

ANALES DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

JOSÉ LUIS GARCÍ MONTESINOS

ESTUDIO EXPERIMENTAL ELECTROFORÉ-
TICO DE LA REACCIÓN DE UHLENHUTH.
APLICACIONES MÉDICO-LEGALES



VOL. XXXVII - CURSO 1963-64
CUADERNO III-1.º - MEDICINA

INTRODUCCIÓN

Cuando sin méritos propios se pertenece a una Cátedra de tan rancio abolengo como la de Medicina Legal de la Facultad de Medicina de Valencia, regentada por el Profesor y Maestro Dr. D. Leopoldo López Gómez, puesto que no sólo es poseedor de los conocimientos de una disciplina, con docencia oficial, sino que además enseña, haciendo del discípulo no un almacén y sí un productor, obliga a los que tenemos la posibilidad de colaborar con él, a trabajar con todo nuestro esfuerzo y a no permanecer como sarmientos secos, sino como tallos vivos capaces de dar fruto. Convencido de esta necesidad surgió el motivo de realizar esta tesis doctoral.

Conocida mi idea, encontré inmediatamente eco favorable para el desarrollo de la misma. Durante los avatares surgidos en su gestación he hallado en el profesor López Gómez, sincero celo y amor al discípulo, ilustrándome, dirigiéndome y animándome para llevar a buen puerto el trabajo propuesto. Mi más sincera gratitud, pues su recia y vigorosa vocación científica es mi mejor padrino.

Desde aquí también, mi sincero reconocimiento al Profesor Gisbert Calabuig, Catedrático de Medicina Legal de Granada, por aquel entonces Profesor adjunto de la misma Disciplina en Valencia, cuya sólida preparación y capacidad de observación, servidas con un criterio de absoluta imparcialidad, tanto me han ayudado en la resolución de algunos de los escollos surgidos durante la iniciación de este trabajo.

Este trabajo ha sido para mí estímulo y no molestia, y si los resultados obtenidos son pobres es únicamente debido a la cortedad de mis conocimientos y a mi falta de facultad crítica.

Con mi trabajo pretendo aportar mi grano de arena al comprometido y extenso campo de la Medicina Legal en el problema del Diagnóstico Específico de las Manchas de Sangre, capítulo éste sobre el cual mucho y excelente se ha publicado, pero que a medida que las técnicas complementarias se perfeccionan, mueve al estudioso a intentar aplicarlas a la Medicina Legal, para ver si es posible, mejorar y facilitar la resolución de problemas fundamentales.

DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DE LAS MANCHAS DE SANGRE

ANTECEDENTES

La Mancha, como la huella, es un vestigio de primera categoría; ahora bien, mientras que en la huella lo que interesa es la forma, en la mancha interesa su naturaleza o materia de que está constituida. El diagnóstico específico de las manchas de sangre ocupa un importante capítulo en la Medicina Legal criminalística. Es cuestión amplia, que frecuentemente plantea problemas en la práctica médico legal corriente.

Dos cuestiones se plantean en presencia de una mancha que parece estar constituida por un líquido biológico: 1.º *Determinar su naturaleza*, es decir, saber si nos encontramos en presencia de una mancha de sangre, esperma, moco, etc. Esta cuestión se resuelve, por una parte, por una serie de pruebas histológicas, microquímicas o físicas, y por el descubrimiento de ciertos elementos característicos, hemoglobina, espermatozoides, células del epitelio vaginal que permitan identificar las manchas de sangre, esperma y moco vaginal. 2.º *Determinar el origen biológico*, es decir, el saber si el origen es humano o animal. Esta segunda cuestión presenta dificultades mucho más grandes.

Los primeros intentos para resolver esta segunda cuestión, en lo que respecta a las manchas de sangre, y que es el objeto de nuestro trabajo, consistieron en calentar la presunta mancha con ácido fosfórico y según el olor que se percibía pertenecería a una especie animal u otra. Posteriormente fueron utilizándose diversas técnicas que para mayor claridad clasificaremos en técnicas físicas y biológicas.

TÉCNICAS FÍSICAS

ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LOS HEMATÍES

Los glóbulos rojos son elípticos en las aves, reptiles batráceos y peces. Los mamíferos tienen los glóbulos rojos circulares, excepto los camélidos. Dentro de los redondeados y carentes de núcleo, la medición del diámetro permite diferenciar los hematíes de los distintos mamíferos. Pero en la mayoría de las peritaciones, no podemos extraer hematíes íntegros y sin deformar; por otra parte, pueden aparecer en el hombre hematíes nucleados, y la dispersión en los valores de los diámetros es demasiado pequeña de unas a otras especies, aparte las variaciones individuales en la especie humana.

MICROQUIMIA DE LA HEMOGLOBINA

La cristalización de la hemoglobina obtenida por el procedimiento de la saponina de Amantea, está todavía muy lejos de suministrar datos seguros en el campo de la aplicación médico legal, pues aparte de requerir una sangre donde no se haya iniciado la separación de la globina (muestras muy recientes) y una delicada técnica de cristalización (pues se trata de una molécula grande), precisa profundo conocimiento de interpretación cristalográfica.

ESPECTROSCOPIA DE LA CLOROHEMOGLOBINA

La especificidad de la sangre se puede manifestar también en el espectrograma. Ya Sorby, en 1876, había demostrado que los espectros de las diversas hemoglobinas no eran iguales. Vles llama de nuevo la atención sobre esta cuestión, y más tarde Barcroft comprueba que los estudios de Sorby no estaban exentos de razón. La espectroscopia de la clorohemoglobina requiere igualmente trabajar sobre sangre muy reciente e inmodificada y la valoración de las intensidades relativas de sus cuatro bandas de absorción (que es lo que permite la identificación de la especie), supone

el empleo de aparatos costosos y la posesión de una técnica depurada. Todo ello fuera del alcance del Médico Forense práctico. No obstante reconocer que este finísimo medio analítico puede ser un excelente control de la prueba biológica.

Por todo ello nos vemos obligados a emplear los métodos biológicos.

TÉCNICAS BIOLÓGICAS

A principios de siglo, los descubrimientos de Bordet permitieron a Uhlenhuth introducir en la práctica médico legal los métodos inmunológicos recurriendo a la reacción antígeno-anticuerpo. La publicación original de Uhlenhuth data de 1901 y la revisión de conjunto de 1905. Casi simultáneamente, Wassermann expuso idénticos resultados ante la Sociedad de Fisiología de Berlín.

El hecho biológico fundamental en que está basada la reacción de Uhlenhuth es la propiedad que adquiere el suero sanguíneo de un animal inyectado con un líquido albuminoso de una especie animal diferente, de precipitar las albúminas procedentes de la misma especie que proporcionó las albúminas inyectadas.

Precisa, pues, la preparación de un suero precipitante o antisuero que será el reactivo que hemos de emplear para el diagnóstico específico de la sangre de una mancha.

En 1905 Neisser y Sachs aplicaron a los fines médico legales la *reacción de desviación de complemento de Bordet y Gengou*, basada en el principio siguiente: Un animal que ha recibido inyecciones intraperitoneales de glóbulos rojos (antígeno) de otro animal, posee un suero que tiene la propiedad de hemolizar los hematíes de la misma especie que aquellos que le han sido inyectados. La propiedad nueva de este suero es debida a la presencia de dos principios: la sensibilizatriz o amboceptor y la alexina o complemento. El método de la desviación del complemento se funda en el hecho de que cuando sobreviene la reacción entre el antígeno (hematíes) y el amboceptor hemolítico (suero inmune inactivado), el complemento queda fijado. La fijación del complemento puede verificarse cuando se usa como antígeno proteínas como las que se encuentran en

los extractos de sangre de una mancha y como amboceptor el suero anti correspondiente.

Este fenómeno no es visible, y precisa para poner en evidencia esta fijación del complemento, colocar un segundo sistema antigénico incompleto, o sea, hematíes y suero hemolítico. Si el complemento quedó fijado en el primer sistema no tendrá lugar la hemólisis en el segundo (fenómeno bien visible), y por el contrario, si en el primer sistema antigénico quedó libre el complemento (por no corresponderse el antígeno y el anticuerpo), se fijará al segundo sistema y la hemólisis será evidente. En resumen, si se produce hemólisis indica que el antígeno (mancha) y el suero precipitante utilizado no se corresponden antigénicamente. Si no se ha producido hemólisis hay correspondencia antigénica entre la mancha y el suero precipitante, indicando éste la especie animal correspondiente a las albúminas que componen la mancha analizada.

También pertenecientes al grupo de las reacciones antígeno-anticuerpo (como la reacción de Uhlenhuth) es el método anafiláctico o *reacción Pfeiffer*, con la característica de practicarse no *in vitro* sino *in vivo*. El fenómeno de la anafilaxia descubierto por Richet y definido por Von Pirquet fue aplicado a la medicina legal por Pfeiffer, Uhlenhuth, Thomsen y Sleeswijk, quienes, independientemente los unos de los otros, demostraron que era posible, mediante esta reacción, el reconocimiento específico de las proteínas.

Como su nombre indica, dicha reacción está fundada en el fenómeno de la anafilaxia, y en la práctica, consiste en inyectar a un animal, el cobaya (animal reactivo de la anafilaxia), albúminas de otra especie. Después de cierto tiempo (15 a 20 días) se practica otra inyección con las albúminas cuya procedencia se quiere averiguar. Si estas albúminas pertenecen a un animal de la misma especie que aquel cuyo suero se utilizó en la primera inyección, aparecen graves accidentes anafilácticos de intensidad variable, pero en los que el fenómeno de la hipotermia es constante y característico.

La reacción de eritroaglutinación de Marx y Ehrenrooth consiste en poner en presencia del extracto de la mancha los hematíes del observador, haciendo a continuación un examen microscópico, poniendo de manifiesto la aglutinación o no de los hematíes. Esta reacción merece citarse como recordatorio histórico, ya que el fenómeno de la isoaglutinación de Landsteiner suponía un error que desvirtuaba todo el valor de la citada reacción,

aunque también hay que recordar que la modificación de Lattes utilizando hematíes del grupo O (refractarios a la isoaglutinación) devolvió en parte la validez perdida.

En 1955 Vacher, Sutton, Derobert, Moullec, Ruffie y Ducos, propusieron un nuevo método para identificación de la sangre humana: *La inhibición de la antiglobulina*. Se funda este método en la existencia, dentro del sistema Rh, de anticuerpos bloqueantes o aglutininas incompletas y que se unen a los hematíes correspondientes bloqueándolos.

El método de la inhibición de la antiglobulina humana experimentado por Wiener, aplicado al estudio de las manchas de sangre por Allison y Morton en 1953 y por Anderson en 1954, fue aplicado en medicina legal en 1955 por Vacher, Sutton, Derobert, Moullec, Ruffie y Ducos. Este método tiene como principio el que los glóbulos rojos, "sensibilizados" por contacto con un suero conteniendo anticuerpos incompletos, no se aglutinan. La adición de antiglobulina antihumana (suero antihumano obtenido inyectando al conejo la fracción globulínica del suero humano) produce la aglutinación. Ahora bien, si este suero antiglobulina ha estado en contacto con albúmina humana, al añadirlo a los hematíes recubiertos con anticuerpos incompletos, la aglutinación no se produce: la antiglobulina ha sido inhibida.

En 1956 Ducos propuso el método de la *hemoaglutinación pasiva*. Se funda en el hecho demostrado por Boyden en 1950, de que los hematíes tratados por el ácido tánico adquieren la propiedad de fijar ciertas proteínas y que los hematíes así tratados, al reaccionar con un suero antiglobulina humano, se aglutinan si la mancha estaba constituida por sangre humana.

Todos estos métodos anteriormente reseñados tienen sus ventajas e inconvenientes.

La reacción de precipitación tiene una especificidad y sensibilidad por todos reconocidas, no se altera en nada por los efectos del aire, la luz, la sequedad o el frío; la putrefacción sólo la impide cuando se han degradado totalmente las albúminas. La antigüedad tampoco altera su sensibilidad, y así Hanseman ha obtenido reacciones positivas con tejidos de momias de 4.000 años.

Frente a estas ventajas, la reacción de precipitación presenta inconvenientes: Uno de ellos es el que la lectura, bien en tubos de hemólisis o en tubos especiales de Uhlenhuth, conlleva una importante apreciación

subjetiva; otro, que en ocasiones la solución de antígeno no es limpia o el inmuosuero es ligeramente lactescente, y siendo la reacción un fenómeno de enturbiamiento y precipitación, la apreciación de la positividad resulta dificultada si la maceración es turbia, y un tercer inconveniente es que la fotografía de los tubos con las reacciones es siempre difícil, siendo necesario recurrir a artificios técnicos, cosa no fácil, salvo en laboratorios muy especializados. Finalmente, y como principal inconveniente, la especificidad de grupo, es decir, que un suero que precipita la sangre humana precipita asimismo, aunque en menor grado, la de los cuadrumanos superiores: un suero que precipita la sangre de caballo precipita también la de asno, etc.

