

R. 4029



T.D.
CH/1

JOSE RAFAEL CHACON PENA

**Profesor Ayudante de Clases Prácticas
Primera Cátedra de Anatomía**

ELECTROFORESIS DE LAS PROTEINAS SOLUBLES DEL CEREBRO DE CONEJO.

**Trabajo realizado para optar al grado de
Doctor en Medicina y Cirugía por la Facul-
tad de Medicina de Sevilla.**



SEVILLA

MCMLXXI



D. JUAN JIMENEZ-CASTELLANOS Y CALVO-SUBIZO

Catedrático Numerario de Anatomía y Técnica Anatómica y Director de la Escuela Profesional de Neurología y Neurocirugía en la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICO: Que D. José Rafael Chacón Peña, Profesor Ayudante de Clases Prácticas de Anatomía, ha venido desarrollando a partir de Enero de 1.969 una labor investigadora con toda esmero y eficacia cuyos frutos se han concretado en el presente trabajo que presenta bajo el título de: "Electroforesis de las proteínas cerebrales del cerebro de conejo", para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Sevilla.

Y para que surta efecto oportuno legal, empuído el presente certificado en Sevilla a 1 de Mayo de 1.972

Juan Jimenez Castellanos



ELECTROFORESIS DE LAS PROTEINAS SOLUBLES DEL CEREBRO DE CONEJO

REVISADO POR EL COMITÉ DE REDACCIÓN DE LA REVISTA DE QUÍMICA Y FÍSICA EN EL INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

J U S T I F I C A C I O N

Notre esprit est, en effet, tellement borné, que nous ne pouvons connaître ni le commencement ni la fin des choses ; mais nous pouvons saisir le milieu c'est-à-dire ce qui nous entoure immédiatement.

CLAUDE BERNARD.



En el principio de toda obra humana, surge la motivación, notar que pasa en marcha la acción y la mantiene durante su ejecución, para que nuestra voluntad no desista. Pero, en que además de ser motivados nuestros actos deben presentar una justificación, una razón de ser, es decir un fin, que es por el que nos movemos cuando realizamos nuestras actividades.

Ya en los últimos años de nuestra Licenciatura, y una vez decidido nuestro propósito, de vincularnos universitariamente, pensábamos en el camino a recorrer, en los pasos que tendríamos que dar, primero completar nuestros estudios médicos, difícil y pesada labor, que durante años debería acompañar nuestra formación. Realizar una Licenciatura, momento de apertura vital y profesional, después. Y finalmente, tras un largo pe-

fiada de incubación, de maduración, y guiado por
nuestros créditos, realizar nuestro Doctorado, ésto
no paso antes de adentrarnos de lleno en la vi-
da universitaria.

La Tesis Doctoral, -cuerpo- debe ser,
primero, temblorosa e inestable paso y trabajo,
quizás no del todo correcto y acabado, como co-
rrespondiente a todo ensayo, -pues ensayo es el cam-
po de la Ciencia es-, que a pesar de ser el pri-
mero de nuestra vida, (por lo que nos llena de
gozo), posee una significación especial, en vig-
tad de su importancia, importancia, que viene
avalada por todas las otras que nos precedieron
durante años, y por la seriedad científica y
dedicación de los que las confeccionaron. Nos
atenemos pues al pensar, en la labor que teng
nos que intentar igualar, como así mismo por el
valor del Título de Doctor al que optamos con
este nuestro trabajo.

Pero es que la Tesis Doctoral, como cual-
quier otra actividad, viene avalada en los acci-
ones humanas, y por tanto sujeta a la infini-
dad de avatares espirituales y materiales del de-
venir existencial. Debe pues definirse por un,

"por qué", por un "para qué", y por un "como", requisitos que una vez satisfechos, tranquilizarán nuestro espíritu.

El, "por qué", ha sido definido anteriormente, cuando efectuamos nuestra idea de la tesis y buscábamos una justificación.

El, "para qué", imperturbablemente, para los que con un sentido finalista, buscamos sin cesar el fin de nuestros actos, sería, ni más ni menos, que para añadir nuestro pequeño grano de arena en el libro de la Ciencia, y al menos una modesta "obra", en la gigantesca Enciclopedia de la Existencia humana, avivar el fuego sagrado de la vida, y contribuir mínimamente al desarrollo de la civilización y del mundo.

El, "como", es decir, el preguntarse, pues no podemos olvidar, que la ciencia y nuestros movimientos dentro de ella, vienen limitados por nuestros entornos histórico-social. La Cultura de nuestra época, nos ofrece una determinada deformación de la realidad, y la sociedad, nos rodea de un círculo económico, que nos delimita nuestro campo de actividades. Todo esto, al margen

naturalmente, de la imposibilidad, de satisfacer ansias infinitas, en esta existencia humana, por nuestra materialidad. Debemos pues circunscribirnos a lo inmediato, a lo proximo, es decir, " a aquello que nos rodea inmediatamente ", como citábamos de Claudio Bernard al principio.

Dentro ya de la decisión de la realización de la Tesis, nos encontrábamos, con diversas alternativas que nos tentaban. Realización de una tesis clínica, o puramente experimental, -igualmente válidas ambas-, nos inclinamos por la segunda, por una preferencia meramente subjetiva. Mas atrde la elección de una temática, nos preocupaba y como nuestras actividades profesionales se desarrollan dentro de la Escuela Profesional de Neurologia y Neurocirugia de Sevilla, era lógico, que abordáramos un tema Neurológico. Algo dudamos sobre cual sería éste, y hemos de confesar que incluso tanteamos varios, antes de llegar al definitivo. Elementos decisivos de nuestra elección fueron, por una parte la obserbación de nuestro laboratorio y de su instrumental, dentro del anclaje social, del que hablabamos antes. Por otra, la consideración de la riqueza de aportaciones de las tecnicas electroforéticas, como así mismo de su

relativo facil manejo. Finalmente, otros trabajos realizados en el mismo laboratorio que nosotros, por CASTELLANOS MATEO, en 1.967, de fructíferos resultados, y amplios ecos, terminaron por inclinarnos por utilizar la Electroforesis.

Ahora bien, al elegir una Tesis experimental, debíamos hacer la elección de los animales para realizarla, naturalmente tendríamos, que reducirnos a un mamífero, por su semejanza al hombre en su organización neural, y descartados otros, por su difícil manejo, (demasiado grandes), y por lo complicado de su obtención, (demasiado caros), nos decidimos por los conejos. De la conjunción de estos tres requisitos, los animales, la técnica, y el tema, surgió el Título de nuestra tesis: ELECTROFORESIS DE LAS PROTEINAS SOLUBLES DEL CEREBRO DEL CONEJO ".

Finalmente, no podemos terminar esta introducción, sin expresar nuestro agradecimiento a nuestro maestro, el Profesor JIMENEZ CASTELLANOS, guía de nuestro aprendizaje neurológico, director de este nuestro primer trabajo científico, consejero y ejemplo en todo momento, al que debemos toda nuestra formación profesional.

Igualmente, sería una injusticia por nuestra parte, no mencionar, la ayuda prestada por el Doctor Castellanos Mateos, (codirector de nuestra Tesis), -tan experimentado en las técnicas electroforéticas -, al Doctor Navas Rivera, y al alumno Don Antonio Figueredo, todos compañeros de trabajo, como así mismo a la Señorita Joaquina Gómez, auxiliar de nuestro laboratorio, y en fin a todos aquellos, amigos y compañeros, que con su estímulo y apoyo contribuyeron a hacer una realidad de este trabajo.

PLAN DE TRABAJO

Despues de nuestra breve introducción vamos a establecer una sistemática de trabajo, que es la que vamos a seguir puntualmente en nuestras experiencias.

Repartiremos en tres partes el trabajo, y trazaremos distintos capítulos en cada una de ellas.

PRIMERA PARTE

Capítulo 1.- Una introducción somera de nuestras experiencias, sus líneas generales, y lo que se pretende con ellas. Algunos datos sobre las proteínas cerebrales.

Capítulo 2.- Un concepto y evolución histórica de los procederes electroforéticos. Sus aplicaciones al campo de la investigación Neurológica.

Capítulo 3 .- Descripción de nuestros materiales fundamentales. La Elección de los animales de experimentación y sus requisitos. El resto de la instrumentación de nuestro laboratorio.

Capítulo 4.- Los métodos, es decir las manipulaciones realizadas hasta la consecución de los resultados finales. La forma de obtención de las muestras cerebrales, su manejo ulterior. Los pasos por los que se siguió. Las distintas formas de electroforesis, (libre, en agar, papel, acetato de celulosa, etc), y la elección de una de ellas, en virtud de su fácil manejabilidad. Coloración y lectura de las curvas.

