

EVALUACION INMUNOLOGICA Y SU INTERPRETACION EN LAS AZOOSPERMIAS

Dr. Vázquez, José - Dra. Mazzolii, Alicia B. - Dr. Barrera, Clydes - Dra. Andreetta, Ana María - Dra. Eliosoff, Nilda

La esterilidad matrimonial o conyugal se observa en aproximadamente 15 % de las parejas, siendo el varón responsable en casi 50 % de los casos. De éstos 8-10 % son azoospermicos, definiendo como tales a aquellos en cuyo semen no hay espermatozoides.

Clasificación de las azoospermias

Si consideramos los hallazgos histológicos de las biopsias testiculares y el nivel orgánico de la afección etiológica (como lo propusieran Ting-Wa Wong, Francis H. Straus y Nancy E. Warner,^(1, 2, 3) para clasificar a la esterilidad masculina en general), y teniendo en cuenta que la biopsia testicular es el estudio más importante en la evaluación del paciente azoospermico, podría adoptarse la siguiente clasificación:

- De causa pretesticular.
- De causa testicular.
- De causa posttesticular.

Azoospermias pretesticulares

Son principalmente de origen endocrinológico extragonadal, estadísticamente las menos significativas.

Hipopituitarismo { inicio prepuberal
 { inicio pospuberal

Exceso de estrógenos { endógenos (cirrosis hepática)
 { exógenos (carcinoma de próstata)

Exceso de andrógenos { endógenos (síndrome adrenocortical)
 { exógenos (impotencia sexual)

Exceso de glucocorticoides { endógenos (síndrome de Cushing)
 { exógenos (enfermedades autoinmunes)

Hipotiroidismo severo
Diabetes mellitus

Azoospermias testiculares

Son aquellas en las cuales la lesión primaria se localiza en el testículo:

- Ausencia de epitelio germinal.
- Síndrome de Klinefelter.
- Varicocele.
- Torsión testicular bilateral.
- Criptorquidismo.
- Orquitis urliana.
- Radiaciones ionizantes.
- Anorquia congénita.
- Síndrome de Turner masculino.
- Síndrome de Reifestein.
- Otras anomalías congénitas.

Azoospermias posttesticulares

En este grupo predominan las afecciones congénitas y obstrucciones adquiridas (infecciosas, quirúrgicas). El factor común es una función gonadal normal, con obstrucción o ausencia canalicular bilateral:

Congénitas	{	ausencia de conductos deferentes y vesículas seminales
		ausencia de conductos eyeculadores y vesículas seminales
		ausencia de epidídimos
Adquiridas	{	obstrucciones testículo-epididimarias
		obstrucciones epididimarias
		infecciosas { { gonorrea { T.B.C. { inespecíficas
	{	quirúrgicas { { voluntarias { iatrogénicas
	{	traumáticas

Metodología de estudio seguida en los pacientes azoospermicos

Con la intención de lograr un diagnóstico etiológico, hemos sistematizado una metodología para el estudio de los pacientes azoospermicos, donde los distintos exámenes no son rutinarios o sistemáticos, ya que los mismos dependerán de la evaluación clínica y probable orientación diagnóstica. A continuación nos limitaremos a enumerar los procedimientos de estudio a que han sido sometidos los pacientes, ya que el desarrollo de cada uno de ellos escapa al propósito de la presente comunicación. Estos comprenden:

- Interrogatorio.
- Examen físico.
- Espermogramas.⁽⁵⁾
- Estudios rutinarios de laboratorio.
- Evaluación endocrinológica del eje hipofiso-gonadal.⁽⁸⁻⁹⁾
- Cromatina sexual y/o estudio genético.
- Biopsia testicular bilateral.⁽⁴⁾
- Exploración quirúrgica epidídimo-gonadal.
- Deferentovesiculografía.⁽⁶⁻⁷⁾

Sobre un total de setenta pacientes azoospermicos estudiados, en veinticinco casos hemos incluido en la programación diagnóstica el estudio de su perfil inmunológico atespermático. En los veinticinco pacientes que son motivo de esta comunicación hemos efectuado un diagnóstico de lesión (100 %), y en veinticuatro de ellos (96 %) logramos un diagnóstico etiológico, utilizando la metodología anteriormente enunciada.

