



Universitat de Lleida

**TORSIÓN TESTICULAR. ESTUDIO INMUNOLÓGICO.
ADMINISTRACIÓN POST-INTERVENCIÓN DE GLOBULINA
ANTILINFOCITARIA Y CORTICOIDES.**

CONXITA TEIXIDÓ ARMENGOL

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**TORSIÓN TESTICULAR. ESTUDIO INMUNOLÓGICO.
ADMINISTRACIÓN POST-INTERVENCIÓN DE GLOBULINA
ANTILINFOCITARIA Y CORTICOIDES.**

CONXITA TEIXIDÓ ARMENGOL

Tesis presentada para optar al grado de doctor en Medicina y cirugía.

Director de tesis : Profesor Dr. LUIS MORALES FOLCH

Codirector de tesis : Dr. JUAN VIDAL BOTA

LLEIDA , 1993



Casanova, 143
08036 BARCELONA
Telèfon 453 45 85

UNIVERSITAT DE BARCELONA
—
DIVISIÓ DE CIÈNCIES DE LA SALUT
FACULTAT DE MEDICINA
—
DEPARTAMENT
D'OBSTETRICIA I GINECOLOGIA
PEDIATRIA
RADIOLOGIA I MEDICINA FÍSICA
AREA DE PEDIATRIA

TEIXIDO ARMENGOL,
CONCEPCIO
Medicina i Cirurgia
03/09/93
93/94 2

Don **LUIS MORALES FOCHS**, Profesor Titular de Pediatría de
la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

CERTIFICA:

Que Doña **CONCHITA TEIXIDO ARMENGOL**

ha trabajado bajo mi dirección, la Tesis Doctoral sobre
el tema:

"Torsión Testicular. Estudio Inmunológico. Administración
post-intervención de Globulina Antilinfocitaria y Corti-
coides", estando en condiciones de ser presentada para la
obtención del grado de Doctor.

Lo que certifico en Barcelona a 25 de Mayo de 1.993

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

LA REALIZACIÓN DE UNA TESIS DOCTORAL, NO ES UN TRABAJO INDIVIDUAL, SINO EL ESFUERZO Y LA COLABORACIÓN DE MUCHAS PERSONAS, APORTANDO CADA UNA DE ELLAS SUS IDEAS Y CONOCIMIENTOS, SU ANIMOSIDAD Y AMISTAD, IMPRESCINDIBLE PARA SU ELABORACIÓN.

A TODAS ELLAS, MUCHAS GRACIAS.

Al Profesor, Dr.Luis Morales Folch, Jefe de Servicio de Cirugía Pediátrica, del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona , director de esta tesis, por su iniciativa y orientación en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Juan Vidal Bota, Adjunto del Servicio de Pediatría, del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida, codirector de esta tesis, que me asesoró en los momentos difíciles ..

Al Dr.Juan Viñas Sala, Jefe de Departamento de Cirugía y Medicina, de la Facultad de Medicina de Lleida, por las facilidades obtenidas.También por aceptar la tutoría de esta tesis.

Un especial agradecimiento a la Dra.Paz Martinez Ramirez, Profesora titular de Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona.Facultad de Ciencias.,porque sin su ilusión y conocimientos, no habria podido llevarse a feliz término este trabajo.

A la becaria Pilar Fuentes Majà , y a todo el equipo que forman el grupo de Inmunología de la Reproducción, del Instituto de Biología Fundamental de Barcelona , por su labor científica desinteresada, en mi tesis, y en otros muchos trabajos.

Al Dr. Enric Ribelles Cases. Adjunto de Analisis Clínicos. Departamento de Serología. Hospital Arnau de Vilanova de Lleida , por su ayuda e interés en el desarrollo de los técnicas inmunológicas, utilizadas en un principio, y su ánimo ante la negatividad de las mismas.

Al Dr. Manel Peremiquel LLuch . Adjunto de Análisis Clínicos. C.A.P Seguridad Social de Lleida, por sus consejos e inestimable colaboración en la realización de este trabajo.

Al Dr. Miquel Sistere Manonelles, por la ayuda prestada, en la realización de las técnicas quirúrgicas.

Al Dr. Josep Enric Esquerda Colell, Catedrático de la Universidad de Lleida , por su experiencia y amabilidad.

A Xavier Calomarde Burgaleta ,por el tesón y entusiasmo con que me orientó y enseñó a realizar las preparaciones histológicas.

A la Dra Victoria Julia , y a todo el Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona, por su amistad, y porque gracias a ellos, a sus referencias y correctas orientaciones ,pude llevar a cabo este estudio.

Al Dr. Andreu Martinez Broto , por su cariño ,paciencia y ayuda en la labor informática.

A Jaume March Llanes y Albert Sorribas Tello de la Unidad Docente de Estadística. Facultad de Medicina Universidad de Lleida , por su ayuda en la realización del estudio estadístico.

Para la realización de esta tesis se contó con una ayuda de investigación de la Fundación LEVIRI y del Instituto Berna de España S.A.

**A ANDREU I ANDREUET.
A MIS PADRES.**

**Però, encara que la llum s'esvaeixi i les flors es mustiguin,
jo duré mar endins la meva barca.**

(Rabindranath Tagore)

INDICE

INTRODUCCION	1
2. HIPOTESIS DEL TRABAJO Y OBJETIVOS	4
3. RECUERDO ANATOMICO	6
3.1. ORGANOS REPRODUCTIVOS DE LA RATA MACHO	
3.1.1. El escroto	7
3.1.2. El testículo	8
3.1.3. El epidídimo	9
3.1.4. Conductos deferentes	10
3.1.5. La uretra	11
3.1.6. Accesorios del aparato genital	12
3.1.7. Músculos de la uretra y pene	15
3.1.8. Pene	16
3.1.10. Glandula prepucial	18
3.2. INERVACION	18
3.3. VASCULARIZACION	19

4. INMUNOLOGIA DE LA RATA.	21
4.1. INMUNOGLOBULINAS	
4.1.1. Nomenclatura de las Ig de la rata	22
4.1.2. Historia	23
4.1.2.1. LOU. Inmunocitomas malignos en la rata.	25
4.1.2.2. Origen de LOU.Clase.	25
4.1.2.3. Inmunocitomas malignos ileocecales	26
4.2. RESPUESTA INMUNOLOGICA HUMORAL.	27
5. ANTECEDENTES CIENTIFICOS	29
5.1. INFERTILIDAD	30
5.2. ANTECEDENTES HISTOLOGICOS	32
5.3. ANTECEDENTES INMUNOLOGICOS	38
5.4. ANTECEDENTES TERAPÉUTICOS	40

6. MATERIAL Y MÉTODOS	42
6.1. MATERIAL	43
6.1.1. Animales de experimentación	43
6.1.1.1. Características generales	43
6.1.1.2. Grupos de estudio	44
6.2. MÉTODOS	49
6.2.1. Pre- intervención.Técnica anestésica	49
6.2.2. Intervención quirúrgica	49
6.2.2.1. Torsión testicular	50
6.2.2.2. Técnica de Ryan	54
6.2.2.3. Orquiectomía	56
6.2.3. Tratamiento médico experimental	56
6.2.4. Obtención de material	57
6.2.5. Técnicas experimentales	59
6.2.5.1. Técnica de aglutinación.SPERMAR.	59
6.2.5.2. Técnica Elisa comercial	59
6.2.5.3. Técnica Elisa modificada	61

6.2.6. Metodología Anatomía Patológica	64
6.2.7. Estudio estadístico	64
7. RESULTADOS	65
7.1. Valoración de la morbimortalidad	66
7.2. Valoración de los controles somáticos	66
7.3. Procesamiento de datos	70
7.4. Resumen de los resultados	119
8. DISCUSION	120
8.1. Del análisis estadístico	121
8.2. De los animales de experimentación	124
8.3. De las titulaciones de Anticuerpos anti-esperma	129
8.3.1. Factor edad	129
8.3.2. Factor intervención quirúrgica	132
8.3.3. Factor tratamiento médico	134
9. CONCLUSIONES	138
10. BIBLIOGRAFIA	141

1.- INTRODUCCION

En algunos pacientes que habian sufrido una torsión testicular unilateral ,y en los que se habia realizado cirugía paliativa posterior (destorsión u orquiectomía) se apreció una disminución de la fertilidad.

Esta eventualidad sugirió , que el testículo contralateral al lesionado también estaba alterado :

Algunos autores, en principio, pensaron en anomalías bilaterales preexistentes , en pacientes que posteriormente sufrían una torsión testicular unilateral.

York & Drago 1985 (174) ,refieren una etiología similar a la Orquitis Alérgica Experimental (EAO) ; Wallace 1982 (166) , considera una patogenia semejante a la Panuveitis Simpática .

Estudios clínicos y experimentales parecen demostrar que dicha alteración en la fertilidad es debida a una reacción inmunológica, mediada por anticuerpos antiesperma que producen patología en el testículo contralateral sano.

Los antígenos espermáticos no se detectan hasta la época puberal, en que se produce la espermatogénesis ; posiblemente, por este motivo algunos autores no han encontrado alteraciones testiculares significativas en animales de experimentación prepuberes, en los que se había provocado una torsión testicular prolongada, con posterior destorsión.

En cambio hay prácticamente unanimidad en la bibliografía revisada, en varios puntos:

El daño del testículo contralateral no es el mismo en cada paciente, es dependiente del grado y duración de la torsión; en algunos casos consideran que se protege el testículo contralateral, si se realiza destorsión u orquiectomía antes de las tres horas post-torsión, York (174).

El tiempo necesario para que se produzca la lesión contralateral, no es una cuestión unánime: 10 días, según Nagler & White, 1982 (119) 3 semanas , York y Drago 1985 (175) y un mes, Cerasaro y cols 1984 (34).

El daño testicular histológico, no son cambios temporales, aunque el científico anteriormente citado, Jeffrey P. York, dice haber encontrado regeneración tubular completa, con espermatogénesis a los 421 días de la lesión..

Siempre que no se ha realizado orquiectomía, las alteraciones contralaterales son más evidentes, esto se explicaría porque al restaurar la circulación del testículo torsionado, se produciría un escape adicional de material antigénico a la circulación sistémica .

2.- HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

1ª La isquemia testicular produce una lesión irreversible en el testículo afecto. Parece repercutir en el testículo contralateral por mediación de una reacción inmunológica.

2ª Si se produce la reacción inmunológica, es posible disminuirla con tratamiento médico inmunosupresor.

OBJETIVOS

1º Se pretende demostrar cualitativamente y cuantitativamente, que en las torsiones testiculares unilaterales experimentales se produce una reacción inmunológica.

2º Se estudiará, si existe variación en la reacción inmunológica, en animales de diferentes edades. Inclusive ratas prepúberes (15 días).

3º Ante la diversidad de métodos terapéuticos propuestos por los diferentes autores, ante una torsión testicular unilateral, (orquiectomía, destorsión, no intervención) se intentará valorar la reacción inmunológica en algunos de ellos.

4º Búsqueda de los diferentes métodos de determinación inmunológica, su sensibilidad y especificidad.

5º Se experimentará con diferentes terapéuticas médicas, a fin de intentar anular o disminuir la reacción inmunológica producida, posible causa de las diferentes lesiones del testículo contralateral.

3.- RECUERDO ANATOMICO

3.1 ORGANOS REPRODUCTIVOS DE LA RATA MACHO.

La anatomía de los órganos sexuales de la rata, practicamente no difiere de la humana.

3.1.1.EL ESCROTO.

El escroto está localizado ventrolateral al ano. La piel escrotal es de 0,5-0,6 mm de grosor, cubierta por un fino vello, que en las ratas Sprague Dawley, es de color blanquecino.

El músculo cremaster externo esta formado por dos estratos musculares estrechamente superpuestos; tiene un espesor entre 0,1-0,2 mm. Las fibras circulares externas derivan del músculo abdominal oblicuo interno y las fibras longitudinales internas son del m. abdominal transverso.

