

L'EFECTE DEL SÈRUM ANTITESTICULAR SOBRE LA VALOR EXALTANT DE L'EXTRACTE TESTICULAR

per

F. DURAN-REYNALS

Es pot extreure un factor del teixit testicular i de l'esperma que és molt actiu en exaltar infeccions (1-3), per una banda, i en inhibir el creixement dels tumors transplantables per l'altra. L'objecte del present treball ha estat estudiar els efectes sobre aquest factor del sèrum d'animals immunitzats experimentalment per l'extracte testicular i obtenir així nous coneixements sobre la naturalesa d'aquest darrer.

MATERIAL I MÈTODES

L'extracte testicular es preparà triturant el teixit glandular amb sorra i el seu mateix volum de solució de Ringer. Després de la centrifugació es feia ús del líquid sobrenedant.

En els experiments s'utilitzà la raça nerviosa del virus vacunal com a agent infecciós. S'inoculava un conill en el testicle i cinc dies més tard s'extirpaven els

testicles i es molien en 50 cc. d'una barreja a parts iguals de glicerina i solució de Ringer. Aquesta suspensió es diluïa cinquanta vegades immediatament abans d'emprar-se.

Els antisèrums per als extractes de testicles de rata o de conill es preparaven de la manera següent. S'agafaven conills i se'ls donaven dotze injeccions intravenoses d'un extracte de testicles normals en quantitats creixents, començant per 0'2 cc. i acabant per 1'20 cc., donant-se dues vegades la mateixa quantitat, amb un interval aproximat de tres dies entre les injeccions. Deu dies després de la darrera se sagnaven els conills per obtenir el sèrum.

EFFECTE DE L'ANTISÈRUM PER L'EXTRACTE TESTICULAR DE CONILL SOBRE LA INFECCIÓ PEL VIRUS VACUNAL

Experiment. — Tres conills, 3-15, 3-16 i 3-20, eren injectats amb extracte testicular i sagnats, com s'ha descrit anteriorment. 0'5 cc. de cada sèrum es barrejaven amb 0'25 cc. de la suspensió diluïda de virus i s'incubaven durant dues hores a 37°; aleshores s'injectaven intradèrmicament a conills. Com a controls, es barrejava amb el virus sèrum normal dels conills 3-15, 3-16 i 3-20, agafat abans de la immunització, s'incubava i s'injectava intradèrmicament en els animals de prova; també s'injectava una quantitat equivalent de virus sol. L'extensió relativa de les lesions produïdes pot veure's en la taula I. A més, els tres sèrums es provaven amb extracte testicular per les precipitines segons els mètodes corrents. No es registraven reaccions en dilucions superiors a 1:1 i àdhuc a aquesta dilució els resultats eren discutibles.

TAULA I

Efecte de l'antisèrum per a l'extracte testicular de conill sobre la infecció pel virus vacunal

Sèrum N.º	Virus + sèrum pres abans de la immunització	Virus + sèrum pres enmig de la immunització	Virus + sèrum pres després de la immunització	Lesió del virus sol
3-15	+++	+	+	+++
3-16	++	+	+	+++
3-20	+++	+	+	+++

El nombre de signes + indica l'extensió de la lesió

No hi havia diferència marcada entre l'extensió de les lesions produïdes pel virus sol i pel virus amb sèrum normal, però les lesions produïdes pel virus més sèrum antitesticular eren definidament més petites. El resultat podia suggerir que el sèrum tenia propietats antivacunals, però el fet que el virus emprat havia estat cultivat en el testicle de conill i que el sèrum havia estat obtingut per immunització amb extracte de testicle de conill complica la interpretació dels resultats.

EFFECTE DE L'ANTISÈRUM PER A L'EXTRACTE TESTICULAR DE RATA SOBRE LA INFECCIÓ PEL VIRUS VACUNAL

Per a eliminar el factor complicant que s'acaba d'esmentar, es repetí la prova, substituint l'extracte de testicle de conill pel de la rata.