Ahora bien, la relatividad de la especificidad del suero precipitante puede ser suplida por su sensibilidad; empleando diluciones extremas de sangre, un suero precipitante para la sangre humana proporcionará una reacción netamente positiva con la sangre humana, ligera precipitación con la de monos superiores y sólo enturbiamiento ligero con la de sangre de monos inferiores, pero con la de otros mamíferos se obtendrá una reacción negativa. Por ello deben emplearse en la práctica médico legal soluciones muy diluidas de sangre y sueros de alto poder precipitante.

A pesar de todo no puede evitarse que las albúminas de los animales más próximos en la escala zoológica, concedan resultados equívocos, y para soslayarlo se han descrito diversos métodos que enumeraremos sucintamente:

A) MÉTODO DE LA SATURACIÓN ESPECÍFICA (WEICHARTD)

El suero antihumano es saturado de suero de mono mientras precipite; cuando no precipita se centrifuga y el líquido claro se usa como suero precipitante que no es capaz de producir el error expuesto.

B) MÉTODO DE LAS PRECIPITACIONES SERIADAS (CASTELLANI)

Se pone el extracto de la mancha en contacto de suero antimonio, se centrifuga y al líquido se añade suero antihumano; con la primera precipitación se ha eliminado del extracto de la mancha todo lo que hubiera en ella de antígenos de grupo, por lo que si hay precipitación en la segunda se deberá exclusivamente a las albúminas de procedencia humana.

C) PREPARAR EL SUERO ANTIHUMANO EN EL MONO (UHLENHUTH)

Basado en que ningún animal produce anticuerpos para sus propias albúminas.

D) COMPROBACIÓN NEFELOMÉTRICA DE LA INTENSIDAD DE LA REACCIÓN (GRADWOHL)

El fundamento del método consiste en medir el grado de turbidez de la reacción de precipitación, trasformándola de cualitativa en cuantitativa. Se utiliza para ello el Fotoreflectómetro de Libby, que detecta las partículas suspendidas en la solución. La luz reflejada por dichas partículas incide sobre una célula fotoeléctrica, generando una corriente que desvía proporcionalmente la aguja del galvanómetro, de tal suerte, que si la reacción se practica con soluciones crecientes de antígeno y fijas de antisuero, la suma de las turbideces medidas fotoeléctricamente con dicho aparato nos dará el total de la reacción. Como es lógico suponer el grado de turbidez será mayor en las reacciones específicas que en las de grupo.

Finalmente, y con el fin de acrecentar la sensibilidad de la reacción de precipitación, han sido propuestos diferentes métodos, así Hanser propone el examen de la reacción en tubo capilar; Derobert y colaboradores, la ultracentrifugación destinada a aumentar la acción de la globulina responsable de la formación del precipitado; Huber, el examen microscópico del precipitado, y Szollosy y Rengei, la utilización de un enzima proteolítico para la constatación específica de la sangre.

Por todos los inconvenientes reseñados es por lo que se han buscado nuevos métodos para la identificación de la sangre humana, y de todos ellos la inhibición de la antiglobulina es a nuestro juicio el mejor, junto con la reacción de Uhlenhuth. Decimos esto porque la técnica de la inhibición de la antiglobulina es de empleo fácil, concede resultados muy precisos, reducen a nada la interpretación subjetiva y posee una segura especificidad semejante a la reacción de precipitación. Sin embargo, los reactivos necesarios sólo pueden obtenerse de un centro de transfusiones bien equipado.

PROPÓSITOS DEL PLAN DE TRABAJO

La finalidad del presente trabajo es la de averiguar si por medio de la electroforesis en papel del líquido restante, tras haber practicado la reacción de Uhlenhuth, era posible continuar diferenciando de una manera específica (valorando las alteraciones en los porcentajes de las distintas fracciones proteicas) una mancha de origen humano de una de origen animal.

Era lógico pensar que si un extracto de mancha de origen humano tratado con un inmunosuero antihumano de conejo produce una reacción de Uhlenhuth positiva, es decir, un precipitado evidente (expresión de la correspondencia antígeno-anticuerpo) y que ese mismo inmunosuero puesto en contacto con un extracto de mancha de otra especie animal daba una reacción negativa (ausencia de precipitado), la electroforesis en papel del líquido sobrenadante tras la centrifugación debería continuar mostrando, en ambos casos, una diferencia. Según esto sería posible afirmar ante una curva electroforética su procedencia humana o animal.

Al reunir bibliografía sobre el tema, se vio que Luigi-Ambrosi había publicado en *Giornale de Medicina Legale Infortunistica e Tossicologia* (Vol. III, núm. 4, Diciembre 1957), un trabajo titulado "El método electroforético en hematología Forense".

La idea base es la misma, pero la técnica seguida es completamente distinta, ya que L. Ambrosi trabaja sobre el precipitado y en el estudio presente se ha partido del líquido sobrenadante.

Este trabajo ha sido completado estudiando: 1.º *La reacción de Uhlenhuth, no en tubo de ensayo, sino en Agar*, con el fin de ver si era posible obviar algunos de los inconvenientes que la clásica reacción de Uhlenhuth conlleva, a saber:

a) Que la lectura en tubo de Hemolisis conlleva una importante apreciación subjetiva.

b) Que la solución de antígeno no es siempre limpia, y siendo la reacción un fenómeno de enturbiamiento y precipitación, la apreciación de la positividad resulta dificultada si la maceración es turbia.

c) El que el extracto de mancha hay que diluirlo de una manera bastante empírica.

2.º *Estudio inmunoelectroforético de los extractos de mancha humana*, comparándolos con los extractos de mancha de animales superiores (monos) para ver si era posible evitar la especificidad de grupo, y ver de precisar qué constituyentes de la mancha persisten y por tanto cuál es el elemento que interviene en la reacción, y qué alteraciones se producen a medida que la mancha envejece.

Los estudios inmunoelectroforéticos, cada vez más interesantes y sugestivos por el dilatado campo de posibilidades que descubren, no constituyen en España, todavía, métodos corrientes de investigación, quizá por llevar consigo, a la par de una técnica complicada, un elevado coste de los elementos necesarios para su realización.

Como se ha dicho, su técnica es delicada, requiere gran paciencia y habilidad, aparte de acertados conocimientos teóricos para su correcta interpretación.

Muchas horas han sido dedicadas a este menester, grandes los sinsabores que su aprendizaje nos ha acarreado, pero todo ello compensado con creces por la satisfacción que supone haber conseguido para Valencia las primicias de estos estudios en la Cátedra de Medicina Legal.

MARCHA EXPERIMENTAL

A) OBTENCIÓN DEL SUERO ANTIHUMANO

Si uno de los reactivos que hemos de emplear para el diagnóstico específico de la sangre de una mancha es un suero precipitante, nuestra primera tarea consistió en obtener un suero antihumano.

En la obra *Técnica Médico Legal (Criminalística)* del Profesor López Gómez se hace constar la dificultad progresiva que se ha observado en la obtención de sueros precipitantes para la práctica de la reacción de Uhlenhuth sin que a ciencia cierta pueda saberse el motivo. Para orillar esta dificultad, y con el fin de conseguir un suero de alta titulación, se han seguido las técnicas siguientes:

1.º *Técnica del Instituto de Serología de Bucarest*

Teniendo en cuenta de que no todos los animales son capaces de proporcionar un suero activo y que en el curso de las inyecciones se puede perder algún ejemplar, elegimos seis conejos machos de un peso aproximado de dos kilos. El suero humano utilizado para las inyecciones endovenosas provenía siempre de varios individuos. El ritmo de las inyecciones fue el siguiente:

- 1.ª inyección: 4 c. c. de suero.
- 2.ª inyección (a los cinco días): 4 c. c. de suero.
- 3.ª inyección (a los cinco días): inyección desensibilizante de 1 c. c. de la dilución de suero al 1/10.
- 4.ª inyección (una-dos horas después): 4 c. c. de suero.
- 5.ª inyección (a los cinco días): inyección desensibilizante de 1 c. c. de la dilución de suero al 1/10.
- 6.ª inyección (una-dos horas después): 4 c. c. de suero.

A los ocho días, sangría de prueba. Si el título precipitante es suficiente, se sangra y se recoge el suero precipitante. En caso contrario, se deja descansar al conejo dos meses, pasados los cuales se le inyecta de nuevo 1 c. c. de la dilución de suero al 1/10 y luego un c. c. de suero puro. Ocho días después, nueva sangría de prueba. Si el título no es todavía suficiente, se le inyectan 10 c. c. de suero puro previa desensibilización.

2.º *Técnica de V. Pérez Argilés y J. M.ª Bastero Beguiristain*

Se utiliza el plasma humano desecado *liófilo* y gamma globulina, siguiendo la técnica siguiente:

1.ª inyección. Inyección endovenosa de 14 c. c. de plasma humano liófilo en disolución.

2.ª inyección (cinco días después): 14 c. c. de plasma humano liófilo en disolución.

3.ª inyección (a los cinco días): si el descenso de peso del conejo no es alarmante, 14 c. c. de plasma endovenosos. En caso contrario, 14 c. c. subcutáneos.

4.ª inyección (a los cinco días): 14 c. c. de plasma humano subcutáneos y 81'25 mgr. de globulina gamma en inyección intraperitoneal.

5.ª inyección (a los cinco días): 14 c. c. de plasma humano subcutáneos y 81'25 mgr. de globulina gamma intraperitoneal.

6.ª inyección (a los cinco días): 7 c. c. de plasma humano subcutáneos y 162,5 mgr. de globulina gamma intraperitoneales.

7.ª inyección (a los cinco días): 325 mgr. de globulina-gamma intraperitoneales.

A los ocho días de la última inyección se procede a titular, y en caso de que el título sea satisfactorio, se sangra y se recoge el suero precipitante.

El plasma humano inyectado ha sido el procedente de los laboratorios Grifols y la globulina gamma de la Casa Letti (Frascos con 325 mgr. de globulina gamma extraída de sangre placentaria).

3.º *Técnica de Gradwohl*

1.º Preparar una solución de suero o plasma humano al 1/10 en suero fisiológico (5 c. c. de suero o plasma y 45 c. c. de suero fisiológico).

2.º Inyectar 2 c. c. de dicha solución endovenosos, diariamente durante seis días.

ESTUDIO EXPERIMENTAL ELECTROFORÉTICO...

- 3.º Descansar una semana.
- 4.º Dos c. c. de dicha solución intramusculares (para evitar anafilaxia).
Al día siguiente seguir con 2 c. c. endovenosos (en total, cinco inyecciones).
- 5.º Descansar una semana.
- 6.º Repetir otra serie.
- 7.º Descansar una semana.
- 8.º Sangrar y titular.
- 9.º El suero obtenido se inactiva a 56º para destruir el complemento y evitar la contaminación bacteriana.
- 10.º Añadir Mertiolato (0'1 c. c. de una solución al 10 por 100 por cada 100 c. c. de suero).
- 11.º Envasar en ampollas de 1. c. c.

Con estas tres técnicas anteriormente reseñadas hemos obtenido un antisuero con un poder precipitante que oscila entre 1/10000 y 1/30000. Los títulos más bajos corresponden a la técnica de Bucarest y los más altos a la técnica de Gradwohl.

Como es lógico hemos utilizado en nuestras experiencias el antisuero obtenido con la técnica de Gradwohl. Con la técnica de Pérez Argiles y Bastero se obtuvieron antisueros cuyo título era de 1/20000, que perfectamente podría haber sido utilizado en nuestro trabajo, pero tiene el inconveniente de su elevado coste, pues el plasma liofilizado y la globulina gamma son productos de alto coste en el mercado nacional.

B. ELECTROFORESIS EN PAPEL DE LA REACCIÓN DE UHLENHUTH

De los dos métodos que pueden ser utilizados para practicar la reacción de precipitación, técnica de la floculación y técnica del anillo, se ha utilizado la segunda, porque se requieren pequeñas cantidades tanto de extracto como de antisuero.

Para la práctica de la reacción se ha utilizado tubo de vidrio de 2 mm. de diámetro y 10 cm. de longitud, uno de cuyos extremos está cerrado a la lámpara.

Las manchas fueron maceradas en suero fisiológico durante 24 horas obteniendo una solución muy diluida, aproximadamente al 1/1000 lo cual se conoce por que, agitada fuertemente, da una espuma persistente. Como generalmente la solución no es transparente hay que centrifugar y filtrar.