	Nº de casos
Ausencia de vías espermáticas (11-12)	8
Agenesia de epitelio germinal (10)	5
Obstrucción epididimaria congénita	4
Obstrucción canalicular posinfecciosa	2
Obstrucción epidídimo-testicular congénita	1
Vasectomía voluntaria	1
Criptorquidia	1
Orquitis urliana	1
Varicocele	1
Causa no determinada	1

Aspecto inmunológico

El sistema inmunológico es de un complejo y delicado equilibrio. La activación de células inmunocompetentes por antígenos específicos causa dos tipos de respuestas inmunológicas, celular y humoral, las que defienden al organismo contra la invasión de virus, bacterias, parásitos, tejidos extraños, etc. Sin embargo, la respuesta inmunológica no siempre es beneficiosa, pudiendo originar respuestas adversas, como reacciones de hipersensibilidad, anafilácticas y desórdenes autoinmunes.

Es evidente que el antígeno espermático no es desconocido para el aparato inmunológico, en condiciones normales; figuras fagocíticas en epidídimo, así como bajos niveles de anticuerpos antispermáticos en individuos normozoospermicos, lo confirman. Sin embargo, un cuadro obstructivo en las vías espermáticas, de origen congénito o adquirido, plantea una situación desconocida, ya que es muy grande la cantidad de antígeno que pasa a la circulación y, por lo tanto, sería fácil así romper la tolerancia inmunológica natural dirigida hacia los propios antígenos.

En las enfermedades autoinmunes, además de la presencia del autoantígeno, existen otros factores que pueden coadyuvar favoreciendo o aumentando su respuesta, tales como las infecciones, traumatismos, obstrucción, criptorquidia, torsiones testiculares, etc.

En el caso de los pacientes azoospermicos, es imprescindible conocer si previamente hay espermatogénesis completa o no, por cuanto la presencia del espermatozoide es fundamental como factor antigénico.

En el grupo de los obstructivos es evidente que también hay que diferenciar los casos congénitos, en donde la absorción antigénica se instaló paulatinamente, de los adquiridos en los que la instalación fue más o menos brusca.

Material y métodos

De los veinticinco pacientes azoospermicos estudiados, diecinueve eran de etiología congénita. En este grupo, ocho se debían a agenesia de vías espermáticas, cinco con obstrucción epididimaria o testicular, cinco con agenesia de epitelio germinal y uno criptórquido. De los restantes pacientes, cinco eran azoospermias adquiridas, dos posinfecciosas, una vasectomía voluntaria, una orquitis urliana y una varicocele. Un paciente presentó una hipoespermatogénesis severa de etiología no determinada.

Como control se estudiaron veinticinco normozoospermicos con fertilidad comprobada, que se ofrecieron voluntariamente.

A todos los pacientes se les extrajeron dos muestras de sangre para la obtención de leucocitos circulantes y plasma sanguíneo, y una muestra de semen para aislar plasma seminal. Cada paciente concurreó con una muestra de semen de un dador de fertilidad comprobada, de la que se obtuvieron los espermatozoides móviles para ser utilizados en los diferentes tests inmunológicos.

Inmunidad celular es la inmunidad mediada por células, es decir la detección de linfocitos sensibilizados a antígenos espermáticos propios, fue determinada mediante dos técnicas:

el Test de Inhibición de Migración de Leucocitos (IML) y el Test de Inhibición de Migración de Macrófagos (IMM).⁽¹³⁻¹⁴⁾

Esquemáticamente, el IML consiste en aislar los leucocitos circulantes del paciente o del control, que puestos en cámaras de migración con antígeno o sin él, migrarán más o menos según el grado de sensibilización de las células utilizadas.

El IMM sirve para confirmar el test anterior y consiste en cultivar los leucocitos a testar con antígenos espermáticos, con el objeto de permitir la síntesis de mediadores linfocitarios (linfoquinas) por parte de los linfocitos sensibilizados. La segunda parte del test consiste en medir la presencia de esas linfoquinas en el sobrenadante del cultivo.

La cuantificación de ambos tests se realiza aplicando una fórmula matemática, cuyo resultado se expresa en : % de inhibición de migración.