El músculo cremaster rodea la túnica vaginal completamente y recoge el testículo en la cavidad abdominal.

El canal inguinal permanece abierto durante toda la vida y tiene un distendido diámetro de 8-12 mm, el testículo se puede localizar tanto en situación escrotal, como inguinal o abdominal.

Los testículos descienden alrededor de los 21 días de vida extrauterina.

Las capas íntimas del escroto están formadas por la túnica vaginal, la fascia transversal y el peritoneo, de fuera a dentro.

3.1.2. EL TESTÍCULO

El tamaño máximo es, en longitud 20 mm y en diámetro 14 mm. El peso en la rata macho adulta oscila entre 2-3,5 gr.

Cerca del polo caudal de los testículos se origina el gubernáculo testicular de 10-15 mm de largo y 2-4 mm de ancho.

La túnica albugínea transparente está formada por dos capas de tejido fibroso conectivo, de igual espesor. Las fibras elásticas de colágeno están restringidas a la vecindad de los grandes vasos sanguíneos. El tejido conectivo que contienen los testículos de la rata es en cantidad inferior al 10%.

El diámetro de los túbulos seminíferos es de cerca de 250 micras, su longitud promedio 32 cm. Estos túbulos están rodeados de una membrana subepitelial que contiene células musculares lisas, también los rodean unos sinusoides linfáticos peritubulares, no existiendo conexión entre los túbulos seminíferos y el intersticio.

Sinusoides adyacentes comunican libremente a través de una "ventana" con el intersticio; es así, como la linfa tiene acceso a los túbulos seminíferos.

El ciclo gametogénico del epitelio seminífero está dividido en 14 etapas que tienen lugar dentro de la demarcación de los segmentos tubulares, cada uno de los cuales presenta una longitud de 7-60 mm. Cada segmento

contiene una asociación de células generacionales, cada una de las cuales está en la misma etapa de desarrollo.

El número de células de Sertoli (aprox. 15,7 millones por gramo de testículo fresco) es constante por unidad de longitud de los túbulos seminíferos.

La producción diaria de espermátides maduros es 9,61 millones por gramo de testículo.

3.1.3.EL EPIDÍDIMO

El epidídimo tiene una cabeza semilunar unida al polo craneal del testículo, que se continúa en un cuerpo alargado y estrecho que desciende pegado al testículo, extendiéndose 5-11 mm por debajo del polo caudal del testículo, formando la llamada cola del testículo.

Tiene un peso aproximado de 0,76-0,98 gr.

Presenta cinco tipos celulares diferentes:

Epitelio cuboidal que recubre la rete testis. Epitelio columnar pseudoestratificado con cilios a nivel de los conductos eferentes. Células de músculo liso que rodean los conductos eferentes de la cabeza del epidídimo. Tejido conectivo laxo que entrelaza los conductos eferentes que formarán el conducto epididimario que se continúa en el conducto deferente uretral.

El epidídimo realiza la función de transporte de los espermatozoides (suelen tardar 8 días en recorrerlo), realiza también la concentración de

dichos espermatozoides, mediante la reabsorción de agua y sodio en los conductos eferentes, mientras se va produciendo su maduración.

La cola del epidídimo es la zona de almacenaje del esperma.

3.1.4.CONDUCTOS DEFERENTES

Los conductos deferentes emergen de la zona medial del tallo epididimario. Recorren el lado medial del testículo y penetran en la cavidad abdominal a través del "ostium" vaginal.

El conducto tiene 5-6 cm de largo y un diámetro de 2,5 mm. En la cavidad abdominal gira perpendicularmente por fuera de los vasos espermáticos ,y corre, primero medialmente, después más ventromedial a nivel del cuello de la vejiga urinaria, donde se une al conducto del lado opuesto; aquí el conducto se estrecha (aproximadamente 1 mm) penetrando dorsolateralmente en la próstata y abriéndose dorsalmente en el interior de la uretra.

Los conductos deferentes se dividen en 3 partes, basandose en las diferencias epiteliales y amplitud de los mismos. El conducto propio termina en forma de papila, vaciando dentro de una amplia ampolla donde desembocan también los productos de vesículas seminales, glande y conductos deferentes.

El cordon espermático contiene mayoritariamente vasos sanguíneos ,en forma de espirales, y tiene un grueso espesor. El cordon espermático posterior previene la herniacion hacia el interior del proceso vaginal y reduce la conducción del calor del cuerpo al complejo testes-epidídimo.

3.1.5.LA URETRA

La luz de la uretra varía según los diferentes segmentos.

En el arco isquiático la uretra pélvica penetra 4-5 cm en el bulbo uretral , el cual tiene una luz central (divertículo uretral) circunvalado por el músculo bulbocavernoso.

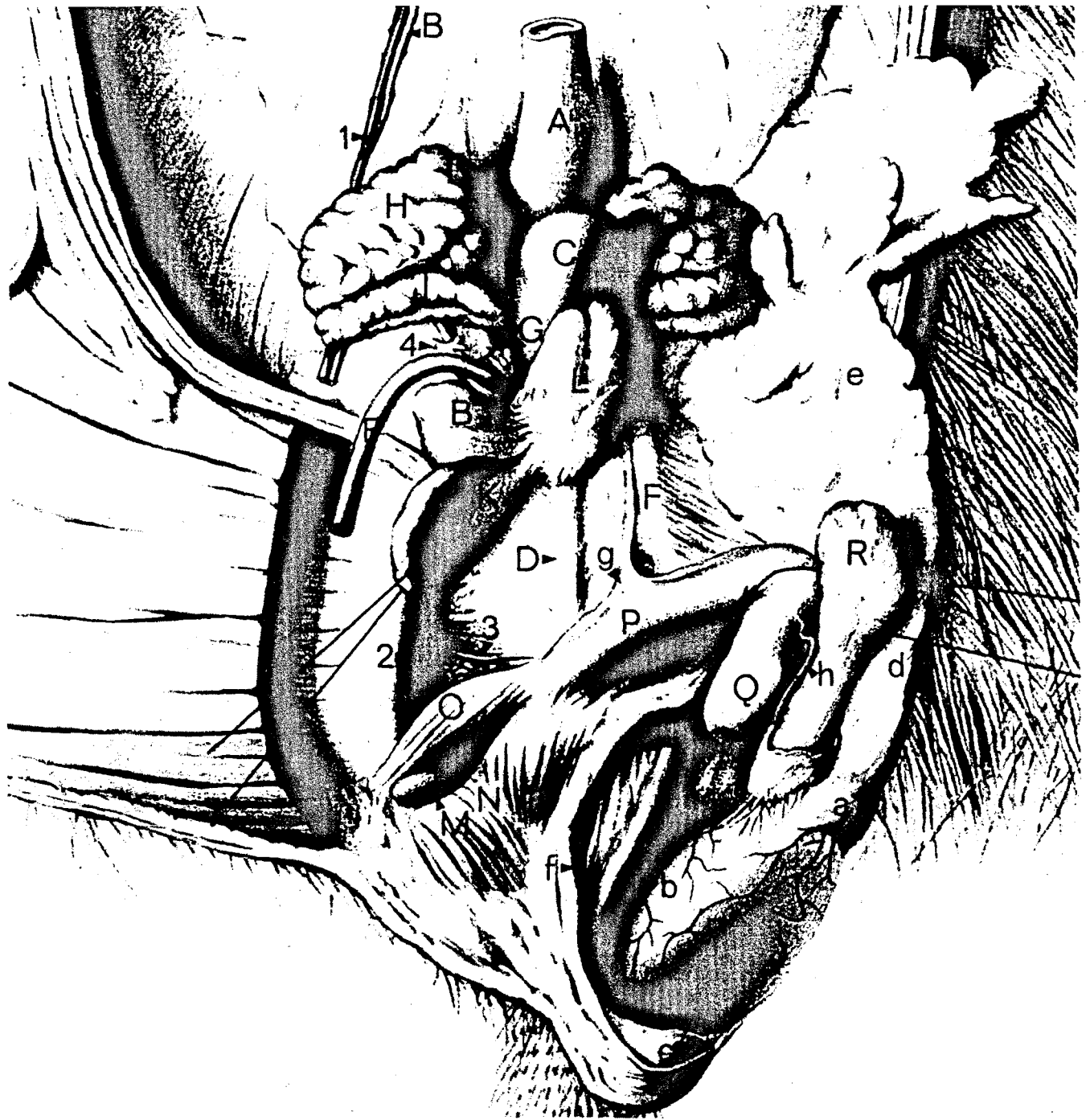
La parte distal de la uretra contiene casi exclusivamente pliegues mucosos.

Toda la pared de la uretra contiene primordialmente mucha cantidad de tejido subepitelial cavernoso; muy desarrollado en la zona de la vesícula seminal.

Se continua con el voluminoso cuerpo cavernoso del bulbo uretral , estrechándose en dirección a la parte peneana, donde los surcos uretrales forman un estuche de espesor uniforme alrededor de la uretra.

Las fibras musculares mucosas se encuentran solamente en la pared uretral craneal, en las vesículas seminales y en el bulbo uretral.

La uretra proximal (ocasionalmente dentro de la vejiga urinaria) en la rata macho adulto está rellena de una masa eosinófila (peso 0,063 gr).



TOPOGRAFÍA DE LOS ÓRGANOS GENTALES DE UNA RATA MACHO.

A. recto	b. cuerpo	G. gland.cond.deferentes	N. m.bulbocavernoso
B. ureter derecho	c. epidídimo caudal	H. vesícula seminal	O. m.isquiocavernoso
C. vejiga urinaria	d. cond.spermático	I. glánd.coagulación	P. cuerpo pene
D. uretra,porción pélvica	e. depositos grasa	K. Lóbulo vent. próstata	g. lig. suspensorio pene
D. testículo izqdo	f. pared escroto	L. Lóbulo dors-lat.próstata	Q. gland. pene
a. cabeza	F. conductos deferentes	M. gland. bulbouretral	h. musc. parietal
			R. gland. prepuccial

1. A. testicular 2. Plexo venoso 3. Rama n. Pudendo 4. Ganglio hipogástrico.

3.1.6.ACESORIOS DEL APARATO GENITAL

A) Los lóbulos longitudinales de la glándula de los conductos deferentes se sitúan a lo largo de la parte terminal del conducto. Dichos lóbulos tienen 4 mm de longitud y 2 mm de diámetro ; están formados por ramilletes de glándulas tubulares finas.

Cada lóbulo pesa aproximadamente 25 mg.

Excepto en el polo proximal, la glándula es circundada por el lóbulo dorsolateral de la próstata.

B) Los túbulos glandulares se unen para formar un conducto común dentro de la ampolla.

El voluminoso cuerpo de la vesícula seminal es aplanado dorsoventralmente. Cada glándula tiene 17-25 mm de largo, 8-11 mm de ancho y 5-6 mm de grueso. Su peso varía entre 0,7 a 1,5 gr.

La glándula se apoya dorsolateralmente en la vejiga urinaria y dorsalmente está en contacto con el recto. Excepto por el lado ventromedial está

cubierta enteramente por el peritoneo, el cual forma una laminilla entre las partes craneales de dicha glándula.

El conducto excretorio caudal está rodeado por el lóbulo dorsolateral de la próstata. Dicho conducto corre dorsal a los conductos deferentes hacia una común terminación en el "ostium" eyaculatorio.

El epitelio glandular consiste en una capa de altas células columnares conteniendo visibles gránulos secretorios; entre ellas, se encuentran pequeñas células basales.

C) La glándula prostática está formada por tres pares de elementos uretrales; estos forman dorsocraneal (también llamada glándula de coagulación) ventral y dorsolateral (por fusión de lateral y dorsocaudal elementos) lóbulos.

C-1. La alargada glándula de "coagulación" se encuentra en el lado cóncavo de la vesícula seminal, agregándose a ella por una vaina común de tejido conectivo. Consiste en 5-6 túbulos con ondulaciones superficiales. La longitud de la glándula varía de 3-6 mm y el peso de 40-110 mg.