SEGUNDA PARTE

Capítulo 5.- Resultados, es decir los hallazgos obtenidos, su medición técnica.

Capítulo 6.- Estudio estadístico de los resultados, determinación de valores medios, desviaciones standard, y errores standard. Pretendemos dejar sentados unos patrones electroforéticos de las proteínas cerebrales de conejos.

Capítulo 7.- Comentarios sobre los resultados. Correlaciones con otras técnicas, y con los resultados de otros autores. Su utilidad, por venir y asociate para la investigación humanas.

TERCERA PARTE

Capítulo 8.- Conclusiones extraídas de todo el anterior estudio.

Capítulo 9.- Resumen del trabajo.

Capítulo 10.- Bibliografía utilizada, siguiendo un orden internacionalmente adoptado para su expresión.

Capítulo 11.- Índice.

PRIMERA PARTE
=====

CAPITULO PRIMERO

INTRODUCCION

Una vez planteada la justificación de nuestro trabajo, y concebido como TESIS DOCTORAL con sus disgresiones, como así mismo, hecho el indispensable plan de trabajo, es menester, que dediquemos algun tiempo, a plantear de una manera concisa, en que va a consistir este estudio, dando algunas informaciones preliminares sobre él.

Surge nuestro trabajo, de reflexiones personales, de sugerencias de nuestro medio ambiente profesional, y de las correspondientes lecturas y estudios.

Las consideraciones del relativo poco estudio que se ha dedicado a las proteínas cerebrales, comparados con sus parientes bioquímicos los lipidos y glicidos, en el curso del estado normal, como en afecciones neurológicas, nos estimuló. Ambos glicidos y lipidos, mediante tecnicas de fina

histoquímica son ampliamente detectados en el Sistema nervioso, (técnicas de P.A.S., y otras), estando por el contrario el estudio de las proteínas cerebrales con respecto a ellos muy atrasado, debido a sus dificultades de extracción. Es necesario que llegue la electroforesis, para que se realicen los primeros ensayos para su estudio.

Todo esto y nuestra afición a los temas Neurológicos, nos hicieron concebir la idea del estudio de las proteínas cerebrales, mediante la aplicación de las técnicas electroforéticas. Por otra parte, el desafío lanzado por la naturaleza, nos animaba, pues el saber, que aproximadamente el 40% de la sustancia seca del cerebro, está formada por proteínas, cuya composición se nos escapa, era acicate suficiente, como para permitirnos el iniciar unos trabajos sobre ellas.

La novedad del tema, -basta echar una rápida ojeada a la bibliografía mundial, para observar los relativamente pocos trabajos publicados sobre la materia-, era un nuevo motivo de estímulo para iniciar la tarea.

Preferencias subjetivas, y requisitos

experimentales citados anteriormente, nos indujeron a escoger el cerebro de conejos para el estudio de sus proteínas. La idea, por otra parte, no era difícil de realizar, pues se trataba, mediante manipulaciones manuales, obtener trozos de los distintos lóbulos del cerebro, (frontal, temporal, parietal, occipital), cerebelo y troncoencéfalo, de conejo, que tras maniobras sistematizadas, nos permitieran extraer sus proteínas solubles, a las que aplicado el método electroforético nos dieran las distintas bandas del espectro.

Los resultados obtenidos, nos permitirían la fabricación de unos patrones electroforéticos de las distintas regiones del sistema nervioso central del animal manejado, extrayendo sus consecuencias y pudiendo servir de base para trabajos futuros.

Este es en esencia el planteamiento del trabajo que será desarrollado en capítulos posteriores.

CAPITULO SEGUNDO

CONCEPTO Y EVOLUCION HISTÓRICA

Es ya sabido, que la palabra "electroforesis" significa transporte por la electricidad. Es sinónima de catoforesis, y ambas explican la emigración de partículas coloidales o en suspensión dentro de un campo eléctrico.

Nos es imposible, ni es momento ahora, de abordar los complejos principios fisico-químicos en que está basada la Electroforesis, siendo por otra parte su campo de aplicación tan grande, que es imposible aun hoy en día el precisarlo. Bástenos saber, y reflexionar sobre sus aplicaciones, como la moderna inmunoelectroforesis, que tantos viejos conceptos ha venido a derribar. Y es que la Medicina, está hoy ampliamente asentada en bases bioquímicas, y marcha aceleradamente a profundizar en el terreno de la Física, haciendo realidad los sueños científicos de otros tiempos.

Los fundamentos esenciales que no podemos dejar de describir, de por qué se desplazan las

proteínas en la electroforesis son;

- 1ª.- Se desplazan del polo negativo al positivo debido a su caracter anfótero, así pues utilizando un tampón alcalino se comportan como ácidos.
- 2ª.- Emigran con una velocidad inversamente proporcional al peso molecular de la partícula.
- 3ª.- Innumerables factores condicionan la movilidad protéica en el campo eléctrico, resistencia del papel, evaporación, pH, tampón, etc.

Citaremos solo de pasada, los precedentes de la Electroforesis, que en 1.807 se deben al físico ruso REUSS, que trabajaba con coloides minerales, y mas tarde a HARDY, que en 1.899 utiliza la palabra cataforesis, y a MICHAELIS, que usa el de Electroforesis.

La verdadera historia de la Electroforesis comienza en 1.937 con el sueco TISELIUS, ideando el primitivo aparato de electroforesis, que se llamó "libre", por realizarse en las paredes de un tubo, trabajo que le valió el Premio Nobel

en 1.948. Es en este mismo año cuando otros investigadores, HAUGAAR, KROWER, WIELAND, FISCHER, y DURRUM, crean la Electroforesis en papel, método moderno que simplificaba y sustituía al anterior.

Pronto esta técnica fué aplicada a las investigaciones Neurologicas, estudiando entre los distintos líquidos biológicos en 1.938 HESSELCICK, algunas muestras de líquido cefalorraquídeo. Definitivamente en 1.942, KABAT, LANDW y MOORE, describen el perfil electroforético de las proteínas requideas, identificandose mas tarde en 1.944 las distintas fracciones por SCHEID Y SCHEID. Quedaban asentados así los primeros estudios científicos sobre proteínas de un líquido del sistema nervioso, que mas tarde habria de ser prolijamente estudiado por LATERRRE, en 1.965 y entre nosotros por CASTELLANOS MATEOS, en 1.967.

Paralelamente a esto, y por diversos autores, habian comenzado las investigaciones para el reconocimiento de las propias proteínas cerebrales. Así TAYLOR y colaboradores, por el método de " salting out " , separan

nueve fracciones diferentes en las proteínas cerebrales. En el cerebro de rata, son separadas siete fracciones por el sulfato de amonio en un tampón de glicina de pH 9'5 por DINGMAN y colaboradores en 1.959.

El primitivo método de TISELIUS, también sirvió para el estudio de las proteínas cerebrales, pues KIYOTA y colaboradores, en 1.959 pudieron demostrar diferencias entre las proteínas del cortex, del tálamo, y las de la sustancia blanca. En el cerebro de mamíferos, TONINI y colaboradores en 1.957, habían encontrado cinco fracciones diferentes. En el cerdo KEUP, en 1.955, encuentra seis fracciones diferentes.

Utilizando por el contrario la electroforesis en papel, DEMLING y colaboradores, (1.954), -los pioneros de esta técnica aplicada a las proteínas de órganos-, y en el cerebro de gato, encuentran seis fracciones diferentes. Por el contrario, CARAVAGLIOS y colaboradores, (1.956), describen siete fracciones, al igual que ROBERTSON, (1.957), siendo este último, el que señala la importantísima aportación, de las diferencias tipográficas en la distribución de las proteínas cerebrales. En el cerebro de conejo, INESI y

COLONGO, (1.958), encuentran de ocho a diez fracciones, que identifican como dos prealbuminas, una albúmina, tres alfa, dos betas, y dos gamma globulinas, encontrando que la cantidad de albúmina del cerebelo, es mayor que las de otras partes del sistema nervioso, sin modificarse la gamma globulina. ALLEGRENZA y colaboradores, en 1.960 estudian líquidos y glucidos unidos a las proteínas y en la rata demuestran la existencia de varias prealbuminas. Finalmente GUHA y colaboradores, (1.960) utilizando un tampón boratado demuestran la existencia de seis fracciones proteínicas diferentes en el cerebro de la rata.

Numerosos cerebros humanos fueron igualmente estudiados tanto en estado normal como patológico, por diversos autores, (Van Sande 1.962).