En cada tubo capilar se introduce una columna de 2/3 centímetros del extracto de la mancha, utilizando una pipeta Pasteur y una columna de un

centímetro de antisuero. Si la reacción es positiva a los 5 minutos aparece una opalescencia en el punto de contacto y en algunos casos, el fenómeno del doble anillo, cuando la superposición de antígeno y anticuerpo es cuidadosa. A las 24 horas de haber mantenido los tubos a 37° se forma un precipitado en el fondo del tubo. A continuación se centrifuga con lo que dicho precipitado aumenta y el líquido sobrenadante queda transparente y limpio.

Del líquido sobrenadante y utilizando una pipeta Shandon para electroforesis, se extrae 0'01 c.c. y con ellos se practica la electroforesis.

El aparato de electroforesis usado ha sido un aparato marca Shandon que puede trabajar simultáneamente con cuba vertical y horizontal. Aunque la mayoría de nuestros electrocromatogramas han sido obtenidos con la cuba vertical (pues de todos es conocido que se consigue una separación mucho más amplia y correcta) nos hemos visto precisados, dado el gran número de pruebas realizadas, a utilizar en ocasiones la cuba horizontal lo que explica la cortedad en la separación de algunos de los electrocromatogramas.

El tampón utilizado ha sido el de veronal, veronal sódico a Ph. 8,6 (veronal sódico 10,33 gr.; veronal 1,84 gr. agua destilada 1000 c.c.). El papel utilizado ha sido el papel Wathmann n.º 1; voltaje 120 voltios; duración de la electroforesis 12 horas. Terminada la electroforesis las bandas eran secadas a 100° durante cinco minutos con el fin de fijar los componentes proteicos. La tinción de las bandas con Amidoschwartz (Colorante proteico que no necesita de un factor de corrección) según la técnica siguiente:

Solución de tinción: 0,2 gr. de colorante disueltos en 100 c.c. de Metanol con ácido acético al 10 % (90 c.c. de Metanol y 10 c.c. de ácido acético glacial).

Coloración: 1.º Las bandas son sumergidas durante 10 minutos en el colorante.

2.º Cuatro baños de metanol al 50 % con 10 % de acético hasta que queda blanco el fondo.

3.º Sumergir las bandas una vez decoloradas en agua acética al 10 % durante 10 minutos.

4.º Rápido lavado de las bandas decoloradas con agua.

5.º Secar a la estufa.

ESTUDIO EXPERIMENTAL ELECTROFORÉTICO...

La lectura de las bandas, se ha realizado por el método de Grasmann y Hannig, haciendo trasparente el papel por mezcla de aceite de parafina y Bromonaftol y fotometría subsiguiente con aparato Elphor y los valores de las extinciones llevados sobre papel milimetrado correspondiendo un milímetro de desplazamiento a una unidad de densidad óptica.

Los valores porcentuales se han obtenido por planimetría con un planímetro de compensación (OTT —Kompensations— Polarplanimeter Nr. 19 palax) ya que este método aunque engorroso parece más exacto que el determinar las áreas (proporcionales a la cantidad de proteína) por el teorema de los rectángulos, trapecios, tangentes o ecuación de Sipsom.

Realmente el problema médico legal del diagnóstico específico de la sangre no se plantea nunca con un suero sino con una mancha, pero desde un punto de vista experimental era preceptivo iniciarlo en condiciones óptimas, dado que, los extractos de mancha contienen hemoglobina que lógicamente tenía que dificultar la electroforesis y persiguiendo el diferenciar una reacción de U. positiva de una negativa, es decir, una sangre humana de una sangre de otra especie, es por lo que se ha realizado un primer ensayo con sueros diluidos al 1/1000, seguidos de otros utilizando extractos de manchas de sangre humana y animales (cerdo, toro y caballo) de distintas datas cuyos resultados se exponen a continuación:

Electroforesis, reacción de Uhlenhuth realizados con sueros al 1/1000.

SUEROS	ALBÚMINA	ALFA 1	ALFA 2	BETA	GAMMA
Humano n.º 1	59,20	4,—	5,—	9,40	22,40
Humano n.º 2	59,30	3,70	7,40	11,—	18,60
Cerdo	64,50	3,50	6,70	7,50	17,80
Toro	67,10	2,50	6,20	10,80	13,40
Caballo	68,20	2,—	7,—	7,30	15,50

JOSÉ LUIS GARCÍ MONTESINOS

Electroforesis, reacción de Uhlenhuth realizada con manchas de sangre. Data 1-5 días.

MANCHAS	ALBÚMINA	ALFA 1	ALFA 2	BETA	GAMMA
Humana n.º 1	43,35	3,94	11,33	14,28	27,10
Humana n.º 2	51,56	4,06	7,38	12,55	24,35
Humana n.º 3	52,28	4,06	7,10	10,66	26,90
Humana n.º 4	55,51	4,24	7,20	10,17	22,88
Cerdo n.º 1	57,50	3,12	6,25	8,12	25,01
Cerdo n.º 2	48,80	3,66	10,16	17,68	19,50
Toro n.º 1	52,30	3,55	8,63	10,15	25,37
Toro n.º 2	60,87	3,10	7,45	9,94	18,64
Caballo n.º 1	52,20	4,88	8,29	12,19	22,44
Caballo n.º 2	45,45	6,20	11,57	13,22	23,56

Electroforesis, reacción de Uhlenhuth realizada con manchas de sangre. Data 30 días.

MANCHAS	ALBÚMINA	ALFA 1	ALFA 2	BETA	GAMMA
Humana n.º 1	63,20	3,20	8,—	6,40	16,—
Humana n.º 2	61,30	4,70	6,60	9,40	18,—
Humana n.º 3	69,40	3,40	5,40	7,—	12,50
Humana n.º 4	67,50	4,20	7,10	6,70	14,50
Cerdo n.º 1	69,70	4,—	5,—	7,10	14,20
Cerdo n.º 2	53,10	5,70	6,30	8,60	23,50
Toro n.º 1	63,60	5,60	6,90	8,40	15,50
Toro n.º 2	59,80	2,60	6,—	10,20	21,40
Caballo n.º 1	60,50	5,60	6,10	12,90	12,90
Caballo n.º 2	61,80	6,90	8,40	9,90	13,—

ESTUDIO EXPERIMENTAL ELECTROFORÉTICO...

Electroforesis, reacción de Uhlenhuth realizada con manchas de sangre. Data 180 días.

MANCHAS	ALBÚMINA	ALFA 1	ALFA 2	BETA	GAMMA
Humana n.º 1	63,30	4,30	7,70	9,20	15,50
Humana n.º 2	61,80	5,80	9,10	10,40	12,90
Humana n.º 3	58,20	—	6,70	12,20	22,90
Humana n.º 4	53,—	—	7,50	13,60	25,90
Cerdo n.º 1	70,60	5,90	5,90	12,90	4,70
Cerdo n.º 2	71,50	6,30	7,70	10,40	4,10
Toro n.º 1	68,10	4,04	6,10	7,29	10,92
Toro n.º 2	68,50	4,50	4,50	9,—	9,80
Caballo n.º 1	68,80	7,—	6,60	9,40	8,20
Caballo n.º 2	73,50	5,—	5,40	9,—	7,10

Electroforesis, reacción de Uhlenhuth realizada con manchas de sangre. Data 360 días.

MANCHAS	ALBÚMINA	ALFA 1	ALFA 2	BETA	GAMMA
Humana n.º 1	44,—	—	9,40	23,30	23,30
Humana n.º 2	43,40	—	8,50	13,20	34,90
Humana n.º 3	46,50	—	9,20	14,60	29,70
Humana n.º 4	58,50	—	3,19	13,83	24,46
Cerdo	52,60	—	8,20	18,70	20,25
Toro	53,40	—	7,20	20,—	19,40
Caballo	51,—	—	10,90	16,30	21,80

C) REACCIÓN DE UHLENHUTH REALIZADA EN MEDIO GELIFICADO

De los dos procedimientos que pueden ser utilizados para la práctica de la reacción de precipitación en medio gelificado, sobre goma de acacia y agar se ha utilizado este último, con la diferencia de haber empleado agar tamponado (del utilizado para la inmunoelectroforesis) en lugar de agar simple al 1,5 por 100 como proponen Hartman y Toilliez.

Como soporte para la práctica de la reacción antígeno anticuerpo en medio gelificado, se han usado placas de Petri de 6 cm. de diámetro y portas de 7 por 2 cm.

El agar, tamponado y fundido al baño maría, se vierte sobre las placas de Petri hasta formar una capa de unos 3 mm. de espesor. Para los portas, se sitúan éstos en un recipiente rectangular de fondo perfectamente plano sobre los que se vierte la gelosa tamponada y fundida hasta conseguir un espesor aproximado de 1 mm.

Se deja solidificar a la temperatura ambiente, y conseguido esto, mediante un instrumento cortante (bisturí), se recorta a ras de los bordes de cada porta, y con ligero movimiento de palanca se extraen los portas sobre los cuales ha quedado adherida la lámina de agar.

Así, preparadas las placas de Petri y los portas, se colocan sobre un papel milimetrado (Muller y Fontaine) sobre el que se ha marcado un punto de referencia y otros cuatro equidistantes, 0,5 cm. Con un sacabocados se practican cinco orificios en las placas de Petri y tres en los portas, procurando realizar esta operación cuando la gelosa está perfectamente solidificada con el fin de que la extracción del pequeño tapón gelosado sea perfecta. Para esta última operación puede utilizarse la punta del bisturí o una pequeña espátula. De esta forma se consiguen reservorios de paredes perfectas, que a continuación se rellenan de la siguiente forma:

El reservorio central con antisuero y los laterales con el extracto de la mancha correspondiente (fig. 1). Dato muy importante y al que damos gran importancia es el que no es necesario utilizar el extracto de mancha a determinada concentración, como ocurre con la reacción de precipitación de Uhlenhuth, sino que cualquier concentración del extracto reacciona, si los antígenos se corresponden con los anticuerpos del antisuero correspondiente, formando arcos de precipitación específicos. Esto facilita extraordinariamente la práctica de la reacción, puesto que el preparar una dilución del extracto de mancha al 1/1000 es tarea de difícil exactitud. Conviene señalar, no obstante, que si se utilizan extractos muy concentrados los reservorios laterales quedan aureolados de una mancha circular fuertemente teñida, pero que no interfiere la interpretación de los resultados.

El relleno de los reservorios debe hacerse con pipeta Pasteur y con suma delicadeza para evitar su desbordamiento, ya que se trata de conseguir una perfecta difusión de extracto y antisuero a través de la gelosa.

Rellenados los reservorios, las placas y portas se llevan a una cámara húmeda para evitar la desecación del agar. Conviene evitar asimismo la contaminación microbiana, para lo cual se rocía la superficie con un derivado orgánico de mercurio o amonio cuaternario. En nuestra opinión este procedimiento no da buenos resultados, puesto que es muy difícil conseguir una uniforme distribución del antiséptico sobre la superficie del agar y por lo mismo no evita totalmente su contaminación, como puede apreciarse en algunas preparaciones. Por el contrario, si el antiséptico se incorpora al agar tamponado en el momento de su fusión, se evita este inconveniente.

A las 24 horas, si la reacción es positiva, aparecen arcos de precipitación simétricos que son perfectamente visibles al trasluz. No creemos necesario recargar los reservorios en el transcurso de la prueba.

A continuación se lavan las preparaciones con suero fisiológico durante dos días para eliminar el exceso de proteínas que no hubieran reaccionado, y en el caso de los extractos de manchas, eliminar los trazos de hemoglobina que orlan los reservorios laterales y que afean las preparaciones. Seguidamente, y cuando se ha realizado la reacción de precipitación en placa de Petri, se extrae el molde de agar colocándolo sobre una placa de vidrio, con lo que se evita la dificultad de la lectura, dado que el fondo de la placa es irregular. Se recubren los portas y los moldes de agar con papel de filtro Wathman de grano fino y se colocan en estufa a 37° hasta su completa desecación.

Los arcos de precipitación para su conservación indefinida pueden ser teñidos con cualquier colorante específico de proteínas (amidoschwarz, 10 B. Negro naftol beta, azocarmín o Bromofenol). En nuestras pruebas se ha utilizado el azocarmín, sumergiendo las preparaciones en una solución tampón de acetato glicerinado, en la cual se disuelven 0,5 gr. de azocarmín por litro. Tiempo de tinción, 3 horas. Se lavan con una solución de agua, ácido acético y glicerina (agua, 380 ml.; acético, 20 ml., y glicerina, 150 ml.) hasta dejar el fondo blanco. La incorporación de la glicerina a la solución de teñido y lavado permite despegar de los vidros los moldes de agar. Con el azocarmín la tinción es perfecta, pero de débil intensidad, por lo que si después se quiere fotografiar la preparación es mejor utilizar como colorante el amidoschwartz. Finalmente las placas se secan bien a la temperatura ambiente o estufa a 37° durante 24 horas.

