro grupos, cada grupo fué inmunizado con un antígeno diferente: semen completo, plasma seminal, espermatozoides todos ellos de origen humano, y solución salina como control negativo. Estos antígenos fueron aplicados por medio de catéteres de plástico de calibre 21 introduciéndolos en el recto de los animales de estudio en una longitud de 3 a 5 centímetros, lacerando con movimientos hacia adelante y hacia atrás para simular una relación homosexual, la cantidad aplicada fue en base a la concentración de proteínas encontradas en 1×10^8 espermatozoides/ml. Las inmunizaciones por vía transrectal se llevaron a cabo una vez por semana, durante doce semanas (25). Cada semana se sangraban a los diferentes grupos de conejos para determinarles los títulos de anticuerpos totales anti-antígenos seminales por hemaglutinación pasiva, así como para conocer el patrón de reconocimiento antigénico por inmunoelectrotransferencia o Western blot .

3.5 ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE HEMAGLUTINACION PASIVA.

3.5.1.- Tanación de los glóbulos rojos de camero. (GRC)

- a) Se utilizaron 3 ml de glóbulos rojos de camero a los cuales se les agregó 10 ml de solución salina al 0.9 % se mezclaron y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos. Este procedimiento de lavado se realizó tres veces.
- b) De los GRC ya lavados, se hizo una dilución al 2.5% tomando 0.5 ml a los que se les agregó 20 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS pH 7.2), y se mezclaron suavemente.
- c) Se tomaron 2 ml de los GRC al 2.5%, al que se le agregó 10 ml de agua destilada. A esta solución se le determinó la absorbancia a una longitud de onda de 520, para estandarizarla entre 0.4 a 0.6 nm (28).
- d) Se pesaron 0.1 gr de ácido tánico, se disolvió en 100 ml de solución salina 0.9 % (solución patrón) . A partir de ésta solución se hizo una dilución con una relación 1:1000.
- e) Se mezclaron los GRC lavados con el ácido tánico 1:1000 en una proporción 1:2 y se incubaron en baño de agua a 37°C durante 15 minutos.
- f) Pasado este tiempo, los GRC se lavaron con solución salina al 0.9% la cual contenía 0.1% de suero inactivado y adsorbido de un conejo no inmunizado (solución diluyente).
- g) Los GRC anteriormente lavados se resuspendieron a su volumen original con PBS pH 7.2 .

3.5.2 Preparación del antígeno.

a) Al semen completo sonicado se le hizo determinación de proteínas por el método de Lowry. Posteriormente se preparó una concentración de 0.5 mg/ml diluída en solución salina pH 6.4 (recién preparada).

3.5.3 Sensibilización de los GRC tanados.

a) Una suspensión de GRC tanados, se pusieron en contacto v/v con el antígeno (0.5 mg/ml), ésta mezcla se incubó durante 15 minutos a 37°C en baño de agua.

b) Posteriormente, los GRC fueron lavados con PBS pH 7.2, se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos por dos ocasiones, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron los GRC sensibilizados con el antígeno a su volumen original.

3.5.4 Preparación de los sueros de los conejos problemas.

a) Los sueros de los grupos de conejos inmunizados por vía transrectal con los diferentes antígenos, fueron inactivados durante 30 minutos a 56⁰ C en baño de agua.

b) Los sueros ya inactivados, fueron adsorbidos v/v con GRC lavados durante 45 minutos a 37⁰ C (baño de agua).

c) Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, y se recuperaron los sobrenadantes (sueros inactivados y adsorbidos)

3.5.5 Titulación de anticuerpos anti-antígenos seminales

- a) Se preparó solución diluyente con solución salina al 0.9% adicionada con 0.1% de suero inactivado y adsorbido de un conejo sano.
- b) 50 microlitros de la solución diluyente fue puesta a cada uno de los pozos de la microplaca de titulación de poliestireno con 96 pozos fondo en U, menos al primer pozo de cada hilera.
- c) Se agregaron 100 microlitros del o los suero(s) problema(s) al primer pozo de cada hilera. Se tomaron 50 μ l del primer pozo y se hicieron diluciones seriadas al doble, utilizando microdilutores hasta el undécimo pozo.
- d) A cada pozo se le agregó 25 μ l de GRC tanados y sensibilizados con el antígeno. La microplaca se agitó suavemente, se tapó con una cinta adhesiva y se incubó toda la noche a 4⁰C en el refrigerador.
- e) El título de anticuerpos correspondió a la recíproca de la máxima dilución del suero, que permitió la aglutinación de los GRC.

Para llevar a cabo esta técnica se utilizaron sueros testigos positivos y negativos. Como control positivo se utilizó el suero de un conejo inmunizado via intradérmica con semen completo y adyuvante completo de Freund(28). Como control negativo se utilizaron los sueros de los conejos inmunizados con solución salina. Así también se puso como control negativo solución diluyente, más los GRC sensibilizados con el antígeno.

3.6 DETERMINACION DE LA CINETICA DE PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTIANTIGENOS SEMINALES.

Todos los conejos problema se sangraron de la arteria auricular externa una vez por semana, con una jeringa de 3 ml con aguja 23 x 25. La cinética de producción de los anticuerpos se hizo determinando el título de anticuerpos por semana durante todo el tiempo que duró el estudio, la detección de anticuerpos se llevó a cabo por la técnica de hemaglutinación pasiva descrita anteriormente.

3.7 PATRON DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET)

3.7.1 Análisis de los antígenos mediante SDS-PAGE.

3.7.1.1 Preparación de geles.

Se utilizaron minigeles de poliacrilamida con SDS (condiciones desnaturalizantes), en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8; cuyas dimensiones fueron 7 cm X 10 cm X 0.75 mm de grosor.

3.7.1.2 SDS PAGE de los antígenos problema.

El gel se sometió a un precorrimento de 50 volts durante 20 min. antes de aplicar las muestras.

Las muestras que se sometieron a electroforesis en este experimento fueron las siguientes: marcadores de bajo peso molecular SDS-7L y muestras de

los antígenos problema: semen completo sonicado, plasma seminal y células espermáticas sonicadas, éstas muestras se mezclaron con amortiguador de muestras 4X para condiciones desnaturizantes en relación 3:1 (v/v); posteriormente se agitaron con un vibrador eléctrico y se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 2 minutos.

La electroforesis se realizó a 80 volts en el gel de empaquetamiento y 150 volts en el gel de separación hasta que el colorante (azul de bromofenol) alcanzó el límite del gel.

3.7.2 IET de los antígenos problema

La IET se realizó de acuerdo a la técnica de Towbin (27). Se preparó un minigel de poliacrilamida con SDS en gradiente de 10% a 18% T, 2.7% C, pH 8.8, con un gel de empaquetamiento al 5% T, 2.7% C, pH 6.8 y se colocó un peine con 3 carriles de 2 cm cada uno. Las muestras de los antígenos problema fueron 3 : semen, plasma seminal y espermatozoides humanos, los cuales se sometieron a SDS-PAGE. Al término de la electroforesis se cortó parte del gel que contenía cada una de las muestras para teñirlas con azul de Coomassie y el resto de las proteínas contenidas en el gel se transfirieron a papel de nitrocelulosa durante una hora a un voltaje constante de 100 volts a 4°C, con agitación constante. Como amortiguador de transferencia se utilizó tris 25 mM, glicina 192 mM con 20% de metanol. El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se colocó en solución bloqueadora

(leche Svelty al 5% en PBS pH 7.4) por una hora a 37°C y posteriormente se realizó un lavado de 10 min. con la solución de lavado (PBS 0.1 M, pH 7.4 con tween 20 1:1000).

El papel de nitrocelulosa se cortó en tirillas de 4 mm de ancho, las cuales se colocaron en una cámara de incubación.

Las tirillas que contenían las fracciones antigénicas se incubaron con los sueros respectivos de los conejos inmunizados por vía transrectal con los diferentes antígenos, los sueros se diluyeron 1:25 con la solución diluyente (leche Svelty al 1.0% en PBS 0.1 M pH 7.4 con tween 20 1:1000). También se incluyeron un testigo positivo que fue el suero de un conejo inmunizado con semen completo y adyuvante completo de Freund por vía intradérmica y el suero de un conejo inmunizado por vía transrectal con solución salina como testigo negativo. Las tirillas se incubaron durante 15 hrs a 4°C y posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con la solución de lavado mencionada anteriormente. Posteriormente estas tirillas se incubaron con suero de cabra que contenía un anti-anticuerpo IgG anti-gammaglobulinas de conejo conjugado con peroxidasa y diluido 1:1000. Las tirillas se incubaron durante 2 hr. con agitación constante, enseguida se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno y posteriormente se expusieron a la solución cromógeno-substrato (10 mg de 3'3 diaminobenzidina en 20 ml de PBS 0.1 M pH 7.4 con 40 ml de peróxido de hidrógeno al 30%). La reacción se detuvo con HCl 1N. Las tirillas se enjuagaron con agua bidestilada y se secaron colocándolas sobre papel absorbente.