Dignas de mención son las hipótesis de BOOIJ (1.957), acerca del origen de las proteínas del líquido cefalorraquídeo. Analiza la cantidad de proteínas totales de sustancia gris y blanca, encontrando las diferentes y deduciendo que la composición química del Sistema Nervioso Central, varía según sus funciones biológicas. Sobre papel encuentra de siete a ocho fracciones. Halla la prealbúmina en algunas regiones, deduciendo que es forma

da por el parenquima nervioso y para obviar las dificultades de identificación de las diversas fracciones, compara los espectros electroforéticos del suero, del líquido cefalorraquídeo, y de los extractos cerebrales.

Posteriormente la electroforesis en agar y sobre almidón fué aplicada igualmente a las proteínas cerebrales. Sobre gel de gelosa, ALLEGRENZA, (1.961), en el ratón, en colaboración con MAROBIO identifican siete fracciones, y CHATAKNON, y CHATAGNON, (1.960), utilizando la inmunoelectroforesis insiste sobre la analogía de las proteínas séricas y cerebrales.

Los modernos métodos de electroforesis en discos de poliacril-amida, son igualmente empleados a las proteínas cerebrales, por GUY MONSEAU, y CUMINGS en 1.965, encontrando estos dos autores en cadáveres humanos hasta quince bandas.

No nos detendremos a citar los trabajos realizados en casos patológicos, por no estar en relación con el que aquí desarrollamos.

Al final de esta revisión de la Bibliografía, podemos concluir, que la electroforesis en

sus distintos métodos, aplicada al estudio de las proteínas cerebrales es una metódica relativamente joven aún, que sus resultados en manos de unos u otros autores son extramadamente variables, y que posiblemente se deban a la dificultad de obtención de los extractos cerebrales. Se discute la importancia de la fuerza iónica del solvente por TENINI, (1.957), mientras que ROBUGHI, (1.957), utiliza el agua, y otros autores utilizan para extraer las proteínas el mismo tampón empleado para la migración electroforética. Finalmente LEBARON y FOLCH, en 1.959, habiendo estudiado las distintas circunstancias de la extracción de las proteínas concluyen que se realiza de una forma óptima utilizando un tampón de fuerza iónica tres y un pH comprendido entre 6 y 9.

Todas estas dificultades, lo inacabado de la técnica, y lo poco estandarizado de los resultados es lo que nos anima a efectuar nuestra contribución para intentar dilucidar aún mas el problema.

CAPITULO TERCERO

ARTICULO 1.

Vamos a describir brevemente, cuales fueren los elementos con que contábamos, a la hora de la realización de nuestro trabajo.

Parte importante de nuestra experiencia, fueron los animales, cuya elección, ya justificábamos antes en virtud de las dos previas facil manejabilidad y poco costo.

Elejimos pues, diez ejemplares adultos, sin discriminación de sexo, de peso y talla normales de la Clase Mamíferos, Infraclase Mammalia, Orden Lagomorpha, Familia Leporidae, Género Oryzotylagus, Especie Oryzotylagus Cuniculus - Conejos-, (Tracy S.), mas dos adicionales para el ulterior estudio estadístico poder apreciar los resultados máximos y mínimos obtenidos.

Para los desplazamientos electroforéticos hemos utilizado un aparato CHEMEXTON, con capacidad para 6 ó 8 tiras a la vez, dependiendo de la anchura de ellas, del tipo GRASSMAN Y HANBIG

es decir horizontal, (figura 1).

Para la separación de las fracciones proteicas, hemos elegido por las razones que citaremos posteriormente, tiras de acetato de celulosa marca CILLOCEL, de dimensiones 2"5 por 17 cm, preparadas en sobre de 25 unidades. Estas tiras deben ser conservadas en una solución de acetato al 50%, y sobre ellas una vez saturadas en la solución buffer, se va a colocar en forma de una fina raya la muestra conteniendo las proteínas.

Para proporcionar corriente adecuada, deidamente estabilizada y directa, para la electroforesis utilizamos un aparato de conexión tipo ELPHOR, (figura 1).

Para la medida de la densidad óptica de las bandas proteicas, utilizaremos un DENSITOMETRO ELPHOR, (figura 2).

Finalmente un PLANIMETRO OTT, (figura 3), para la medida de la superficie de las curvas una vez llevadas al papel.

Citaremos solo de pasada el resto del instrumental utilizado, por ser de una importancia

secundaria, tales como, cámara frigorífica, estufa
gradillas, pipetas, centrífuga, y tubos adecuados
para ellas, suero fisiológico, cubetas, material
neuroquirúrgico, mortero y masa de vidrio, etor
sulfúrico, etc. Todos ellos nos utilizaron en el
transcurso de nuestros métodos.

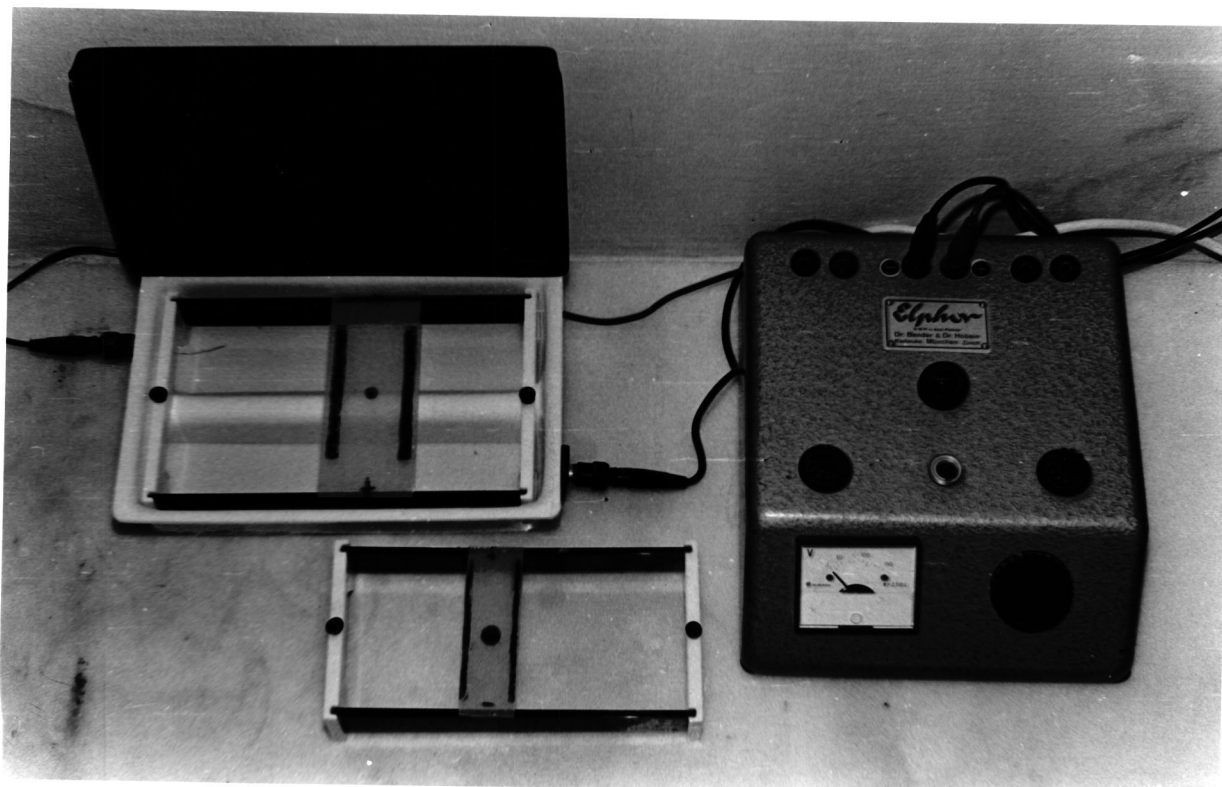


Figura 1

Cámara de Electroforesis tipo CHAMBERON y
Estabilizador de corriente ALPHOR.