Los líquidos problemas utilizados han sido:

En portaobjetos: Suero humano diluido al 1/20.

Extractos de mancha de animales (toro, perro, cerdo, carnero y mono).

Extractos de mancha de sangre humana con datas distintas (24 horas, 5, 10, 180, 360 y 720 días).

En placas de Petri: Suero humano diluido al 1/20.

Extractos de mancha de animales (toro, perro, cerdo, carnero y mono).

Extractos de mancha de sangre humana con datas distintas (24 horas, 5, 10, 360 y 720 días).

Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

a) Con suero diluido al 1/20: Arcos de precipitación múltiples de intensidad, decreciente a partir del reservorio del antisuero, apreciándose en los más internos un aparente relieve.

b) Con manchas de sangre de animales: No se han obtenido arcos de precipitación con los extractos de mancha de toro, perro, cerdo y carnero. Con el extracto de mancha de sangre de mono se obtienen arcos de precipitación, pero dichos arcos son de menor intensidad cromática, mayor anchura y menor nitidez.

c) Con manchas de sangre humana: Arcos de precipitación de intensidad y nitidez perfectas, tanto en las recientes como en las antiguas.

D) INMUNOELECTROFORESIS

Si para la práctica de la inmunolectroforesis es necesario el dominio de la electroforesis, en medio gelificado es lógico que primero se adquiera la técnica necesaria en este proceder.

1. *Electroforesis en medio gelificado*

1.º *Preparación del agar.* La mayor parte de las gelosas del comercio no están lo suficientemente purificadas y por ello precisa una purificación previa a su utilización. Para ello se pesan 30 gramos de gelosa comercial, a los que se añaden 400 mililitros de agua destilada neutra, se calienta al baño maría hasta su completa fusión y se vierte sobre un recipiente de fondo plano. Una vez gelificado el agar se corta en pequeños trozos que se lavan durante tres días con agua destilada, cambiándola, a ser posible, mañana y tarde. Sin embargo, existen preparados de pureza suficiente

ESTUDIO EXPERIMENTAL ELECTROFORÉTICO...

para poderlos utilizar directamente, como sucede con el agar especial (noble). N. D. 142 de la casa Difco.

Con uno u otro de estos productos se prepara una solución al 2, 5 ó 3 por 100 en agua destilada neutra; hervir 10/15 minutos al baño maría; añadir, tras haberlo enfriado a 50°, un volumen igual de solución tampón de Veronal Sódico de Ph. 8,2 y fuerza iónica 0,05. Esta solución tampón de Veronal Sódico de Ph 8,2 se prepara de la siguiente forma: Disolver 47,6 gramos de Veronal Sódico en 4,3 litros de agua destilada, añadiendo 69 mililitros de ácido clorhídrico normal. De esta forma se obtiene una solución de agar tamponado al 1,5 ó 1,25 por 100 respectivamente. Conviene filtrar varias veces a través de una gasa fina para obtener un producto de limpieza absoluta. Seguidamente se añade mertiolato al 1/10000, y el agar así obtenido se reparte en frascos, cada uno de los cuales contiene la cantidad necesaria para una experiencia.

2.º *Preparación de las placas de gelosa.* Se pueden utilizar placas de vidrio fotográfico de 13 por 18, 9 por 12, o portaobjetos, si se sigue el micrométodo Scheidegger.

Sobre las placas (lavadas con gran cuidado) se colocan algunas gotas de agar al 1 por 100, que se secan a la estufa a 80 por 100. Esta operación permite que el agar tamponado se adhiera mejor a la placa de vidrio. Sobre el fondo de una cubeta perfectamente horizontal se coloca la placa así preparada. Dos bandas de papel cromatográfico (Arches 304 ó Wathman núm. 1) para electroforesis impregnadas de tampón, se colocan en cada extremo de la placa. La extensión total de las bandas es de cuatro centímetros y su colocación se hace de la forma siguiente: 1 centímetro sobre la placa de vidrio y 3 centímetros fuera de ella.

Placa y papel se recubren de gelosa tamponada en cantidad suficiente para obtener una película con espesor de 4 milímetros. En el micrométodo el espesor de la película es de 1 milímetro.

Conviene mediante una pequeña espátula mantener sumergidas las tiras de papel, con el fin de que queden bien adheridas a la placa de vidrio.

Cuando el agar está completamente solidificado, recortarlo con un bisturí alrededor de la placa y el papel con el fin de separarlo del fondo de la cubeta.

Para que la extracción sea perfecta es imprescindible practicar dos incisiones en la gelosa, a lo largo de la línea de unión del borde de la placa

de vidrio con el papel, sin llegar a lesionar el mismo. Con un movimiento de palanca se levanta la placa de vidrio y el papel quedará plegado en ángulo recto. Finalmente, y para asegurar la continuidad del gel, se rellenan las hendiduras con gelosa tamponada fundida mediante una pipeta capilar.

En las placas así preparadas y sobre el agar, se practican uno o dos reservorios rectangulares en la parte media y perpendiculares al eje de emigración. En efecto, la gelosa no es una substancia inerte, y bajo la acción del campo eléctrico da lugar a un movimiento de electroendósmosis del líquido contenido en el gel. Así, aunque todos los elementos se desplacen hacia el polo + su posición final en el gel será la resultante de su migración electroforética en un sentido y de su transporte por electroendósmosis del líquido que embebe el gel en sentido contrario. Las substancias poco móviles se encuentran de esta forma al terminar la electroforesis en el lado opuesto respecto su posición de partida. Pero las relaciones de movilidad de los respectivos componentes permanecen inalterables. En nuestras experiencias estos reservorios se han obtenido mediante un molde de plata construido "ad hoc".

Para evitar las fugas de problema en el reservorio, se introduce una pequeña gota de agar que obture el fondo.

Las soluciones a estudiar se depositan en los reservorios después de haber sido mezcladas volumen a volumen con agar al 2,5 por 100, manteniendo la gelosa fundida a 42°. Para la electroforesis simple se utiliza el suero previamente diluido con agua destilada neutra, y para la inmunoelectroforesis, el suero puro. La cantidad de líquido a situar en los reservorios, oscila entre 0,1 y 0,3 mililitros.

3.º *Electroforesis*. Dado que el aparato utilizado para electroforesis en papel no permitía la práctica de la electroforesis simple en gelosa: a) Porque la distancia entre las cubas era excesivamente pequeña. b) Escasa su capacidad. Y c) La no tolerancia de intensidades altas por parte del rectificador, fue necesario, ante la imposibilidad de adquirir un aparato especialmente construido para este fin, improvisar el utillaje necesario. Para ello se construyeron dos cubas de plástico y un aparato rectificador de corriente que nos permitía intensidades del orden de 40 a 50 miliamperios.

Con este utillaje se dispone la operación de la siguiente forma: Las placas recubiertas de gelosa se colocan sobre los bordes de las cubas de

forma que el papel de filtro quede sumergido en la solución tamponada de veronal sódico de fuerza iónica, 0,05 que rellena las mismas. Esta solución tampón debe llenar la cuba casi hasta el borde, con el fin de minimizar la pérdida de corriente en los papeles de filtro que sirven de unión entre las cubas y el gel de las placas.

A seguido se aplica una corriente para obtener un gradiente de potencial de 5 a 6 voltios por centímetro en el interior del agar.

La duración de la electroforesis es variable, dependiendo del tamaño de las placas. Las placas de 13 por 18 requieren una electroforesis media de cuatro horas, noventa minutos las de 9 por 12 y treinta y cinco minutos para las placas sobre porta.

Es posible seguir la migración electroforética de los distintos componentes, en especial de la albúmina, durante la prueba, hasta el punto que se ve perfectamente (dada la transparencia del agar) como el reservorio en donde se ha colocado la mezcla a analizar va decolorándose paulatinamente, a la vez que una mancha amarillenta, redondeada, se desplaza hacia uno de los polos. Esto permite poder objetivar el tiempo de electroforesis terminándola cuando la separación se supone suficiente.

4.º *Fijación.* Terminada la electroforesis debe inmovilizarse en el gel los constituyentes de la mezcla separados tras su migración electroforética. Para ello las placas de gelosa desembarazadas de sus conexiones de papel de filtro, se sumergen en un baño fijador.

De los que pueden ser utilizados es el ácido acético en solución acuosa al 2 por 100, el que proporciona mejores resultados. A los pocos minutos de sumergidas las placas en la solución fijadora aparecen unas manchas blanquecinas cuya intensidad aumenta con el tiempo y que corresponden a los distintos componentes separados por electroforesis. El tiempo de fijación no debe ser inferior a tres horas, pero puede prolongarse hasta veinticuatro, sin que por ello se dificulten las operaciones sucesivas.

5.º *Desecación.* A continuación, se procede a la desecación de las placas, lo que se realiza aplicando una hoja de papel de filtro de grano fino sobre la placa y colocándolas en estufa a 37º durante 24 horas. El papel de filtro tiene como finalidad facilitar la desecación gradual del agar y evitar la aparición de grietas. Caso que tras la desecación el papel de filtro haya quedado fuertemente adherido al agar, no conviene despegarlo, ya que al colorear se desprende fácilmente.

6.º *Coloración.* De los colorantes susceptibles de ser utilizados: amidoschwartz, azul de bromofenol, azocarmín y rojo amapola, ha sido utilizado el primero.

Solución colorante:

Negroamido	1 gramo
Ácido acético, 1 M.	450 mililitros
Acetato sódico 0,1 M. (8,6 gr./l) ...	450 ”
Glicerina	100 ”

El tiempo de coloración oscila entre un mínimo de 3 a 4 horas y un máximo de 24.

Sacadas las placas del baño de tinción, se lavan con una solución acuosa de ácido acético al 2 por 100 conteniendo un 10 al 15 por 100 de glicerina hasta la completa decoloración del agar.

Finalmente, secadas las placas a 37º se procede a la separación de la membrana de gelosa de su soporte de vidrio. Esta película de gelosa desecada es de conservación prácticamente indefinida.

2. INMUNOELECTROFORESIS

El procedimiento clásico para separar los constituyentes proteicos de una solución compleja, como es el suero, consiste en agregar en determinadas condiciones de concentración y temperatura, un agente que precipite las propias proteínas separándolas de acuerdo a su solubilidad relativa. Cada una de las fracciones obtenidas se compone, sin embargo, de un número mayor o menor de proteínas diversas, tan semejantes químicamente entre sí, que ya no se pueden distinguir una de otra.

Al someter a examen electroforético una de las fracciones que ya no es posible separar, en base a la solubilidad, pueden identificarse otras fracciones en base a la velocidad con que emigran hacia un determinado electrodo; pero cada una de estas subfracciones representa todavía una mezcla de proteínas. La fracción globulínica, como todos sabemos, se divide entres subfracciones: alfa, beta y gamma. La alta especificidad con que cada anticuerpo reacciona con su sustancia complementaria, evidencia la falta de selectividad de las técnicas de fraccionamiento proteico a

nuestra disposición, ofreciendo al mismo tiempo, por lo menos teóricamente, un criterio de gran valor para la identificación de las proteínas.

Para la identificación de las diversas fracciones proteicas de una mezcla, la bioquímica cuenta hoy con un método de grandísima utilidad: *La inmunoelectroforesis*, que consiste en: Separación de las proteínas en base a su diferente movilidad electroforética y luego su definición y enumeración a expensas de la reacción específica de precipitación.

El método de la doble difusión de Ouchterlony sobre el que se basa la inmunoelectroforesis, se funda en el siguiente principio: La línea visible de precipitado que se forma sobre una plancha de agar, posteriormente a la reacción de un determinado antígeno con su anticuerpo, puede ser "identificada" siempre y cuando se dispongan tanto del antígeno como del anticuerpo purificados. El precipitado de la toxina diftérica, por ejemplo, puede ser identificado en una plancha de agar, colocando en un reservorio la toxina y en otro el anticuerpo. La difusión de ambos produce al reaccionar entre sí varios arcos de precipitación. Si se llena un tercer reservorio con toxina purificada, ésta difundirá pasivamente hasta encontrar su propio anticuerpo y reaccionará con él. El arco de precipitación que se produce coincidirá con el arco que se ha formado anteriormente en virtud de la misma reacción. Tal reacción de "identidad" permite dar un nombre a cada uno de los componentes de una mezcla. El método de Ouschterlony no permite identificar todos los antígenos de una mezcla, por lo que Grabar introdujo la inmunoelectroforesis o análisis inmunoelectroforético.

