

Tesis de Posgrado

Contribución al estudio químico-legal de las manchas de la sangre

Fliess, Alois D.

1912

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Fliess, Alois D.. (1912). Contribución al estudio químico-legal de las manchas de la sangre. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0087_Fliess.pdf

Cita tipo Chicago:

Fliess, Alois D.. "Contribución al estudio químico-legal de las manchas de la sangre". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1912. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0087_Fliess.pdf

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS Y NATURALES

Contribución al estudio químico legal

DE LAS

Manchas de Sangre

TESIS

PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN QUÍMICA

POR

ALOIS D. FLIESS



BUENOS AIRES

"LA ARGENTINA" - IMPRENTA Y Encuadernación - SANTA 4 1576

1912

UNIVERSIDAD DE CALIFORNIA

SCHOOL OF LAW

La Facultad no se hace solidaria de las
opiniones vertidas en las tesis.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA

PADRINO DE TESIS

Dr. Jacinto C. Raffo

A LA MEMORIA DE MI PADRE

A MI MADRE Y A MI HERMANO ENRIQUE

TODO OS LO DEBO

A MIS HERMANOS

A LOS MIOS

Señores Consejeros:

Señores Profesores:

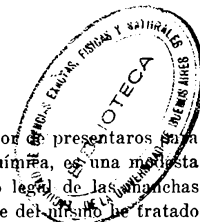
El trabajo que tengo el honor de presentaros en la opta al título de Doctor en química, es una modesta contribución al estudio químico legal de las manchas de sangre. En la primera parte del mismo se trata de reunir los conocimientos teóricos, necesarios para la práctica de las reacciones corrientes en la investigación de las manchas de sangre. Dedicando la segunda parte de este trabajo, a la aplicación práctica de los diversos métodos de que disponemos para la identificación de las mismas.

Al someterme a la última prueba, cumplo con un deber al agradecer al cuerpo de profesores de esta facultad, las enseñanzas recibidas.

A mi padrino de tesis Dr. Jacinto T. Raffo, mi reconocimiento por el honor que me dispensa al acompañarme en este acto.

A los Dres. José Penna, Juan B. Emina, Enrique Herrero Ducloux, Jacinto T. Raffo, Guillermo Schaefer, Francisco P. Lavalle, Felipe Justo y Pedro J. García mi gratitud por las atenciones y enseñanzas recibidas en mi carrera universitaria.

No quiero terminar, sin hacer presente en esta introducción, el reconocimiento y afecto que mi espíritu guarda por la memoria del malogrado Dr. Federico J. Tagliabue.



PRIMERA PARTE

CAPITULO I.

Caracteres físicos

Todas las funciones nutritivas están confiadas en primer término a la sangre, así como el sistema nervioso es el encargado de las funciones de relación; por lo tanto, se encontrarán en ella todas las sustancias destinadas a alimentar los tejidos y todos los productos residuales que deben ser eliminados.

La sangre es fluida y circulante, lo que le permite su objetivo de relacionar y ligar todos los tejidos fijos y sirviendo así de intermediaria, para el cambio de materiales del organismo. Contiene numerosos corpúsculos celulares (glóbulos rojos, blancos y hematoblastos) y una sustancia intercelular: el plasma.

Establecido así ligeramente el papel fisiológico de la sangre pasaremos a ocuparnos de sus propiedades físicas.

COLOR. — Es un líquido rojo, rojo escarlata la sangre arterial y dieróica la venosa; es decir, presenta dos coloraciones, una rojo obscura por reflexión y la otra con tintes verdosos por refracción, es opaca debido a la presencia de corpúsculos en suspensión y vista a través de capas muy delgadas, es translúcida.

OLOR. — Su olor recuerda el del suero del ani-

mal de que proviene, es debido a la presencia de ácidos grasos volátiles; exaltándose dicho olor si se añade ácido sulfúrico a la sangre, que pone en libertad los ácidos grasos.

SABOR. — Tiene un sabor salado y desagradable.

DENSIDAD. — La densidad de la sangre es muy variable, en el hombre oscila entre 1.055 y 1.065; en la mujer entre 1.050 y 1.060, considerados ambos en estado fisiológico.

En la determinación del peso específico de la sangre, puede ocurrirnos, que dispongamos de suficiente cantidad de sangre ó de muy pequeñas porciones de la misma, variando entonces el detalle del método. Cuando se dispone de cantidades suficientes de sangre, se emplea un picnómetro de 100 cc. de capacidad, la tapa que lo cierra está ajustada al esmeril y lleva en su interior un termómetro que está soldado a la misma, con objeto de operar á la misma temperatura. Se limpia perfectamente el picnómetro, se seca, se pesa vacío, se vuelve a pesar lleno de agua destilada, se vierte el agua se seca, se lava con alcohol y eter, se vuelve a secar y se pesa nuevamente lleno de sangre; la sensibilidad de la pesada debe ser al milígramo. La densidad la obtendremos aplicando la siguiente fórmula:

$$D = \frac{p' - p}{p' - p'}$$

En la p peso del picnómetro vacío
" " P " " " con agua destilada
" " P' " " " con sangre

Si la cantidad de sangre de que disponemos es muy pequeña seguiremos el mismo método disminuyendo las dimensiones del picnómetro; lo que se realiza

con el picnómetro capilar de Schmaltz. Este aparato consiste en un tubo capilar de vidrio de 12 ct. de largo por 1.5 mm. de ancho. Para obtener con él la densidad de la sangre se opera en la forma siguiente: Se limpia perfectamente el picnómetro, se seca y luego se pesa, se introduce por aspiración agua destilada y se pesa nuevamente, se extrae el agua, se seca, se limpia con alcohol y éter, se vuelve a secar y se introduce ahora sangre por aspiración y se pesa. Con los datos obtenidos se produce como en el caso anterior aplicando la fórmula ya mencionada.

VISCOSIDAD. — Un fluido perfecto sería aquél, que considerado únicamente en la parte interna de su masa líquida, tuviese sus partículas dotadas de una extrema movilidad, la que podíamos considerar ilimitada. Pero esto no sucede con los líquidos que conocemos, pues no son fluidos perfectos y sus partículas no están dotadas de esa extrema movilidad por el contrario, encuentran al deslizarse las unas con las otras, una cierta resistencia. Se expresa este hecho diciendo: que los líquidos son viscosos unos más que otros, pero aún en distinta medida todos los son. La sangre es viscosa, su viscosidad es variable según la especie animal y depende en gran parte del número de corpúsculos que tiene en suspensión.

La viscosidad relativa de la sangre, se toma comparándola con la del agua: el aparato empleado en este caso es el de A. Mayer (fig. 1). La operación consiste en medir por medio de un cronógrafo el tiempo T empleado por la sangre, colocada

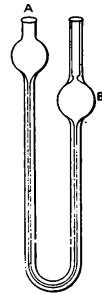


FIG. 1
Aparato de Mayer

hasta llenar la bola A, en descender por el capilar H y llenar la bola B, se lava el aparato, se seca y se repite la misma operación con agua destilada, midiendo el tiempo T' , empleado en esta segunda operación. La temperatura debe ser la misma en ambas medidas, lo que se obtiene operando en un termostato especial, o simplemente en un recipiente de temperatura constante.

El cociente $\frac{T}{T'}$, da el coeficiente de velocidad.

PRESION OSMOTICA.—J. H. Van 'T Hoff ha estudiado y establecido la teoría de las soluciones, la que sintetizaremos en breves líneas. Las sustancias disueltas en un líquido, se encuentran en un estado análogo al estado gaseoso; recordaremos que todo gas se caracteriza físicamente por los siguientes elementos: temperatura volumen y presión; veamos ahora estos elementos en las soluciones. Una sustancia disuelta en un líquido, tiene una temperatura, que estará dada por la que marque un termómetro sumergido en la misma, su volumen será el volumen final de la solución, en cuanto a la presión, un ligero análisis nos aclarará este concepto; si en un líquido introducimos un cuerpo soluble, éste caerá al fondo del recipiente en que está contenido el líquido y estará rodeado por las capas inferiores del mismo, que serán las únicas que podrán ejercer su acción disolvente; pero después de un cierto tiempo la sustancia sólida, está completamente disuelta y repartida igualmente en todo el líquido, lo que nos lleva forzosamente a aceptar la existencia en el líquido, de una presión que se ha dirigido al encuentro del cuerpo sólido, y lo ha llevado y difundido en todas las direcciones. Esta presión interna del líquido, análoga a la presión interna de un gas que

también lo difunde en todas direcciones, se llama presión osmótica de la solución.

La presión osmótica de una solución, es directamente proporcional a su concentración; así, cuando más concentrada es una solución mayor es su presión osmótica. Las soluciones que tienen la misma presión osmótica se llaman isotónicas y anisotónicas las que tienen distinta presión osmótica, denominándose hipertónicas las de mayor presión y hipotónica la de menor presión. Se llama membrana semipermeable, una membrana, que formando una de las paredes de un recipiente que contenga una solución, deja pasar a través de sus poros solamente al disolvente impidiendo el paso de las sustancias disueltas. Dos soluciones isotónicas, separadas entre sí por una membrana semipermeable; como las presiones a uno y otro lado de la membrana son iguales, no se establece ninguna corriente líquida a través de ella, en cambio si las soluciones son de distinta presión osmótica, se establece una corriente, que va de la solución más diluida a la más concentrada, corriente que cesa, cuando las dos soluciones han adquirido la misma presión osmótica.

La sangre, representa en conjunto, una solución de sustancias orgánicas y minerales, en la que nadan los corpúsculos (glóbulos rojos, glóbulos blancos y hematoblastos); las sustancias disueltas, son las que determinan en la sangre su presión osmótica, los corpúsculos que viven en este medio sufren dicha presión osmótica.

Entre los corpúsculos que tiene la sangre se hallan los glóbulos rojos, que contienen una sustancia colorante de color rojo, la hemoglobina; la hemoglobina

está íntimamente fijada al glóbulo y no se difunde en el plasma, las cosas están dadas de manera que la tensión osmótica del suero sanguíneo, equilibra la tensión interna del glóbulo rojo, pero si por una circunstancia cualquiera se disminuye la tensión osmótica del plasma sanguíneo, el glóbulo rojo se deforma, se distiende por causa de la disminución de presión a su alrededor y acaba por romperse, dejando pasar entonces su materia colorante al plasma, que se colorea a su vez.

La presión osmótica de la sangre, no es la misma en todas las especies de mamíferos; según Eykman, la presión osmótica del suero de la sangre humana, en individuos sanos y enfermos, corresponde á la presión osmótica de una solución de 0.78 a 0.90 por 100 de cloruro de sodio. Entre los distintos métodos para determinar la presión osmótica de la sangre, citaremos el de Hamburger, que se funda en la investigación de una solución de cloruro de sodio isotónica con el suero sanguíneo.

Si diluimos el suero sanguíneo, de una cantidad cualquiera de sangre, con 50 o 60 o/o de agua dilatada, disminuirémos la presión de dicho suero y como consecuencia de esta disminución de presión, los glóbulos rojos cederán su hemoglobina que pasará al suero, coloreándolo. Ahora bien, si en una solución de cloruro de sodio, isotónica con la sangre, introducimos glóbulos rojos, éstos permanecerán inalterables pero si diluimos esta solución agregándole agua, la hemoglobina pasará como en el caso anterior y coloreará el líquido.

La técnica del método de Hamburger, es la siguiente: en un soporte para tubo de ensayo, se colo-

can seis tubos de ensayo numerados; en cada uno de estos tubos se vierten 5 cc. de suero, luego se añade a cada uno de los seis tubos de ensayo agua destilada en la siguiente forma: al primero 3.1 cc., al segundo 3.0 cc., al tercero 2.9 cc., al cuarto 2.8 cc., al quinto 2.7 cc. y al sexto 2.6 cc. Después se dejarán caer en cada uno de los tubos, tres gotas de sangre desfibrinada, agitando y centrifugando por último dichas mezclas. Por otra parte, se disponen en otro soporte para tubos de ensayo, otros seis tubos numerados y se vierten en cada uno de ellos, 8 cc. de una solución de cloruro de sodio cuyo título es para cada uno de los seis tubos respectivamente de: 0.62 o/o, 0.61 o/o, 0.60 o/o, 0.59 o/o, 0.58 o/o y 0.57 o/o, luego se deja caer como en el caso anterior, tres gotas de sangre desfibrinada en cada uno de los tubos y se agita. Transcurridas dos horas, se observan los tubos de las dos series y se observa:

1°. Que en todos los tubos se han depositado los glóbulos rojos;

2°. Que en algunos de los tubos, el líquido se mantiene rojo por la salida del pigmento y en otros no.

Supongamos que los tubos en que se ha producido la salida del pigmento correspondientes a la primera serie, es decir, los que contenían suero y agua, fueran el 1°, 2° y 3° que correspondían a los siguientes títulos: 3, 1, 3.0 y 2.9, luego la mezcla de 5 cc. de suero y 2.9 cc. de agua destilada, ofrece la salida del pigmento. Observamos la segunda serie y notamos por ejemplo, que en la solución de cloruro de sodio que ha permitido el pasaje del pigmento es la que responde a un título de 0.58 o/o.

Por esas razones,

la mezcla de 5 cc. de suero + $\frac{2.9}{2} + \frac{2.8}{2} = 2.85$ de agua es isotónica con una solución de cloruro de sodio de:

$$\frac{0.58 + 0.59}{2} = 0.585 \%$$

Con estos datos podemos calcular, con que solución de cloruro de sodio, es isotónico el suero normal, no diluido, planteando la siguiente proporción:

$$5 : 5 + 2.85 :: 0.585 : X$$

de la que se deduce:

$$X = \frac{5 + 2.85}{5} \times 0.585 = 0.92 \%$$

De manera pues que en este caso, el suero de la sangre es isotónico con una solución de ClNa al 0.92 o/o.

COAGULACION. — Como ya hemos visto, la sangre circulante en el organismo de los vasos, está constituida por un líquido: el plasma sanguíneo, que lleva en suspensión los elementos figurados: glóbulos rojos, glóbulos blancos y hematoblastos. Extraída de los vasos y abandonada al reposo en un recipiente cualquiera, permanece líquida un tiempo variable, coagulándose luego, casi bruscamente: es decir, se transforma en una masa gelatinosa. Cuando recién se ha producido la coagulación toda la sangre presenta el aspecto de una masa; pero bien pronto comienza a contraerse esta masa y a expulsar un líquido claro, de manera que al cabo de varias horas queda en el recipiente un blok rojo bastante duro, el coágulo rodeado de un líquido algo amarillento, el suero.

El coágulo, está formado por los glóbulos sanguíneos, aprisionados dentro de una especie de retículo; las mallas o filamentos de este retículo, están constituidas por una sustancia albuminoide: la fibrina. Como vemos, el plasma y el suero, difieren en su composición por de pronto, el suero está desprovisto de fibrina, el suero se presenta en la sangre coagulada, en cambio el plasma, se halla en la sangre circulante en los vasos.

Si queremos obtener plasma sanguíneo, al extraer la sangre, debemos evitar que coagule y luego separar mecánicamente los corpúsculos del plasma, en el que se hallan en suspensión. Varios procedimientos nos permiten impedir la coagulación de la sangre:

Procedimiento de la yugular. — En los vasos, la sangre es fluída, luego si se aísla convenientemente la vena yugular de un caballo, la sangre que circula en esta vena es fluída; ahora efectuando dos ligaduras que permitan llenar la vena de sangre e impidan y la aislen de la circulación, obtendremos una especie de saco lleno de sangre. Seccionando de uno y otro lado de las ligaduras, podremos retirar la vena llena de sangre; como los glóbulos sanguíneos del caballo son mucho más pesados que el plasma, observaremos en nuestro saco artificial, dos zonas bien delimitadas: la inferior, que ocupa la mitad de la vena, formada por glóbulos sanguíneos y la mitad superior por el plasma. El plasma así obtenido es puro, pero en cuanto se le retira del vaso coagula.

Vasos y cánulas parafinadas. — Si introducimos en una arteria una cánula que haya sido vaselinada o parafinada interiormente y ponemos en comunicación, por medio de un tubo de cautchut también para-

finado o vaselinado interiormente, dicha cánula, con un recipiente cuyas paredes también han sido parafinadas o vaselinadas, la sangre que reciba este recipiente se conserva mucho tiempo sin coagular, siempre que la sangre al salir, no se haya puesto en contacto con los tejidos de la herida. Ahora, si con las mismas precauciones, trasvasamos esta sangre a un tubo y la centrifugamos, separaremos mecánicamente, el plasma de los glóbulos.

ENFRIAMIENTO. — Una vez extraída la sangre del vaso y enfiada rápidamente a una temperatura vecina de 0°, permanece líquida.

SANGRE DE LOS OVIPAROS. — Si se efectúa una sangría en un pájaro, la sangre que se obtiene coagula; pero si se recoge, teniendo la precaución de introducir una cánula en la arteria incidida, de manera a impedir que la sangre que se escapa por la herida, venga a estar en contacto con ella y se pierden las primeras porciones, la sangre que sigue escapándose, no coagula.

CABEZAS DE SANGUIJUELAS. — Inmirtiéndolo cabezas de sanguijuelas durante algún tiempo en alcohol, luego desecadas y pulverizadas, este polvo puesto en contacto con agua salada al 1 o/o, y filtrando esta solución salada, el líquido filtrado que se obtiene puesto en contacto con sangre, impide su coagulación.

PEPTONA DE WHITE. — Si se inyecta una solución de peptona de White en el sistema venoso de un animal y luego se efectúa una sangría en el mismo, la sangre que se obtiene no coagula.

Sales neutras.—Cuando se recibe la sangre al salir del vaso en una solución de cloruro de sodio, o de

sulfato de Magnesio, etc., de suficiente concentración, la sangre no coágula.

DECALCIFICANTES. — Si se recibe la sangre en un recipiente conteniendo una solución capaz de precipitar las sales de calcio, por ejemplo: soluciones de oxalatos neutros o de citratos, en estas condiciones, la sangre no coagula.

CAUSAS DE LA COAGULACION DE LA SANGRE. — Estudiaremos muy ligeramente este punto, limitándonos solamente a indicar, las causas que en otra época se creyeron que intervenían en este fenómeno. Se supuso que intervenía la temperatura, atribuyéndose al enfriamiento que sufría la sangre, al salir del vaso; pero esta consideración queda destruída si recordamos que precisamente enfriando la sangre, se impide su coagulación. El contacto del aire se pensó que podría influir en este fenómeno, lo que hay que abandonar en presencia del hecho de que la sangre en el vacío también coagula. El reposo tampoco explica este fenómeno, pues si agitamos vivamente la sangre contenida en un recipiente, con una varilla cualquiera, la sangre también coagula. Se ha sostenido que la sangre coagula porque ella no se halla en contacto con la pared vascular sana y como análogamente, la sangre extraída con cánulas parafinadas o vaselinadas y recibida en recipientes también parafinados o vaselinados, que no moja, no coagula; se agregaba que la sangre en el interior de los vasos no moja las paredes de los mismos, lo que no puede ser aceptado, pues los cambios materiales que se efectúan entre la sangre y los líquidos de los tejidos, exigen que la sangre moje la pared vascular.

Como vemos, todas estas razones, no explican el

fenómeno de la coagulación de la sangre; investigadores posteriores, siguiendo las huellas de Alejandro Schmidt, buscan la causa del fenómeno de la coagulación de la sangre en otro terreno de hechos, atribuyéndole un origen diastásico. En breves palabras bosquejaremos esta teoría. La sangre circulante en los vasos tiene la siguiente composición:

Sangre en los vasos { 1 — parte de glóbulos: rojo, blanco, hematocitos
1 — parte de plasma: sustancias minerales
sustancias orgánicas

Entre las sustancias orgánicas que se hallan en el plasma sanguíneo se encuentran las sustancias protéicas que desempeñan un papel muy importante en estos fenómenos y que detallamos en el cuadro adjunto:

Sustancias protéicas { sero albumina
sero globulina
fibrinógeno
núcleo albuminoide

Todas estas sustancias tienen los caracteres generales de los albuminoides, permitiendo sus caracteres diferenciales clasificarlas en los distintos grupos de las sustancias protéicas.

El suero sanguíneo, es decir, el líquido exudado por el coágulo, es un líquido claro que lleva en solución sustancias orgánicas y minerales, entre las sustancias orgánicas se hallan las protéicas cuyo detalle es el siguiente:

Sustancias protéicas { sero albumina
sero globulina
fibrin globulina
núcleo albuminoide

Comparando ahora la composición del plasma sanguíneo con la del suero, hallamos:

- 1°. Que el fibrinógeno del plasma ha desaparecido;
- 2°. Que en el suero ha aparecido una sustancia nueva, la fibrinoglobulina;
- 3°. Que los glóbulos sanguíneos se hallan aprisionados por una nueva sustancia, la fibrina.

Por el hecho de la coagulación, todo el fibrinógeno del plasma ha desaparecido, pero el peso de fibrina producida, no corresponde al de fibrinógeno consumido.

Este orden de cosas ha conducido a varios experimentadores a admitir que por el hecho de la coagulación, el fibrinógeno se hubiese desdoblado en fibrina y fibrinoglobulina, pero esta interpretación es dudosa, pues las relaciones del fibrinógeno, fibrinoglobulina y fibrina son aun oscuras en muchos puntos. Lo que parece indudable es que el fibrinógeno se ha transformado en fibrina; su interpretación según la teoría diastásica, es la siguiente:

Cuando la sangre sale de los vasos aparece en ella un fermento (una diastasa de origen leucocitario probablemente) llamada trombina o plasma; bajo la acción de esta diastasa desaparece el fibrinógeno y se produce la fibrina, que encierra entre sus mallas los glóbulos.

Una condición esencial para que se produzca la coagulación es que en el plasma se hallen disueltas sales de calcio (ver acción de los oxalatos); Pekelharin y Haunmarsten, han demostrado que la intervención de las sales de calcio en la coagulación, se hace de la siguiente forma: la trombina no aparece inmediatamente, por el contrario, ella tiene un precursor inac-

tivo que es la protrombina, quien bajo la influencia de las sales de calcio se transforma en trombina, que es activa. Respecto al origen de la protrombina, que es que ella proviene de los glóbulos blancos, quienes la ponen en libertad, según unos, por una excreción osmótica y fisiológica de los mismos; según otros, por una destrucción anatómica de los leucocitos. Más verosímil es que se trate de una alteración de los leucocitos.

Muchos sostienen que la diastasa, que produce la transformación del fibrinógeno y la formación de fibrina, es exudada por los hematoblastos, quienes ponen en libertad esta sustancia, destruyéndose. Los que tal hipótesis sostienen lo hacen fundándose en el hecho de que observado al microscopio sangre coagulada, los hematoblastos aparecen entre los filamentos de fibrina, ocupando posiciones tales, como los vértices de la red de fibrina, que haría suponer ser ellos, su punto de origen. Conviene referir los interesantes estudios de Aynaud, quien en su tesis para el doctorado en medicina "Globulin des Mammiferes", Facultad de Medicina de París, año 1909, se ocupa de estudiar el tercer elemento de la sangre, el hematoblasto de Hayem o plaqueta de Bizzozero, que Aynaud designa con el nombre de globulino, conservando la denominación que le dió su descubridor, Donne.

El autor citado, en el capítulo XIII "Globulins el hecho de que observando al microscopio sangre coagulación de la sangre comienza, los globulinos han desaparecido, pero si se evitan todas las causas que puedan destruir los globulinos, es decir, la arteria que va a producir la sangre, debe ser descubierta con cuidado, no rompiendo los músculos, arteriolas

ni vénulas vecinas, hundiendo de un solo golpe en la arteria una gruesa aguja de acero de 2 a 5 milímetros de diámetro interior, vaselinada. La sangre que escapa entonces de la arteria, recogida en un vaso graduado, parafinado interiormente, coagula sin que se destruyan sus globulinos. Aynaud procede en la siguiente forma:

1°. Toma una gota de sangre de asno, desprovista, por sedimentación, de la mayor parte de sus glóbulos rojos, la coloca en gota pendiente sobre una lámina vaselinada y la examina al microscopio, a la temperatura de 20 a 30 grados; al cabo de un cierto tiempo (30 minutos a 1 hora), los globulinos se inmovilizan y toman una forma redondeada.

Removiendo la preparación, el plasma coagula, los globulinos se ven aislados los unos de los otros y se notan filamentos de fibrina. Estos filamentos están absolutamente independientes de los globulinos, que se hallan dispuestos al azar, en las mallas de la red de fibrina y no forman puntos de partida ni de arranque de los filamentos fibrinosos.

2°. Los autores que atribuyen a los globulinos una participación en la coagulación, invocan el paralelismo que hay entre la conservación de ellos y el retardo de la coagulación. Los agentes anticoagulantes serían, entonces, sustancias conservadoras de los globulinos. Este hecho no es general, si bien ciertas sustancias anticoagulantes como el citrato y oxalato de soda, conservan la vida de los globulinos; otras como el fluoruro de sodio, son un veneno intenso para ellos; el extracto de sanguijuela, mata y aglutina los globulinos. Los agentes físicos como el frío (0 grado), suspende la coagulación y mata los globu-

linos, en cambio el calor (45°), activa la coagulación y mata los globulinos. Luego no hay paralelismo, entre conservación de globulinos y retardo de la coagulación.

3°. La peptona en inyección intravenosa tiene la propiedad de producir, en el perro, la incoagulabilidad de su sangre, con desaparición bastante rápida de los globulinos de la sangre examinada. Esta desaparición de los globulinos, no debe interpretarse como una destrucción de los mismos, pues si sacrificamos el animal inmediatamente a la inyección de peptona, quitamos su hígado y le hacemos pasar por la vena porta una corriente de agua salada citrada al 1 o/o, recogemos el líquido de lavage y lo examinamos al microscopio como si se tratase de sangre, hallamos en él, gran cantidad de globulinos; luego, estos elementos no han sido destruidos sino simplemente retenidos por el hígado.

Al cabo de un cierto tiempo de la inyección de peptona en un perro, reaparecen en la circulación del mismo, los globulinos, quedando incoagulable la sangre. Con el suero de anguila y con el extracto de músculos de cangrejo, pasa lo mismo; con esas sustancias, se puede obtener sangre incoagulable con o sin globulinos.

El sulfato de atropina, inyectado en el sistema de la vena porta, determina un retardo considerable de la coagulación, y en la sangre así tratada, los globulinos no han sufrido ninguna modificación. Una inyección intravenosa de Azul de Prusia, tiene la propiedad de hacer incoagulable la sangre, pero precedida durante los primeros minutos que siguen a la inyección, de una faz de hiper-coagulabilidad extre-

ma. Ya sea incoagulable o hipercoagulable la sangre al Azul de Prusia, contiene siempre globulinos aislados, en número normal.

4°. La gelatina, que bajo el punto de vista de la coagulación, es antagónica de la peptona, pues aumenta la coagulabilidad de la sangre, se comporta respecto a los globulinos, lo mismo que la peptona, permitiendo obtener una sangre hiper-coagulable desprovista de globulinos.

5°. Una cantidad de sustancias que modifican muy poco la coagulación, disminuyéndola algunas y permitiendo la retracción normal del coágulo. Estas sustancias que poca influencia tienen en el fenómeno de la coagulación, hacen desaparecer los globulinos de la circulación. Se vé entonces, que coagulación y retracción del coágulo, no se hallan condicionadas por la presencia de globulinos. La desaparición de los globulinos es debida, no a una destrucción, sino a una repartición diferente y a su acumulación en ciertas redes capilares.

Aynaud, admite que en las sangres deglobinizadas in vivo, la desaparición de los globulinos es debida a su aglutinación, y considera esas sangres deglobinizadas in vivo, como sangres que han sufrido una primera coagulación y que tienen una aptitud normal para sufrir la segunda, habiendo algunas para las cuales, la segunda coagulación ha sido considerablemente retardada (sangre de peptona o de sanguijuela.)