Experiment. — Seguint les tècniques ja descrites, s'injectà extracte de testicle de rata i es recollí el sèrum de tres conills 3-18, 3-19 i 3-22. A més, un quart conill, 8-3, fou injectat intraperitonealment amb dosis creixents del mateix extracte fins que va haver rebut 31 cc., i

aleshores se'l sagnà per a obtenir el sèrum. La presència de precipitines fou provada amb dilucions creixents del sèrum en relació a l'extracte testicular de rata a una dilució constant de 1 : 10. Les barreges, incubades durant dues hores a 37°, es llegiren després de passar tota la nit a la nevera. Els resultats es consignen en la taula II. El sèrum del conill 8-3, que havia rebut la quantitat màxima d'antigen, donà el títol més elevat. L'especificitat de la reacció quedà demostrada per proves addicionals *a*, *b*, sèrum i extracte testicular de conill, que no donaren precipitació.

TAULA II

Poder precipitant de l'antisèrum per a l'extracte testicular de rata contra l'antigen homòleg

Dilució del sèrum	1 : 1	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 100	1 : 200	Antigen sol
Sèrum N.º							
3-18	+++	++	+	+	±		
3-19	+++	+	—	—	—		
3-22	+++	++	+	±	—		
8-3	++++	+++	+++	++	++	±	—
Sèrum normal	—	—	—	—	—	—	—

El nombre de signes + indica el grau de precipitació

Els tres sèrums primers foren provats en llur influència sobre la infecció pel virus vacunal. 0'5 cc. de cada un es barrejaren amb 0'25 cc. de la suspensió diluïda de virus vacunal, s'incubaren durant dues hores i s'injectaren intradèrmicament als conills. Com a control cada conill rebé, a més, una injecció del virus sol o del virus amb sèrum normal. Els resultats d'aquest experiment, amb les dimensions relatives de les lesions, produïdes es consignen en la taula III.

TAULA III

Efecte de l'antisèrum per a l'extracte testicular de rata sobre la infecció pel virus vacunal

Sèrum N.º	Virus + sèrum pres abans de la immunització	Virus + sèrum pres enmig de la immunització	Virus + sèrum pres després de la immunització	Lesió amb el virus sol
3-18	+++	+	+++	+++
3-19	++++	++++	++++	
3-22	++	+++	+++	

El nombre de signes + indica l'extensió de la lesió

Com a prova ulterior de la influència de l'antisèrum de l'extracte testicular de rata sobre la infecció per virus, el sèrum d'un poder precipitant més acusat, el 8-3, s'injectà intradèrmicament, i una o dues hores més tard el virus vacunal s'inoculà en la mateixa àrea. La prova fou controlada per la injecció de sèrum normal, seguida de la inoculació de virus. De la mateixa manera, el virus i el sèrum 8-3 foren injectats immediatament després de barrejar-los, eliminant així el període d'incubació de l'experiment anterior. En cap d'aquestes proves no pogué notar-se cap influència sobre les dimensions de les lesions produïdes pel virus.

D'aquest grup d'experiments es dedueix que l'antisèrum per a l'extracte testicular de rata o de conill no té efectes sobre la infecció pel virus vacunal en el conill. Aquest resultat sembla indicar que l'acció inhibidora trobada en l'experiment anterior era deguda a una interacció de l'antisèrum per a l'extracte testicular de conill amb alguns compostos de l'extracte testicular que contenia el virus, no a una influència directa de l'anticòs del sèrum sobre el virus.

EFFECTE DEL SÈRUM ANTITESTICULAR SOBRE EL PODER
EXALTANT DEL EXTRACTE TESTICULAR.

El factor de l'extracte testicular responsable de l'exaltació de les infeccions no és específic, perquè extractes de teixits d'animals d'altres espècies que les infectades són tan efectius com els extractes de la mateixa espècie. L'acció dels antisèrums sobre aquest factor exaltant s'investigà a continuació.