A lo largo, el estrecho conducto excretor corre lateral y ventral a los conductos deferentes y se abre craneolateral al "ostium" eyaculatorio de la vesícula seminal.

C-2.El lóbulo ventral esta pegado al lado ventrolateral de la vejiga urinaria .La superficie de esta glándula gris-rojiza es ondulante. Perifericamente el tejido glandular forma unos pliegues que contribuyen a estrechar la luz.

La luz central es muy amplia (alrededor de 0,3 mm) debido a la escasez de dichos pliegues.

Las piezas terminales están rodeadas por una delgada e incompleta capa muscular. Cada glándula se vacía por 5-7 conductos excretores con apoyo a lo largo de la cara lateral de la uretra, y se abren bajo dos pliegues mucosos que miden la distancia entre la vesícula seminal y la pared opuesta de la uretra.

La inervación autonómica de la próstata ventral, estudiada en 1979 por Vaalasti y Hervonen, consiste primordialmente de fibras adrenérgicas y escasas no adrenérgicas. También la enorme zona glandular luminal y el epitelio, aumentado de altura en la actividad sexual animal, junto con el estroma prostático tienen numerosas fibras adrenérgicas que les contornean.

C-3. Los dos lóbulos dorsolaterales de la próstata son envueltos cerca de la zona proximal de la uretra como un único cuerpo de 5-10 mm de ancho. La histología glandular no es homogénea. La parte dorsal contiene acinis estrechos con alto epitelio pseudoestratificado, periféricamente y localizados lateralmente tiene porciones de epitelio cuboidal formando profundos pliegues y medialmente hay anchos acinis con pequeño epitelio cuboidal. Las porciones secretorias se abren a los conductos colectores los cuales tienen prominentes capas musculares rodeando una estrecha luz. Estos conductos se unen para formar alrededor de 15 conductos secretores, que junto con los del lóbulo ventral, corren lateral a los conductos secretores de las otras glándulas. Se abren preferencialmente en el fondo de un divertículo próximo a la vesícula seminal; algunos evacúan dentro de la zona más caudal de la uretra.

D) La rosada glándula bulbouretral está situada lateral al recto con tejido conectivo entre los músculos isquiocavernoso y bulbocavernoso. Un delgado conducto excretor de 6-10 mm de largo, corre craneoventralmente y medialmente al cuerpo globuloso y liso de la glándula y entonces penetra en la pared del bulbo uretral.

La glándula tiene 11-15 mm de longitud y alrededor de 5 mm de diámetro. Peso 60-70 mg.

La glándula está recubierta por músculo estriado. A juzgar por su secreción, las células que la recubren y tapizan son una mezcla de células mucosas y seromucosas.

E) Los acinis de la glándula uretral se encuentran en la capa cavernosa de la parte pélvica y bulbosa de la uretra; cada uno de los pequeños conductos se abren independientemente en la uretra.

3.1.7. MÚSCULOS DE LA URETRA Y PENE.

El músculo uretral empieza en el cuello de la vejiga urinaria, rodeando la parte pélvica de la uretra y acaba entre los músculos isquiocavernosos del bulbo. Las fibras interiores circulares y otras longitudinales convergen en un incompleto y sagital septum de tejido conectivo.

La pareja de músculos bulbocavernosos se origina de la parte craneal del bulbo, cubriéndolo enteramente, y se inserta en la cara caudal de la base del pene.

La pareja de músculos isquiocavernosos tiene origen en el arco isquiático y termina en la cara dorsolateral del pene.

El músculo esfínter anal externo empieza en la parte prominente dorsolateral del bulbo uretral (donde es envuelto por el músculo bulbocavernoso) y forma un ojal dorsal alrededor del ano. El músculo conocido como m. elevador externo del ano o m. bulbocavernoso dorsal se desarrolla como homólogo del m. esfínter anal externo. Aunque tienen un desarrollo parecido en ambos sexos, sufre regresión en la rata hembra después de los 18 días de gestación; en el periodo postnatal es rudimentario, Cihak et al, 1967 (35). Supliendo al nervio pudiendo aparecen unas fibras degenerativas (más del 57%) que toman su lugar simultaneamente , Hanzlikova & Gutmann ,1972 (71).

La pareja de músculos coxigeo-anales (o m.anocoxigeos) se origina en la cara ventral de la vértebra superior coxigea; cada músculo pasa ventrocaudalmente a lo largo del recto.Los dos músculos se juntan como un tabique central, justo delante del ano.Una rama del nervio perineal penetra en el músculo justo antes de que se unan,Guillespie,1972 (63).

3.1.8. EL PENE

Posee una longitud de 20-28 mm, un promedio de ancho de 3,6 mm y altitud aproximada de 2,8 mm. En posición no erecta la parte medial del pene presenta caudalmente un ángulo agudo (flexura peneana); aquí una estrecha banda de gruesa fascia une el cuerpo del pene con la pared ventral abdominal. Próximo a la zona cilíndrica del glande, el pene se estrecha ligeramente para formar un imperceptible cuello.

El cuerpo cavernoso del pene está rodeado por una fuerte doble capa de túnica albuginea. Las fibras longitudinales de la capa externa están ausentes a lo largo del surco uretral y en el fondo del surco dorsal. A lo largo de ambos surcos la túnica tiene sólo 90 micromilímetros de espesor y alrededor de 200 micromilímetros en la zona lateral del pene.

El tejido erectil es sostenido principalmente por tejido conectivo y músculo liso. En contraste, el armazon del cuerpo cavernoso del tronco peneano consiste en un fuerte paquete colagenoso que arranca verticalmente de un plano medial irradiando hacia la periferia. El más grande espacio vascular se encuentra a lo largo del surco medio dorsal. Las paredes de este espacio estan revestidas con endotelio, y contienen un número variable de fibras musculares lisas y delgadas capas de tejido conectivo.

El tronco del pene está cubierto por fascia peneana, que incluye principalmente fibras elásticas longitudinales. Estas fibras emiten finas ramas hacia la túnica albuginea, sobretodo hacia su parte distal.

La zona apical del glande es rosada, y la parte proximal de color púrpura. Tiene una longitud de 7,5-10 mm y un diametro de 3-4 mm.

Centralmente el glande contiene un "hueso" peneano, que presenta una gran zona proximal (5,5-6,2 mm longitud) y una pequeña y cartilaginosa zona apical. Tiene dos partes articuladas, y contiene una cavidad medular de 2,5 mm de diámetro proximal y 1 mm distal.

La sección transversal es circular, aplanada bilateralmente en la zona apical Didier 1954 (48). Existen fuertes conexiones entre el "hueso" peneano y el cuerpo cavernoso mediadas por fibras de colágeno. El cuerpo cavernoso del glande está compuesto por dos pequeñas parejas y un grande e impar tronco cavernoso, contiguos entre si; se juntan en un amplio seno para drenar en la vena dorsal del pene Leeson 1965, (103).

Durante la erección, el mango del cuerpo cavernoso del pene se agranda para borrar la flexura peneana. Un claro aumento en longitud o volumen no cambia el aspecto del fuerte tejido conectivo capsular y septal; previene la compresión uretral el propio tejido cavernoso y una fuerte vaina conectiva. Un gran incremento en volumen del glande puede producir un aflojamiento del tejido cavernoso y una nueva organización en el tejido conectivo Hofer 1971 (78).

La capa visceral del prepucio cubre el glande y forma un ancho pliegue circular (1-2 mm) en el extremo. La capa parietal del prepucio tiene una lámina muscular continua que deriva de los músculos cutaneos. Los folículos del fino vello que presentan estos animales alrededor del prepucio, se proveen de voluminosos grupos de glándulas sebaceas.

3.1.10. GLÁNDULA PREPUCIAL. (GLANDULA PREPUTIALIS)

La glándula prepucial está localizada en el tejido adiposo subcutáneo, lateral del pene; coloración amarillo-marrón, es aplastada dorsoventralmente, presenta 8-10 mm longitud, 5 mm de ancho y pesa alrededor de 70 mg (casi 150 mg en los animales más viejos).

Su extremo distal se adelgaza cónicamente y se abre por un estrecho conducto de transición a la capa parietal de la piel del prepucio. La glándula tiene un componente exocrino con acinis que se abren a numerosos conductos, que se unen en un solo excretorio central.

Acinis y túbulos están revestidos con epitelio estratificado. El glándula tiene tejido conectivo en la cápsula y septum intersticial. Basándose en el tipo de secreción se considera ,Schaffer 1940 (140), que ambos, juegan un importante papel en la coagulación y también como glándulas olorosas.

En el SISTEMA REPRODUCTIVO de la rata macho, los testículos descienden entre los 30-40 días de vida, y se sitúan en sacos escrotales separados. El canal inguinal permanece abierto toda la vida.

En ambos sexos, la pubertad aparece entre los 50-60 días de edad.

3.2. INERVACIÓN

La inervación corre a cargo del nervio pudendo, que está formado por partes del VI nervio lumbar y del nervio sacro, corre caudalmente a lo largo del borde dorsal del hueso isquiático y da ramas al peritoneo ,recto, pene y escroto. Baljet y Drukker mencionan que el nervio pélvico algunas veces puede originarse del nervio pudendo y más tarde, como rama del

puddendo puede inervar la parte distal del recto y vagina (en la hembra). El músculo esfinter uretral, isquiocavernoso, bulbocavernoso y esfinter del ano son cada uno inervados por dos poblaciones de neuronas situadas en áreas separadas, del asta ventral de L6. El nervio caudal recibe contribución de los nervios sacros II o III , que caudalmente inervan la musculatura y piel distal.

3.3 VASCULARIZACIÓN

Los testículos tienen su IRRIGACIÓN a través de la arteria espermática interna, que puede proceder directamente de la a.aorta, o de la a.renal.Se divide en dos ramas principales,la a.epididimaria y la a.testicular.

4.- INMUNOLOGIA DE LA RATA

LA RESPUESTA INMUNE DE LA RATA HACIA AGENTES PATOLÓGICOS Y TUMORES REQUIERE UNA COMPLEJA INTERACCIÓN ENTRE ANTICUERPOS , LINFOCITOS Y MACRÓFAGOS.

4.1. INMUNOGLOBULINAS.

4.1.1. NOMENCLATURA DE LAS IG DE LA RATA.

La nomenclatura de las varias clases de Ig y subclases existentes es complicada. Existe principalmente confusión entre IgA e Ig G1, tanto en la rata, como en el ratón.

La división de las clases de Ig G en base a la movilidad electroforética (división establecida en otras especies animales) puede ser mantenida en el presente momento, al menos por razones históricas. El nuevo nombre de IgR, dado a la Ig G1 (sub) clase por Binaghi y Boussac-Aron (22) parece cuestionable. Ellos aducen que la (sub) clase Ig G1 en la rata, no tiene determinantes antigénicos comunes con la Ig G humana. Sin embargo, Bazin y col. ,Orleans han publicado reacciones cruzadas obtenidas usando anti Ig G humana (suero) y LOU Ig G1 monoclonal inmunoglobulina o Ig G1 normal de rata; Orleans escribe " en la rata, y también en el ratón, la Ig G está más estrechamente relacionada con la Ig G humana electroforeticamente, que las subclases más lentas.

En ausencia de más avanzados conocimientos de la estructura química de estas proteínas, hay dificultad para cambiar el nombre dado por Jones a estas clases de Ig , de acuerdo a la presente recomendación de la WHO, Ig M, Ig A, e Ig E, que tienen propiedades casi análogas a sus homólogas

humanas. El equivalente en la rata, a la Ig D humana está todavía en estudio, pero todo sugiere que existe su homóloga.

Actualmente, es imposible dividir las diversas especies de Ig G (Ig G1, Ig G2a, Ig G2b, Ig G2c) en clases o subclases; pero hay similitudes precisas en las subclases entre la rata y otras especies, sobretodo los ratones y humanos.

