PUBLICACIONES
DE
CRONICA
MEDICA

ACERCA DE LA INVESTIGACION DE GRUPO EN LAS MANCHAS DE SALIVA

POR

J. LOPEZ IBOR

Valencia, 15 Enero 1933

ACERCA DE LA INVESTIGACION DE GRUPO EN LAS MANCHAS DE SALIVA

POR

J. LOPEZ IBOR

Catedrático de Medicina Legal

Probablemente la saliva es uno de los líquidos orgánicos menos estudiados desde el punto de vista de sus propiedades biológicas. Apenas si se encuentran algunos datos acerca de las mismas esparcidos por la literatura; es curioso que Uhlenhut y sus colaboradores pasasen por alto su estudio en la serie de investigaciones que emprendieron al descubrir la reacción de precipitación. Sólo en los últimos tiempos Seitz se ocupó del comportamiento de esta secreción con respecto a la anafilaxia. En cambio, la saliva, como vector de toxina en ciertos animales, ha sido objeto de incesantes trabajos, como los de Kraus, Pick y Silberstein, Faust, etcétera. Goodner dice que la mucina procedente de la glándula submaxilar del cerdo reacciona con especificidad de órgano en la prueba de las precipitinas, lo mismo que otras glucoproteínas, tales como el condromucoide y el tendomucoide del tendón de Aquiles del toro.

Cuando a comienzos de siglo Landsteiner realizó el experimento inicial de todos los estudios acerca de los grupos sanguíneos, se estaba lejos de sospechar la importancia biológica y práctica de este descubrimiento. Algunos autores, como J. Peset, lanzaron poco después la doctrina de que en los grupos sanguíneos no se trataba de cualidades exclusivas de la sangre, sino de características generales de los líquidos y de los elementos formes de los organismos.

No tardó la confirmación experimental de esta hipótesis, y así, por ejemplo, López Gómez demostró la existencia de los cuatro grupos en el esperma y detalló sus aplicaciones médicolegales. Independientemente de él demostró Shirai que el esperma humano es capaz de inhibir la isohemoaglutinación de un modo específico. Yahakami confirmó que lo mismo que el esperma se comportaban otros líquidos orgánicos, como la saliva y la secreción vaginal; demostró, además, que de tales propiedades inhibidoras están dotados no sólo los elementos celulares, sino la parte líquida liberada del sedimento mediante centrifugación. Hasta en el líquido amniótico han sido descritas recientemente las propiedades de grupo. Kritschewski y Schwarzmann han revelado la presencia del aglutinógeno correspondiente a los glóbulos rojos en el cerebro, bazo hígado y riñón.

La demostración de las sustancias específicas de grupo en la saliva, mediante la inhibición de la isohemoaglutinación, se debe a Lehrs especialmente, quien encontró una cierta constancia en perros observados durante varios meses, averiguando además que su concentración en dicha secreción es diez veces mayor que la que alcanza en la orina.

Schiff comprobó el mismo fenómeno mediante experiencias de inmunización. Para evitar pérdidas de conejos esterilizaba la saliva mediante ultrafiltración o por otros procedimientos; también logró obtener en experiencias análogas una hemolisis de carnero específica anti-A, siendo digno de observar que el título del suero era aproximadamente tan elevado como el obtenido en los ensayos de inmunización mediante hematíes; el suero empleado en el ensayo 18 de Schiff contenía además anticuerpos contra el factor M de Landsteiner y Levine, puesto que después de absorbido mediante una sangre que no contenía M todavía poseía aglutininas específicas para eritrocitos que albergaban dicho factor (1); los

(1) No existe en el suero normal de conejo.

anticuerpos de este animal se debilitaron rápidamente. Asimismo se ha demostrado la presencia del *fragmento carnero (Schafanteil)* de la sustancia A, recurriendo para ello a la inhibición de la aglutinina heterogenética y tomando como antígeno la sangre de carnero.

La saliva debe purificarse para todas estas experiencias; la operación se realiza dejándola reposar hasta la formación de un sedimento, que se lava. Después se acidifica ligeramente y se condensa con precaución a 40° ó 50°, pudiendo incluso hacerlo a 100°, precipitando así casi toda la mucina. El líquido separado de la mucina, mediante centrifugación, se diluye con agua acidificada y se condensa, precipitando nueva cantidad de mucina y algo de albúmina. Repetida varias veces esta operación obtiénese un líquido claro que no da precipitado alguno con el ácido sulfosalicílico. Existe otra técnica que permite una mayor rapidez, la cual estriba en agregar luego de la primera condensación doble cantidad de sulfato amónico a saturación, centrifugando el precipitado y separando mediante diálisis el líquido que sobrenada del sulfato amónico.