Experiment. — A cinc tubs, contenint cada un 5 cc. d'extracte testicular de rata diluït a 1:10, s'afegiren, respectivament, 1 cc. de sèrums antiextracte testicular de les rates 3-18, 3-22, 8-3, sèrum normal de conill i solució de Ringer. Les barreges s'agitaren i s'incubaren a 37° durant quatre hores. Durant aquest temps s'havien format abundants precipitats en els tubs que contenien sèrums 3-18 i 8-3 i un precipitat menys marcat en el que contenia sèrum 3-22. Tots els tubs foren agitats una altra vegada per a suspendre els precipitats i 0'5 cc. de cada un fou barrejat amb 0'25 cc. d'emulsió de virus vacunal i s'injectà intradèrmicament en conills. Les porcions restants de les barreges es col·locaren en la nevera i s'injectaren dos dies més tard en la pell de conills.

Es feren altres proves amb la barreja d'antisèrum-antigen per a demostrar possibles diferències en l'acció del líquid i del precipitat, respectivament. En les que es feren amb sèrums 3-8 i 8-3, aquests es centrifugaren, el precipitat se separà i se suspengué en 4 cc. de solució de Ringer. Al líquid sobrenedant i a la suspensió del precipitat se'ls afegí la meitat de llur volum de suspensió de virus vacunal. S'injectaren immediatament 0'75 cc. en la pell de conills i 0'75 cc. de la porció restant després

de passar dos dies a la nevera. En cada cas el virus vacunal sol fou inoculat per control. Els resultats d'aquestes proves es presenten en la taula iv. Una idea dels resultats dels cinc experiments pot tenir-se de la fig. 1, que expressa gràficament les diferències generals observades en les barreges emprades.

L'antisèrum per a l'extracte testicular de rata no solament neutralitza el poder exaltant dels extractes testiculars de rata, sinó que les lesions produïdes per les barreges d'antisèrum-extracte-virus són sempre més petites que els controls. Amb tot, la neutralització no és una reacció estable, com pot veure's pel fet que les barreges injectades, després de dos dies d'estar a la nevera, produeixen lesions moderadament exaltades. No pogueren observar-se diferències significades entre les lesions produïdes per la barreja total, pel líquid sobrenedant i pel precipitat.

Se suggereixen immediatament dues explicacions possibles del resultat anterior. O bé hi ha una neutralització directa del factor exaltant per l'antisèrum, o el factor no és específicament afectat, sinó adsorbit pel floculat que es forma per la interacció de l'antisèrum i l'extracte testicular. Els experiments següents són un intent per a resoldre aquesta qüestió.

Experiment. — Es repetí el mateix procediment descrit anteriorment, excepte que les barreges d'antisèrum, extracte testicular i virus no s'incubaren, sinó que s'injectaren en conills immediatament després de barrejar-les. El resultat d'aquestes inoculacions es diferencià del dels experiments anteriors en què els sèrums 3-18, 3-19 i 3-22, tots comparativament dèbils en precipitines, no inhibiren el poder exaltant de l'extracte testicular. No obstant això, amb el sèrum d'un precipitat més marcat, el 8-4, hi hagué una neutralització ben clara de l'acció.

TAULA IV

Efecte de l'antisèrum per a l'extracte testicular de rata sobre les infeccions pel virus vacunal exaltat per l'extracte testicular de rata

Barreja injectada	Lesió resultant	Lesió resultant després que les barreges han estat dos dies a la nevera abans de la injecció
Antisèrum per a l'extracte testicular de rata 3-18 + extractes testicular + virus (barreja completa).....	++	+++
Antisèrum per a l'extracte testicular de rata 3-18 + extracte testicular + virus (líquid sobrenedant).....	+	+++
Antisèrum per a l'extracte testicular de rata 3-18 + extracte testicular + virus (precipitat).....	+±	+++
Antisèrum per a l'extracte testicular de rata 3-22 + extracte testicular + virus (barreja completa).....	++	+++
Antisèrum per a l'extracte testicular de rata 8-3 + extracte testicular + virus (líquid sobrenedant).....	+	
Antisèrum per a l'extracte testicular de rata 8-3 + extracte testicular + virus (precipitat).....	++	
Sèrum normal + extracte testicular + virus.....	++++++	++++++
Solució de Ringer + extracte testicular + virus.....	++++++	++++++
Solució de Ringer + virus.....	+++	++