4.1.2. HISTORIA.

La primera noticia concerniente a proteínas del suero de rata, obtenidas por análisis inmunolectroforético, fué publicada por Grabar y Courcon, 1958 (67). Algunos años más tarde, Arnason y col. identificaron tres proteínas con actividad Ac. en el suero de rata, que les llamaron Ig M, Ig X (más tarde Ig A) e Ig G.

a) Ig M Inmunoglobulina.

Arnason y colaboradores caracterizaron esta clase de Ig , por su susceptibilidad a la cisteína y más tarde por su peso molecular.

b) Ig G Inmunoglobulina.

La nomenclatura usada para la Ig G es confusa. Actualmente se sabe que la IgA (o IG X) y la Ig G de Arnason , son ambas (sub) clases de Ig G.

c) Ig G Inmunoglobulina "ligera".

Esta clase de Ig, también fué identificada por Arnason y col., llamada en principio Ig X y posteriormente Ig A, para llamar la atención sobre la

posible correlación con la Ig A humana. La determinación era esencialmente basada en Ac presentes en saliva y tenía una menor homologación en el suero. Nash y col. informaron casi al mismo tiempo de la posibilidad de identificar un componente en la leche de rata, con la ayuda de un suero anti-ratón Ig A de conejo.

Posteriormente otros autores llamaron a esta Ig, Ig A, y demostraron que su movilidad anódica era mucho más rápida, que la provisionalmente determinada " IgA ", la cual era, efectivamente la Ig G1.

Orlans y Feinstein, obtuvieron una reacción cruzada entre Ig A humana y de rata.

d) Ig E Inmunoglobulina.

Los Ac reagínicos han sido demostrados en la rata y además con propiedades parecidas a las del hombre. Jones y Edwards han publicado que son un equivalente a la Ig E humana y se ha demostrado usando LOU monoclonal, proteínas de rata.

e) Ig D Inmunoglobulina.

Usando un anti-suero de pollo para Ig D humana, Ruddick y Leslie demostraron un homólogo antigenicamente (con reacción cruzada) a la Ig D humana, en las membranas linfocíticas de células de rata. Además recientemente Bazin y col. han encontrado cuatro LOU Ig D monoclonal inmunoglobulinas en la rata.

f) Celulas T. Reconocimiento de su estructura.

El antígeno receptor de los linfocitos T fué hasta hace poco desconocido; Binz y Wigzell encontraron que en las ratas, las celulas T y B especificas por el mismo antígeno, tienen idiotipos similares. Sin embargo, en la misma especie, idiotipos de los receptores de las celulas T, con especificidad para

más Ag de histocompatibilidad, son codificados por genes. Por esto, el Ag receptor de los linfocitos T tiene una fuerte afinidad para presentar conocidas clases de Ig , aunque su naturaleza exacta todavía no se ha podido determinar.

4.1.2.1.LOU. Inmunocitomas malignos en la rata.

Gran cantidad de conocimientos, respecto a las inmunoglobulinas de ratón, fueron facilitados por el descubrimiento de los plasmocitomas espontáneos C3H, y anteriormente los plasmocitomas inducidos por BALB/c en dicho animal. De manera similar, el descubrimiento de LOU inmunocitomas ileocecales malignos, contribuyó al desarrollo del conocimiento de las inmunoglobulinas de estas especies..

4.1.2.2.ORIGEN de LOU, clase.

En 1955, Maisin y col., trabajando en el Instituto del Cancer de la Facultad de Medicina, Universidad de Louvain, atrajo su atención un tipo especial de tumor linfoide aparecido en el area ileocecal en ratas. Deckers, Maisin y col. informaron, que algunos de estos tumores ileocecales, eran secretores de Inmunoglobulinas. En 1970, Bazin y Beckers lograron engendrar ratas con varios nucleos, en la Universidad de Louvain, y les dieron el nombre de LOU, en honor a dicha Universidad.

Estudiaron, en ratas de 28 razas diferentes y distintas lineas, el nivel de fertilidad y la incidencia del tumor en la unión ileo-cecal .La linea que presentó mayor incidencia de inmunocitomas malignos, fué elegida como referencia de histocompatibilidad y denominada LOU/C.La linea que presentó una tasa de reproducción mayor y una histocompatibilidad idéntica a LOU/C, se le llamó LOU/M. Ambas lineas, eran perfectamente

histocompatibles, y todos los machos LOU/M eran seleccionados según su semejanza en rasgos a LOU/C.

4.1.2.3. INMUNOCITOMAS malignos ileocecales.

Inmunocitomas malignos o tumores secretores de inmunoglobulinas aparecen espontáneamente en el nódulo linfático ileocecal en ratas LOU/C de ocho meses de edad. Su incidencia es de 34% y 17% en machos y hembras respectivamente. Tumores aparentemente muy similares han sido descritos esporádicamente en varias colonias de crías de ratas de todo el mundo, pero su incidencia no era nunca superior al 2-3%; Sin embargo, como no hay estudios realizados sobre las proteínas del suero en estos tumores, es imposible asegurar su identidad con los inmunocitomas LOU malignos. La incidencia de aparición de estos inmunocitomas malignos, es máxima a los 12-15 meses, aunque algunos aparecen incluso a los 27 meses, máxima edad de estos animales. La zona de origen de estos tumores LOU malignos, es en la mayoría de los casos, el nodo linfático ileocecal. Los tumores aparecen en la cavidad peritoneal como masas sólidas. Aparece algunas veces líquido ascítico, que puede ser de ayuda en la detección del tumor primitivo. La progresión del tumor es lenta, dando metástasis en mediastino y cavidad pleural.

En el aspecto histológico, la mayoría de las veces, las células proliferativas, no pueden ser descritas como células plasmáticas, por su pobre diferenciación; Las células secretoras del tumor, tienen una talla uniforme, un núcleo granular con nucleolos relativamente pequeños, con un citoplasma basófilo y pironinófilo.

La etiología de los inmunocitomas LOU malignos es todavía desconocida.

4.2. RESPUESTA INMUNOLÓGICA HUMORAL.

La respuesta inmunológica humoral de las ratas ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, las características fisicoquímicas de los antígenos, el usar o no usar el adjuvante, la vía de inoculación, la constitución genética de los animales inoculados, y la clase de los Ac. estudiados, son todo ello factores que hacen difícil la descripción de la respuesta inmunológica humoral en ratas, así como en otras especies.

NIVELES de Inmunoglobulinas y Anticuerpos en el suero después de una estimulación antigénica:

a) Respuesta inmunológica convencional.

Prácticamente todas las especies de roedores de laboratorio, son buenas productoras de IgM e IgG (sub) ,clases de Ac. Dependiendo del antígeno y del status fisiológico de la rata, la dosis de Ag a inocular, para obtener Ac precipitantes, es variable, oscilando entre 100 microgramos y 1mg con Freund's adjuvante. En todos los casos la respuesta inmunológica observada es inferior a la influencia de los factores genéticos.

b) Niveles de IgE y reagentes en el suero, después de estimulación antigénica.

Las ratas son consideradas pobres productores de Ac reagentes después de la estimulación con Ag convencionales. La respuesta reagentes era considerada como de corta vida y relativamente imposible de activación secundaria. Jarrett y Steward demostraron, sin embargo, que con algunas combinaciones de antígenos, adjuvantes y cedulas de inmunización se producía una fuerte y prolongada respuesta reagentes primaria, y aun

más, se podía obtener una respuesta secundaria efectiva; para ello utilizaron la clase (strain) LIS de rata, la cual vieron eran especialmente hábil para producir la respuesta inmunológica reagínica. Con menor capacidad, la clase (strain) LOU/M puede también producir elevados títulos de Ac reagínicos; en todos los casos es necesario el uso de adjuvant para inducir la respuesta primaria, pero no en la secundaria. La vía de inoculación más frecuente es la intraperitoneal, pero pueden utilizarse la via oral o intradérmica, con gran eficacia. Levin y Vaz descubrieron ,que la cantidad de antígeno por minuto, que inoculada en el ratón, más efectiva para producir una respuesta reagínica mayor y persistente, también era aplicable a la rata. Dosis de 10 microgramos a 1 mg , eran generalmente las usadas en estas especies; dosis superiores producían un efecto inhibitorio.

5.- ANTECEDENTES CIENTIFICOS

5.1. INFERTILIDAD

Aproximadamente el 10 % de las parejas que desean descendencia, son infértiles.

La infertilidad masculina se considera, que es la causa aproximadamente, del 40 % de los casos

En un 10-20% de dichas parejas, la investigación de su caso revela análisis de semen normales, en el hombre, y regular ovulación y cavidad uterina sin patologías en la mujer; si estas parejas han mantenido relaciones sexuales regularmente durante un año, sin conseguir un embarazo, se considera infertilidad de causa desconocida.

Los factores inmunológicos, son la causa de la mayoría de las infertilidades sin etiología conocida, por ello es obligado en su estudio el realizar técnicas específicas de aglutinación e inmovilización, así como el título de anticuerpos antiespermáticos en suero y semen.

Rumke y Hellinga (135) fueron los primeros en detectar anticuerpos anti-esperma en hombres infértiles. Desde entonces han surgido nuevas técnicas, más sensibles, más específicas, que han permitido detectar estos anticuerpos, sin embargo el papel etiológico de los Ac anti-esperma en la infertilidad no está todavía claro.

El estudio comparativo de parejas que presentaban Ac anti-esperma , con aquellas que resultaron negativas a la inmunología , pone de manifiesto que la presencia de dichos anticuerpos, reduce de manera significativa, la posibilidad de un embarazo, presentando especial interés en aquellas parejas con infertilidad primaria y en varones oligospermicos, según Haas y Matury Mathur (109)

La inmunosupresión con corticoides, se ha usado como medida terapéutica en pacientes con sospecha de infertilidad inmunológica. Aunque el mecanismo de acción en estos casos no es claro, si se sabe que disminuye la producción de Ac. y altera la acción de los mismos, especialmente los de la clase Ig G e Ig A. En los casos, en que se instauró el tratamiento, la fertilidad del paciente aumenta; sin embargo el efecto inmunosupresor no es permanente, M. Seki (144)

Pacientes con historia de torsión testicular, presentaron disminución de la fertilidad. Desde los trabajos de Krarup (101) que observó que los pacientes que habían sufrido una torsión testicular unilateral, tenían anomalías testiculares en ambos testículos y disminución de la espermatogénesis, se empezaron a considerar diferentes hipótesis etiológicas, apuntando como la más probable, la teoría inmunológica.

Sin embargo, hay motivo de controversia en este aspecto, el hecho que exista un alto grado de infertilidad incluso en pacientes en los que se destorsionó el testículo antes de las cuatro horas, hace que algunos autores, opinen que ambos testículos son previamente patológicos, no sólo en su suspensión, sino también en su estructura interna, por lo que las lesiones del testículo contralateral, no se deberían a la torsión testicular, ni dependerían del tratamiento realizado, Bartsch (15). krarup (101). Guajardo (69).

5.2. ANTECEDENTES HISTOLÓGICOS

Desde la publicación de Krarup (101), han sido varios los autores que se han preocupado del estudio del testículo contralateral " sano ", después de una torsión testicular.

Nagler, en 1982 (119), trabajó con ratas Sprague Dawley de 60 días de vida. Realizó torsión testicular unilateral, con posterior destorsión u orquiectomía , a las 24 horas. Sacrificó los animales a los 10 días. El estudio histológico del testículo contralateral le mostró una disminución del diámetro de los túbulos seminíferos y también de la espermatogénesis en las ratas que había realizado torsión-destorsión; en cambio en las que realizó orquiectomía como tratamiento quirúrgico observó un cierto grado de protección del testículo contralateral, mostrando mayor tamaño tubular y un 30% de espermatogénesis normal.

En principio se pensó que el edema y la inflamación secundarios a la torsión testicular, podían alterar la función termoreguladora del escroto y como consecuencia la espermatogénesis y el parénquima del testículo contiguo, Ashley1959 (11) .