3.8. DETECCION POR INMUNOHISTOQUIMICA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-ANTIGENOS SEMINALES EN ORGANOS DEL APARATO REPRODUCTOR DE LOS CONEJOS INMUNIZADOS POR VIA TRANSRECTAL .

Una vez inducida la producción de anticuerpos en los animales de experimentación tratados con los antígenos seminales por vía transrectal, y después de haber verificado el título en suero y el patrón de reconocimiento antigénico, se procedió a indagar si tales anticuerpos habían pasado en forma natural y reconocido a los antígenos tisulares en los órganos del aparato reproductor de los animales inmunizados.

Para esto, se sacrificaron los animales problema y controles, se procedió en cada uno de ellos a disecar los testículos, epidídimos, conductos deferentes, vesículas seminales y próstata, que fueron fijados en formaldehído al 10% en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, 0.1M (PBS), por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron 4 lavados con PBS-Glicina 0.01M a cada uno de los especímenes y se llevó a cabo la inclusión de los tejidos en parafina por la técnica convencional siguiente (29): Se hizo una fijación en y formaldehído al 10% en PBS pH7.2 durante 12 horas, posteriormente los especímenes se lavaron 4 veces con PBS-Glicina. Enseguida se llevó a cabo una deshidratación progresiva con diferentes concentraciones de alcohol etílico:

50 % 1 hora

60 % 1 hora

70 % 1 hora

80 % 1 hora

96 % 1 hora

99 % 1 hora

99% 1 hora

99% 1 hora

Después de la deshidratación se llevó a cabo la preinclusión con xileno (2 cambios de 1 hora cada uno). A continuación se llevó a cabo la penetración de la parafina: 2 cambios de parafina a 56^oC de una hora cada cambio. Posteriormente se hizo la inclusión y formación del bloque de microtomía. Secciones de 5 a 7 micras de grosor fueron cortadas y montadas en portaobjetos cubiertos con albúmina de Meyer (ovoalbúmina al 50% en glicerina más timol), el montaje se hizo en baño de agua a 44^oC en seguida las secciones histológicas montadas en portaobjetos fueron secadas en una estufa a 56^o C durante 2 horas y posteriormente se desparafinizaron en xileno (2 cambios de 5 minutos cada uno), luego se hizo una hidratación progresiva de los preparados histológicos por inmersiones consecutivas de 30 segundos cada una en concentraciones decrecientes de alcohol etílico (99%, 96%, 80%, 70%) y por último una inmersión en agua destilada. Las secciones histológicas de 5 a 7 μ de grosor, después de hidratadas sirvieron para llevar a cabo las técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta (29,30,31, 32).

3.8.1 Inmunofluorescencia directa.

Habiendo preparado previamente en nuestro laboratorio el anti-anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína (IgG de cabra antigammaglobulinas de

conejo) y después de haber hecho una dilución 1:4000, se procedió a ponerlo en contacto directo (50µl) con cada una de las secciones de los órganos muestreados. Los cortes se incubaron en cámara húmeda durante 20 minutos a 37°C y posteriormente se lavaron 3 veces con 5 ml de PBS-Glicina; después de lavados, los cortes se montaron con glicina y un cubreobjetos y se observaron al microscopio de epifluorescencia. Para cada una de las observaciones se contó con un testigo positivo (secciones de tejido de los órganos problema de un conejo inmunizado por vía intratesticular con semen humano) y uno negativo (secciones de tejido de los diferentes órganos problema de un conejo inmunizado por vía transrectal con solución salina) que fueron los mismos en todos los aspectos técnicos del trabajo .

3.8.2 Inmunofluorescencia indirecta.

Para conocer si existía un reconocimiento por parte de los anticuerpos anti-antígenos seminales humanos presentes en el suero de los conejos inmunizados por vía transrectal hacia los antígenos tisulares de los órganos de estudio, utilizamos la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Los preparados histológicos, se incubaron con 50 µl del suero de los conejos que contenían los anticuerpos anti-semen, anti-plasma seminal y anti-espermatozoides humanos, durante 20 minutos a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS-Glicina y después de los lavados se incubaron con el anti-anticuerpo marcado con fluoresceína bajo las mismas condiciones que la técnica anterior. Posteriormente se lavaron y los preparados

histológicos se montaron en portaobjetos con glicina y se observaron en el microscopio de epifluorescencia. Para todas las observaciones se incluyó un testigo positivo y uno negativo para el control de la técnica.

4. RESULTADOS

4.1 DETERMINACION DE PROTEINAS A LOS ANTIGENOS DE ESTUDIO.

La concentración de proteínas determinada por el método de Lowry en los antígenos de estudio fue de :

semen completo sonicado.....80 mg / ml

células espermáticas sonicadas...20 mg / ml

plasma seminal..... 52 mg / ml

4.2 ANALISIS POR SDS-PAGE DEL SEMEN DE CONEJO Y EL SEMEN HUMANO.

Luego de hacer el análisis mediante SDS-PAGE en gradiente y después de haber teñido el gel con azul de Coomassie, observamos que en el carril donde se puso como antígeno el semen de conejo existían aproximadamente 16 bandas localizadas principalmente entre los marcadores de 66 y 14KDa. Cuando se utilizó como antígeno el semen humano observamos aproximadamente 13 bandas localizadas, al igual que el antígeno anterior entre los marcadores de 66 y 14 KDa. (ver Fig.1). Al comparar el corrimiento electroforético entre los dos antígenos, observamos que en ambos existían aproximadamente 5 bandas con un peso molecular similar, localizadas entre los marcadores de 66 y 14 KDa .

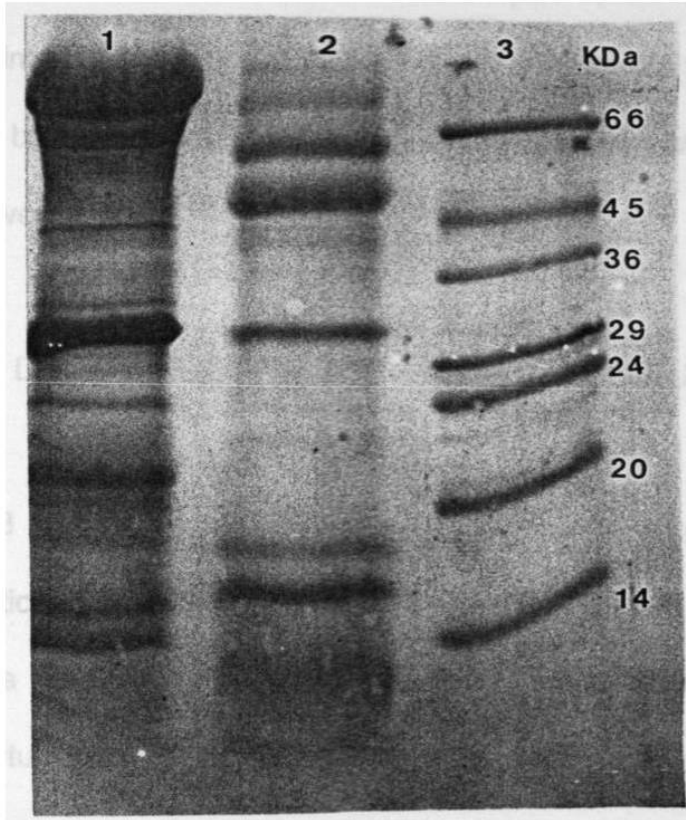


Fig.1 ANALISIS POR SDS-PAGE EN GRADIENTE DE 10% A 18%T, 2.7%C DEL SEMEN DE CONEJO Y EL SEMEN HUMANO. Carril 1: Semen de conejo, Carril 2: Semen humano, Carril 3: Marcadores de peso molecularr SDS-7L. Tinción con azul de Coomassie.

4.3 ANALISIS POR IET DEL SEMEN DE CONEJO Y EL SEMEN HUMANO.

Para determinar la reactividad antigénica cruzada entre el semen de conejo y el semen humano, analizamos los antígenos anteriores por IET, donde se determinó que sí existía una similitud antigénica entre el semen de conejo y el semen humano ya que el suero de conejo que contenía anticuerpos contra el semen humano, reconoció aproximadamente 4 bandas de peso molecular similar en ambos antígenos, estas bandas estaban localizadas principalmente entre los marcadores de 47 y 14 kDa. (ver Fig.2).

4.4 CINETICA DE PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTI-ANTIGENOS SEMINALES.

En la Fig.3 se representa la cinética de producción de anticuerpos contra células espermáticas detectados por hemaglutinación pasiva. Los anticuerpos producidos contra este antígeno, se detectaron a partir de la 5a semana de inmunización, el título máximo obtenido se determinó entre la 11a y 12a. semana de inmunización.