De las observaciones y experiencias que cita Aynaud, se desprende el hecho que los globulinos no son indispensables para la coagulación ni retracción del coágulo. El mismo autor hace notar que esta conclu-

sión contraria a las ideas generalmente aceptadas hoy día, podría haber sido prevista a priori. La linfa desprovista de globulinos, coagula retrayéndose también. Pero la linfa y la sangre in vivo, lo mismo que in vitro, obedecen a las mismas leyes de coagulación. Considera también como irracional admitir en la sangre la existencia de un elemento, cuyo rol sería precisamente entrar en función cuando ha sido extraído de los vasos. En el animal viviente, la sangre del interior de los vasos queda indefinidamente líquida, exceptuando los estados patológicos. La coagulación de la sangre, es una propiedad que aparece después de su contacto con los tejidos y que es proporcional a la duración o a la intensidad de ese contacto. La sangre extraída de los vasos coagula, porque ha tocado los tejidos y no porque lleva con ella un poderoso hemostático.

CAPITULO II

Citología de la sangre

El estudio citológico de la sangre, está basado en la observación microscópica de la misma, la que nos permite distinguir en ella tres clases de elementos: los glóbulos rojos (eritrocitos o hematies), los glóbulos blancos (leucocitos) y los hematoblastos de Hayem (plaquetas de Bizzozero, globulinos de Donne).

GLOBULOS ROJOS.

La sangre de todos los animales vertebrados, contiene glóbulos rojos, exceptuando el amphioxus, que no los posee; los invertebrados no tienen glóbulos rojos y si la sangre de algunos invertebrados contiene hemoglobina, ésta no se halla fijada a ningun corpúsculo figurado, encontrándose únicamente disuelta en el plasma. En los vertebrados los glóbulos rojos presentan la siguiente variante: los maníferos adultos tienen sus glóbulos rojos sin núcleo, en cambio, los ovíparos, tienen glóbulos rojos con núcleo.

Los glóbulos rojos son corpúsculos redondeados, bicóncavos; vistos de cara aparecen como discos, de contorno circular. vistos de perfil dejan notar un pequeño estrangulamiento en su parte media. Todos los

glóbulos de los mamíferos son discoides, exceptuando los del camello y la llama, que son elípticos, observándose en ellos también la forma bicóncava. (figura 2 y fig. 3.)

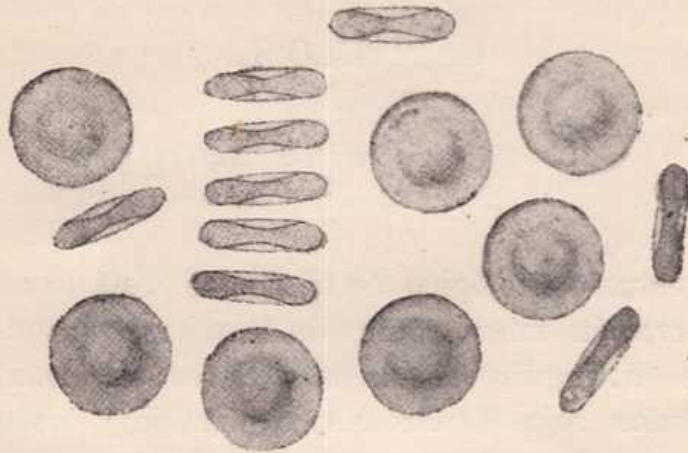


FIG. 2
Hematíes humanos

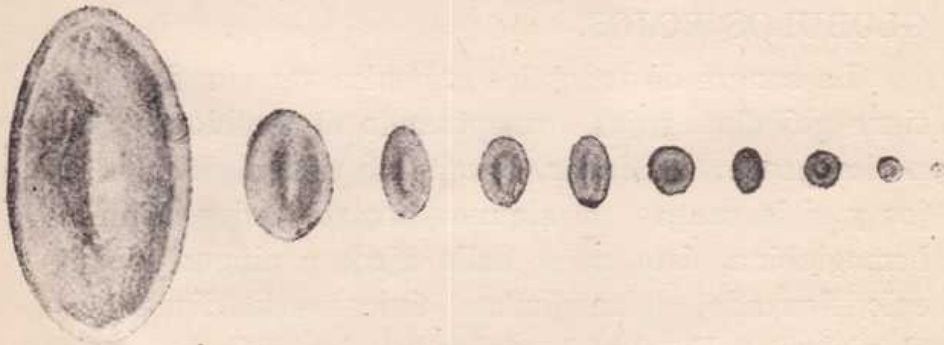


FIG. 3
Hematíes (de izquierda a derecha): proteo, rana, lagartija, tenca, paloma, hombre, llama, marmota, cabra, almizle. Tamaño relativo (De Luciani).

DIMENSIONES. — En el hombre, tienen un diámetro de 7 a 8 micrones y un espesor de 2 micrones; en los demás mamíferos sus dimensiones varían como puede verse en el cuadro siguiente:

Elefante	9 á 4 micrones	Perro	6.7 micrones
Buey	5 á 6 "	Gato	5 — "
Caballo	6.5 "	Mono	7.6 "
Carnívoro	5.6 "	Conejo	7 — "
Cebra	4.5 "	Cobayo	7 á 8 "

NUMERO. — La sangre normal contiene en el hombre 5.000.000 de hematias por mm.³ y 4.500.000 en la mujer.

COLOR. — Aisladamente tienen un color amarillo ligeramente verdoso, pero cuando varios glóbulos se superponen, lo hacen tomando el aspecto de una pila de monedas y su color entonces tiende a ser vecino de la coloración roja de la sangre.

ESTRUCTURA. — El glóbulo rojo se compone de dos partes: el estroma, masa globular albuminoide y la hemoglobina, materia colorante roja. Schwann había admitido la existencia en el glóbulo rojo de una membrana de envoltura que impedía la difusión en el plasma de la hemoglobina, pero hoy se acepta con Hamburger, que el estroma se comporta como una membrana semipermeable, con relación al contenido. El estroma, una vez extraída de él la hemoglobina, no es visible directamente al microscopio. para distinguirlo es necesario colorearlo por el yodo o la fuchsina y en estas condiciones aparece con la forma y figura del glóbulo.

GLOBULOS ROJOS DE LOS OXIPAROS. — *Batracios.* — Los batracios tienen sus glóbulos rojos nucleados, su forma es elíptica, vista de cara, pero mirados de perill aparecen fusiformes, son también biconvexos. Tienen un núcleo central grande, de forma oval, las dimensiones de estos glóbulos son las siguientes:

Rana, 22 micrones; Tritón, 30 a 40 micrones;
Proteo, 80 micrones.

Pájaros. — Sus glóbulos rojos son elípticos, biconvexos y nucleados. Sus dimensiones son 15 micrones de largo y un ancho que oscila entre 7 y 8 micrones.

Peces. — Sus glóbulos rojos son elípticos y nucleados.

CARACTERES FISICOS DE LOS GLOBULOS ROJOS. — Si se observa al microscopio, una preparación de sangre seca se ven los glóbulos rojos con una forma redondeada, que es la que casi siempre se describe, pero si se observa la sangre circulante en el mesenterio de una rana, por ejemplo, el aspecto que presentan es distinto, aparecen los hematies alargados en el sentido de la corriente y cuando tienen que atravesar orificios muy estrechos, los capilares por ejemplo, se estiran en forma de huso alargado para recuperar su forma primitiva una vez salvado el obstáculo; estas modificaciones de forma las efectúan en virtud de su elasticidad.

VISCOCIDAD. — En las preparaciones microscópicas de sangre seca, comunmente se ven los glóbulos rojos adheridos entre sí y dispuestos unos sobre otros dando al conjunto el aspecto de una pila de monedas; esta disposición adherente es debida a la viscosidad de que están dotados los glóbulos rojos. También se observa esta disposición en monedas en la circulación lenta de los pequeños vasos de un animal vivo.

PAPEL DE LOS GLOBULOS ROJOS. — Los hematies, que en síntesis los podemos considerar compuestos de un corpúsculo discoide, el estroma, en el que está íntimamente fijada una sustancia de color

rojo, la hemoglobina, son, gracias a esta hemoglobina, fijadores y conductores de oxígeno. En los capilares del pulmón ellos toman del aire exterior oxígeno, que se fija en la hemoglobina convirtiéndola en oxi-hemoglobina; el glóbulo rojo en estas condiciones, es llevado por el torrente circulatorio y distribuye a su paso entre los tejidos su oxígeno, pasando entonces la oxi-hemoglobina al estado de hemoglobina. La forma biconvexa de estos corpúsculos está de acuerdo con su función, pues ella le ofrece una gran superficie de oxidación y por consiguiente la cantidad de oxígeno cedida es mayor.

GLOBULOS BLANCOS.

Los glóbulos blancos o leucocitos fueron descubiertos en 1770 por Hewson, pero su importancia comienza con los trabajos de Virchow, Jones, Robin, Max Schulze y una falange de estudiosos, entre los últimos de los cuales se destacan notablemente Ehrlich y Metchnikoff. Se distinguieron, primero las variedades de leucocitos, luego sus movimientos propios; se descubrieron las granulaciones de su masa protoplasmática, ocupando actualmente su estudio un lugar muy importante en la patología moderna.

Los leucocitos son corpúsculos que en estado de reposo tienen una forma esférica y están constituidos por una masa protoplasmática que contiene un núcleo. (fig. 4.)

COLOR. — Son incoloros, con un reflejo gris y tienen un aspecto granuloso.

DIMENSIONES. — Sus dimensiones oscilan entre 5 y 20 micrones.

NUCLEO. — En el leucocito vivo el núcleo es

poco visible; en la sangre del hombre se distingue el núcleo muy vagamente como una mancha oscura en

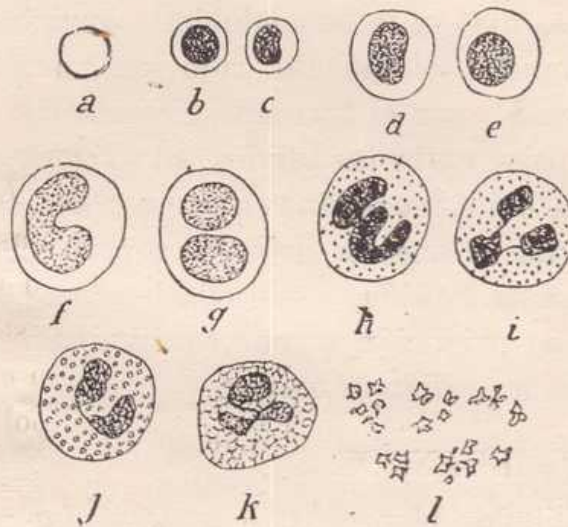


FIG. 4

a, glóbulo rojo; b, c, linfocitos; d, e, pequeños leucocitos mononucleares; f, g, grandes leucocitos mononucleares neutrófilos; h, i, polianucleares con granulaciones neutrófilas; j, polinuclear con granulaciones eosinófilas; k, maztzellen; l, plaquetas sanguíneas.

la parte central del protoplasma; el ácido acético hace destacar el núcleo, mientras que los alcalis lo destruyen. En los animales de sangre caliente, el núcleo es único, pero hay ciertas variedades de leucocitos, que se designan con el nombre de polinucleares, que tienen un núcleo dividido en varios lóbulos.

GRANULACIONES DE LOS LEUCOCITOS. —

Algunos leucocitos contienen en su protoplasma granulaciones cuyo aspecto es variable y según su afinidad con las materias colorantes, dan lugar a la siguiente clasificación:

Granulaciones eosinófilas. — Estas granulaciones aparecen como corpúsculos redondeados, refringentes, que resisten a la acción disolvente de los ácidos di-

luidos; se colorean con los colores ácidos y en particular con la eosina. (fig. 4—j.)

Granulaciones neutrófilas. — Son muy pequeñas y para ser distinguidas exigen una técnica especial; son muy sensibles a la acción de los disolventes, se tiñen en violeta rojo por el triácido de Ehrlich, pero no se colorean por la eosina. (fig. 4—h—i.)

Granulaciones basófilas o mastzellen de Ehrlich. — El núcleo de los leucocitos que poseen estas granulaciones, está formado de varios lóbulos; su protoplasma tiene grandes granulaciones que no se colorean por el triácido de Ehrlich o la hemateína-eosina, coloreándose en violeta rojizo con el azul policromo de Unna. (fig. 4—k.)

MOVILIDAD DE LOS LEUCOCITOS. — Los leucocitos están dotados de movimientos, que los emplean para su nutrición y desplazamiento; se estiran, se alargan, pudiendo de ese modo atravesar las paredes vasculares y caminar en los intersticios de los tejidos. Estos movimientos por su analogía con los movimientos de las amibas, se llaman movimientos ameboidales.

Los leucocitos emiten prolongaciones de su masa protoplasmática que se llaman pseudopodios; a veces, el leucocito queda inmóvil y emite un pseudopodio, estos movimientos ameboidales son excitados por el calor y el oxígeno.

QUIMIOTAXIA. — Es la sensibilidad que tienen los leucocitos frente a distintos agentes químicos; las sustancias que atraen los leucocitos, se dice que tienen propiedades quimotáxicas positivas. Entre ellas encontramos numerosos bacterios, productos de

secreción de los mismos, ciertas sustancias químicas, como el alcohol, etc.

Otras sustancias rechazan a los leucocitos o se muestran indiferentes a ellos, éstas se las llama como dotadas de propiedades quimotáxicas negativas. A este grupo pertenecen ciertos microbios muy virulentos, las toxinas segregadas por los mismos, ciertas sustancias químicas, como el ácido láctico, la quina, el potasio, sodio, etc.

FAGOCITOSIS. — Los leucocitos son capaces del mismo modo que las amibas, de ingerir, envolviendo con su masa protoplasmática, los cuerpos extraños que se les presentan; así, ellos encierran dentro de su protoplasma, gotas de grasa, células diversas, sustancias colorantes, etc. No solamente los leucocitos engloban y digieren los cuerpos muertos que pueden encontrar, sino que ellos también engloban y digieren, quitándoles la vida, a los elementos vivos y microbios que se les presentan. Metchnikoff, ha expuesto su teoría de la fagocitosis, que trata de explicar la defensa del organismo humano, contra cualquier ataque exterior, por medio de esta propiedad de los leucocitos. Según Metchnikoff, los leucocitos mononucleares o macrófagos, son los que intervienen en el organismo en la defensa contra los cuerpos extraños y células; mientras que los polinucleares o micrófagos, son los que intervienen en la lucha contra los microbios.

NUMERO Y FORMA DE LOS LEUCOCITOS. — La sangre normal contiene alrededor de 7.000 leucocitos por milímetro cúbico, distinguiéndose en ella dos clases de leucocitos: los mononucleados y los polinucleados. En la técnica de observación microscópica, cuan-

do se colorean ambas clases de leucocitos, siguiendo procedimientos especiales, se nota que los leucocitos mononucleares no tienen granulaciones en su protoplasma, en cambio, los polinucleares tienen granulaciones en su protoplasma. Los leucocitos mononucleares (no granulados), se presentan bajo las siguientes formas:

Linfocitos. — Su tamaño es aproximadamente el de un glóbulo rojo, tienen un núcleo redondo o ligeramente reniforme.

Leucocitos mononucleares medianos. — Muy semejantes a los linfocitos, pero de mayores dimensiones, oxilando entre 10 y 14 micrones.

Leucocitos mononucleares grandes. — De mayores dimensiones que los anteriores, oxilando entre 15 y 20 micrones.

Además, se observan otras clases de leucocitos muy semejantes a los precedentes, pero su núcleo tiene un gran estrangulamiento en su parte central, que le da el aspecto de una herradura; a veces el núcleo está formado por dos masas distintas. Esta división del núcleo origina una confusión, entre estos leucocitos y los polinucleares; pero, acertando la teoría de varios observadores que creen, en la transformación de los mononucleares en polinucleares en la circulación sanguínea; estos leucocitos serían verdaderas formas de transición.

Leucocitos polinucleares granulados. — Estos leucocitos tienen su núcleo dividido en varios lóbulos que están reunidos por los filamentos cromáticos. Su protoplasma contiene granulaciones, cuya afinidad para las materias colorantes y sus dimensiones, clasifican a estos leucocitos en las siguientes va-

riedades: Leucocitos polinucleares, a granulaciones neutrófilas; Leucocitos polinucleares, a granulaciones eosinófilas; Leucocitos polinucleares, a granulaciones basófilas.

La proporción de las diferentes variedades de los leucocitos en la sangre, según Ehrlich, es la siguiente:

Mononucleares: 24 a 29 o/o del número total de leucocitos.

Polinucleares neutrófilos: 70 a 72 o/o del número total de leucocitos.

Polinucleares eosinófilos: 2 a 4 o/o del número total de leucocitos.

Polinucleares basinófilos (Mastzellen): 0.25 a 0.50 o/o del número total de leucocitos.

HEMATOBLASTOS.

Estos pequeños elementos que se hallan en la sangre, fueron llamados así por Hayem; en cambio, Bizzozero, los designa con el nombre de plaquetas sanguíneas y Donne, que es el primer autor que señaló su presencia en la sangre, en el año 1884, los llama globulinos.

M. Aynaud en el trabajo ya citado, ha hecho un estudio completo de los hematoblastos, conservando para ellos el nombre de globulinos. Estudiado in vivo en la circulación, el globulino se presenta bajo la forma de bastoncitos, de un color más pálido que los glóbulos blancos, de igual longitud y a veces superior a los glóbulos rojos, menos numerosos que éstos últimos, pero en mayor número que los leucocitos. In vitro, siguiendo una técnica especial, obtiene Aynaud globulinos, también con la forma de

bastoncitos. Bajo la influencia de variaciones de temperatura extrafisiológicas o bajo la acción de agentes químicos, toman una forma redondeada. El ancho de los globulinos más grandes llega, y a veces es mayor que el de los glóbulos rojos, las concentraciones moleculares fuertes, los destruyen, la elasticidad del globulino es nula. El rojo neutro, colorea vacuolos en el interior de los globulinos, no tiene núcleo en el sentido estricto, su número es término medio de 500.000 por mm.³. In vitro, los globulinos son susceptibles de ser aglutinados por un cierto número de sustancias coloidales, esas mismas sustancias inyectadas en las venas, los hacen desaparecer de la circulación.

CAPITULO III

Caracteres químicos de la sangre

El estudio sobre la composición química de la sangre, debiendo efectuarse en el laboratorio y tratándose de un líquido tan alterable, no responde con una rigurosa exactitud a su composición en el organismo. Nos ocuparemos ligeramente de la composición química de la sangre, pasando por alto los métodos a seguir, dado que ello, no nos interesa en el presente trabajo; estudiaremos la reacción, extracto y estableceremos la composición química del suero, plasma y glóbulos.

EXTRACTO SECO.

Si evaporamos a la estufa, una cantidad dada de sangre, obtendremos un residuo sólido que estará formado: por los materiales que lleva la sangre en suspensión (glóbulos) y en solución (sustancias orgánicas e inorgánicas.) Entre las varias determinaciones de dicho residuo sólido, se han encontrado las siguientes cifras:

(grs. 21,92 o o en el hombre (Askanazy.)
" 20,53 o o " la mujer "
" 22,72 o.o " el hombre (Von Jacksch.)
" 25,09 o.o " " " (Abderhalden.)

REACCION.

La sangre al estado normal, presenta ante el tornasol, la cochinilla, el ácido rosólico, una reacción alcalina; permaneciendo neutra con la fenolftaleína. Los indicadores que como el tornasol, la cochinilla, el ácido rosólico, indican una reacción alcalina, son muy poco sensibles a los ácidos débiles, como el ácido carbónico; en cambio la fenolftaleína, es sensible a los ácidos débiles. Si para dosar la alcalinidad de la sangre, empleamos una solución titulada ácida, la cantidad de ácido empleado en dicha neutralización, nos indicará simplemente, no la cantidad de álcali libre que tiene la sangre, sino esa cantidad combinada a ácidos débiles, como el carbónico. Como vemos, la reacción alcalina de la sangre es solo aparente.

COMPOSICION QUIMICA DEL SUERO.

El suero, es un líquido amarillento, alcalino, cuya densidad oscila entre 1.027 y 1032. Contiene aproximadamente 95.60 grs. de materias sólidas por mil (Askanazy). Está formado por agua que lleva en solución sustancias orgánicas, inorgánicas y gases puede contener otras sustancias accidentales introducidas por la alimentación, medicamentos y productos de la destrucción de los elementos de la sangre.

Sustancias minerales. — Las sustancias minerales están formadas en su mayor parte por cloruro de sodio (5 gramos por mil), en menor proporción se hallan fosfatos de sodio y de calcio, sulfato de sodio, cloruro de calcio y bicarbonato de sodio.

El cuadro siguiente, da la composición de las cenizas del suero:

	HOMBRE (Schmidt)	HUEY (Bunge)	CABALLO (Bunge)
Cloro	3.610	3.720	3.750
Anhidrido fósfórico	0.370	—	—
" sulfúrico	0.130	—	—
Potasa	0.390	0.250	0.270
Soda	4.460	4.450	4.430
Cal	0.163	0.130	—
Magnesia	0.101	0.045	—
Hierro	rastro	0.011	rastros

Sustancias orgánicas. — En mayor proporción, 70 a 80 por mil, se hallan las sustancias albuminóideas, que comprenden: una sero-albúmina coagulable a 75° con un poder rotatorio $ad = -57.2$ y una sero-globulina coagulable entre 68° y 75°, con un poder rotatorio $ad = -47.2$. Además se hallan pequeñas cantidades de fibrinoglobulina que aparece en el momento de la coagulación y de un núcleo-proteido, la núcleo albúmina del suero.

Grasas. — En proporción variable, según la especie animal y variando su cantidad con la naturaleza de los alimentos ingeridos.

Glucosa. — De 1.10 a 1.15 gramos por mil en la sangre de la carótida y 0.67, a 1.25 por mil en la sangre de la vena yugular (Claudio Bernard). Durante la lactancia se halla lactosa.

Glicógeno. — De 0.01 a 0.02 gramos por mil (Rupert y Czerny).

Urea. — En la proporción de 0.18 gramos por mil en el suero del hombre sano (Yvon).

Algunos observadores han hallado en la sangre, ácido hipúrico (Hervier), ácido úrico (Abeles), Hipoxantina (Salomón).

Amoniaco. — En pequeñas porciones de 1,3 a 1,8 miligramos por 100 cc. de sangre.

Colesterina, Lecitina. — Estas sustancias parecen provenir de la destrucción de los leucocitos.

Glicerina. — Nieloux ha hallado de 2 a 3 miligramos por 100 cc. de sangre de perro.

Además se hallan pigmentos, fermentos y leucomainas.

Azoe de retención. — Si acidificamos el suero, luego lo calentamos, coagulan las sustancias albuminóideas, que se pueden separar por filtración, pero el líquido filtrado contienen todavía pequeñas porciones de diversos cuerpos azoados que en este caso se conocen con el nombre de azoe de retención. Strauss, ha hallado como promedio de varias determinaciones, una cantidad que oscila entre 0,20 a 0,35 por mil de azoe de retención en el suero humano normal.

El cuadro siguiente que tomo de A. Chassevant, dá la composición química de 1000 gramos de suero:

	HOMBRE	BUEY	CABALLO
Agua	907.9	910.4	914.0
Materias sólidas	92.1	89.6	86.4
• albuminóideas	76.2	75.0	72.6
Globulina	31.0	41.7	45.6
Serina	45.2	33.3	26.8
Lecitina, gra a. úrea, etc.	7.1	6.6	5.4
Sales minerales	8.8	8.1	8.0

Gases de la sangre. — Haciendo hervir o sometiendo la sangre al vacío barométrico (bomba de Grehant) se desprenden de ella gases, entre los cuales podemos caracterizar el azoe, oxígeno y ácido carbónico. El azoe se halla disuelto en la sangre; el oxígeno, parte

disuelto y parte combinado con la hemoglobina ;el gas carbónico, se encuentra en tres estados distintos: al estado de simple disolución, como combinación disociable y como combinación estable.

El cuadro siguiente, indica las cantidades variables de estos gases en 100 cc. de sangre arterial y venosas:

	OXÍGENO	ACIDO CARBÓNICO	AZOE
SCHNEPPER			
Sangre arterial	19.2 cce	39.5 cc.	2.7 cc.
» venosa	11.9 cc.	45.3 cc.	1.7 cc.
HEDON			
Sangre arterial	20 á 24 cc.	39.0 cc.	1.5 cc.
» venosa	8 a 12 cc.	46.0 cc.	1.5 cc.
VIAULT Y JOLYET			
Sangre arterial	20 á 24 cc.	40.0 cc.	2.0 cc.
» venosa	8 á 12 cc.	46.0 cc.	2.0 cc.

PLASMA.

Es un líquido amarillo verdoso el humano y de color ambarino el de caballo, su densidad es muy poco superior á la del suero y su reacción es alcalina. Con tiene los mismos elementos orgánicos y minerales que el suero, teniendo además una sustancia albuminóidea especial, el fibrinógeno, que por la acción de un fermento segregado por los leucocitos: la plasmasa, se transforma en fibrina. El fibrinógeno es una globulina, que precipita del plasma, cuando se le añade un 15 olo de cloruro de sodio; el calor la coagula a 56° desdoblándola. Desvía el plano de polarización de la

luz ad=—43°. La fibrina es una sustancia sólida, elástica, de color blanco gris, recién obtenida es rojiza. debido a que está impregnada de glóbulos rojos que lleva entre sus mallas; lavándola con agua, toma su color blanco. Por sus propiedades es una globulina, se halla en el plasma en una proporción de 4,05 gramos por mil, coagula a 56° desdoblándose y quedando en solución un albuminóide que coagula a 64°.

El cuadro siguiente, tomado de Hoppe Seyler y de Hammarsten dá la composición química del plasma por mil:

	HOPPE SEYLER	HAMMARSTEN
Agua	908.4	917.6
Materias sólidas	91.6	82.4
" albuminóideas totales	77.6	69.5
De las cuales:		
Fibrina	10.1	6.4
Sero globulina	—	38.4
Sero albúmina	—	24.6
Grasa	1.2	
Materias extractivas	4.0	
Sales solubles	6.4	12.9
Sales insolubles	7.7	

COMPOSICION QUIMICA DE LOS GLOBULOS ROJOS.

Anatómicamente los glóbulos rojos, están constituidos por un estroma y una materia colorante. El estroma, está compuesto de materias orgánicas y minerales; entre las primeras hallamos las siguientes: lecitina, colessterina y un albuminóide que parece ser una globulina, que es el que domina en la composición del estroma. Entre las sustancias minerales encon-

tramos: calcio magnesio, potasio, ácido fosfórico y cloro.

La materia colorante está compuesta por la hemoglobina; albuminoide complejo que contiene fierro y azufre.

La composición de los glóbulos es la siguiente, según Chassevant:

1000 partes de glóbulos contienen:

Agua	688
Materias orgánicas	304
Hemoglobina	280.0
Albuminoide del estroma	19.
Lecitina, Colesterina, etc	2.7
Grasas	2.3
Materias minerales	8
Cloro	1.686
Acido sulfúrico	0.066
Acido fosfórico	1.134
Potasio	3.820
Sodio	1.052
Calcio	0.114
Magnesio	0.073

Hemoglobina. — Como hemos visto anteriormente, la sangre contiene dos materias colorantes: la hemoglobina y la oxihemoglobina; la transformación de la primera en la segunda se obtiene por fijación de oxígeno y por reducción de oxihemoglobina se llega a la hemoglobina. Al ocuparnos del glóbulo rojo, dijimos que su materia colorante estaba fijada íntimamente en el estroma; el estudio de la composición química de la hemoglobina, nos permitirá aclarar este concepto.

La hemoglobina es un albuminoide complejo, contiene: C, H, N, O, Fe y S en la siguiente proporción:

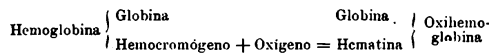
C	H	N	O	Fe	S
54,57	7,11	16,38	21,04	0,33	0,568 (Osborne)

Su peso molecular es elevadísimo, superior a 15.000.

El lugar que ocupa la oxihemoglobina entre las sustancias proteicas, es el de un proteido (proteína conjugada) del tipo de los cromoproteidos; es decir, resulta de la unión de una globulina, la globina y un pigmento ferruginoso (grupo prostético) la hematina. En efecto los alcalis fijos, los ácidos en solución concentradas y el calor, la desdoblán en globina y hematina, en las siguientes proporciones: 94 y 6 ojo respectivamente.