Partió Grabar de la idea de que sobre una placa de agar, la electroforesis dispondría los antígenos a lo largo de su eje de migración bajo la forma de manchas, difundiéndo los radialmente. Se practica a continuación un reservorio alargado paralelo al eje de migración electroforética separado del reservorio central que contiene la mezcla problema, a una distancia determinada. Los antígenos y los anticuerpos se difunden a través del gel y cuando ambos se encuentran en proporciones convenientes forman complejos insolubles que precipitan. Estos pares antígeno anticuerpo no precipitan como segmentos de recta, sino como arcos de elipse. Puesto que cada par reacciona y precipita independientemente de los demás, su arco se intersecta con el de los otros pares: Estos arcos cruzados indican que los respectivos reactivos son proteínas diferentes desde el punto de vista clínico inmunológico.

En resumen, para realizar una inmunolectroforesis se necesita:

- 1.º Una sustancia problema formada por varios constituyentes que queremos identificar; esta sustancia debe tener carácter antigénico o por lo menos actuar como hapteno.
- 2.º Un inmunosuero rico en anticuerpos, los cuales nos identificarán los constituyentes de la mezcla problema. Estos inmunosueros pueden ser de tres tipos: *a*), inmunosuero antihumano normal obtenido por inyección al caballo de suero y plasma humanos. Contiene una gran variedad de anticuerpos contra las proteínas del suero humano, estudiándose con él de manera global una mezcla problema. El Instituto Pasteur (36, Rue Dr. Roux, París 15) proporciona este suero en ampollas de 1 y 10 c. c.
- b*) Inmunosuero dirigido contra una proteína, es decir, que sólo y exclusivamente revela dicha proteína, por ejemplo, la seroalbúmina, la siderofilina, la B₂ macroglobulina, la gama globulina, etc.
- c*) Inmunosuero antihumano normal específicamente absorbido. Este inmunosuero revela todos los componentes de la mezcla, salvo el correspondiente al antígeno, que previamente ha sido absorbido. Si lo que se quiere poner de manifiesto son las B₂ globulinas —cuyos trazos de precipitación están frecuentemente enmascarados por los de la gamma globulinas—, será necesario poner en contacto con gamma globulina pura el inmunosuero a utilizar, con lo que desaparecerá del mismo el anticuerpo antiglobulina gamma. De tal suerte que al hacer el estudio inmunolectroforético, colocando en uno de los canales laterales el inmunosuero absorbido y en el otro el inmunosuero completo, aparecerá en la parte correspondiente al inmunosuero absorbido un arco menos, que sí aparecerá por el contrario en la parte del inmunosuero completo.

TÉCNICA

La mezcla a estudiar se coloca en el reservorio central siguiendo las mismas directrices que para la electroforesis simple. Terminada la electroforesis se retiran las placas y se separan los papeles de filtro que han servido de puente de conexión. Las placas se colocan sobre un papel milimetrado, en el que se han dibujado dos pequeñas canales que sirven de referencia, y con la ayuda de un bisturí se recortan en el agar dos reservorios paralelos al eje de migración electroforética y perpendiculares al

reservorio central. Su anchura debe ser de 4/5 mm. y su longitud casi igual a la de la placa.

Los reservorios laterales deben estar separados del central 5/8 mm. Finalmente, con una pequeña espátula se vacían.

Depositado el inmmosuero en los reservorios laterales, se colocan las placas en cámara húmeda, siendo conveniente colocar en el fondo de ellas un papel de filtro embebido de una solución de sulfato de cobre con el fin de evitar el desarrollo de mohos. Aunque se pueden mantener las cámaras a la temperatura ambiente, si se quiere acelerar la aparición de los arcos de precipitación pueden introducirse en estufa a 37°.

Con el fin de evitar la proliferación de microorganismos es conveniente, aparte de incorporar un antiséptico (mertiolato al 1 por 100), al gel, distribuir unas gotas en la superficie del mismo antes de colocar las placas en la cámara húmeda.

La aparición de precipitados específicos en el gel no es simultánea. Normalmente los primeros arcos se hacen visibles a las 24 horas y algunos tardan a desarrollarse de 5 a 7 días. Si se utiliza el micrométodo la reacción es completa a las 24 horas.

Los resultados observados pueden ser anotados, bien en forma de esquemas, bien por fotografía o bien por coloración tras el lavado y secado de la placa. Si se sigue el método de coloración, las placas se someten previamente a un lavado durante 2/3 h. con suero fisiológico, con el fin de eliminar el exceso de proteínas que no ha participado en la reacción específica. Terminado el lavado, se aplica sobre la placa un papel de filtro embebido en agua y se deseca el gel en estufa a 37°.

Si los precipitados específicos están constituidos por proteínas es evidente que podemos aumentar su visibilidad utilizando un colorante proteico; de todos ellos el azocarmín y el Rouge Ponceau son los colorantes selectivos.

Las placas se sumergen durante tres horas en una solución tampón de acetato sódico glicerinado en la cual se disuelve 0,5 gr. de azocarmín por litro. A continuación, las placas se lavan con ácido acético al 2 por 100 en solución acuosa conteniendo un 10 por 100 de glicerina. Tras el lavado, secar las placas a la estufa a 37 por 100. Finalmente, si se desea, se puede despegar la película de gelosa del vidrio.

PRINCIPIOS DE INTERPRETACIÓN DE LOS DIAGRAMAS INMUNOELECTROFORÉTICOS

El análisis de un diagrama inmunolectroforético conlleva en primer lugar el descubrir las líneas de precipitación en cada zona electroforética y el de comparar su nombre y aspecto a los dados por un suero normal de referencia.

Los estudios inmunolectroforéticos realizados sobre suero humano normal, han permitido identificar quince componentes distintos, aunque lógicamente este número debe ser mayor, puesto que es muy probable que el suero contenga otras muchas proteínas, pero en cantidad tan pequeña que no son capaces de ser detectadas por un inmunosuero por rico que éste sea.

Los sueros inmunizantes han permitido evidenciar la existencia de los siguientes componentes:

1.º *Grupo ρ (ρ)*. A este grupo corresponde una línea de precipitación fina e incurvada, más rápida que la de la albúmina, por lo que algunos autores le llaman prealbúmina. Su aparición no es constante.

2.º *La albúmina*. El arco de precipitación específico que forma la albúmina es generalmente el primero en aparecer. Es fuertemente marcado, bastante incurvado y extendiéndose ampliamente hacia las alfa globulinas a las que enmascara parcialmente. Este arco puede sufrir modificaciones.

- a) Extenderse progresivamente formando estrías.
- b) Dividirse en dos o más líneas que se unen por sus extremidades.
- c) Desaparecer por redisolución.

Todas estas modificaciones son consecuencia de un exceso de antígeno, en la mayoría de los casos, o dependen del inmunosuero utilizado, así la a) es frecuente cuando se utiliza el inmunosuero de conejo, la b) si se utiliza el de caballo.

3.º *Alfa cero globulinas (α_0)*. Se manifiesta en forma de un arco de precipitación largo y fino prácticamente incluido en el de la albúmina, pero siempre por debajo de aquél. Se le llama seromucoide ácido.

4.º *Alfa uno globulinas (α_1)*. Aunque generalmente se aprecia un solo arco neto y bastante alargado, aparecen en ocasiones otros dos arcos por debajo del primero que reciben el nombre de Alfa 1 B y Alfa 1 C.

5.º *Alfa dos globulinas (α_2)*. La zona de las alfa dos globulinas es una zona compleja en donde la numeración de las proteínas es difícil, porque

a menudo los arcos de precipitación se entrecruzan. Grabar utilizando sueros muy ricos ha podido describir hasta diez componentes. Por ello cuando se quiere estudiar las alfa dos globulinas conviene alargar la electroforesis con el fin de separar al máximo sus componentes.

De todas ellas cuatro son las más principales:

a) *La haptoglobulina*. Da un trazo de precipitación fino, pero limpio, de curvatura bastante marcada y próximo a la canal que contiene el inmunosuero. La haptoglobulina es una glico proteína que forma un complejo con la hemoglobina.

b) *La ceruloplasmina*. Es una proteína que contiene cobre descubierta por Holmberg y Laurell y que presenta una marcada actividad oxidásica. Esta proteína da un arco bastante débil situado generalmente entre el de la haptoglobulina y el de la alfa dos macroglobulina.

c) *La alfa dos macroglobulina*. Se revela por un arco de precipitación bastante denso, fuertemente incurvado y asimétrico, que aparece por debajo del de la ceruloplasmina. Esta alfa dos macroglobulina es una glico proteína y que cuantitativamente representa el 2 por 100 de las proteínas del suero.

d) *Alfa dos lipoproteína (α_2)*. Se revela por un corto arco y el más próximo al eje de migración electroforética.

Aparte de estas alfa dos globulinas citadas, existen otras muchas, pero que permanecen todavía sin identificar.

6.º *Beta 1 globulinas (β_1)*. Hay aparentemente tres beta 1 globulina importantes. La más conocida de todas es la siderofilina o transferrina descrita por Koechlin. Ella da un arco de precipitación acerca de la canal del inmunosuero. Dentro de la beta 1 globulinas hay otros dos constituyentes importantes: la beta 1 A y la beta 1 B. De movilidad casi idéntica y cuyos trazos se cruzan a menudo. Hay que señalar que para poner de manifiesto estas dos globulinas beta 1 se necesita de inmunosueros especiales.

7.º *Beta 2 globulina (β_2)*. La zona de las globulinas beta 2 encierra dos componentes fácilmente visibles y casi con seguridad otros dos, que sólo con dificultad pueden ser separados. A los dos primeros se les designa con los nombres de beta 2 A y beta 2 M. La beta 2 A globulina da un arco de precipitación bastante recto y recubierto en su mayor parte por el de la gamma globulina. La beta 2 M globulina da un arco muy débil y

siempre lejos de la canal del inmuosuero; con frecuencia presenta una doble curvatura. En ocasiones es posible descubrir entre los arcos de las beta 2 A y beta 2 M otros dos, uno de ellos bastante rectilíneo y que corresponde a la beta 2 B globulina y el otro más incurvado que corresponde a la beta 2 C globulina.

8.º *Gamma globulina* (γ). Su análisis inmunoelectroforético muestra una larga línea de precipitación que no solamente recorre toda la zona electroforética gamma, sino que penetra en la zona beta y se prolonga hasta la zona alfa 2. Numerosas comprobaciones han demostrado que la extensión de esta línea no se debe a retenciones por parte del gel, sino a la existencia de globulinas que tienen propiedades antigénicas semejantes a la de la globulina gamma, pero con movilidades diferentes.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Para su análisis dividiremos este Capítulo en tres apartados:

- A. La Electroforesis en papel y la Reacción de Uhlenhuth.
- B. La reacción de Uhlenhuth en medio gelificado.
- C. La inmunoelectroforesis y la Reacción de Uhlenhuth.

A. LA ELECTROFORESIS EN PAPEL Y LA REACCIÓN DE UHLENHUTH

Conviene recordar la idea fundamental de este trabajo, cual es el diferenciar por electroforesis en papel una reacción de Uhlenhuth positiva de una negativa. Si la reacción de Uhlenhuth positiva condiciona la formación de un precipitado debido a la correspondencia antígeno-anticuerpo y la reacción de Uhlenhuth negativa una ausencia por falta de dicha correspondencia, la electroforesis en papel del líquido, tras la centrifugación debería seguir mostrando diferencias entre una y otra.

Es lógico se objete: ¿Para qué recurrir a la electroforesis en papel (técnica lenta y compleja) si la reacción de Uhlenhuth clásica resuelve con gran margen de seguridad el problema Médico Legal del diagnóstico específico de las Manchas de Sangre?

A ello se puede contestar:

1.º Que si bien es cierto que la reacción de Uhlenhuth clásica resuelve dicho problema, no es menos cierta la inclinación del investigador iniciado en aplicar una técnica complementaria, como es la Electroforesis en papel, al estudio de las manchas de sangre, puesto que, siendo los elementos que intervienen en la reacción, extracto de mancha e inmunosuero, complejos proteicos, el estudio electroforético era perfectamente aplicable a este caso concreto.

2.º Averiguar si mediante dicho estudio electroforético y en esto radica el motivo e interés de este trabajo, era posible estudiar el mecanismo íntimo de la reacción de Uhlenhuth, y ello porque lógicamente si dicha reacción es una reacción de precipitación antígeno-anticuerpo y los anticuerpos van en la fracción globulínica del inmunosuero, el líquido restante estudiado electroforéticamente debería mostrar un déficit de globulina gamma, debido a que los anticuerpos, al unirse con los antígenos de la mancha, absorberían toda o parte de dicha globulina gamma. Por el contrario, en aquellos casos de reacción de Uhlenhuth negativa no se produciría déficit de globulina gamma y por lo tanto la curva de electroforesis daría un porcentaje de dicha globulina, muy superior al obtenido en el caso anterior. En resumen:

Reacción de Uhlenhuth electroforética positiva, déficit de globulina gamma.

Reacción de Uhlenhuth electroforética negativa, porcentaje normal de globulina gamma.