En la Fig.4 se representa la cinética de producción de anticuerpos presentes en los sueros de los conejos inmunizados por vía transrectal con semen completo humano; los anticuerpos se detectaron a partir de la 7a. semana de inmunización y el título máximo se detectó en la 10a y 12a. semana

La cinética de producción de anticuerpos anti-plasma seminal se representa en la Fig.5, en donde se observa la detección temprana de anticuerpos a partir de la

7a. semana, y el título máximo obtenido por hemaglutinación pasiva fue a partir de la semana número 10.

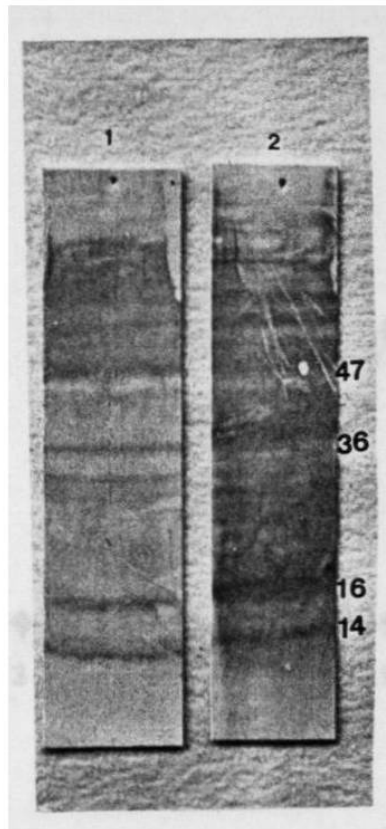


Fig.2 ANALISIS POR IET DEL SEMEN DE CONEJO Y EL SEMEN HUMANO.

Tirilla 1: Fracciones protéicas del semen de conejo reveladas con suero de conejo inmunizado por vía subcutánea con semen humano y adyuvante completo de Freund.

Tirilla 2: Fracciones protéicas del semen humano revelado con el suero anteriormente mencionado.

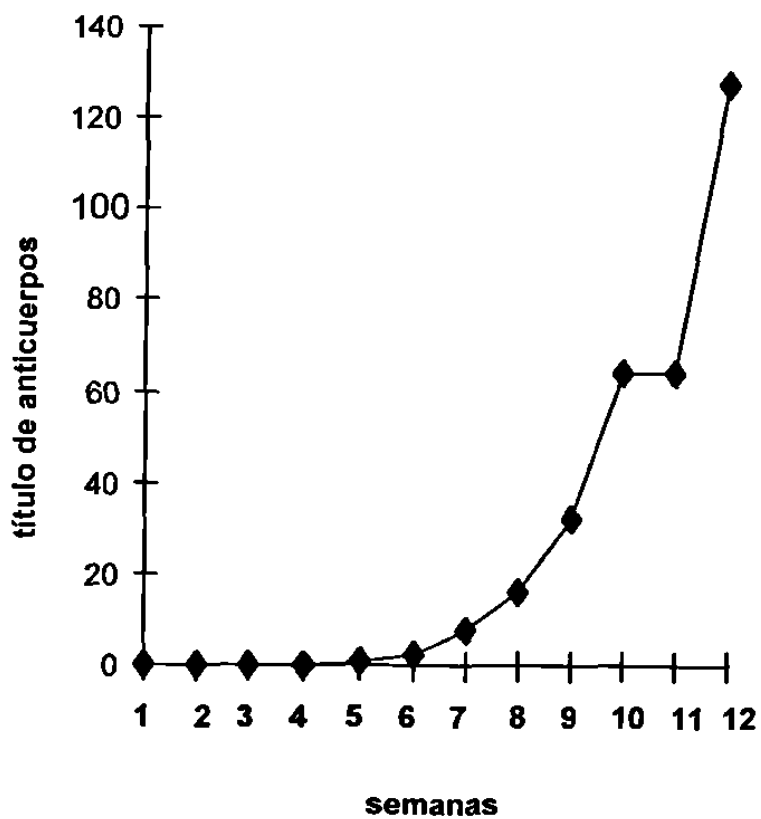


Fig.3.- Cinética de producción de anticuerpos anti-células espermáticas producidos por conejos Nueva Zelanda inmunizados por vía transrectal.

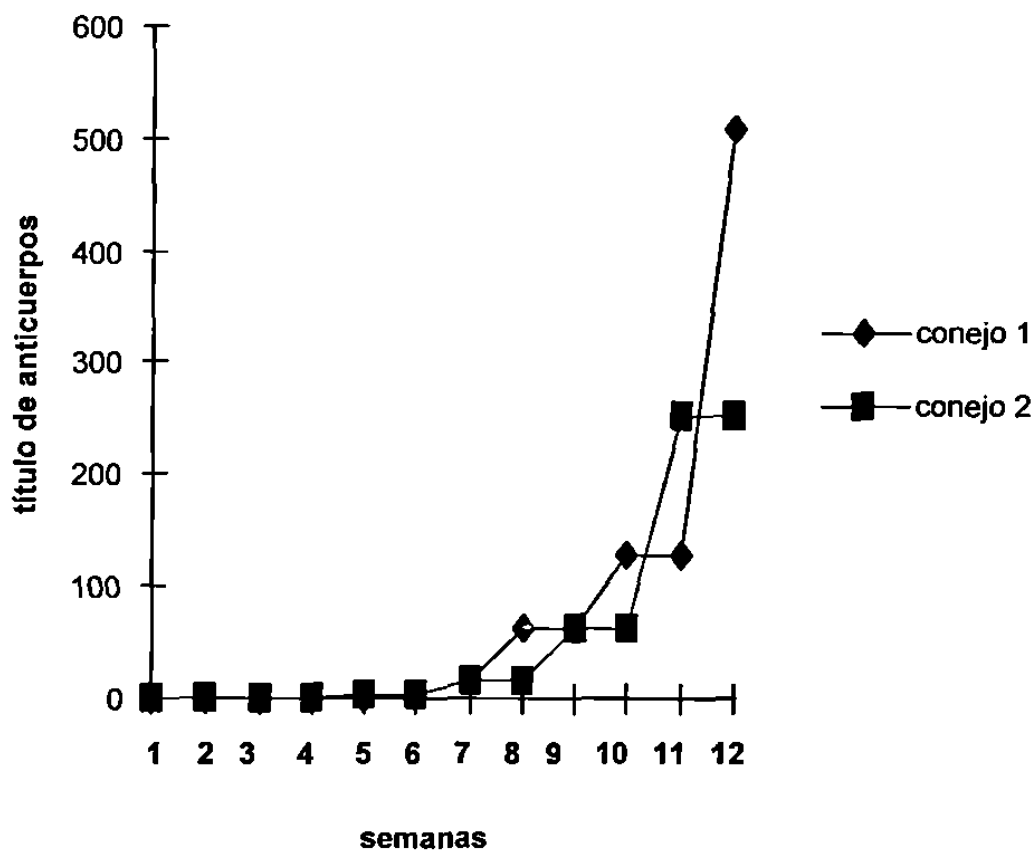


Fig. 4.- Cinética de producción de anticuerpos anti-semen completo humano producidos en conejos Nueva Zelanda inmunizados por vía transrectal.