En cambio la hemoglobina en las mismas condiciones, es desdoblada en globina y en hemocromógeno, también en las mismas proporciones relativas.

El hemocromógeno, por fijación de oxígeno, regenera la hematina, la que a su vez por reducción se convierte en hemocromógeno.



Como vemos, el hemocromógeno y la hematina por una conveniente adición y sustracción de oxígeno, pueden transformarse el uno en el otro, de modo que este papel de la sustancia prostética respecto al oxígeno del aire, al que parece servirle de vehículo de transporte, ha permitido a algunos llamarle núcleo respiratorio.

Respecto a la fijación de la hemoglobina y de la

oxihemoglobina en el hematie, se han emitido distintas hipótesis. Según Hoppe, Seyler, esas materias colorantes, están contenidas en el glóbulo rojo al estado de combinación con las lecitinas que contiene el mismo, de modo que la materia colorante extraída de la sangre se halla en un estado químico distinto del que posee en el organismo. Lo que halla su comprobación en el hecho, de que la solubilidad en el agua, de la hemoglobina extraída, es tal, que el agua contenida en los glóbulos no podría nunca disolverla. Además, la sangre presenta mayor afinidad por el oxígeno y lo cede más fácilmente que la hemoglobina in vitro; todas esas razones inducen a creer, que la hemoglobina y la oxihemoglobina, no se hallan disueltas en el estroma, sino combinadas con otras sustancias.

La hemoglobina es soluble en el agua, insoluble en el alcohol, es levógira, sus soluciones son dicroicas: por transparencia, amarillo verdosas y por reflexión, rojizas. Se obtiene cristalizada, variando el aspecto de los cristales, con la especie animal y el método de cristalización: los cristales de hemoglobina humana tienen la forma de tabletas rectangulares alargadas.

La cantidad de hemoglobina en la sangre humana es de 10 a 15 o/q de sangre.

Se combina la hemoglobina, con el óxido de carbono, bióxido de azoe, hidrógeno sulfurado y con el cianógeno, para formar distintas combinaciones que estudiaremos en cada caso.

El espectro de la hemoglobina, así como el de sus derivados será objeto, en el capítulo siguiente, de un estudio especial.

Oxihemoglobina. — Esta materia colorante resulta de la combinación del oxígeno con la hemoglobina,

produciéndose en este acto un desprendimiento de calor, equivalente a 14,77 calorías, por cada molécula de oxígeno fijado. Un gramo de hemoglobina a 0° y 760 mm., agitado en el aire, absorbe 1,34 de O² (Huffner); esta cantidad, a la temperatura del organismo humano, se convierte en 1.25.

La combinación del oxígeno con la hemoglobina, es fácilmente disociable, y esta disociación depende de la tensión y temperatura. Pura y cristalizada, es de color rojo bruno, soluble en el agua; coloreando la solución acuosa en rojo oscuro, es insoluble en el alcohol.

Su composición química es idéntica a la de la hemoglobina, diferenciándose, en el oxígeno que contiene en más; presenta la propiedad de cristalizar y de afectar el estado coloidal. Las distintas oxihemoglobinas, que se obtienen de diferentes animales, no son idénticas, difieren en su forma cristalina, solubilidad y proporción de hierro.

La oxihemoglobina de la sangre de rata, langosta, cobayo, carpa, perca, barbeau, cristaliza fácilmente. Añadiendo a su solución acuosa, éter, y enfriando a 0° se obtiene una magna cristalina.

La oxihemoglobina de la sangre de caballo, perro y gato, cristalizan más difícilmente, es necesario agregar a su solución acuosa, 1/4 de su volumen de alcohol.

La oxihemoglobina de la sangre del hombre y del mono, es más difícil aún de obtener cristalizada; hay que proceder como en el caso anterior y enfriar.

La oxihemoglobina de la sangre de chanco y de buey, cristaliza más difícilmente todavía.

La oxihemoglobina se desdobra como hemos visto anteriormente, en globina y hematina.

Es soluble en las soluciones salinas diluidas, los alcalis fijos y carbonatos, el cloruro de sodio y carbonato de potasio en exceso la precipitan de sus soluciones.

Los reductores la convierten en hemoglobina; la misma transformación es producida por la acción del vacío. Los cristales de hemoglobina descomponen el agua oxigenada, ozonizan el oxígeno y azulean la tinctura de guayaco.

El cuadro siguiente dá la forma cristalina y la solubilidad en el agua, de las hemoglobinas de distintas especies animales:

ESPECIE	FORMA CRISTALINA	SOLUBILIDAD EN EL AGUA
Hombre .	prismas ortorómbicos (rectangulares alargados).	muy solubles
Mono . . .	prismas ortorómbicos (pequeñas tablas).	muy solubles
Gato . . .	prismas ortorómbicos á 4 pines.	poco solubles
Ardilla .	prismas exagonales (agrupados en rosas).	muy poco solubles
Ferreo . . .	prismas ortorómbicos.	poco solubles
Cobayo .	tetraedros.	muy poco solubles
Laucha .	tabletas exagonales (finas agujas).	muy poco solubles
Conejo . .	rectángulos alargados.	extremadamente solubles
Caballo .	prismas ortorómbicos.	muy solubles
Rana . . .	„ „	muy solubles

Hemoglobina oxicarbonada. — Si agitamos sangre oxigenada, conteniendo por consiguiente oxihemoglobina con óxido de carbono, este gas desplaza volumen a volumen, el oxígeno de la hemoglobina ocupan-

do su lugar, dando origen a un nuevo compuesto: la hemoglobina oxicarbonada. Esta combinación es muy estable; el vacío muy difícilmente la quita el óxido de carbono. A 15 y 40 grados no es disociada; tratada por los agentes reductores, entre ellos el sulfhidrato de amonio, no es reducida al estado de hemoglobina, cosa que sucede con la oxihemoglobina.

El óxido de carbono se combina con la hemoglobina con un desprendimiento de 18,7 calorías por molécula; en idénticas condiciones la hemoglobina con el oxígeno se combina con un desprendimiento de 14,77 calorías. Como vemos, la carboxihemoglobina es más estable que la oxihemoglobina, lo que explica el hecho de que la hemoglobina en una atmósfera de oxígeno conteniendo pequeñas porciones de óxido de carbono, se combina con este gas. Las soluciones de hemoglobina oxicarbonada, son de un rojo escarlata; sus cristales análogos a los de la oxihemoglobina, son un de color rojo violeta intenso.

Ciano hemoglobina. — Si se calienta a 40 grados una solución de oxihemoglobina con ácido cianhídrico en solución muy extendida, se obtiene ciano hemoglobina; también puede obtenerse la fijación del cianógeno sobre la hemoglobina, haciendo pasar una corriente de gas cianógeno sobre una solución de hemoglobina.

Azotooxihemoglobina. — Se obtiene por la acción del bióxido de azoe sobre la hemoglobina. Se prepara haciendo pasar una corriente de gas bixoido de azoe en una solución de hemoglobina oxicarbonada; como vemos la azotooxihemoglobina es más estable que la carboxihemoglobina. Los cristales de azotooxihemoglobina son análogos a los de la oxihemoglobina.

Mctahemoglobina. — Tratando la oxihemoglobina

por oxidantes, como el permanganato de potasa, ferri-
cianuro de potasio, los nitritos, el ozono, el yodo, etc.
se obtiene una materia colorante pardo rojiza, que se
considera isómera de la oxihemoglobina. Si bien este
cuerpo se obtiene por agentes oxidantes, la acción di-
recta del oxígeno atmosférico, no basta para producir
dicho compuesto. Por disminución de la tensión del
oxígeno externo, no pierde este gas, diferenciándose
con ello de la oxihemoglobina, que lo pierde. Crista-
liza en forma de agujas prismáticas, es poco soluble
en el agua a la que colorea en rojo oscuro, insoluble
en el alcohol y en el éter. La metahemoglobina por
los reductores de alguna intensidad, se convierte en
hemoglobina reducida, que a su vez puede transfor-
marse en oxihemoglobina. Por la acción de los alcali-
s y los ácidos, es desdoblada en globina y hematina.
La metahemoglobina aparece en la sangre de los su-
jetos intoxicados por ciertos venenos: clorato de po-
tasio, nitrito de amilo, ácido pirogálico.

Hematina. — Tratando la oxihemoglobina por los
ácidos y alcalis, obtendremos un desdoblamiento de
dicho cuerpo, en globina y hematina. La hematina es
el núcleo coloreado de la oxihemoglobina, es una sus-
tancia nitrogenada y ferruginosa; desecada, es un
polvo de color pardo oscuro, insoluble en el agua, al-
cohol y éter; soluble en ácido acético en caliente, en
ácido nítrico y en los alcalis en solución diluida. Las
soluciones ácidas son de color rojo oscuro, las alcali-
nas dicroicas. Se combina con el ácido clorhídrico,
dando cristales de clorhidrato de hematina, también co-
nocidos con el nombre de cristales de hemina. Los
jugos digestivos como el gástrico y el pancreático,
transforman la oxihemoglobina en hematina, lo que

explica el hecho de hallarse la hematina en los excrementos, después de la ingestión de sustancias fijas en sangre.

Hemina. — La combinación del ácido clorhídrico con la hematina, es decir, el clorhidrato de hematina, se conoce con el nombre de cristales de hemina; este compuesto tiene importancia en medicina legal, para el diagnóstico de las manchas de sangre. Los cristales de hemina se presentan a menudo, bajo la forma de cristales romboidales, pardos, dispuestos en cruz; son insolubles en el agua, alcohol y éter; se disuelven descomponiéndose en las lejías alcalinas. Los cristales de hemina no se presentan siempre en la misma forma, dependiendo ella, no de la especie animal y si del método seguido para su obtención. Respecto a su obtención, en la segunda parte de este trabajo nos ocuparemos de ella.

Hematoporfina. — La hematina, sustancia ferruginosa o su clorhidrato, la hemina, tratados por el ácido sulfúrico concentrado o clorhídrico fumante, son descompuestos con pérdida de hierro, que se combina con el ácido y la hematina se transforma en hematoporfirina, sustancia colorante no ferruginosa. Su fórmula es: $C_{32}, H_{36}, Az_4, O_6$; es un polvo de color rojo negro violeta, casi insoluble en el agua; soluble, en las soluciones ácidas y alcalinas.

Hemocromógeno. — Como hemos visto al tratar la hemoglobina, el hemocromógeno se produce como un desdoblamiento de la hemoglobina, cuando se hace actuar sobre ella los alcalis fijos, los ácidos o el calor en estas condiciones es desdoblada en globulina y hemocromógeno. Análogamente la oxihemoglobina, es desdoblada en globina y hematina. La hematina trata-

da por los reductores, como el sulfuro de amonio, se transforma en hemocromógeno. También puede obtenerse el hemocromógeno, desdoblando la hemoglobina por los ácidos o los alcalis, al abrigo del aire. El hemocromógeno, es un polvo de color rojo oscuro se disuelve en las soluciones alcalinas y ácidas débiles, a las que colorea en rojo cereza, se oxida rápidamente en el aire reproduciendo la hematina.

CAPITULO IV

Aplicación del espectroscopio al estudio de la hemoglobina y sus derivados

Haciendo incidir sobre un prisma P un haz de rayos solares A B y recibiendo los rayos emergentes sobre una pantalla, tendremos en esta, en lugar de una mancha de luz blanca B' una banda R V que presenta los colores del arco iris y en tre los cuales, podremos distinguir los siguientes: rojo, anaranjado, amarillo, verde, azul, indigo, violeta. (fig. 5).

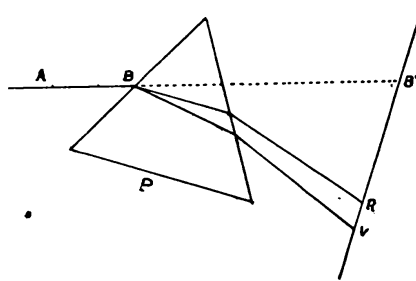


FIG. 5

Los rayos rojos que en la banda de colores ocu-

pan el lugar R, han sido los menos desviados, con relación a los rayos violetas V, que han sido los más desviados; entre los rojos y los violetas se han colocado los demás rayos, ocupando posiciones intermedias dadas, por su desviación.

Esta clasificación de los rayos desviados en siete colores, es arbitraria: en realidad no se puede precisar el punto exacto en que terminan los rayos rojos y comienzan los anaranjados. Hay tantos colores simples, como valores tiene el índice de refracción, esos colores se funden los unos en los otros, pues sus propiedades varían por grados insensibles, cuando se pasa del primero al último, dando la impresión de los siete colores mencionados.

La descomposición de la luz blanca en rayos coloreados, se llama dispersión y la banda luminosa toma el nombre de espectro solar.

Rayas de Fraunhofer. — Examinando con detención el espectro solar, se hallan en él un gran número de rayas negras, perpendiculares a la longitud del espectro, que se conocen con el nombre de rayas de Fraunhofer. Estas rayas ocupan posiciones determinadas en los diversos colores, sirviendo así, de puntos de referencia del espectro; unas forman grupos bastante compactos, otras están aisladas, pudiendo distinguirse ocho grupos característicos que se designan con las letras A., B., C., D., E., F., G., H., empleándose las letras a, b, c, d, ó a', b', c', para designar las rayas intermedias según su intensidad.

Las rayas de Fraunhofer más importantes, que pueden utilizarse como puntos de referencia, son las siguientes:

A	raya ancha difícil de percibir	se halla en el extremo rojo
a	grupo de muchas rayas	» » »
B		» » »
C		» » »
C—		anaranjado
D	raya doble	» » amarillo
E		» » verde
b	tres rayas	» » »
F		» » azul
G		» » indigo
H	dos rayas anchas	» » extremo violeta

Espectroscopio. — Para estudiar el espectro producido por el sol o por las varias fuentes luminosas, se podría hacerlo proyectando sobre una pantalla, los rayos que emergen del prisma. Pero este procedimiento no sería cómodo ni práctico, además, el espectro proyectado tendría muy poca intensidad. Para remediar estos inconvenientes, se ha ideado un aparato, que permite la observación más práctica y exacta de los espectros; este aparato es, el espectroscopio y consiste en lo siguiente:

Tres tubos A, B, C, convergen hacia un prisma (fig. 6). El tubo A, llamado colimador tiene en su extremidad una ventana o hendidura F, cuyo ancho se puede variar por medio de un tornillo, esta hendidura está dirigida hacia la luz S, que se examina; la otra extremidad del tubo A, lleva una lente convergente L, en cuyo plano focal está la hendidura F. Los rayos que parten de S, atraviesan la hendidura y como ésta se halla en el foco de la lente L, los rayos luminosos al emerger de la lente, salen en un haz paralelo. Este haz de rayo paralelos cae sobre la cara N Q del prisma, penetran en éste sufriendo una refracción y dispersión. Al emerger del prisma penetran en el tubo B, formando haces paralelos, los rayos que constituyen los diversos colores del espectro. Estos diver-

Los rayos penetran en el tubo B, atravesando una lente convergente O y van a formar en el plano focal

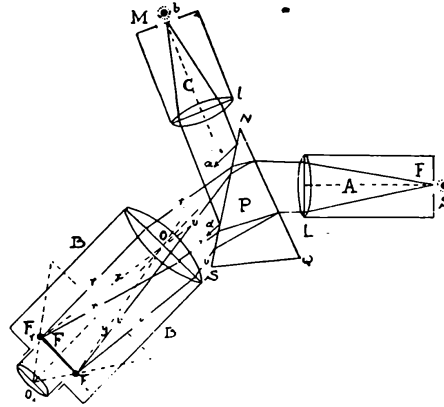


FIG. 6

Fr Fv, una imagen del espectro, imagen que se agranda, por medio de la lente ocular O1.

El tubo C, tiene una escala micrométrica M grabada sobre vidrio y en su extremidad una lente convergente l, en cuyo plano focal se halla la escala. La escala se ilumina por un foco de luz b y como dicha escala está en el plano focal de l, los rayos luminosos que parten de ella, al emerger de la lente l, lo hacen en un haz de rayos paralelos, haz de rayos que incide sobre la cara N S del prisma, donde se reflejan en los puntos a y d y penetran en el tubo B por la lente O, de modo tal que la imagen de la esca-

la, se forma en el mismo plano que la imagen del espectro, pudiendo entonces hacer coincidir las divisiones de la escala, ya sea con los colores del espectro o con las rayas del mismo por medio de un tornillo que se halla en M.

Comparación de dos espectros. — Puede suceder que sea necesario comparar al mismo tiempo y en la misma operación, dos espectros de fuentes luminosas diferentes. Para ello se aplica un pequeño prisma de reflexión total, sobre la hendidura del espectroscopio que se halla delante de los focos de luz, de modo que recubra la mitad de la misma, dejando la otra mitad libre. En estas condiciones, se colocan los focos luminosos: uno delante de la hendidura del espectroscopio, de modo que los rayos que emanen de él, la atraviesan y no incidan sobre el prisma colocado delante de la hendidura; el otro, lateralmente, de modo que los rayos que él envía atraviesen el prisma por uno de sus catetos y sean reflejados por su cara hipotenusa, la que los envía al prisma P, por el tubo A. Con este dispositivo, se tienen dos espectros de dos sustancias diferentes, yuxtapuestos.

Diferentes formas de espectros. — Según que los rayos luminosos, cuyo espectro se estudia, se observen tal como son emitidos por la fuente luminosa o después de haber atravesado un medio, que retenga parte de las radiaciones luminosas, se tendrán dos clases de espectros. En el primer caso se trata de espectros de emisión y en el segundo, de espectros de absorción.

Espectros de emisión. — *Espectros continuos.* — Los cuerpos incandescentes al estado sólido o líquido, producen esta clase de espectros, que se presentan como una banda ininterrumpida que contiene todos los

colores, desde el rojo al violeta inclusive. *Espectros de líneas.*—Los vapores o gases incandescentes, producen espectros que están formados por líneas brillantes, que se hallan repartidas en toda la extensión de lespectro y cuyo color, es el del lugar del espectro que ellas ocupan.

Espectros de absorción. — Haciendo pasar los rayos de luz blanca a través de un medio que absorba ciertas radiaciones se producen los espectros de absorción. En estos espectros faltan ciertos rayos o grupos de rayos que se manifiestan por la aparición de rayas o bandas oscuras, sobre un fondo brillante.

Espectro de absorción de la materia colorante de la sangre. — Coloquemos delante de la hendidura del espectroscopio, un pico Bunsen, que queme con muy poco aire, dando por consiguiente una llama luminosa.

El espectro que producirá la llama del pico Bunsen será continuo pues la luminosidad de la llama es debida a partículas sólidas que se hallan en la misma, al estado de incandescencia. Dejando el pico de Bunsen delante de la hendidura de lespectroscopio, interpongamos entre él y el espectroscopio, un recipiente (tubo de ensayo o cuba de vidrio a caras paralelas) que contenga una dilución de sangre fresca y observemos el espectro. Notarémos que el espectro continuo primitivo se ha modificado, apareciendo en él dos bandas oscuras y anchas, que ocupan una posición invariable. Estas bandas se hallan, una en el amarillo y otra en el verde. De modo que la oxihemoglobina, nos ha dado un espectro de absorción caracterizado por dos bandas negras.

Con las nociones ya adquiridas, estamos en condiciones de efectuar la observación espectroscópica de la

sangre. Las diversas partes de esta operación son las siguientes:

Reglaje del espectroscopio. — Se iluminan; la hendidura del espectroscopio y la escala graduada, por medio de dos fuentes luminosas. La hendidura se ilumina, ya sea con una bujía, lámpara eléctrica o pico Bunsen con llama luminosa; la fuente iluminante debe hallarse en el eje del tubo A. Para la iluminación de la hendidura, se puede emplear con buenos resultados un pico Bunsen con una camisa de incandescencia. Mirando por el tubo B. se tiene una imagen del espectro, que se regula a la vista del observador por medio del tornillo que llevo dicho tubo. El espectro está a punto, cuando es claramente visible, y sus bordes son netos lo que se obtiene por medio del tornillo y acercando o alejando la luz. Reglado el espectro, se ilumina la escala graduada con una fuente luminosa de poca intensidad, pues en caso contrario un exceso de luz de ella, perjudicaría la visibilidad clara del espectro; la iluminación de la escala debe permitir la lectura clara de las cifras grabadas en ella. El tubo C, que lleva la escala graduada, posee un dispositivo, que permite colocar a la vista del observador las graduaciones de la escala sin tocar el ocular, de B que ya ha sido colocado en posición conveniente para el espectro. Es conveniente que las divisiones del micrómetro, sean paralelas a las rayas del espectro, es decir, perpendiculares a la longitud del mismo y que la escala micrométrica caiga por encima del espectro luminoso, lo que se obtiene por un tornillo, que lleva el tubo C.

Reglado el espectro y la escala, le llega su turno a la hendidura del espectroscopio. Un tornillo adap-

tado a la extremidad del tubo A. que mira a la fuente luminosa permite abrir o estrechar la hendidura de dicho tubo. Esta hendidura debe ser suficientemente estrecha, posición que se obtiene, haciendo perder su luminosidad al pico situado delante de A; colocar en la llama un fragmento de sodio y mirando por el ocular de B, debe abrirse o cerrarse la hendidura hasta obtener con claridad, una raya delgada amarilla.

La escala graduada colocada en la parte posterior del tubo C, se halla grabada sobre un trozo de vidrio, las cifras y trazos de la misma, están invertidos. de modo que al mirarse por B, se vean normales. Las divisiones son micrométricas y su número varía según el espectroscopio, cualquiera que sea su numeración (que no tiene sino una importancia relativa) se des- plaza esta escala, por medio de un tornillo que lleva consigo, de modo que la división 80 de la escala micro- métrica, corresponda a la raya amarilla producida por el sodio.

Con estas operaciones se ha reglado el espectros- copio, el que no debe ser tocado durane la observación, para no falsear ésta.

Examen de la solución de sangre. — La sangre a examinar, convenientemente diluida, debe ser colocada entre la fuente luminosa y el espectroscopio (1). El recipiente que contiene la solución es una cuba de vi- drio a caras paralelas, cuyas dimensiones son las si- guientes: 10 milímetros por 30 milímetros, las dos diferentes dimensiones permitan observar el espectro de absorción a través de distintos espesores, según la

(1) El espectroscopio mas conveniente es el común a un solo prisma, pues os espectroscopios a dos prismas, dispersando muchos los rayos refractados, producen bandas de absorción, muy pálidas.

concentración de la solución de sangre (fig. 7. Puede utilizarse también un tubo de ensayo, pero es preferible el dispositivo anterior. En caso de que la can-

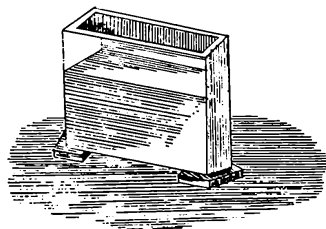


FIG. 7

tividad de sangre de que se disponga, sea muy pequeña, puede emplearse para contener la solución de la misma, una cuba celular que permita disponer una pequeña cantidad de sangre a través de un espesor relativamente grande, o construir con un tubo de vidrio, una especie de tubo polarimétrico, de capacidad muy reducida, pero con longitud grande. La técnica para obtener la solución de sangre o mancha de sangre, así como su conveniente solución y título, la exponemos en el capítulo siguiente.

Los diversos espectros de absorción que se pueden distinguir con el espectroscopio, en la materia colorante de la sangre y sus derivados, son los siguientes:

Oxihemoglobina. — La sangre fresca contiene oxihemoglobina y da el siguiente espectro de absorción:

Dos bandas de absorción en las rayas D y E, que corresponden a las divisiones 84-85 y 103-104 en el medio de ambas bandas; la primera es más estrecha

que la segunda. Tratando la oxihemoglobina por agentes reductores (ver capítulo siguiente) pasa al estado de hemoglobina y se obtiene el espectro de la

Hemoglobina — que se caracteriza por una banda única llamada banda de Stokes, que ocupa el espacio intermediario entre las dos bandas de la oxihemoglobina y es más pálida que estas últimas. La reducción se efectúa, echando unas gotas de sulfhidrato de amoníaco en la cuba de caras paralelas que contiene la solución de oxihemoglobina y esperando cinco minutos se ve la reducción de la hemoglobina.

Hemoglobina oxicarbonada. — La hemoglobina oxicarbonada, da un espectro de absorción caracterizado por dos bandas muy semejantes a las bandas producidas por la oxihemoglobina. Sin embargo, comparando simultáneamente los dos espectros, lo que se puede hacer utilizando el pequeño prisma a reflexión total que lleva la hendidura, se nota que las bandas de absorción de la sangre oxicarbonada, están desviadas un poco a la derecha de las bandas de la sangre con oxihemoglobina. Si en la cuba conteniendo sangre con hemoglobina oxicarbonada, agregamos un reductor cualquiera, por ejemplo unas gotas de sulfhidrato de amonio, no hay reducción alguna y las dos bandas persisten. (Diferencia con la hemoglobina).

Metehemoglobina. — El espectro de absorción de la metehemoglobina varía según que ella se encuentre en solución ácida o alcalina. En solución ácida, dá una banda en el rojo correspondiente a la división 68 de la escala en solución alcalina, da una banda pálida que corresponde a la división 80 de la escala.

Como la metehemoglobina, es un producto de transformación de la oxihemoglobina y como puede

acontecer que no toda la oxihemoglobina haya sido transformada, se observará en este caso al mismo tiempo, que el espectro de la metehemoglobina el de la oxihemoglobina.

Hematina. — Su espectro varía como el de la anterior, según que se halle en solución ácida o alcalina. La solución ácida, da una banda de absorción que corresponde a la división 58. En solución alcalina dá una banda de absorción que corresponde a la división 80.

Hemocromógeno. — Le hematina en solución alcalina, tratada por los reductores, se transforma en hemocromógeno, el que presenta las siguientes bandas de absorción: una banda negra y estrecha que corresponde a la división 98 de la escala, otra ancha, que corresponde a la división 112 de la escala.

Hematoporfina. — El ácido sulfúrico acciona sobre la oxihemoglobina, transformándola en hematoportirina, cuyo espectro varía según se halle en solución ácida o alcalina. En solución ácida, presenta tres bandas que corresponden a las divisiones 80, 100 y 118 de la escala; la que corresponde a la división 100, es la que presenta mayor intensidad. En solución alcalina, dá tres bandas que corresponden a las divisiones 92, 108 y 135 de la escala, desapareciendo por completo el espectro a partir de la división 170.

CAPITULO V

Hemolisis

Al tratar de la presión osmótica de la sangre, vimos que la tensión osmótica del plasma sanguíneo, era isotónica con una solución de Cl Na al 0.92 o/o y que esa tensión osmótica equilibraba la tensión interna del glóbulo rojo, de modo que una disminución de la tensión del plasma, traía por consecuencia la deformación del glóbulo y el pasaje de la hemoglobina al plasma, en el que se disolvía, coloreándolo. La sangre se hace transparente y límpida. Este fenómeno de la destrucción del glóbulo y difusión de su materia colorante, se conoce con el nombre de hemolisis. In vitro se produce la hemolisis, cuando se colocan los glóbulos rojos en un medio hipotónico y tiene su maximum en el agua destilada.

En condiciones fisiológicas, cuando los hematíes han cumplido su ciclo evolutivo, al llegar a ciertos órganos y probablemente por la acción de enzimas hemolíticas que ségregan estos órganos, pierden los hematíes su hemoglobina total o parcialmente, siendo su estroma englobado por los leucocitos macrófagos, quienes lo digieren en parte y en parte también por el plasma de los órganos hemolíticos.

La hemoglobina es transformada en pigmentos biliares. Normalmente, esta destrucción de los glóbulos no se efectúa en el torrente circulatorio, sino en ciertos órganos como el hazo. En condiciones anormales esta hemolisis se realiza en otros órganos y aún dentro de los vasos, y en este caso se conoce con el nombre de hemolisis.

Ciertos compuestos tóxicos para el hematíe, lo destruyen dentro del aparato circulatorio, el estroma es destruido, la hemoglobina se disuelve en el plasma y la sangre se hace transparente. Estos mismos agentes que producen in vivo la hemolisis, también la producen in vitro.

