



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

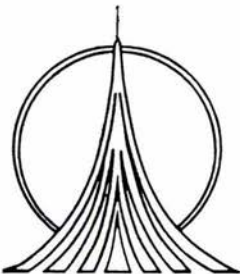
DETERMINACIÓN DE SANGRE HUMANA TOTAL MEDIANTE
TÉCNICAS DE INMUNOPRECIPITACIÓN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
PÉREZ CEJA JORGE

ASESOR: DR. MARROQUÍN SEGURA RUBÉN

MÉXICO, D.F.

A SEPTIEMBRE DEL 2008 4





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Nombre: Jorge Pérez Ceja

Numero de cuenta: 9259284-7

Folio del alumno: 505922859

Año de término de la carrera: 2001

Orientación de la carrera: Bioquímica Clínica

Título del tema: Determinación de sangre humana total mediante técnicas de inmunoprecipitación.

Área específica del proyecto: Química Legal.

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Rubén Marroquín Segura.

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. RUBEN MARROQUÍN SEGURA.

DEDICO ESTE TRABAJO DE TESIS,
A MI MADRE **ELVIRA CEJA BRICEÑO**,
Y A MI PADRE, **LUIS PEREZ GIL**.

INDICE

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	8
INTRODUCCIÓN.....	9
COMPOSICIÓN DE LA SANGRE	11
MANCHAS	12
MANCHAS DE SANGRE	13
CAPTACIÓN DE LA MANCHA SANGUÍNEA. - TRASLADO AL LABORATORIO.....	14
DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DE LA SANGRE.....	15
TÉCNICAS FÍSICAS.....	15
<i>Estudio morfológico de los hematíes:</i>	15
<i>Microquímica</i>	17
<i>Diferencias específicas espectrográficas</i>	18
TÉCNICAS BIOLÓGICAS	19
<i>Reacción de los sueros precipitantes</i>	19
PREPARACIÓN DEL SUERO PRECIPITANTE.....	19
MATERIALES A INYECTAR	20
INYECCIÓN A LOS ANIMALES	22
a) <i>Inyección subcutánea</i>	22
b) <i>Inyección intraperitoneal</i>	22
c) <i>Inyección intravenosa</i>	22
d) <i>Inyección intracardiaca</i>	23
VOLUMEN Y NÚMERO DE INYECCIONES	23
VALORACIÓN DEL PODER PRECIPITANTE DE UN SUERO	27
ESPECIFICIDAD DE LA REACCIÓN	28
LA ESPECIFICIDAD DEL SUERO	29

CONSERVACIÓN DEL SUERO PRECIPITANTE.....	29
VALOR MÉDICO LEGAL DE LA REACCIÓN DE PRECIPITACIÓN.....	30
EL SISTEMA INMUNITARIO	33
CLASES PRINCIPALES DE RESPUESTA INMUNITARIA.....	34
LA MEMORIA INMUNOLÓGICA SE DEBE A LA EXPANSIÓN CLONAL Y A LA DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS.	34
LA TEORÍA DE LA SELECCIÓN CLONAL	35
LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS ANTICUERPOS.....	37
LOS RECEPTORES ANTIGÉNICAMENTE ESPECÍFICOS DE LAS CÉLULAS B SON MOLÉCULAS DE ANTICUERPO	37
LOS ANTICUERPOS TIENEN DOS CENTROS IDÉNTICOS DE UNIÓN AL ANTÍGENO	38
UNA MOLÉCULA DE ANTICUERPO ESTÁ COMPUESTA POR CUATRO CADENAS POLIPEPTÍDICAS, DOS CADENAS LIGERAS IDÉNTICAS Y DOS CADENAS PESADAS IDÉNTICAS.....	39
EXISTEN CINCO CLASES DIFERENTES DE CADENAS H, CADA UNA CON PROPIEDADES BIOLÓGICAS DISTINTAS.	39
LA INTENSIDAD DE UNA INTERACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO DEPENDE TANTO DE LA AFINIDAD COMO DEL NÚMERO DE CENTROS DE UNIÓN.	40
LAS INTERACCIONES ANTÍGENO-ANTICUERPO SE PUEDEN CUANTIFICAR DE MUCHAS MANERAS.....	42
EL TAMAÑO DE LOS COMPLEJOS ANTÍGENO-ANTICUERPO FORMADOS DEPENDE DE LA VALENCIA DEL ANTÍGENO Y DE LAS CONCENTRACIONES RELATIVAS DEL ANTÍGENO Y DEL ANTICUERPO.	43
INMUNIZACIÓN DE ANIMALES.....	45
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:.....	47

OBJETIVO:	50
MATERIALES Y METODOLOGÍA	52
OBTENCIÓN DE SUERO PRECIPITANTE	52
INMUNOPRECIPITACIÓN EN CAPILAR	56
<i>Material</i>	56
<i>Método</i>	56
MÉTODO DE OUCHTERLONY	60
<i>Material</i>	60
<i>Método</i>	60
RESULTADOS	63
POR LA TÉCNICA DE INMUNOPRECIPITACIÓN EN CAPILAR	63
POR LA TÉCNICA DE OUCHTERLONY INMUNOPRECIPITACIÓN EN GEL	67
EN LA VALORACIÓN DEL SUERO DE CONEJO ANTISANGRE HUMANA TOTAL	73
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	77
CONCLUSIONES	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

Fundamentación teórica

El desarrollo de las ciencias forenses en el mundo actual ha sido resultado del avance de las ciencias en general. Sin embargo a pesar del impresionante adelanto científico, aun quedan problemas y fenómenos que resolver dentro de las ciencias forenses. Es decir, la investigación científica del delito esta en pleno desarrollo.

A nivel mundial existen pocos países que realizan investigación científica generadora de conocimiento dentro del campo forense. En cambio en países en desarrollo, como el nuestro, este tipo de investigación no existe, acaso abra investigaciones aisladas relacionadas con esta temática. Por esta razón adquiere mayor relevancia que algún estudiante o profesional universitario enfoque sus inquietudes en temas relacionados con el área forense, dentro del área de la hematología y serología forense uno de los indicios mas encontrados en un lugar de hechos es la sangre. Su estudio conlleva a realizar una serie de técnicas de acuerdo a la petición del ministerio público. Generalmente el investigador requiere saber si la mancha es de sangre humana, lo cual es el centro de interés de este trabajo.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La sangre es el fluido que circula dentro de los vasos sanguíneos es muy complejo. Consiste en una porción líquida, el plasma, que constituye aproximadamente el 55- 60 por ciento de su volumen y en los varios tipos de células, que forman el otro 40-45 por ciento.

El plasma es principalmente agua con gran número de sustancias inorgánicas en solución (diversas sales, la principal es el cloruro de sodio) y varios tipos de proteínas. Las proteínas mantienen la presión osmótica de la sangre. Algunas de ellas intervienen en la coagulación sanguínea, otras son anticuerpos que ayudan a combatir a los microorganismos causantes de enfermedades. Algunas de las proteínas de la sangre son hormonas que modifican el funcionamiento de los diversos órganos y tejidos.

El plasma también contiene los productos de la digestión: grasas y otros productos utilizados por las células (como las vitaminas). Los desechos nitrogenados, como la urea, y la mayor parte del dióxido de carbono producido por las células, también se encuentra en el plasma. Es imposible proporcionar un cuadro completo de las propiedades químicas de este asombroso líquido. Sus funciones son casi tan numerosas como las sustancias químicas que contiene. Una de las funciones más importantes del plasma es la de transportar por todo el cuerpo a las células sanguíneas.

Hay tres clases de células en la sangre: los glóbulos rojos, los glóbulos blancos y las plaquetas. Las más numerosas de estas células son los glóbulos rojos o eritrocitos. Cada milímetro cúbico de sangre contiene alrededor de cinco millones de ellos. En el adulto, los glóbulos rojos se producen en la médula roja contenida en el centro de algunos huesos. Durante su formación, el núcleo es eliminado de cada célula. Los glóbulos rojos contienen

gran cantidad de hemoglobina, una proteína que desempeña un papel esencial en el transporte de oxígeno y en menor grado, en el de bióxido de carbono.

Los glóbulos blancos o leucocitos, de los cuales existen varios tipos, son producidos en la médula ósea, en los ganglios linfáticos y en el bazo. Un milímetro cúbico de sangre generalmente contiene de 7000 a 8000 glóbulos blancos. Todos ellos tienen núcleo. La función principal de los glóbulos blancos es la fagocitosis, que protege al cuerpo contra las bacterias. Estas células al fagocitar bacterias, las rodean por medio de prolongaciones llamadas pseudópodos, y las envuelven con su membrana; las bacterias quedan así dentro de vacuolas, donde son digeridas y usadas como alimento por el glóbulo blanco; este modo de actuar nos recuerda la manera en que se alimentan las amibas.

Otros glóbulos blancos forman anticuerpos. Durante una infección como, por ejemplo, la neumonía, el número de glóbulos blancos aumenta grandemente. Los glóbulos blancos ayudan a combatir la enfermedad formando anticuerpos y destruyendo a las bacterias. El pus que se forma en una herida infectada está formado en su mayor parte por glóbulos blancos que han muerto en la lucha contra las bacterias.

Las plaquetas son mucho más pequeñas que los glóbulos rojos y los glóbulos blancos. Desempeñan un papel fundamental en la coagulación de la sangre, la cual tiende a detener la hemorragia cuando los vasos sanguíneos se rompen.

Composición de la sangre

La sangre es una mezcla polifásica líquida, circulante, fácilmente coagulable cuando se detiene su circulación o es expuesta fuera de los vasos sanguíneos; de composición relativamente constante y que está constituida:

- a) Por elementos sólidos: los corpúsculos celulares formes o figurados – eritrocitos, leucocitos, plaquetas – y los productos minerales u orgánicos disueltos en el plasma.
- b) Por sustancias líquidas: el plasma hemático (con un 90 % de agua) el cual, junto con el agua intersticial, constituye la mayor parte de la llamada agua extracelular de nuestro organismo.
- c) Por elementos gaseosos (O₂, CO₂), transportados por los eritrocitos y en mucha menos cuantía disueltos en el plasma.

Consideramos pues la sangre como un complejo poli sistemático, con múltiples unidades funcionales, entre las que cabe diferenciar:

- 1.- un sistema eritrocítico, vector de gases.
- 2.- un sistema leucocitario, destinado a las funciones defensivas.
- 3.- un sistema trombocítico, que interviene en detener las hemorragias.
- 4.- un sistema plasmático, a su vez integrado por múltiples sustancias, (las proteínas del plasma, los aniones y cationes, el agua extracelular intravascular, etc.), cada uno de los cuales esta dedicado a la ejecución de determinada función nutritiva, correlacionadora de la homeostasis (regulación humoral), o de varias a la vez.⁽¹⁾

Manchas

Entre los vestigios que el autor deja de su delito, y que a veces se lleva sobre de sí mismo, están las manchas, que tienen una gran importancia médico-legal. Por mancha se entiende toda modificación de color, toda suciedad, toda adición de una materia extraña, visible o no, en la superficie del cuerpo humano, sobre instrumentos o sobre un objeto

cualquiera, y determinada por el depósito de un producto líquido, blando y algunas veces sólido, de cuyo estudio se pueden establecer relaciones de la intervención o participación de una persona o cosa en el hecho delictivo.

La mancha es, pues, como la huella, un vestigio de primera categoría; ahora bien, mientras que el carácter más importante (desde el punto de vista de la investigación médico-legal) es la forma, en la mancha interesa su naturaleza o materia de que está constituida.

El estudio completo de las manchas de todo género que pueden encontrarse en el lugar del delito pertenece exclusivamente al dominio del médico-legista. Sin embargo, es absolutamente indispensable y necesario que los jueces, los magistrados, etc., sepan y conozcan las cuestiones que se refieren a las manchas, los problemas que pueden plantear al perito forense, el valor que pueden dar a las conclusiones de nuestros informes, etc., para no incurrir en preguntas tan peregrinas como la de cierto juez instructor que acompañó un oficio de remisión de unas sabanas manchadas de sangre en el que preguntaba si las manchas eran de sangre procedente de un parto y si el producto de la concepción era a término; o aquella otra en que se encarecía al perito dijera si las manchas de sangre adjuntas tenían las características de la pérdida de la virginidad.

Las manchas que pueden ser objeto de estudio médico-legal son de una variedad infinita; se reducen, sin embargo, casi todas a la serie siguiente: Sangre, esperma, meconio, pus, moco nasal y vaginal, saliva, unto sebáceo, líquido amniótico, leche, calostro, materias fecales, orina, etc.

Manchas de sangre

Las manchas de sangre tienen aspecto diferente según sean recientes o antiguas y variable también según el soporte sobre el que se encuentran. En la ropa blanca y en los soportes claros y absorbentes, aparecen de contornos muy netos por penetrar la sangre en los tejidos y embeberlos a modo de papel chupón. Si la sangre es fresca, es de color rojo vivo, pero después oscurece progresivamente. Recién desecada es roja, después se hace morena y aun negruzca por transformación de la hemoglobina en meta hemoglobina y hematina, sucesivamente. En las ropas oscuras o negras las manchas resultan muy difíciles de distinguir, máxime si son antiguas. Cuando recaen en sustancias y tejidos poco o nada absorbentes conservan sus formas características. Una vez secas constituyen diminutas masas, ligeramente elevadas, teniendo aspecto de pequeñas escamas brillantes, más o menos resquebrajadas, según las condiciones atmosféricas de humedad o sequedad en que se encuentren.

Si las manchas de sangre han sido lavadas y tratadas por jabón, agua, etc., las dificultades de apreciación aumentan, por encontrarse modificados sus caracteres clásicos.

Captación de la mancha sanguínea. - Traslado al laboratorio.