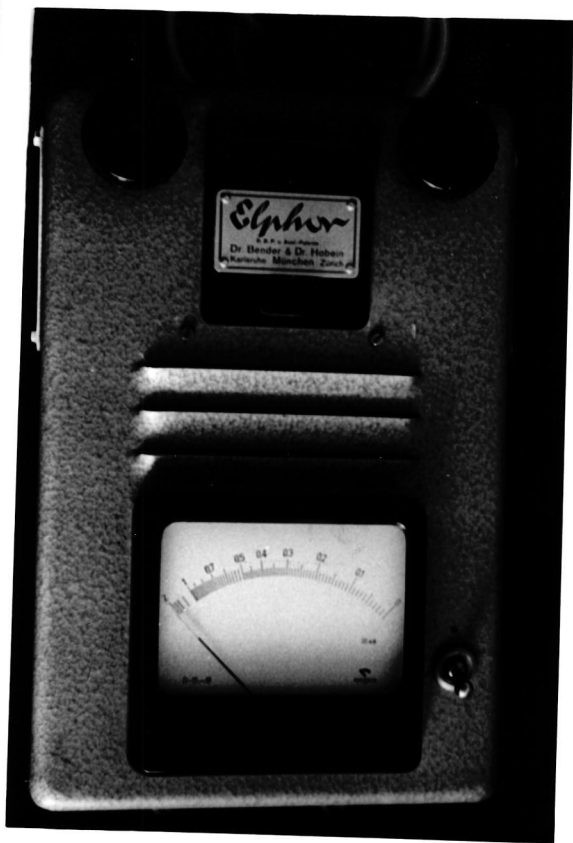


Figura 2

Densitometro ELPHOR



Figura 3

PLANIMETRO ORT





CAPITULO CUARTO

METODOS.

Como se desprende de todo lo que hasta aquí hemos venido exponiendo ,para la realización de este trabajo,se requeriría previamente determinadas previsiones, y así mismo el seguir unos pasos muy recortados,

Al hacerse nuestro trabajo, sobre animales , deberíamos obtenerlos, como así mismo realizar determinadas manipulaciones con ellos,para la obtención de la muestra cerebral.

Una vez en posesión de ella, realizaríamos la serie de maniobras en que consiste nuestro método electroforético,- que describiremos con detalle-,hasta la obtención de las curvas típicas de los desplazamientos de las distintas proteínas. Así pues este capítulo ,va a constar a su vez de diversos apartados:

- A) Obtención de los animales y su conservación.
- B) Expresión de la muestra cerebral y sus manipulaciones hasta prepararla para la electroforesis.

- C) Realización de la electroforesis en gel
tato de celulosa ,para conseguir las fracciones,
- D) Colocación de las tiras para la visualización de dichas fracciones proteicas.
- E) Lectura del proteinograma de las proteínas solubles cerebrales y determinación de los porcentajes relativos de las fracciones.

A) Obtención de los animales y su conservación

La obtención de los animales, que no presenté, serice inconvenientes, se hizo por el personal auxiliar de nuestros Servicios, y se procuró, que todos fueran de una misma procedencia, para conseguir una cierta uniformidad en su raza.

Nuestros 12 ejemplares de conejos durante el tiempo total de la experiencia fueron alojados en jaulas, anejas al quirófano experimental de nuestro Servicio de Neurología, alimentados (con piensos artificiales), y cuidados convenientemente por el personal auxiliar.

Durante todo este período cronológico, no tuvimos ninguna baja en nuestros animales, ni registros en ellos enfermedades epidémicas ninguna, ni enfermedad grosseramente ostensible, todo puso nos inclinaba a pensar en su perfecta salud y en su adecuación para nuestros trabajos. Su vida transcurrió pues en cautiverio con normalidad.

B) Extracción de la muestra cerebral.-

Para la extracción de la muestra cerebral, nos enfrentamos con dos géneros de dificultades :

- 1.- Obtención de los cerebros de los ojos de una manera poco traumática, que no alterara su composición.
- 2.- Realizar las manipulaciones de una forma rápida que evitara las alteraciones postmortem de las proteínas.

Todo esto se consiguió correctamente como se verá a continuación.

La anestesia de nuestros animales, condición indispensable para su fácil manejo, se realizó mediante su extracción de las jaulas, y depositándolos en una caja de cartón donde previamente se había introducido un trozo de algodón impregnado en Éter Sulfúrico. El tiempo de la anestesia fue en los dos nuestros casos de 1 a 5 minutos.

Debido a la toxicidad del Éter Sulfúrico se nos permitieron que se prolongara más su actuación sobre los animales para impedir, tanto su

muerte como serias alteraciones en sus tejidos.

A continuación procedimos, de una forma rápida a realizar una incisión transversal en la región cervical lateral, y al abertaje del paquete vascular nervioso cervical, seccionando la carótida y yugular, con lo que producimos la muerte por hemorragia aguda en todos nuestros casos. Tuvo mos la precaución de invertirlos, con objeto de regular una perfecta desplección sanguínea, y de esta manera evitar acumulos de sangre caliente en el cerebro durante la extracción y una tarde enteropostócora a la hora de realizar los macerados.

Inmediatamente despues de la muerte, procedimos a la apertura de la cavidad craneal, tras la incisión y separación de los planos superficiales, auxiliados por el instrumental neuroquirúrgico.

La extracción de los cerebros, fue efectuada en todos los casos en un periodo de tiempo no superior a los cinco a diez minutos posteriores a la muerte, (segun el requisito segundo de este apartado), con lo que tuvimos la certeza absoluta de la integridad de las proteínas de los ce-

refrón, para evitamos su alteración postmortem. Ya es sabido que el sistema nervioso, posee una cataplasma muy activa, que solo puede catabolizar las proteínas in vitro no in vivo, dado que su pH, es de 7, dándose además la circunstancia que solo actúa sobre proteínas desnaturalizadas, como puede ocurrir después de la muerte, debido al pH descendido ya, por un exceso de ácido láctico, (SCHITT, 1.957; TALLAN, 1.951).

En los casos publicados, no puede conseguirse esta certeza dado que la extracción tuvo lugar de cadáveres humanos en un período mayor de tiempo que en nuestros casos, dado los requisitos médico-legales pertinentes en estos casos para la celebración de la necropsia, (VAN BASTIE, 1.962; GUY MONSIEAU, 1.965).

Evitamos la presencia durante la operación de extracción de librar al cerebro de las cubiertas meníngeas que nos hubieran falsado los resultados.

El cerebro fue depositado en un frasco de vidrio con suero fisiológico y transportado rápidamente al laboratorio para su manipulación. Fue

lavado repetidas veces con suero fisiológico, para librarlo al máximo de colecciones sanguíneas, dado que ya es sabido, que las proteínas extrañas que pueden aparecer en el esferograma cerebral, pueden deberse a esta sangre, por lo que conviene eliminarla, para que los resultados finales no resulten falseados, (CHALAZIUKI C. y COLACIACON P. 1.960).

A continuación, fue depositado, en un pedo de filtro, para proceder a su fragmentación, que fue llevada a cabo con una simple cuchilla de afeitar. Algunos de los autores que se ocupan de estos temas, eligen para su trabajo o bien muestras de la sustancia blanca, o gris de forma aislada, (VAN BANNING 1.962), o bien solo sustancia gris, (GAY LONDEAU, 1.965). Nosotros, dado el mínimo espesor de la corteza cerebral del conejo, y que la premisa de nuestra tesis, fue la de registrar los patrones electroforéticos a partir de los distintos lóbulos del cerebro, (sin discriminación de sustancia gris o blanca), es por lo que procedimos a formar bloques que englobaron ambas sustancias en la seguridad además de obtener suficientes proteínas para el ulterior desplazamiento electroforético. Por otra parte

los trabajos de algunos autores, (GUY MONTAUDO; UMINO, 1.965), establecen, que tanto sustancia blanca, como gris poseen el mismo número de bandas proteicas en el desplazamiento electroforético, en trabajos realizados en cerebros humanos y sobre gel de agar.

La semejanza de la morfología cerebral del conejo, (figuras 4,5,6,7,8,9), con la humana, fácilmente comprobable en cualquiera de nuestros textos de Neuroanatomía, (JIMÉNEZ CASTELLANOS, 1.965), nos orientó a la hora de obtener las muestras cerebrales. Cogimos trozos de lóbulos frontales, temporales, parietales, y occipitales, como así mismo de cerebelo, y tronco-encefalo, siempre de una forma bilateral y simétrica, y uniendo varios pedacos para mayor seguridad, de obtener el porcentaje suficiente de proteínas para el desplazamiento a partir de la muestra.

A partir de este momento, hubo que confeccionar una papilla, de la que se iba a extraer las proteínas. Para ello utilizamos una variante del método de HOBBSOBI, (1.957), que utilizaba para tal fin el agua. En nuestro caso usamos suero

fisiológico salino, en cantidad de 2 c.c. que mezclamos con el trozo de la muestra en un mortero de vidrio, en cada una de las ocasiones. Se procedió a una homogeneización de tipo manual, dado que solo nos interesaba el obtener proteínas únicamente citoplasmáticas, cosa que no conseguiríamos por otros métodos, (VAN DAMME, 1.962). Ya fue demostrado, (CHAIKIN C. y CHAIKIN I. 1.960), que la elección de métodos de homogeneización mecánica, altera los nucleos y con ello libera sus proteínas, que vendrían a sumarse a las plasmáticas, con lo que falsearían el resultado final.