AGENTES HEMOLITICOS.—Los agentes hemolíticos de uso más frecuente son el agua destilada y las soluciones hipotónicas, respecto al plasma. Pero hay otras sustancias que producen la hemolisis, independientemente de la presión osmótica de la solución en que son empleadas. Estas sustancias obran cualquiera que sea su concentración, y su acción es mayor, cuanto mayor es ella. Lo que se explica fácilmente, pues dichas sustancias obran por sí, son verdaderos venenos electivos para la sangre. Entre ellos encontramos glucósidos como la digitaleína, saponina, salicina; toxalbuminas de origen vegetal: ricina, abrina, ponsoña de serpientes, de escorpión, venenos microbianos, silicatos, la antipirina, bilis, ciertas orinas patológicas isotónicas con el plasma, algunos extractos orgánicos, muscular, tiroideo, pancreático, hepático, el sudor, toxinas microbianas y los sueros de la sangre de animales de otras especies, siendo tanto más intensa su acción, cuanto mayor es la semejanza entre dichas especies.

La forma en que obran estas sustancias es oscura aún, se supone que se trata de una acción enzimática.

El éter, alcohol, bencina, sulfuro de carbono, la bilis, tienen un poder hemolítico propio y se acepta que en este caso, el fenómeno de hemolisis, no es producido por una disminución de la presión osmótica del medio que rodea al glóbulo, pues dichas sustancias obran en medio isotónico. Y teniendo en cuenta que esas sustancias son disolventes de los lipoides, se admite que la hemolisis, en esos casos, es producida por una disolución de las lipoides, en especial de la lecitina de la pared globular.

Los ácidos y las bases producen hemolisis, los primeros, coagulando y precipitando las sustancias proteicas y los lipoides del estroma, y los segundos saponificando los lipoides. En uno y otro caso reblandecen el estroma, modificando así las condiciones físicas del glóbulo y ocasionando la difusión de la hemoglobina. El suero de la sangre de ciertos animales, tiene propiedades hemolíticas naturales para los glóbulos rojos de otra especie: así: el suero de sangre de anguila, es hemolítico para los glóbulos rojos de todos los mamíferos; el suero de sangre de perro, es hemolítico para los glóbulos de cobayo; el suero de sangre humana, es hemolítico para los glóbulos de carnero. Al lado de estos sueros hemolíticos naturales, tenemos los artificiales. Si a un animal de la especie A, le inyectamos en la cavidad peritoneal glóbulos rojos de la especie B tomando las precauciones necesarias, al cabo de un cierto tiempo el suero de A, es hemolítico respecto a los glóbulos rojos de B, disolviendo por consiguiente los hematíes de B.

HEMOLISINAS.—Las hemolisinas son sustancias

que determinan la disolución de la hemoglobina, contenida en el hematíe. En un sentido general, esta definición comprende a todas las sustancias capaces de producir la hemolisis; pero en el sentido estricto de la palabra, esa denominación se aplica, no a las sustancias que obran, ya sea destruyendo el estroma o porque en virtud de la presión que determinan en la solución que se emplea, rompen el equilibrio de presiones y permiten en una y otra forma, el pasaje y la disolución de la hemoglobina, en el líquido en que se hallan los glóbulos rojos, sino más bien, a aquellas sustancias que obran independientemente de las causas arriba citadas y su acción *per se* las convierte en toxinas del glóbulo rojo. La aloína, la ricina, la crotina, que aún en cantidades infinitesimales son capaces de disolver cantidades grandes de glóbulos rojos de oveja o de conejo que se encuentran en un medio isotónico, son hemolisinas en el sentido estricto.

Del mismo modo, el suero de anguila y los sueros de muchas especies animales, que tienen propiedades hemolíticas para los glóbulos rojos de otras especies, contienen hemolisinas; en este caso, son hemolisinas naturales. El suero de la especie A, preparado el animal convenientemente, por inyecciones intraperitoneales de glóbulos rojos de especie B, contienen hemolisinas artificiales respecto a los glóbulos de B, y en este caso, específicas.

La especificidad de las hemolisinas de A respecto a los glóbulos de B, está dada por el hecho de que el suero de de la sangre de A disuelve únicamente los glóbulos rojos de la especie B. Esta especificidad es bastante grande y si bien las hemolisinas de A, disuelven los glóbulos rojos de cualquier animal de la

especie B, no manifestándose su acción hemolítica para los glóbulos rojos de otra especie distinta, esta regla sufre limitaciones, interviniendo en ciertos casos lo que Kolle y Hestch, llaman reacción del grupo. Esta reacción interpreta el hecho de que el suero de A, preparado hemolítico, respecto a B, disuelve también los glóbulos rojos de otra especie afin; lo que sucede, por ejemplo, con el suero preparado hemolítico para la sangre humana, que acciona sobre la sangre de mono y vice-versa.

SUEROS HEMOLITICOS. — Nos ocuparemos del estudio de los sueros hemolíticos, artificiales y específicos. Su en la cavidad peritoneal del animal de la especie A, inyectamos glóbulos rojos del animal de la especie B, tomando las precauciones y en la forma que más adelante indicaremos, al cabo de un cierto tiempo, el suero de la sangre de A, tiene la propiedad de hemolisar los glóbulos rojos de cualquier animal de la especie B. Pasaremos revista a las condiciones que hay que satisfacer, para la obtención de un suero hemolítico.

Animal que sufrirá la inyección de glóbulos rojos. — El animal escogido para inyectarlo, será tanto mejor productor de hemolisinas, cuanto más diste su especie, de la especie a que pertenezca la sangre empleada para la inyección. El suero de la sangre del animal inyectado, no debe tener propiedades hemolíticas naturales para los glóbulos rojos que se empleen en la inyección. Además, debe producir con facilidad hemolisinas. El conejo responde a las anteriores condiciones; el suero de su sangre no tiene propiedades hemolíticas naturales, para los glóbulos de hombre, carnero, buey, caballo y cobayo. Elegido el animal, se le

practican, en la cavidad peritoneal, varias inyecciones de glóbulos rojos para los cuales se quiere obtener suero hemolítico. Estas inyecciones se hacen con intervalo de algunos días entre cada una de ellas y como a veces mueren los animales en el curso de la preparación, es conveniente inyectar al mismo tiempo, tres o cuatro.

Preparación de los glóbulos. — La sangre que va a proveernos de los glóbulos rojos, debe ser obtenida en las mejores condiciones de asepsia. Se recoge por medio de una cánula esterilizada que se introduce en la carótida, o también puede introducirse en la yugular externa. La sangre que gotea de la cánula, se recibe en un balón de 250 cc. de capacidad, preferentemente en un frasco de Erlermeyer, cualquier recipiente que se emplee con ese objeto, debe ser esterilizado y contener, hasta la cuarta parte inferior, perlas de vidrio. Se recibe la sangre hasta las dos terceras partes de la capacidad del recipiente, se tapa con un trozo de algodón esterilizado y se agita regularmente, imprimiéndole un movimiento de rotación, hasta que las perlas se aglutinen por los filamentos de fibrina y la sangre que sobrenada quede líquida. Esta operación se conoce con el nombre de desfibrinación de la sangre. Desfibrinada la sangre, hay que proceder al lavaje de los glóbulos. Para ello, se colocan en cada uno de los tubos de una centrifuga, 1/5 de sangre desfibrinada, teniendo la precaución de marcar con un lápiz, el nivel de la sangre en dicho tubo, luego se acaba de llenar con agua salada fisiológica esterilizada al 0.92 o/o y se coloca el tubo en la centrifuga, centrifugando, hasta la completa sedimentación de los glóbulos. Obtenida esta sedimentación

de los glóbulos, se decanta el agua y se añade al mismo tubo, otra cantidad de agua salada fisiológica, como la primera vez, se agita el tubo para que todos los glóbulos queden suspendidos en el líquido y se centrifuga nuevamente. Después del tercer lavaje y decantación del agua, se añade agua salada fisiológica, hasta el trazo que se marcó con lápiz y tendremos una mezcla de glóbulos y solución fisiológica, cuyo volumen será igual al de la sangre correspondiente.

Preparados ya los glóbulos, es conveniente efectuar inmediatamente la inyección, al animal elegido, pero si el caso lo exige, pueden ser empleados dos o tres días después, siempre que hayan sido conservados en la heladera, tapado el recipiente que los contiene con algodón esterilizado.

Armand Delille, aconseja, para conservar los glóbulos un tiempo mayor, añadirles después del lavaje formol del comercio, en la proporción de 1 por 500; el autor citado, ha conservado así hematíes durante un tiempo mayor de tres semanas, sin que presentaran alteración.

Inyección de los glóbulos. — Los glóbulos que se van a inyectar, se aspiran por una jeringa provista de su aguja, para evitar se oblitere por los grumos y filamentos fibrinosos. Se inmoviliza el animal, ya sea por un aparato especial o con la intervención de un ayudante, la faz ventral debe mostrarla al operador. Se le quitan los pelos de la pared abdominal en una pequeña zona, en la vecindad de la línea media de la región sub-umbilical y se desinfecta con tintura de yodo un pequeño trozo de dicha región, en el punto en que penetrará la aguja de la jeringa. Se toman con los dos dedos de la mano izquierda, la piel

de la región desinfectada, haciendo un pliegue con ella, en el cual no estarán comprendidas las ansas intestinales; se pasa de parte a parte el pliegue con la aguja de la jeringa, luego se retira la aguja hasta que su extremidad quede en la cavidad peritoneal y se hace la inyección, manteniendo la jeringa horizontal. (1)

Las inyecciones deben hacerse con un intervalo de 5 á 6 días y algunos aconsejan una semana y su número debe ser de 5 a 6. Cuando sea necesario obtener rápidamente un suero hemolítico, se pueden hacer las inyecciones con un intervalo menor de tiempo, de 4 en 4 días por ejemplo, pero en este caso, la dosis de glóbulos inyectados debe ser menor, 2 a 3 centímetros cúbicos.

Recolección del suero hemolítico. — Ocho días después de la última inyección, el animal debe ser sangrado. Lo más conveniente es sacrificarlo y recoger la mayor cantidad posible de sangre, cuyo suero tendrá un título fijo, respecto a su poder hemolítico. Si se desea conservar el animal, se puede efectuarle sangrías parciales, pero con el inconveniente de tener suero hemolítico, con distinto título. El primer camino es el mejor, pues el suero hemolítico, se conserva sin debilitarse por un período mayor de un año. El procedimiento más práctico para recoger la sangre, es la sangría en la carótida por medio del tubo pipeta de vidrio, que la figura siguiente dá una idea. (fig. 8)

Los tubos pipeta tienen una capacidad de 50 cc.

(1) Respecto a la técnica a seguir en la inyección, hay varias que pueden consultarse en las distintas obras especiales. Nosotros seguimos la que detallamos.

y como un conejo de 2 y 1½ ks. produce fácilmente 70 a 80 cc. de sangre, se hacen necesarios dos tubos pipetas.

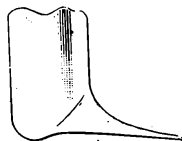


FIG. 8
Tubo pipeta cortado en bisel para puncionar la arteria

La sangría se practica en la forma siguiente: se inmoviliza el conejo, cuya cara ventral debe mirar hacia arriba, se le quitan los pelos en la cara anterior del cuello y luego en dicha parte, se hace una incisión longitudinal sobre la línea mediana; se aísla la carótida y se desnuda ésta sobre una extensión de dos centímetros, se liga la extremidad superior de la porción desnudada y un centímetro por debajo de la ligadura, se coloca una pinza de presión continua. en el segmento comprendido entre la ligadura y la pinza, se introduce la extremidad del tubo pipeta. La sangre penetra en el tubo hasta una cierta altura. en que la presión sanguínea disminuyendo, será necesario para que penetre más sangre en el tubo, comprimir la masa abdominal y ejercer presiones en las partes laterales del tórax del animal. Cuando no penetre más sangre en el tubo pipeta, se retira, teniendo la precaución de aspirar por medio de la boca, la extremidad superior del tubo, pues de lo contrario, se perdería sangre. En esta condición se cierra el tubo por medio de un pico Bunsen, se tapa con algo-

dón esterilizado y se guardan los tubos en un armario oscuro, donde se dejan por espacio de 24 horas. Los tubos con sangre no deben ser colocados en una heladera, pues el frío impide la retracción del coágulo. Entre las tres y diez horas siguientes a la sangría, es conveniente desprender el coágulo del tubo; puede obtenerse este desprendimiento, colocando en cada tubo antes de esterilizado y por consiguiente, con anterioridad a la extracción de la sangre, una gota de solución fisiológica. Cuando el coágulo ha abandonado la mayor cantidad de suero, se decanta este último por medio de una pipeta esterilizada y se le distribuye en varios tubos que se conservan en la heladera. (fig. 9)

Si se desea obtener rápidamente suero hemolítico, y que él sea muy límpido, se puede hacer la sangría por medio de una cánula, recoger la sangre en un tubo de centrifuga, centrifugar y entonces en la parte superior del tubo, queda un suero muy claro que se puede decantar.

Mecanismo de la acción de un suero hemolítico. — Supongamos tener suero de conejo hemolítico para los glóbulos de carnero, y pongámoslo en contacto con glóbulos de carnero; la hemolisis se produce. Pero, si antes de efectuar esa mezcla de glóbulos y suero hemolítico, calentamos dicho suero a la temperatura de 55-56°, la hemolisis no se produce. Luego el suero hemolítico llevado a la temperatura de 55-56°, pierde su poder hemolítico, pero no de un modo permanente, pues si a la mezcla de suero hemolítico y glóbulos calentados a 55-56°, le agregamos una pequeña cantidad de suero nuevo de conejo o de cualquier otra especie animal, que no hayo sido calentada a

55-56°, la hemolisis se produce. Luego, la adición de suero nuevo de cualquier especie animal, ha reactivado

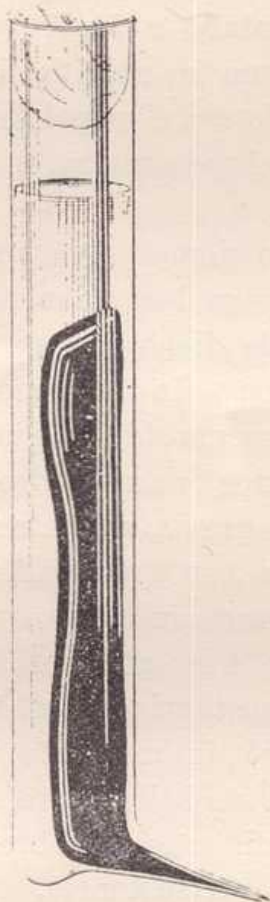


Fig. 9

Tubo pipeta con suero y el coagulo retraido .

la acción hemolítica del suero calentado. Por consiguiente, en los sueros no calentados, existe una sustancia que complementa la acción de la hemolisina, y que ha merecido por esta razón, el nombre de complemento. Esta sustancia no es específica, pues se halla en los sueros de todas las especies animales y su modo de comportarse respecto al calor, la clasifica como una sustancia termolábil. Ehrlich, llama

a dicha sustancia complemento; Buchner, la designa alexina y Metchnikoff, citasa.

Al suero calentado a 55-56°, se le llama suero inactivo y al que no ha sufrido la acción del calor, activo. Establecido así el papel del complemento, pasemos a estudiar el mecanismo de la acción del suero hemolítico.

Si continuando siempre con nuestro suero de conejo hemolítico para los glóbulos de carnero, hacemos una mezcla de dicho suero, calentado a 55-56°, y glóbulos de carnero, la colocamos durante una hora a la estufa, a esa misma temperatura, luego la retiramos y centrifugamos para sedimentar los glóbulos; recogemos éstos, previa decantación del suero; lavamos los glóbulos con agua salada fisiológica, en la forma que ya hemos indicado, y añadiendo suero nuevo no calentado a los glóbulos, la hemolisis se produce. Luego la sustancia hemolítica que se hallaba en el suero, se fijó íntimamente sobre los glóbulos, sensibilizándolos hemolíticamente, para la acción del suero, lo que justifica el nombre de sensibilizatriz, que Bordet dió a esta sustancia. Si el suero hemolítico que estuvo en contacto con los glóbulos y que separamos por decantación, lo ponemos en contacto con otra cantidad de glóbulos rojos y suero nuevo, la hemolisis no se produce; lo que prueba que el primer lote de glóbulos que estuvo en contacto con dicho suero, absorbió la sensibilizatriz que se fijó sobre ellos, despojándolo por completo de ella.

La forma anterior, no es la única para obtener la fijación de la sensibilizatriz sobre los glóbulos; colocando durante 24 horas en una heladera, temperatura a la que no se produce hemolisis, glóbulos con sue-

ro hemolítico para ellos, separando por centrifugación y lavando los glóbulos, se comprueba como en el caso anterior, que los glóbulos se han sensibilizado, quitándole al suero su sensibilizatriz hemolítica y dejándole su complemento.

La sensibilizatriz hemolítica, es específica, se fija enérgicamente sobre los glóbulos para los cuales, fué preparado hemolítico el suero que la contiene; y así vemos que el suero de conejo, preparado hemolítico para los glóbulos de carnero, no tiene acción sobre los glóbulos de otras especies. Es una sustancia termoestable, pues el calor no la destruye. Bordet la llama sensibilizatriz, en cambio Ehrlich, la designa con el nombre de amboceptor, por el hecho de que sirve de intermediaria entre el glóbulo y el complemento, para que la hemolisis tenga lugar.

Las dos figuras siguientes dan una idea esquemática, del fenómeno de la hemolisis. (fig. 10)

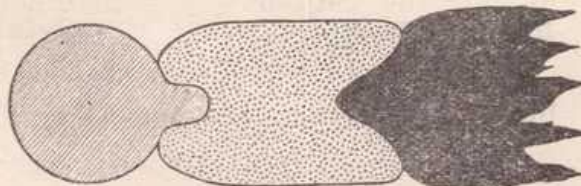


FIG. 10

Fijación del Complemento
(Lámina de A. Delille)

Titulaje del poder de un suero hemolítico. — Con el objeto de aclarar los anteriores conceptos y familiarizarnos con ellos, indicamos un titulaje de un suero hemolítico.

Tomemos varios tubos de ensayo y en cada uno de ellos, coloquemos 1 cc. de una dilución al 5 o/o de glóbulos rojos en solución fisiológica, luego añadimos cantidades variables de suero hemolítico calentado; en estas condiciones tenemos en cada uno de los tubos glóbulos rojos y sensibilizatriz, faltándonos complemento para que se efectúe la hemolisis.

A este objeto se agrega, a cada uno de los tubos con la anterior mezcla, 1 cc. de suero nuevo de cobayo, no calentado, también diluido, y por último se completan con distintas cantidades de agua fisiológica de manera de obtener un volumen final de 2 cc. en cada tubo. Efectuadas las anteriores mezclas, se llevan todos los tubos a la estufa, a la temperatura de 37-38° y se observa frecuentemente la marcha de dichos tubos. Se nota que en todos ellos se ha producido hemolisis; en unos totalmente y en otros, parcialmente. Como en cada tubo tenemos para la misma cantidad de glóbulos, distinta de suero hemolítico, indudablemente que el fenómeno de la hemolisis, habrá requerido distinto tiempo en los diferentes tubos. En aquéllos en que fué rápida la hemolisis, había cantidad exagerada de suero hemolítico; otros de los tubos no presentan hemolisis completa, aun en las mejores condiciones, dejándolos mucho tiempo en la estufa, luego estos tubos contenían cantidades pequeñas de suero hemolítico. Toda la investigación consiste en hallar la dilución más baja, para que con

ella y en el término de media hora se produzca hemolisis total.

Suero hemolítico para los glóbulos de carnero. calentado á 56°. — Para el titulado de un suero hemolítico para los glóbulos de carnero, las diluciones y elementos necesarios, son los siguientes:

Glóbulos. — Glóbulos rojos de carnero recogidos el mismo día, lavados por centrifugación y diluidos en solución fisiológica en la proporción de 5 de glóbulos y 95 de solución. Antes de diluir los glóbulos, deben ser llevados al volumen inicial de sangre, como ya hemos indicado.

Suero nuevo de cobayo, no calentado. — Este suero se diluye en la siguiente forma: 1 cc. de suero y 3 cc. de agua fisiológica.

Agua salada fisiológica o solución fisiológica o agua fisiológica. — Solución de cloruro de sodio al 9.2 por 1000.

Tubos de vidrio de 12 centímetros de alto y 12 milímetros de diámetro; pipeta de 1 cc., graduada al décimo. Los tubos y la pipeta convenientemente tapados con algodón y esterilizados.

Las sustancias que se colocan en los tubos se hacen en el orden siguiente: glóbulos, suero hemolítico, suero nuevo de cobayo y la cantidad de solución fisiológica para llevar el volumen a 2 cc.

El cuadro siguiente dá una idea muy clara del titulado:

TUBOS	Glóbulos diluidos al 5 ojo	Suero hemolítico calentado	Suero de cobayo nuevo	Agua fisiológica	RESULTADO
Nº 1	1 cc.	0.5 cc.	0.1 cc.	0.4 cc.	Hemolisis total en 10 minutos.
» 2	1 »	0.4 »	0.1 »	0.5 »	Hemolisis total en un cuarto de hora.
» 3	1 »	0.3 »	0.1 »	0.6 »	Hemolisis total en un cuarto de hora.
» 4	1 »	0.2 »	0.1 »	0.7 »	Hemolisis total en un cuarto de hora.
» 5	1 »	0.1 »	0.1 »	0.8 »	Hemolisis casi total en un cuarto de hora, total en media hora.
» 6	1 »	0.05 »	0.1 »	0.85 »	Hemolisis casi total en media hora.
» 7	1 »	0.01 »	0.1 »	0.9 »	Hemolisis ligera en media hora.
» 8	1 »	sin suero	0.1 »	0.9 »	Hemolisis nula.
» 9	1 »	0.5 cc.	sin suero	0.5 »	Hemolisis nula.
» 10	1 »	0.5 »	» »	1.0 »	Hemolisis nula.

Como vemos, el tubo núm. 5, es el que tiene las dosis mejores para la hemolisis. Una vez titulado el suero hemolítico, el título obtenido no es necesario verificarlo cada vez que se utilice el suero, pues se conserva durante mucho tiempo. Del mismo modo que hemos titulado un suero hemolítico, podemos también titular la actividad aléxica de un suero, variando entonces en la experiencia anterior, las cantidades de suero de cobayo que contiene la alexina.

PRECIPITINAS. — Hemos visto al estudiar la hemolisis, que inyectando ciertos elementos morfológicos a un animal, se obtiene en el suero de su sangre, agentes disolventes para los mismos; análogamente sucede inyectando ciertos líquidos que nos pro-

ducen en el suero de la sangre del animal inyectado, propiedades precipitantes para el líquido inyectado.

Si en la piel o el peritoneo de un animal de la especie A. inyectamos suero sanguíneo de la especie B, el suero de A tiene propiedades precipitantes respecto a la sangre de cualquier animal de la especie B. Estas propiedades precipitantes, no son determinadas únicamente por la inyección de elementos celulares, sino que también pueden obtenerse sueros precipitantes y específicos para las especies bacterianas, para las distintas albúminas, para las diferentes carnes, etc. Bordet que fué quien inició esta clase de trabajos, inyectó en el peritoneo de un conejo, leche de vaca y obtuvo de la sangre de dicho animal, un suero, que precipitaba la leche de vaca.

Tsistowitsch, inyectando a un conejo suero de sangre de caballo, obtenía un suero precipitante, artificial y específico, para la sangre de caballo. Wasermann y Schütze, inocularon conejos, con distintas especies de leche: de vaca, mujer, cabra, y observaron que los sueros de los animales inyectados, tenían cada uno de ellos la propiedad de coagular la leche, con que habían sido inyectados.

Los autores arriba citados y con ellos Biffi y Uhlenluth, efectuaron numerosas experiencias, con objeto de obtener sueros precipitantes, artificiales y específicos. Uhlenluth, inoculó conejos, con albúmina de huevos de gallina, unos y otros con albúmina de huevos de paloma; obteniendo de esos animales, sueros que adicionados a las soluciones de albúmina del mismo origen, con un título de 10 ojo, daban un precipitado manifiesto.

Muchas experiencias posteriores han venido a de-

mostrar la posibilidad de diferenciar, por el método de los sueros precipitantes específicos, las distintas albúminas.

Como las sustancias que hemos utilizado para inocular el animal elegido, contienen sustancias proteicas, los sueros precipitantes, lo serán para la albúmina del organismo que nos proveyó de la sustancia a inocular y serán específicos para dichas albúminas, consideradas con las albúminas de otras especies animales, pero la reacción será común a todos los líquidos albuminosos de ese organismo. En tal sentido, las manchas de esperma humano, dan la misma reacción que las manchas de sangre humana y esto se explica por las sustancias proteicas de ambas, de igual origen.

Las aplicaciones de los sueros precipitantes son numerosas: en química legal, nos permiten diferenciar la sangre humana, de la sangre de otra especie animal; con los sueros precipitantes podemos diferenciar las distintas albúminas; en higiene, se utilizan dichos sueros precipitantes para diferenciar las carnes de las distintas especies animales y aun para indicarnos carnes que pueden ser muy peligrosas para el consumo, como sucedería con la carne carbunculosa. Y hasta es posible, en presencia de huesos que contengan aun albuminóideos, poder determinar la especie a que han pertenecido dichos huesos.

Las sustancias contenidas en un suero, y que determinan precipitaciones, se llaman precipitinas. Análogamente con los sueros hemolíticos naturales, tenemos sueros precipitantes naturales y por consiguiente, precipitinas naturales; lo que sucede con el suero normal de buey, que precipita los extractos albuminosos del bacilo typhosus y los sueros normales de ove-

ja, cerdo y caballo, que precipitan el virgula colérico.

Especificidad de los sueros precipitantes. — Dado la naturaleza y el número de problemas que debe resolver un suero precipitante; el grado de especificidad del mismo, es de suma importancia. A veces sucede que un suero precipitante, lo es para distintas albúminas muy afines; así, el suero de un conejo inyectado con suero de pollo, produce un precipitado en soluciones de sangre de paloma; del mismo modo el suero precipitante para la sangre de cabra, puede serlo para la sangre de carnero. Estos inconvenientes pueden evitarse, empleando sueros cuya eficacia y especificidad, hayan sido establecidas previamente con gran exactitud. La sustancia a inyectar debe provenir de un animal cuya especie zoológica, diste lo más posible de la especie a que pertenece el animal inyectado. Se puede prever la importancia de este punto, recordando que el suero de un conejo, inmunizado con el suero humano, precipita no solo la albúmina humana, sino que también la del mono. El tratamiento de los animales para la obtención del suero precipitante, tiene importancia en lo relativo a la especificidad; cuanto más largamente y con mayor intensidad son inyectados, menor es su especificidad.

Modo de acción de las precipitinas. — La precipitación ocasionada por un suero precipitante, tiene lugar por la combinación de la precipitina que se halla en el suero específico, con la sustancia precipitable, que podemos llamar precipitinógena, que contiene la solución de una sustancia proteica o el filtrado de una cultura bacterica.

Las precipitinas son bastantes resistentes al ca-

lor, en cambio, por la acción del tiempo se alteran, aconsejándose para conservarlas, la adición de cloroformo o fenol. Respecto a su composición química se las considera como globulinas. Los conocimientos que se tienen de ellas son bastantes incompletos.

Obtención de un suero precipitante para la sangre humana. — Siguiendo un procedimiento análogo al del suero hemolítico, indicaremos todos los puntos y detalles que interesa conocer, para obtener un suero precipitante.

- a) *Animal que sufrirá la inyección.* — Varias especies de animales han sido propuestas para ser utilizados en la inyección, pero el más indicado y el que se emplea en todos los laboratorios para la obtención de suero precipitante para la sangre humana, es el conejo. Debe ser elegido un animal joven y en buen estado.
- b) *Sustancia a inyectar.* — La sustancia que se inyectará al conejo, será suero de sangre humana. A causa de la dificultad que se presenta muchas veces para conseguir sangre humana, algunos experimentadores aconsejan y utilizan otros líquidos provenientes del organismo y conteniendo albúmina humana, como ser: líquido pleural, líquido ascítico, líquido del hidrocele, del quiste del ovario, leche de mujer y hasta orina albuminosa. Los dos primeros son los que tienen mayor aceptación. En el caso de inyectar dichos líquidos, por falta de sangre humana, es conveniente concentrarlos previamente, lo que puede conseguirse por medio del calor o sometiendo el líquido a inyectar a la acción de temperatu-

ras muy bajas, en las que cristaliza el agua y no las sustancias albuminóideas; por repetidas cristalizaciones y eliminación de los cristales, se llega a concentrar suficientemente el líquido albuminoso que se va a inyectar.