Mentre els resultats amb els sèrums més febles suggereixen que la inactivació del factor testicular era deguda a adsorció pel floculat, el sèrum més poderós semblava inactivar directament. La floculació immediata amb aquest darrer sèrum és una possibilitat que cal tenir en compte.

PROVA DE L'ESPECIFICITAT DE L'ACCIÓ DEL SÈRUM ANTI-TESTICULAR SOBRE LES PROPIETATS EXALTANTS I DIFUSORES DE L'EXTRACTE TESTICULAR

L'experiment anterior suscità la qüestió de si el factor exaltant actua com un antigen o si els anticossos són formats contra alguna proteïna accidental. Si els sèrums formats contra l'extracte testicular d'una espècie neutralitzen el factor exaltant i difusor d'un extracte d'una altra espècie, l'anticòs seria contra el factor, ja que aquest no té especificitat d'espècie.

L'antigen usat en aquests experiments fou una fracció purificada de testicle de brau. Aquest material, obtingut en col·laboració amb Claude i Helmer per mètodes que seran descrits ulteriorment, és una pols estable, pobre en proteïnes, que conté en una forma concentrada pràcticament tot el factor exaltant i difusor present en l'extracte total de l'òrgan. Tres conills, 5-12, 5-14 i 5-17, foren injectats intravenosament amb 5 cc. d'una solució d'aquesta pols, la potència de la qual, calculada a partir del seu poder difusor, és de tres a quatre vegades la de l'extracte. Les injeccions es repetiren cinc vegades a tres dies d'interval, i vuit dies després de la darrera injecció se sagnà l'animal per a obtenir el sèrum.

El poder precipitant dels tres sèrums es provà contra la fracció purificada i l'extracte testicular total de brau,

i també contra la fracció activa de l'extracte testicular de cobai i de rata. La quantitat de sèrum fou mantinguda constant i l'antigen progressivament diluït. Els resultats es llegiren després que els tubs hagueren estat incubats a 37° durant dues hores i guardats tota la nit a la nevera. Es presentà un precipitat amb la fracció purificada i amb l'extracte testicular ordinari, amb un títol que anava d'una dilució d'1:30 pel sèrum 5-14 fins a 1:200 amb els sèrums 5-12 i 5-17. No hi havia reacció amb els extractes testiculars del cobai i de la rata i ni el sèrum normal de conill tingué cap poder precipitant per a qualsevol dels extractes.

Les primeres proves amb els sèrums així obtinguts demostraren que els antisèrums més forts neutralitzaven completament el poder exaltant per al virus de l'extracte testicular de brau, resultat similar al consignat en l'experiment anterior amb el testicle de rata. Fent ús de la mateixa tècnica, aquests dos sèrums es provaren contra els extractes testiculars de cobai i de rata. Amb tot i que els resultats no foren marcats, no hi hagué una neutralització definida del poder exaltant.

Com que el poder difusor de les partícules inertes i l'exaltació de les infeccions per l'extracte testicular semblen ésser manifestacions de l'acció del mateix factor, el primer oferia una millor prova per a l'estudi de l'acció de l'antisèrum.