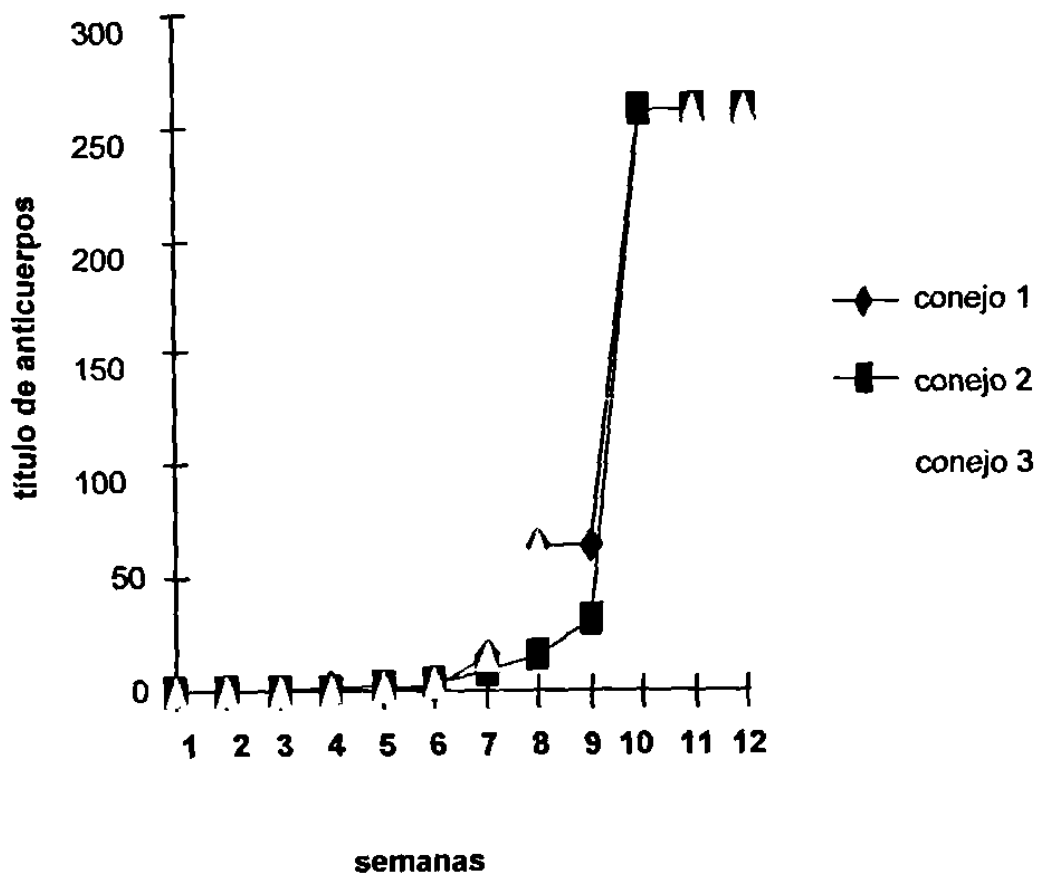


Fig.5.- Cinética de producción de anticuerpos anti-plasma seminal humano producidos en conejos Nueva Zelanda inmunizados por vía transrectal.

Al hacer la comparación entre las 3 cinéticas de producción de anticuerpos con los diferentes antígenos (ver Fig.6), observamos que el comportamiento fue similar en los tres casos, la aparición de anticuerpos se presentó entre la 5a. y 7a. semana y el título máximo se alcanzó entre la semanas 10 y 12. Como se puede observar, no hubo diferencia en la cinética de producción de anticuerpos con los 3 antígenos de estudio, a excepción de los títulos producidos donde si hay marcada diferencia.

4.5 TITULO DE ANTICUERPOS TOTALES ANTI-ANTIGENOS SEMINALES DETERMINADO POR HEMAGLUTINACION PASIVA.

Los títulos máximos de anticuerpos detectados en los sueros de los conejos inmunizados por vía transrectal con semen completo, células espermáticas y plasma seminal se representa en la tabla 1, observamos que los títulos de anticuerpos anti-antígenos seminales oscilaron entre 128 a 512. El título máximo obtenido entre los tres grupos de estudio fue de 512 y se detectó en el suero de un conejo inmunizado por vía transrectal con semen completo.

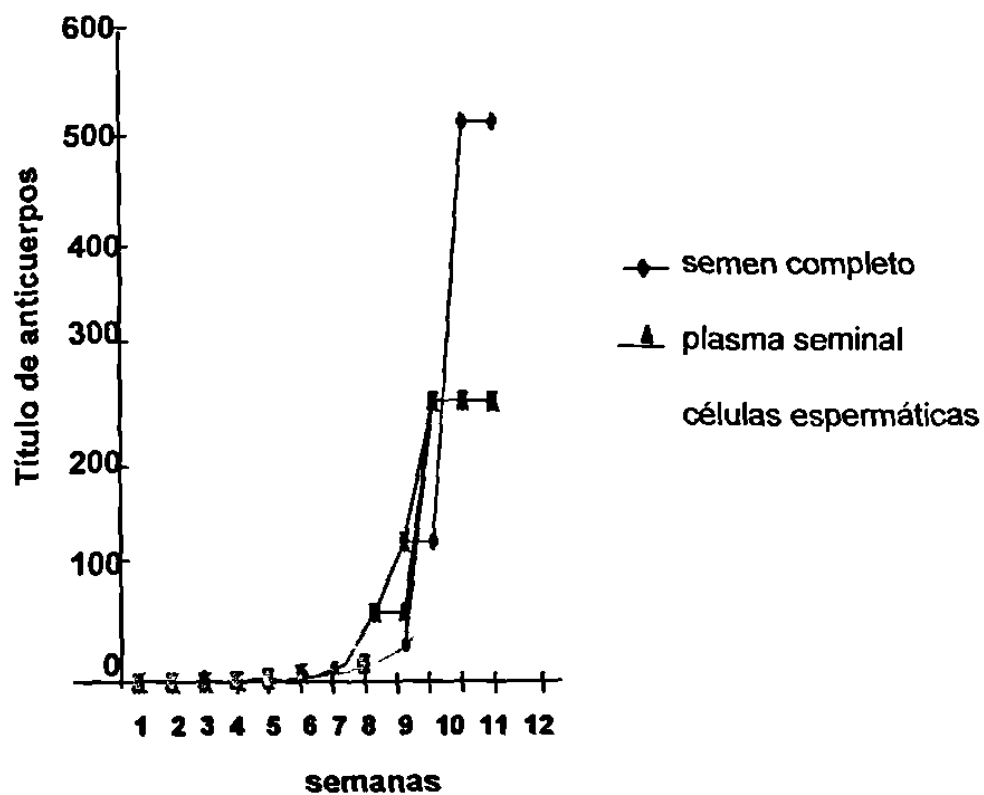


Fig.6 .- Comparación entre las cinéticas de producción de anticuerpos anti-antígenos seminales producidos en conejos Nueva Zelanda por vía transrectal.

Grupo de conejos inmunizados	Títulos de anticuerpos máximos		
	Semen	256	512
Plasma seminal	128	256	256
Células espermáticas	128	128	*
Control (-) Sol. salina	Negativo	Negativo	Negativo
Control positivo	4128		

Tabla 1. Títulos de anticuerpos totales anti-antígenos seminales determinados por Hemaglutinación pasiva.

* Falleció.

4.6 DETERMINACION DEL PATRON DE RECONOCIMIENTO POR IET DE LOS ANTIGENOS DE ESTUDIO.

Para determinar el patrón de reconocimiento antigénico de los sueros de los conejos en estudio fue necesario someter a IET las siguientes muestras: semen completo, plasma seminal y células espermáticas. Los sueros de los conejos inmunizados con células espermáticas reconocieron 7 bandas de aproximadamente 66, 60, 32, 29, 23, 18 y 16 kDa. Los sueros de los conejos inmunizado con plasma seminal reconocieron 6 bandas de aproximadamente 66, 60, 50, 18, 16 y 14 KDa. El suero de otro conejo inmunizado con el antígeno anterior, reconoció las bandas de 60, 50, 32, 18, 16 y 14 KDa. Los sueros de los conejos inmunizados con semen completo sonicado reconocieron 8 bandas de aproximadamente 60, 50, 45, 32, 29, 23, 18 y 16 KDa (ver Fig.7).

Al hacer la comparación entre los patrones de reconocimiento antigénico de los grupos de estudio (Fig.8) observamos que las bandas de 32,29, y 23 KDa son probablemente fracciones proteicas propias de células espermáticas sonicadas y que la banda de 50 KDa y probablemente la de 14 KDa son de plasma seminal. Éstas bandas y las otras compartidas anteriormente mencionadas están presentes en el semen completo (ver Fig.8).

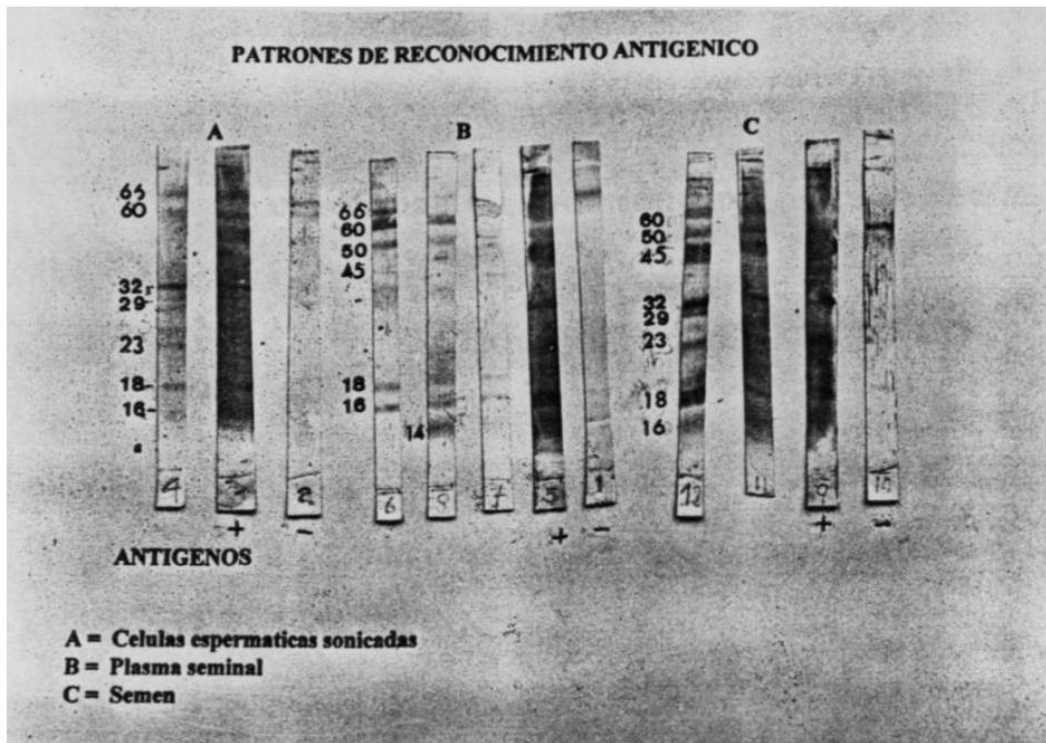


Fig.7. PATRONES DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO.