Tras cada una de las homogeneizaciones, el mortero fue lavado, primero con agua y después con suero, repetidas veces y con cuidado a continuación concienzudamente. El resultante de la homogeneización, fue centrifugado a 4.000 revoluciones por minuto, durante media hora, con objeto de que tanto los elementos fijos posiblemente existentes, como así mismo el resto de la materia se nos sedimentara quedándonos arriba las proteínas solubles, sobrenadando en el líquido.

Al cabo de este tiempo, obtuvimos, por encima del sedimento, una cantidad de varios centímetros cúbicos, de líquido transparente, preparada para la electroforesis. Se efectuó la t₂ en del líquido sobrenadante, y quedó a continuación depositado en pequeños tubos de vidrio que pasaron a la cámara frigorífica, para su conservación en espera de efectuar los desplazamientos, que en todos los casos se realizaron dentro de las 24 horas siguientes.

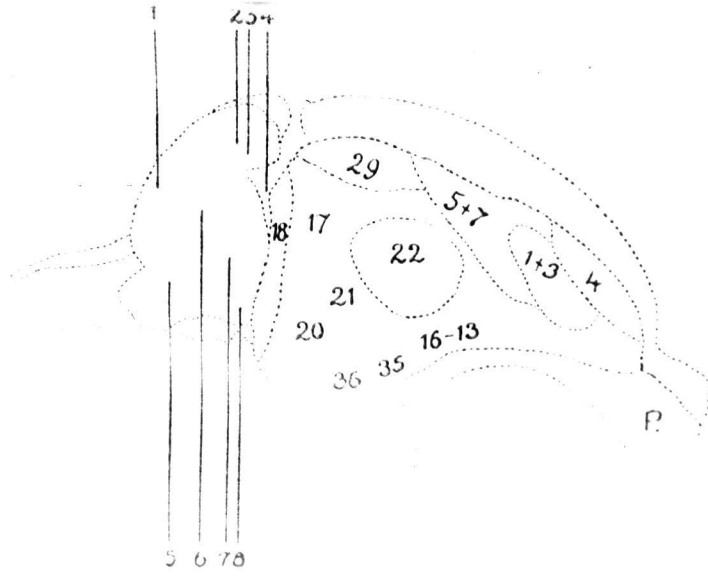
En esta muestra obtenida, se efectuó la medición de la cantidad de proteínas que había en todos los casos, asegurándonos, que siempre poseía una cantidad superior a la mínima indispensable para la ejecución del desplazamiento, según fue demostrado en trabajos anteriores de otros autores, (CASTELLANOS *et al.*, 1967)



Figura 4

Vista lateral del cerebro de conejo

1 Lob^{us} med.
2 Lob^{us} simpl.
3 Lob. ant.
4 C. Q. p.



5 Lob^{us} petr.
6 Lob^{us} param.
7 crust. M. lob. ans.
8 crust.

Figura 5

Esquema de la vision lateral del cerebro del conejo

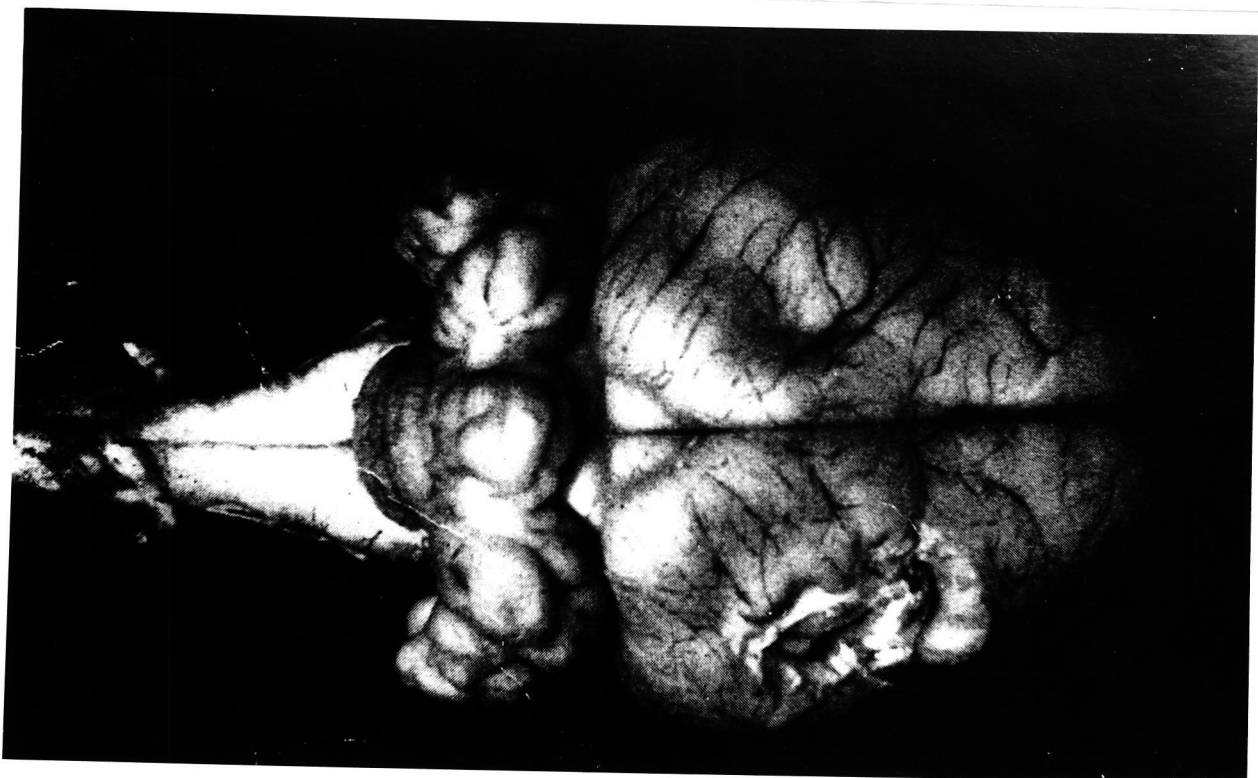


Figura 6

Vista superior del cerebro del conejo

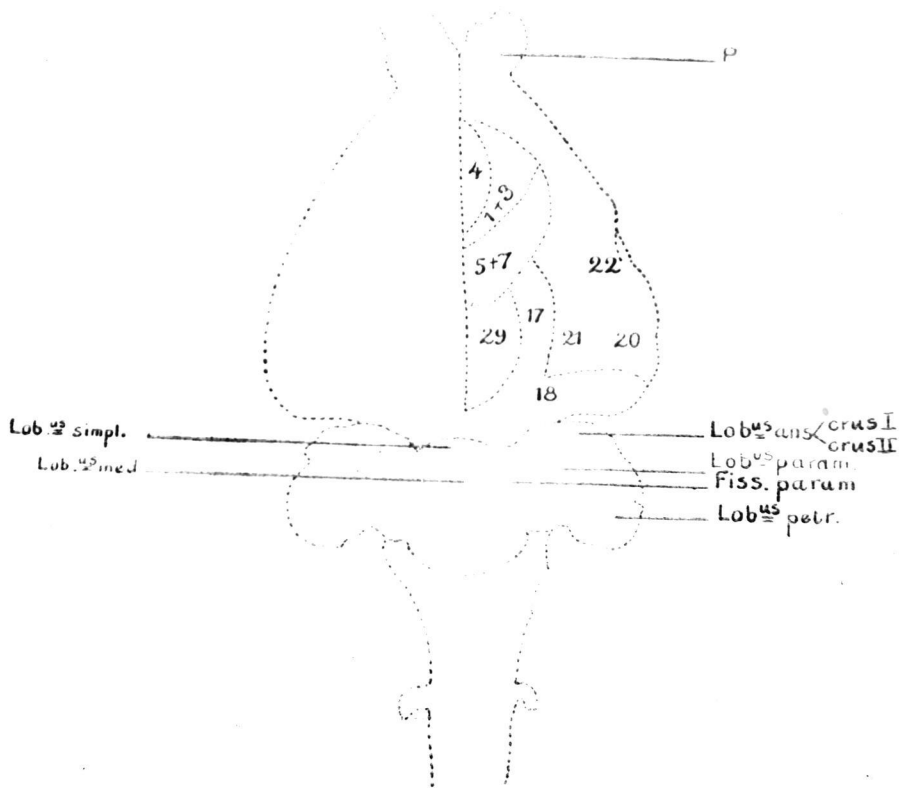


Figura 7

Esquema de la visión superior del cerebro de conejo.