Debido a la carencia de espermatozoides autólogos en el grupo de pacientes estudiados, los tests de inmunidad celular se efectuaron con dos antígenos de dos dadores homólogos diferentes.^(8, 9, 10)

De acuerdo con los resultados obtenidos con los tests de inmunidad celular en el grupo control de voluntarios normales (tabla 1), los valores de inhibición de migración se determinaron en $22,5 \pm 15,7$ para el antígeno autólogo y de $21,7 \pm 14,9$ para el antígeno homólogo, se sumaron dos desvíos estándares a las medias aritméticas, con lo que se determinó con seguridad, en base a estos resultados, qué porcentajes de inhibición superiores a 50 % fueran considerados positivos, es decir, con positiva inmunidad celular al antígeno utilizado.

Inmunidad humoral es aquella que se manifiesta mediante la presencia de inmunoglobulinas antispermáticas en el suero sanguíneo y plasma seminal de los pacientes controles.

Para estudiar la inmunidad humoral se aplicaron dos técnicas clásicas: a) Test Inmovilizante, según la técnica de Isojima y col.,⁽¹⁵⁾ que es citotóxico y fija complemento; b) Test Aglutinante de Rumke y Hellings,⁽¹⁶⁾ que no fija complemento y, por lo tanto, involucra un mecanismo inmunológico diferente al anterior. Como técnica nueva se aplicó el Test para Anticuerpos Citofílicos Antiespermáticos,⁽¹⁷⁾ que tampoco fija complemento. Estos anticuerpos tienen la propiedad de fijarse sobre la superficie de macrófagos y de allí su posible presencia patogénica en los típicos infiltrados mononucleares que caracterizan los hallazgos inmunopatológicos de las lesiones testiculares.

Los resultados obtenidos en el grupo control con los tests aglutinante e inmovilizante, mostraron un alto porcentaje de negatividades; sin embargo hubo títulos positivos en general bajos (1:4, 1:8), pero el hallazgo de unos pocos con títulos de anticuerpos inmovilizantes y aglutinantes de 1:16 nos decidieron a considerar como positivos a los valores superiores a 1:16 en suero sanguíneo, y por la misma razón a 1:8 en plasma seminal.

En cuanto a los anticuerpos citofílicos se aplicó el índice de actividad citofílica antizoide, considerándose positivos a los títulos superiores a 2,0 (valor que resultó de sumar dos desvíos estándares a la media aritmética).

TABLA 1
Tests inmunológicos en hombres normozoospermicos fértiles
(Valores normales - 25 casos)

Nº	Inmunidad celular		Inmunidad humoral					
			Citofílicos		Aglutinantes		Inmovilizantes	
	AA	AH	Suero	PS	Suero	PS	Suero	PS
1	20	20	1,5	0,3	—	NR	16	NR
2	0	32	0,3	0	—	NR	—	NR
3	40	36	0	0,3	—	NR	—	NR
4	15	0	0,1	0,3	—	NR	2	NR
5	46	24	0,8	0,9	—	—	—	—
6	24	16	0,3	0,2	—	—	—	—
7	37	28	0,6	0	—	—	—	—
8	18	20	1,7	0,4	8	—	4	8
9	8	37	0,7	0,1	—	—	4	—
10	20	10	0,3	0,2	—	—	2	2
11	0	20	1,8	1,0	2	—	—	—
12	4	0	0,7	0,6	—	—	2	2
13	10	12	1,7	0,1	—	—	4	2
14	3	8	1,2	0,3	—	—	—	—
15	23	43	0,8	0,2	—	—	16	—
16	2	35	0,3	2,0	—	—	16	4
17	29	24	1,5	0	—	—	—	—
18	42	48	1,7	0	—	—	2	1
19	32	48	0,2	0,1	16	1	—	—
20	0	0	0,4	0,8	—	—	2	1
21	29	10	0,8	0,1	—	—	4	—
22	30	40	0	0	—	—	—	—
23	20	15	0	0,5	—	—	—	—
24	20	15	1,5	0	—	8	—	—
25	27	26	0	0,7	—	—	—	—
	22,5 ± 15,7	21,8 ± 14,9	0,76 ± 0,62	0,35 ± 0,42	≤ 16	≤ 8	≤ 16	≤ 8

AA: Antígeno autólogo
 AH: Antígeno homólogo
 PS: Plasma seminal

Resultados

El grupo de pacientes azoospermicos de etiología congénita y con epitelio germinal conservado mostró los resultados que se consignan en la tabla 2. La inmunidad celular anti-espermática fue positiva en 6/13 casos (46%). Es interesante consignar que no se hallaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos con los dos antígenos homólogos utilizados, lo que descarta la intervención en este test de antígenos no específicos de órgano, como serían los antígenos de histocompatibilidad o de grupo sanguíneo.