El grupo A corresponde a las fracciones protéicas de las células espermáticas reveladas con el suero de conejo inmunizado por vía transrectal con el mismo antígeno, se presenta una tirilla ya que el conejo No.2 de este grupo murio antes de hacer el análisis por IET. El grupo B corresponde a las fracciones protéicas del plasma seminal revelados con los sueros de los conejos inmunizados con el mismo antígeno. El grupo C representa al semen humano revelado con el suero de los conejos inmunizados con semen. Las dos últimas tirillas de cada grupo corresponden al control positivo y negativo, respectivamente.

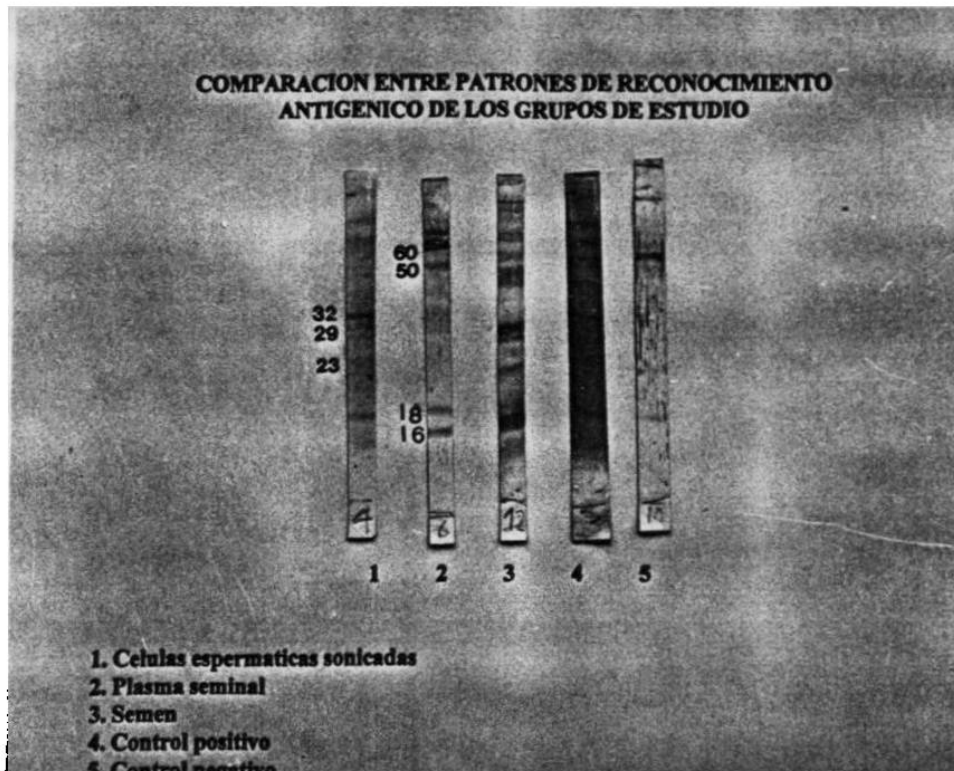


Fig.8. COMPARACION POR IET ENTRE LOS PATRONES DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

Tirilla 1: Fracciones proteicas de las células espermáticas sonicadas reveladas con el suero de un conejo inmunizado con el mismo antígeno. **Tirilla 2:** Plasma seminal revelado con el suero de un conejo inmunizado con el antígeno correspondiente. **Tirilla 3:** Semen humano revelado con el suero de un conejo inmunizado con el mismo antígeno. **Tirilla 4:** Semen revelado con el suero de un conejo inmunizado por vía subcutánea con semen humano y adyuvante completo de Freund (control

positivo). Tirilla 5: Semen humano revelado con el suero de un conejo inmunizado por vía transrectal con solución salina (control negativo) .

4.7 DETECCION POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-ANTIGENOS SEMINALES EN ORGANOS DEL APARATO REPRODUCTOR DE LOS CONEJOS INMUNIZADOS POR VIA TRANSRECTAL.

En ninguno de los grupos experimentales detectamos por la técnica de inmunofluorescencia directa, anticuerpos anti-antígenos seminales humanos, unidos a los antígenos tisulares de los órganos del aparato reproductor de los conejos de estudio.

4.8 DETECCION POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-ANTIGENOS SEMINALES EN ORGANOS DEL APARATO REPRODUCTOR DE LOS CONEJOS DE ESTUDIO.

No detectamos por la técnica de inmunofluorescencia indirecta anticuerpos séricos anti-antígenos seminales humanos, que reconocieran a los antígenos tisulares de los órganos del aparato reproductor de los conejos inmunizados por vía transrectal con los diferentes antígenos de estudio.

5. DISCUSION

Existen varios mecanismos propuestos de sensibilización masculina contra antígenos espermáticos pero no han sido bien establecidos. En hombres heterosexuales se considera que la causa puede ser debido a una alteración en la barrera hematotesticular después de una vasectomía o infección con la consecuente inflamación del tracto genital (18).

Los anticuerpos contra los componentes seminales están presentes en el suero de individuos homosexuales aparentemente sanos, por lo que el mecanismo propuesto de sensibilización es una isoimmunización como consecuencia del felatio o relación anal (33). La exposición a espermatozoides alogénicos, así como a componentes del plasma seminal, leucocitos y microorganismos puede traer como consecuencia la activación del sistema inmune (34); esto podría contribuir al desarrollo de alteraciones a nivel del aparato reproductor de los individuos homosexuales y bisexuales y traer como consecuencia infertilidad inmunológica.

Ya que la información publicada sobre la respuesta inmune inducida por vía transrectal es escasa, fue importante estudiar parte de la respuesta inmune humoral a través de un modelo experimental en conejos inmunizados por vía transrectal con semen, plasma seminal y espermatozoides humanos, con la finalidad de demostrar la presencia de anticuerpos anti-antígenos seminales en el suero y en los órganos del aparato reproductor de los conejos inmunizados. Así intentamos conocer si por

vía transrectal se activa una respuesta inmune que pudiera provocar alteraciones en los órganos del aparato reproductor de los animales problema.

Tauber y cols. (35) determinaron la existencia de una similitud electroforética entre el semen de conejo y el semen humano. En nuestro estudio comprobamos esa similitud electroforética y además comparamos la actividad inmunogénica entre estos 2 antígenos mediante la técnica de Western blot. Los resultados indicaron que existía similitud antigénica por lo cual nos atrevimos a comparar estudios hechos en humanos con estudios hechos en animales utilizando semen humano, como es el caso de nuestro trabajo de investigación.

Al analizar los resultados de los títulos de anticuerpos anti-antígenos seminales encontramos que el título mayor estuvo en el suero de los conejos inmunizados con semen completo. Estos resultados los comparamos con los de Wicher y cols (36), quienes hicieron inmunizaciones vía transrectal durante 7 meses con grupos de 12 conejos, la determinación de anticuerpos la hicieron por la técnica de ELISA y encontraron que el 50% de los animales inmunizados con semen produjeron anticuerpos anti-semen, el 35% produjeron anticuerpos anti-plasma seminal y el resto anticuerpos anti-espermatozoides. Al comparar los resultados encontramos que aunque la determinación de anticuerpos no se hizo con la misma técnica observamos en los 2 estudios, que la producción de anticuerpos fue mayor cuando se utilizó como antígeno semen completo y los de menor antigenicidad fueron los espermatozoides, por lo que podemos suponer que cuando están juntos

el plasma seminal y los espermatozoides en condiciones normales (semen), son más inmunogénicos que si los fraccionamos.

En los estudios hechos por James K.(37) se indica que la baja inmunogenicidad de los espermatozoides se debe a que están cubiertos con plasma seminal al que se le ha atribuido actividad inmunosupresora y que cuando se utilizan espermatozoides epididimarios estos van a tener mayor inmunogenicidad, ya que no han estado en contacto con el plasma seminal. En nuestro estudio los espermatozoides utilizados fueron lavados y centrifugados con PBS pH 7.2 , lo cual según Harrison (38), no es el método adecuado para separar completamente el plasma seminal de los espermatozoides, ya que existen algunas proteínas del plasma seminal que se adhieren a la membrana espermática por lo que se requiere de un gradiente de densidad con Ficoll, para poder hacer la separación completa.