A ser posible, debe recogerse el objeto sobre el que radique la mancha sanguínea para enviarlo al laboratorio. Si ello no es posible por hallarse la mancha de sangre en paredes, suelo, etc., entonces se raspa con un escalpelo o una navaja nueva la costra sanguínea y el polvillo obtenido se envuelve en papel satinado. En cada papel se anota el sitio de procedencia y características que interesen o bien se numeran los distintos paquetes.

cuyo detalle puede ir en papel aparte. En casos especiales no hay más remedio que recurrir “in situ” a la disolución de la mancha mediante disolventes.

El traslado al laboratorio debe practicarse con la máxima rapidez posible, procurando evitar confusiones, mediante una clara descripción externa del contenido del paquete. Este debe ser envuelto con tela impermeable para ponerle a salvo de contactos impuros.

Llegadas las manchas de sangre al laboratorio, se plantean las siguientes cuestiones médico-legales:

- 1.^a- La mancha, ¿es de sangre?
- 2.^a- La sangre, ¿es humana?
- 3.^a- ¿A qué individuo pertenece?
- 4.^a- ¿A qué sexo pertenece la sangre?
- 5.^a- ¿De qué región del cuerpo procede?
- 6.^a- ¿Qué cantidad de sangre tiene la mancha?
- 7.^a- ¿Cuál es la edad de la mancha?

Diagnóstico específico de la sangre

De estos cuestionamientos el que interesa a nuestra investigación es el de si la sangre es humana, este cuestionamiento medico-legal solo se plantea cuando estamos en presencia de sangre. Los primeros intentos para la solución de este problema consistieron en calentar la sangre con ácido fosfórico y según el olor que se percibía, así pertenecía a una especie animal u otra.

Las técnicas que han merecido mayor atención forense pueden clasificarse en dos grupos: físicas y biológicas.

Técnicas físicas

Estudio morfológico de los hematíes:

Los glóbulos rojos son elípticos en las aves, reptiles, batracios y peces. Los mamíferos tienen los glóbulos rojos circulares, excepto los camélidos (camello, dromedario, llama, alpaca, etc.). A primera vista parece que la diferenciación pudiera ser fácil y sin embargo es muy delicada en la práctica, pues los glóbulos rojos encontrados en las manchas están deformados.

Por ello se propuso como carácter diferencial la ausencia de núcleo en los hematíes de los mamíferos y su presencia en los glóbulos rojos de aves, peces, batracios y reptiles. El núcleo puede presentarse en formas juveniles de hematíes humanos y en ciertos estados patológicos.

El problema tiene así fácil solución, dentro de las dificultades de las técnicas histológicas cuando el acusado alegaba que la sangre procedía del sacrificio de un ave de corral. Pero el problema quedaba sin solución si lo alegado era que la sangre procedía de un mamífero cualquiera, como cerdo, conejo, etc., y se pensó en hacer el diagnóstico diferencial por las variaciones de los diámetros de los hematíes.

Utilizando el micrómetro ocular o el micrómetro objetivo, se han fijado las siguientes cifras:

Hombre.	69 a 77 micras
Perro.	66 a 73 micras
Conejo.	60 a 69 micras
Cerdo.	60 a 65 micras
Buey.	56 a 60 micras
Caballo.	55 a 57 micras
Carnero.	45 a 50 micras
Cabra.	40 a 46 micras

Sin embargo, los glóbulos de los mamíferos tienen los diámetros tan próximos unos de otros, y por otra parte son tan poco constantes, que este método no permite jamás sentar una conclusión médico-legal.

Algún autor fundamento este diagnóstico específico en el estudio de las granulaciones de los protoplasmas de los leucocitos polinucleares y pretendió deducir que los neutrófilos eran privativos de la sangre humana. No hay tal; esas granulaciones también se encuentran en la sangre de animales mamíferos.⁽²⁾

Microquimia

Mientras los cristales de hemina, hemocromógeno y hematoporfirina no presentan diferencias notables de naturaleza específica, los cristales que se obtienen de la hemoglobina (oxihemoglobina y hemoglobina) y de la metahemoglobina, es decir, cuando el pigmento hemático no ha sido sometido a tratamiento que separe la globina de la hematina, sí presentan diferencias específicas más o menos marcadas. Se trata todavía de observaciones incompletas.

En estos últimos tiempos, estudios de *Amantea* y *Krzykowsky*⁽³⁾, *Nicoletti*⁽⁴⁾ y *Perrier* y *Janelli*⁽⁵⁾ han resuelto la posibilidad de cristalizar la hemoglobina de algunas especies en forma y ángulos características de cada una de ellas y en plena correspondencia con las pruebas serológicas. Los cristales de hemoglobina de cada género son isomorfos. Los miembros de un grupo isomorfo tienen aproximadamente la misma forma estructural y, por consiguiente, en un examen superficial presentan forma idéntica.

La diferencia de una especie a otra dentro del mismo género, estriba en los ángulos, en sus relaciones, en los caracteres ópticos y especialmente en los caracteres comprendidos bajo la denominación genérica de hábito cristalino de los cristales de hemoglobina.

La cristalización de la hemoglobina se obtiene por el procedimiento de la saponina propuesto por *Amantea*. A una gota de sangre colocada sobre un porta objetos se le añade una pequeña cantidad de saponina en polvo, mezclando bien con una varilla de vidrio. La saponina interviene exclusivamente como medio hemolítico. Los cristales aparecen por efecto de la lenta evaporación y de la gradual concentración de la solución de hemoglobina. Tratándose de la adición de sangre desecada, la adición de saponina es superflua, ya que basta para hemolizar disolver la mancha en dos o tres gotas de agua destilada y dejar evaporar lentamente.

Los resultados de estos estudios cristalográficos están todavía muy lejos de suministrar datos seguros en el campo de la aplicación médico-legal. En manos del mineralogista *Perrier* esos estudios han demostrado una diferencia de estructura química entre la hemoglobina del hombre adulto y la del recién nacido, y entre la hemoglobina del hombre blanco y el de la raza negra. Insistir en este orden de investigaciones necesita una especialización no fácil de adquirir.

Diferencias específicas espectrográficas

La clorohemoglobina.-La especificidad de la sangre se puede manifestar también en el espectrograma. Ya *Sorby* en 1876 había demostrado que los espectros de las diversas hemoglobinas no son iguales. *Vles*⁽⁶⁾, llama de nuevo la atención sobre esta cuestión y más tarde *Barcroft*⁽⁷⁾, comprueba que los estudios de *Sorby* no estaban faltos de razón.

Dalla Volta⁽⁸⁾, prepara la clorohemoglobina tratando la hemoglobina o la sangre desfibrinada con algunas gotas de sulfuro amónico saturado de hidroxilamina (clorhidrato o sulfato). Esta combinación es inestable, transformándose en poco tiempo en

sulfahemoglobina. Mayor estabilidad se obtiene reduciendo la hemoglobina previamente tratada con hidrosulfito sódico.

La clorohemoglobina a concentración apropiada (1 c.c. de sulfuro amónico saturado de hidroxilamina por cada 100 c.c. en solución al 5 %), presenta un espectro de absorción constituido en la zona visible en seis bandas de absorción situadas respectivamente en el extremo del rojo, en el anaranjado, en el amarillo-verde (dos bandas), en el azul y la sexta en el extremo violeta, difícilmente apreciable por el ojo y que en el espectrograma aparece muy intensa.

La posibilidad de valorar en la práctica médico-legal, la diferencia específica de la clorohemoglobina está muy lejos de haber sido resuelta. La espectrografía podrá tener algún día en el campo de la medicina legal un puesto adecuado a este finísimo medio analítico y el estudio de la clorohemoglobina llegará a ser un excelente control de la prueba biológica.

Técnicas biológicas

Reacción de los sueros precipitantes

A principios de siglo y tan sólo con cuatro días de diferencia se dio a conocer por *Uhlenhuth*⁽⁹⁾, por una parte y *Wassermann* y *Schultze*⁽¹⁰⁾ por otra, la aplicación de los hechos biológicos señalados por *Krauss*, *Bordet* y *Tchistowitsch*, a la Medicina legal. En España el primero que trabajó y publicó trabajos sobre estas cuestiones fue el catedrático de Zaragoza, el profesor *Juan Bastero Lerga*.⁽¹¹⁾

El hecho biológico fundamental en que está basada la reacción de *Uhlenhuth*, que pasamos a estudiar, es la propiedad que adquiere el suero sanguíneo de un animal inyectado con un líquido albuminoso de una especie animal diferente, de precipitar las albúminas

procedentes de la misma especie que proporcionó las albúminas inyectadas. Precisa, pues, la preparación de un suero precipitante o antisuero, que será el reactivo que hemos de emplear para el diagnóstico específico de la sangre de una mancha.

Preparación del suero precipitante. El animal de elección.-El animal de elección es el conejo ordinario, macho, joven, pero ya desarrollado, de más de dos kilogramos de peso y, a ser posible, de la variedad de orejas largas, que al tener las venas marginales de estos apéndices más voluminosas, ofrecen más facilidades para la práctica de las inyecciones intravenosas.

Se escoge el conejo por ser un animal muy manejable en los laboratorios y porque a igualdad de peso es el animal que produce más fácilmente sueros de alto poder precipitante.

Linossier y Lemoine propusieron los cobayos, animal muy utilizado en los laboratorios, que si bien nos da un suero de gran poder precipitante, el volumen de suero que proporciona es muy escaso. Contrariamente, *Corin* y otros han propuesto animales de gran tamaño, perro, cabra, cerdo, caballo, buey, etc., con vistas a obtener grandes cantidades de antisuero; pero ofrecen el inconveniente de necesitar grandes cantidades de material a inyectar y de ser escaso el poder precipitante que aparece en sus sueros. Es, por tanto, preferible el conejo.

No debe comenzarse la preparación con un sólo conejo, sino con varios, ya que no todos los animales son capaces de proporcionar un suero activo, aparte de que en el curso de las inyecciones podemos perder algún ejemplar. Se aconseja el macho por que las hembras están frecuentemente en gestación y las inyecciones les provocan el aborto y muerte subsiguiente del animal.

Materiales a inyectar.-*Binda* y *Uhlenhuth* han propuesto el empleo de sangre desfibrinada. *Wassermann* y *Schulze* emplean el suero sanguíneo, que se obtiene más cómodamente.

Para la práctica médico-legal precisa obtener un suero precipitante antihumano. Habrá que preparar al conejo inyectándole suero humano. Se utiliza para estos fines la sangre procedente de sangrías, dejándola coagular y recogiendo el suero estérilmente. La sangre procedente del cordón umbilical ha sido empleada, lo mismo que los residuos de sangre extraída, para análisis clínicos.

Ziemke, *Hauser* y *Modica* han propuesto el empleo de sangre de cadáver, lo más reciente que sea posible. *Hauser*, previa disección de la yugular externa, introduce por ella un tubo de cristal hasta llegar al corazón y entonces elevando el cadáver por los miembros inferiores o comprimiendo el abdomen, puede recogerse hasta unos 200 grs. de sangre. *Obendorfer* punciona el corazón a cielo cerrado con aguja larga y previa esterilización de la piel con termocauterío. No ha entrado en la práctica el empleo de la sangre de cadáver porque contiene microbios de la putrefacción, lo que causa la muerte de los conejos.

Otros líquidos albuminoideos normales o patológicos han sido propuestos para sustituir el suero sanguíneo, pero sin ventaja. Así. *Arthur* y *Barthe* propusieron el líquido ascítico; *Butza* y *Fleig*, el pleurítico; *Perrando* y *Gianello*, el de hidrocele; *Merteus*, *Linossier* y *Lemoine*, la orina albuminosa; *Fleig*, el de quiste ovárico; *Bordet*, *Uhlenhuth* y *Schulze*, leche de mujer. Los más prácticos de los propuestos por su riqueza albuminoidea, son el ascítico y el pleurítico. A pesar de todo, la concentración albuminosa es muy inferior a la del suero, por lo que precisa concentrarlos para inyectarlos y evitar inyecciones muy voluminosas. *Dervieux* consigue la concentración mediante la evaporación en el vacío, en una campana, sobre cristalizador conteniendo ácido sulfúrico. *Ogier* con ayuda de una

mezcla frigorífica conseguía cristales de hielo, que no contienen albúmina y que se van retirando, con lo que la albúmina va quedando en las aguas madres y, por tanto, más concentradas en albúmina.

Mientras sea posible es preferible procurarse para cada inyección la cantidad de suero inyectada. Si nos vemos obligados a conservar el suero para varias inyecciones, se envasa en ampollas, se tinalizan a 56°C al baño de maría varias veces y se conservan en frigorífica alrededor de 0°C. Con este procedimiento se puede conservar el suero varios meses. *Dervieux* emplea la albúmina desecada completamente al vacío; no permite una conservación muy larga. Se pueden filtrar los sueros por bujía, lo que, según *Nassol*, modifica la constitución del suero, obteniéndose sueros precipitantes menos activos. Una causa de muerte de los conejos es la coccidiosis.

Inyección a los animales.-Se han propuesto diversas vías de introducción del líquido, descritas a continuación:

- a) **Inyección subcutánea.**- Es la más fácil y sencilla, practicándose del modo ordinario, después de cortar el pelo y aseptizar la región. Se evitará hacer inyecciones sucesivas en el mismo punto, a fin de no provocar abscesos ni escaras. No es aconsejable esta vía porque produce sueros de escaso valor precipitante.
- b) **Inyección intraperitoneal.**-No presenta dificultad. Hay que tener en cuenta el gran desarrollo de los músculos del abdomen del conejo para hundir la aguja en todo el espesor de la pared abdominal. Debe asegurarse de que la aguja se mueve libremente en la cavidad abdominal. El material a inyectar a de ser absolutamente

estéril. La absorción por esta vía es muy rápida y conceden sueros de mayor poder precipitante que la vía anterior.