Los autores se han preocupado de cuál de los elementos de la saliva pudiera ser el activo, o al menos el portador de estas actividades. Schiff dice que no es probable que sea la albúmina, puesto que en un preparado de saliva condensado Brahn encontró 0'7 mg. de nitrógeno por centímetro cúbico y si todo este nitrógeno se quisiera referir a la albúmina se encontraría un total de 4'2 mg. de la misma. Haciendo los cálculos correspondientes halla que a un miligramo de dicha albúmina debieran corresponderle 16.000 unidades; viceversa, una unidad de sustancia activa correspondería a una diezmillonésima de gramo de albúmina, y por consiguiente resulta improbable que sea la albúmina la portadora de las propiedades específicas de grupo en la saliva. Verificando extracciones con alcohol absoluto los extractos son inactivos, pero no así el residuo; luego las citadas actividades no se hallan asentadas, o al menos no lo están exclusivamente en sustancias de natu-

raleza lipoidea. Evaporando 100 centímetros cúbicos de saliva y tratando con Fehling no aparecen sustancias reductoras; también fué negativa la reacción tras una disociación hidrolítica en caliente con solución al 6 por 100 de ácido sulfúrico. De suerte que las experiencias realizadas hasta hoy son insuficientes para decidir esta cuestión.

Son curiosas las propiedades de la saliva del caballo. Los órganos de éste, y entre ellos dicha secreción, contienen antígeno de Forssmann; la saliva obtenida mediante la inyección de arecolina posee un poder inhibitorio fuerte y específico en ensayos de hemolisis frente al suero heterogenético A. También es capaz de inhibir la aglutinación anti-A del inmunsuero de conejo, obtenido con sangre de carnero. La isoaglutinina anti-A es debilitada por ciertas cantidades de saliva de caballo. Puede por consiguiente aceptarse que en la saliva del caballo se encuentra, sino todo el A humano, al menos el *fragmento carnero*. Schiff, basándose en los hechos relatados, apunta la opinión de que la forma hidrosoluble de la sustancia A no actúa por sí como antígeno ni tiene el carácter de un hapteno, sino de un semihapteno *(Halbhapten)* adoptando la terminología de Sachs. Además, la presencia de propiedades antiisohemoaglutinantes de los humores está ligada a su existencia en las células. Si subsiste en aquéllos cuando éstas se separan, es por que hay cesión de aquellas propiedades, como en el agua del lavado de los glóbulos rojos, en la cual Schuz y Wozione encontraron un aumento del poder absorbente de aglutininas con la prolongación del tiempo de centrifugación.

Cuando en lugar de tratarse de experiencias de laboratorio se buscan las aplicaciones médicolegales a los problemas que corrientemente pueden ofrecerse, hay que variar las condiciones técnicas de la investigación para obtener resultados fehacientes. Excepto en la investigación de la paternidad y en algún que otro caso, el médicolegista tiene que realizar la determinación de grupo en las manchas de sangre u otro líquido orgánico que se encuentren

sobre los soportes más diversos. Müller ha publicado una técnica de enriquecimiento de la concentración de los extractos mediante el vacío, alcanzando un 70 por 100 de resultados aceptables en manchas de dieciocho meses; Serebrjaikow ha descrito un procedimiento análogo. Kan Iti Yosida recomienda un método sencillo para la investigación en diversos materiales (camisas, pañuelos, etcétera), el cual consiste en cortar varios segmentos de un centímetro cúbico aproximadamente del papel o tela manchado con saliva, orina, loquios, sudor, etc., y en colocar cada segmento repartido en dos portaobjetos; se añade una gota de suero anti-A sobre el uno y otra de anti-B sobre el otro, dejándolas en contacto cinco minutos, al cabo de los cuales se quita el segmento de tejido y se agrega una gota de una emulsión al 5 por 100 de eritrócitos del grupo A B. Según se produzca inhibición de la aglutinación o no, y en el primer caso, según sea en uno o en otro de los portaobjetos, deduciremos a qué grupo pertenece la mancha.