Mathur y col.(39), inmunizaron a conejos Nueva Zelanda por vía intradérmica, con espermatozoides y plasma seminal de individuos con problemas de infertilidad, así como de individuos sanos. Ellos indicaron en sus resultados que los sueros de los conejos inmunizados con espermatozoides y plasma seminal de los individuos sanos, tenían títulos bajos de anticuerpos y con efecto aglutinante pero que no llegaban a alterar la capacidad fertilizante de los animales; en cambio los sueros de los conejos inmunizados con los espermatozoides y plasma seminal de hombres infértiles tenían títulos muy elevados y con efecto citotóxico, por lo que concluyen que los espermatozoides y el plasma seminal de hombres infértiles son más

inmunogénicos que el de los individuos sanos. Analizando nuestros resultados en base al antígeno utilizado y comparándolo con el estudio hecho por Mathur, podemos suponer que si se utilizara como antígeno el semen, el plasma seminal y los espermatozoides de individuos infértiles, probablemente el título de anticuerpos obtenido por vía transrectal hubiera sido más elevado y quizá con actividad citotóxica. En nuestro trabajo de investigación, detectamos que los anticuerpos obtenidos eran con capacidad aglutinante utilizando como antígeno semen de individuos sanos.

Al analizar los títulos de anticuerpos en los sueros de los conejos inmunizados con los diferentes antígenos por vía transrectal y compararlos con nuestro conejo control positivo en el cual obtuvimos un título de 4,128, podemos decir que los título obtenidos en los sueros de nuestros conejos problema fueron bajos sin embargo, aún así se demostró la producción de anticuerpos contra las 3 fracciones antigénicas utilizadas en nuestro estudio. Además hay que aclarar que nuestro conejo control positivo fue inmunizado vía subcutánea con el antígeno mezclado con adyuvante completo de Freund en la forma convencional, es decir de la manera en la cual nosotros sabíamos que íbamos a obtener títulos elevados de anticuerpos. Por el contrario en nuestro estudio se utilizó únicamente el antígeno y la vía de inmunización transrectal, la cual es un método de inmunización diferente a las comunes.

Anticuerpos policlonales y monoclonales han sido utilizados para identificar y caracterizar antígenos. En nuestro estudio se indujeron anticuerpos policlonales

contra los diferentes antígenos seminales y con los que se identificaron las diferentes fracciones proteicas inmunodominantes.

Cuando utilizamos como antígeno una mezcla de espermatozoides lavados y sonicados, los sueros de los conejos inmunizados con este antígeno reconocieron por la técnica de Western blot las siguientes fracciones proteicas: 66, 60, 32, 29, 23, 18 y 16 KDa (ver Fig.7). Nuestros resultados son similares al patrón de bandas encontrado por Bradford y Menge(40) quienes determinaron la isoantigenicidad de espermatozoides de conejos después de haber inmunizado intrauterinamente a conejos hembras con extractos espermáticos. Con el isoantisuero obtenido se detectaron por la técnica de Western blot bandas de 76, 61, 41, 33, 30,26 y22 KDa. Consideramos que existe una similitud en las bandas de 60,32, 29, y 23 KDa, obtenidas por nosotros.

O'Rand y col.(41) identificaron un antígeno espermático acrosomal de conejo con un peso molecular de 30 kDa. En el estudio obtuvimos una fracción proteica con un peso molecular de 29 KDa, por lo que podemos sugerir que esta fracción proteica podría corresponder a la encontrada por O'Rand.

En este estudio no llevamos a cabo una isoimmunización, no utilizamos adyuvante y además utilizamos una vía de inmunización no ortodoxa. A pesar de estas diferencias consideramos que en nuestros resultados si existen algunas bandas proteicas cuyos pesos moleculares son aproximados o similares a las bandas obtenidas en los estudios anteriormente descritos de los diferentes autores.

Wingate y col.(42) identificaron por Western blot diferentes antígenos en espermatozoides capacitados de individuos fértiles e infértiles. Los individuos fértiles presentaron fracciones antigénicas con un peso molecular de 34/36, 46, 68,105 y 115 KDa y las fracciones protéicas de los individuos infértiles fueron de 22/24, 30, 32, 50, 80, 88/92 KDa. Al comparar estos resultados con los nuestros, donde utilizamos como antígeno espermatozoides lavados y sonicados de individuos aparentemente sanos, observamos que existe una similitud en los pesos moleculares entre las bandas de 22/24, 30 y 32 KDa con las bandas de 23, 29 y 32 KDa observadas en nuestro estudio. Aparentemente existen diferencias en la comparación electroforética y antigénica de acuerdo a la capacidad fertilizante de los espermatozoides, pero aunque en esta investigación no se comprobó la fertilidad de los individuos donantes incluidos, es probable que la similitud entre las bandas del grupo de los infértiles con los de este estudio, sea debido a la vía de inmunización utilizada.

Al comparar nuestros resultados con los resultados de las investigaciones descritas anteriormente y al hacer un análisis general, podemos decir que las bandas de 23, 29 y 32 KDa observadas en nuestros resultados son las fracciones antigénicas exclusivas de espermatozoides y que el resto de las fracciones antigénicas detectadas pertenecen probablemente a proteínas seminales que se adherieron a las células espermáticas.

Algunos de los antígenos del plasma seminal han sido aislados y se han estudiado sus propiedades físicas y químicas (43). El antisuero contra plasma

seminal reacciona cruzadamente con espermatozoides eyaculados y lavados, pero no con espermatozoides del epidídimo (44), lo que puede confirmar que aún el lavado de los espermatozoides no elimina del todo proteínas del plasma seminal adheridas a la membrana de las células espermáticas, o que el anticuerpo anti-plasma seminal reconoce estructuras químicas compartidas solo con espermatozoides maduros.

La aparición de los antígenos se desarrolla durante la espermatogénesis. El patrón de cambios antigénicos va de acuerdo a su localización en el tracto genital masculino. Después de la capacitación, pocos antígenos de estadios inmaduros son detectados.

Cuando utilizamos como antígeno el plasma seminal obtuvimos el siguiente patrón de reconocimiento antigénico: 66, 60, 50, 45, 18, 16 y 14 KDa (ver Fig.7). Mathur y col (39), inmunizaron por vía intradérmica a conejos machos Nueva Zelanda con plasma seminal de hombres fértiles e infértiles. Los anticuerpos producidos y analizados por Western blot demostraron las siguientes fracciones proteicas: 58, 49, 43, 28, 25, 18 y 15 KDa. Al compararlos con nuestros resultados encontramos cierta similitud en los pesos moleculares de las bandas de 60, 50, 45, 18 y 16 de nuestra investigación. El patrón de bandas encontrada por Mathur fue producto de la inmunización vía intradérmica con el antígeno aplicado junto con adyuvante completo de Freund por lo cual volvemos a considerar que a pesar de que las vías de inmunización y la forma de preparación del antígeno fueron diferentes, los patrones de reconocimiento antigénico son muy similares. Podemos

decir que independientemente de la vía de entrada de los antígenos seminales, el sistema inmune los reconoce de la misma manera.

Las bandas de 66 y 60 KDa fueron reconocidas por los sueros de los conejos inmunizados con solución salina (control negativo), probablemente debido a que el semen humano tiene reactividad cruzada con otros tejidos humanos como riñones, hígado y pulmón, pero también reacciona cruzadamente con tejidos de otras especies como conejos y cobayos (45). No podemos dejar de descartar que algunos de los sueros de los conejos hayan reconocido bandas proteicas pertenecientes a los HLA debido a la presencia de leucocitos en el semen, sin embargo esta posibilidad es remota si consideramos la proporción relativamente baja en la que se encuentran y que además la presencia de dichos antígenos en el espermatozoide es todavía debatible (46).

El semen completo fue el más inmunogénico de los antígenos de estudio, ya que fue el que tuvo un mayor título de anticuerpos y al revelar el patrón de reconocimiento antigénico la intensidad de color en las bandas fue más fuerte e incluso muy similar al patrón de reconocimiento antigénico del control positivo. Con este antisuero se observaron todas las bandas proteicas encontradas en los otros dos antisueros, lo que pudiera contribuir a que el semen completo fuera mucho más inmunogénico que cuando se separaron en sus componentes: plasma seminal y espermatozoides.

Con la técnica de inmunofluorescencia directa, se trató de detectar si los anticuerpos anti-antígenos seminales habían atravesado las barreras tisulares y se

encontraban reconociendo antígenos de los órganos del aparato reproductor del animal en experimentación. Los resultados fueron negativos. Al contrastar estos resultados junto con la literatura citada, pensamos que se debió a que no se produjo una alteración localizada en ninguno de los órganos de estudio, lo cual pudimos comprobar al observar los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina en los cuales no se detectó daño alguno. Rumke (13) señala en su trabajo de investigación que los anticuerpos séricos solo pueden alcanzar el aparato reproductor siempre y cuando se produzca una alteración localizada, por lo tanto, es probable que esta situación que no se presentó en nuestro estudio, fuera la causa de no tener resultados positivos.