- c) **Inyección intravenosa.**- Se practica en la vena marginal del pabellón de la oreja, que anteriormente se habrá puesto de relieve golpeando la oreja, y bañándola en agua caliente, o frotándola con xilol; esto último tiene el inconveniente de provocar escaras que dificultan inyecciones posteriores. La inyección debe ser lentísima. Es preferible a las anteriores vías porque se obtiene suero de alto valor.
- d) **Inyección intracardiaca.**- Propuesta por *T. Peset*. Es una variante de la anterior, con la ventaja de ofrecer más facilidad técnica y el inconveniente de que se pierden algunos animales por hemopericardias. La punción se realiza en el espacio intercostal izquierdo en que se perciba el máximo latido cardíaco.

Volumen y número de inyecciones.- Se han propuesto varias técnicas cuyas diferencias estriban en las dosis de suero a inyectar y el intervalo de tiempo a transcurrir de una a otra inyección. *Uhlenhuth* inyecta 10 c.c. de suero intraperitonealmente, cada seis días, y da tres inyecciones. *Binda* inyecta en el peritoneo 1-2 c.c. todos los días, durante ocho-diez días. *Wassermann* y *Schultze*, *Lande*, *Ogier* y *Hercher* inyectan 5-10 c.c. cada dos días y repiten seis a siete veces las inyecciones. *Dervieux* recomienda inyectar cada dos-tres días, subcutáneamente, 2-3 c.c. y repitiendo cinco-seis veces. El profesor *Bastero* aconseja inyectar 5 c.c. por kilogramo de animal cada cinco días y un total de cinco-siete inyecciones por vía intraperitoneal.

Se ha propuesto por *Staubenathus* la inyección, unos días antes, de 10 c.c. de solución al 10 por 100 de tinta china en suero fisiológico, con el objeto de excitar el sistema retículoendotelial. *Friedberger*, *Lasnitzki* y *Gaechgens* adicionaron lipoides al antígeno inyectado. Otros autores aconsejan la desensibilización previa a cada inyección, *Mr. Kohn Abrest*, emplea la técnica del Instituto de serología de Bucarest, con lo que consigue sueros precipitantes con título 1/32.

La técnica es como sigue:

Todas las inyecciones han de ser intravenosas. El suero humano fresco y proveniente de varios individuos (cuatro-cinco).

1.^a inyección: 4 c. c. de suero.

2.^a inyección (a los cinco días): 4 c. c. de suero.

3.^a inyección (a los cinco días): inyección desensibilizante de 1 c.c. de la dilución de suero al 1/10.

4.^a inyección (una-dos horas después): 4 c.c. de suero.

5.^a inyección (a los cinco días): inyección desensibilizante de 1 c.c. de la dilución de suero al 1/10.

6.^a inyección (una-dos horas después): 4 c.c. de suero.

A los ocho días sangría de prueba. Si el título precipitante es insuficiente, se deja reposar al conejo más de dos meses, pasados los cuales se le inyecta de nuevo 1 c.c. de la dilución de suero al 1/10 y luego 1 c.c. de suero puro. Ocho días después, nueva sangría de prueba. Si el título no es todavía suficiente, al día siguiente se le

inyectan 10 c.c. de suero puro, previa desensibilización. Última sangría de prueba ocho días después.

López Ibor ha puesto en práctica todas las técnicas enumeradas, con resultados tan inconstantes que le ha sido imposible deducir conclusiones.

Método de *Fujiwara*.- Utiliza sangre íntegra que diluye en agua destilada en la proporción de 1/10, añadiéndole un quinto en volumen de una solución saturada de cloruro sódico y unas gotas de ácido acético. Todo ello es cocido al baño maría hasta precipitación completa de las albúminas del suero; se filtra a continuación sobre papel y se secan por enjugamiento las albúminas que quedan sobre el papel de filtro, conservándolas bajo tolueno. De los antígenos así obtenidos se inyectan al conejo por vía intravenosa alrededor de 2 centigramos disueltos en 2 c.c. de solución fisiológica, repitiendo la inyección cada dos o tres días, hasta un total de 10 inyecciones.

Método de *Dalla Volta y Del Carpio*.- El anterior procedimiento en que se usa antígeno cocido, que da sueros precipitantes de los más específicos, ha sido notablemente simplificado por *Dalla Volta y Del Carpio*; estos autores aconsejan una técnica que da en la práctica óptimos resultados.

Se diluye en agua destilada el suero sanguíneo en la proporción 1/10; a cada 100 c.c. de la dilución se añaden 5 grs. de sulfato amónico y unas gotas (cinco-seis) de ácido acético. Se calienta en baño maría hasta total precipitación de albúminas, se filtra sobre papel y las albúminas que quedan sobre el filtro se secan en termostato, recogiendo después y conservándolas bajo toluol. En el momento del

uso, se dejan secar, se trituran finamente en mortero, se emulsiona finamente este antígeno en solución fisiológica tibia y se inyecta, en cantidad alrededor de 1 gramo, al conejo por vía endoperitoneal. El título de suero precipitante así obtenido adquiere altos valores, alcanzando a los siete o diez días un título de alrededor de 1:100.

Como accidentes de las inyecciones pueden sobrevenir infecciones locales o generalizadas. El animal pierde peso lo que obliga a distanciar las inyecciones; puede presentar debajo de la piel del abdomen, cuando se han dado inyecciones intraperitoneales, unos nódulos más o menos voluminosos, rodeados de una zona inflamatoria, que no tarda en supurar; es el llamado fenómeno de *Arthus*, de naturaleza esencialmente anafiláctica local.

Extracción de la sangre del animal y recogida del suero precipitante.-Como este suero alcanza su máximo de acción a los ocho días de la última inyección, se extraerá precisamente dentro de ese plazo. De todos modos se obtendrá una pequeña cantidad de sangre antes de la extracción total, con el fin de comprobar la actividad del suero. La muestra se toma por punción en la vena marginal de la oreja. Con el fin de evitar autoprecipitaciones de origen digestivo (proteopepsinas), se aconseja hacer tanto esta punción de prueba como la sangría total, estando el animal en ayunas diez-doce horas. Si el suero tiene poder precipitante suficiente entonces hay que recogerlo parcial o totalmente, según conservemos el animal o lo matemos. La extracción parcial se hace por punción cardiaca, obteniendo unos 20 o 30 c.c. de sangre sin que se muera el animal.

La sangría total se practica previa anestesia etérea o clorofórmica del animal. *Uhlenhut*, abre asépticamente el tórax, incinde el corazón y aspira con pipeta estéril la sangre que va cayendo a la cavidad torácica. Nosotros aconsejamos, una vez puesto al descubierto el corazón, puncionar con aguja gruesa unida a jeringa de 20 c.c., que se intercambia varias veces conforme se va llenando, hasta dejar exangüe al animal, con lo que se extraen unos 80 c.c. de sangre. Otros autores como *Dervieux* y *Leclercq*, proponen la punción de la carótida.

La sangre se recoge en frascos de suero, que tienen unas puntas en su interior encargadas de favorecer la retracción y retención del coágulo. Puede recogerse en tubos de centrifuga, como recomienda *Pfeifer*, que permite una centrifugación ulterior, lo que produce un suero libre de hematíes. Si el suero no fuese completamente transparente, puede filtrarse a través de la bujía de *Berkefeld*.

Uhlenhuth exige a todo antisuero las siguientes condiciones para la práctica médico-legal: transparente, estéril, de alto poder precipitante y específico.

Valoración del poder precipitante de un suero.- Veamos cómo se averigua. Si ponemos en contacto un antisuero con albúminas procedentes de un animal de la misma especie que el que ha suministrado las materias destinadas a las inyecciones preparantes, se obtiene al cabo de unos minutos un precipitado. Esta actividad del suero es variable y, por consiguiente, es útil hacer la titulación del poder precipitante.

Diferentes procedimientos han sido propuestos. *Wassermann* y *Schultze* admiten como unidad precipitante la más pequeña cantidad de antisuero necesaria

para provocar la aparición de un precipitado coposo en presencia de una cantidad constante de suero antígeno, operando durante una hora a 37° C.

Michaelis añade a una cantidad constante de sangre pequeñas cantidades de suero precipitante hasta llegar a obtener copos netamente visibles. La medida del poder precipitante viene entonces representada por una fracción:

$$\text{Poder precipitante} = \frac{\text{cantidad de suero precipitante empleado}}{\text{Cantidad de sangre empleada}}$$

Nuttal e Inchley y Hamburger miden el poder precipitante según la cantidad de precipitado obtenido con cantidades determinadas de suero y sangre, apreciando el volumen por la altura que ocupa después de su centrifugación en un tubo graduado.

Balthazard prefiere pesar el precipitado después de su centrifugación en un tubo graduado.

El método más empleado por su sencillez y exactitud es el propuesto por *Uhlenhuth y Beumer*. Se preparan con suero fisiológico soluciones transparentes incoloras de la albúmina-antígeno; se obtienen así diluciones de mayor a menor concentración: 1/1; 1/5; 1/10; 1/20; 1/30, etc. En una serie de tubos de aglutinación se vierten 0.9 c.c. de cada una de estas diluciones y se deja caer lentamente por las paredes de cada uno de los tubos 0.1 c.c. del suero precipitante a examinar, de manera que los líquidos se superpongan sin mezclarse y se observa cuidadosamente la aparición de la precipitación. Se inicia esta a los cinco minutos en la dilución 1/1 en forma de un ligero enturbiamiento que poco a poco se hace más denso, transformándose en ligeros copos que van cayendo al fondo del tubo.

Para que un suero precipitante tenga utilidad práctica en Medicina Legal, precisa que provoque a una temperatura media (18°C) precipitación completa, en veinte minutos, en las diluciones 1/20 y 1/30.

Especificidad de la reacción.

La especificidad del suero precipitante dista mucho de ser absoluta. Un suero que precipita la sangre humana, precipita así mismo, aunque en menor grado, la de los cuadrúmanos superiores. Un suero que precipita la sangre de caballo, precipita también la de asno; el suero precipitante para la sangre de cabra, lo es también para la de carnero. Esta especificidad de grupo no es tampoco absoluta (*Linossier y Lemoine*), habiéndose demostrado por investigaciones más precisas que un suero precipitante para la sangre de un mamífero lo es también para la sangre de otro mamífero, pero no para la de los reptiles, aves, peces y batracios.

Decaix demostró que los precipitados así obtenidos eran tanto menos voluminosos cuanto que el animal, cuyo suero se estudiaba, era más alejado en la escala de los seres vivos de aquél cuya sangre había servido para preparar el suero anti.

La especificidad del suero.

La especificidad del suero pues, no es más que relativa, pero se trata de una reacción que suple por ser tan sensible lo que le falta de especificidad. Empleando diluciones extremas de sangre, un suero precipitante para la sangre humana, por ejemplo, proporcionará una reacción netamente positiva con la sangre humana, pero no originará más que ligera precipitación con la sangre de monos superiores, sólo un enturbiamiento ligero con la sangre de monos inferiores y con la de otros mamíferos

no se obtiene ningún resultado apreciable. Por esta razón deben emplearse en la práctica médico-legal, de una parte, soluciones muy diluidas de la sangre a examinar, y de otra, sueros cuyo poder precipitante sea muy elevado y perfectamente dosificado.

Conservación del suero precipitante.

Cuando se recoge en estado de pureza, el suero se conserva muy bien en ampollas de 1 c. c. (cantidad suficiente para una investigación), que se colocan en una nevera y al abrigo de la luz. *Binder*, para esterilizar el suero recurre a la tindalización, mientras que *Ziemke* preconiza la filtración por bujías de poro fino. *Erlich* y *Gregorjew* desecan el suero al vacío en placas de cristal y en presencia de ácido sulfúrico, obteniendo luego por raspado un polvo fino que se disuelve en agua. *Corin* precipita la globulina o parte activa del suero (*Nolf*) por el sulfato magnésico, recogiénola después en papel chupón (previamente macerado en agua), que se deja secar. Se ha propuesto igualmente la adición al suero de diferentes sustancias antisépticas, como cloroformo, timol, fluoruro sódico, ácido fénico al 1 por 100 en suero fisiológico, etc. Estos procedimientos, por ingeniosos que sean, ofrecen dificultades de aplicación y presentan además, el grave inconveniente de amenguar el poder precipitante del suero. Es preferible, pues, conservarlo según el método usual, en ampollas cerradas al abrigo de la luz y del calor, conservando su utilidad hasta meses y años.

Valor médico legal de la reacción de precipitación.

Es notable por su extremada sensibilidad, dando resultados positivos con soluciones de sangre sin color alguno. La reacción no se altera en nada por los efectos del aire, la luz, la sequedad o el frío (*Vincent*). *Leclerq* ha demostrado que la putrefacción sólo la impide cuando se han degradado y disociado del todo las albúminas. *Dervieux* ha obtenido la reacción con sangre de una momia egipcia que contaba más de 4000 años. En cambio la sangre, calentada a más de 65°C no produce ya reacción.

Cuando el soporte de la mancha es de plata o cobre parece dificultar la reacción; si es de oro o hierro, no (*Vincent*). Salvo la solución de ácido fénico al 5 por 100, que no parece tener influencia alguna sobre la reacción, todos los ácidos minerales u orgánicos y la mayoría de los antisépticos, la entorpecen. Para *Biondi* las bases (sosa, potasa y amoníaco), los jabones, el bórax, etc., dificultan la reacción, que vuelve a resultar positiva una vez neutralizada su alcalinidad (*Vincent*).

Las cantidades mínimas de sangre y la dificultad de disolución de la mancha pueden también producir resultados negativos o equívocos.