Lo más aceptado y conveniente, es inyectar al conejo suero de sangre humana. Pudiéndose procurar esta última en los hospitales, ya sea sangre de urémicos o cardíacos, también puede usarse sangre de placenta. La sangre debe ser recogida en un tubo esterilizado y desfibrinada en la forma que hemos indicado al ocuparnos de los sueros hemolíticos. Desfibrinada la sangre, se centrifuga, recogiendo asépticamente el suero, que es el que se inyectará al animal.

- e) *Inyección al animal.* — Es conveniente inyectar al mismo tiempo 3 o 4 conejos, pues en el transcurso de las inyecciones, aun tomando todas las precauciones necesarias, mueren algunos de ellos en virtud de fenómenos anafilácticos.

Las inyecciones pueden hacerse por distintas vías, nosotros seguimos la que hemos indicado al hablar del suero hemolítico.

- d) *Cantidad de líquido a inyectar.* — La cantidad de líquido a inyectar, el número de las inyecciones y el intervalo que debe existir entre ellas, varía según la vía que se ha elegido y según los experimentadores. El cuadro siguiente dá una idea clara del asunto:

AUTOR	Via de la inyección	Cantidad de líquido	Número de inyecciones	Intervalo entre cada inyección
Kolle y Hetsch	subcutánea	8 a 10 cc.	5 a 6	4 a 6 días
" "	intravenosa	2 a 5 "	3 a 4	4 a 5 "
Uhlenhuth	intra peritoneal	10 "	3	6 "
Buida	id.	1 a 2 "	8 a 10	diarias
Wassermann	id.	5 a 10 "	5 a 6	2 días
Herscher	id.	5 a 10 "	5 a 6	2 días
Vigano	id.	2 a 3 "	4 a 5	5 a 6 días
Citron	endovenosa	1 "	3 a 4	6 días

En la obtención de los sueros precipitantes que hemos utilizado en el presente trabajo, hemos inyectado suero humano en una cantidad de 4 a 5 cc., en número de 5 inyecciones, con un intervalo entre cada inyección de 6 a 7 días.

- e) *Recolección del suero precipitante.* — Ocho días después de la última inyección, debe recogerse el suero precipitante. Generalmente antes de extraerle toda la sangre posible al animal y sacrificarlo por consiguiente, se recomienda hacer un ensayo, practicándole una pequeña sangría en la oreja y probar por medio de algunas reacciones, si el suero tiene suficiente actividad.

La sangría definitiva, se hará en la misma forma que la que hemos indicado para el suero hemolítico. Es conveniente no alimentar el animal las 24 horas anteriores a la sangría para evitar tener un suero opalescente. Retraído el coágulo en el tubo pipeta, se decanta el suero por medio de una pipe-

ta esterilizada y se le coloca, distribuyéndolo, en ampollas de 1 cc. de capacidad, cada una.

Tratándose de la naturaleza física del fenómeno, que producirá el suero precipitante, es absolutamente necesario que sea límpido. Si el suero obtenido, no es límpido, puede esperarse, de una simple sedimentación, que recupere su limpidez. Si ella no dá resultado puede recurrirse a una centrifugación, y en último caso, filtrarlo. El procedimiento más indicado es la filtración, con un filtro Berckefeldt. Para terminar, diremos, que un suero que no sea completamente límpido, no debe utilizarse.

f) *Conservación del suero.* — El suero bien límpido se distribuye en ampollas de vidrio, de 1 cc. de capacidad. Las ampollas que hemos empleado con tal objeto, han sido las que se destinan para contener líquidos para inyecciones hipodérmicas. Hemos elegido ampollas de color amarillo, si se quiere mejor, caramelo; las hemos llenado con suero, siguiendo la misma técnica que se emplea para llenarlas, en la industria y fueron cerradas por medio de un mechero Bunzen. Las ampollas habían sido previamente esterilizadas. Para conservarlas, las guardamos en una heladera, donde no sufrían la acción de la luz.

Como la producción de un suero precipitante, es el resultado de una preparación larga y aun costosa, tiene mucha importancia, el problema de su conserva-

ción. Con tal fin se añaden al suero precipitante diversas sustancias: ácido fénico (0.5 o/o), cloroformo (1 o/o), tolnol (pequeñísimas cantidades). Con objeto de comprobar si un suero precipitante, conservado con la adición de antisépticos, sufre modificaciones, se han hecho numerosas experiencias. Weidanz, ha comprobado que el ácido fénico es perjudicial al suero precipitante; Graham Smith, como resultado de sus investigaciones llegan a la conclusión que todos los antisépticos perjudican el suero precipitante. Además el agregado de sustancias conservadoras, modifica la limpidez del suero, condición indispensable, para la reacción precipitante.

Uhlenhuth, en el laboratorio de Salud Pública de Berlín, conservó sueros precipitantes, en frascos esterilizados, al reparo de la luz y del calor, durante varios años, sin que hubiese sufrido alteración alguna la acción precipitante de los mismos. Las muestras que no habían sido suficientemente protegidas, habían sufrido solamente, una modificación del título.

Actualmente, después de las experiencias de Uhlenhuth, se conservan los sueros en lugares frescos y al abrigo de la luz, colocándolos en recipientes esterilizados.

Después de algún tiempo, se observan, en los sueros precipitantes, un depósito gris-amarillento, resultado de una auto-precipitación: este depósito se puede eliminar centrifugando el suero, la única precaución a tomar luego, es verificar el título del suero precipitante. También si el ambiente en que se encuentra el suero es demasiado fresco, se suelen encontrar en los recipientes que contienen el suero pre-

cipitante: un enturbamiento y a veces un precipitado, que desaparecen calentando ligeramente.

REACCION PRECIPITANTE. — La reacción precipitante puede practicarse en dos formas distintas: reacción floconosa y reacción zonal.

Reacción floconosa.—El líquido o la dilución en los cuales se investiga la precipitina específica y el suero precipitante, se mezclan. La reacción se produce como un enturbamiento con pequeños flocos que luego se precipitan en el fondo de la probeta.

Reacción Zonal. — Los dos líquidos no se mezclan, se colocan superpuestos y en la zona de separación se forma un anillo opalescente. La figura siguiente muestra un aparatito muy sencillo y cómodo para practicar la reacción precipitante. (fig. 11)

Se vierte en la probeta 1|2 cc. de la dilución del líquido en el cual se investiga la precipitina y luego con una pipeta Pasteur, se coloca sobre el fondo el suero precipitante, dejándolo correr de modo que no se mezcle con el líquido; como el suero es más denso que el líquido, ganará el fondo de la probeta. Si la reacción es positiva, en la superficie de separación de los dos líquidos se formará un anillo opalescente. La reacción se examina a la luz incidente, colocando la probeta contra una superficie negra.

Otra aplicación práctica y un dispositivo cómodo y sencillo, es el ideado por Ascoli, para el diagnóstico de las carnes carbunculosas.

El método de la precipitina específica de Ascoli, consiste en lo siguiente: Una probeta de pie (fig. 12), con un estrangulamiento en su tercio inferior y un abultamiento debajo; esta probeta contiene has-

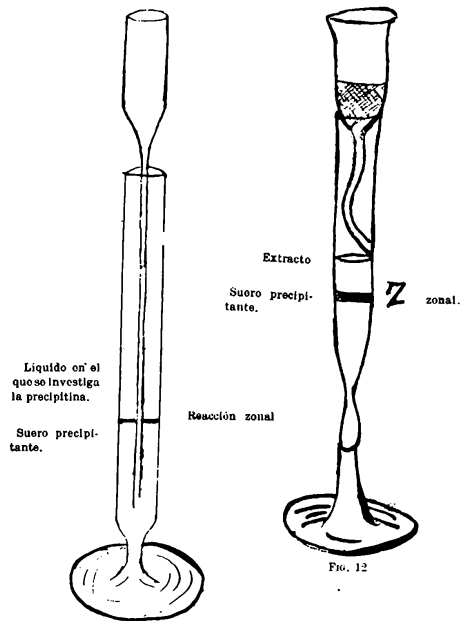


FIG. 11

FIG. 12

ta la señal Z, suero precipitante, perfectamente límpido; cualquier precipitado eventual que pudiese existir, se deposita en la parte abultada, quedando en ella retenido, por el extrangulamiento. Un pequeño embudo con un taponamiento de amianto, termina en un tubo capilar doblado y cortado a bisel.

Para montar el aparato y efectuar la reacción, se procede en la siguiente forma: se coloca en la probeta suero precipitante hasta la señal Z, luego se introduce el embudo en la probeta, de modo que la extremidad del tubo adhiera a su pared, se vierte entonces en el embudo un extracto, en solución fisiológica, de la carne o piel sospechosa de carbunco; esta solución filtra a través del amianto y se ve obligada a correr lentamente a lo largo de la pared y a estratificarse netamente, arriba del suero precipitante. Si la reacción es positiva, se ve aparecer en la zona de contacto Z, entre los dos líquidos, un anillo circular blanquecino.

TITULACION DEL SUERO. — Para la determinación del título de un suero precipitante, seguimos el método indicado por Uhlenhuth. Dicho autor prepara soluciones de sangre en agua fisiológica, con diversos títulos: 1 por 10; 1 por 100; 1 por 1000; 1 por 10000; 1 por 20000; 1 por 30000. En una serie de tubos de ensayo esterilizados y bien limpios o en la probeta que ya hemos indicado, coloca 0.9 cc. de cada una de las diluciones anteriores y luego deja caer en las paredes del tubo o probeta, 0.1 cc. de suero precipitante, de modo que los líquidos se superpongan y nunca se mezclen. Se observa luego si se forma algún precipitado. El tubo en el cual tiene lugar una precipitación con la más pequeña cantidad de albúmina, da el título del suero precipitante.

Uhlenhuth, exige para un suero precipitante, que con la solución al 1 por 1000 de sangre, dé casi momentáneamente un enturbiamiento, y que a más tardar este se produzca, 1 a 2 minutos después. Un suero en estas condiciones, da con las soluciones al 1

por 10000 y al 1 por 20000, un enturbiamiento entre los 3 y 5 minutos después de puestos en contacto. El autor citado recomienda en química legal, el empleo de sueros con título elevado.

TEORIA DE EHRlich PARA LA EXPLICACION DE ESTOS FENOMENOS. — Para la mejor comprensión de los fenómenos de hemolisis y precipitación que acabamos de describir, así como para la desviación del complemento que más adelante veremos y que tienen todos ellos su aplicación en el diagnóstico de las manchas de sangre, transcribiremos sucintamente esta teoría.

INMUNIDAD. — Es el estado de un organismo por el cual es refractario hacia una enfermedad infecciosa, enfermedad que adquieren en iguales condiciones, otros individuos de la misma especie y raza. Ehrlich distingue la inmunidad natural y la adquirida.

Inmunidad natural. — La inmunidad natural o congénita o resistencia natural no es completa en todos los casos, lesiones naturales o artificiales del organismo pueden ser causa de su desaparición.

Todos los investigadores están de acuerdo en aceptar, que esta inmunidad natural es el resultado de disposiciones internas del organismo, pero cuando se trata de explicar el mecanismo de esta disposición interna, los autores se dividen en dos escuelas, la de la Patología celular y la de la humoral.

Metschnikoff en su teoría de la fagocitosis, atribuye esta inmunidad del organismo a la presencia de ciertos elementos celulares, los fagocitos que él clasifica en dos grupos: los fijos y los móviles. A los primeros pertenecen las células conetivales y endo-

teliales y a los segundos, los leucocitos, linfocitos y otras células que se hallan en la sangre y que provienen de la médula ósea. Todos los elementos extraños y perjudiciales al organismo son destruidos por los fagocitos, en el interior de estos últimos y probablemente por la acción de sustancias contenidas en los fagocitos.

Buchner, partidario de la teoría humoral, afirma que la defensa del organismo contra los gérmenes infecciosos tiene lugar sobre todo en los humores del organismo que no contienen elementos celulares.

Buchner demostró que el suero de la sangre posee, in vitro, esta propiedad de matar los bacterios, y llama alexina a la sustancia dotada de ese poder. La alexina sustancia termolábil, pues una temperatura de 56 a 60° la destruye, manifiesta su acción bactericida, a la temperatura del cuerpo humano, en un medio de reacción débilmente alcalina y en presencia de sales. Los animales que son inmunes hacia una determinada enfermedad infecciosa, tienen la propiedad de destruir los bacterios, en un medio desprovisto de elementos celulares.

Actualmente la mayor parte de los autores se colocan en un lugar intermedio, entre estas dos teorías. Y como todas las manifestaciones vitales están ligadas a procesos celulares, aceptan que la destrucción de los gérmenes, tiene lugar, por la acción de sustancias enzimáticas producidas por los leucocitos, ya sea por secreción de ellos o destrucción de los mismos.

Buchner, el partidario de la teoría humoral, ha expuesto otra teoría conciliadora con las dos escuelas; según ésta: los leucocitos digieren los gérmenes que penetran en el organismo, y la alexina, es un pro-

ducto de secreción de las células del organismo, que han sido estimuladas por los mismos gérmenes, y que toma parte, en la destrucción de los gérmenes patógenos.

Inmunidad adquirida. — Según Ehrlich, esta inmunidad puede ser activa o pasiva.

La pasiva es la que se obtiene inmunizando el organismo con sueros de animales inmunizados activamente. En esta inmunidad, el organismo no toma parte activa elaborando productos de defensa; el suero inmunizado le trasmite las sustancias defensivas, que él absorbe.

Inmunidad activa. Los agentes infectivos o sus venenos introducidos en el organismo, son absorbidos por éste. El organismo atacado reacciona, elaborando sustancias, que las utiliza para defenderse de los elementos que le son perjudiciales.

Los elementos infecciosos o sus toxinas, le sirven entonces de estímulo y provocan esta defensa del organismo; el que atraviesa por un período de reacción, que no es nada más que el resultado de su actividad celular aumentada.

La inmunidad activa adquirida, es un proceso específico que se puede provocar contra los agentes infecciosos vivos o hacia sus toxinas.

Visto lo que antecede, pasamos a la teoría de Ehrlich.

Antígenos. — Con este nombre se conocen todas las sustancias heterogéneas que el organismo asimila, reaccionando a su vez sobre ellas.

Por consiguiente las diversas albúminas inyectables a un organismo: los bacilos, los glóbulos rojos, las células, las toxinas, son antígenos. Todos ellos inyec-

tados a un organismo, dan lugar a la formación en dicho organismo de productos de reacción específicos contra los antígenos.

Anticuerpos. — Los productos de reacción del organismo hacia cada antígeno, se conocen con el nombre de anticuerpos. Cada antígeno provoca, por reacción vital, un anticuerpo que le es específico. Según Ehrlich el protoplasma de una célula está compuesto de moléculas, cada una de las cuales está constituida por un núcleo, llamado funcional y por cadenas laterales.

Las cadenas laterales, llamadas también receptoras, sirven de ordinario para fijar y asimilar las sustancias nutritivas. Las sustancias nutritivas se fijan en las cadenas laterales en una forma poco estable, que les permite, una vez transformada la sustancia alimenticia, desprenderse de la cadena y eliminarse, sin dañar a la célula.

Las toxinas se fijan en el receptor de las cadenas laterales, por medio de su grupo aptóforo, y el grupo toxóforo ejerce entonces su acción tóxica. Esta fijación de la toxina por su grupo aptóforo, es muy enérgica. Si la fijación de la toxina en una célula, pasa de un límite, la célula queda inutilizada en sus funciones; si esto se repite con muchas células, se produce la muerte del individuo.

Pero no se llega a tal límite, y según la ley de regeneración de Weigert, se produce en cambio de las partes destruidas de la célula, una producción muy grande de las mismas, que viene a sustituir a la parte inutilizada. Y como esos receptores producidos en exceso, son inútiles para el funcionamiento de la célula, los receptores en exceso, son eliminados. Estos

productos eliminados, son receptores libres, que conservan su propiedad de fijar las toxinas, y neutralizando así su acción, evitan que éstas inutilicen las células por el procedimiento arriba mencionado.

Hay varias clases de receptores: de 1ro., 2º y 3er. orden, que en estado de libertad toman el nombre de aptinas.

A los receptores o aptinas de 1er. orden pertenecen las antitoxinas y los antifermentos; a los de 2º orden: las aglutininas y precipitinas; de 3er. orden son: las hemolisinas y bacteriolisinas. Vemos que las aptinas de 3er. orden poseen dos grupos aptóforos libres; Ehrlich las llama amboceptores, y uniceptores a las de 1ro. y 2º orden.

Las figuras siguientes indican gráficamente, las nociones anteriores: (fig. 13).

Desviaciones del complemento. — Cuando inyectamos en el peritoneo de un conejo, glóbulos rojos de carnero, tenemos al cabo de un cierto tiempo, que el suero de la sangre del conejo inyectado, tiene la propiedad de hemolisar los glóbulos rojos de carnero. De acuerdo con las denominaciones que hemos dado a las sustancias, tenemos: que los glóbulos rojos inyectados al conejo, constituyen el antígeno; que las hemolisinas que aparecen en el suero de conejo, son los anticuerpos específicos y para que la reacción hemolítica se produzca, tenemos que poner en presencia:

antígeno + anticuerpo + complemento

Si ponemos en contacto glóbulos rojos sensibilizados en presencia de un suero nuevo, la hemolisis se produce; pero si tomamos este suero y lo ponemos en contacto con otra cantidad de glóbulos rojos sensibi-

lizados, la hemolisis no se produce. Luego, el complemento ha sido desviado por el primer lote de glóbulos sensibilizados.

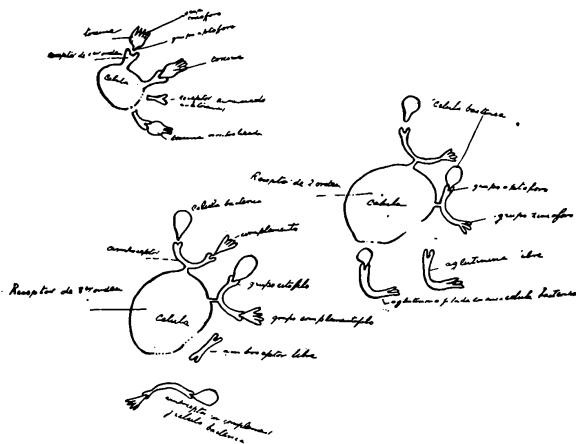


FIG. 13

Supongamos tener suero de un animal inmunizado contra el cólera, por consiguiente conteniendo sensibilizadoras. Si calentamos ese suero y lo ponemos en presencia de vibriones coléricos, las sensibilizadoras (anticuerpos) anticoléricas se fijarán sobre los vibriones coléricos; si enseguida añadimos suero de cobayo nuevo, los vibriones sensibilizados, fijarán el complemento. Si por último a la anterior mezcla, le agregamos glóbulos rojos sensibilizados, éstos no encontrarán complemento y la hemolisis no se producirá.

Luego, los vibriones coléricos sensibilizados, han desviado el complemento.

Antígeno	Anticuerpo	Complemento
vibriones coléricos + suero inmunizado	+ suero nuevo de cobayo	+
+ glóbulos rojos	+ hemolisina	desviado
Resultado = hemolisis negativa		

Para comprobar la desviación del complemento por un antígeno sensibilizado, se añade a la mezcla de las dos sustancias anteriores glóbulos sensibilizados: si la hemolisis se produce, el complemento está libre; en caso que la hemolisis no se produzca, el complemento ha sido desviado. Supongamos tener un suero, que presumimos en él, la existencia de un anticuerpo. Para investigar la existencia de ese anticuerpo, ponemos en contacto el suero dado, calentado a 55-56°, con el antígeno correspondiente y añadimos suero nuevo. A la mezcla anterior de suero sospechoso, antígeno y suero nuevo, le agregamos glóbulos rojos sensibilizados; si el complemento no ha sido desviado, los glóbulos sensibilizados hemolisan, en caso contrario, la ausencia de hemolisis nos indicará, la desviación del complemento.

Esta reacción de la desviación del complemento, tiene numerosas aplicaciones en el diagnóstico médico y en el diagnóstico de las manchas de sangre.

Anaphilaxia. — Creemos oportuno indicar esta reacción, aún cuando no la hemos practicado en nuestras determinaciones de manchas de sangre.

El término *anaphilaxia*, ha sido creado por Richet en 1902 y significa lo contrario de la protección. En general hemos visto que ciertas sustancias, en el caso de la inmunidad adquirida, introducidas en el organismo, disminuyen la sensibilidad de este a su acción en cam-

bio otras sustancias aumentan la sensibilidad del organismo en que son introducidas, de tal modo que algún tiempo después de la primera introducción, una dosis insuficiente para matar o enfermar el animal, introducida por segunda vez en el mismo organismo, ocasiona accidente graves y mortales. No se puede atribuir en este caso, que haya acumulación de la sustancia en el organismo, pues al cabo de 4 o 5 días ningún accidente se produce y para que éste tenga lugar, es necesario efectuar la segunda introducción de la sustancia, dos o tres semanas después de la primera.

Uhlenhuth, Besredka y otros, han tratado de utilizar la especificidad de esta reacción para el reconocimiento de los líquidos orgánicos. Uhlenhuth y Händel, han efectuado experiencias sobre un cobayo y han comprobado dicha especificidad, pudiendo sensibilizar cobayos con suero humano.

SEGUNDA PARTE

CAPITULO I

Manchas de sangre - Sus caracteres

Muy difícil es poder precisar y clasificar las manchas de sangre según sus caracteres exteriores, pues el aspecto de las mismas dependen de numerosas causas: la época en que se produjo la mancha, el objeto en que se depositó, la forma en que cayó sobre él, agregando también como influencias que modifican su aspecto, las condiciones de humedad del ambiente, su temperatura, etc. A estas causas naturales, se agregan las artificiales con objeto de destruirlas, como ser los lavajes con los distintos agentes químicos.

Las manchas frescas tienen un color rojo vivo, pero por la acción del tiempo se oxidan, cambiando de color, y cuando son muy viejas, su color pasa a ser pardo negruzco. El color del objeto en que se halla depositada la mancha, tiene su importancia para poder distinguirla con facilidad; en objetos claros las manchas se destacan bien, mientras que en objetos oscuros, se distinguen con dificultad.

Si el objeto en que cayó la mancha es absorbente (géneros, etc.), el líquido sanguíneo penetra con facilidad y más o menos profundamente. Las telas absorbentes, manchadas con sangre, presentan sus manchas,

en forma análoga a la que puede presentar el papel secante o de filtro. Si el objeto no es absorbente respecto a la sangre, ésta se deposita sobre él, constituyendo un pequeño montoncito, que una vez seco, tiene el aspecto de una escama brillante.

Tamaño. — Su tamaño es variable; cuando sus dimensiones son grandes la tarea se simplifica, pero cuando presentan dimensiones muy pequeñas, casi como puntos, la investigación de las manchas se hace muy difícil por la exigüidad del material a examinar.

Forma. — La forma de las manchas depende de la inclinación con que han caído, del estado de reposo o de movimiento que tenía el individuo que las produjo y de la altura que cayeron. Cuando la sangre se deposita en un soporte horizontal, y si provenía de un sujeto en reposo, la mancha toma una forma esférica. Si cae de una cierta altura, es rechazada, formando pequeñas manchas siguiendo una línea. Cuando caen sobre un soporte poroso, presentan bordes dentados. Hallándose en movimiento la parte del cuerpo o el sujeto que produjo las manchas de sangre, éstas toman una forma tanto más alargada, cuanto más rápido era el movimiento. La misma forma alargada toman las manchas, cuando son proyectadas contra una pared (fig. 14).

Condiciones en que pueden ser presentadas al perito. — Frecuentemente se remiten al perito encargado de diagnosticar sobre la naturaleza de unas manchas, objetos diversos, para que dictamine sobre las manchas depositadas en ellos. Estos objetos son a menudo, armas las más variadas, pañuelos, monedas, billetes de banco, uñas, etc., etc.; si el objeto en que se halla la mancha no ha sido maltratado desde que ella

se depositó, hasta llegar a manos del perito, la tarea de su investigación no se complica. Pero a menudo



FIG. 14

1. - Sangre caída en reposo.
2. - " sobre plancha de pino.
3. - " caída en movimiento.
4. - " " rápido.
5. - " caída de 15 centímetros de altura.

las manchas se hallan depositadas en objetos no transportables: paredes, pisos, intersticios del mismo, muebles, tapicerías, mármoles, cristales etc., etc., siendo entonces necesario, destacar un pequeño trozo del lugar en que se halla la mancha. Lo más conveniente sería, que el perito se trasladase al lugar en cuestión y procediera personalmente a extraer un trozo del objeto, en que se halla la mancha, tomando todas las precauciones, para no destruirla ni modificarla.

Los géneros, pañuelos, etc., en los que se ha depositado sangre, muchas veces con objeto de despis-

tar, han sido lavados por diversas sustancias (agua, jabón, agua de Javel, etc.) y el objeto, un pañuelo por ejemplo, manchado con sangre y lavado, aparece de color blanco, pero si se le fotografía, interponiendo entre él y el objetivo un transparente azul, la placa revela manchas de un color gris oscuro.

A veces telas de color rojo u oscuro, presentan manchas de sangre, siendo difícil precisar su ubicación por el contraste nulo de los colores. En estos casos para situar las manchas, conviene fotografiar la tela, con placas sensibles ortocromáticas, teniendo la precaución de colocar entre la tela y el objetivo, un transparente amarillo. La placa revelada muestra entonces con claridad las manchas.

Reiss, que se ha ocupado de este punto, aconseja para las manchas depositadas en telas de color azul pálido, gris claro, amarillo muy claro, verde claro, fotografiar dichas telas con placas comunes sin interponer transparentes, si las telas son de un color amarillo oscuro, verde oscuro o rojo, fotografiarlas con placas ortocromáticas con transparente azul y si las telas son de color azul oscuro, negro o gris oscuro, interponer un transparente azul y fotografiarlas con placas ordinarias.

Precauciones que deben tomarse al practicar su investigación. — El perito antes de proceder al análisis de las manchas, debe examinar y describir todos los caracteres que presentan las manchas, en los objetos sometidos a su examen. Anotará el color, el aspecto, su ubicación, el número de ellas, forma, caracteres de su bordes. Si se trata de telas, debe observar si existen señales de haber sido lavadas; en las armas debe buscar indicios de raspaduras o cualquier modi-

ficación que haya tenido por objeto, la desaparición de la mancha. Debe buscar indicios, que le puedan dar probabilidades de conocer la época de que data la mancha.

Si el perito debe trasladarse en persona, para recoger las manchas que se hallan sobre objetos no transportables, debe recogerlas con cuidado y llevarlas a su laboratorio, tomando las precauciones necesarias, para que ellas no sufran ninguna modificación. Obvio sería indicar una regla general, quedando librado estos cuidados al criterio personal.

Tratamiento de la mancha de sangre.—Aún cuando en cada método de investigación, indicamos el tratamiento previo que ha de sufrir la mancha supuesta de sangre, daremos aquí algunas reglas generales.

Cualquiera que sea el procedimiento que se emplee para establecer la naturaleza de las manchas, las reacciones que se efectúen, se harán con prudencia, empleando siempre lo estrictamente necesario, para no correr el riesgo de concluir con el material a examinar, sin haber podido efectuar todas las verificaciones necesarias.

Si la mancha se encuentra en la superficie de un objeto, se la raspará con cuidado, con un objeto perfectamente limpio y se recoge el polvo que resulte del raspaje en un pequeño vidrio de reloj perfectamente limpio, pudiéndose ayudar de un pincel bien limpio.