Cuboni ha hecho el estudio de la parte líquida de la saliva de 36 individuos, la cual era separada del resto mediante centrifugación y mezclada a los sueros I, II y III en proporciones del 1 : 1 al 1 : 10; añadía entonces una suspensión de glóbulos rojos al 2'5 por 100, leyendo los resultados a las 12 horas. Dice que la inhibición específica de la aglutinación no ocurre de una manera constante, resultados opuestos a los encontrados por Bussato y por nosotros. Haraguti también ha obtenido una absorción específica de las aglutinaciones en las manchas de saliva. Bussato ha utilizado la saliva *in toto,* y nosotros también, puesto que es así como ella impregna las telas o papeles que pueden ser objeto de investigación en la práctica médicolegal. Pone en contacto fragmentos de las manchas con sueros testigos, dejando los tubos tapados con parafina 12 horas a la temperatura de 20°. Hace luego una preparación en gota pendiente con glóbulos testigos A y B. Del examen de la saliva en 30 personas pertenecientes a los grupos II, III y IV resulta que absorben y fijan de un modo electivo las aglutininas del suero; la

saliva del grupo 0 α β carece de acción. Si la prueba de la absorción se hace con sueros de fuerte título, éstos podrán ser absorbidos sólo parcialmente, haciendo aparecer una prueba como negativa cuando no lo es. Este inconveniente se subsana concretamente empleando la técnica de Holzer para las manchas de sangre, tal y como la exponemos a continuación, puesto que así siempre sabemos el título del suero con que realizamos la experiencia, y la disminución que el mismo experimenta en virtud de la absorción mediante el extracto de la mancha de saliva.

Si un suero 0 con aglutininas α y β o una mezcla de un suero con aglutinina β y de otro con aglutinina α se pone en contacto con una sustancia que contenga un determinado tipo de aglutinógeno, resultará que en determinaciones posteriores la cantidad de aglutininas α y β del suero de que se partió habrá disminuído a tenor de la cantidad de aglutinógeno que contenía el extracto objeto de investigación. La causa fundamental de error, consistente en la variabilidad en la cuantía de los aglutininas α y β que existan en el suero 0, se esquivará mediante la valoración previa de los mismos.

Cuando tengamos que operar con una mancha seca habrá que devolverle a la misma el agua que perdió por desecación. Schiff dice que para saturar una determinada cantidad de aglutininas se necesitan 5/8 de su peso de sangre fresca, y como según Hammarstenn la sangre desecada se reduce a 1/5 de su peso, resultará que para saturar una cantidad seca bastará 1/8 del peso del suero, es decir que para 0'1 cm. de suero aproximadamente bastan 0'01 de sangre fresca. Prácticamente hemos observado que con la saliva se obtienen los mejores resultados, aceptando las mismas cifras aproximadas que para la sangre.

Con objeto de realizar las experiencias partiendo de condiciones lo más próximas posibles a aquellas en que pueden plantearse los problemas médicolegales referentes a las manchas de esta secreción, hemos recurrido a las que se encuentran en las puntas de los cigarros ya fumados. El grupo hallado en la mancha se contro-

laba con el hallado en la sangre del sujeto, resultando concordantes en los veinte casos a que extendimos nuestros ensayos.

Estas se realizan de la siguiente manera: En unos tubitos se colocan 10 mg. del papel del cigarro fumado y 0'1 cm. del suero de prueba. Se dejan veinticuatro horas en la nevera; como suero de comprobación hay que usar uno que tenga α y β en cantidad igual o casi igual, para lo cual conviene elegirlo entre los de una serie perteneciente a ese grupo. En una bandejilla de porcelana, que tiene ocho concavidades del tamaño de una moneda de cinco céntimos aproximadamente, se hacen diluciones del suero testigo sólo, siguiendo las potencias de 2 en esta forma: en la primera concavidad se colocan cuatro gotas del suero testigo y cuatro de suero fisiológico; de ésta se toma la mitad (cuatro gotas) y se mezcla con otras cuatro de suero fisiológico, y así sucesivamente obtendremos las diluciones a continuación consignadas correspondientes a 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256. En cada una de las concavidades de la segunda bandejilla se coloca la mitad del líquido contenido en cada una de las ocho de la primera, teniendo así una dispuesta para el grupo A y otra para el B; se les agrega una gota gruesa de una solución al 5 por 100 de los hematíes correspondientes y se hacen dos lecturas independientes a los diez y a los treinta minutos; si las bandejillas en lugar de ser de porcelana son de vidrio será posible realizar en cualquier caso dudoso el correspondiente control microscópico. Para cada investigación o serie de ellas debe emplearse la misma dilución de hematíes porque la sensibilidad de cada una de ellas es variable.

De este modo se averigua hasta qué dilución son aglutinados los hematíes por el suero testigo sólo, y repitiendo la operación con el suero mezclado con el extracto de la mancha, hallaremos en cuánto se han modificado los títulos de aglutinación con respecto a las cifras conseguidas con el testigo sólo.