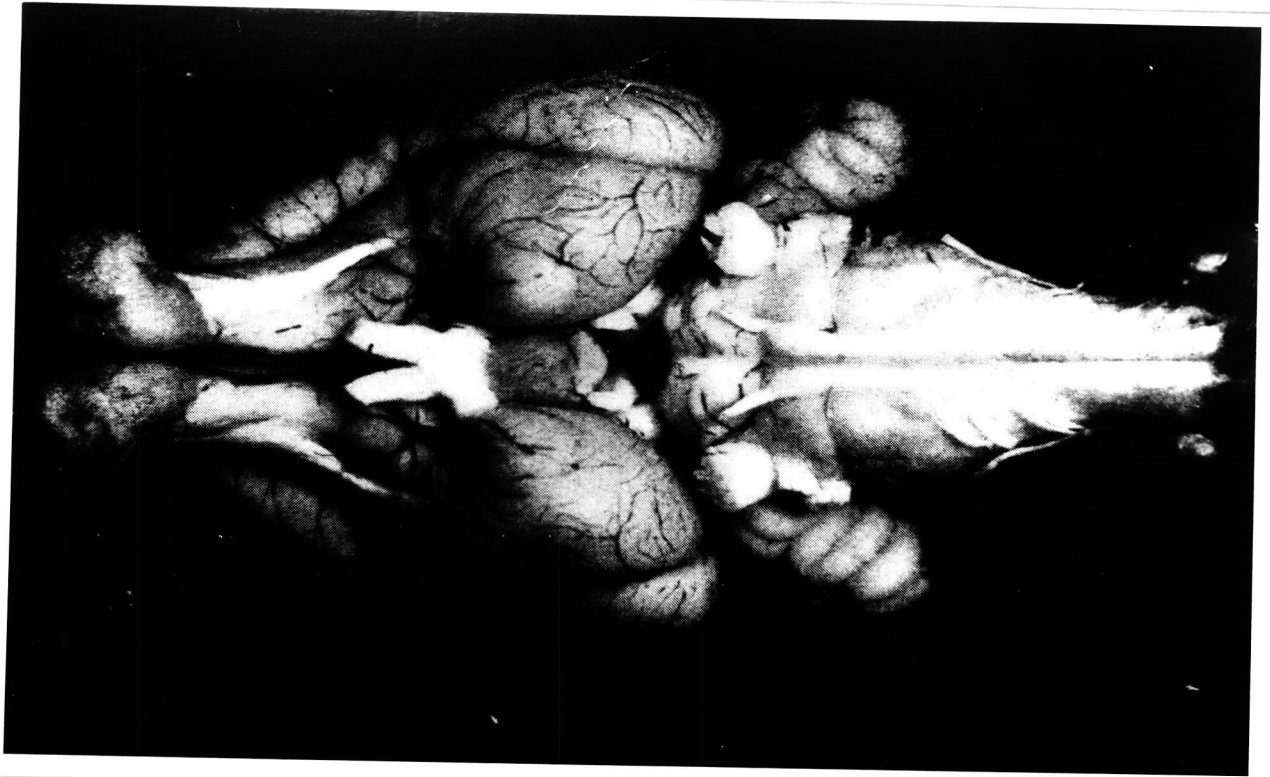


Figura 5

Vista inferior del cerebro de conejo

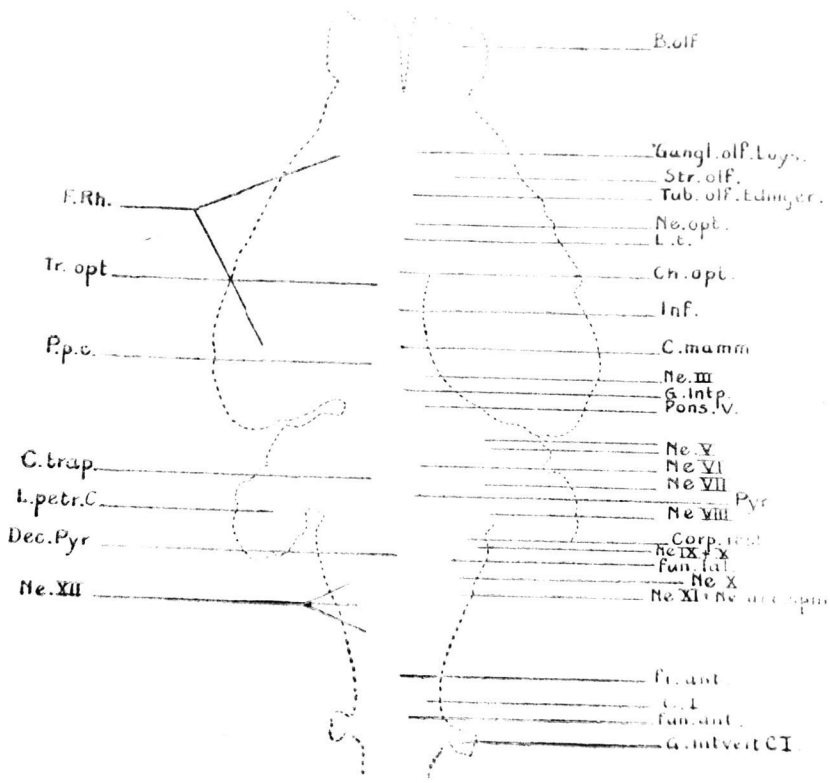


Figura 9

Esquema de la vision inferior del cerebro del conejo.

c) Electroforesis en acetato de celulosa.-

A partir de este momento, es cuando comienzan verdaderamente, nuestra aportación electroforética. Trabajos anteriores, demostraron, como ya hemos dicho, la cantidad mínima de proteínas que debe tener la muestra para su desplazamiento y obtención de un buen electrograma.

A la hora de efectuar nuestras electroforesis nos encontramos, con el elemental problema de la elección del método, entre los ya existentes.

Descartamos de entrada la realización de la electroforesis libre, como ya fue introducida por HILLIS, en 1.937, por ser ya un proceder superado hoy en día. Igualmente, descartamos la realización de nuestros desplazamientos en gel de agar, puesto que estudios comparativos realizados por los distintos autores, (ARONOW, VAN NABIE, y LOS ANGELES, 1.957), en el líquido cefalorraquídeo, han demostrado, que las fracciones muestran idénticas características relativas en uno y otro método, comparado con el papel, y ser la preparación del gel de agar, difícil de preparar y compleja de

aplicación a un laboratorio clínico. Ya en último lugar, descartamos, al papel filtro, a pesar de la bondad de sus resultados, que han permitido durante años excelentes resultados en nuestro laboratorio, motivo de anteriores comunicaciones, (CASTELLANOS BARRÓN, 1.969, 1.969 y 1.970), por haber sido sustituido entre nosotros desde hace algún tiempo por las tiras de "acetato de celulosa", CELLONAL, que permiten mejores resultados, (CASTELLANOS BARRÓN y colaboradores, "en prensa"). Finalmente descartamos la aplicación de al todos los complejos y sus recipientes como puede ser los "discos de poliacrilamida", técnica introducida por WILSON y DAVIS en 1.962, por necesitar una instrumentación especial, que hace su utilización por el momento imposible en un laboratorio clínico. Así pues manejamos para nuestras electroforesis las tiras de "acetato de celulosa".

Las tiras manejadas, de marca CELLONAL, son de 2'5 por 17 centímetros, y son el soporte, sobre el que colocamos en todos los casos la muestra del líquido proteico, en forma de una fina raya. Las tiras fueron conservadas en una solu-

ción de acetoni al 40 al 50%.

El aparato utilizado para los desplazamientos, decíamos anteriormente que era del tipo WALKER, (Figura 1), capaz para 6 u 8 tiras simultáneamente, dependiendo de la anchura de las bandas utilizadas.

Las bandas fueron impregnadas en una solución buffer, con un pH de 8.6, que se obtuvo de la siguiente manera:

Acido dietilbarbiturato sódico.....	10.30 g.
Acido dietil barbitarico	1.34 g.
Agua destilada	1.000 c.c.

Con esta solución descrita, pueden obtenerse hasta mas de cinco determinaciones debiles, y con objeto de evitar cambios en el pH se interrogaban los polos de la corriente eléctrica, en la cámara de electroforesis despues de cada prueba.

Por otra parte foune esta solución también, el requisito de estar situada entre unos limites de pH de 8 y 9, condición que ya citabamos, que BARKER y FOLCH, (1.959), consideraban como óptima

para la extracción de las proteínas.