Si la mancha se encuentra comprendida entre las mallas de un tejido, se corta la porción que contiene la mancha y se hace macerar el trozo de tejido en una solución conveniente, colocada en una pequeña cápsula de vidrio perfectamente limpia o en un vidrio de reloj en las mismas condiciones de limpieza.

CAPÍTULO II

Diversos métodos para la identificación de las manchas de sangre

En los capítulos anteriores hemos visto ordenadamente, los distintos caracteres de la sangre. En algunos casos ha sido posible establecer diferencias, entre los elementos de la sangre humana y la de las distintas especies animales; un ejemplo de ello, son la forma y dimensiones de los corpúsculos de la sangre humana y la de los mismos elementos en la sangre de otras especies animales. Estos hechos tienen su aplicación y constituyen el método citológico para la caracterización y diferenciación de las manchas de sangre.

Al estudiar la composición química de la sangre, detallamos las diversas sustancias que entran en ella: hemoglobina, oxihemoglobina, sustancias ambas, que al disolverse en el agua dan soluciones de color rojo; albúmina y fibrinas que existen en el líquido sanguíneo y que tratadas por los reactivos adecuados, darán sus reacciones características; azoe que podrá ser identificado valiéndose de los métodos corrientes en el análisis químico. Los distintos componentes de la sangre

constituyen un medio especial y característico, que tratado por los diversos reactivos nos permitirá obtener muchas veces coloraciones o reacciones especiales a él.

En uno y otro caso habremos originado un método químico, para las investigaciones que nos proponemos.

La hemoglobina, oxihemoglobina y sus derivados observados al espectroscopio, nos dan espectros característicos en cada caso, y tendremos entonces un método puramente físico, cuando apliquemos el espectroscopio para la diagnosis de las manchas de sangre.

Identificada una mancha como de sangre, se nos presenta el problema de establecer si ella es de sangre humana o no. Recurriremos entonces, a la especificidad de los sueros precipitantes que ya hemos estudiado, pudiéndonos valer también para ello, del método de la desviación del complemento y de la reacción anafiláctica. La biología nos ha prestado su auxilio, creando un método biológico.

Respondiendo al plan que nos hemos trazado, de efectuar un estudio metódico y razonado de la sangre, siempre con la mira de su aplicación en el diagnóstico de las manchas, en la misma forma veremos los diversos métodos de que dispone hoy la ciencia para tal objeto. En el último capítulo concretaremos, en las conclusiones, el valor de cada método.

Espectroscopia de la sangre. — Habiéndonos ocupado detalladamente en el capítulo IV de la teoría y manejo del espectroscopio, pasaremos aquí por alto dicho punto. En síntesis, la teoría del método espectroscópico, es la siguiente: Dada una mancha de sangre, disuelta ella en un líquido apropiado, e interpues-

ta entre una fuente luminosa y el espectroscopio, se ven aparecer en el espectro, rayas oscuras características, que constituyen espectros de absorción.

La técnica a seguir es la siguiente:

- 1°. Reglaje del espectroscopio;
- 2°. Disolución de la mancha en un líquido apropiado;
- 3°. Observación de la solución de la mancha por medio del espectroscopio.

1°. Deben ponerse en práctica, para el reglaje del espectroscopio, todas las indicaciones aconsejadas en el capítulo IV, de manera que cuando se observe con dicho aparato, no haya necesidad de tocarlo en lo más mínimo.

Disolución de la mancha. — Lo más conveniente es disolver la mancha en agua destilada fría; las manchas frescas se disuelven fácilmente, no cediendo así con las viejas, que exigen para disolverse, que se las ponga en maceración con agua destilada por un tiempo más o menos largo, según la edad de la mancha. En ambos casos si es necesario, se filtra la solución acuosa de la mancha.

Las manchas muy viejas son casi insolubles en el agua, y si la mancha es muy pequeña la cantidad de sustancia que llevará en solución el agua, será insignificante. En estos casos se disuelve la mancha, ya sea en potasa, soda, ácido acético o cianuro de potasio, teniendo en cuenta entonces, que esas sustancias transforman la oxihemoglobina, variando por consiguiente el espectro de absorción que dará la solución de la mancha.

En el caso de la potasa o la soda, el producto de transformación de la oxihemoglobina depende de la

concentración de la solución de potasa o soda. Con soluciones diluidas al 10 o/o se obtiene hematina y con soluciones al 30 o/o, hemocromógeno. El ácido acético, transforma la oxihemoglobina en hematina. El cianuro de potasio en solución concentrada, disuelve las manchas muy viejas, dando una solución de un bello tinte rojo que vista al espectroscopio dá una banda de absorción en el verde. Añadiendo amoníaco, esta banda única se divide en dos rayas semejantes a las de la oxihemoglobina pero más cerca del violeta.

Cuando la sangre ha sufrido la acción de una temperatura muy elevada y está casi carbonizada, su materia colorante se ha transformado en parte, en hematoporfirina. En estos casos se disuelve la mancha en ácido sulfúrico concentrando, y observando al espectroscopio se tendrá el espectro de la hematoporfirina.

Obtenida la disolución de la mancha, se tomarán todas las precauciones, para que el líquido que resulte sea límpido y en esas condiciones, se observará al espectroscopio.

Observación de la solución de sangre. — La solución límpida de la mancha se introduce en un recipiente de vidrio, que debe ser interpuesto entre la fuente luminosa y el espectroscopio. Puede emplearse con tal objeto, un tubo de ensayo pequeño, siendo más práctico y conveniente, utilizar una cuva de vidrio de caras paralelas, con unas dimensiones de 10 por 30 milímetros. Esta cuva, que presenta dos espesores distintos para ser atravezados por la luz, los tiene con el objeto de utilizar la sección de menor espesor para soluciones concentradas y la de mayor espesor para

soluciones diluídas. En los casos en que la cantidad de sangre de que se dispone sea muy pequeña, se emplea un tubo de vidrio de 5 milímetros de diámetro por un decímetro de largo. Las dos extremidades del tubo están cerradas con discos de vidrio; cierre análogo al de los tubos polarimétricos. Con estos tubos se pueden observar, a través de un espesor grande, cantidades muy pequeñas de sangre. Cualquiera que sea el dispositivo empleado para contener la solución de la mancha, debe colocarse delante de la hendidura del espectroscopio y a poca distancia de la fuente luminosa, en forma tal, que los rayos que esta última envía, atraviesen la solución, antes de penetrar por la hendidura del espectroscopio.

Modificando la concentración de una solución de sangre, varían la intensidad y el ancho de las bandas de absorción. Con soluciones muy concentradas, las bandas no se distinguen, pues están reunidas en una sola, que absorbe todas las radiaciones a excepción del rojo, rojo anaranjado y parte del amarillo; diluyendo entonces la solución, las bandas comienzan a diferenciarse. Las condiciones mejores para la observación clara y bien diferenciada de las bandas, dependen de la concentración y espesor de la solución. Con soluciones de sangre al 1 o/o y bajo el espesor de un centímetro, se ven las bandas de absorción.

Al anotar la posición de las bandas y referirlas a la numeración de la escala micrométrica, los números que se tomen deben corresponder a la cifra de la parte media de la banda.

Diversos espectros de absorción que pueden observarse en una mancha de sangre. — En el supuesto que una mancha sea de sangre, el espectro de absor-

ción que se verá, depende del estado de la mancha. Manchas frescas, contiene su materia colorante al estado de oxihemoglobina, pero no todas las manchas son recientes; además han sufrido la acción de los agentes exteriores, acciones que han modificado la

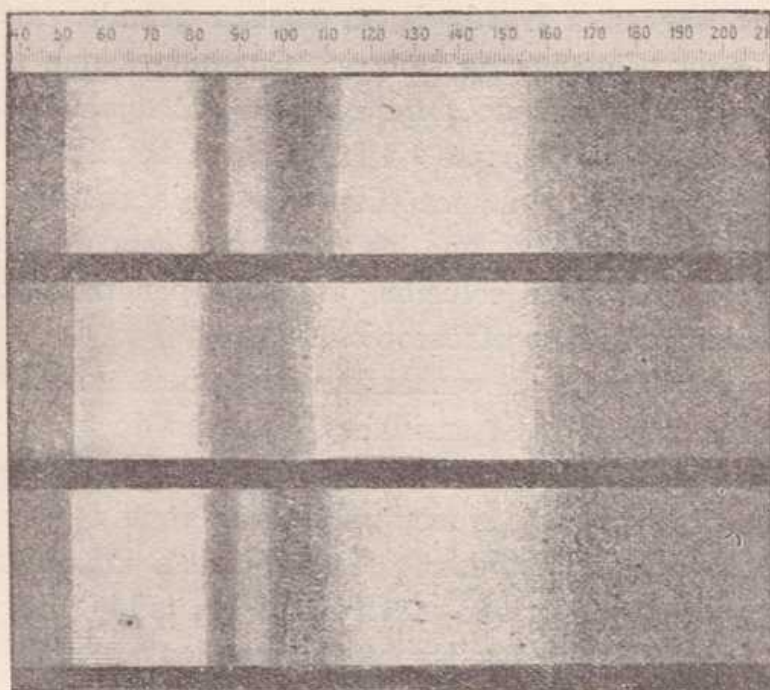


FIG. 15

1. — Espectro de la oxihemoglobina.
2. — " " " hemoglobina.
3. — " " " carboxihemoglobina.

materia colorante. Indicaremos los distintos espectros que pueden observarse.

Oxihemoglobina. — Dos bandas de absorción situadas entre las rayas D y E del espectro (fig. 15); si el espectro ha sido reglado, como ya hemos indicado, de modo que su raya D, corresponda a la división 80 del micrómetro, las bandas de absorción de la oxihemoglobina tienen las siguientes característi-

cas: Banda que corresponde a la raya D, se extiende de la división 81 a la 87, comienza hacia el fin del anaranjado, a su parte media le corresponde la división 84-85 de la escala; Banda que corresponde a la división E, se halla en el medio del verde, se extiende desde la división 97 a 106 del micrómetro, a su parte media le corresponde la división 103-104, esta banda es más ancha que la anterior.

Pudiera suceder que no se tratase de sangre, a pesar de tener una solución del mismo color; en este caso la sustancia que nos induce en error, es el picro carmín y que dá un espectro análogo al de la oxihemoglobina. Tratando entonces la solución de la mancha por un reductor, en caso de ser sangre, la oxihemoglobina daría el espectro de la hemoglobina, en cambio el carmín no sufre una reducción análoga, pues no contiene oxihemoglobina.

Hemoglobina reducida. — Supongamos haber examinado al espectroscopio, la solución de una mancha, y haber observado con un resultado positivo las dos bandas de absorción de la oxihemoglobina. Si el mismo recipiente en que se halla la solución de la mancha, y sin moverlo de su posición, le agregamos un reductor cualquiera, por ejemplo, sulfhidrato de amoníaco, la oxihemoglobina pasa al estado de hemoglobina y en lugar de observarse dos bandas de absorción, notaremos una sola banda, que ocupa el espacio comprendido entre las dos bandas anteriores (fig. 15) (2). La banda de absorción de la hemoglobina, es un poco más ancha que las anteriores y también menos oscura y se halla situada en la región amarilla del espectro, no es muy visible en las soluciones demasiado diluidas de sangre.

Las características son: se extiende de la división 87 a la 97 de la escala micrométrica. Se conoce con el nombre de banda de Stokes.

Los reactivos reductores son varios, Stokes recomienda una solución al 5 ojo de protocloruro de estaño, adicionada de ácido tártrico, luego neutralizada por amoníaco. El hidrosulfito de sodio, la amalgama de sodio, el oxalato ferroso, han sido recomendados para producir la reducción de la oxihemoglobina, pero el reactivo empleado, es el sulfhidrato de amonio, bastando agregar dos gotas de dicha sustancia a la sangre diluída y esperar luego 5 minutos para que la reducción se produzca.

Metehemoglobina.—La sangre en putrefacción contiene su materia colorante al estado de metehemoglobina. La metehemoglobina dá dos espectros distintos, según que la solución en que ella se encuentre, sea ácida o alcalina.

En solución ácida, dá una banda de absorción en el rojo en la división 68 de la escala micrométrica. En solución alcalina, dá una banda de absorción más pálida en la división 80 de la escala micrométrica. Pero como esta transformación de la oxihemoglobina, en las manchas viejas no es total, se observa al mismo tiempo, las dos bandas de absorción de la oxihemoglobina, no transformada.

Hematina. — Si el proceso de putrefacción de la mancha es más intenso, su materia colorante ha pasado al estado de hematina. La hematina dá dos espectros distintos según que se halle en solución alcalina o ácida.

En solución alcalina, la hematina dá una banda sola de absorción en D, división 80, poco visible, que

por la adición de un reductor como al sulfbhidrato de amonio, da dos bandas de absorción que corresponden al hemocromógeno.

En solución ácida, da dos bandas pálidas, difíciles de distinguir, cuya situación es muy vecina de las de la oxihemoglobina y una banda muy visible en el rojo que corresponde a la división 58 de la escala micrométrica.

Hemocromógeno. — El hemocromógeno da dos bandas de absorción, la primera, que corresponde a la división 98 de la escala, y la segunda a la 112. El hemocromógeno se obtiene por reducción de la hematina alcalina.

Hematoporfirina. — La hematoporfirina se obtiene por la acción del ácido sulfúrico concentrado, sobre la sangre. Como ya hemos dicho, esta sustancia, se encuentra en parte, en las manchas que han sufrido la acción del calor y que presentan un principio de carbonización. En estos casos conviene tratar la mancha por ácido sulfúrico, por adición de agua precipita la hematoporfirina y disolviéndola entonces en potasa, se tiene hematoporfirina en solución alcalina. La hematoporfirina en solución alcalina, da cuatro bandas de absorción, de las cuales tres son fáciles a distinguir, las que corresponden a las divisiones 92, 108, 135 y a partir de la división 170 el espectro desaparece casi completamente.

La hematoporfirina en solución ácida, da tres bandas de absorción que corresponden a las divisiones 80, 100 y 118 de la escala micrométrica.

Método citológico. — Al efectuar el estudio citológico de la sangre, vimos en ella elementos característicos: los glóbulos rojos y los blancos. Indudablemente

te que estos elementos deben hallarse en las manchas de sangre y si la mancha es reciente, estarán en ella, con sus caracteres ya bien conocidos. En la inmensa mayoría de los casos, las manchas de sangre no son frescas, por el contrario, ellas se presentan secas y los glóbulos han sufrido alteraciones en su forma y dimensiones. Solo excepcionalmente se tendrán manchas de sangre frescas. En estos casos, los glóbulos rojos conservan sus caracteres que ya hemos descrito. Si se trata de glóbulos rojos de sangre humana, presentarán un diámetro que oscila entre 7 y 8 micrones, con un contorno redondo, con una depresión en el centro, frecuentemente comprimidos los unos contra los otros y superpuestos en pilas; la adición de ácido acético los decolora y permite ver con claridad los glóbulos blancos. Glóbulos rojos de forma elíptica, nos haría suponer que se trata de sangre de pescados, reptiles o de pájaros. Los maníferos (perros, conejos) a veces presentan glóbulos rojos con dimensiones análogas a los del hombre. Los de buey tienen una media de 5, 8 micrones, el carnero 4, 5 micrones. En estos casos que acabamos de describir, y en que excepcionalmente se trata de manchas de sangre líquida, para observarlas al microscopio, se coloca en una lámina porta objeto, una pequeñísima cantidad de sangre y se calienta muy ligeramente para obtener una rápida desecación.

Las manchas viejas, están completamente desecadas, y los corpúsculos de la misma, alterados en su forma y tamaño. El borde de los glóbulos se halla hendido, frecuentemente ellos no son visibles porque encontrándose en gran número y al secarse la mancha,

se han comprimido, formando una masa compacta. Con el objeto de separar los glóbulos y facilitar así su observación microscópica, se emplean varios líquidos, entre los cuales el de Vibert, que tiene la siguiente composición: Agua, 100; cloruro de sodio, 2; hielo ruro de mercurio, 0.5.—Roussin: glicerina, 3 partes; ácido sulfúrico, 1 parte; agua c. s. para obtener la densidad de 1.028.—Ranvier: solución de yoduro de potasio al, 2 o/o en la que se ha disuelto yodo a saturación. En nuestras investigaciones hemos utilizado el líquido de Roussin. La técnica a seguir es la siguiente: en una lámina porta objeto, se deposita una pequeña cantidad de la mancha sospechosa, se añaden 2 gotas del líquido conservador, se recubre con una lámina y se ejerce una pequeña presión, con objeto de ablandar la mancha y separar sus elementos figurados. Observando entonces al microscopio, si la mancha no estaba muy alterada, se ven glóbulos más o menos netos, a veces envueltos en redes de fibrina.

Cuando la mancha se encuentra sobre una tela y no se puede destacar, se hace macerar con el líquido conservador un pequeño fragmento de la tela que contenga la mancha, luego se raspa con un escalpelo la tela y las gotas de líquido que se recogen en dicho instrumento, se colocan en una lámina porta objeto y se observa. A veces es necesario dilacerar la tela con el líquido conservador por medio de unas agujas sobre la lámina de vidrio y examinar líquido y filamentos del tejido.

Método de Florence. — El método de Florence, tiene la ventaja de que permite examinar al microscopio la mancha, sin modificarla, ni sacarla del objeto en que se halla, y al mismo tiempo obtener una fo-

tografía, que puede servir de pieza de convicción. El aparato de Florence, (fig. 16) consiste en un microscopio, el que está conectado a un tubo que le es

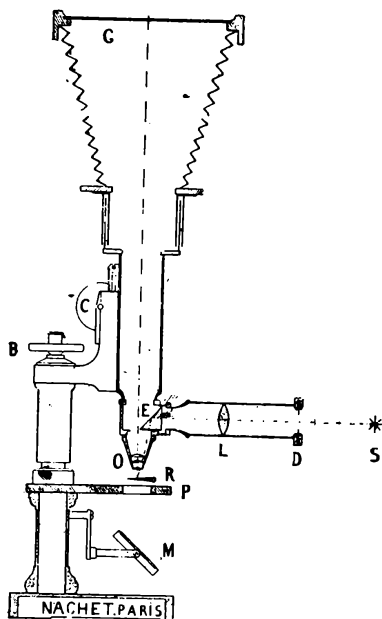


FIG. 16
Aparato de Florence

perpendicular. Dicho tubo en su parte media tiene una lente convergente L y en su sección de contac-

to con el microscopio un prisma E. Una fuente luminosa S, envía sus rayos que atraviesan el tubo, pasando por un diafragma iris D, inciden sobre el prisma E que lo atraviesan, siendo reflejados por la cara a, b que los envía atravesando el objetivo, hacia la preparación R, la que iluminan por su parte superior. En R se ha colocado el objetivo a examinar, una lámina de cuchillo, por ejemplo. Se pone en punto el microscopio y empleando un objetivo 7 Nachet, se ven los glóbulos bien claros.

Si se quiere obtener una fotografía, se conecta en la parte superior del microscopio, una cámara negra vertical sistema Nachet, y se obtiene una fotomicrografía de la preparación, operando como es de práctica en estos casos.

Métodos químicos. — Los métodos químicos empleados para la investigación de las manchas de sangre, comprenden: ya sea la investigación de las sustancias normales de la sangre, o bien las reacciones coloreadas que da la sangre, al ser tratada por reactivos especiales.

Reacción por el calor y la potasa. — Una pequeña porción de la mancha se coloca en un tubo de ensayo y se disuelve en agua destilada. El líquido se colorea débilmente: cuando la mancha es reciente toma un color rojizo y si la mancha es vieja, amarillento. Al ser calentado dicho tubo con la solución, ésta se decolora y coagula la albúmina, bajo la forma de un coágulo gris verdoso, si la solución está saturada y un enturbiamiento solamente, con soluciones diluidas. Añadiendo unas gotas de solución diluida de potasa, el coágulo se disuelve o el enturbiamiento desaparece.

ce y el líquido toma una coloración verde, a la luz reflejada y rojo por transparencia.

Reacción por el amoníaco. — Las manchas de otras sustancias que la sangre, disueltas en agua, pueden dar a ésta una coloración rojiza semejante a la de la sangre. Pero si se trata la solución de la mancha por unas gotas de amoníaco, la coloración rojiza vira a otras coloraciones: verde, violeta, escarlata, cuando la mancha es de otras sustancias. En caso de ser de sangre, la coloración rojiza de la solución de la mancha, persiste después de la adición de amoníaco.

Reacción por el ácido hipocloroso. — Este ácido decolora las soluciones rojizas de manchas que no son de sangre, acentuando más la coloración de la solución de una mancha de sangre. Al cabo de unos minutos, aun tratándose de una mancha de sangre, el ácido hipocloroso decolora la solución de la misma.

Investigación del azoe. — Las manchas de sangre calentadas, desprenden vapores amoniacales, fáciles de reconocer. Este desprendimiento de vapores amoniacales se facilita por la adición de potasa o soda.

Caracterización de los albuminoides. — La albúmina de la sangre se puede reconocer, calentando la solución acuosa de la mancha, o bien por la acción del ácido nítrico, reactivo de Millon, ácido tricloroacético, que coagulan los albuminoides.

Acción del hipobromito de soda. — De la solución acuosa de la mancha, se depositan unas gotas, en una lámina porta objeto, se las recubre con una lámina de vidrio y se las coloca en la platina de un microscopio, para observarlas con un pequeño aumento. Si se hace penetrar una gota de la solución corriente de hipobromito de soda, cuando ésta llega a ponerse en

contacto con las gotas de la solución de la mancha, si ésta es de sangre, se observan un número considerable de burbujas gaseosas que se desprenden.

Acción del agua oxigenada. — Zenter, Doew y otros, han constatado la presencia de un fermento en la sangre que tiene la propiedad de descomponer el agua oxigenada y poner en libertad el oxígeno.

La técnica de la reacción es la siguiente: se disuelve la mancha en agua destilada fría si ella está en un objeto, del que se la puede extraer por raspaje; si esto no fuera posible por hallarse la mancha sobre una tela, se macera un trozo de la tela en agua destilada. La solución de la mancha o su maceración, se coloca en un tubo de ensayo, evitando que por sacudimiento del tubo se forme espuma. Se deja caer entonces a lo largo de la pared del tubo, algunas gotas de agua oxigenada neutra, si la solución era de una mancha de sangre, se producen pequeñas burbujas que al llegar a la superficie del líquido, forman una espuma, cuya abundancia depende de la riqueza en sangre de la solución.

REACCIONES COLOREADAS

Reacción de Van Deen. — La tintura de guayaco de color amarillo pardo, al oxidarse, toma un color azul. Si ponemos en presencia agua oxigenada, esencia de eucaliptus o esencia de terebentina, líquidos todos ellos ozonizados, y tintura de guayaco, ésta no cambia de color, porque no es capaz por sí misma, de quitarle el oxígeno a esas sustancias y de fijarlo por consiguiente. Pero si se añade sangre, el azulamiento de la tintura de guayaco se produce. Esta

oxidación de la tintura de guayaco, se atribuye a la acción de un fermento, y como la reacción es positiva con la hemoglobina, hematina, hemocrómogeno, derivados de la hemoglobina que contiene fierro, se atribuye que este fermento está ligado a la existencia del fierro en la hemoglobina.

La técnica de la reacción y los elementos que entran en ella, son los siguientes:

Tintura de guayaco. — Guayaco, 5 gramos, que se disuelven en 100 cc. de alcohol a 95°. Se filtra y se obtiene un líquido amarillo pardo.

La tintura calentada a 50°, no debe azulear, en caso contrario, no debe emplearse. En general se aconseja que la tintura de guayaco sea reciente.

Esencia de terebentina. — Cuanto más vieja, más ozonizada estará y más sensible será el reactivo. Para ozonizarla, se puede dejar el recipiente abierto durante varios días. Los reactivos antes de utilizarse deben ser probados solos, sin sangre, para ver si no se produce la coloración azul en la tintura de guayaco. Para obtener la reacción se procede en la forma siguiente: Si la mancha se halla en un objeto y se puede destacar con facilidad, se disuelve o se macera una parte de ella,—según que sea reciente o vieja la mancha,—en agua destilada. Un centímetro cúbico de la solución obtenida, se coloca en una pequeña cápsula de porcelana blanca, se añade 1 cc. de tintura de guayaco, se agita, luego se agregan algunas gotas de esencia de terebentina ozonizada; si la mancha contiene sangre, aparece un tinte verde que pasa al azul claro y por último al azul oscuro. La reacción coloreada, debe producirse algunos segundos

después de agregarse los reactivos; en caso de que ella tuviera lugar minutos después, no tiene valor.

Si la mancha que se supone sea de sangre, se encuentra en un objeto del que no puede retirarse, para efectuar la reacción, hay que proceder en la forma siguiente:

Se toma un trozo de papel de filtro (que ha sido ensayado, sin sangre, con tintura de guayaco y terebentina y dió reacción negativa) se humedece con agua destilada y húmedo, se lo aplica sobre la mancha sospechosa, efectuando ligeras y prolongadas presiones sobre el papel. Al cabo de unos minutos se retira el papel, se vierte en la porción que estuvo en contacto con la mancha algunas gotas de tintura de guayaco y luego unas gotas de esencia de terebentina. Si la mancha sospechosa era de sangre, aparecen rápidamente manchas azules que reproducen la forma de la mancha.

Reacción con el sulfato de hidrazina. — Se disuelven 5 gramos de sulfato de hidrazina en 1000 de una solución alcohólica de potasa (100 de potasa, 900 de agua y 100 de alcohol a 95°), se filtra la solución. Este reactivo, en presencia de una solución de una mancha de sangre, da una coloración rosa. La reacción se efectúa en la siguiente forma:

Si la mancha se disuelve en agua destilada, se mezcla 1 cc. de la solución de la mancha en 10 cc. del reactivo; si la mancha es de sangre, se produce una coloración amarillo verdosa, que pasa al rosa. Agitando la mezcla al aire, la coloración desaparece bien pronto. Las manchas viejas no se disuelven en el agua, sino en muy pequeña proporción, pero en cambio fácilmente, en una solución de potasa alcohólica.

En caso de tratarse de una mancha vieja, se pone ésta en contacto con el reactivo, quien, gracias a su potasa alcohólica, la disolverá coloreándose en rosa, si se trata de sangre.

Reacción de Adler con la benzidina. — La benzidina en solución alcohólica o acética adicionada de agua oxigenada da con las manchas de sangre una coloración verde que pasa al azul.

Reactivo. — Solución saturada de benzidina pura en alcohol a 95° acidulada con ácido acético. El reactivo se debe preparar en el momento de utilizarse.

Agua oxigenada a 12 volúmenes. La marcha de la reacción es la siguiente:

Si la mancha se disuelve en agua, se toma 1 cc. de la solución acuosa, se le añade 1 cc. de la solución de benzidina, luego algunas gotas de agua oxigenada. Si la mancha es de sangre, la mezcla toma una coloración verde, que pasa al azul.

Si la mancha es muy vieja y no se disuelve en agua o se halla sobre una tela, se toma un trozo de papel de filtro, se humedece con el reactivo, se aplica sobre la mancha; obtenida la impresión de ella se humedece el papel de filtro con agua oxigenada, y aparecerán en el papel puntos azules que diseñarán la mancha en el caso que la mancha examinada sea de sangre.

Reacción de la parafenildyamina. — Una mancha de sangre, disuelta en agua y tratada por el clorhidrato de parafenildyamina, en presencia del agua oxigenada da una coloración verde oscura.

El reactivo se prepara disolviendo un gramo de clorhidrato de parafenildyamina en 200 gramos de agua destilada.

La técnica de la reacción es la siguiente:

Se disuelve la mancha o se macera en agua destilada fría, se toman 2 cc. de la solución, se le añaden 4 o 5 gotas del reactivo y luego 3 gotas de agua oxigenada; si la mancha es de sangre, se produce rápidamente después de la agitación de la mezcla una coloración verde, que pasa al violeta, y por último al violeta oscuro.

Es conveniente disolver la mancha en éter, en lugar de agua destilada; según Boas, la reacción se produce en mejores condiciones.