Se ha visto que los resultados positivos puede producirlos un antisuero con las albúminas de las más variadas procedencias. Pero también quedó dicho que utilizando el antisuero a diluciones adecuadas se eliminaba esta causa de error y por ello exigíamos en la práctica médico-legal el empleo de suero de alto poder precipitante, con el fin de poderlo emplear a diluciones más débiles. A pesar de todo, no puede evitarse que las albúminas de los animales más próximos en la escala zoológica concedan equívocos resultados: caballo y asno; carnero y cabra; perro y lobo; rata y ratón; hombre y mono. De ordinario existen diferencias de dilución y

rapidez, pero ello no es suficiente para establecer un diagnóstico médico-legal. Prácticamente se puede eliminar esta causa de error, pues es muy raro encontrarse con sangre de mono. *Weichardt* propuso su método de saturación específica para soslayar esta posible causa de error: el suero antihumano es saturado de suero de mono mientras precipite; cuando no precipita se centrifuga y el líquido claro se usa como suero precipitante que no es capaz de producir el error expuesto. *Castellani* fundándose en lo mismo, propuso su método de las precipitaciones seriadas: pone el extracto de la mancha en contacto de suero antimono, centrifuga y al líquido añade suero antihumano. Si se consigue precipitado es porque en la mancha existen albúminas de procedencia humana, ya que todo lo de antropomorfo fue arrastrado en la primera precipitación.

Basándose en la imposibilidad de producirse autoprecipitinas, *Uhlenhuth* propuso preparar el suero antihumano en el mono, con lo cual se obtiene un suero anti, capaz de precipitar las albúminas humanas y no las de mono. La reacción de precipitación concede resultados positivos con toda albúmina procedente del animal cuya sangre se ha empleado para preparar el suero precipitante. Es decir, que un suero precipitante antihumano no sólo precipita el suero humano, sino que precipita igualmente el líquido de la ascitis, del quiste de ovario, el esperma, etc., todo aquello que tenga indicios de albúmina humana. Por lo tanto, esta prueba no demuestra la naturaleza sanguínea de una mancha, sino el origen específico de las albúminas que la componen.

Hay que señalar una remotísima causa de error y es el hecho de superposición de una mancha de sangre de un animal con otra que contenga albúminas humanas, como pus, moco, esperma, etc., el examen microscópico podría

aclarar esto y además la misma reacción de precipitación realizada con antisueros correspondientes a varias especies animales aclararían la cuestión. No debe nunca dejar de realizarse la reacción con trozos de tela no manchada de sangre, ya que en caso de existir albúminas humanas a ésta, haría positiva la reacción de precipitación.

La conclusión de nuestro informe, después de realizada una reacción de precipitación, será la afirmación o la negación de que las albúminas que componen la mancha problema tienen o no las características de las albúminas humanas.⁽²⁾

El sistema inmunitario

El sistema inmunitario nos salva de una muerte cierta por infección. Un recién nacido que tenga el sistema inmunitario gravemente defectuoso, morirá muy pronto a menos que se adopten las medidas más extraordinarias para aislarle de un ejército de agentes infecciosos –bacterias, virus, hongos y otros parásitos. De hecho, cualquier vertebrado que sea inmunológicamente deficiente corre el mismo peligro mortal.

Todos los vertebrados tienen un sistema inmunitario. Los sistemas de defensa que encontramos en los invertebrados, son más primitivos; a menudo se basan principalmente en células fagocíticas. Los denominados fagocitos profesionales –principalmente macrófagos y leucocitos polimorfonucleados- también desempeñan un papel importante en

la defensa de los vertebrados contra la infección, pero sólo constituyen una parte de la estrategia de defensa mucho más compleja y sofisticada.

La inmunología, el estudio del sistema inmunitario, nació a partir de la observación habitual de que la gente que se recupera de ciertas infecciones son “inmunes” a la enfermedad a partir de entonces; es decir, rara vez sufren de nuevo la misma enfermedad. La inmunidad es altamente específica: un individuo que se recupera del sarampión queda protegido contra el virus del sarampión, pero no contra otros virus comunes como el de las paperas o el de la varicela. Esta especificidad es una característica fundamental de la respuesta inmunitaria.

Aunque el sistema inmunitario evolucionó en el sentido de proteger a los vertebrados contra la infección por parte de microorganismos y parásitos, la mayor parte de lo que sabemos de la inmunidad procede de estudios sobre las respuestas inmunitarias en los animales de laboratorio ante inyecciones de sustancias no infecciosas, tales como proteínas y polisacáridos extraños. Casi cualquier macromolécula, siempre que sea extraña al receptor, puede inducir una respuesta inmunitaria; toda sustancia capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria recibe el nombre de antígeno. Es importante subrayar que el sistema inmunitario puede distinguir antígenos muy similares entre sí –por ejemplo dos proteínas que únicamente se diferencian por un aminoácido y dos isómeros ópticos.

Clases principales de respuesta inmunitaria.

Existen dos clases principales de respuestas inmunitarias: (1) las repuestas con anticuerpos humorales implican la producción de anticuerpos que circulan por la sangre y se unen específicamente al antígeno extraño que los ha inducido. La unión del anticuerpo al antígeno facilita a las células fagocíticas la ingestión del antígeno, y a menudo activa un

sistema de proteínas sanguíneas, denominadas colectivamente complemento, que ayuda a destruir el antígeno. (2) Las respuestas inmunitarias mediadas por células implican la formación de células especializadas que reaccionan principalmente con los antígenos extraños situados sobre la superficie de las células del huésped, ya sea matando la célula huésped si el antígeno es un virus infeccioso, o induciendo a otras células del huésped, como por ejemplo a los macrófagos, a destruir el antígeno.

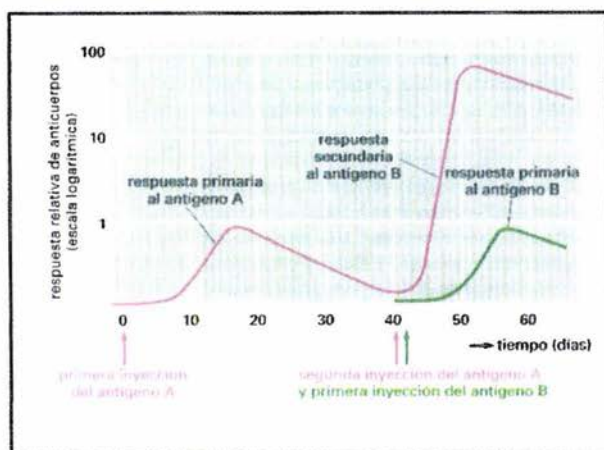
La memoria inmunológica se debe a la expansión clonal y a la diferenciación de los linfocitos.

El sistema inmunitario, al igual que el sistema nervioso, puede recordar. Esta es la razón de que desarrollemos una inmunidad para toda la vida frente a muchas enfermedades víricas comunes después de nuestra exposición inicial al virus. El mismo fenómeno se puede demostrar fácilmente en los animales experimentales. Si a un animal se le inyecta el antígeno A, su respuesta inmunitaria (ya sea humoral o mediada por células) aparecerá al cabo de un período de retraso de varios días, aumentando de manera rápida y exponencial para luego volver a disminuir, aunque de forma más gradual. Este es el curso característico de una respuesta inmunitaria primaria, que se produce en la primera exposición de un animal a un antígeno. Si se dejan pasar algunas semanas o meses, o incluso años, y de nuevo se inyecta al animal antígeno A, se producirá una respuesta inmunitaria secundaria, muy distinta a la respuesta primaria: el período de retraso es más breve, la respuesta es mayor y la duración más prolongada. Estas diferencias indican que el animal ha recordado su primera exposición al antígeno A. Si, en lugar de una segunda inyección de antígeno A, se administra al animal un antígeno distinto (por ejemplo al antígeno B), la respuesta será

tipicamente de tipo primario y no secundario; por consiguiente, la respuesta secundaria refleja una memoria específica del antígeno A.

La teoría de la selección clonal proporciona una trama conceptual útil para comprender la base celular de la memoria inmunológica. En un animal maduro, las células T y B de los tejidos linfoides periféricos son una mezcla de células por lo menos en tres fases discretas de diferenciación que se pueden denominar, células vírgenes, células con memoria y células efectoras. Cuando las células vírgenes se encuentran con un antígeno por primera vez, algunas de ellas se estimulan a multiplicarse y se transforman a células efectoras –es decir, en células dedicadas activamente a producir una respuesta (las células efectoras T realizan respuestas mediadas por células, mientras que las células efectoras B segregan anticuerpo). Otras células vírgenes T y B se estimulan a multiplicarse y a diferenciarse a células con memoria –es decir, a células que no producen respuesta pero que fácilmente se inducen a transformarse en células efectoras, por un encuentro posterior con el mismo antígeno. Existe una cierta evidencia de que los linfocitos vírgenes tienden a permanecer en los tejidos linfoides periféricos y no a circular por la sangre y la linfa. Además tienen una vida relativamente corta, muriendo probablemente a los pocos días o semanas a menos que se encuentren con su antígeno específico. Por otro lado, las células con memoria recirculan y pueden vivir durante muchos meses o incluso tardar años en morir.

Según este esquema:



Esquema en el que se expone la forma en que actúa de la memoria inmunológica

la memoria inmunológica se genera durante la respuesta primaria porque (1) la proliferación de cada célula virgen, desencadenada por el antígeno, genera muchas células con memoria-proceso conocido como expansión clonal; (2) las células con memoria tienen una vida más larga y recirculan por la sangre y la linfa; y (3) cada célula con memoria está preparada para responder más fácilmente al antígeno que una célula virgen. Así, los cambios inducidos durante la respuesta primaria aseguran que la mayoría de las células de la reserva circulante de linfocitos sean apropiadas para el ambiente antigénico del animal y ya estén dispuestas para la acción.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos

La única función conocida de los linfocitos B es la de producir anticuerpos. Un rasgo característico de los anticuerpos, que les distingue de todas las demás proteínas conocidas, es que pueden existir en millones de formas diferentes, cada una con su centro de unión característico para el antígeno. Conocidos colectivamente como inmunoglobulinas

(abreviado, Ig) representan una de las principales clases de proteínas sanguíneas, y constituyen aproximadamente el 20 % en peso del total de la proteína plasmática.

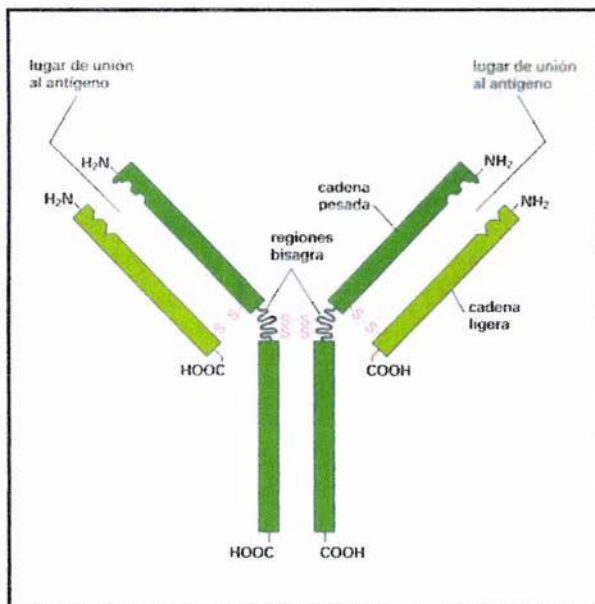
Los receptores antigénicamente específicos de las células B son moléculas de anticuerpo

Como lo predice la hipótesis de la selección clonal, todas las moléculas de anticuerpo producidas por una célula B individual, tienen el mismo centro de unión para el antígeno. Los primeros anticuerpos producidos por una célula B recién formada, no se segregan; en vez de ello, quedan insertados en la membrana plasmática, donde actúan de receptores para el antígeno. Cada célula B tiene aproximadamente 10^5 moléculas de anticuerpo en su membrana plasmática.

Cuando el antígeno se une a las moléculas de anticuerpo de la superficie de una célula B en reposo, suele iniciar una complicada y poco comprendida serie de acontecimientos, que culminan en la proliferación y diferenciación de la célula produciendo células secretoras de anticuerpo. Entonces estas células producen grandes cantidades de anticuerpo soluble (y no unido a la membrana) con el mismo centro de unión para el antígeno que los anticuerpos de la superficie, y los segregan a la sangre. Aunque las células B activadas pueden empezar a segregar anticuerpos mientras aún son linfocitos pequeños, la fase final de esta vía de diferenciación es la gran célula plasmática, que segrega anticuerpos a una velocidad de unas 2000 moléculas por segundo. Parece que las células plasmáticas han dedicado una parte tan grande de su maquinaria de síntesis proteica a la producción de anticuerpos, que son incapaces de crecer y dividirse, y por lo tanto mueren después de varios días de segregar anticuerpos.

Los anticuerpos tienen dos centros idénticos de unión al antígeno

Las moléculas más sencillas de anticuerpo son moléculas en forma de Y con dos centros idénticos de unión al antígeno, uno en la punta de cada brazo de la Y.



Representación esquemática de una molécula de anticuerpo

Debido a sus dos centros de unión al antígeno, se dice que son bivalentes. Estas moléculas de anticuerpo pueden establecer enlaces cruzados con las moléculas de antígeno, produciendo amplias redes, siempre que las moléculas de antígeno tengan tres o más determinantes antigénicos. Una vez alcanzado cierto tamaño, una red de este tipo, precipita en solución. Esta tendencia de los grandes complejos inmunitarios a precipitar, es útil para detectar la presencia de anticuerpos y antígenos. La eficiencia de los antígenos para unir el antígeno y formar puentes cruzados, se ve altamente incrementada por una región bisagra flexible en la zona en que los brazos de la Y se unen al pie, región que permite variar la distancia de los dos centros de unión al antígeno.

Una molécula de anticuerpo está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas.

La unidad estructural básica de una molécula de anticuerpo consta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras (L) idénticas cada una con unos 220 aminoácidos y dos cadenas pesadas (H) idénticas generalmente de unos 440 aminoácidos. Las cuatro cadenas se mantienen unidas gracias a una combinación de interacciones no covalentes y de enlaces covalentes (enlaces de bisulfuro). La molécula está compuesta por dos mitades idénticas en las que las cadenas L y H contribuyen casi por igual a los dos centros idénticos de unión del antígeno.

Existen cinco clases diferentes de cadenas H, cada una con propiedades biológicas distintas.