En la tira de lectroforesis, se marca con un lápiz, una línea vertical a unas 10 centímetros de uno de los bordes, anotándose en un extremo para su ulterior reconocimiento y se humedece en la citada solución buffer. Para eliminar molestos sobantes, del líquido se presiona la citada cinta entre dos papeles secantes o de filtro gruesos egaines.

Se coloca la cinta en el aparato de electroforesis procurando que quede el lugar de la muestra a unos 3 cm., del borde. Para lograr una perfecta adhesión al marco, se humedece el soporte en solución buffer sin quedar burbujas de aire entre el marco y el papel.

La muestra proteica, es depositada a continuación sobre la tira a la distancia citada de la orilla en cantidad de unos 1'5 a 2 μ l mediante una pipeta de precisión en el lado opaco de la cinta, es decir precisamente en la zona del polo negativo. Se procura que las puntas de la cinta queden sumergidas en la solución tampón, y que no eg

ten curvadas .Se tapa la cámara y a continuación se da la corriente eléctrica al sistema.

Para conseguir que la corriente que llega al sistema sea estabilizada , decíamos que disponíamos de un estabilizador ELTON,(figura 1), que proporciona corriente adecuada para los desplazamientos del orden de unos 150 Voltios.

Se mantiene el paso de la corriente durante un tiempo de una hora y media , representando esta una de las ventajas con respecto a la electroforesis sobre tiras de papel, en la cual la corriente debía actuar durante unas 12 horas , con lo cual el proceso resultaba lentificado extraordinariamente.

Se recomienda la colocación de la cámara en sitio fresco en época de calor y regiones calurosas, para evitar evaporaciones que entorpecieran el proceso.

Hasta aquí hemos obtenido los tiras con las proteínas desplazadas y dispuestas en ellas en forma de bandas y listas para su coloración, que describiremos en el apartado siguiente.

D) Coloración de las fracciones proteicas.-

Una vez obtenidas las distintas bandas en el GEL, se pueden visualizar mediante coloraciones especiales. En nuestro caso el colorante está compuesto de la siguiente manera:

Verde lisina	0'50 g.
Metanol	500 c.c.
Agua Destilada	40 c.c.
Acido acético	10 c.c.

Se deja este colorante actuar sobre la banda dentro de una cubeta , durante unos 5 minutos, de esta manera nos queda la banda con las distintas fracciones proteicas perfectamente coloreadas. Ahora es preciso decolorar la banda para que se lo quedan visibles las fracciones y teniendo bien presente que una banda bien decolorada, es aquella en la que quedan despejadas de todo el colorante , dejando bien marcadas, teñidas y separadas las distintas fracciones proteicas.

La decoloración la producimos sumergiendo la tira con 3 ó 4 baños sucesivos en la solución

decolorante que esta compuesta de:

Agua destilada	1.000 cc.
Acido asbico	50 cc.

Con esto la tira queda completamente coloreada , posteriormente decolorada y apata para ser leida, y hallar su perfil electroforético y determinar los porcentajes de las diferentes fracciones proteicas.

3) Lectura.-

La valoración del espectro proteico, es decir la obtención de curvas o esferogramas y su determinación de los porcentajes de las fracciones, puede hacerse por los siguientes procedimientos:

- 1.- Por elución y fotocolorimetría, practicando previamente cortes en la banda, de modo que cada uno de ellos comprenda una de las bandas proteicas. Los cortes se eluyen en una solución previamente preparada, haciendo la lectura posteriormente en el fotocolorímetro.
- 2.- Por DENSITOMETRÍA, en virtud de las diferencias de densidades ópticas del espectro proteico.

En nuestro caso preferimos este último, por su mayor facilidad, por su precisión y sobre todo porque permite la conservación de las tiras para posteriores usos y comprobaciones.

Se ha utilizado para las mediciones un INSTRUMENTO marca ALLEN, (figura 2), que requiere,

la previa transparentación de las tiras, emergiéndolas en la sustancia transparentadora, durante unos 2 minutos. La solución transparentadora se confecciona de la siguiente manera:

Agua Destilada	57 c.c.
Acetanal	37 c.c.
Acido acético	5 c.c.
Alcohol dietílico	5 c.c.
Glicerina	2 gotas.

Una vez secadas las tiras de la solución transparentadora, se colocan entre dos vidrios y se llevan a la estufa a unos 50 a 60 °C, hasta que quedan completamente transparentes, a condición indispensable para su correcta lectura.

A continuación se despegan las tiras de los vidrios y están ya dispuestas para su lectura en el DENSITOMETRO.

Se colocan las tiras entre dos placas de vidrio y se introducen en el DENSITOMETRO, y se procede a la lectura. Se va moviendo el mando del Densitómetro y efectuando la lectura de los valores. Cada dos movimientos del botón, se lee el

valor, llevándose a un papel milimetrado, ya confeccionado y estandarizado, cuyas cuadrículas tienen 2 milímetros de lado. Se unen los puntos así obtenidos por líneas, dando como resultado una curva específica y característica de cada uno de los perfiles proteicos de las distintas zonas del cerebro tomadas.

Previamente a todo esto se tuvo la precaución de obtener suero del conejo, y hacer su perfil electroforético, (siguiendo idénticos procedimientos que con los cerebros), como así mismo de marcar sobre papel milimetrado después de la lectura con el densitómetro, su electrograma, con las distintas fracciones proteicas separadas.

Nos queda por último en es e apa todo, la determinación de los porcentajes de las distintas fracciones .

Estos porcentajes, se calculan por separado, por planimetría, determinando el área de cada una de las fracciones por separado. Para el análisis de cual es el espacio correspondiente a cada una de las fracciones en el electrograma,

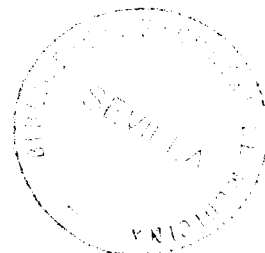
seguimos la metodología instituida por BOWLS(1.957), que pensaba obviar estas dificultades, mediante la superposición del esferograma cerebral y del suero, viéndose ya con facilidad pues que espacio corresponde a cada una de las fracciones, en virtud de sus movilidades relativas. A continuación se trazan las correspondientes curvas de Gauss y se miden cada una de ellas por separado con el Planímetro, la suma de todas ellas nos da el área total, y a continuación por simples reglas de tres hallaremos los porcentajes de cada una de ellas.

Para todo esto se utiliza un PLANÍMETRO OIT (Figura 3), citado anteriormente, consistente en un polo y en un nonio que va en un carro, Cada unidad que marca el Planímetro corresponde a unos 4 milímetros cuadrados de área.

Todo esto es llevado posteriormente a un papel milimetrado, quedando dibujado el perfil de la curva electroforética, (Tablas 1 y 2).

No vamos a calcular el valor absoluto en gramos de cada banda proteica, pues tampoco calculamos la proteínas total del líquido obtenido

después del centrifugado, es decir el que extraí
mos de las muestras cerebrales. Nos bastaría to
do lo que sabemos, como se dijo, la existencia
de una proteína útil por encima de 1 mg, dado
que en eso se centra nuestro trabajo, es el cotu-
dio porcentual de las proteínas cerebrales.



CAPITULO QUINTO

N. OLIVARI

Una vez realizadas todas las mediciones descritas, confeccionaron los esferogramas. Se trazaron los correspondientes a cada una de las seis regiones cerebrales exploradas con las tomas de muestras, en cada uno de los 12 ejemplares. En total obtuvimos por lo tanto unos 72 esferogramas proteicos.

Se realizó como dejamos dicho anteriormente, el hallazgo del porcentaje de cada una de las fracciones proteicas cuyo límite en todos los casos se realizó por comparación con el esferograma sanguíneo del conejo.

En todos nuestros casos pudimos observar la presencia constante de ocho bandas: 1 α -ALBUMINA; 1 ALBUMINA; 1 ALFA 1, 1 ALFA 2; 1 BETA 1, 1 BETA 2; 1 GAMMA 1 y 1 GAMMA 2 GLOBULINAS.

A continuación, vamos a describir sucintamente los resultados, detallándolos. Debido a la profusión de hallazgos, se realizará una agrupación topográfica de ellos, es decir unir todos los correspondientes a una misma zona cerebral,

que es lo que nos va a interesar para después realizar el elemental estudio analítico y estadístico. Igualmente de la forma elegida por nosotros para su presentación, en forma de cuadros, correspondientes cada uno de ellos a los **FAMILIAS FRONTAL, CENTRAL, PARIENTAL, OCCIPITAL, CEREBELA,** y **ENCEFALOCERVALES**, se tendrá una visión osada y global de todos los números ofrecidos.