Para determinar si los anticuerpos presentes en el suero de los animales inmunizados eran capaces de reconocer antígenos expresados en testículo, epidídimos, conductos deferentes, próstata y vesícula seminal, utilizamos la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Los resultados obtenidos fueron negativos. Algunos autores (44, 45) han indicado que en el semen existen antígenos de reacción cruzada con órganos del aparato reproductor de otros animales. Puesto que en las diferentes etapas de maduración se van adquiriendo antígenos y a la vez se van suprimiendo otros, es probable que los antígenos seminales que despiertan la producción de anticuerpos sean antígenos expresados solamente en espermatozoides maduros; esto podría ser la explicación de la falta de dichos antígenos en los tejidos. Para poder corroborar si los anticuerpos producidos eran propios de antígenos seminales humanos, se hicieron reaccionar con secciones de

testículo y epidídimo humano y se obtuvo un resultado positivo. Suponemos en consecuencia que la falta de reconocimiento pudo deberse a falta de reactividad cruzada entre el semen humano y los tejidos de los testículos, epidídimo, conductos deferentes, próstata y vesícula seminal del conejo..

Es importante seguir estudiando las características inmunológicas de los antígenos seminales, ya que la amplia reactividad cruzada con muchas moléculas impide una buena caracterización de cada uno de estos antígenos; además es relevante mencionar que la vía de inmunización transrectal es la menos estudiada, por lo que es muy importante ampliar este campo de investigación .

6. CONCLUSIONES

- La inmunización transrectal en conejos permite la producción de anticuerpos séricos contra antígenos seminales humanos.

- Existen 5 fracciones antigénicas o probablemente más, que son propias de plasma seminal y 3 de células espermáticas. En el semen completo se encontraron todas estas fracciones y otras compartidas .

- Los anticuerpos contra antígenos seminales humanos no reconocieron a los antígenos tisulares de los órganos del aparato reproductor de los conejos de estudio.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Hekman, A; Rumke, P. Antigens Seminal and Autoimmunity. In: Human Semen and Fertility Regulation in Men. The C.V Mosby company. Saint Louise, Mo. U.S.A . 1976 p 265.
- 2.- Warren R. Jones. Immunology Aspects of the Infertility. In: Immunology of human reproduction. Academic Press. London England, 1976 p 375.
- 3.- Stite Daniel P.Terr Abba I. Inmunología básica y clínica. 7a. Ed. Manual Moderno. México 1992 pág 229.
- 4.- N.J. Alexander.1988.Natural and induced immunological infertility. Current Opinion in immunology. 1:1125
- 5.- Stacey Lee; Mandelbaum E., Diamond M.P. and Decherney A:H: 1987. The Impact of Antisperm Antibodies on Human Infertility. J Urol. 138: 152 p 1-7.
- 6.- González G. F. Andrología. Fertilidad e infertilidad. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Instituto de Investigación de la altura. Lima, Perú. 1992 pág 512.
- 7.- Bruce R. Gilbert . M.D.Ph.D. Immunology of male subfertility . Academic Press.inc. 1972 pág 214
- 8.- Bronson R., Cooper G. and Rosenfeld D. 1984. Sperm Antibodies: Their role in infertility. Fertil. Steril. 42 (2): 171.

- 9.- Rümke P. 1974. The origin of immunoglobulins in semen. *Clin.Exp. Immunol.***12**:287.
- 10.- Gill, Thomas J III. 1989. Human anti-sperm antibodies: *Immunol Today.***10** : 91.
- 11.- Golub S. Edward.1981. *The Cellular basis of the Immune Response.* 2a. Ed. Sinauer. U.S.A. 612
- 12.- Kapur K.D and Pignot, A.1989. Immunocytochemistry of male reproductive Organs. *Arch. Androl.* **23**:169.
- 13.- Rumke C. Shulman, S. Hjort, T; et al. 1978. Antisperm antibodies in infertile men. *Fertil. Steril.* **44**:673.
- 14.- Hirinchen A.1985. Analysis of antigen expression on human spermatozoa for means of monoclonal antibodies. *Fertil. Steril.* **43** (2): 218.
- 15.- Liu M.S, Yang; Pan, J. and Menge, A.C. 1989. Purification of acrosomal antigen recognized by a monoclonal antibody and antifertility effects of isoimmune serum. *Intern. J. Androl.* **12**: 451.
- 16.- Clarcke G.N. 1986. Effect of isotypes of antisperm antibodies y reproduction, Buenos Aires Argentina. *Introd. of Andrology.* **15**:220.
- 17.- Chandrima S., Suri A. and Talwar G.P. 1988. Identification of sperm antigens that regulate fertility. *Intern. J. Androl.* **11**:479-91
- 18.- Shulmas B. 1991. Antigenicity and autoimmunity in sexual reproduction. A review. *Clin. Exp. Immunol.* **9**:267.
- 19.- Wolff H and Schill W.B. 1985. Antisperm antibodies in infertile and homosexual men: Relationship to serologic and clinical findings. *Fertil Steril.* **44**:673-7

- 20.- Mulhall Fieldhouse and Marrison E.B. 1990. Antisperm antibodies in homosexual men: Prevalence and correlation with sexual behaviour. *Genitourin Med.* **66**:52
- 22.- Borraz Vásquez B.E, Arce Mendoza A.Y. 1994. Respuesta inmune humoral contra antígenos inmunodominantes del semen en pacientes homosexuales y sujetos sanos. Tesis de licenciatura, Fac. de Med. U.A..N.L. Monterrey N.L, México.
- 23.- Mclaughlin C. Laboratory Anatomy of the rabbits. Leavels press Inc. Washington, D.C. U.S.A.1993, pág 52.
- 24.- Vásquez Trujillo A. y Zavala Pérez A 1994. Relación dosis-efecto de la furazolidona en el conejo. Acción de esta sobre la espermatogénesis, histología y conducta sexual. XII. Enc. Invest. Biomédica. Monterrey N.L. México pág 138.
- 25.- Witkin S; Richards, J. M and Bedford, M.1984. Rectal insemination modifies immune response in rabbits. *Science.* **224**: 390.
- 26.- Laemmli V.K. 1970.Cleavage of structural proteins durin the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680.
- 27.- Towbin H, Staehelin T. and Gordon, J.1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose, sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76** (9): 4350.

- 28.- Garvey S. Justine, Cremer Natalie E and Sussdorf H.D. 1977. Methods in Immunology. W.A. Benjamin inc. 3a. Ed. U.S.A.1977 p 510.
- 29.- Lynch Raphael and Mellor L.D. 1977. Métodos de Laboratorio. Edit. Interamericana. 2a. Ed. México. 1977 pág 540.
- 30.- Javois C. Lorette. Immunocytochemical Methods and Protocols. Human Press. Totowa. New Jersey. U.S.A. 1994 pág 130
- 31.- J Beesley J.E. Immunocytochemistry. A practical Approach, IRL press. U.S.A. 1994 pág 15.
- 32.- Nakamura Robert M. M.D. Immunopathology. Clinical Laboratory Concepts and Methods. Little Brown Inc. Boston, U.S.A. 1974 pág 620
- 33.- Mansell, P.W.A. 1984. Chronic immune stimulation by sperm alloantigens. J. Am. Med. Assoc. **251**:237.
- 34.- Mavligth, G.M. 1983. Immune responses to spermatozoa in homosexual men. Fertil. Steril. **39**:337.
- 35.- Tauber, P.F. , Zaneveld, L.J.D., Propping, D., and Schumacher, G.F.B. 1975. Components of human split ejaculates. I. Spermatozoa, fructose, immunoglobulins, albumin, lactoferrin, transferrin, and other plasma proteins, J. Reprod. Fertil.**43**:249.
- 36.- Wicher, V; Albin, B and Hill, J.K. 1984. Alteration of immune response induced by chronic intrarectal insemination in rabbits. AIDS Res. **1**: 309.
- 37.- James K and Hargreave, T.B. 1984. Immunosuppression by seminal plasma and its possible clinical significant. Immunol. Today. **5**:357.