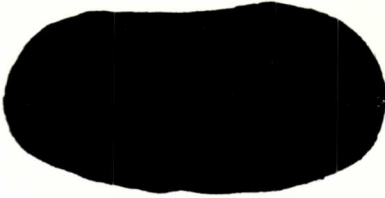
En tots els experiments d'aquest grup, s'han usat les fraccions purificades dels extractes testiculars de brau, rata i cobai amb els antisèrums 5-12, 5-14 i 5-17, formats contra la fracció purificada del testicle de brau. Les fraccions foren diluïdes amb solució de Ringer fins a un punt en què el poder difusor era aproximadament el de l'extracte fresc. Es barrejaren quantitats iguals d'antisèrum i fracció de testicle diluïda, s'incubaren

durant dues hores a 37° i es guardaren tota la nit a la nevera. Els controls mantinguts en les mateixes condicions estaven formats d'extracte amb sèrum normal i solució de Ringer. Després del període de contacte, els tubs foren ben agitats per a suspendre els precipitats. Sengles mostres, barrejades amb tinta xinesa, s'injectaren intradèrmicament en un conill. L'àrea de difusió, que podia seguir-se fàcilment en la pell afaitada, es registrà dues hores i vint-i-quatre hores després de la injecció.

Les proves preliminars assenyalaren dos punts dignes d'esment. La neutralització del poder difusor dels extractes testiculars pels antisèrums homòlegs aconseguí la màxima evidència a les dues hores, quan el control amb extracte sol donà una difusió aproximadament cinc vegades més gran que el material de prova. Les diferències encara eren pronunciades al final de les vint-i-quatre hores; però els controls en aquest moment eren solament dues o tres vegades més grans. El canvi en la proporció nasqué del fet que la barreja d'antisèrum i extracte testicular difongué a una velocitat menor, però continuà durant més temps, cosa deguda probablement a l'alliberament gradual d'una porció de la fracció activa agafada en la interacció de l'antisèrum amb l'extracte. El segon punt fou que, quan s'empraven solucions molt concentrades d'extracte testicular, no es podia veure cap acció inhibidora de l'antisèrum homòleg.

Amb el mètode descrit anteriorment es portaren a cap nou experiments per a contrastar l'acció dels antisèrums sobre els extractes testiculars homòlegs i heteròlegs. Els resultats es consignen en la taula v, en la qual l'àrea de difusió de la injecció control de tinta xinesa i solució de Ringer, es pren com a unitat i la difusió de les altres barreges s'expressa com a múltiples del control.

Virus vacunal +
extracte testicular +
solució de Ringer



10'0 × 4'8

Virus vacunal +
extracte testicular +
sèrum normal



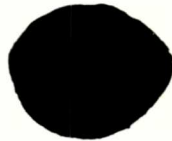
7'8 × 4'0

Virus vacunal +
extracte testicular +
sèrum antitesticular



3'9 × 3'0

Virus vacunal +
solució de Ringer



4'4 × 3'5

Efecte del sèrum antitesticular de rata sobre les lesions produïdes
pel virus vacunal + extracte testicular de rata.

TAULA V

Efecte del sèrum antiextracte testicular de brau sobre el poder difusor de l'extracte testicular

Experiment N.º	Barreges injectades							
	Extracte testicular de brau + sèrum immune	Ext. test. de brau + sèrum normal	Ext. test. de brau + solució de Ringer	Ext. test. de rata + sèrum immune	Ext. test. de rata + sèrum normal	Ext. test. de rata + solució de Ringer	Ext. test. de cobai + sèrum immune	Ext. test. de cobai + sèrum normal
1	1'2	2	2	—	—	—	—	—
2	1	2	2	—	—	—	—	—
3	1'2	—	4'5	6'5	—	2'5	—	—
4	1	—	1'8	—	—	—	—	—
5	1'5	3'5	2'5	—	—	—	—	—
6	1'3	4	—	—	—	—	—	—
7	1	3	2'5	2'5	3'5	2'5	2'5	2'5
8	1'2	2	2'3	1'5	2	—	2	2'3
9	1	3	2'5	1	1'5	1'5	1'5	1'7

Els resultats indicaren clarament que l'antisèrum per l'extracte testicular de brau neutralitza el factor difusor de l'extracte testicular de brau i té poc efecte o no en té sobre l'acció de l'extracte testicular de la rata o del cobai. Es veuran possibles excepcions en els experiments 8 i 9, però poden atribuir-se al fet que els extractes en aquests casos foren diluïts a 1:10 i 1:40, respectivament. En aquestes condicions el poder difusor normal podia estar reduït a un punt en què és difícil valorar les diferències.