Reacción de Meyer a la fenoltaleína. — La fenoltaleína, en presencia de una solución de potasa, vira al rojo, colorando por consiguiente a la solución en rojo; ahora si esta solución se trata por el hidrógeno naciente, la fenoltaleína, pasa al estado de fenoltalina, que no vira al rojo, en presencia de la potasa, desapareciendo por consiguiente el color rojizo de la solución. Pero la fenoltalina puede oxidarse, originando la fenoltaleína, siempre que se ponga en contacto con un cuerpo oxigenado como el agua oxigenada y otra sustancia que le sirva de intermediaria para el transporte de oxígeno, coloreando de nuevo la solución en rojo. La sangre, gracias a un fermento de que ya nos hemos ocupado y que reside probablemente en la hemoglobina, es la encargada de transportar el oxígeno del agua oxigenada y fijarlo en la fenoltalina.

El reactivo de Meyer es el siguiente:

Fenoltaleína	2	gramos
Potasa	20	„
Agua destilada	100	„

Disolver en caliente y añadir 15 gramos de zinc pulverizado y hervir hasta completa decoloración y luego filtrar.

La potasa acciona sobre el zinc y desprende hidrógeno que reduce la fenolftaleína decolorándose la solución.

Este reactivo debe ser cuidadosamente guardado evitando la acción oxidante del aire. A pesar de ello con el tiempo siempre se oxida un poco y toma un tinte color rosa. Esto se puede evitar poniendo fragmentos de zinc en el frasco, que desprenden hidrógeno, o colocar una capa de aceite de vaselina en el líquido, el que forma una superficie que lo protege de la acción oxidante del aire.

El agua oxigenada a dos volúmenes es el agente oxidante empleado. La técnica a seguir es la siguiente:

En un tubo de ensayo se colocan 2 cc. de la solución o maceración de la mancha y se le agregan 2 cc. del reactivo de Meyer, dejando caer por último 2 o 3 gotas de agua oxigenada. Si la mancha es de sangre, inmediatamente de la agregación de los reactivos, aparece una coloración rojo vivo. Las precauciones que hay que tomar al efectuar esta reacción son las siguientes:

El líquido no debe tener una temperatura mayor de 30° ni debe ser ácido. La reacción de coloración debe ser inmediata; si ella es lenta, no tiene valor, pues la acción oxidante del aire es su causa productora.

Reacción con la fluoresceína.

Reactivo:

Fluoresceína	0.25	gramos
Potasa anhydra	20.00	„
Agua destilada	100.00	„
Polvo de zinc	10.00	„

Se hierve hasta que el líquido se decolore, se filtra y se conserva el reactivo, preservándolo de la acción de la luz y del aire, en la misma forma que la indicada para el reactivo de Meyer.

La técnica de la reacción es la siguiente:

En un tubo de ensayo, se coloca 1 cc. de la solución o maceración de la mancha con agua destilada fría, se añade 1 cc. del reactivo, y unas gotas de agua oxigenada. Si la mancha es de sangre, el líquido presenta una fluorescencia cuya intensidad depende de la riqueza en sangre de la solución.

CRISTALES DE HEMINA.

La hematina, se combina con los ácidos clorhídricos bromihídrico, yohídrico, dando lugar a las heminas correspondientes. Estas heminas, o clorhidratos de hematina cristalizan con facilidad y la forma de sus cristales es característica, lo que le ha valido su aplicación para el diagnóstico de las manchas de sangre.

Los cristales de clorhidrato de hematina, también se conocen con el nombre de cristales de Teichmann, quien fué su descubridor en el año 1853. Los cristales de yohidrato de hematina se conocen con el nombre de cristales de Strzyzowski.

Existen también otras clases de cristales, que veremos como terminación de este párrafo, los cristales de Lecha Marzo. Estos cristales no son de he-

mina, sino simplemente de hemocromógeno, que toman una forma característica y son visibles y bien diferenciables por el microscopio, con la ventaja de que pueden obtenerse rápidamente y con facilidad.

Cristales de hemina (clorhidrato de hematina) cristales de Teichmann. — Estos cristales se producen cuando se trata la sangre por el ácido acético glacial, en presencia de pequeñísimas cantidades de cloruro de sodio. En la técnica a seguir, muchos autores prefieren no agregar cloruro de sodio, basándose en que la sangre ya lo tiene y que una adición un poco notable de ese cuerpo impediría y enmascararía la formación de cristales de hemina. Pero este inconveniente puede evitarse, agregando una traza de una solución de cloruro de sodio al 1 por mil.

Práctica de la reacción. — La mancha sospechosa se disuelve en la menor cantidad posible de agua. unas gotas. Es preferible hacer macerar la mancha en 3 o 4 gotas de agua durante un tiempo variable, según la edad de la mancha. Si ella se halla sobre una tela, se vierten sobre la mancha 3 o 4 gotas de agua destilada y se deja macerar el trozo de tela con el agua. un espacio de tiempo que varía según la mancha. Se comprime el trozo de la tela para recoger las gotas de agua que han disuelto parte de la mancha, y se recoge sobre una lámina porta objeto. Si por cualquier causa la cantidad de líquido en que está disuelta la mancha es mayor que 3 o 4 gotas, se exprime el trozo de tela en un vidrio de reloj, se concentra a una temperatura muy baja para evitar la coagulación de los albuminódeos.

El líquido que resulta, se deposita gota a gota sobre la lámina porta objeto por medio de una pipeta y

se le agrega una traza de la solución de cloruro de sodio al uno por mil. Siempre que se coloque la solución de la mancha sobre la lámina porta objeto, se hace, depositando una gota a la vez y calentando suavemente sin pasar de 60°. Esta precaución es importante para la obtención de los cristales. Para calentar la lámina porta objeto se lo hace colocándolo a cierta distancia de una lámpara de alcohol, o empleando un dispositivo especial ideado por Ogier. Cuando se han evaporado las gotas de la solución, queda en la lámina una mancha algo coloreada y que debe presentar la menor superficie posible. Obtenida la mancha se agregan 8 a 10 gotas de ácido acético glacial; cada gota que cae debe hacerlo en el centro de la mancha, y en seguida debe calentarse la lámina a cierta distancia de la llama de la lámpara o en el dispositivo de Ogier. La lámina porta objeto debe calentarse, no en el centro de la mancha, sino alrededor de ella. Cada gota de ácido acético, que se evapora es reemplazada por otra, repitiendo esta operación entre 8 y 10 veces. Efectuadas todas las operaciones anteriores, se puede recubrir la lámina con un cubre objeto y examinarla al microscopio con un aumento de 400 a 500 diámetros.

Caracteres de los cristales. — Los cristales de hemina, tienen la forma de prismas alargados, a veces forman maclas con el aspecto de cruces o estrellas. Su color es pardo más o menos oscuro, y cuando son de dimensiones grandes son translúcidos (ver fig. 17). Respecto a los caracteres de estos cristales, es aconsejable efectuar muchas preparaciones con sangre para adquirir entonces así la seguridad de poderlos caracterizar bien.

Cristales de Strzyzowski. — Strzyzowski ha modificado el procedimiento de Teichmann, empleando áci-

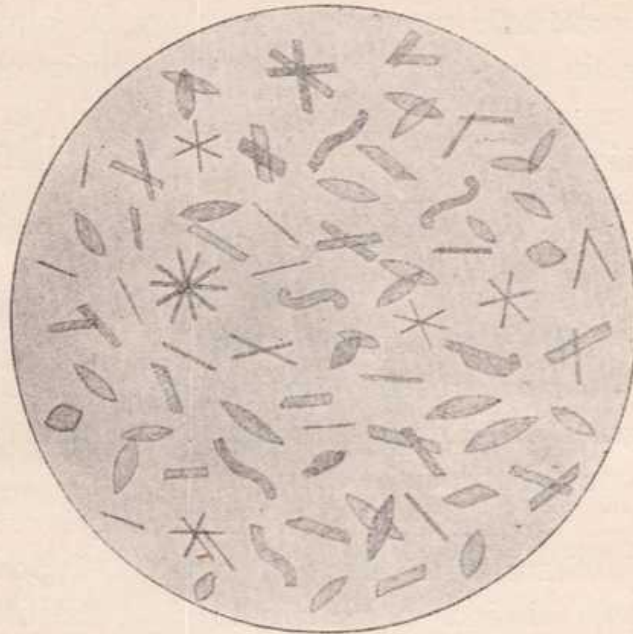


FIG. 17
Cristales de Hermina

do yohídrico y obteniendo cristales de yohidrato de hematina, según dicho autor.

El reactivo es el siguiente:

Alcohol	1 cc.
Acido acético glacial	1 cc.
Agua destilada	1 cc.
Acido yohídricoD 1,5	3 a 4 gotas

Este reactivo como no se conserva debe ser preparado en el momento de utilizarse.

La técnica es la siguiente:

Sobre una lámina porta objeto, se deposita una pequeña cantidad de la mancha, se le recubre con un

vidrio pequeño, y por los bordes del vidrio, se añade algunas gotas del reactivo. Se calienta la lámina porta objeto a cierta distancia de la llama de una lámpara de alcohol o de un pequeño pico de Bunsen. El líquido hierve, dejándolo así durante unos diez segundos, teniendo la precaución de reemplazar el reactivo a medida que se evapora.

Luego se examina al microscopio con un aumento de 400 a 500 diámetros y se observan, en el caso que se trate de sangre, cristales de yohidrato de hematina de una coloración pardo oscura, tirando al negro; su forma característica es la de prismas rómbicos.

Reacción de Lecha Marzo. — Se coloca una pequeña porción de la mancha, sobre la lámina porta objeto, se le agregan algunas gotas de pyridina que la disuelven, se calienta ligeramente; luego se añade una gota de solución yodo-yodurada (yodo 2,5 gramos—yoduro de potasio 0,5—alcohol a 96,25 gramos) y se evapora a sequedad. Se añade entonces una gota de pyridina y una gota de sulfhidrato de amoníaco, se recubre con un cubre objeto y al cabo de algunos segundos se producen cristales de hemocromógeno, que se pueden observar al microscopio.

Los cristales de hemocromógeno, se presentan bajo la forma de tabletas rectangulares y a veces de agujas de color rojo oscuro.

Métodos Biológicos.

Precipitinas. — Sintetizando los conocimientos que hemos adquirido sobre los sueros precipitantes; su aplicación en el diagnóstico de las manchas de sangre, no es nada más que la utilización de la precipitación específica hacia la sangre humana de un suero

de conejo, preparado con inyecciones de suero humano.

Respecto a la forma de obtener un suero precipitante específico, para la sangre humana, y conservación del mismo, no nos detendremos por habernos ocupado ya, con detalle de dichos puntos.

La técnica a seguir, para una reacción precipitante con manchas, es la siguiente:

Tratamiento de la mancha. — En tubos de ensayo perfectamente limpios, lavados con solución de potasa al 10 o/o (nunca con alcohol y éter), luego con abundante cantidad de agua y por último esterilizados, se pone a macerar la mancha con suero fisiológico y soda (1) durante 24 horas a la heladera; prefiriéndose la heladera a la estufa, pues a la temperatura de 37° de esta última, se desarrollan microorganismos que determinan un enturbiamiento en la solución, difícil de eliminar. La operación del lavaje de los tubos tiene suma importancia en la práctica de la reacción, pues cualquier sustancia extraña (filamentos de algodón, fibras de tejidos, polvos atmosféricos, etc.) que puedan contener los tubos, obrando por su presencia, provocan enturbiamientos que simulan precipitaciones.

La mancha puede presentarse, ya sea como una costra desecada en la superficie de un objeto, o bien entre las mallas de un tejido; en el primer caso se raspa con cuidado la mancha y se coloca en el tubo de ensayo para macerarla; si ella se encuentra sobre una tela, se corta el trozo de tela que contiene la mancha y se pone a macerar con la solución mencio-

(1) La solución que se emplea en la maceración, tiene la siguiente composición: suero fisiológico al 9,2 por mil 10 cc., lejía de soda al 10 o/o 2 gotas.

nada, en uno de los tubos de ensayo. En este último caso que se macera un tejido que contiene una mancha sospechosa, no conviene agitar el tubo que los contiene, por las sustancias extrañas que pueda arrastrar el líquido, de la tela (fibras, apresto de la tela, colorantes, etc.) y que pueden provocar un enturbiamiento del líquido, o que a pesar de su relativa limpieza, las sustancias extrañas al albuminoide de la mancha, precipiten con el suero, simulando así, una verdadera reacción precipitante. Se puede macerar la mancha con solución fisiológica sin soda, pero se corre el peligro de que no se disuelvan los albuminoides de las manchas viejas, por las transformaciones que ellos puedan haber sufrido.

Efectuada la maceración, que exige un tiempo de 24 horas y a veces más, si se trata de tejidos, se filtra el líquido a través de papel de filtro esterilizado y que ha sido mojado con solución fisiológica. Para la filtración pueden emplearse: bujías, aparatos especiales, etc., que permiten filtraciones de muy pequeñas cantidades de líquido, operando bajo la presión (ver Uhlenhuth und Weidanz. Anleitung zur Ausführung des biologischen Eiweiß differenzierungsverfahrens. — Año 1906, pág. 46.)

Filtrado el líquido, hay que neutralizar la soda que contiene, neutralización apreciable al tornasol, que se puede obtener por el ácido acético, o mejor aun, haciendo pasar en el líquido, una corriente de anhídrido carbónico. Uhlenhuth aconseja neutralizar con CO_2 . Puede acontecer que la neutralización por el anhídrido carbónico, ocasione un enturbiamiento del líquido, enturbiamiento que se elimina por filtración, sobre papel de filtro esterilizado y mojado con solución fi-

siológica y que no perjudica la marcha de la reacción, favoreciendo, por el contrario, la limpidez del líquido después de filtrado.

Resumiendo las operaciones hechas, tenemos:

- 1°.—Maceración de la mancha;
- 2°.—Filtración del líquido de maceración;
- 3°.—Neutralización del líquido resultante de la operación anterior por medio del CO₂.
- 4°.—Filtración del líquido anterior, si él lo exige;
- 5°.—Este líquido filtrado debe tener una riqueza de albuminoides, equivalente al de una solución de sangre al 1 por mil.

La determinación de dicho título se hace en la forma siguiente: Se toman 0,3 a 0,5 cc. de la solución, se colocan en un tubo de ensayo, pequeño y bien limpio, y se agregan 1 a 2 gotas de NO₃H al 25 o/o y se observa la turbidez producida, comparándola con la producida en análogas condiciones por una solución tipo, de uno en mil. Si la turbidez es mayor, se diluye hasta obtener una turbidez análoga a la de la solución tipo; si es menor, se busca su título aproximado, el que se tendrá en cuenta más adelante. Determinado el título de la solución, que debe ser de 1 en mil, se toman de ella 0,9 cc. por medio de una pipeta graduada en 1/100 de cc., que esté limpia y esterilizada, y se colocan en el fondo de un tubo de vidrio, evitando que el líquido corra por las paredes. Este tubo debe responder a las siguientes dimensiones: 11 centímetros de largo y 0,9 de diámetro. Hecho lo anterior, con otra pipeta esterilizada se toman 0,1 cc. del suero precipitante, cuyo título será de 1 por 20000 (1) y

(1) Uhenhuth entiende por título de 1 por 20000 al de un suero que dé una reacción débil pero positiva a la media hora con una solución de 1 de albuminoide por 20000 de agua.

Reacciones Químicas

Mancha de sangre humana colocada en	Edad de la mancha	Estado de conservación	Reacción de Van Deen (Impresiones Taylor)	Reacción de Adler (Impresiones Taylor)	Reacción de Meyer (en la solución de la mancha)	Reacción con la fluoresceína (en la solución de la mancha)	Reacción con el sulfato de hidrazina (en la solución de la mancha)	Reacción con la Parafenyldamina (Impresiones Taylor)
hoja de cuchillo	15 días	Bueno	francamente positiva	francamente positiva	francamente positiva	positiva	positiva	francamente positiva
» » »	6 meses	Regular	positiva	» » »	» » »	debil positiva	debil positiva	» » »
mango » »	15 días	Bueno	francamente positiva	» » »	» » »	positiva	positiva	» » »
» » »	6 meses	Regular	positiva	» » »	» » »	debil positiva	debil positiva	» » »
vaina » »	15 días	Bueno	francamente positiva	» » »	» » »	positiva	positiva	» » »
» » »	6 meses	Regular	positiva	» » »	» » »	debil positiva	debil positiva	» » »
Clavos	20 días	Bueno	francamente positiva	» » »	» » »	positiva	positiva	» » »
» oxidados	6 meses	Malo	muy debil positiva	positiva	debil positiva	dudosa	dudosa	positiva
trozos de tela	15 días	Bueno	francamente positiva	francamente positiva	francamente positiva	positiva	positiva	francamente positiva
» » »	4 meses	Regular	positiva	» » »	» » »	debil positiva	debil positiva	» » »
» » »	6 meses	Malo	muy debil positiva	positiva	debil positiva	dudosa	dudosa	positiva
reboque de pared	20 días	Regular	positiva	francamente positiva	francamente positiva	debil positiva	debil positiva	francamente positiva
» » »	4 meses	Malo	muy debil positiva	positiva	debil positiva	dudosa	dudosa	positiva
tierra	10 días	Regular	positiva	francamente positiva	francamente positiva	debil positiva	debil positiva	francamente positiva
»	2 meses	Malo	muy debil positiva	positiva	debil positiva	dudosa	dudosa	positiva
pavimento	20 días	Regular	positiva	francamente positiva	francamente positiva	debil positiva	debil positiva	francamente positiva
»	4 meses	Malo	muy debil positiva	positiva	debil positiva	dudosa	dudosa	positiva

se coloca en el tubo que contiene la solución límpida y neutra de la mancha, haciéndolo correr por las paredes, muy cerca de la superficie del líquido, y como el suero precipitante es más denso, irá al fondo del tubo. Si la mancha es de sangre, debe observarse después de la adición del antisuero, un principio de enturbiamiento en el fondo del tubo con un máximo de tiempo de 5 minutos, que irá aumentando sucesivamente, hasta propagarse a todo el líquido, para resolverse por último en un precipitado esponjoso, que luego caerá al fondo del tubo.

Al mismo tiempo que se hace la reacción con la mancha sospechosa de sangre, se efectúan una serie de reacciones con tubos testigos, cuyo número varía según el material del que se extrajo la mancha y cuyo detalle es el siguiente:

Tubo testigo número 1 que contiene:

0,9 cc. de (suero fisiológico 10 cc. + soda 2 gotas + corriente de CO₂) + 0,1 cc. de suero precipitante A (título 1 por 20000) operando en las mismas condiciones que con el líquido de la mancha.

Tubo testigo número 2 que contiene:

0,9 cc. de suero de conejo normal, (1) diluido al 1 por mil + 0,1 cc. de suero precipitante A.

Tubo testigo número 3:

0,9 cc. de una solución al 1 por mil de suero humano o del animal de que se sospeche o pregunte el origen de la mancha + 0,1 cc. de suero precipitante A.

Tubo testigo número 4:

0,9 cc. de suero, de una especie zoológica muy dis-

(1) O de la misma especie a que pertenece el animal que proveyó el antisuero

tante de la especie a que pertenece la sangre buscada + 0,1 cc. de suero precipitante A.

Tubo testigo número 5:

0,9 cc. del líquido resultante de la maceración, en las mismas condiciones en que se maceró la mancha sospechosa, de trozos del mismo género u objeto sobre el cual se hallaba la mancha + 0,1 cc. de suero precipitante A.

Tubo número 6:

Es el tubo con maceración de la mancha sospechosa y suero, que ya hemos descripto.

NOTA. — Si al investigar la riqueza en albuminoides de líquido resultante de la mancha, se halla un título menor al 1 por 1000, se añade una porción mayor de antisuero, en relación a la disminución del título.

La reacción es positiva, cuando ella tiene lugar únicamente en los tubos números 3 y 6.

Respecto a las diluciones respectivas de la solución albuminóidea y de suero precipitante, hay dos sistemas: unos operan con soluciones muy concentradas de albuminoides y sueros de título débil (1 por 500), otros, entre ellos Uhlenbuth, emplean las soluciones albuminóideas muy diluídas y los sueros de título elevado (1 por 20000.)

Cuando deba practicarse la reacción precipitante con cantidades pequeñas de líquido, se opera en las mismas condiciones, en tubos capilares, que disminuyen por consiguiente la proporción de todas las cantidades.

Para la observación de la reacción precipitante, en el interior de los tubos, conviene suspender éstos en el soporte, de manera tal, que el fondo del tubo no repose sobre ninguna superficie y quede en el aire,

siendo posible así, observar lo que pasa en su base.

Durante esta operación conviene tapar los tubos con un tapón que se puede obtener, cortando el fondo de un tubo de vidrio.

Otro dispositivo ventajoso y cómodo para la observación de la reacción precipitante, es el ideado por Dürch, que consiste en lo siguiente: se sumergen los tubos en un recipiente de vidrio que contenga aceite de cedro: éste obra, como en el caso de la inmersión homogénea, en los microscopios, evitando las pérdidas de luz y los rayos refractados, originados por las densidades de los distintos medios.

Método de la desviación del complemento. — La teoría de este método, habiendo sido tratada con detalla, nos limitaremos aquí a la parte práctica del mismo.

Poniendo en contacto suero precipitante para la sangre humana calentado a 56°, con una mancha de sangre humana y con suero nuevo de cobayo, tendremos el siguiente sistema: antígeno (mancha sangre humana) + sensibilizatriz específica (suero precipitante para la sangre humana) + complemento (suero nuevo de cobayo). En este sistema se ha producido la fijación del complemento, de manera que si le agregamos ahora a dicho sistema, suero de conejo calentado a 56° y hemolítico para los glóbulos de carnero y glóbulos de carnero, la hemolisis no se produce, por la falta en el sistema del complemento que fué desviado y fijado por los dos primeros elementos del mismo. Para que esta desviación del complemento se produzca, es necesario que el antígeno y la sensibilizatriz se correspondan, dada la especificidad de la reacción. antígeno y anticuerpo. En las condiciones en que operamos, esta correspondencia de antígeno y anticuerpo,

tiene lugar únicamente cuando el antígeno o mancha, es de sangre humana; en esas condiciones habrá desviación del complemento, y posteriormente no se producirá la hemolisis. Luego hemolisis no producida, reacción positiva; hemolisis que se produce, reacción negativa.

Los elementos necesarios para la reacción son los siguientes:

Antígeno. — Mancha que se investiga si es de sangre humana.

Sensibilizatriz (suero precipitante). — Suero de conejo precipitante para la sangre humana. Este suero se calienta a 56° para destruir el complemento.

Complemento. — Suero nuevo de cobayo.

Glóbulos rojos. — Glóbulos rojos de carnero, (para su obtención ver sueros hemolíticos.) Se emplean en dilución al 5 o/o.

Suero hemolítico para los glóbulos de carnero. — (Ver sueros hemolíticos.) Este suero se calienta a 56° para destruir el complemento.

Obtenidos los elementos anteriores, hay que proceder a los siguientes titulajes:

Titulaje del poder hemolítico del suero. — Procederemos en la forma ya indicada (ver sueros hemolíticos.)

Supongamos haber hallado que 0,1 cc. de suero hemolítico son suficientes para hemolizar 1 cc. de glóbulos de carnero diluidos al 5 o/o en presencia de 0,1 cc. de suero de cobayo diluido al 1/4.

Titulaje del poder aléxico del suero de cobayo (complemento). — Operación igual a la anterior, variando únicamente las cantidades de suero nuevo de cobayo. Supongamos haber hallado que 0,1 cc. de

suero nuevo de cobayo diluído al 1|4, es la cantidad de complemento que necesitan 0,1 cc. de suero hemolítico, para hemolizar 1 cc. de glóbulos rojos de carnero en 1|2 hora.

Titulaje del suero precipitante. — Para ello se colocan en una serie de tubos de vidrio, el suero precipitante en cantidades variables, luego se añaden a cada tubo la misma cantidad de complemento (suero de cobayo diluído al 1|4) y de antígeno (sangre humana normal diluída), se lleva el volúmen a 2 cc. añadiendo agua fisiológica y se colocan los tubos a la estufa a 37°, durante dos horas. Se retiran los tubos de la estufa, y se añade 1 cc. de glóbulos de carnero al 5 o|o y 0,1 cc de suero hemolítico. El título del suero precipitante estará dado, por la cantidad de suero suficiente, para no permitir hemolisis en los tubos. El cuadro siguiente, aclara el punto.

TUBOS	Suero precipitante	Sangre humana normal diluída al 1 por 1000	Suero de cobayo nuevo diluído al 1 4	Glóbulos de carnero al 5 por 100	Suero hemolítico para glóbulos de carnero	HEMOLISIS
Nº 1	0.1 cc.	1 cc.	0.1 cc.	1 cc.	0.1 cc.	nula
» 2	0.05 »	1 »	0.1 »	1 »	0.1 »	»
» 3	0.03 »	1 »	0.1 »	1 »	0.1 »	rastros
» 4	0.02 »	1 »	0.1 »	1 »	0.1 »	muy débil

Luego 0,03 de suero es la cantidad necesaria para fijar 0,1 de complemento sobre 1 cc. de sangre humana normal diluída al 1 por 100.

Por investigar si una mancha es de sangre humana, se procede en la forma siguiente:

	A	B	C	D	E	F
TUBOS	Mancha de san- gre diluida en agua fisiologica al 1 por 1000	Suero preci- pita de san- gure humana	Suero nue- vo de caba- yo diluido al 1/4	Suer. ho- molitico pa- ra los glo- bulos de carnero	Globulos de carnero al 5 ojo	Agua fisiologica
Nº 1	1 cc.	0.3 cc.	0.1 cc.	0.1 cc.	1 cc.	0.5 cc.
> 2	0.75 >	0.3 >	0.1 >	0.1 >	1 >	0.75 >
> 3	0.50 >	0.3 >	0.1 >	0.1 >	1 >	1 >
> 4	0.25 >	0.3 >	0.1 >	0.1 >	1 >	1.25 >
> 5	0.10 >	0.3 >	0.1 >	0.1 >	1 >	1.4 >

A los distintos tubos se agregan las sustancias en la forma siguiente: Se agrega A, B y C, se agita y se lleva a la estufa a 37° donde se deja 2 horas, se retira luego y se agrega D, E y F, se agita y se lleva nuevamente a la estufa por 2 horas, por último se observa: si hay hemolisis, la mancha no es de sangre humana, en caso de que la hemolisis sea negativa, la mancha es de sangre humana.

Es necesario preparar 4 tubos testigos con los siguientes elementos:

- 1er. tubo—Con todos los elementos anteriores menos antisuero.
- 2.º id—Con todos los elementos anteriores menos manchas a examinar.
- 3er. id—Con todos los elementos anteriores, en lugar de la solución de la mancha, solución de sangre humana.
- 4.º id—Con todos los elementos anteriores, en lugar de la solución de la mancha, solución de sangre de especie animal muy distante.

CONCLUSIONES

Para la realización del fin propuesto en este trabajo: identificación de las manchas de sangre, fué necesario ante todo efectuar un estudio detallado de esta, conocimiento previo reclamado por los diversos componentes del elemento sanguíneo y para el desarrollo de los variados métodos de investigación.

Los diversos métodos para la identificación de las manchas de sangre, exigieron una larga práctica de los mismos, que fué hecho, primero con materiales conocidos de sangre, para poder llevar luego las investigaciones á otro terreno.

Las reacciones que efectué con los sueros precipitantes, obligo la preparación previa de los mismos, ya que el comercio no los libra á la venta, y sobretodo que esta clase de investigaciones, exige que ellos sean preparados personalmente por el perito químico. La obtención del suero precipitante fué tarea difícil de realizar. Unas veces por la dificultad en conseguir sangre humana, otra porque los animales morían en el transcurso de la preparación y hasta llegó á producirse el caso de que terminado el período de inyecciones á un animal, el suero del mismo no tenía propiedades precipitantes.

Insistiendo, observando y teniendo en cuenta los

errores cometidos en cada operación, pude llegar á obtener suero precipitante con 3 animales después de haberlo intentado con varios. Los animales fueron tratados en la forma ya indicada en el capítulo V, la marcha del animal en lo referente á su peso, la cantidad de líquido inyectado y la cantidad de suero recogido, fué la siguiente:

Conejo negro A, peso 1800 gramos. Inyección intraperitoneal de suero humano.