Se realizó entonces, torsión testicular subcutanea y se comprobó que el daño en el teste contralateral era similar al de la torsión intraescrotal; por lo tanto los factores locales no se consideraron etiologicamente significativos en las anormalidades del testículo contralateral

A partir de estos resultados, ya se apuntó la posibilidad de una teoría inmunológica, apoyando esta hipótesis el que las lesiones que aparecían en la orquitis alérgica y la orquidoepididimitis autoinmune eran de la misma naturaleza., Friberg (59), Waksman (165).

Cuando no se extirpaba el testículo ,las alteraciones contralaterales eran más evidentes, esto se explicaría porque al restaurar la circulación en el teste torsionado, se produciría un escape adicional de material antigénico a la circulación sistémica.

Serrallach y Guajardo (145) , observaron en 36 pacientes, escogidos al azar de 134 torsiones testiculares unilaterales ; Cuatro presentaron azoospermia, cuatro cifras inferiores a 10 millones/ ml, siete entre 10-20 millones / ml y siete entre 20-40 millones / ml de espermatozoides. Tomando como densidad media la cifra de 48 millones/ ml, los resultados son claramente patológicos. Se hace la consideración que aunque se aceptara como límite normal 20 millones / ml el índice quedaría en un 44,1 %. La movilidad media total fue de 42,6 % y el número medio de formas anormales de 34,9 % en 25 enfermos.

YorK y Drago (174) trabajaron con ratas Noble de 75 días de vida. En las ratas que realizaron torsión testicular (sin destorsión) y que sacrificaron a los 14 dias no encontraron cambios histológicos significativos en el testículo contralateral; esto difiere de lo observado por Nagler,(119) en su trabajo. Sin embargo, si observaron disminución de la espermatogénesis y del tamaño tubular en las ratas sacrificadas a las tres semanas.

Realizaron también torsión y orquiectomía, a las tres horas de la torsión testicular, manifestando que este proceder protegía al testículo contralateral ; otro punto polémico, puesto que Bartsch (15), consideró que el tiempo máximo entre torsión- destorsión para que se produjese alteración contralateral era de 6-8 horas, pero Merimsky y cols (114) que procedieron a la ligadura del cordón espermático en ratas sanas, durante

tres horas ,observaron a los tres meses, que la fertilidad había quedado reducida al 63 %; pero si pasadas las tres horas de ligadura se procedía a practicar orquiectomía ipsilateral, la fertilidad no presentaba alteraciones.

Cerasaro y cols. (34) , investigaron con conejos blancos de Nueva Zelanda (no especifican edad), en los grupos en los que realizaron ligadura vascular y posterior orquiectomía (a las 24 y 96 horas) no encontraron cambios histológicos, ni disminución en la espermatogénesis del testículo contralateral.

Los grupos con torsión testicular, con torsión- destorsión a las 36-96 horas, presentaron distorsión histológica y disminución de la espermatogénesis en dicho testículo.

La mitad de los animales habian sido sacrificados a las dos semanas y la otra mitad a las 8 semanas. Se apoya la teoría de que si no hay paso de material antigénico a la circulación general , no se produce reacción sistémica, y por lo tanto, tampoco lesión del testículo contralateral .

Kogan y cols.(98) , en ratas Sprague Dawley de 53 días de vida, realizaron torsión unilateral (sin destorsión) y torsión- orquiectomía a las 48 horas. Sacrificaron los animales a los 30 días.

Los resultados demostraron que los análisis histológicos del teste contralateral , presentaban un decremento de la espermatogénesis y disminución del diámetro tubular en 6 de las 8 ratas en las que se había realizado torsión testicular. Las ratas en las que se realizó orquiectomía, mostraron histología normal en 5 de 8, con ligera disminución de la espermatogénesis y sin reducción del diámetro tubular en las restantes.

Ortolano (124) , utilizó también ratas Sprague Dawley para sus investigaciones ; Edades, 5 y 10 semanas.

Estudió los efectos de una isquemia transitoria, producida por la ligadura de los vasos espermáticos (Fowler-Stephens Maneuver), sacrificando los animales a los diez días. No encontró cambios, ni en la morfología, ni en la espermatogénesis del testículo contralateral.

M Sade y cols.(138) , trabajaron con ratas adultas *Mus musculus* y Swiss albino. Realizaron torsión -destorsión y torsión-orquiectomía, en un intervalo de 24 horas. Sacrificaron las ratas a las cuatro semanas. El diámetro de los túbulos seminíferos presentaron una significativa disminución en todos los grupos de ratas, comparativamente con el grupo control, así como un tanto por ciento de azoospermias elevado, presentando el grupo de ratas en el que se había realizado torsión exclusivamente (sin destorsión) un 47% de ellas; Esto sugiere que un mínimo de circulación sanguínea, es suficiente para producir patología en el testículo contralateral y que la intensidad de la lesión presenta una estrecha relación con el tiempo de duración de la torsión (33, 114, 162).

F Hadziselimovic (70), realizó su estudio en 38 chicos, 30 adolescentes y 8 prepuberales., obteniendo biopsia del testículo torsionado en 18 de ellos, biopsias bilaterales en otros 18, y solamente del teste contralateral (el teste torsionado estaba completamente infartado) en otros dos restantes.; las realizó en el momento de la intervención. La duración de la torsión varió entre 2 horas a tres días.

En los niños prepuberes encontró el 70% de biopsias alteradas, el número de espermatogonias por túbulo estaban disminuidas. En los adolescentes, el número de espermátides también estaba severamente disminuido en ambos testes. En definitiva, 20 de los 38 pacientes (53%) presentaban alteraciones testiculares bilaterales antes de la torsión , según el presente estudio..Estas observaciones sugieren al autor que la infertilidad en pacientes con unilateral torsión testicular puede ser consecuencia de una patología pre-existente, en ambos testículos.

Estudios realizados en animales PREPUBERES, :

Henderson (75) ,los realizó con hamsters chinos prepuberales, realizando la torsión-destorsión o torsión-orquiectomía.,a las 24 horas.Comprobó la histología de ambos testículos a la semana, al mes y a los seis meses de la intervención; así como el estudio de la espermatogénesis, y sus resultados fueron negativos, en todos los casos.

Puri y cols.(129) apoyaron en su trabajo, los resultados anteriores. Sólo encontraron un paciente con análisis anormal del semen , de su serie de 18 niños prepúberes (11 de ellos tenían más de 10 años), a los cuales realizó estudio seminal entre 7 y 23 años después de una torsión testicular prolongada.

Henderson, Puri, Nagler and White, Kogan..., consideran que estos resultados se deben a que en niños o animales prepúberes, sólo existen elementos germinales inmaduros, que no son capaces de producir un estímulo de autosensibilización eficaz.

J.Guajardo1991 (69), en su tesis doctoral, trabajó con ratas Sprague Dawley de más de 45 días (adultas), que sacrificó a los 20 y 60 días; estudiando la espermatogénesis del teste contralateral en la torsión testicular, mediante citometría de flujo, microscopía electrónica de superficie y microscopio óptico; sus conclusiones fueron totalmente negativas: no encontró alteraciones histológicas, ni alteraciones en la espermatogénesis del testículo contralateral post-torsión, no influyendo ni el tiempo de torsión, ni el tratamiento realizado.

S. Sanjuan (139), en su tesis doctoral, 1989, demostró alteraciones significativas, en el estudio histológico del testículo contralateral y en el espermiograma de ratas Wistar, de edades comprendidas entre 30 y 70 días, en las que realizó torsión-destorsión (24 horas) y sacrificó a los 15 y 30 días. Postuló, que en el estudio estadístico sobre la influencia de la edad en las alteraciones del número de espermatozoides y porcentaje de esperma móvil, no había diferencia significativa dependiente de este factor.

C Frado 1992 (53), trabajó con ratas Sprague Dawley de 30-40-50-60 y 90 días. Las sacrificó a los 40, 60 y 90 días. Las conclusiones de su tesis doctoral fueron : Producción de daño histológico en el teste contralateral al torsionado; mecanismos inmunológicos como génesis de estas lesiones testiculares; aparición de más daño testicular en las ratas de 50 días de edad, que en las de 30 días, puesto que el proceso de maduración sexual es mucho más completo.

Como conclusión final decía "en aplicación a la práctica humana, es muy probable que el no tratar quirúrgicamente una torsión testicular de 24 horas de evolución, sea una medida razonable", ya que en su trabajo los testículos contralaterales que menos alteraciones presentaban, precisamente eran los que, el testículo torsionado no había sufrido intervención alguna.

Como dato "casi anecdótico", en cuanto al tema que tratamos en esta tesis podríamos enumerar los estudios de Kolbe (99) y Consentino (36), que realizaron sus respectivos trabajos con el mismo tipo de ratas (Sprague Dawley), aplicando la misma técnica quirúrgica, y con los mismos periodos de tiempo; la única diferencia eran las edades de los animales, 30 y 35 días en el momento de la intervención.

Los resultados :

Dr. Kolbe. Testículo contralateral histologicamente normal en todas las series. Ratas de 30 días.

Dr. Consentino. Disminución significativa del diámetro de los túbulos seminíferos. Ratas de 35 días.

Consentino, consideraba ,que la espermatogénesis de la rata empezaba, antes de los 35 días.

Debemos de tener en cuenta, que los resultados y las opiniones de los diferentes autores difieren entre si por las diferentes varianzas utilizadas, en la raza del animal, edad, periodo....., además en muchos de los trabajos no hay datos cuantitativos, ni tablas que nos permitan una comparación estadística razonable.

5.3. ANTECEDENTES INMUNOLÓGICOS

La bibliografía sobre este tema es escasa, y tan dispar en los resultados, como en los antecedentes histológicos.

Kogan y cols.(98) realizaron con ratas Sprague Dawley, de 53 días de edad, torsión testicular unilateral (sin destorsión) y torsión - orquiectomía a las 48 horas. Sacrificaron las ratas a los 30 días post-torsión en ambos casos. Realizaron el estudio de la actividad de los Anticuerpos anti-esperma por el método de inmunofluorescencia indirecta, encontrando en todos los grupos, títulos bajos, y sin diferencia notable entre los diferentes grupos. En un posterior ensayo, con técnica modificada de Amos, encontraron títulos elevados de Ac linfotóxicos en los grupos en los que se había realizado la intervención , mientras que el grupo control era negativo a estos anticuerpos.

Flickinger y col. 1988 (51), realizaron vasectomías y vasovasostomías bilaterales en ratas Sprague Dawley, y las sacrificaron para estudio, en los intervalos de tres, cuatro y siete meses, a partir del principio del experimento. En base a las biopsias testiculares realizadas, clasificaron los testes en dos categorías: testes normales y testes alterados. En todos los casos, los resultados demostraron una clara asociación entre los testículos alterados y la presencia de Acs antiesperma, más positivos a los cuatro y siete meses (metodo Elisa). Pensamos que es un dato más a tener en cuenta, y que hace más consistente la teoría , de que dichos anticuerpos interaccionan con los componentes testiculares y juegan un papel importante, en la producción de lesiones testiculares.

Pedersen (125) , Rubenson (138) realizaron su trabajo con ratas Lewis (Lew/ BAN) prepuberales en el momento de la intervención (6 semanas) y mediante el método de inmunofluorescencia indirecta. Procedieron. a realizar vasectomía unilateral en un grupo,

interrupción vascular unilateral y bilateral en otros sendos grupos y por último, la resección bilateral de la arteria ductal en el último grupo de ratas. Un sólo grupo de ratas adultas, se les realizó interrupción vascular unilateral, para utilizarlas como grupo comparativo.

A las 13 semanas se procedió a cuantificar los títulos de Ac antiesperma, verificando la misma cantidad de ellos en los animales adultos, que en los de edad pre-fertil.