La experiencia se anota en la siguiente forma que damos a a título de ejemplo, tomado de una de las realizadas:

Experiencia definitiva

A Diluciones	10'	30'	B Diluciones	10'	30'
2	+	+	2	+	+
4	+	+	4	+	+
8	+	+	8	±	±
16	+	+	16	−	−
32	±	+	32	−	−
64	−	+	64	−	−
128	−	±	128	−	−
256	−	−	256	−	−

Experiencia de control

A Diluciones	10'	30'	B Diluciones	10'	30'
2	+	+	2	+	+
4	+	+	4	+	+
6	+	+	6	+	+
8	+	+	8	+	+
16	+	+	16	+	+
32	+	+	32	±	+
64	±	+	64	−	+
128	±	±	128	−	±
256	−	−	256	−	−

Con alguna frecuencia ocurre que la presencia de un aglutinógeno A hace descender el título previamente hallado de aglutinina β. Thomsen y Worsaae se han ocupado de la influencia recíproca de las sustancias de grupo en la sangre y, según ellos, esto explica que para la disminución de la mitad de un contenido en aglutininas en un suero rico se necesitan más aglutininas que en un suero pobre en ellas; por ello deben preferirse en general ricos, y así lo estimamos nosotros, a pesar de la afirmación Bussato. Los autores antes citados hallan que la dependencia de ambas aglutininas en el suero 0 es aparente, puesto que la aglutinación heteróloga se halla unida sólo de un modo secundario al complejo hematíes + anticuerpos homólogos. De todos modos, prácticamente no deben tomarse en cuenta dos grados en el descenso del título de una aglutinación cuando la otra ha descendido mucho.

Los resultados obtenidos en los veinte casos han sido concordantes con respecto a los grupos hallados en las manchas de saliva y en la sangre. De los veinte, cuatro pertenecían al grupo I, ocho al II, seis al III y dos al IV.

Pocas palabras hemos de agregar acerca del interés que en nuestra disciplina pueden tener investigaciones como las citadas; basta recordar cuántas veces el estudio de la variedad de cigarrillos encontrada en el lugar del hecho comparada con la habitual de determinados sujetos ha servido para encaminar la encuesta judicial.

Los indicios adquirirán una trascendencia mayor cuando la concordancia de la clase se una a la de los grupos de la sangre y de la saliva del sujeto. Naturalmente que el planteamiento del problema habrá de hacerse en los mismos términos en que suele formularse para las manchas de sangre.

BIBLIOGRAFIA

(Un índice bibliográfico casi completo sobre los grupos sanguíneos se halla en *Handbuch der Blutgruppen*. München 1931. Ed. Lehmans).

Bussato Santo.—*Arch. di Antr. Crim. Pschiatria e Med. Leg.*, vol. LII (serie IV), fasc. 2-3, 1932.

Cuboni.—*Bolletino dell'Inst. Sier, Milanese,* 1928, fasc. 1.

Faust.—*Tierische Gifte. Heffters Handb. ex. Pharmakol,* pág. 2, 1929.

Goodner.—*Journ. of. inf. dis.,* XXXVII, pág. 285, 1925.

Haraguti.- *Bulteno de la jurmedicina Instituto de Nagasaki,* vol. I y II, 1929.

Higuchi.—*Z. Inmunitätsforschung,* LX, 246, 1928.

Holzer, F.—*Dtsch. Z. f. gericht. Med.,* XVI, 1931.

Kraus en *Kolle-Kraus-Uhlenhuth Handb.*, tomo III, 1928.

Landsteiner.—*Zentralbl. f. Bakteriol,* XXVII, 357. 1900.—*Handb. der exp. Therapie.* Lehmans Ed. (hay trad. esp.), 1931.

Landsteiner y Levine.—*Journ of. Innumolog,* XVIII, 87, 1930.

Lehrs.—*Jnaug-Diss,* Berlín 1929.—*Z. f. Inmunitätsforschung,* LXVI, pág. 175, 1930.

López Gómez.—*Tesis Doctoral,* Madrid 1927.

Müller y Brunner.—*Diss. Chirurg.,* Zürich 1927.

Peset, J. y T.—*Policlínica,* 1915, núm. 34.

Popoff.—*Dtsch. Z. gericht. Med.,* IX, 1927.

Seitz.—*Z. f. Inmunitätsforschung,* XVIII, 1913.

Serebrjanoff y Leitschick.—*Dtsch. Z. f. gericht. Med.,* XII, 1929.

Schiff.—*Über die Gruppenspezifischen Substanzen des menschlischen Körpers,* Fischer Ed., Jena 1931.—*Dtsch. Z. gericht. Med.,* IX 1927.

Thomsen y Worsaae.—*Z. Rassenphysiol.,* II (cuad. 1), 1929.

Yiosida Kan Iti.—*Ann. Mèd. lég.,* VIII, 1928.—*Ztschf. f. d. ges. exp. Med.,* LXIII, 1928.

Imprenta La Semana Gráfica
: ARTES GRAFICAS EN GENERAL :
Conde Salvatierra de Alava, 20 VALENCIA