En los vertebrados superiores existen cinco clases de anticuerpos diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, cada una con su propia clase de cadena H $-\alpha$, δ , ϵ , γ y μ , respectivamente; las moléculas de IgA tienen cadenas α , las moléculas de IgG tienen cadenas γ , etc. Además existen varias subclases de IgG y de algunas de las otras inmunoglobulinas. Las diferentes cadenas H imparten una conformación distintiva a las regiones del pie de los anticuerpos, y confieren a cada clase unas propiedades características propias.

La intensidad de una interacción antígeno-anticuerpo depende tanto de la afinidad como del número de centros de unión.

La unión de un antígeno a un anticuerpo, al igual que la unión de un sustrato a una enzima, es reversible. Está mediada por la suma de numerosas fuerzas no covalentes relativamente débiles, entre ellas enlaces hidrofóbicos y de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals e interacciones iónicas. Estas fuerzas débiles solo son eficaces cuando la molécula de antígeno está lo bastante cerca como para que alguno de sus átomos puedan encajar en los huecos complementarios existentes en la superficie del anticuerpo. Las regiones complementarias de una unidad de anticuerpo de cuatro cadenas son sus dos centros idénticos de unión al antígeno, mientras que la región correspondiente de un antígeno es un determinante antigénico. La mayoría de macromoléculas de antígeno, tienen muchos determinantes antigénicos diferentes; si dos o más de ellos son idénticos (como sucede en un polímero con estructura repetitiva), se dice que el antígeno es multivalente.

La reacción reversible de unión de un antígeno con un único determinante antigénico (indicado por Ag) y un anticuerpo con un único centro de unión (indicado por Ab) se puede expresar de la siguiente manera:



El punto de equilibrio depende de las concentraciones de Ab y Ag y de la intensidad de su interacción. Evidentemente, a medida que aumente la concentración de Ag, una fracción mayor de Ab quedara asociada con Ag. La intensidad de la interacción se suele expresar en la constante de afinidad (K), donde

$$K = [\text{AgAb}]/[\text{Ag}][\text{Ab}]$$

Esta constante de afinidad, llamada también constante de asociación (K_a), se puede determinar midiendo la concentración de Ag libre necesaria para llenar la mitad de los centros de unión al antígeno del anticuerpo. Cuando la mitad de los dichos centros están

ocupados, $[AgAb] = [Ab]$ y $K = 1/[Ag]$. Por lo tanto, el valor recíproco de esta concentración de antígeno que produce la mitad de la unión máxima es igual a la constante de afinidad del anticuerpo por el antígeno. Los valores habituales abarcan desde cifras tan bajas como 5×10^4 hasta cifras tan altas como 10^{12} litros por mol. La constante de afinidad en la que una molécula de inmunoglobulina deja de ser considerada un anticuerpo para un antígeno determinado, es algo arbitraria, pero es poco probable que un anticuerpo con una K inferior a 10^4 sea biológicamente eficaz.

La afinidad de un anticuerpo refleja la bondad del ajuste de un determinante antigénico a un único centro de unión al antígeno, y es independiente del número de dichos centros. Sin embargo, la avidéz total de un anticuerpo por un antígeno multivalente, tal como un polímero con subunidades repetidas, se define como la intensidad total de unión de todos sus centros de unión juntos. Una molécula de IgG típica se unirá con una intensidad por lo menos 10,000 veces superior a un antígeno multivalente si intervienen ambos centros de unión que si sólo interviene uno de ellos.

Por la misma razón, si la afinidad de los centros en una molécula de IgG y de IgM es la misma, la molécula de IgM (por tener 10 centros de unión) mostrará una avidéz muy superior por un antígeno multivalente que una molécula de IgG (que sólo tiene dos centros). Esta diferencia de avidéz es importante desde el punto de vista de que los anticuerpos producidos en las primeras fases de una respuesta inmunitaria generalmente tienen afinidades muy inferiores a las que muestran los producidos más tarde. (El aumento de la afinidad media de los anticuerpos producidos con tiempo después de la inmunización, recibe el nombre de maduración de la afinidad.) Debido a su elevada avidéz total, la IgM – la primera clase de Ig producida en las primeras fases de las respuestas inmunitarias- puede actuar incluso cuando cada uno de sus centros de unión aún tiene una afinidad baja.

Las interacciones antígeno-anticuerpo se pueden cuantificar de muchas maneras.

La especificidad antigénica exacta de los anticuerpos, los convierte en herramientas poderosas y versátiles que se pueden utilizar para detectar, cuantificar y localizar una amplia variedad de moléculas de interés biológico. Pero, ¿cómo se detectan y se cuantifican las interacciones antígeno-anticuerpo? La reacción inicial de unión de un antígeno y un anticuerpo –la denominada reacción primaria- se puede medir de muchas maneras distintas. En la prueba de radioinmunoensayo, que es una técnica muy valiosa para medir cantidades incluso diminutas de una sustancia, se añade una cantidad conocida de antígeno radioactivo, y una cantidad determinada de anticuerpo, a una muestra que contenga una cantidad desconocida del mismo antígeno en forma no radioactiva. El antígeno no marcado compite con el antígeno marcado por los centros de unión del anticuerpo, de modo que cuanto mayor sea la cantidad de antígeno en la muestra, tanto menor será la cantidad de antígeno radiactivo que se unirá al anticuerpo. El antígeno radiactivo unido se puede separar del antígeno libre y se puede cuantificar mediante diversos métodos, que se basan en las diferentes propiedades del antígeno libre y del antígeno unido; una manera general de hacerlo consiste en precipitar los complejos antígeno-anticuerpo con un anticuerpo anti-inmunoglobulina.

También se pueden utilizar anticuerpos marcados radiactivamente, fluorescentes o acoplados a enzimas, para detectar y localizar moléculas específicas en las células y en los tejidos. En este caso, los anticuerpos unidos se visualizan mediante una autorradiografía, mediante la microscopia de fluorescencia, o por medio del producto coloreado de la reacción enzima-sustrato. respectivamente.

Sin embargo, muchas pruebas se basan en las reacciones secundarias que se producen como consecuencia de la interacción primaria del anticuerpo con el antígeno. Entre las reacciones secundarias se cuentan la precipitación, la aglutinación celular y la fijación del complemento. Esta última se puede aprovechar debido a que los componentes del sistema de complemento únicamente se unen al anticuerpo que forma un complejo con el antígeno; por ello, la desaparición de los componentes del complemento se puede utilizar como medida de la cantidad formada de complejo antígeno-anticuerpo. Pero la prueba secundaria utilizada con mayor frecuencia implica la detección de los precipitados de antígeno-anticuerpo que se forman en lo líquido o geles. Por ejemplo, en la prueba de Ouchterlony, el antígeno y el anticuerpo se colocan en diferentes pocillos practicados en un gel de agar. Entonces se deja que difundan hacia el exterior de los pocillos hasta que se encuentren en las proporciones óptimas para formar un gran precipitado, que resulta visible en forma de línea opaca debido a la luz que dispersa.

El tamaño de los complejos antígeno-anticuerpo formados depende de la valencia del antígeno y de las concentraciones relativas del antígeno y del anticuerpo.

La base de las reacciones de precipitación es la formación de enlaces cruzados entre los antígenos multivalentes por parte de los anticuerpos bivalentes. Si solo se halla presente una especie de anticuerpo, las moléculas con un solo determinante antigénico no se pueden unir por puentes cruzados. Si un antígeno es bivalente, puede formar pequeños complejos cíclicos o cadenas lineales con el anticuerpo, mientras que un antígeno con tres o más determinantes antigénicos puede formar grandes redes tridimensionales que precipitan fácilmente. Pero, de hecho, la mayoría de antisueros preparados contra un antígeno contienen varios anticuerpos diferentes que reaccionan con distintos determinantes del

antígeno y que pueden cooperar en la formación de puentes cruzados. En cambio, los anticuerpos homogéneos (monoclonales) sólo pueden precipitar moléculas con determinantes antigénicos idénticos repetidos (un antígeno multivalente).

Dadas unas condiciones de valencia que permitan la formación de grandes agregados, el tamaño de los complejos antígeno-anticuerpo que se forman dependerá críticamente de las concentraciones molares relativas de los reactantes. Si existe un exceso de antígeno o de anticuerpo, es poco probable que se formen grandes complejos: en caso de un exceso de antígeno, la mayoría de complejos estarán formados por moléculas de anticuerpo con una molécula de antígeno en cada uno de sus centros de unión de antígeno; en caso de un exceso de anticuerpo, la mayoría de complejos estarán formados por moléculas aisladas de antígeno con anticuerpos unidos a cada uno de sus determinantes antigénicos. Los complejos de mayor tamaño se formarán en las proximidades de la equivalencia molar entre antígeno y anticuerpo.

El tamaño y la composición de los complejos antígeno-anticuerpo, no solo son importantes por su influencia sobre las reacciones de precipitación en el tubo de ensayo, sino que además son cruciales para determinar en el cuerpo el destino de los complejos. Los complejos formados en condiciones de equivalencia o con un exceso de anticuerpo, tienen regiones Fc que sobresalen y por consiguiente se unen fuertemente a los receptores Fc de los macrófagos, que los ingieren y degradan. Los complejos pequeños, formados con un exceso de antígeno, tienen una sola región Fc por complejo. Por ello se unen poco a los receptores Fc de los macrófagos y se destruyen con menor eficacia. En vez de ello a menudo se depositan en los pequeños vasos sanguíneos de la piel, de los riñones, de las articulaciones y del cerebro, donde activan el sistema del complemento, provocando inflamación y destrucción de tejido.⁽¹²⁾

Inmunización de animales

Toda sustancia que puede inducir una respuesta inmune se le considera un inmunógeno y aquellas sustancias que son reconocidas por una inmunoglobulina o por un receptor de células T y que son el blanco de una respuesta inmune se dice que posee antigenicidad. Un hapteno es una sustancia que no es inmunogénica; pero tiene la capacidad de unirse a anticuerpos previamente elaborados o ser reconocida por receptores de células T (TCR) homólogo y entonces decimos que el hapteno tiene antigenicidad.

La estructura del antígeno que es reconocida por el sitio activo del anticuerpo o el TCR se le llama determinante antigénico o epitopo.

La composición química de los inmunógenos puede ser proteica, son las macro proteínas los inmunógenos más potentes, también los carbohidratos, los polipéptidos cortos y algunos antígenos sintéticos bajo ciertas circunstancias se comportan como inmunógenos. Los lípidos y los ácidos nucleicos puros no son inmunogénicos; pero la inmunización con complejos de nucleoproteínas o lipoproteínas nos pueden producir anticuerpos que reconocen a los lípidos y a los ácidos nucleicos puros, es decir que estas sustancias tienen antigenicidad pero carecen de inmunogenicidad.

En las prácticas de inmunización usando modelos en animales, las vías de inoculación pueden ser: administración oral, con sonda gástrica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, en cojinete plantar etc. La elección de la vía depende de las características del inmunógeno y si éste va acompañado de adyuvantes. En principio sustancias con adyuvantes no pueden ser inoculadas por vía intravenosa.

Los adyuvantes son sustancias que colaboran con el antígeno para aumentar la respuesta y uno de los adyuvantes más conocidos es el adyuvante de Freund el cual se prepara con la mezcla de un aceite por ejemplo el Drakeoil (9 partes) y un detergente el arlancel A (1 parte) A este adyuvante se la llama adyuvante incompleto de Freund y si se le adicionan bacterias, por ejemplo *Mycobacterium bovis* muertos por calor se le conoce como adyuvante completo de Freund.

Las especies de animales que con más frecuencia se usan son: los conejos, las ratas, los ratones, los hamster, los cobayos, los chivos, los carneros y los caballos, la elección del animal se hace en función de la disponibilidad de instalaciones y la cantidad de suero que se quiera obtener.⁽¹³⁾

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Planteamiento del problema:

En la comisión de un delito con violencia, inevitablemente el cálido líquido purpurino no cesa de brotar, correr y macular la escena del crimen, de ahí que la mano criminal armada de un palo, cuchillo o arma de fuego deje siempre a su alrededor, como acabamos de referir, una estela biológica perdurable “La Sangre”. Este indicio suele ofrecer, inapreciables datos sobre las circunstancias del hecho, así como de la identidad de sus autores.⁽⁵⁾ Por tal motivo e aquí que el diagnóstico específico de la especie animal a la que pertenece la sangre tenga gran interés para la investigación, y las técnicas de inmunoprecipitación ofrecen magníficos resultados. Para la identificación específica de la sangre, esta técnica bien aplicada y siguiendo los procedimientos adecuados para su implementación no debe constituir problemática alguna.⁽¹⁴⁾

OBJETIVO

Objetivo:

Obtener un suero de conejo inmunizado con sangre humana que nos reconozca a los antígenos de eritrocitos humanos, diferentes del grupo A y B, y que además nos reconozca proteínas séricas humanas específicamente.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Materiales y Metodología

Obtención de suero precipitante.