Los autores de este trabajo consideran que los animales pre-fértiles son más sensibles al trauma vascular, con respecto a la formación de Ac. antiesperma, incluso que los adultos ; la razón de esto, parece ubicar en que la pared de los vasos, tiene diferente densidad, siendo más sensible y menos resistente en las ratas más jóvenes.

Totalmente opuestos al trabajo anterior, son los resultados de Puri (129) y Henderson (75).

Puri , cuyo método experimental ya hemos descrito anteriormente, estudió en niños pre-púberes que habían sufrido una torsión testicular, las IgA e Ig G específicas, mediante reacción de aglutinación (MAR) y no encontró evidencia de Ac antiesperma en ninguno de sus pacientes.

Henderson, en hamsters chinos pre-púberes, en los que había realizado destorsión y orquiectomía (también según método descrito anteriormente) examinó tejido testicular, mediante la técnica de inmunofluorescencia, usando anti-hamster IgG, no apreciando diferencia entre el grupo control y el experimental.

5.4. ANTECEDENTES TERAPEUTICOS (MEDICOS)

M.Sade y col. 1988 (138) realizaron su estudio en ratas *Mus musculus* y *Swiss albinas*. Investigaron el efecto del tratamiento con *Metilprednisolona*, en el testículo contralateral.. .

Procedieron a la torsión del testículo izquierdo, con posterior destorsión u orquiectomía, a las 24 horas ; inyectaron a cada animal, 2 mg/ Kg de *metilprednisolona* diariamente durante cuatro semanas.

Sus resultados fueron: Las diferencias en el diámetro de los túbulos seminíferos eran significativas entre los grupos que habian sido intervenidos sin tratamiento médico y el grupo control. En cambio no eran estadísticamente significativas con los grupos en tratamiento corticoide.

En cuanto a niveles de azoospermia, eran mayores en el grupo de ratas en que se practicó torsión- destorsión, sin tratamiento médico.

Kogany cols. (98), que trabajaron con ratas *Sprague Dawley* adultas, intentaron también un tratamiento médico con *Prednisona*.

Realizaron los siguientes grupos:

- 1- Grupo control
- 2- Grupo control más *Prednisona*
- 3 - Grupo con torsión testicular unilateral
- 4- Grupo con torsión testicular unil. más *Prednisona*.
- 5 -Grupo con torsión testicular unil. con orquiectomía a las 48 horas.

La *Prednisona* se inyectó a dosis de 80 mg /Kg diarias al principio y se fue disminuyendo hasta 50 mg/ kg, tres veces por semana, en la última semana. Se sacrificaron al mes de la intervención

Se apreció disminución de la espermatogénesis y del diámetro tubular, en los grupos 3 y 5.

En los grupos 1,2 y 4, la espermatogénesis y la histología testicular eran normales.

El estudio inmunológico, que se realizó por método Elisa modificado, evidenció aumento del título de Ac linfotóxicos en los grupos 3 y 5.; Cero en los restantes grupo.

6.- MATERIAL Y METODOS

6.1. MATERIAL

6.1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

6.1.1.1 Características generales:

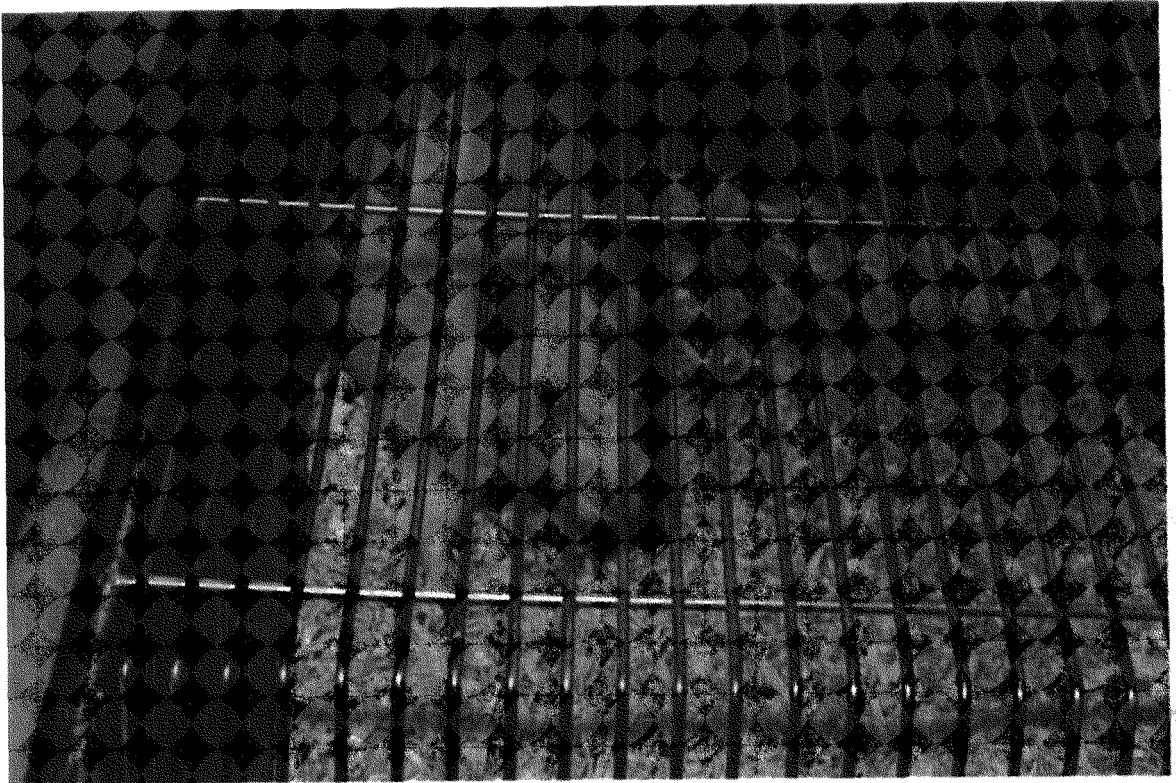
Para la realización de este trabajo , se han utilizado 98 ratas , raza Sprague- Dawley, machos de diferentes edades, que han sido previamente examinados y elegidos totalmente sanos . Se eligió esta raza de ratas, por su mejor manejabilidad , teniendo en cuenta su tamaño y su resistencia física a la anestesia y a los traumas quirúrgicos. El único inconveniente de las ratas Sprague-Dawley , es que inmunologicamente, son de las menos activas.

Cada grupo de animales, constaba de 5 a 10 ratas, según la cantidad de animales que teníamos disponibles de cada camada, para que las diferencias físicas y bioquímicas entre las ratas fuesen mínimas.

Fueron cedidas por el estabulario de la Facultad de Medicina de Lleida, y alimentadas y cuidadas en el mismo, a temperatura constante de 24- 25 grados. Dieta A04 * Lética, que consta de unos niveles nutricionales, adaptados para dieta de mantenimiento de ratas; agua " ad libitum".Las ratas permanecían 14 horas con luz artificial y 10 horas a oscuras, regulado por un sistema de electrostato.

Se eligieron ratas de 15 días ; 1,5 meses ; 2,5 meses , con el fin de poder comparar las diferentes reacciones inmunológicas en grupos de edad dispares, todos ellos inmunologicamente activos.

Se considera una rata de 1,5 meses, rata puber, adolescente. A los 2,5 meses, es la edad de máxima fertilidad en las ratas. La rata de 15 días de edad, según prácticamente todos los autores, se considera una rata en edad infantil , sin poder inmunológico..



**RATA MACHO DE 45 DÍAS.
(RAZA SPRAGUE-DAWLEY)**

6.1.1.2 Grupos de estudio :

G 1 - Grupo control, ratas de 15 días. No se realizó intervención.

G 2 - Grupo de ratas de 15 días de edad. Se les realiza torsión del testículo izquierdo, según método habitual. Se destorsiona a las 24 horas post-intervención. Se sacrifican a los 15 días.

G 3 - Grupo de ratas de 15 días de edad. Se realiza la misma intervención anterior. Se sacrifican a los 30 días.

G 4 - Grupo control, ratas de 1,5 meses. No se realizó intervención en estos animales.

G 5 - Grupo de ratas de 1,5 meses. Se les realizó torsión del testículo izquierdo, con posterior destorsión a las 24 horas de la intervención. Se sacrificaron a los 15 días post-intervención.

G 6 - Grupo de ratas de 1,5 meses. Se les realizó la misma intervención que en el grupo anterior. Se sacrificaron a los 30 días post-intervención.

G 7 - Grupo de ratas de 1,5 meses . Se les realizó torsión del testículo izquierdo, que se mantuvo durante 24 horas. Pasado este intervalo de tiempo se realizó orquiectomía del testículo torsionado. Se sacrificaron a los 30 días.

G 8 -Grupo control , ratas de 2,5 meses. Sin intervención quirúrgica.

G 9 - Grupo de ratas de 2,5 meses . Se les realizó torsión del testículo izquierdo, con destorsión a las 24 horas. Se sacrificaron a los 30 días post-intervención,

G 10 - Grupo de ratas de 2,5 meses. Se les realizó el mismo procedimiento que en el grupo anterior, se las sacrificó a los 60 días.

G11 - Grupo de ratas de 2,5 meses. Igual procedimiento que el anterior grupo.Sacrificio a los 90 días.

G12 -Grupo de ratas de 2,5 meses. Se les repite el procedimiento anterior.Se sacrificaron a los 120 días.

G13 -Grupo de ratas de 2,5 meses .Se realizó torsión del testículo izquierdo.Se procedió a la destorsión a las 24 horas, previamente (20' antes) se le inyectó 0,05 ml de Lymphoser Berna, en inyección lenta.IM. Se repitió la dosis de Lymphoser, una vez por semana, hasta su sacrificio a los 30 días.

G14 -Grupo de ratas de 2,5 meses . Se realizó torsión del testículo izquierdo. Destorsionamos a las 24 horas, inyectando previamente (aprox. 25' antes) 0,5mg de Metilprednisolona IM lenta (2 mg/ Kg). Se repitió la dosis semanalmente hasta su sacrificio a los 30 días

G15 -Grupo de ratas de 2,5 meses. Se realizó torsión del teste izquierdo. Se destorsionó a las 24 horas; previamente inyectamos (12 horas antes) 1 mg de Metilprednisolona IM lenta (4 mg/ Kg) y doce horas después de la intervención, repetimos la dosis. Se repite la inyección a dosis de 1 mg (4 mg / Kg/día), tres veces por semana hasta su sacrificio a los 30 días

G16 -Grupo de ratas de 2,5 meses . Se realizó torsión- destorsión en un periodo de 24 horas. Se les inyectó Urbason a dosis de 4m/Kg /día, a días alternos. Se sacrificaron a los 15 días.

G17 -Grupo de ratas de 2,5 meses. Se les realizó la misma intervención anterior. Se les inyectó la misma pauta de corticoides. Se sacrificaron a los 30 días.

EDAD	Nº RATAS	INTERVENCION	DURACION INT.	SACRIFICIO
1,5 meses	5	control	-	-
1,5 meses	5	torsión-destorsión	24 horas	15 días
1,5 meses	10	torsión-destorsión	24 horas	30 días
1,5 meses	5	orquiectomia	24 horas	30 días
2,5 meses	5	control	-	-
2,5 meses	5	torsión-destorsión	24 horas	30 días
2,5 meses	5	torsión-destorsión	24 horas	60 días
2,5 meses	5	torsión-destorsión	24 horas	90 días
2,5 meses	5	torsión-destorsión	24 horas	120 días
2,5 meses	5	orquiectomia	24 horas	30 días
2,5 meses	5	t-dest-trat Lymphoser	24 horas	30 días
2,5 meses	5	t-dest-trat Corticoides (intensivo)	24 horas	15 días
2,5 meses	5	t-dest-trat Corticoides (intensivo)	24 horas	30 días
2,5 meses	5	t-dest-trat Corticoides (alterno)	24 horas	30 día
15 días	5	Control	-	-
15 días	5	torsión-destorsión	24 horas	15 días
15 días	5	torsión-destorsión	24 horas	30 días

*t-dest Lymphoser, son ratas en las que se realizó la intervención de torsión-destorsión y tratamiento con Lymphoser.