La actividad citofílica no mostró ser importante en este grupo, ya que sólo se detectaron dos casos en suero.

Los antígenos inmovilizantes en suero se hallaron en 5/13 casos (38%), no encontrándose coincidencia con los casos positivos de inmunidad celular. Este hecho nos confirma que ambos tests miden mecanismos inmunológicos diferentes. En plasma seminal hubo 3/13 casos positivos (23%). El hecho de hallar anticuerpos inmovilizantes en plasma seminal sólo en los casos en los cuales también se encontraron en suero (y no a la inversa), nos sugiere la idea de que este tipo de anticuerpos debe sintetizarse fuera del tracto genital y que pasa a éste desde la sangre, probablemente a través de las secreciones.

Los anticuerpos aglutinantes fueron también irrelevantes en este grupo.

TABLA 2

Resultados obtenidos en pacientes azoospermicos congénitos con epitelio germinal conservado (13 casos)

Nombre	Inmunidad celular		Anticuerpos citofílicos		Anticuerpos inmovilizantes		Anticuerpos aglutinantes		Biopsia testicular
	S	PS	S	PS	S	PS	S	PS	
S	54	69	—	—	—	—	—	—	Esclerohialinosis
G	35		—	—	> 32	—	—	—	Normal
B	20		—	—	—	—	—	—	Normal
F	59	49	+	—	> 32	> 16	—	—	Hipoespermatogénesis moderada
C	1	3	—	—	—	—	> 32	—	Hipoespermatogénesis moderada
T	39		+	—	> 32	> 16	—	—	Hipoespermatogénesis moderada Hipoplasia Cél. de Leydig
S	13	89	—	—	> 32	—	—	—	
A	10	47	—	—	—	—	—	—	Normal
T	77	75	—	—	> 32	> 16	—	—	Hipoespermatogénesis
N	48	100	—	—	—	—	—	—	Normal
P	82	20	—	—	—	—	—	—	Normal
U	13	12	—	—	—	—	> 32	—	Normal
O	68	89	—	—	—	—	> 64	> 32	Esclerohialinosis
		6/13	2/13	5/13	3/13	3/13	1/13		6/12
		46 %	15 %	38 %	23 %	23 %	8 %		50 %

S: Suero

PS: Plasma seminal

Los resultados obtenidos con el pequeño grupo de etiología adquirida con espermatogénesis conservada (tabla 3), muestran una considerable frecuencia de inmunidad celular positiva, 2/5 (40 %). Los mismos pacientes mostraron anti-

cuerpos inmovilizantes en suero.

Es evidente que el caso de criptorquidia fue el que mostró un gran número de positividads en todos los tests realizados.

TABLA 3

Resultados obtenidos con pacientes azoospermicos de etiología adquirida con epitelio germinal conservado
N: 5 casos

Nombre	Etiología	Inmunidad celular		Anticuerpos citofílicos		Anticuerpos inmovilizantes		Anticuerpos aglutinantes		Biopsia testicular
		S	PS	S	PS	S	PS	S	PS	
F	Posinflamatoria	56	55	—	—	> 32	—	—	—	Hipoespermatogénesis ocasional
G	Posinflamatoria	3	4	—	—	—	—	> 32	—	Normal
N	Vasectomía volunt.	0	0	+	—	—	—	—	> 16	Normal
G	Criptorquidia	54	48	+	—	> 32	> 16	> 32	> 16	Hipoespermatogénesis severa, esclerohialinosis
C	Posinflamatoria	35		+	+	—	—	> 32	—	Esclerohialinosis, atrofia tubular
		2/5	3/5	1/5	2/5	1/5	3/5	2/5		
		40 %	60 %	20 %	40 %	20 %	60 %	40 %		

S: Suero

PS: Plasma seminal

En la tabla 4 se encuentran los datos de los cinco casos con agenesia de epitelio germinal. Inesperadamente se observa-

ron algunas positividades fundamentalmente en la inmunidad celular y en el test aglutinante.