Se utilizaron conejos machos adultos de 3 a 4 kilogramos de peso, de la raza Nueva Zelanda, los cuales fueron mantenidos en condiciones de mínima variación de temperatura, humedad, ventilación, comodidad, salud, así como la mínima exposición a enfermedades, y lejos del ruido excesivo. Los conejos se alojaron en jaulas de malla de alambre de acero inoxidable.⁽¹⁵⁾

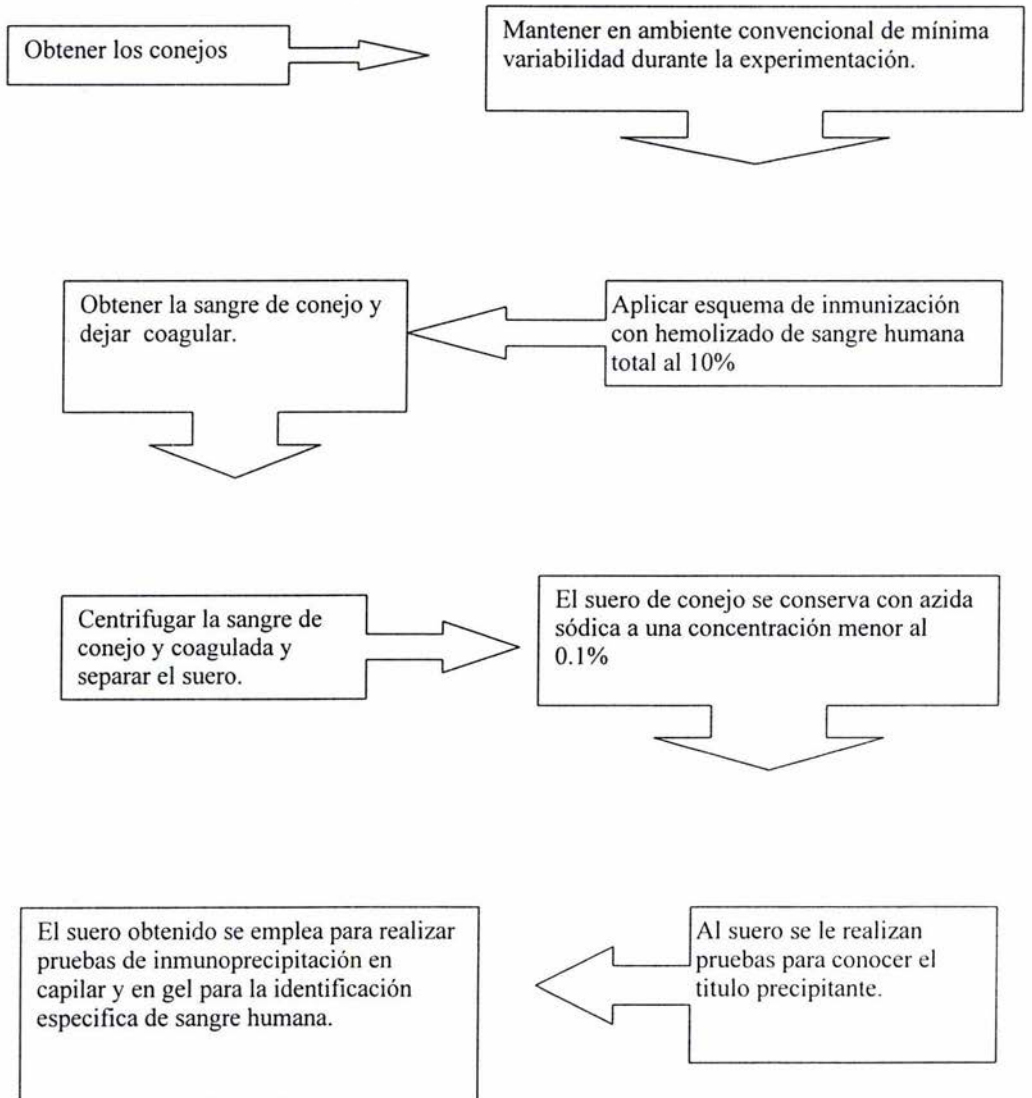
Una vez mantenidos individualmente en estas condiciones por espacio de siete días. A los conejos se les inyectó un hemolizado de sangre humana total grupo O positivo al 10 por 100 con solución salina estéril, a diferentes tiempos como se describe en el siguiente cuadro:

día 0	0.5 mL	vía intravenosa
día 3	0.5 mL	vía intravenosa
día 7	1.0 mL	vía intravenosa
día 10	1.0 ml	vía intravenosa
día 13	1.0 mL	vía intravenosa
día 17	1.0 mL	vía intravenosa
día 22		Sangrar

Esquema de inmunización con hemolizado de sangre humana total al 10%

Habiendo obtenido la sangre de conejo por este método, esta se deja coagular y se centrifuga para obtener el suero el cual se conserva con azida sódica en una concentración menor al 0.1%⁽¹³⁾

**Diagrama de flujo.
Obtención de suero de conejo
antisangre humana total**



INMUNOPRECIPITACIÓN EN CAPILAR

Inmunoprecipitación en capilar

Material.

Capilares.

Regla.

Plastilina.

Pipetas de 1,2 y 5 mL.

Tubos 13 X 100 mm.

Solución de PBS.

Papel filtro

Sistemas antígeno-anticuerpo: (suero de conejo antisangre humana total, sangre humana A positivo, sangre humana B positivo, sangre humana O positivo, sangre humana O negativo, sangre humana AB positivo, sangre de conejo, sangre de rata, sangre de perro, sangre de gato, sangre de cerdo, sangre de borrego, sangre de chivo, sangre de gallina, sangre de vaca, sangre de pato).

Método.

1. Tome los capilares y divídalos en 4 partes con un lápiz.
2. Realice diluciones a cada uno de los antígenos con solución buffer de fosfatos y mantenga constante el anticuerpo.

3. Tome un capilar y absorba por capilaridad el anticuerpo hasta la marca, gire 180 grados el capilar y por el otro extremo limpio tome la dilución del antígeno, se mezcla perfectamente bien girando el capilar y colóquelo en una barra de plastilina.
 4. Esto se hace para cada uno de los antígenos.
 5. Llene dos capilares uno con PBS y el otro con anticuerpo que son los testigos de la prueba.
 6. Deje a temperatura ambiente 1 hora y después guarde en refrigeración 24 a 48 horas.
- Después de este tiempo lea los precipitados con una regla y repórtelos en mm.⁽⁷⁻¹³⁾

Diagrama de flujo. Inmunoprecipitación en capilar

A los capilares se les realizaran marcas con lápiz para dividirlos en cuatro partes iguales

Realizar diluciones de los antígenos con solución buffer de fosfatos, y mantener constante el anticuerpo.

Esto se hace para cada antígeno de la prueba

Tome un capilar y absorba por capilaridad el antígeno hasta la marca, gire 180 grados el capilar y por el otro extremo limpio tome el anticuerpo, se mezcla perfectamente bien girando el capilar y colóquelo en una barra de plastilina

Llene dos capilares uno con antígeno y otro con anticuerpo que son los testigos de la prueba

Deja a temperatura ambiente una hora y después guarde en refrigeración 24 a 48 después de este tiempo lea los precipitados con una regla y reportelos en mm.

MÉTODO DE OUCHTERLONY

Método de Ouchterlony.

Material.

Portaobjetos con una capa de agarosa al 1%.

Capilares.

Sistemas antígeno-anticuerpo: (suero de conejo antisangre humana total, sangre humana A positivo, sangre humana B positivo, sangre humana O positivo, sangre humana O negativo, sangre humana AB positivo, sangre de conejo, sangre de rata, sangre de perro, sangre de gato, sangre de cerdo, sangre de borrego, sangre de chivo, sangre de gallina, sangre de vaca, sangre de pato).

Cajas de petri.

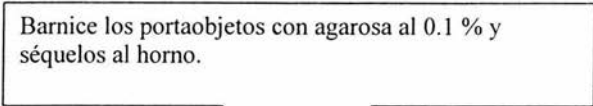
Perforadores.

Método.

1. Barnice los portaobjetos con agarosa al 0.1% y séquelos al horno. Funda agarosa al 1% y en caliente se coloque 5 mL de la agarosa al portaobjeto, sin derramar. Deje que gelifique.
2. Perfore los portaobjetos con un sacabocados, distribuya los agujeros alrededor de un pozo central, en dónde se colocará el anticuerpo de conejo anti suero humano, coloque el antígeno en los pozos laterales. Se debe de mantener una distancia de aproximadamente 0.5 cm entre pozo y pozo.
3. Incube en cámara húmeda, a temperatura ambiente por 24 horas. Observe las bandas de precipitación.⁽¹⁶⁻²¹⁾

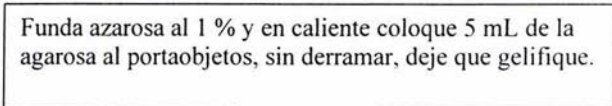
**Diagrama de flujo.
Inmunoprecipitación en gel por el
Método de Ouchterlony**

Barnice los portaobjetos con agarosa al 0.1 % y séquelos al horno.



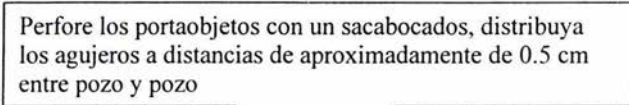
```
graph TD; A[Barnice los portaobjetos con agarosa al 0.1 % y séquelos al horno.] --> B[Funda azarosa al 1 % y en caliente coloque 5 mL de la agarosa al portaobjetos, sin derramar, deje que gelifique.];
```

Funda azarosa al 1 % y en caliente coloque 5 mL de la agarosa al portaobjetos, sin derramar, deje que gelifique.



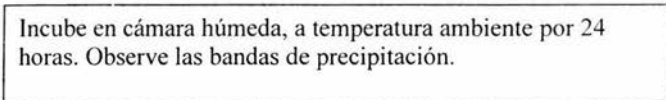
```
graph TD; B[Funda azarosa al 1 % y en caliente coloque 5 mL de la agarosa al portaobjetos, sin derramar, deje que gelifique.] --> C[Perfore los portaobjetos con un sacabocados, distribuya los agujeros a distancias de aproximadamente de 0.5 cm entre pozo y pozo];
```

Perfore los portaobjetos con un sacabocados, distribuya los agujeros a distancias de aproximadamente de 0.5 cm entre pozo y pozo



```
graph TD; C[Perfore los portaobjetos con un sacabocados, distribuya los agujeros a distancias de aproximadamente de 0.5 cm entre pozo y pozo] --> D[Incube en cámara húmeda, a temperatura ambiente por 24 horas. Observe las bandas de precipitación.];
```

Incube en cámara húmeda, a temperatura ambiente por 24 horas. Observe las bandas de precipitación.

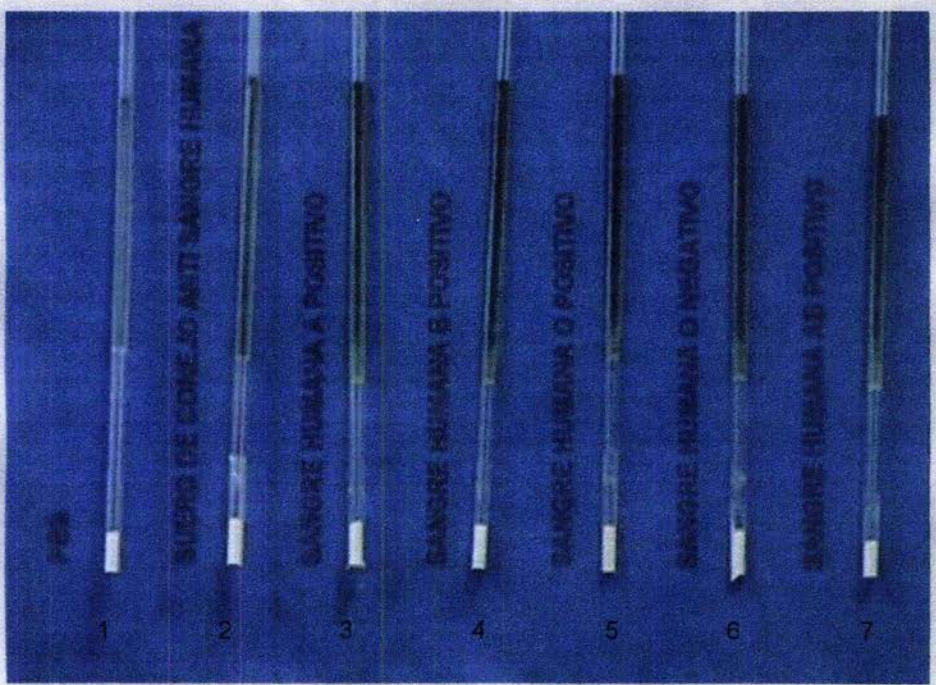


RESULTADOS

Resultados

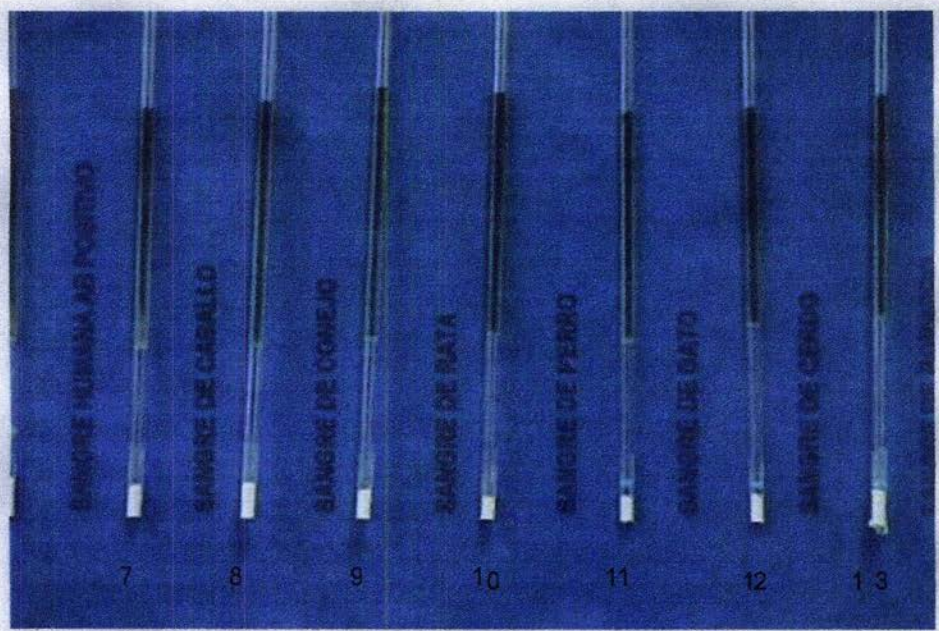
Ya obtenido el suero de conejo antisangre humana total, se procedió a realizar pruebas de identificación específica de sangre humana, por las técnicas de inmunoprecipitación en capilar y por inmunodifusión en gel, arrojando los siguientes resultados.