- 38.- Harrison, K.A.P. 1976. A highly efficient method for washing mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **48**:347.
- 39.- Mathur, S; Chao, B. A; Schulte C. et al.1987. Sperm and Seminal Plasma Antigens from Autoimmune men induce immunological infertility. *Arch. of Androl.* **19**:161.
- 40.- Bradford, R and Menge, A.C. 1984. Isoantigenicity of rabbit sperm, testis, and their extracts as demonstrated by Western blot. *Archives of Androl.* **13**:279.
- 41.- O'Rand, M.G and Romrell, I.J. 1977. Appearance of all surface autoisoantigens during spermatogenesis in the rabbits. *Dev. Biol.* **55**:347.
- 42.- Wingate, E.W; Patrick, R.T and Mathur,S.1993. Antigens in capacitated spermatozoa eliciting autoimmune response. *J. Urol.* **149**:1331.
- 43.- Li, T.S., and Behrman, S.J.1970. The sperm and seminal plasma specific antigens of human, *Fertil Steril.* **21**:565.
- 44.- Kolk, A. H. J., Samuel, T., and Rümke, P.1974. Autoantigens of human spermatozoa. I. Solubilization of a new auto-antigen detected on swollen spermheads. *J. Clin. Exp. Immunol.* **16**:63.
- 45.- Moncharmont, P and Bielsa S. 1989 HLA antigens and infertility with sperm autoantibodies in man. *Tissue antigens.* **34** (2): 90.
- 46.- Kereck, G. and Biberbel, P. 1973. Demonstration of HLA antigens, species and semen specific antigens on human spermatozoa. *Int. J. Fertility.* **18**:145.

8. APENDICES

APENDICE A

EQUIPO:

1. Agitador magnético RC-353 (CORNING)
2. Balanza analítica 2024 MP(SARTORIUS)
3. Balanza granataria (SARTORIUS)
4. Baño de agua B6990 (AMERICAN)
5. Bomba peristáltica (LKB)
6. Cámara de electroforesis (BIORAD)
7. Cámara de transferencia. Model Trans Blot Cell (BIO-RAD)
8. Centrífuga eppendorf 5415 (BRINKMANN)
9. Centrífuga TJ-6 (BECKMANN)
10. Centífuga Serofuga II (CLAY ADAMS)
11. Centrífuga J2-21 (BECKMAN)
12. Espectofotómetro DU-6 (BECKMAN)
13. Fuente poder Modelo 1000/500 (BIO-RAD)
14. Formador de gradientes Modelo 385 (BIO-RAD)
15. Incubadora (J. M. ORTIZ)
16. Incubadora con agitación. Dubnoff metabolic (GCA/ PREC.SCI)
17. Microplaca de poliestireno para titulación con 96 pozos fondo en U. 3910 (FALCON) .
18. Microscopio de epifluorescencia (Zeiss)
19. Potenciómetro 43 (BECKMAN)
20. Refrigerador Ultra low (AMERICAN SCI. PROD.)
21. Refrigerador (KELVINATOR)

22. Secador de geles (EPHORTEC)
23. Sonicator modelo 450 (BRANSON)
24. Vortex mixer s/p (AMERICAN SCI. PROD.)

APENDICE B

REACTIVOS QUIMICOS

1. Adyuvante completo de Freund (SIGMA)
2. Acido tánico (MALLINCKRODT)
3. Acido acético glacial (MERCK)
4. Acido clorhídrico (MERCK)
5. Acido nítrico (MERCK)
6. Acrilamida (SIGMA)
7. Albúmina sérica bovina (SIGMA)
8. Amberlita XAD-7 (SIGMA)
9. Anticuerpo polivalente anti-gamma de conejo desarrollada en cabra conjugado a peroxidasa (SIGMA).
10. Anticuerpo IgG de cabra anti-gamma de conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (elaborado en el Departamento de Inmunología).
11. Azul de bromofenol (SIGMA).
12. Azul de Coomassie G-250 (LKB)
13. 2β-Mercaptoetanol (SIGMA)
14. Cloruro de potasio (MERCK)
15. Cloruro de sodio (MERCK)
16. 3-3' Diaminobenzidina (SIGMA)
17. Dihidrógeno fosfato de potasio (MERCK)
18. Dodecilsulfato de sodio (SDS) (SIGMA)
19. Etanol (MERCK)
20. Eosina (FISHER)
21. Fosfato dibásico de sodio anhidro (MONTERREY)
22. Fosfato de sodio monobásico (MONTERREY)
23. Formaldehído (MONTERREY)
24. Glicerol (SIGMA)

25. Glicina (SIGMA)
26. Hematoxilina de Harris (Fisher)
27. Hidróxido de sodio (FISHER)
28. Leche descremada "Svelty" (NESTLE)
29. Oxido de mercurio rojo (PRODUCTOS QUIMICOS)
30. Marcadores de peso molecular Stock No. SDS-7 L Dalton Marck (SIGMA)
31. Metanol (MERCK)
32. Microtomo tipo minot (SPENCER)
33. Nitrato de plata (MERCK)
34. N,N'-metilen-bis-acrilamida (SIGMA)
35. N,N,N',N'-tetrametiletildiamino (TEMED) (SIGMA)
36. Papel de nitrocelulosa de 0.45 m (BIO-RAD)
37. Papel Whatman No. 1
38. Parafina (MERCK)
39. Peróxido de hidrógeno al 30% (MONTERREY)
40. Persulfato de amonio (SIGMA)
41. Trizma-base (SIGMA)
42. Tween 20 (SIGMA)
43. Sulfato de aluminio y potasio (control técnico)
44. Xileno (MONTERREY)

APENDICE C

PREPARACION DE REACTIVOS.

I. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS) 0.1M pH 7.2 - 7.4

NaCl	8 g
Na ₂ HP0 ₄	1.22 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g

Aforar a 1000 ml con agua bidestilada.

II. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS) 0.1M pH 6.4

NaCl	8 g
Na ₂ HP0 ₄	1.22 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g

1 Aforar a 1000 ml con agua bidestilada.

Ajustar el pH a 6.4 con HCl 1N.

III. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS) - FORMALDEHIDO

AL 4 %.

Agua destilada	900 ml
NaH ₂ PO ₄ anhidro	3.5 g
Na ₂ HPO ₄ anhidro	6.5 g
Formol al 40%	100 ml

IV. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)- GLICINA AL 0.1%.

glicina	0.1 gr
PBS pH 7.2	100 ml.

V. PBS CON SUERO NORMAL DE CONEJO AL 0.1%.

Agregar 0.1 ml de suero inactivado y adsorbido de conejo no inmunizado, en
100 ml de PBS pH 7.2

VI. PREPARACION DE ACIDO TANICO.

Acido tánico 0.1gr

disolver en solución salina al 0.9%, aforar a 100ml.(solución A)

de la solución A tomar 0.1 ml y aforar a 100ml. (solución de trabajo).

VII. SOLUCION AMORTIGUADORA DE MUESTRA

Tris 0.3 g

Glicerol 5 ml

Agua bidestilada 17.5 ml

Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado.

Agregar 1 gr de SDS

Agregar 0.005 gr de azul de bromofenol

Mezclar y aforar a 50 ml con agua destilada.

VIII. SOLUCION AMORTIGUADORA PARA GEL DE SEPARACION pH 8.6

Tris-HCl 18.28 g

Tris-OH 18.17 g

Disolver en 30 ml de agua destilada

Ajustar pH a 8.6 con HCl 5N

Aforar a 50 ml con agua bidestilada

IX. SOLUCION AMORTIGUADORA PARA GEL CONCENTRADOR pH 6.8

Tris-OH	7.25 g
Agua bidestilada	20 ml

Ajustar pH a 6.8 con HCl 5N

Aforar a 50 ml con agua bidestilada.

X. SOLUCION DE MONOMEROS , ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA.

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.8 g
Agua bidestilada hasta	60 ml

Agitar durante 12 hr a 4 °C

Aforar a 100 ml con agua bidestilada, agregar 4 g de amberlita

Agitar durante 1 hora, filtrar en papel Whatman No. 1

Guardar en oscuridad a 4 °C

XI. DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS) AL 10 %

SDS	10 g
Agua bidestilada hasta	100 ml

XII. PERSULFATO DE AMONIO AL 10 %

Persulfato de amonio 100 mg

Agua bidestilada 1 ml

Preparar al momento de usarse

XIII. REGULADOR DE TRANSFERENCIA

Trizma base 3.02 g

Glicina 14.41 g

Metanol 200 ml

Aforar a 100 ml

XIV. SOLUCION MADRE PARA TINCION DE PROTEINAS

Azul de Coomassie R250 2 g

Agua bidestilada 200 ml

XV. COLORANTE DE TRABAJO PARA TINCION DE PROTEINAS: AZUL DE COOMASSIE AL 0.125% EN METANOL:ACETICO:AGUA

Solución de Azul de Coomassie R250 62 ml

Metanol absoluto 250 ml

Acido acético glacial 50 ml

Agua bidestilada 137.5 ml

Filtrar en papel Whatman 1

XVI. REGULADOR DE LAVADO PBS-TWEEN 0.1%

PBS 10X	100 ml
Tween 20	1 ml
Agua bidestilada	800 ml
Ajustar a pH 7.3	
Agua bidestilada hasta	1000 ml

XVII. DECOLORANTE PARA GELES DE POLIACRILAMIDA

Metanol absoluto	500 ml
Acido acético glacial	100 ml
Agua bidestilada	400 ml