Como se decía en la parte experimental, el estudio electroforético de la reacción de Uhlenhuth ha sido practicado con sueros y con extractos de manchas de distintas datas, cuyo estudio comparativo permite llegar a las siguientes conclusiones:

1. *Reacción de Uhlenhuth electroforética realizada con sueros humanos y de animales.*
 - a) Un aumento de la albúmina en la electroforesis de sueros animales.
 - b) Una muy discreta disminución de las "alfa 1".
 - c) Valores prácticamente idénticos para las "alfa 2".
 - d) Valores dispares para las "beta".
 - e) Disminución de las "gammas".

2. *Reacción de Uhlenhuth electroforética realizada con Manchas de Sangre humana y de animales; DATA 1-5 días.*

Valores prácticamente idénticos para todos los componentes, pues las diferencias que se aprecian son a todas luces insuficientes para establecer deducción alguna. Es interesante señalar que no se producen diferencias en lo que respecta al porcentaje de las globulinas gamma, pues los valores de las manchas de sangre humana oscilan entre un máximo de 27 por 100 y un mínimo de 22 por 100, y para las de animales, entre un mínimo de 19,5 por 100 y un máximo de 25 por 100. No hay, pues, disminución apreciable en las Manchas de Sangre humana en cuanto a los porcentajes de globulina gamma se refiere.

3. *Reacción de Uhlenhuth electroforética realizada con Manchas de Sangre humana y de animales; DATA 30 días.*

Tampoco aquí es posible llegar a deducciones definitivas, puesto que los valores porcentuales son prácticamente idénticos en las manchas humanas y animales.

Solamente en el caso *Cerdo núm. 2* se aprecia un aumento evidente de la globulina "gamma" y "beta" y una disminución de "albúmina" y "alfa 1". Es de destacar que sólo este caso coincide con la teoría en lo que respecta a los valores de globulina "gamma" aumentadas con relación a las humanas.

4. *Reacción de Uhlenhuth electroforética realizada con Manchas de Sangre humana y de animales; DATA 180 días.*

- a) Se aprecia un aumento de la albúmina.
- b) Valores idénticos respecto a las "alfa 1" y "beta".
- c) Ligeramente disminución de las "alfa 2".

d) Con respecto a la globulina "gamma" los valores son extremadamente dispares; en general hay una disminución con valores extremos entre 4,1 y 10,9 para los animales, frente a 12,9 y 25,9 para las humanas.

5. *Reacción de Uhlenhuth electroforética realizada con Manchas de Sangre humana y de animales; DATA 365 días.*

- a) Disminución de las albúminas.
- b) Valores idénticos para las "alfa" y "beta".

c) Disminución de la globulina "gamma", aunque aquí las variaciones son discretas.

A la vista de los resultados expuestos, se deduce claramente que si bien es posible encontrar matices diferenciales entre una electroforesis de una Reacción de Uhlenhuth positiva procedente de una mancha de sangre humana y la electroforesis de una reacción de Uhlenhuth negativa procedente de una mancha de sangre animal, lo que no es posible es, basándose exclusivamente en una curva electroforética, poder afirmar que dicha curva proceda de una mancha humana o animal, ya que la Medicina legal exige seguridades absolutas, puesto que en multitud de ocasiones está en juego la vida de un ser humano.

Ahora bien, llama la atención, que con los resultados obtenidos no sólo no es posible esta diferenciación, sino que en algunos casos aquéllos son contrarios a lo que teóricamente debería haberse obtenido.

Ya se ha dicho anteriormente que las reacciones de Uhlenhuth positivas deben manifestarse en un proteinograma con un descenso en los valores de globulina "gamma" en relación a los obtenidos en las negativas y en los resultados anteriormente comentados, se ha obtenido todo lo contrario, es decir, que dicho descenso es más manifiesto en la reacción negativa que en la positiva. ¿Por qué este contrasentido?

La contestación puede estar en el mecanismo patogénico de dicha reacción de precipitación. En ella, la reunión de precipitina y precipitinógeno da por resultado la formación de un precipitado de tal suerte, que las emulsiones coloidales que caracterizan a los cuerpos reaccionantes, pasan del estado de sol al de gel. Si uno de los cuerpos reaccionantes se encuentra en exceso, entonces su afinidad por el agua que lo contiene predomina y el complejo formado continúa en forma dispersa.

Se concibe, pues, que debe existir una proporción adecuada entre los cuerpos reaccionantes para que la precipitación sea óptima. Ahora bien, no es forzoso que el resultado de dicha precipitación sea la total eliminación del medio de los cuerpos reaccionantes, es decir, que puede quedar algo de ellos en la solución. De ello se deduce que la precipitación se produce al máximo dentro de ciertos límites; por fuera de ellos, bien por exceso o por defecto, de los cuerpos reaccionantes, la precipitación se retarda o puede faltar en absoluto (fenómeno de zona).

Si trasladamos estos conceptos patogénicos a las experiencias realizadas, pueden deducirse varias explicaciones que aclaran la inversión de los valores obtenidos:

1.º Los extractos de mancha de sangre diluida al 1/1000, tienen forzosamente que hacerse de una forma empírica, desconociéndose, por tanto, la concentración exacta del antígeno existente en dichos extractos. Por ello la proporción de antígeno en las distintas pruebas indudablemente ha sido variable y muy posiblemente no ha llegado a obtenerse esa concentración óptima necesaria para que todo el antígeno se uniera con el anticuerpo. Al quedar probablemente un exceso de anticuerpos, estas proteínas son las que la electroforesis evidencia.

2.º Teniendo en cuenta que en la reacción de precipitación se ha utilizado la técnica del anillo, en la cual la positividad se produce en la superficie de contacto de los dos líquidos reaccionantes, y que por tanto sólo una pequeña proporción antígeno-anticuerpo es responsable de dicha positividad, es lógico suponer quedan una gran cantidad de anticuerpos sin reaccionar, y como por otra parte el antígeno se utiliza fuertemente diluido y el anticuerpo puro, las electroforesis del líquido restante tras la reacción de Uhlenhuth, no serán otra cosa que electroforesis de inmunosuero con discretas variantes. Basta comparar las curvas electroforéticas de un suero antihumano de conejo con las obtenidas en estas experiencias, para ver que son prácticamente idénticas. Se deduce por todo lo expuesto que las curvas electroforéticas procedentes de las distintas reacciones de precipitación realizada, no son en nuestro concepto más que proteinogramas de suero antihumano de conejo.

3.º Esta tercera explicación quizá sea la más simple, pero no por ello carente de grandes posibilidades de ser real. Es sencillamente que tan proteínas son las del cerdo, toro o caballo como las humanas, y dado que las manchas obtenidas proceden de animales y cadáveres normales es lógico que no se aprecien diferencias acusadas en ambos proteinogramas tras la adición del inmunosuero.

Por todo lo expuesto consideramos que la electroforesis de la reacción de precipitación no resuelve, ni mucho menos aporta luces nuevas al problema Médico Legal del diagnóstico de las manchas de sangre.

B. DE LA REACCIÓN DE UHLENHUTH EN MEDIO GELIFICADO

Los resultados obtenidos con este procedimiento han sido altamente satisfactorios, pues no sólo se obtienen bellas imágenes, sino que con él se obvian muchos de los inconvenientes que la clásica reacción de precipitación tiene, aparte de que la sensibilidad y la especificidad de este procedimiento corren parejas con la técnica clásica.

La reacción de Uhlenhuth clásica en tubo conlleva como es sabido varios inconvenientes:

1.º Los extractos de mancha deben ser transparentes, lo que obligan, si no lo son, a la centrifugación y filtración.

2.º Son necesarias soluciones muy diluidas (1/1000) con el fin de soslayar, en parte, la especificidad de grupo.

3.º Los inmunosueros han de ser de alto poder precipitante y completamente lípidos.

4.º La lectura conlleva una importante apreciación subjetiva.

5.º Es preciso recurrir a la fotografía, no siempre viable y fácil, dado que a las veinticuatro horas el anillo de precipitación se deposita en el fondo del tubo en forma de gruesos grumos.

Todos estos inconvenientes se soslayan perfectamente haciendo la reacción en medio gelificado. Su técnica, como ya se ha señalado en su momento, es sencilla; no requiere grandes conocimientos técnicos, y sus resultados son tan precisos que reducen a la nada la interpretación subjetiva, ya que en los casos positivos los arcos de precipitación aparecen con tal nitidez que no es posible dudar en su interpretación.

Desde el punto de vista de la técnica médico legal hay dos hechos muy importantes que es necesario valorar debidamente:

1.º Que no es preciso que la solución fisiológica del extracto de mancha sea transparente; extractos muy concentrados, sucios y turbios, sirven perfectamente para la reacción. No es necesario diluir dicho extracto, porque a cualquier concentración los arcos de precipitación aparecen en los casos de positividad. A estas dos ventajas cabe añadir una más, cual es el que el inmunosuero de débil título (aunque siempre no inferior a 1/10000) e incluso antiguo de fecha (en estas experiencias casi un año desde el momento de su obtención), de reacciones positivas evidentes en medio gelificado.

2.º Con este procedimiento siempre queda constancia de la reacción, lo cual es muy importante, ya que siempre puede ser exhibida como prueba de convicción en los problemas que pueda plantear un hecho jurídico concreto.

Finalmente, y compendiando todo lo expuesto, puede asegurarse que esta modalidad, o mejor dicho, modificación técnica de la clásica reacción de Uhlenhuth en tubo, participa de todas las ventajas de ésta y ninguno de sus inconvenientes.

Como ya quedó expuesto en la parte experimental de este trabajo, esta reacción ha sido practicada sobre "porta" y sobre placa de Petri, utilizando como sustancia problema suero humano al 1/20, extractos de mancha de sangre humana y extractos de mancha de sangre animal, incluido el mono. Los extractos de mancha con datas de veinticuatro horas, 5, 10, 180, 360 y 720 días, tenían como finalidad, aparte la positividad de la reacción, puntualizar si la antigüedad de la mancha influía sobre la intensidad de los arcos de precipitación y con ello tratar de fijar la data de la misma valorando dichas intensidades.

Ante los resultados obtenidos puede decirse que sea cual fuere la antigüedad de la mancha, los arcos de precipitación son de intensidad y nitidez semejantes, es decir, no es posible predecir la data de una mancha por el solo estudio del arco. Que los extractos de mancha de sangre de mono dan igualmente arcos de precipitación, si bien su intensidad es menor, su nitidez disminuida e incluso los bordes de los arcos aparecen difuminados.

C. LA INMUNOELECTROFORESIS Y LA REACCIÓN DE UHLENHUTH

Muy breve va a ser el comentario a la primera parte de este apartado, porque en realidad nada tiene que ver con la idea de este trabajo, pero dada la necesidad de adquirir experiencia en la electroforesis simple en agar como paso previo a la inmunolectroforesis, y dado también que en Valencia es la primera vez que se pone en práctica esta técnica, es por lo que se ofrece una serie de dichas electroforesis simples en agar, en las que cabe destacar, aparte de su belleza, que no debe ser valorada en Medicina, los siguientes extremos:

- a) Su técnica es tan sencilla como la de la electroforesis en papel.
- b) Utilizando placas de 13 por 18 es posible practicar tres electroforesis simultáneas.

ESTUDIO EXPERIMENTAL ELECTROFORÉTICO...

c) Una de las limitaciones de la determinación de las seroproteínas en papel es la absorción de las proteínas sobre el soporte de papel, lo que no permite una separación perfecta de las diversas fracciones, porque en el intervalo entre las mismas queda siempre una pequeña cantidad de proteína que parece estar constituida por albúmina, la cual se fija sobre el papel durante la separación, amén de otros inconvenientes como la estructura reticular del papel y la anisotropía del medio que condicionan que el curso de las partículas proteicas sea tortuoso, en especial la albúmina. El uso del agar como soporte evita esos inconvenientes.

d) Basándose en esta separación perfecta de las distintas fracciones es posible, en multitud de ocasiones, obtener un número superior de fracciones a las cuatro clásicas que la electroforesis en papel obtiene.

Con el estudio inmunolectroforético de las manchas de sangre animal y humana, se han obtenido los siguientes resultados:

1.º La ausencia de arcos de precipitación en aquellas inmunolectroforesis en las que se ha utilizado como sustancia problema extractos de mancha de distintos animales, exceptuando los extractos de manchas de sangre de mono que en virtud de la especificidad de grupo continúan dando arcos de precipitación de situación y aspecto superponibles a los que dan las manchas de origen humano, debido a que la inmunolectroforesis no es más que una reacción de precipitación en la que el antígeno (extracto de mancha) es desdoblado mediante una corriente eléctrica en sus distintos componentes proteicos, que son revelados por el inmunosuero anti correspondiente.