TABLA 4
Resultados obtenidos en pacientes azoospermicos con agenesia de epitelio germinal (5 casos)

Nombre	Inmunidad celular		Anticuerpos citofílicos		Anticuerpos inmovilizantes		Anticuerpos aglutinantes		Biopsia testicular
	S	PS	S	PS	S	PS	S	PS	
T	46	35	—	—	—	—	—	> 16	Agnesia de epitelio germinal
B	71	52	—	—	—	—	> 32	> 16	Sertoli solo
O	43	20	+	+	—	—	—	—	Leydig y Sertoli maduras
M	49		—	—	—	—	> 64	> 32	Agnesia de epitelio germinal
L	81	57	+	—	—	—	—	—	Agnesia de epitelio germinal

S: Suero

PS: Plasma seminal

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo con el grupo control de varones fértiles, muestran bajos tenores de inmunidad celular en todos los casos, así como un gran porcentaje de individuos con títulos bajos de anticuerpos antiespermáticos, confirmando así los datos descritos por otros autores y que denominaron "anticuerpos antiespermáticos naturales".

De estos hallazgos surgen varios interrogantes: a) si las positividades detectadas en los pacientes azoospermicos son respuestas similares a los controles y sólo difieren en intensidad o en mayor título; b) si son diferentes mecanismos inmunológicos detectados por un mismo test; c) de qué modo puede la inmunidad antiespermática interferir en la maduración y capacitación del espermatozoide y por ende en la fertilidad.

De los resultados obtenidos en el grupo de azoospermicos de etiología congénita con espermatogénesis conservada, surge que al ofrecerse una gran cantidad de espermatozoides al aparato inmunológico, éste responde activamente en un alto porcentaje, aunque no medie injuria ni infección alguna. Esta respuesta se observó ya sea a nivel de inmunidad celular como de inmunidad humoral, a través de anticuerpos inmovilizantes séricos principalmente.

Es interesante observar que los porcentajes de autosensibilización positiva obtenida en los pacientes azoospermicos con agenesia de vías espermáticas coinciden con los datos obtenidos en pacientes vasectomizados. Esto indicaría que cualquiera sea el modo de instalación de la obstrucción canalicular y posterior absorción de espermatozoides, la respuesta inmunológica es similar. Un interrogante que aún queda por contestar es por qué hay 50 % de pacientes que a pesar de su obstrucción no se autosensibilizó.

Sin embargo el mayor interrogante surge en la interpretación de las positividades obtenidas en el pequeño grupo con agenesia de epitelio germinal, ya que se cree que este síndrome se produciría por falta de migración de los gonocitos hacia el gononefrótomo (zona embriológica donde se desarrolla el testículo), por lo tanto el paciente no debería haber tomado nunca contacto con el antígeno espermático. Este grupo de pacientes también fue chequeado con antígenos antibacterianos, y cuyo resultado fue negativo, pensando en la posibilidad de reacciones inmunológicas cruzadas. Quedaría por analizar la posibilidad de que se tratara de antígenos de histocompatibilidad, de grupo sanguíneo o de diferenciación.

La literatura médica de los últimos años se ha enriquecido con una frondosa bibliografía, que trata de encontrar una explicación dentro del campo de la inmunología, para acla-

rar el diagnóstico de un gran número de parejas que padecen esterilidad conyugal de etiología incierta.

Aunque los interrogantes con que nos encontramos en el campo de la inmunología son muy numerosos, existen hechos concretos que avalan su participación en la esterilidad matrimonial, algunos de los cuales merecen ser recordados:

- 1) La infertilidad femenina con frecuencia puede estar asociada a la presencia de anticuerpos antiespermáticos en sangre, moco cervical o secreciones vaginales, cuyos niveles titulables descienden cuando se le prescribe a la pareja coito condmatoso o tratamiento con corticoides, obteniendo como resultado una mejoría de su infertilidad.
- 2) También en varones infértiles, principalmente en oligozoospermicos, azoospermicos, con antecedentes traumáticos, inflamatorios o lesiones obstructivas del tracto seminal, mejoran su infertilidad luego del tratamiento con corticoides.
- 3) Un ejemplo de lo antedicho es la falta de relación existente entre el alto porcentaje de recanalizaciones (70-80 %) y la baja incidencia de embarazos (14-30 %) en grupos de pacientes que previamente fueron sometidos a vasectomía voluntaria y con fertilidad probada. Aquellos pacientes que no logran embarazar demostraron niveles de anticuerpos antiespermáticos mucho más elevados, comparados con los que sí embarazaron.
- 4) Personalmente intentamos recanalizar once pacientes con azoospermia obstructiva, y hasta el momento solamente hemos obtenido dos resultados exitosos concluidos. Uno de ellos fue un paciente sometido a vasectomía voluntaria, padre de cuatro hijos. Luego de la vaso-vasostomía bilateral el número de espermatozoides fue satisfactorio, pero el porcentaje de movilidad estaba francamente disminuido, asociado con altos títulos de anticuerpos inmovilizantes, aglutinantes y citofílicos.