Por la técnica de inmunoprecipitación en capilar se logro la identificación específica de sangre humana, debido a la presencia de un precipitado como se muestra en las siguientes ilustraciones:



Fotografía digital en la que se muestran algunos resultados de inmunoprecipitación en capilar obtenidos en el laboratorio de inmunología de la FES ZARAGOZA.

- 1.- Solución PBS en el capilar (testigo negativo): no se observa presencia de turbiedad o precipitado a las 24 horas.
- 2.- Suero de conejo antisangre humana total en el capilar (testigo negativo): no se observa presencia de turbiedad o precipitado a las 24 horas.
- 3.- Sangre humana A positivo vs Suero de conejo antisangre humana total: se observa turbiedad en el capilar a los 30 minutos, a las 24 horas se observa un precipitado de 5 mm de espesor en el fondo del capilar.
- 4.- Sangre humana B positivo vs Suero de conejo antisangre humana total: se observa turbiedad en el capilar a los 30 minutos, a las 24 horas se observa un precipitado de 5 mm de espesor en el fondo del capilar.
- 5.- Sangre humana O positivo vs Suero de conejo antisangre humana total: se observa turbiedad en el capilar a los 30 minutos, a las 24 horas se observa un precipitado de 5 mm de espesor en el fondo del capilar.
- 6.- Sangre humana O negativo vs Suero de conejo antisangre humana total: se observa turbiedad en el capilar a los 30 minutos, a las 24 horas se observa un precipitado de 5 mm de espesor en el fondo del capilar.
- 7.- Sangre humana AB positivo vs Suero de conejo antisangre humana total: se observa turbiedad en el capilar a los 30 minutos, a las 24 horas se observa un precipitado de 5 mm de espesor en el fondo del capilar.



Fotografía digital en la que se muestran algunos resultados de inmunoprecipitación en capilar obtenidos en el laboratorio de inmunología de la FES ZARAGOZA

8.- Sangre de caballo vs Suero de conejo antisangre humana total: no se observa presencia de turbiedad ni precipitado en el capilar a las 24 horas.

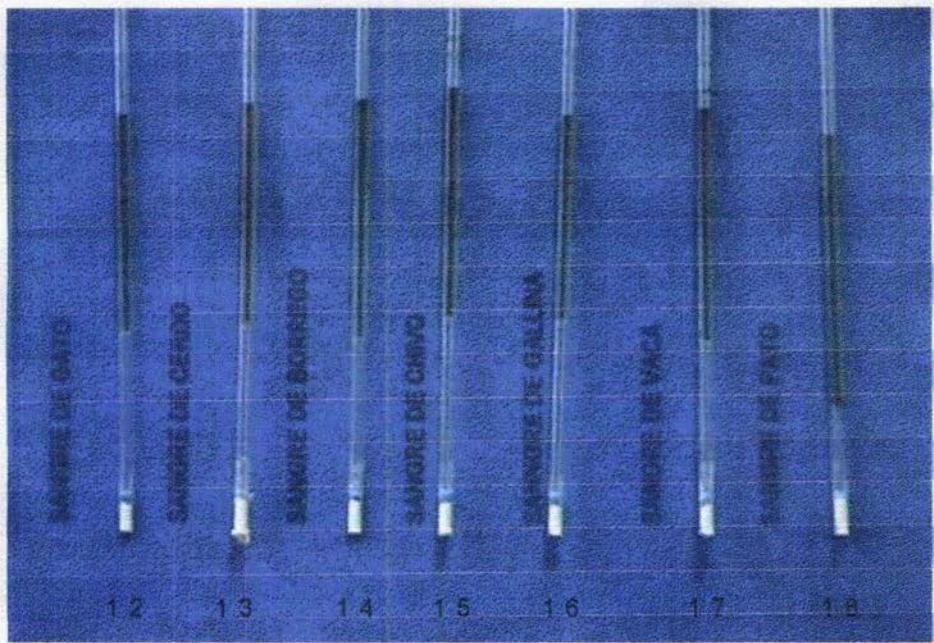
9.- Sangre de conejo vs Suero de conejo antisangre humana total: no se observa presencia de turbiedad ni precipitado en el capilar a las 24 horas.

10.- Sangre de rata vs Suero de conejo antisangre humana total: no se observa presencia de turbiedad ni precipitado en el capilar a las 24 horas.

11.- Sangre de perro vs Suero de conejo antisangre humana total: no se observa presencia de turbiedad ni precipitado en el capilar a las 24 horas.

12.- Sangre de gato vs Suero de conejo antisangre humana total: no se observa presencia de turbiedad ni precipitado en el capilar a las 24 horas.

13.- Sangre de cerdo vs Suero de conejo antisangre humana total: no se observa presencia de turbiedad ni precipitado en el capilar a las 24 horas.



Fotografía digital en la que se muestran algunos resultados de inmunoprecipitación en capilar obtenidos en el laboratorio de inmunología de la FES ZARAGOZA

14.- Sangre de borrego vs Suero de conejo antisangre humana total: no se observa presencia de turbiedad ni precipitado en el capilar a las 24 horas.

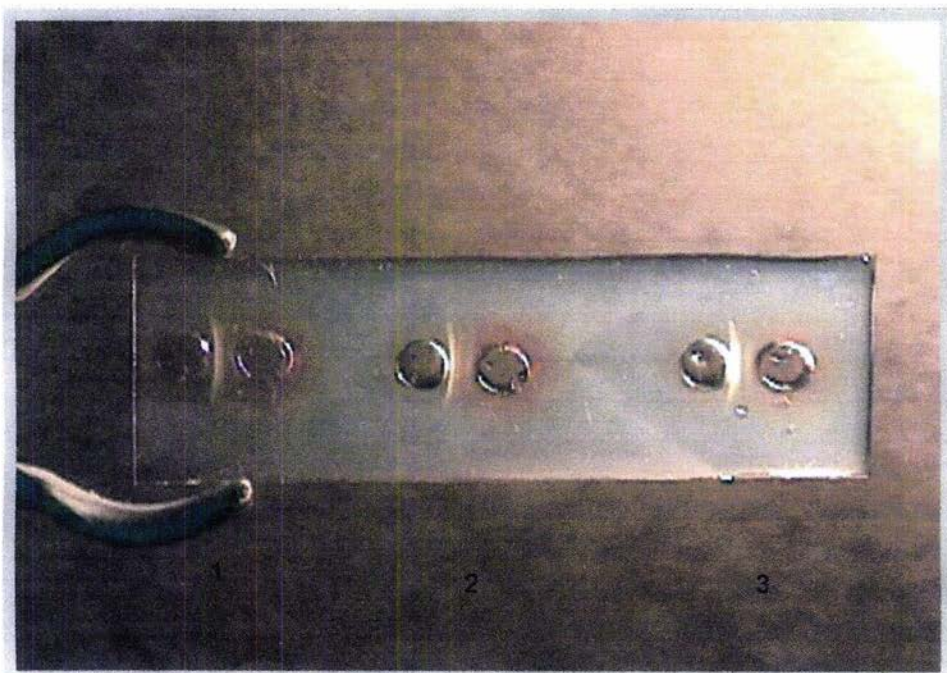
15.- Sangre de chivo vs Suero de conejo antisangre humana total: no se observa presencia de turbiedad ni precipitado en el capilar a las 24 horas.

16.- Sangre de gallina vs Suero de conejo antisangre humana total: no se observa presencia de turbiedad ni precipitado en el capilar a las 24 horas.

17.- Sangre de vaca vs Suero de conejo antisangre humana total: no se observa presencia de turbiedad ni precipitado en el capilar a las 24 horas.

18.- Sangre de pato vs Suero de conejo antisangre humana total: no se observa presencia de turbiedad ni precipitado en el capilar a las 24 horas.

Por la técnica de Ouchterlony inmunoprecipitación en gel, se logro la identificación específica de sangre humana, ya que se observaron bandas de precipitación lo cual se muestra en las siguientes ilustraciones:



Fotografía digital de algunos resultados obtenidos por inmunoprecipitación en gel por técnica de Ouchterlony en el laboratorio de inmunología de la FEZ ZARAGOZA.

1.- Sangre A positivo vs suero de conejo antisangre humana total: se observa una línea de precipitación intensa a las 24 horas de incubación en refrigeración.

2.- Sangre B positivo vs suero de conejo antisangre humana total: se observa una línea de precipitación intensa a las 24 horas de incubación en refrigeración.

3.- Sangre O positivo vs suero de conejo antisangre humana total: se observa una línea de precipitación intensa a las 24 horas de incubación en refrigeración.

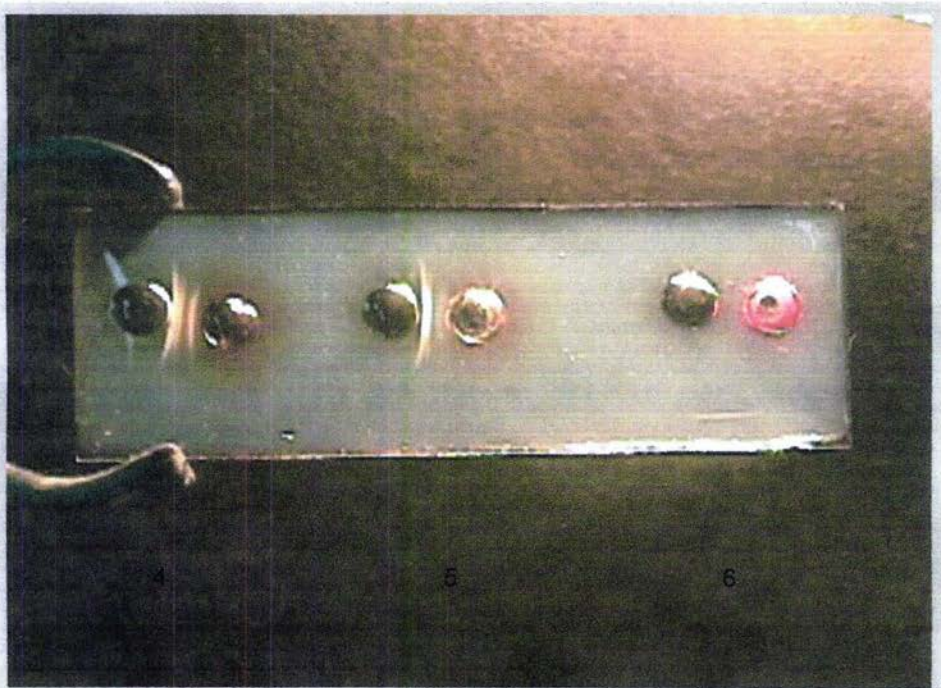


Figura original de algunos resultados obtenidos por inmunoprecipitación en gel por técnica de Ouchterlony en el laboratorio de inmunología de la FEZ ZARAGOZA.

4.- Sangre O negativo vs suero de conejo antisangre humana total: se observa una línea de precipitación intensa a las 24 horas de incubación en refrigeración.

5.- Sangre AB positivo vs suero de conejo antisangre humana total: se observa una línea de precipitación intensa a las 24 horas de incubación en refrigeración.

6.- sangre de conejo vs suero de conejo antisangre humana total: no se observa línea de precipitación a las 24 horas de incubación en refrigeración.

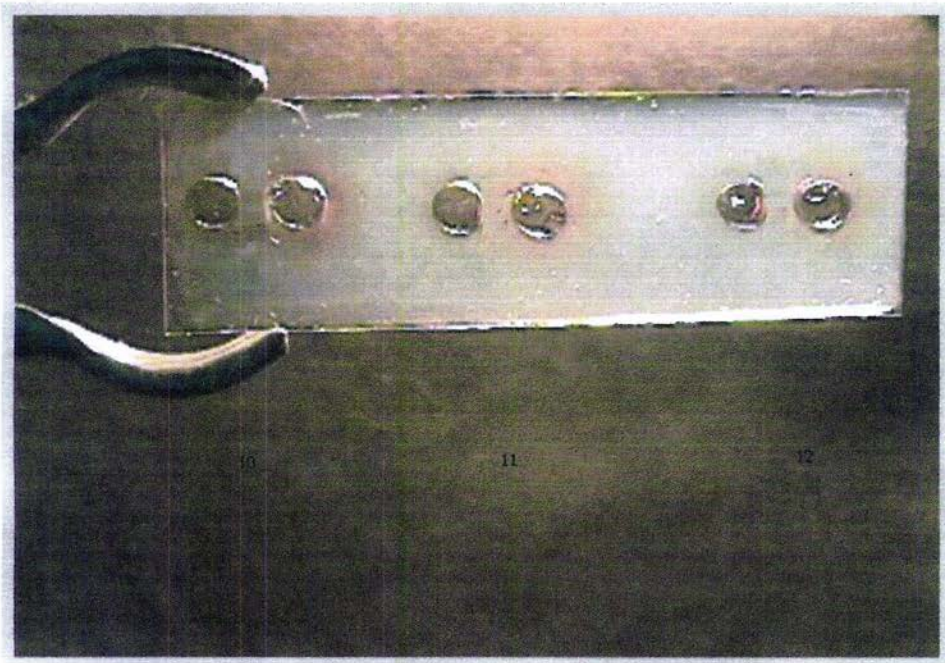


Figura 1. Resultados obtenidos por inmunoprecipitación en los tests de Ouchterlony en el laboratorio de inmunología de la FEZ ZARAGOZA.

7.- sangre de caballo vs suero de conejo antisangre humana total: no se observa línea de precipitación a las 24 horas de incubación en refrigeración.

8.- sangre de rata vs suero de conejo antisangre humana total: no se observa línea de precipitación a las 24 horas de incubación en refrigeración.

9.- sangre de perro vs suero de conejo antisangre humana total: no se observa línea de precipitación a las 24 horas de incubación en refrigeración.