FECHA DE LA INYECCIÓN	CANTIDAD DE LÍQUIDO INYECTADO	PESO DEL ANIMAL
Mayo 4 1912	4 cc.	1.800 gramos
» 11 »	4 »	1.750 »
» 18 »	5 »	1.720 »
» 25 »	5 »	1.710 »
Junio 1 »	5 »	1.700 »

Sacrificado el animal el 9 de Junio, pesa 1680 gramos y produjo 45 gramos de suero precipitante.

Conejo negro B, peso 1.970 gramos, inyección intraperitoneal de suero humano.

FECHA DE LA INYECCIÓN	CANTIDAD DE LÍQUIDO INYECTADO	PESO DEL ANIMAL
Mayo 4 1912	4 cc.	1.970 gramos
» 11 »	4 »	1.925 »
» 18 »	5 »	1.880 »
» 25 »	5 »	1.865 »
Junio 1 »	5 »	1.850 »

Sacrificado el animal el 9 de Junio, pesaba 1840 gramos y produjo 38 gramos de suero precipitante.

Conejo negro C, peso 2.250 gramos. Inyección intraperitoneal de suero humano.

FECHA DE LA INYECCIÓN	CANTIDAD DE LÍQUIDO INYECTADO	PESO DEL ANIMAL
Julio 6 - 1912	4 cc.	2.250 gramos
» 13 »	4 »	2.210 »
» 20 »	4 »	2.175 »
» 27 »	5 »	2.160 »
Agosto 4 »	5 »	2.140 »

Sacrificado el animal el día 12 de Agosto, pesaba 2100 gramos y produjo 50 gramos de suero precipitante.

Creo oportuno hacer notar, que con anterioridad á la obtención del suero precipitante, es conveniente obtener suero hemolítico, efectuar las reacciones hemolíticas, así como el titula je del suero hemolítico, complemento, etc., para familiarizarse de ese modo con las reacciones biológicas. Con el suero precipitante obtenido, efectué las siguientes investigaciones:

Determinación del poder precipitante del suero de los animales A. B. y C. — Para esta determinación procedí en la forma que indicé al tratar de los sueros precipitantes. La reacción la efectué en tubos de ensayo operando como indicé en el Capítulo II (II parte). Las cantidades de dilución de sangre y suero precipitante empleados, eran de 0.9 cc. y 0.1 cc., respectivamente. La solución de sangre en suero fisiológico, al 9.2 por mil respondía á un título de 1 en mil, título adaptado en general y empleado por Uhlenhuth. No obs-

tante he comprobado el título límite de los 3 sueros con el siguiente resultado:

SUERO	PRECIPITANTE	SOLUCIÓN DE SANGRE EN SUERO FISIOLÓGICO	TIEMPO DE LA REACCIÓN
Suero del conejo	A	solución al 1 por 1000	10'
"	"	"	6'
"	"	"	2'5

SUERO	PRECIPITANTE	SOLUCIÓN DE SANGRE EN SUERO FISIOLÓGICO	TIEMPO DE LA REACCIÓN
Suero del conejo	A	Solución 1 por 5000	24 horas
"	"	" 1 " 14000	24 horas
"	"	" 1 " 18000	24 horas

Especificidad del suero precipitante. — Para este objetivo procedí á efectuar la reacción precipitante con sangre de diferentes especies animales. Estas investigaciones fueron hechas con sangre fresca, dado que la naturaleza de ellas, no me exigían otra clase de material, desapareciendo por consiguiente en este caso, las operaciones previas que son necesarias cuando se trata de manchas de sangre.

La solución de sangre en suero fisiológico al 9.2100, fué llevada á un título de 1 de sangre por 1000 de suero. En la solución límpida de la misma, practiqué la reacción precipitante en la forma y con las precauciones indicadas anteriormente, con el siguiente resultado:

SUERO preci- pitante	SOLUCIÓN AL 1 POR MIL EN SUERO FISIOLÓGICO DE SANGRE DE:							
	Caballo	Vaca	Buey	Cerdo	Congo	Cobayo	Gallina	Paloma
	Reacción	Reacción	Reacción	Reacción	Reacción	Reacción	Reacción	Reacción
Sero (C)	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
	C							

Reacciones con manchas preparadas. — Previamente y con objeto de familiarizarme con la técnica de la reacción precipitante, hice varias reacciones con sangre fresca. Las reacciones precipitantes que efectué con diversas manchas de sangre humana, colocadas en distintos objetos, fueron practicadas en la forma que indico en el Capítulo II (II parte). El detalle de las mismas es el siguiente:

MANCHA DE SANGRE HUMANA COLOCADA EN	EDAD DE LA MANCHA	ESTADO DE CONSER- VACION	DILUCIÓN AL 1 POR MIL DE LA MANCHA EN:	Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento
				con suero precipitante A	con suero precipitante B	con suero precipitante C
				REACCIÓN	REACCIÓN	REACCIÓN
hoja de cuchillo	15 días	Buena	suero fisiológico 9. 200	á los 20'	13'	8'
"	6 meses	Regular	ligeramente alcalinizado con Na (OH)	"	30'	15'
mango	15 días	Buena	suero fisiológico al 9. 200	"	18'	10'
"	6 meses	Regular	ligeramente alcalinizado con Na (OH)	"	20'	12'
valva	15 días	Buena	suero fisiológico al 9. 200	"	16'	9'
"	6 meses	Regular	ligeramente alcalinizado con Na (OH)	"	21'	10'
Clavos	20 días	Buena	suero fisiológico al 9. 200	"	15'	7'
" oxidados	6 meses	Mala	ligeramente alcalinizado con Na (OH)	"	30'	20'
Trozos de tela	15 días	Buena	suero fisiológico al 9. 200	"	12'	7'
"	4 meses	Regular	ligeramente alcalinizado con Na (OH)	"	19'	10'
"	6 meses	Mala	"	"	25'	12'
pavimento	20 días	Regular	"	"	15'	10'
"	4 meses	Mala	"	"	23'	13'
reboque pared	20 días	Regular	"	"	20'	16'
"	4 meses	Mala	"	"	50'	35'
tierra	10 días	Regular	"	"	25'	15'
"	2 meses	Mala	"	á 1 hora	40'	20'

Al practicar las reacciones precipitantes con manchas de sangre que detallo en el cuadro anterior, efectué las siguientes reacciones de control:

MANCHA DE SANGRE DE:	EDAD DE LA MANCHA	ESTADO DE CONSERVACIÓN	DILUCIÓN AL 1 POR 1000 EN	TRATAMIENTO CON SUERO PRECIPITANTE DEL CONEJO		
				A	B	C
Caballo	fresca	bueno	Suero fisiológico al 2.2 por 1000	R. negativa	R. negativa	R. negativa
Vaca	"	"	"	"	"	"
Buey	"	"	"	"	"	"
Carnero	"	"	"	"	"	"
Conejo	"	"	"	"	"	"
Gallina	"	"	"	"	"	"
Paloma	"	"	"	"	"	"

OBJETO EN QUE SE HALLABA LA MANCHA DE SANGRE HUMANA	DILUCIÓN AL 1 POR MIL EN	TRATAMIENTO CON SUERO PRECIPITANTE DEL CONEJO		
		A	B	C
Raspaduras de un trozo limpio del mango del cuchillo que contenía sangre humana*	Suero fisiológico alcalinizado con Na (OH) y neutralizado con CO ₂	R. negativa	R. negativa	R. negativa
Trozo de tela limpio, de la tela que contenía sangre humana	Suero fisiológico alcalinizado con Na (OH) y neutralizado con CO ₂		"	
Raspaduras de un trozo limpio de la vaina que contenía sangre humana	Suero fisiológico alcalinizado con Na (OH) y neutralizado con CO ₂	"	"	
Id. id. del pavimento	"	"	"	
.....	Suero fisiológico	"	"	
	" " " alcalinizado con Na (OH) y neutralizado con CO ₂	"	"	"

* Trozo limpio en este caso y los siguientes se refiere a que él no contiene manchas de sangre.

El espectroscopio, aparato que nos es más familiar, no presentó mayores dificultades en su empleo. Las observaciones espectroscópicas las verifiqué en manchas preparadas sobre diversos objetos, manchas cuya edad y estado de conservación eran distintos. La marcha seguida en estas observaciones, es la que indicó en el capítulo (II II parte). El resultado de las mismas queda indicado en el cuadro siguiente:

MANCHA COLOCADA EN	EDAD DE LA MANCHA	ESTADO DE CON- SERVA- CIÓN	SOLUCIÓN DE LA MANCHA EN	Observa- ción de su color de	Reac- ción de la solu- ción de la mancha	Reac- ción de la solu- ción de la mancha	ESPECTRO DE ABSORCIÓN OBSERVADO
hoja de cuchillo	15 días	Bueno	agua destilada lige- ramente alcaliniza- da con NH ₃	1 c.	alcal.	1 por 100	oxihemoglobina
" " "	6 meses	Regular	" " "	"	"	"	hematina
valva " "	15 días	Bueno	" " "	"	"	"	oxihemoglobina
mango " "	6 meses	Regular	" " "	"	"	"	hematina
trozos de hierro	20 días	Bueno	" " "	"	"	"	oxihemoglobina
" " " " (oxidados)	6 meses	Malo	SO ₄ H ₂	"	ácida	"	hematoporfirina
trozos de tela	15 días	Bueno	agua destilada lige- ramente alcaliniza- da con NH ₃	"	alcal.	1 por 100	oxihemoglobina
" " "	4 meses	Regular	alcohol y ácido acético	"	ácida	"	hematina
" " "	6 meses	Malo	Potasa, previo tra- tamiento por SO ₄ H ₂	"	alcal.	"	hematoporfirina
pavimento	20 días	Regular	agua destilada lige- ramente alcaliniza- da con NH ₃	"	"	1 por 100	oxihemoglobina
reboque pared	20 días	Regular	solución de K (OH) al 1 por 10.	"	"	"	metehemoglobina
" "	4 meses	Malo	" " "	"	"	"	hematina
tierza	10 días	Regular	" " "	"	"	"	"
" "	2 meses	Malo	" " "	"	"	"	"
trozo de tela	6 meses	Malo	Reactivo de Ele- gier	"	"	"	hemocromogéno
hoja de cuchillo	6 meses	Regular	Pyridina y trata- miento sulfúrico	"	"	"	hematoporfirina

* Reactivo de Eiegier. Ver "Reacción por el Sulfato de Hidrasina". Capítulo, II (II parte).

Al microscopio observé los elementos de sangre fresca, y los de manchas frescas y viejas, para notar la alteración de los mismos y poder de ese modo precisar la aplicación práctica del microscopio á la identificación de las manchas de sangre. El resultado del exámen microscópico de las manchas de sangre humana preparadas es el siguiente:

MANCHA COLOCADA EN	EDAD DE LA MANCHA	Estado de conservación de la mancha	TRATAMIENTO DE LA MANCHA	RESULTADO
Hoja de cuchillo	15 días	Bueno	R. Virchow *	Globulos rojos de- formados.
" "	6 meses	Regular	" "	No se observan glo- bulos rojos.
Vaina	15 días	Bueno	" Vibert	Globulos rojos de- formados.
Mango	6 meses	Regular	" "	No se observan globulos rojos.
Trozos de hierro	20 días	Bueno	" Ranvier	Globulos rojos muy deformados.
" " " " " " "	6 meses	Malo	" Rousin	No se observan globulos rojos.
Trozos de tela	15 días	Bueno	con suero fisiológico	Globulos rojos muy deformados.
" " " " " " "	4 meses	Regular	" " "	No se observan globulos rojos.
Pavimento	20 días	Regular	R. Virchow	" "
Reboq. de pared	20 días	Regular	" Ranvier	" "
Tierra	10 días	Regular	" Virchow	" "
"	2 meses	Malo	con suero fisiológico	" "

* Solución de K (OH) al 30p.

Cristales de Hemina, Strzizowski y Lecha Marzo. — Operando sobre manchas de sangre humana, de distinta edad y estado de conservación, siguiendo la técnica anteriormente indicada, obtuve los siguientes resultados:

MANCHA COLOCADA EN	EDAD DE LA MANCHA	ESTADO DE CONSERVACIÓN	CRISTALES DE TEICHMANN	CRISTALES DE STRZIZOWSKI	CRISTALES DE LECHA MARZO
Hoja de cuchillo	15 días	Bueno	Positivo	Positivo	Positivo
" " "	6 meses	Regular	"	"	Negativo
Vaina " "	15 días	Bueno	"	"	Positivo
Trozos de hierro	20 días	Bueno	"	"	"
id. id. (oxidado)	6 meses	Malo	Negativo	"	Negativo
Trozos de tela	15 días	Bueno	Positivo	"	Positivo
" " "	4 meses	Regular	"	"	"
" " "	6 meses	Malo	Negativo	"	Negativo
" " "	6 meses	Malo	"	"	"
Reboque de pared	20 días	Regular	"	"	"
" " "	4 meses	Malo	"	"	"
Tierra	10 días	Regular	Positivo	"	"
"	2 meses	Malo	Negativo	"	"
Pavimento	20 días	Regular	Positivo	"	"

Las reacciones anteriores, que nos ofrecen los diversos métodos de investigación, fueron practicados sobre manchas de sangre de distinta edad y estado de conservación. Del mismo modo efectué esas reacciones con el objeto de precisar el límite de ellas, así como su sensibilidad y especificidad, variando entónces dentro del tiempo disponible y en lo posible el sujeto sometido á las mismas reacciones pudiendo llegar, á la siguiente concisa crítica de los diversos métodos:

Aplicación del espectroscopio. — El inconveniente grande de este método, es que él exige gran cantidad de sangre, lo que no siempre se puede realizar. Además la precisión y rapidez que el presenta, cuando se trata de manchas grandes, recientes, abundantes y en buen estado de conservación, desaparece en presencia de pequeñas manchas, aisladas y mal conservadas. Si bien es cierto, que la materia colorante de la sangre, se transforma con el envejecimiento de ella, y que también tratada la mancha por ciertos reactivos, se puede llevar su materia colorante á formas químicas definidas; la precisión del exámen espectroscópico en estos casos, no tiene el valor que cuando se trata de sangre, cuya materia colorante se halla al estado de oxihemoglobina.

↵ *Exámen citológico.* — En el caso de manchas de sangre, frescas y bien conservadas, es decir, que ellas no hayan sufrido compresiones, ni modificaciones, causas que alteran los elementos sanguíneos, estos se encontrarán en las manchas, con sus caracteres morfológicos y dimensiones análogas, á las que poseen en la sangre recién extraída. La circunstancia anterior favorable para el exámen microscópico de las manchas,

es muy difícil de realizar en la práctica, sucediendo frecuentemente, que el exámen debe practicarse en manchas viejas, mal conservadas, cuando no se presenta el caso, que ellas están casi totalmente destruidas. En estas condiciones los elementos figurados de la sangre, han sufrido modificaciones y no vuelven á su estado primitivo, á pesar de los tratamientos por soluciones especiales. Como vemos, la aplicación práctica del método citológico, es muy reducida.

† *Cristales de Hemina.* — La reacción de Teichmann tiene mucho valor en el diagnóstico de las manchas de sangre, ella puede ser efectuada con un resultado positivo, con cantidades muy pequeñas de sangre y con manchas viejas. Esta reacción, rápida y sencilla, exige cierta práctica en el operador.

Entre las causas que pueden inducir en error cuando se practica la reacción de Teichmann hallamos las siguientes: los cristales de murexina, que se hallan en la sangre, tienen una forma análoga á los de Hemina, la materia colorante, de ciertas telas azules; el índigo, da al practicarse la reacción de Teichmann, cristales análogos á los de Hemina. Para diferenciar los cristales de Hemina, de otras formas cristalinas análogas, se aprovecha la propiedad, que presentan los de Hemina, al ser observados á la luz polarizada; en estas condiciones son anisótrofos. No pudiendo efectuar la comprobación anterior, debe comprobarse la solubilidad en agua y alcohol de los cristales. Los de Hemina son insolubles.

× *Cristales de Strzyzowski.* — Este método tiene todas las ventajas del anterior, uniéndose á ellas el hecho de que es más rápido y sensible. Además la técni-

ca para su obtención es más sencilla y segura que la seguida para los de Teichmann. El único inconveniente es la alterabilidad del reactivo, que exige, sea preparado en el momento de utilizarse.

† *Reacciones químicas.* — Las reacciones por la potasa, hipobromito de sodio, amoniac, é investigación de albumina y azoe, cuyo valor de especificidad está basado en el hecho de caracterizar ciertas sustancias que entran en la composición de la sangre, tienen un valor muy relativo. En efecto, las sustancias como la albumina, urea, etc., no son propias de la sangre, sino que son comunes á otros líquidos orgánicos, los virajes de coloración también son frecuentemente observados en líquidos cuya composición química es compleja. Por esas razones, estas reacciones, deben ser abandonadas en la investigación de las manchas de sangre.

† *Reacción al agua originada.* — El desprendimiento de oxígeno, en esta reacción, es ocasionado por un fermento, que no está probado sea característico de la sangre. Por otra parte, numerosos fermentos que se hallan en los líquidos del organismo humano, también provocan este desprendimiento de oxígeno, y en el caso de practicar la reacción que nos ocupa, con un líquido del organismo que posea esos fermentos, tendremos una reacción positiva. Además los metales en polvo ó estado coloidal, ciertos óxidos como el de hierro, provocan el desprendimiento de oxígeno, dando por consiguiente una reacción positiva. Como vemos, el valor de esta reacción es muy pequeño y relativo.

† *Reacción de Van Deen.* — La reacción de Van Deen es sensible con soluciones muy diluidas de sangre.

La sensibilidad de la reacción disminuye con el envejecimiento de la mancha, además presenta los siguientes inconvenientes: el óxido de hierro, las sales de hierro, peróxido de manganeso, peróxido de plomo, musgo de platino, hipoclorito de sodio, las sales de mercurio, etc., etc., dan al ser tratados por el reactivo de Van Deen, una reacción positiva. Entre las sustancias orgánicas que dan esta reacción, tenemos: la harina, gluten, caseína, leche no hervida, goma arábiga, fécula de papas, hongos, cuero, pus, esperma, sudor, etc. La sangre que ha sufrido la acción de una temperatura elevada, no da la reacción de Van Deen. En conclusión, es una reacción bastante sensible y que puede ser utilizada como reacción de orientación.

✕ *Reacción por el Sulfato de Hidrazina.* — La coloración rosa que produce esta reacción, en presencia de sangre, en ciertos casos, es difícil de apreciar con seguridad, pues una solución extendida de sangre posee de por sí, esta coloración rosa. Numerosas sustancias por otra parte dan la reacción al sulfato de hidrazina. La ventaja que tiene, es que permite, en la mancha tratada por el reactivo de Riegler, el exámen espectroscópico del hemocromogeno formado, en el caso de ser positiva la reacción y tratarse por consiguiente de sangre. Esta reacción, dando resultado positivo, en la observación espectroscópica, es una buena reacción de comprobación.

✕ *Reacción de Adler.* — Reacción muy sensible, produciéndose, aún, en presencia de rastros de sangre. Es positiva con manchas viejas y con manchas que han sufrido la acción del calor. Los líquidos orgánicos que en los casos anteriores dan reacción positiva, no

dan la reacción del Adler. En cambio, ciertos jugos vegetales, los líquidos coloidales, sales de hierro, etc., dan la reacción de Adler.

Como reacción de orientación, es más específica y sensible que la de Van Deen.

✧ *Reacción á la parafenildiamina.* — Poco específica pues dada la gran alterabilidad del reactivo al contacto del aire, no permite hacer diferenciaciones precisas.

✧ *Reacción de Meyer.* — Esta reacción posee una gran sensibilidad y presenta los siguientes inconvenientes: el reactivo solo, calentado á 30° da reacción positiva, en presencia de sangre y un líquido ácido no se produce, los fermentos dan la reacción de Meyer, lo mismo que las sales de cobre, hierro, etc.

✧ *Reacción por la fluoresceína.* — Presenta los mismos inconvenientes que la anterior, con el agregado que la fluorescencia que ella produce, es mucho menos apreciable que la coloración en la reacción de Meyer.

✧ *Sueros precipitantes.* — La reacción por los sueros precipitantes, es específica y muy sensible.

Cuando efectuadas en una mancha de sangre las reacciones que nos ofrecen los diversos métodos, ellas nos han llevado á la conclusión que se trata de una mancha de sangre, el método de los sueros precipitantes nos permite aclarar el punto de su origen. Si un suero precipitante es específico para la albúmina humana, y si una mancha ha dado con dicho suero una reacción positiva, habiendo sido también positivas la mayor parte de las reacciones físicas, químicas, citológicas y microscópicas, efectuadas con ella, el punto queda aclarado. La reacción de grupo de los sue-

ros precipitantes queda muy disminuída, pues en este caso solo los monos superiores, dan con su sangre reaccion precipitante.

× *Método de la desviación del complemento.* — Método sensible, cuya sensibilidad es mayor aun que la de los sueros precipitantes. Tiene el inconveniente que él exige una larga serie de preparaciones previas, titulajes, etc., de los elementos que entran en él. Uhlenhuth y Weidanz lo recomiendan, agregando que sirve de control al de las precipitinas.

RESUMEN

De las experiencias que he practicado, aconsejo la siguiente marcha, para la investigación sistemática, de la presencia y origen de la sangre en manchas sospechosas remitidas al químico legista para su examen:

1°. Tratamiento de la mancha.

a) Con suero fisiológico al 9.2|00, y examinar al microscópico la existencia de eritrocitos.

b) Si el tratamiento anterior no dió resultado, tratar con el reactivo de Virehow (K (O H) al 30 o|o).

c) Con agua destilada primero, y con agua destilada ligeramente alcalinizada con N H₃.

d) Con alcohol + ácido acético, y en el caso de que por los tratamientos anteriores no se obtuviera la disolución de los pigmentos sanguíneos. Este tratamiento conviene utilizarlo en un principio para ahorrar tiempo, cuando las manchas se encuentran sobre objetos metálicos, en especial hierro muy oxidado.

e) Como último recurso, para obtener la solubilización de la mancha, se puede emplear con un resultado muy satisfactorio el reactivo de Riegler, que además de presentar una coloración cromática característica permite el exámen espectroscópico (hemocromógeno) de la solución de la mancha, ya sea directamente, ó efectuando la extracción con piridina del hemocromógeno.

f) Obtenida la solubilización con agua destilada ó ligeramente alcalinizada con NH_3 , se utiliza esta solución para el exámen espectroscópico (oxihemoglobina y hemoglobina) y para todas las demás reacciones (cristales de Teichmann, Strzyzowski, etc).

g) Si la solubilización solo se ha obtenido por el alcohol y ácido acético, la disolución se examina al espectroscopio (hematina en solución ácida) y es muy adaptable para la obtención de los cristales de Teichmann y Strzyzowski.

h) Para la diferenciación de las manchas, es muy conveniente efectuar sobre las impresiones Taylor de las mismas, las siguientes reacciones, en el órden que indico y que responde aproximadamente á su valor diferencial:

- 1°. Reacción de Van Deen.
- 2°. " " Adler
- 3°. " " Meyer

De estas tres reacciones la más sensible es la de Adler y la más característica la de Meyer.

i) Efectuado el tratamiento de la mancha como acabo de indicar, para su exámen de órden físico y químico, se procederá á los siguientes ensayos, en el ór-

den que indico y que responden al mismo tiempo á su valor, diremos diagnóstico para caracterizar la presencia de sangre.

1°. Constatar la existencia de eritrocitos y sus dimensiones.

2°. Exámen espectroscópico.

3°. Cristales de Reichmann.

4°. Cristales de Strzyzowski.

Con un resultado positivo en estos cuatro ensayos, se puede afirmar la presencia de sangre en la mancha analizada. Como complemento y únicamente á título de comprobación, se pueden efectuar las siguientes reacciones, teniendo en cuenta que un resultado negativo ó dudoso de algunas de ellas, no modificará en nada las conclusiones obtenidas por las anteriores reacciones; pues aparte de no ser muy características, su sensibilidad es inferior á las 4 fundamentales.

j) En el caso de que la mancha hubiera experimentado una elevada temperatura, aun mismo un principio de carbonización, el único recurso para constatar la posibilidad de la presencia de sangre, consiste en efectuar el tratamiento sulfúrico, y observar en este caso el espectro de la hematoporfirina. Su valor es relativo, y solo tendría fuerza probativa, en el caso de que se excluyera la posibilidad de existir productos vegetales en la mancha.

k) Constatada la presencia de la sangre en una mancha, se procederá á su caracterización biológica, es decir, su origen. Los procedimientos utilizados con este fin se reducen á tres:

- 1°. Reacción de Uhlenhuth
- 2°. " " anafiláctica.
- 3°. " " Desviación del complemento.

La solubilización de la mancha para practicar estas reacciones, debe efectuarse con suero fisiológico al 9.2|00 puro ó ligeramente alcalinizado con Na (OH), en este último caso se debe neutralizar exactamente la alcalinidad por medio del C O₂. Como segundo medio disolvente aconsejo el cianuro de potasio.

l) Es preferible utilizar antisuero á título elevado y utilizar solución diluída de albuminoides, no inferior á 1|00.

m) La práctica de Uhlenhuth es la más aconsejable.

n) La reacción de Uhlenhuth, con sus respectivos controles, es la más concluyente de las que se conocen hasta hoy, para determinar el origen de la sangre.

o) Como complemento á la reacción de Uhlenhuth, se pueden efectuar la anafiláctica y la de la desviación del complemento.

p) La individualización del origen de la sangre, no es posible por el momento efectuarla con seguridad, por ninguna de las tres reacciones biológicas mencionadas.

Buenos Aires, Noviembre 18 de 1912

Pase á la comisión examinadora, N.º 22, para que se sirva estudiar la presente tesis.

SABHY.
DECANO

PEDRO J. CONI.
SECRETARIO

Buenos Aires, Diciembre 10 de 1912

Los miembros de la comisión examinadora, N.º 22, que suscriben aconsejan se acepte la presente tesis.

*E. Herrero Ducloux, Francisco P. Lavalle, G.
F. Schaefer, J. T. Raffo, Julio J. Gatti, F.
Gándara.*

BIBLIOGRAFIA

- Abba F.* — Manuale tecnico di microscopia e batteriologia—(1912).
- Aynaud M.* — Globulin des mammifères (Paris-Tesis—1909).
- Arthus M.* — Précis de chimie Physiologique—(1908).
- Barral E.* — Analyse Biologique—(1909).
- Bezanson et Labbe.* — Traite D'Hématologie.
- Balthazard.* — Médecine Légale—(1911).
- Bottazzi F.* — Chimica fisica—(1905).
- Buignet H.* — Manipulations de Phisique—(1877).
- Citron J.* — I metodi della immundiagnosi e della immunitaria—(1911).
- Chwolson O. D.* — Traite de Phisique—(1910).
- De Boeck et Heger F. Gilbert.* — Traite de Médecine Légale—(1908).
- Delille Armand P. F.* — Techniques du diagnostic par la méthode de deviation du complément—(1911).
- Dervieux F. et Leclercq J.* — Le diagnostic des taches en médecine légale—(1912).
- Hédon H.* Compendio de Fisiologia—(1910).
- Kolle-Heslch.* — Batteriologia Sperimentale—(1908).
- Lambling E.* — Précis de Biochimie—(1911).
- Luciani L.* — Fisiologia Humana.
- Niceforo A.* — La Policè et l'enquête judiciaire—(1907).
- Ogier J.* — Traite de Chimie Toxicologique—(1899).
- Pi y Suñer A. y Rodrigo Lavín L.* — Fisiologia general—(1910).
- Reiss R. A.* — Manuel de Police Scientifique—(1911).
- Sanguinetti A.* — Dosage y variedades de hemoglobinas y sus derivados—(Bs. As. Tesis 1910).
- Salet G.* — Analyse Spectrale.
- Schoentjes H.* — Phisique—(1905).
- Uhlenhuth und Weidanz.* — Anleitung sus ausführung des biologischen Eiweiß differenzierungs verfahrens—(1906).
- Urbain G.* — Introduction à l'eture de la Spectrochimie—(1911).
- Vibert Ch.* — Précis de Médecine légale—(1911).
- Vigano L.* — Manuale di tecnica sierodiagnostica—(1911).