De ello se deduce que el estudio inmunolectroforético de las manchas de sangre de mono no permite eliminar la especificidad de grupo.

2.º En cuanto a las manchas de sangre humana se refiere, los hechos observados son:

A) *Manchas de sangre humana. Data 1/5 días.*

Arco de precipitación intenso, neto y bien delimitado, correspondiente a la albúmina, y otros dos correspondiendo uno a la "alfa 2" y el otro a la "beta 1".

B) *Manchas de sangre humana. Data 10 días.*

Sólo se aprecian arcos de precipitación en la zona albumínica, intensos, netos y bien delimitados.

C) *Manchas de sangre humana. Datas 30, 180 y 360 días.*

A medida que la antigüedad de la mancha aumenta, la intensidad y nitidez de los arcos disminuye hasta tal punto que más que arcos se observan franjas o zonas de precipitación, pero siempre en la zona de las albúminas.

Estos resultados se prestan al siguiente comentario:

1.º Que una mancha de sangre humana, de no ser muy reciente, lo único que persiste es la albúmina y que los arcos de precipitación correspondientes a la misma van decreciendo en intensidad y nitidez a medida que la mancha envejece. Ahora bien, cabe preguntarse el por qué en una mancha no reciente sólo la albúmina es detectable.

Ello pudiera ser debido a dos causas:

a) Que con el envejecimiento, las fracciones globulínicas de la mancha sufren un proceso de descaracterización que las haga indetectables frente al suero antihumano.

b) Que aun existiendo las fracciones globulínicas, bien sea por estar en escasa cantidad, o por falta de poder precipitante del anticuerpo, dichas fracciones quedan sin manifestarse.

De estos hechos parece más aceptable el de que con el transcurso del tiempo la fracción globulínica desaparece y solamente la albúmina persiste.

CONCLUSIONES

1.^a Que el método de los sueros precipitantes (reacción de Uhlenhuth) continúa teniendo en el diagnóstico específico de las Manchas de Sangre un valor preponderante.

2.^a Que el estudio electroforético de la reacción de precipitación no aporta ventaja alguna sobre los métodos hasta ahora conocidos.

3.^a Que la reacción de Uhlenhuth, practicada en medio gelificado, es un método sencillo, seguro y específico que, conservando todas las ventajas del clásico método, orilla todos sus inconvenientes.

4.^a Que la reacción de Uhlenhuth en medio gelificado no es utilizable para determinar la data de una mancha de sangre.

5.^a Que la inmunoelectroforesis de las manchas de sangre revela que en las manchas recientes los arcos de precipitación obtenidos corresponden a la albúmina, "alfa 2" y "beta 1".

6.^a Que a medida que la mancha envejece, la fracción globulínica desaparece, persistiendo solamente la albúmina.

7.^a Que en todas nuestras experiencias no ha sido posible soslayar el problema de que las albúminas de los animales más próximos en la escala zoológica (monos superiores) conceden resultados equívocos (especificidad de grupo).

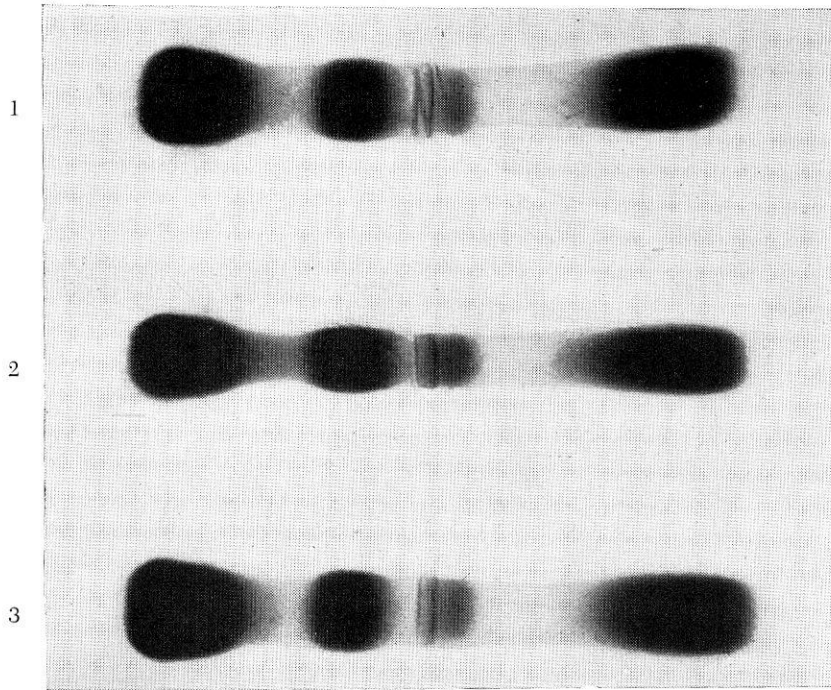
BIBLIOGRAFÍA

- DELL-ERBA Y AMBROSI: *Contributo a la Diagnosi Individuale de Sangue mediante Electroforesi su carta*. Ed. Vedova Tricio, 1955, Bari.
- GRABAR Y BURTIN: *Analyse Immuno-Electrophorétique*. Ed. Masson, 1960. París.
- GRAS: *Proteínas Plasmáticas*. Ed. Jims. 1956. Barcelona.
- GRADWOHL: *Legal Medicine*. Ed. Mosby. 1954, St. Louis.
- LÓPEZ GÓMEZ: *Técnica Médico Legal*. Ed. Saber. 1953. Valencia.
- LÓPEZ GÓMEZ y GISBERT CALABUIG: *Tratado de Medicina Legal*. Tomo I. Ed. Saber. 1962. Valencia.
- SANCHIS BAYARRI: *Elementos de Inmunidad*. Ed. Saber. 1948. Valencia.
- TOPLEY: *Bacteriología e Inmunidad*. Ed. Salvat. 1949. Barcelona.
- UHLNHUTH: *Des Biologische Eiweis Differenzierungsverfahren zur Erkennung*. Ed. G. Fischer. 1905. Iena.
- WIEME: *Studies on agar gel electrophoresis Techniques Applications*. Ed. Arscia Uitva-gen. 1955. Bruxelles.
- WUNDERLY: *Electroforesis en papel*. Ed. Científico Médica. 1956. Barcelona.
- ALLISON y MORTON: *J. Clin Path.* 6, 314, 1953.
- AMBROSI: *Gionale di Medicina Legale Infortunistica é Tossicologia*, III, núm. 2, 45, 1957, y III, núm. 4, 203, 1957.
- ANDERSON: *Aun. J. Clin. Path.* 24, 920, 1954.
- BLANC: *Path. Biol.* 8, 33, 1960.
- GAGLI y MARCHI: *Progreso Médico*. 12. N. 17, 537, 1956.
- GOURCON y URIEL: *An. Bio. Clin.* 3-4, 1958.
- DEROBERT, BRETON y PONY: *An. M. Legal.* 1, 3, 1952 y 2, 83, 1952.
- DEROBERT, VACHER y GIACCONE: *An. M. Legal.* 3, 162, 1957.
- FINE: *Ann. Inst. Pasteur.* 93. N. 5, 582, 1957.
- FONTAINE y MULLER: *Acta Medicinæ Legalis et Socialis*.
- GRABAR: *Bull. Soc. Chim. Biol.* V. 37, 165, 1955.
- GRABAR: *Inst. Arch. Allergy.* V. 7, 103, 1955.
- GRABAR: *J. Immunology.* V. 74, 397, 1955.
- GRABAR: *Bull. Soc. Chim. Biol.* V. 39, 45, 1957.
- GRABAR y WILLIAMS: *Biochim. Biophys. Acta* 10, 193, 1953.
- GRABAR y WILLIAMS: *Biochim. Biophys. Acta* 17, 67, 1955.
- HARTMAN y TOILLEZ: *Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol.* V. 2, 197, 1957.
- HANSER: *Deutsche Z. Gerichtl. Med.* 31, 229, 1939.
- KAMINSKI: *J. Immunol.* 75, 377, 1955.
- KAYSSI: *J. Crimin. Law.* 40, 4, 1949.
- MULLER: *Ann. Med. Legale.* 384, 1950.
- MULLER, MICHAUX, FONTAINE y DEREU: *Ann. Med. Legale.* 384, 1950.

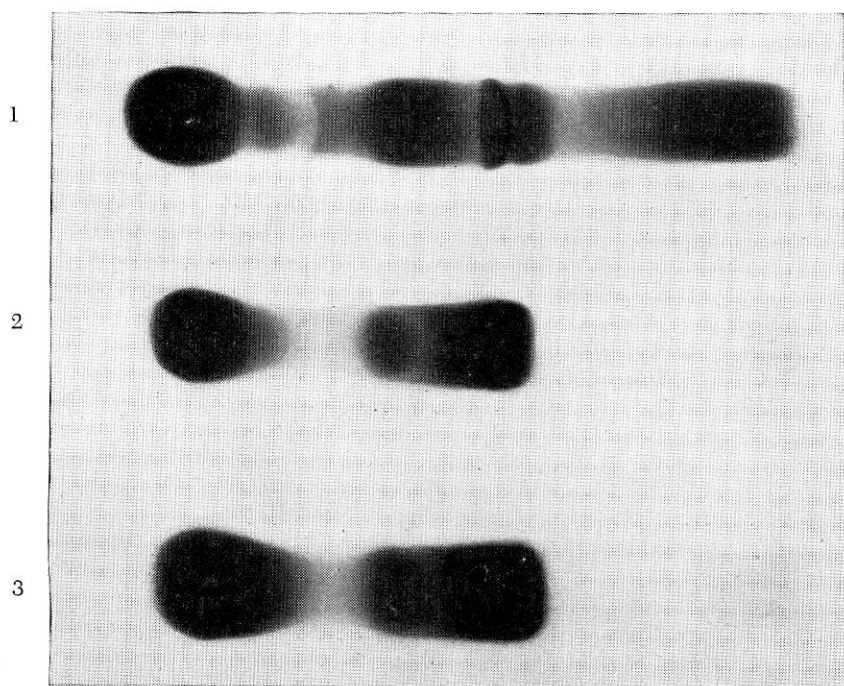
JOSÉ LUIS GARCÍ MONTESINOS

- LOUDIN: *Ann. Inst. Pasteur.* 5, 531, 1955.
OUCHTERLONY: *Anting-Antibody Reaction in gels.* Arkiv. Kemi. Mineralogi och geologi, 26 B, 14, 1949.
PÉREZ ARGILES y BASTERO BEGUIRISTAIN: *Modificación de la técnica de preparación de los sueros precipitantes.* Separata homenaje Profesor López Gómez.
RUFFIE y DUCOS: *Ann. Med. Leg.* 1, 17, 1956.
SCHEIDEGGER: *Revue Française D'Études Cliniques et Biologiques.* 7, 9, 895, 1957.
SCHEIDEGGER: *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1, 45, 1947.
SZOLLOSY y RENGLEI: *Naturwissenschaften.* 5, 175, 1959.
UHLENHUTH: *Deutsche Z. Ferichtl. Med.* 39, 309, 1948.
URIEL: *Bull. Soc. Chim. Biol.* 40, 105, 1958.
URIEL: *Clin. Chim. Acta.* 3, 234, 1958.
URIEL y GRABAR: *Ann. Inst. Pasteur.* 90, 427, 1956.
VACHER, SUTTON, DEROBERT y MOULLEC: *Ann. Med. Legal.* 1, 29, 1955.
VLES: *Arch. Phys. Biol.* 1922.
WADSWORTH-HANSON: *Int. Archs. Allergy,* 17, 166, 1960.
WIENER, HYMAN y HARDMAN: *Proc. Soc. Biol.* 3, 162, 1957.
WASSERMANN: *Berliner, Clin. Woch.* 11-2-1901.