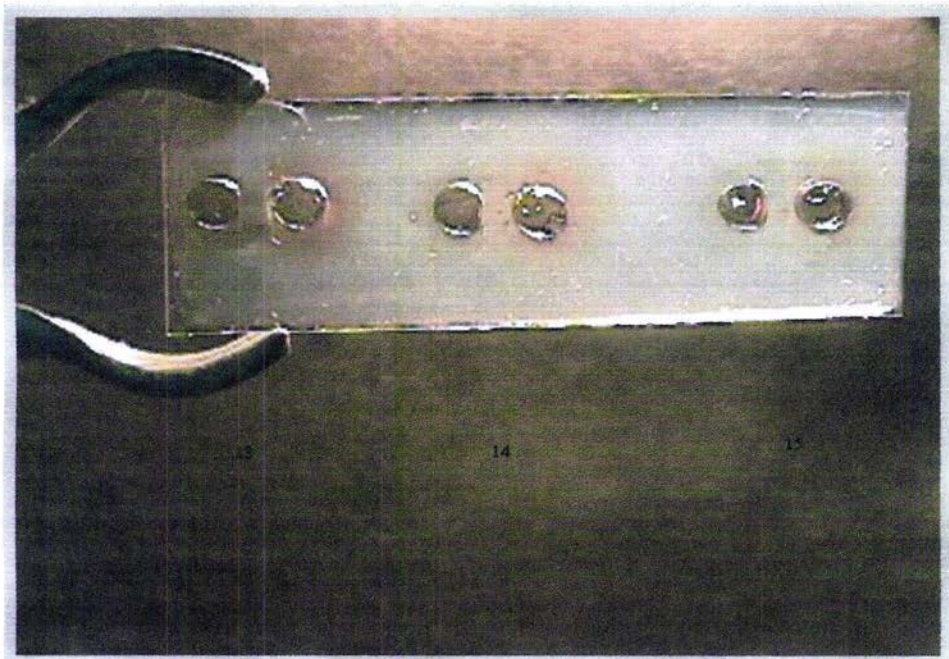


Fotografía digital de algunos resultados obtenidos por inmunoprecipitación en gel por técnica de Ouchterlony en el laboratorio de inmunología de la FEZ ZARAGOZA.

10.- sangre de gato vs suero de conejo antisangre humana total: no se observa línea de precipitación a las 24 horas de incubación en refrigeración.

11.- sangre de cerdo vs suero de conejo antisangre humana total: no se observa línea de precipitación a las 24 horas de incubación en refrigeración.

12.- sangre de borrego vs suero de conejo antisangre humana total: no se observa línea de precipitación a las 24 horas de incubación en refrigeración.

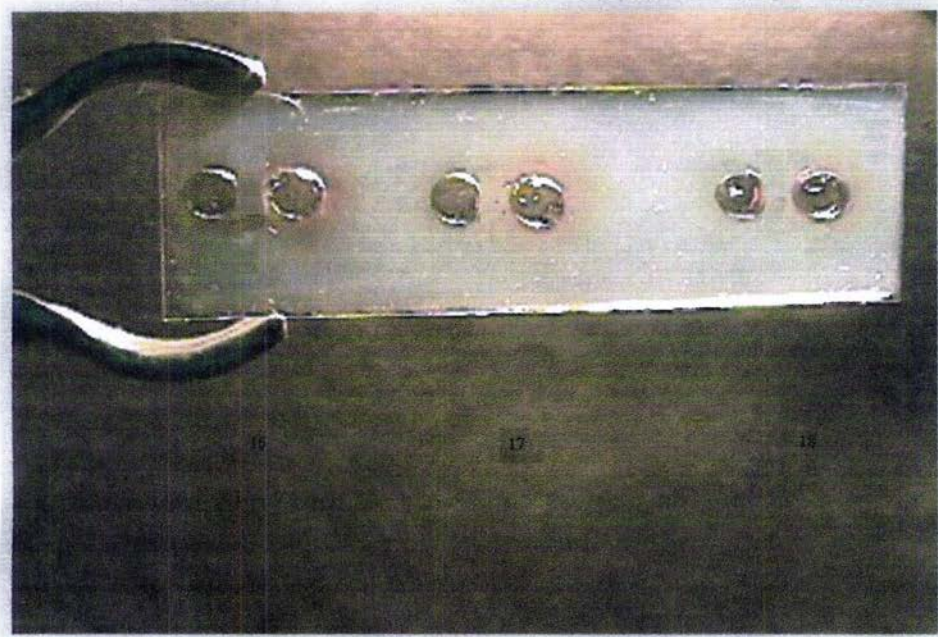


Fotografía digital de algunos resultados obtenidos por inmunoprecipitación en gel por técnica de Ouchterlony en el laboratorio de inmunología de la FEZ ZARAGOZA.

13.- sangre de chivo vs suero de conejo antisangre humana total: no se observa línea de precipitación a las 24 horas de incubación en refrigeración.

14.- sangre de gallina vs suero de conejo antisangre humana total: no se observa línea de precipitación a las 24 horas de incubación en refrigeración.

15.- sangre de vaca vs suero de conejo antisangre humana total: no se observa línea de precipitación a las 24 horas de incubación en refrigeración.



Fotografía digital de algunos resultados obtenidos por inmunoprecipitación en gel por técnica de Ouchterlony en el laboratorio de inmunología de la FEZ ZARAGOZA.

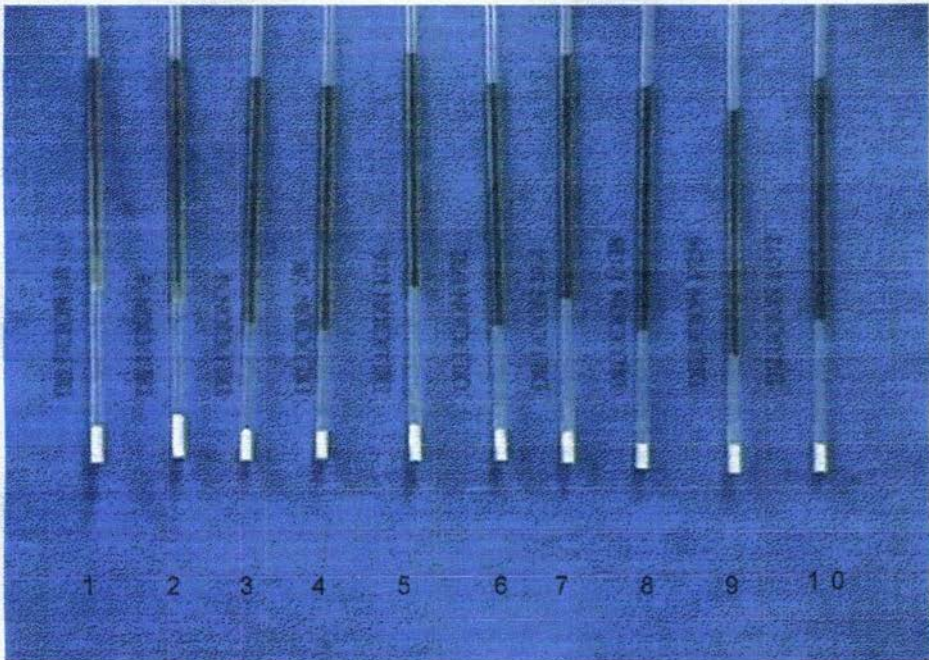
16.- sangre de conejo vs suero de conejo antisangre humana total: no se observa línea de precipitación a las 24 horas de incubación en refrigeración.

17.- sangre de pato vs suero de conejo antisangre humana total: no se observa línea de precipitación a las 24 horas de incubación en refrigeración.

18.- solución PBS vs suero de conejo antisangre humana total: no se observa línea de precipitación a las 24 horas de incubación en refrigeración.

En la valoración del suero de conejo antisangre humana

total se obtuvo como resultado un titulo de valor precipitante de 1:32 el resultado se aprecia en la siguiente ilustración;



Fotografía digital en la que se muestran algunos resultados de inmunoprecipitación en capilar obtenidos en el laboratorio de inmunología de la FES ZARAGOZA

- 1.- Sangre humana O positivo vs suero de conejo antisangre humana total en dilución (1:1): se observa un precipitado de 5 mm de altura a las 24 horas.
- 2.- Sangre humana O positivo vs suero de conejo antisangre humana total en dilución (1:2): se observa un precipitado de 2.5 mm de alturar a las 24 horas.

- 3.- Sangre humana O positivo vs suero de conejo antisangre humana total en dilución (1:4): se observa un precipitado de 1.5 mm de altura a las 24 horas.
- 4.- Sangre humana O positivo vs suero de conejo antisangre humana total en dilución (1:8): se observa un precipitado de 1 mm de altura a las 24 horas.
- 5.- Sangre humana O positivo vs suero de conejo antisangre humana total en dilución (1:16): se observa la presencia de turbiedad en el capilar la cual se mantiene a las 24 horas sin formación de precipitado.
- 6.- Sangre humana O positivo vs suero de conejo antisangre humana total en dilución (1:32): se observa la presencia de turbiedad en el capilar la cual se mantiene a las 24 horas sin formación de precipitado.
- 7.- Sangre humana O positivo vs suero de conejo antisangre humana total en dilución (1:64): no se observa la presencia de turbiedad ni precipitado en el capilar a las 24 horas.
- 8.- Sangre humana O positivo vs suero de conejo antisangre humana total en dilución (1:128): no se observa la presencia de turbiedad ni precipitado en el capilar a las 24 horas.
- 9.- Sangre humana O positivo vs suero de conejo antisangre humana total en dilución (1:256): no se observa la presencia de turbiedad ni precipitado en el capilar a las 24 horas.

10.- Sangre humana O positivo vs suero de conejo antisangre humana total en dilución (1:512): no se observa la presencia de turbiedad ni precipitado en el capilar a las 24 horas.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Discusión de resultados

Nuestros resultados muestran que el suero de conejo antisangre humana total, obtenido por la técnica de inoculación empleada, dio buenos resultados para la identificación específica de sangre humana total, por ambas técnicas de inmunoprecipitación en capilar y en gel, y el poder precipitante del suero obtenido es muy bueno ya que el título de 1:32 corresponde con los más elevados reportados en la bibliografía. El que el suero haya logrado la identificación específica de sangres de los diferentes grupos sanguíneos de sistema ABO nos permite discernir que no se presenta efecto cruzado con los isoantígenos de grupo ABO que pueden producir algunas bacterias lo cual se logró empleando en la preparación del suero precipitante, sangre humana total del grupo O Rh positivo, ya que este tipo de eritrocitos no tienen en su superficie antígenos de los grupos A B con lo cual el suero precipitante producido no tendrá anticuerpos contra los antígenos A B, evitando así el efecto cruzado con isoantígenos de grupo A B.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Se obtuvo suero de conejo antisangre humana total que nos permitió hacer la identificación específica de sangre humana de los diferentes grupos del sistema ABO.

El suero de conejo antisangre humana total obtenido presenta un valor precipitante de 1:32

El suero de conejo antisangre humana total no da reacción cruzada con isoantígenos del grupo ABO que pueden producir algunas bacterias.

Las técnicas de inmunoprecipitación en capilar y el gel, son sencillas y rápidas en su realización y dan muy buenos resultados para la identificación específica de sangre humana.

Las técnicas de inmunoprecipitación en capilar y en gel pueden ser un auxiliar muy importante para la identificación específica de sangre humana, en la identificación forense de esta.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Referencias bibliográficas

1. Ciril Rozman, P. Farreras Valente, A. V. Domarus. Medicina interna. 9º ed. Barcelona: Editorial Marin, 1978: 271.
2. López Gómez Leopoldo. Técnica médico-legal. Valencia España: Editorial Saber, 1958: 9-148.
3. Amantea Y Krzykowsky: Arch. Di Fisiol., 1920-1923. Zachia, 1924
4. Nicoletti: Arch. De Antrop. Crim, e Med. Leg., 1928.
5. Perrier y Janelli: Arch. De Fisiol., 1931.
6. Vles: Arch. Phys. Biol., 1922.
7. Anson, Barcroft, Mirski y Oismma: Proc. Roy. Soc., 1925
8. Dalla Volta: Bol. Soc. Biol. Sper., 1926. Arch. Ital. De Biol., 1926-1928.
9. Uhlenhuth: Dent. Med. Woch., 7 febrero 1901.
10. Wassermann y Schultze: Berliner Klin. Woch., 11 febrero 1901
11. Bastero Lerga: "Procedimiento biológico para el reconocimiento médico-legal del origen de las manchas de sangre". Conferencia. Zaragoza. 1902
12. Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, et al, Biología Molecular de la Célula, 2ª edición, ediciones Omega S.A., Barcelona España, 1994: 1066-1123.
13. Marroquín Segura Rubén, Flores Pimentel Maurilio. Manual de laboratorio de inmunología básica y clínica, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, Octavo semestre, México DF. 2002:23-25
14. Moreno González Rafael, Los indicios biológicos del delito, Instituto nacional de ciencias penales, México DF. 2000:37

15. Altamirano Bautista Adriana, Manual de manejo de animales de laboratorio, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México DF. 1994:65-97
16. Crowle AJ. Immunodifusión, 2nd ed. Academic Press, 1973.
17. Ouchterlony O, Nilsson L.A. Immunodifusión and immunoelectrophoresis. En: Weir DM (editor). Handbook of experimental immunology. Blackwell. 1986.
18. Gockman N, Burke MD. Electrophoretic techniques in today's clinical laboratory. Clin Lab. Med. 1986;6:40
19. Dunbar BS. Two dimensional electrophoresis and immunological techniques. Plenum Press New York 1987
20. Catty D. Antibodies. Vol. II. A practical approach. IRL Press. Oxford University Press. Oxford, New York, Tokyo. 1989
21. Golstein DE, little RR, Wiedmeyer H, England JD, McKenzie EM. Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. Clinical chemistry 1986; 32:864-870.