El otro paciente, quien padeció una azoospermia obstructiva posepididimitis y espermatoocistitis, le fue efectuada una vaso-epididimostomía unilateral. La concentración de zoides posoperatoria fue normal, pero también se presentó una disminución de la movilidad, con títulos considerables de anticuerpos humorales.^(14, 15)

En síntesis consideramos que la evaluación inmunológica en pacientes infértiles no debe ser un estudio rutinario o indispensable, pero en determinadas circunstancias en que se sospeche su participación como factor de esterilidad, la determinación de anticuerpos antiespermáticos puede ayudar a establecer un diagnóstico e instituir una terapéutica adecuada.

Bibliografía

1. Wong, Ting-Wa; Straus, F. H.; Warner, N. E.: "Testicular biopsy in the study of male infertility. I: Testicular causes of infertility". Arch. Pathol., 95:151-159, 1973.
2. Wong, Ting-Wa; Straus, F. H.; Warner, N. E.: "Testicular biopsy in the study of male infertility. II: Post-testicular causes of infertility". Arch. Pathol., 95:160-164, 1973.
3. Wong, Ting-Wa; Straus, F. H.; Warner, N. E.: "Testicular biopsy in the study of male infertility. III: Pretesticular causes of infertility". Arch. Pathol., 98:1-8, 1974.
4. Girgis, Saad M.; Etriby, Anwar; Ibrahim, A. A.; Kahil, S. A.: "Testicular biopsy in azoospermia". Fert. Steril., 20:467-477, 1969.
5. Raboch, Jan; Scachová, J.: "The pH of human ejaculate". Fert. Steril., 16:252-256, 1965.
6. Paulson, D. F.; Lindsey, C. M.; Anderson, E.: "Simplified technique for vasography". Fert. Steril., 25:906-907, 1974.
7. Ford, K.; Carson, C. C.; Reed Dunnick, N.; Osborne, D.; Paulson, D. F.: "The role of seminal vesiculography in the evaluation of male infertility". Fert. Steril., 37:552-556, 1982.
8. Franchimont, P.; Millet, D.; Vendrely, E.; Letawe, J.; Legros, J. J.; Neher, A.: "Relationship between spermatogenesis and serum gonadotrophin levels in azoospermia and oligospermia". J. Clin. Endocrinol., 34:1003-1008, 1972.
9. Kretser, D. M.; Burger, H. G.; Hudson, B.: "The relationship between germinal cells and serum FSH levels in males with infertility". J. Clin. Endocr., 38:787-793, 1974.
10. del Castillo, E. B.; Trabucco, A.; de la Balze, F. A.: "Syndrome produced by absence of the germinal epithelium without impairment of the Sertoli or Leydig cells". J. Clin. Endocrinol., 7:493-502, 1947.
11. Michelson, L.: "Congenital anomalies of the ducts deferens and epididymis". J. Urol., 61:384-390, 1949.
12. Charny, C. W.; Gillenwater, Y. Jay: "Congenital absence of the vas deferens". J. Urol., 93:399-401, 1965.
13. Mazzolli, A. B.: "Demonstration *in vitro* of delayed hypersensitivity in experimental allergic orchitis in Guinea pigs". J. Reprod. Fert., 26:161, 1971.
14. Mazzolli, A. B.; Barrera, C.; Giudice, C. A.; Andreetta, A. M.; Eliossoff, N.: "Estudio inmunológico de hombres estériles". Medicina (Bs. As.), en prensa, 1983.
15. Isojima, S.; Li, T.; Ashitaka, Y.: Amer. J. Obstet. Gynec. 101:677, 1968.
16. Rumke, P.; Hellinga, G.: Amer. J. Clin. Pathol., 32:357, 1959.
17. Mazzolli, A. B.; Barrera, C.: J. Immunol. Methods, 4:31, 1974.