*t-dest Corticoides, son ratas en las que se realizó la intervención de torsión-destorsión y tratamiento con Metilprednisolona .

*En las ratas en las que el tratamiento fué orquiectomía, se realizó, en el mismo momento de la destorsión, previa ligadura de todo el paquete vascular.

* Las ratas control, no sufrieron manipulación alguna, simplemente se les extrajo sangre intracardiaca para la obtención de suero, y se fijaron ambos testículos en formol al 4,5-5 %.

Todas las ratas, se pesaron antes de empezar el estudio:

- ratas macho de 2,5 meses: 250 mg (alternancia de 30-35 mg)
- ratas macho de 1,5 meses: 200 mg (alternancia de 20 mg)
- ratas macho de 15 días : 50 mg (alternancia 3-5 mg)

En las ratas de 2,5 meses, precisamente por considerar que estan en la época de mayor fertilidad, y en el momento de mayor poder antigénico del espermatozoide , se les realizaron determinaciones a los 30,60,90, y 120 días y el tratamiento médico.

Las ratas de 15 días, se eligieron ante la imposibilidad de experimentar con ratas recién nacidas, como era nuestro propósito. Los motivos por los que no pudimos trabajar con ratas más pequeñas fué:

-Antes de los 8 días de vida, no aparecen los testículos en las bolsas escrotales, por lo que incluso es difícil discernir, antes de esta edad, cual será el sexo del animal.

-En este momento, a los ocho días, el tamaño del testículo es tan reducido, que es difícil de intervenir.

- La edad de 15 días, es la edad mínima, en que se puede destetar las ratas, sin peligro de muerte por falta de alimentación

- Si las ratas se operan antes de destetarlas de su madre, la rata madre se las come, por muy pequeña lesión que se les produzca.

6.2.METODOLOGIA

6.2.1. PRE-INTERVENCION: TÉCNICA ANESTÉSICA.

En todos los animales se rasuró la zona escrotal e hipogástrica , desinfectando con alcohol, para realizar la intervención en total asepsia.

La anestesia se realizó con Hidrato de Cloral, en dilución 4-5 % , mediante inyección intraperitoneal, a la dosis de 1cc/ 100 mg ; se inyectó siempre en hipogastrio izquierdo, y de manera superficial, a fin de evitar posibles lesiones orgánicas internas. Algunas ratas presentaron resistencia a la anestesia y se les tuvo que inyectar más dosis (aprox. 1,5 cc/ 100 mg)..

Posteriormente se inmovilizó al animal , ya en la mesa de trabajo

6.2.2. INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA

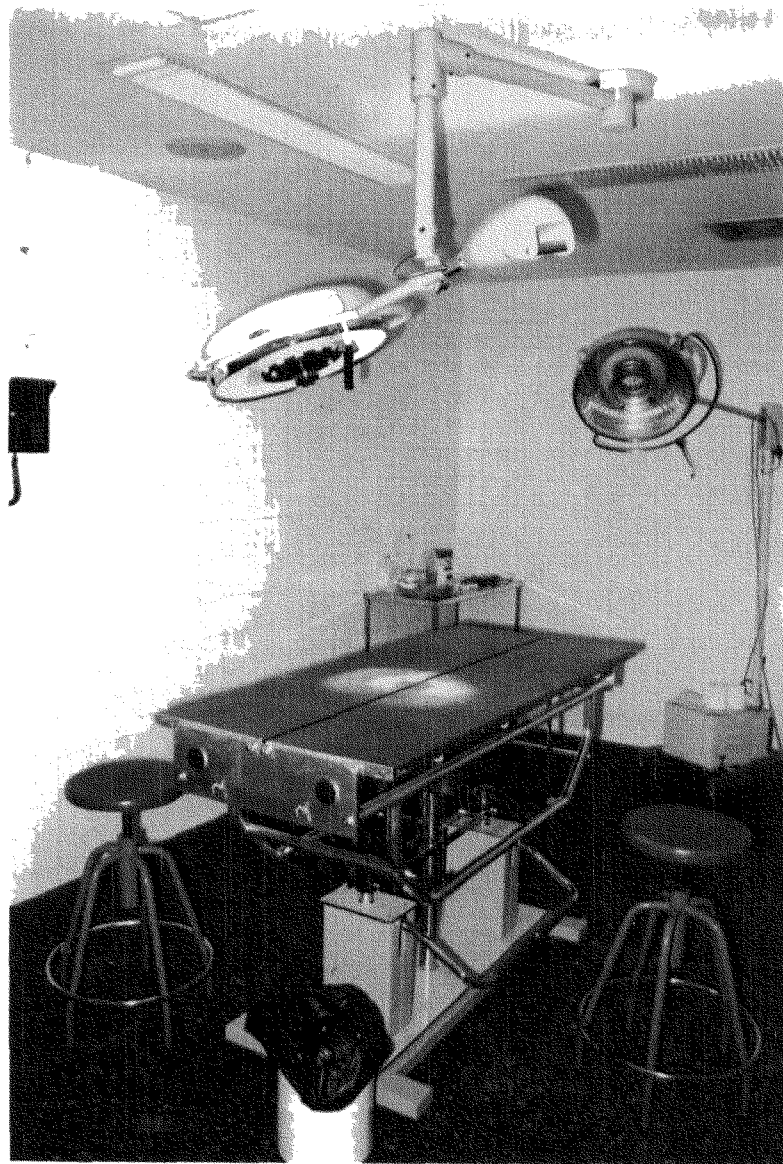
6.2.2.1.TORSIÓN TESTICULAR

Se realizó una incisión en escroto izquierdo, aproximadamente de 2 cm; exteriorizando el testículo. Procedimos a la rotación del mismo, en el

sentido contrario a las agujas del reloj , 720 °, y lo fijamos al tabique interescrotal con material reabsorbible (catgut 5/0) , mediante la técnica atraumática de Ryan (131), que consiste en realizar un " pliegue" en el ligamento mesenquimal, a fin de no dañar lo más mínimo, el parénquima testicular.

Ryan comprobó que la sutura de fijación transparenquimal del testículo también producía cambios vasculares, en algunas ocasiones similares a los observados en la torsión testicular.

Con la técnica de sutura transmesenquimal, no se produce traumatismo en el parénquima testicular, por lo que puede considerarse, modelo más idóneo para la investigación experimental de las torsiones testiculares que las técnicas descritas hasta el momento.



QUIRÓFANO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LLEIDA ,DONDE SE REALIZARON LAS INTERVENCIONES EXPERIMENTALES.



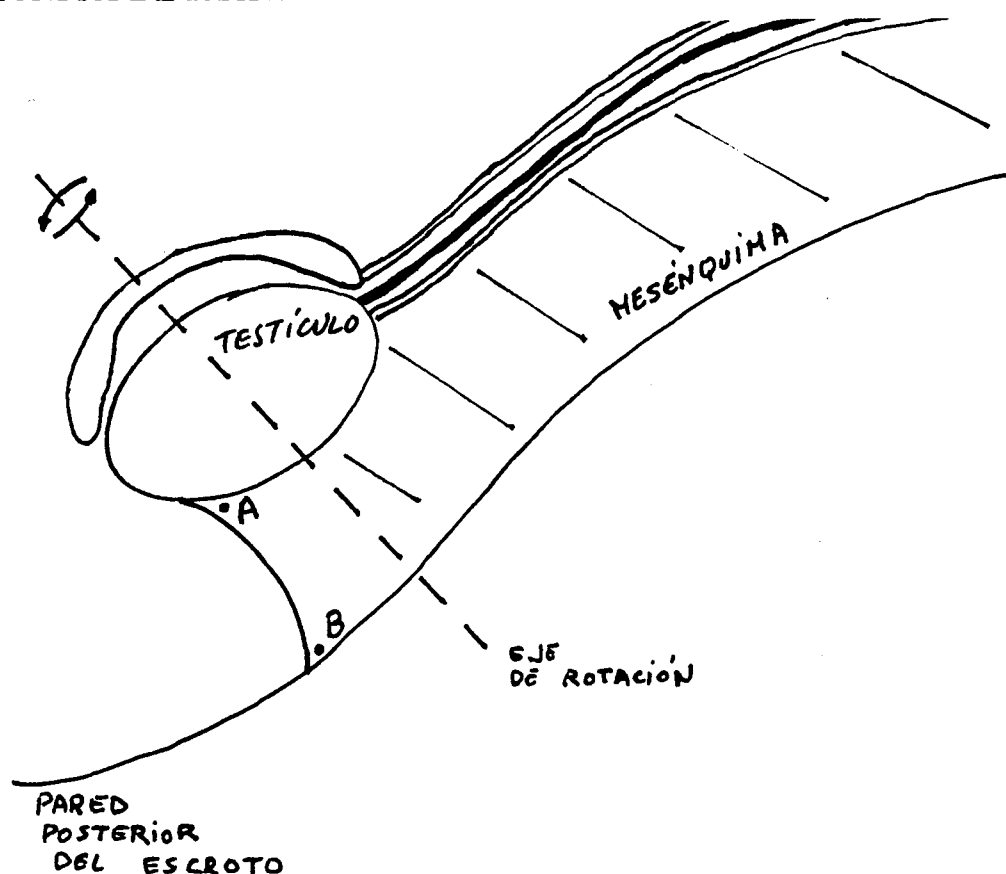
**TÉCNICA ANESTÉSICA. ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE
HIDRATO DE CLORAL (1 c.c/ 100 mg)**



ASPECTO DEL TESTÍCULO TORSIONADO (720 °), A LA HORA DE HABERSE REALIZADO LA INTERVENCIÓN EXPERIMENTAL

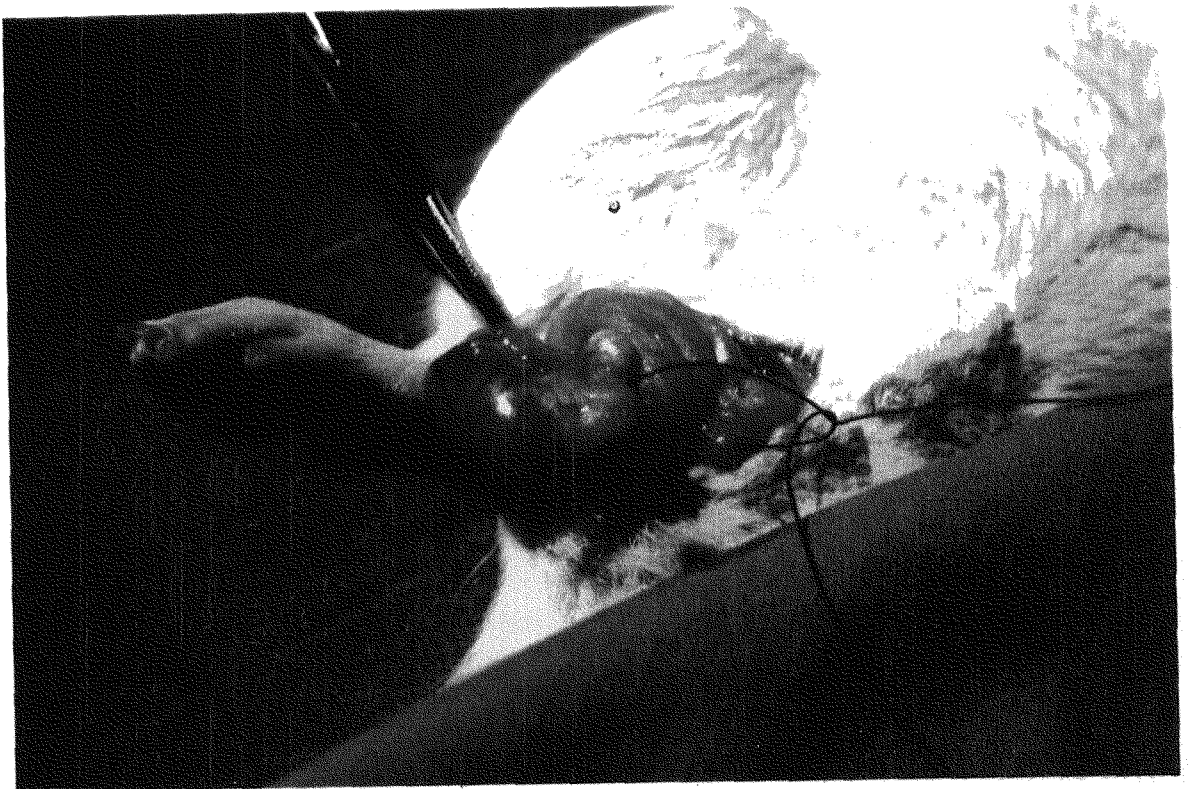
6.2.2.2. EXPERIMENTAL TORSIÓN TESTICULAR. MODELO ATRAUMÁTICO:

TÉCNICA DE RYAN



Se cierra escroto con puntos sueltos de seda 4/0.