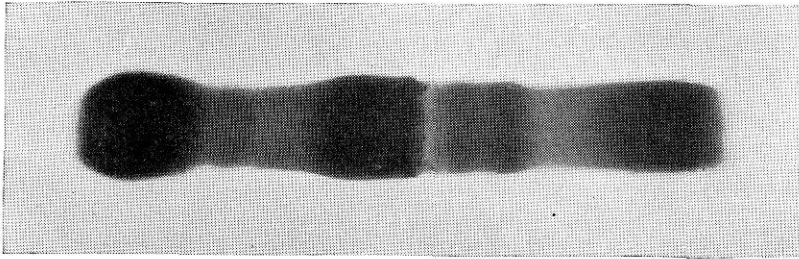
PROTOCOLLO EXPERIMENTAL



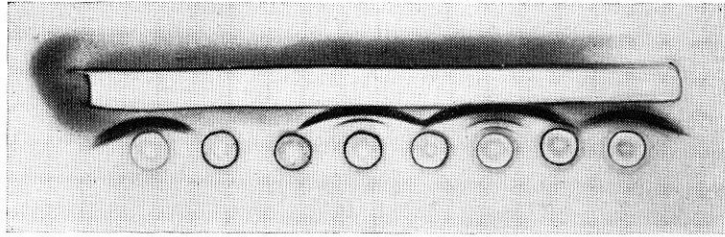
Fotografía de tres electroforesis simples en gelosa. (Placa 13 × 18.) 1-2-3. Sueros humanos normales



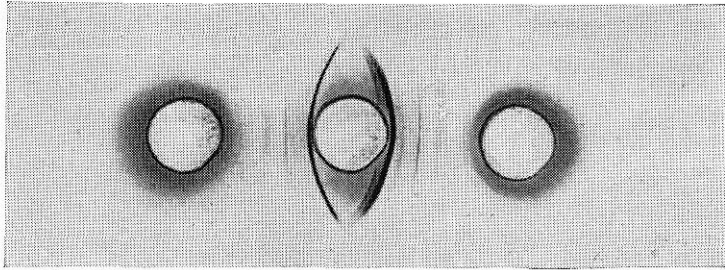
Fotografía de tres electroforesis simples en gelosa. (Placa 13 × 18.) 1, Suero humano normal; 2 y 3, suero humano mieloma "Beta"



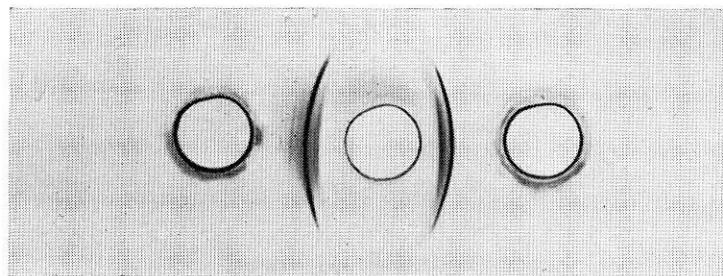
Fotografía de una electroforesis simple en agar realizada sobre vidrio lector "Elphor"



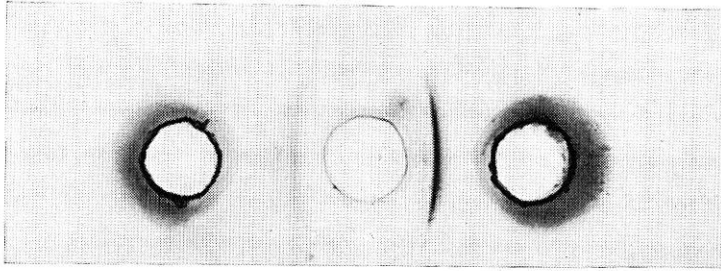
Reacción de U. en medio gelificado. Soporte: Vidrio lector "Elphor". Canal: Suero antihumano de conejo. Reservorio 1.—Exto. mancha sangre humana, data 24 horas. Reservorio 2.—Exto. mancha sangre toro. Reservorio 3.—Exto. mancha sangre perro. Reservorio 4.—Exto. mancha sangre humana, data 2 años. Reservorio 5.—Exto. mancha sangre cerdo. Reservorio 6.—Suero humano. Reservorio 7.—Exto. mancha sangre carnero. Reservorio 8.—Exto. mancha sangre mono. Arcos precipitación en 1-4-6 y 8. Obsérvese que no hay diferencia en cuanto a la intensidad de dichos arcos de precipitación



Reacción de precipitación en medio gelificado. Soporte
"Portaobjetos". Suero humano diluido al 1/20



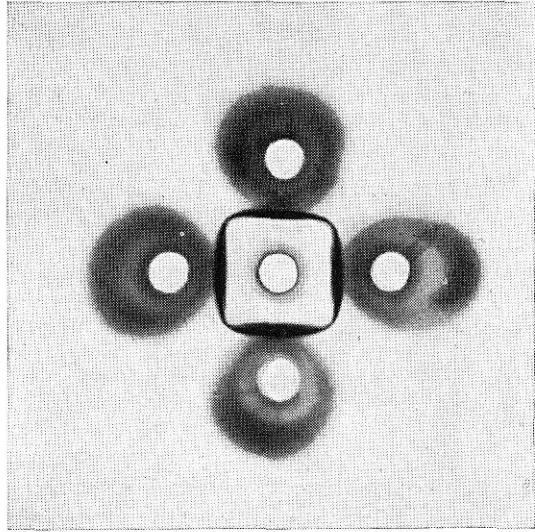
Reacción de precipitación en medio gelificado. Soporte
"Portaobjetos". Extracto de mancha de sangre humana.
Data 24 horas



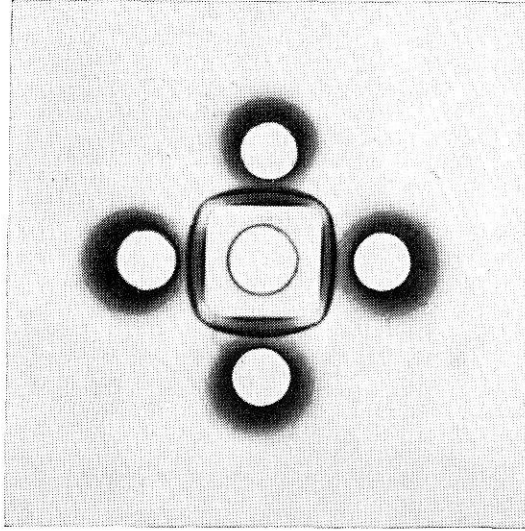
1

2

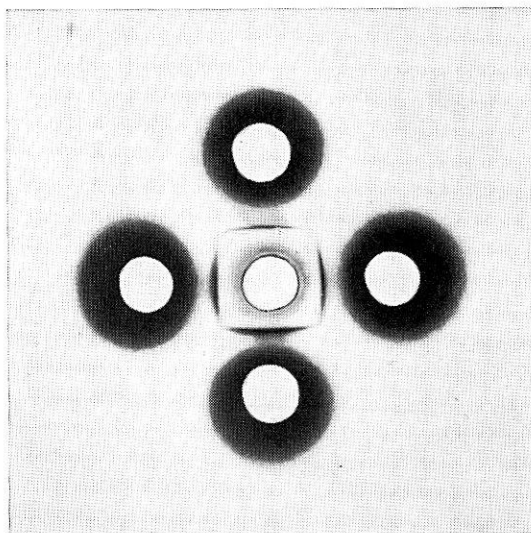
Reacción de precipitación en medio gelificado. Soporte "Portaobjetos". 1.—Extracto de mancha de sangre de mono.
2.—Extracto de mancha de sangre humana



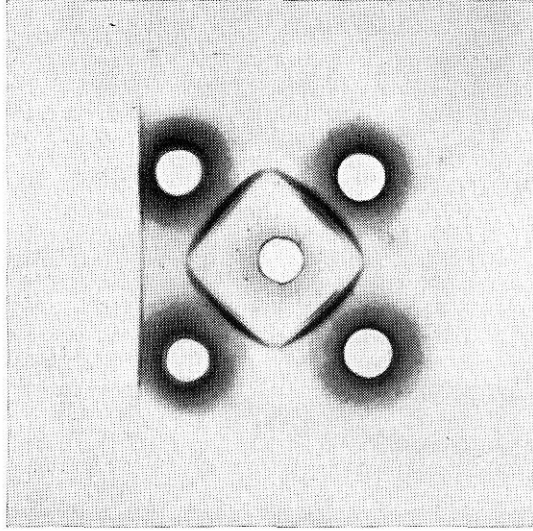
Reacción de precipitación en medio gelificado. Soporte:
Placa de Petri. Data 24 horas



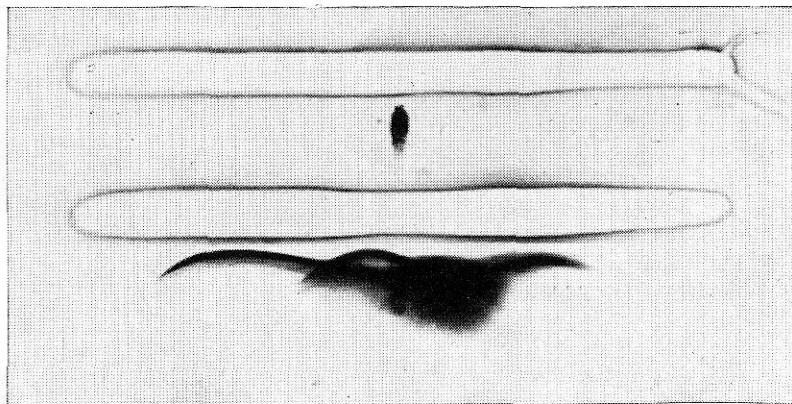
Reacción de precipitación en medio gelificado. Soporte: Placa de Petri. Extracto mancha de sangre humana. Data, 5 días



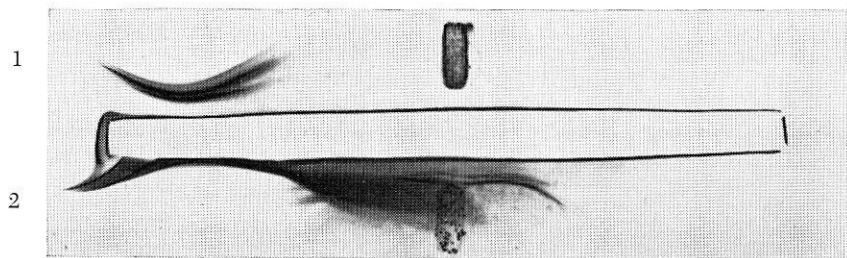
Reacción de precipitación en medio gelificado. Soporte: Placa de Petri. Extracto manchado de sangre humana. Data 360 días



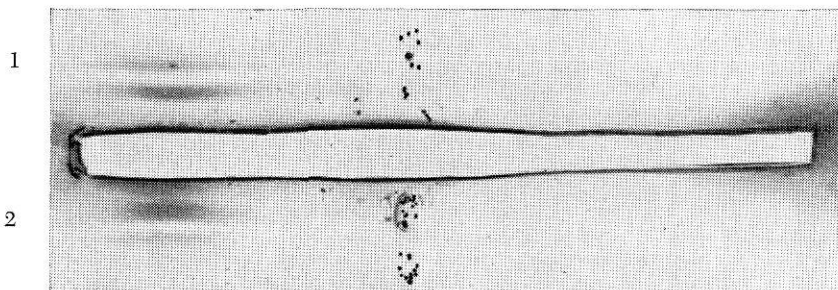
Reacción de precipitación en medio gelificado. Soporte: Placa de Petri. Extracto mancha de sangre humana. Data, 720 días



Imunoelectroforesis de una maceración de mancha de animal (reservorio superior). El reservorio inferior suero humano normal. Las ranuras centrales contienen suero antihumano. Obsérvese la ausencia de arcos con el extracto de mancha animal y su presencia con el suero humano



Immunoelectroforesis.—1. Extracto de mancha de sangre humana, data 10 días.—2. Suero humano normal; arcos múltiples en las distintas zonas proteicas



Immunoelectroforesis.—1. Extracto de mancha de sangre de mono; data, 360 días.—2. Extracto de mancha de sangre humana; data, 360 días. En ambos casos arco precipitación en la zona de albúmina

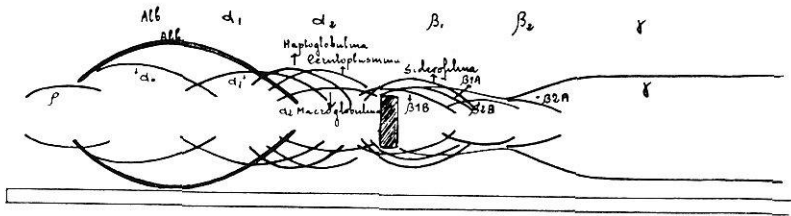


Diagrama Immunolectroforético (Grabar)

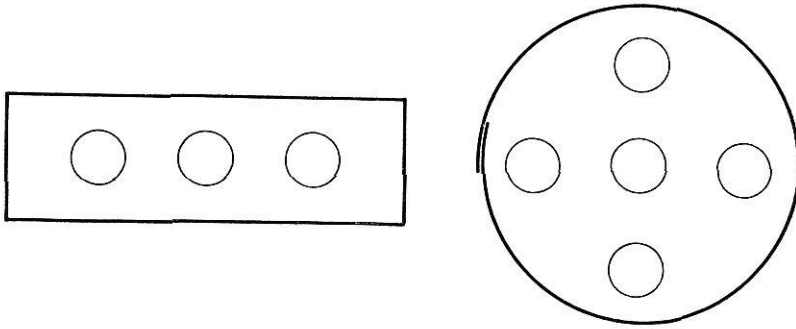


Fig. 1.—Reservorio central: Suero antihumano. Reservorios laterales: Extracto manchas problema