PODER EXALTANT I DIFUSOR DE L'EXTRACTE TESTICULAR EN ANIMALS IMMUNITZATS PER L'EXTRACTE TESTICULAR

La neutralització in vitro de les propietats exaltants i difusores de l'extracte testicular pel sèrum antitesticular homòleg s'ha demostrat en els experiments an-

teriors. En els experiments següents es provà la possibilitat de la neutralització *in vivo*.

Aquest grup estava format de dos conills injectats intravenosament amb extracte testicular de rata, quatre conills injectats intraperitonealment amb extracte testicular de rata i tres galls que rebien l'extracte testicular intravenosament. Encara que aquests animals no donaren un alt títol amb una excepció, tots estaven sensibilitzats, com ho demostra un fenomen d'Arthus intensament positiu. Passats de vuit a vint-i-cinc dies després de la darrera injecció, els animals que havien rebut l'extracte testicular de rata foren inoculats en tres llocs en un costat amb 0'25 cc. de virus vacunal a dilucions diverses, i en l'altre costat amb les mateixes quantitats de virus amb extracte testicular de rata. Per a cada prova s'inocularen conills normals amb els mateixos materials com a controls. Els resultats demostraren que l'exaltació de la infecció per l'extracte testicular de rata era tan gran en els animals immunitzats per l'extracte testicular com en els conills de control. Proves similars fetes amb tinta xinesa demostraren igualment que el poder difusor no era afectat. Els tres conills immunitzats amb extracte testicular de gall i injectats amb virus vacunal sols presentaren lesions iguals a les de l'animal control.

És clar que la neutralització del factor testicular no té lloc *in vivo*. Això recolza la suposició que la neutralització *in vitro* per l'antisèrum homòleg de l'extracte testicular, és un fenomen indirecte lligat a la floculació de les proteïnes no específiques presents, no una veritable neutralització en el sentit immunològic del terme.

DISCUSSIÓ I SUMARI

Els experiments que consignem aquí demostren que el factor exaltant de les infeccions de l'extracte testicular és neutralitzat in vitro per un antisèrum de l'extracte testicular homòleg. Un antisèrum format contra un extracte testicular d'una espècie no influencia el factor exaltant i difusor de l'extracte testicular d'una altra espècie. Els conills immunitzats contra l'extracte testicular no exhibeixen cap alteració en l'efecte exaltant o difusor dels extractes emprats més tard, àdhuc quan l'extracte testicular emprat és de la mateixa espècie que l'emprat per a la immunització.

Si la inactivació in vitro del factor actiu és una neutralització específica, o si és el resultat de l'absorció del factor sobre el floculat format, no ha estat determinat definitivament. És probable que la neutralització no sigui directa, sinó incidental, per l'esmentada floculació.

*The Rockefeller, Institute for Medical Research.
New York.*

BIBLIOGRAFIA

1. F. Duran-Reynals, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 99, 6; 1928. *J. Exp. Med.*, 50, 327; 1929.
2. F. Duran-Reynals i J. Suñer-Pi, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 99, 1908; 1928.
3. D. C. Hoffman, *J. Exp. Med.*, 53, 43; 1931. M. Pijoan, *J. Exp. Med.*, 53, 37; 1931. P. K. Oliitsky, R. E. Knutti i J. R. Tyler, *J. Exp. Med.*, 53, 753; 1931.
4. F. Duran-Reynals, *Science*, 73, 608; 1030; *J. Exp. Med.*, 54, 493; 1931. R. Tanzer, *J. Exp. Med.*, 55, 455; 1932.
5. D. C. Hoffman, i F. Duran-Reynals, *J. Exp. Med.*, 53, 387; 1931. D. McClean, *J. Path. and Bact.*, 33, 1045; 1930.