A las 24 horas, se realiza de nuevo la misma anestesia y se sacan los puntos de la bolsa escrotal y los de fijación del testículo, se realiza la rotación en el sentido contrario y se reintroduce el teste. No se fija el testículo al tabique interescrotal. Se cierra el escroto, según la técnica anterior.



MOMENTO DE LA FIJACIÓN DEL TESTÍCULO TORSIONADO, AL TABIQUE INTER-ESCROTAL, MEDIANTE LA TÉCNICA DE RYAN.

6.2.2.3. ORQUIECTOMÍA

En los grupos en los que se realizó orquiectomía , previamente a la sección del testículo , dos centímetros por su parte proximal se realizó ligadura con Dexon 5/0 de todo el paquete vascular y conducto espermático. La técnica quirúrgica previa, fue la misma que en la torsión testicular.

6.2.3. TRATAMIENTO MÉDICO EXPERIMENTAL

En las ratas en las que se instauró tratamiento, con corticoides o gammaglobulina antilinfocitaria, se siguió las siguientes pautas:

Tratamiento con Gammaglobulina antilinfocitaria(Lymphoser); se inyectó 0,05 ml deGGA intramuscular lenta, unos 20 minutos antes de la destorsión y se repitió la dosis cada semana (4) hasta el sacrificio de la rata.

*Lymphoser , es un inmunosupresivo que contiene inmunoglobulina antilinfocitaria de caballo (50 mg/ 1 c.c). No se observó ningún efecto secundario en las ratas, con la dosis utilizada, en ningún momento del trabajo.

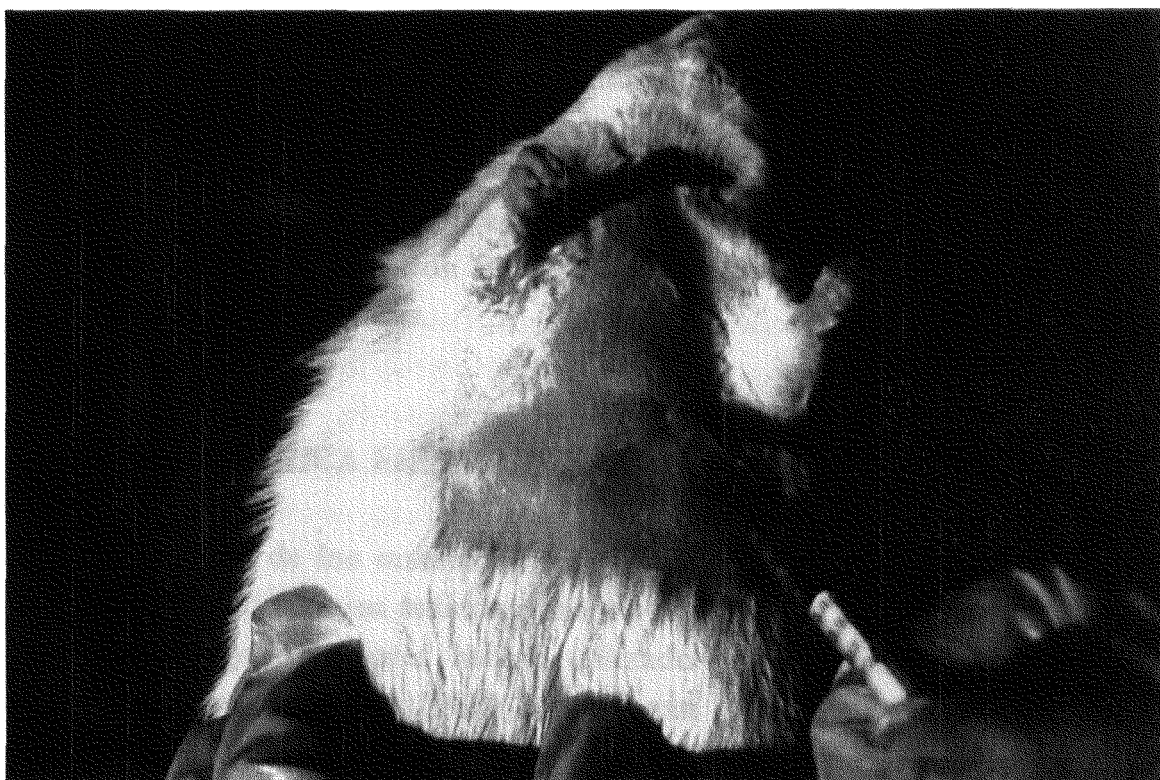
En el tratamiento con corticoides (Metilprednisolona) se utilizó dosis de 2 mg y 4 mg / Kg/día, ya que las dosis para mamíferos inferiores, son equitativas a las utilizadas en el hombre. Se siguió el mismo protocolo mencionado anteriormente. Tampoco en estos grupos se observó

No se realizó la pauta quirúrgica de torsión, sin posterior intervención, por considerar que en la práctica quirúrgica humana no se puede extrapolar :la torsión testicular aguda, mientras no se demuestre lo contrario, es siempre una urgencia quirúrgica.

6.2.4. OBTENCIÓN DEL MATERIAL

En el momento del sacrificio se procede de nuevo a anestésiar la rata con Hidrato de Cloral, a la dosis descrita de 1cc/100mg.

Se obtiene la sangre de la rata mediante punción intracardiaca, que se realizó con aguja de insulina, con inclinación de 45 grados, en la zona inferior costal. Se dejó reposar la sangre en tubo de cristal durante 3-4 horas, a fin de poder separar el suero del coágulo; se centrifugó a continuación a 2.500 revoluciones por minuto, durante 15 minutos, y se separó de nuevo el suero obtenido del resto de hematies. Se conservó el suero en congelador a -20 grados hasta su procesamiento.



**MOMENTO DE LA OBTENCIÓN DE SANGRE INTRACARDIACA
ANTES DEL SACRIFICIO DEL ANIMAL.**

6.2.5. TÉCNICAS DE EXPERIMENTACIÓN

6.2.5.1. TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN:

Para poder realizar la determinación cualitativa de los diferentes Ac., la primera técnica que se utilizó fué la de aglutinación, por medio del SPERMAN TEST.

Los resultados obtenidos, en todas las series fueron negativos. Puri y cols (129) obtuvieron los mismos resultados en todos sus pacientes, utilizando este método.

6.2.5.2. TÉCNICA ELISA COMERCIAL.

A la vista de los resultados anteriores, se procedió a realizar la técnica Elisa, que determina anticuerpos anti-esperma, en suero, de la clase Ig G , y que algunos autores habian utilizado para el mismo fin, con buenos resultados, Flickinger 1988 (51), Kogan 1986 (98), Pedersen (126)..

En el presente estudio, los resultados obtenidos, siguieron siendo totalmente negativos.

Procedimiento del test :

1. Se introduce con pipeta, en los correspondientes pocillos, 100 microlitros de dilución standart, suero de la rata y suero control respectivamente .
2. Se precintó la placa con cinta adhesiva y se incubó a 37°C durante hora y media.
3. Se lavaron todos los pocillos cinco veces, con buffer de lavado.

4. Se añadió a cada uno de los pocillos cien microlitros de conjugado peroxidasa, dilución 1:500.
5. Se precintaron de nuevo, con cinta adhesiva y se incubaron a 37°C durante una hora.
6. Se lavó la placa cinco veces (igual que en el apartado tres).
7. Usando una pipeta multicanal, se añadió cien microlitros de solución de sustrato fresco a cada uno de los pocillos. Se cubrió la placa y se incubó a RT durante 5-7 minutos. Usando una pipeta multicanal, se añadió cincuenta microlitros de reactivo de frenado, en todos los pocillos, en el mismo orden elegido anteriormente.

Cálculo de resultados :

Se procedió a medición de observancias con lector ELISA de placa microliter, con dos longitudes de onda (longitud de lectura 492 nm y longitud de referencias 620 nm).

Los positivos simples y standard tienen que mostrar un color anaranjado.

Se calculó la diferencia entre las densidades ópticas de los diferentes pocillos y cada estandard. En caso de doble determinación se calcula el valor medio.

Los valores se transcriben en una curva logarítmica.

6.2.5.3. TÉCNICA ELISA MODIFICADA (BENET-RUBINAT.,MARTINEZ P y cols,1991)

Mediante esta técnica conseguimos procesar , con titulaciones positivas, los sueros obtenidos en las diferentes muestras.

Todos los métodos utilizados hasta este momento, no consiguieron cuantificar dichas titulaciones.

El protocolo que se siguió en esta técnica fue el siguiente:

1. Absorción del antígeno (espermatozoides de rata) en la placa de poliestileno, 800.000 espermatozoides por pocillo.
2. Lavado con PBS-Tween 20 al 0,05 % (tres veces).
3. Bloqueo de las zonas activas remanentes,para ello se incubó con BSA 1 % en PBS- Tween 20 al 0,05 % durante una hora.
4. Lavar con PBS- Tween 20 al 0,05 % (una vez)
- 5 .Incubación con el primer Ac (suero de rata, diluido 1/ 100) durante 1,30-2 horas.
6. Nuevo lavado con PBS-Tween 20 al 0,05 %.
- 7.Incubación con el segundo Ac (goat-antirat -PO, dilución 1/ 2.000) durante 1,30-2 horas.
- 8.Lavado con PBS-Tween 20 al 0,05 %.
9. Adición del sustrato cromogénico (Substract DMAB + MBTH , en presencia de H₂ O₂) y se esperó 20 minutos.

10. Parar la reacción con H₂SO₄.

11. Lectura a 620 nm.

DMAB. Acido-3 (dimetilamino) benzoico MBTH.

MBTH. 3 metil-2 benzotiazolinoma hidrazona.



**LECTOR DE PLACAS ELISA.MODELO ANTHOS 2.000.
(FILTRO UTILIZADO , LANDA = 620 nm)**

6.2.6. METODOLOGÍA ANÁTOMO-PATOLÓGICA

Se procedió a la DESHIDRATACIÓN de ambos testículos, fijados en formol al 3,5-4 % ; con alcoholes de 60º,80º,96º, 100º durante ocho horas y Tolué I, II,III Xilol durante dos horas.

A continuación, se realizó su inclusión en PARAFINA ; para proceder a realizar los cortes adecuados, con MICROTOMO.

Después de transportar los cortes realizados a sus " portas" correspondientes, se pasó a la TINCIÓN EOSINA- HEMATOXILINA, según método habitual.

6.2.7. ESTUDIO ESTADÍSTICO.

Se realizó con el programa SPSS/ PC + 4 .0 .,en la Unidad Docente de Estadística.Facultad de Medicina. Universidad de Lleida.

El test estadístico se basó en el ANALISIS DE LA VARIANCIA (ANOVA) , PRUEBA DE SCHEFFE Y CONTRASTES A PRIORI.