Al final de este estudio descriptivo, colocaremos gráficos de algunas de las esferogramas más típicos, (uno por cada región cerebral explorada), y bandas en acetato de celulosa más típicas igualmente.

LOBULO FRONTAL

MUESTRAS	PREALBUMINA	ALBUMINA	ALFA 1	ALFA 2	BETA 1	BETA 3	GAMMA 1	GAMMA 2
MUESTRA 1	0'9	17'0	17'0	17'0	15'6	13'6	8'7	9'7
MUESTRA 2	<u>12'3</u>	13'6	12'3	13'6	13'6	20'5	<u>6'8</u>	6'8
MUESTRA 3	4'0	10'0	8'0	12'0	14'0	16'0	16'0	<u>20'0</u>
MUESTRA 4	1'1	23'9	<u>17'6</u>	<u>5'8</u>	17'6	17'6	11'7	11'7
MUESTRA 5	2'2	11'4	12'6	18'3	<u>22'8</u>	12'6	13'7	<u>5'7</u>
MUESTRA 6	2'6	<u>5'2</u>	10'5	15'7	21'0	<u>21'0</u>	10'5	13'1
MUESTRA 7	3'3	20'0	13'3	16'6	13'3	13'3	10'0	10'0
MUESTRA 8	6'3	21'2	17'0	10'6	<u>6'3</u>	10'6	<u>17'0</u>	10'6
MUESTRA 9	0'8	<u>26'7</u>	15'6	8'9	13'3	<u>8'4</u>	13'3	12'5
MUESTRA 10	<u>0'7</u>	10'8	14'4	15'2	14'4	15'2	14'4	14'4
MUESTRA 11	3'6	14'7	<u>7'3</u>	8'0	22'0	16'1	14'7	13'2
MUESTRA 12	1'8	18'9	13'5	<u>22'5</u>	9'0	10'9	13'5	10'0

LOBULO TEMPORAL

MUESTRAS	PREALBUMINA	ALBUMINA	ALFA 1	ALFA 2	BETA 1	BETA 2	GAMMA 1	GAMMA 2
MUESTRA 1	2'3	18'8	16'4	16'4	14'1	14'1	10'5	<u>7'0</u>
MUESTRA 2	6'3	<u>18'9</u>	18'9	12'6	<u>12'6</u>	12'6	<u>6'3</u>	11'3
MUESTRA 3	10'2	10'2	10'2	10'2	18'3	10'2	10'2	<u>20'4</u>
MUESTRA 4	2'0	8'1	12'2	12'2	15'9	<u>20'4</u>	16'3	12'2
MUESTRA 5	<u>0'6</u>	9'8	10'4	<u>19'6</u>	16'3	13'0	19'6	10'4
MUESTRA 6	2'0	12'2	<u>20'4</u>	16'3	12'2	12'2	12'2	12'2
MUESTRA 7	3'1	<u>7'9</u>	15'8	14'2	17'4	15'8	12'6	12'6
MUESTRA 8	<u>11'3</u>	11'3	11'3	11'3	11'3	<u>6'8</u>	<u>25'0</u>	11'3
MUESTRA 9	0'6	18'9	13'7	18'3	18'3	9'8	13'0	7'1
MUESTRA 10	1'7	12'5	12'5	13'6	14'3	16'1	14'3	14'3
MUESTRA 11	5'5	16'6	<u>5'5</u>	<u>5'5</u>	16'6	16'6	16'6	16'6
MUESTRA 12	1'2	17'6	16'8	14'7	<u>20'1</u>	10'5	10'5	8'4

LOBULO PARIETAL

MUESTRAS	PREALBUMINA	ALBUMINA	ALFA 1	ALFA 2	BETA 1	BETA 2	GAMMA 1	GAMMA 2
MUESTRA 1	6'2	12'5	12'5	15'6	15'6	14'0	12'5	10'9
MUESTRA 2	7'8	26'3	13'1	13'1	13'1	<u>7'8</u>	<u>5'2</u>	13'1
MUESTRA 3	1'2	16'2	12'1	14'6	<u>9'7</u>	14'6	<u>28'4</u>	<u>6'9</u>
MUESTRA 4	4'0	14'2	10'2	12'2	14'2	16'3	14'2	14'2
MUESTRA 5	4'7	10'3	9'4	9'4	14'1	14'1	18'8	<u>18'8</u>
MUESTRA 6	<u>8'2</u>	11'0	<u>9'1</u>	<u>9'1</u>	13'7	<u>18'3</u>	16'5	13'7
MUESTRA 7	2'7	<u>27'0</u>	16'2	16'2	13'5	10'8	5'4	8'1
MUESTRA 8	6'2	7'8	15'6	12'5	15'6	14'8	11'7	15'6
MUESTRA 9	0'6	17'1	<u>17'1</u>	14'3	14'3	13'6	12'3	10'2
MUESTRA 10	<u>0'6</u>	<u>6'6</u>	13'2	18'2	11'5	13'2	23'1	13'2
MUESTRA 11	1'4	14'8	15'5	<u>18'5</u>	14'8	14'8	11'1	8'8
MUESTRA 12	1'9	12'2	13'7	17'7	<u>17'7</u>	13'7	12'5	12'2

L O B U L O O C C I P I T A L

=====

MUESTRAS	PREALBUMINA	ALBUMINA	ALFA 1	ALFA 2	BETA 1	BETA 2	GAMMA 1	GAMMA 2
MUESTRA 1	5'2	10'5	10'5	15'7	<u>21'0</u>	10'5	15'7	10'5
MUESTRA 2	3'4	10'4	11'6	11'6	11'6	<u>23'2</u>	17'4	10'4
MUESTRA 3	7'8	15'7	<u>7'8</u>	<u>4'7</u>	15'7	15'7	16'7	15'7
MUESTRA 4	3'1	6'3	12'6	17'4	17'4	17'4	14'2	11'1
MUESTRA 5	2'6	17'6	8'8	13'2	13'2	17'6	13'2	13'2
MUESTRA 6	<u>8'6</u>	<u>25'8</u>	8'6	17'2	<u>8'6</u>	<u>8'6</u>	17'2	<u>5'1</u>
MUESTRA 7	5'3	19'6	8'9	<u>26'7</u>	8'9	8'9	<u>3'5</u>	17'8
MUESTRA 8	0'9	15'4	<u>20'0</u>	18'5	15'4	10'8	9'2	9'5
MUESTRA 9	<u>0'6</u>	7'1	9'8	3'7	19'6	16'3	16'3	16'3
MUESTRA 10	1'4	11'9	13'4	13'4	19'4	13'4	17'9	8'9
MUESTRA 11	4'8	<u>6'0</u>	8'0	10'1	20	14'1	18'2	<u>18'2</u>
MUESTRA 12	1'7	14'0	12'2	12'2	14	12'8	<u>19'2</u>	14'0

C E R E B E L O

MUESTRAS	PREALBUMINA	ALBUMINA	ALFA 1	ALFA 2	BETA 1	BETA 2	GAMMA 1	GAMMA 2
MUESTRA 1	1'2	8'9	7'6	14'1	17'9	20'5	16'6	12'8
MUESTRA 2	3'3	6'6	<u>20'0</u>	<u>6'6</u>	6'6	20'0	20'0	6'6
MUESTRA 3	7'1	<u>16'6</u>	14'2	7'1	14'2	14'2	19'0	7'1
MUESTRA 4	1'4	9'4	9'4	16'5	17'9	17'9	14'1	13'2
MUESTRA 5	2'8	12'8	15'7	18'5	14'2	12'8	17'1	<u>5'7</u>
MUESTRA 6	3'8	8'3	7'6	19'0	15'2	15'2	15'2	15'2
MUESTRA 7	<u>10'0</u>	16'0	18'0	18'0	12'0	<u>10'0</u>	<u>7'2</u>	8'8
MUESTRA 8	<u>0'8</u>	16'1	14'4	14'4	16'9	14'4	14'4	8'2
MUESTRA 9	1'4	16'1	7'3	14'7	16'1	14'7	14'7	14'7
MUESTRA 10	1'7	5'2	14'6	13'9	19'1	10'4	19'1	15'6
MUESTRA 11	2'7	13'7	<u>6'5</u>	<u>19'2</u>	<u>19'2</u>	13'7	10'9	13'7
MUESTRA 12	1.9	<u>4'8</u>	9'7	9'7	<u>5'8</u>	<u>24'2</u>	<u>24'2</u>	<u>19'4</u>

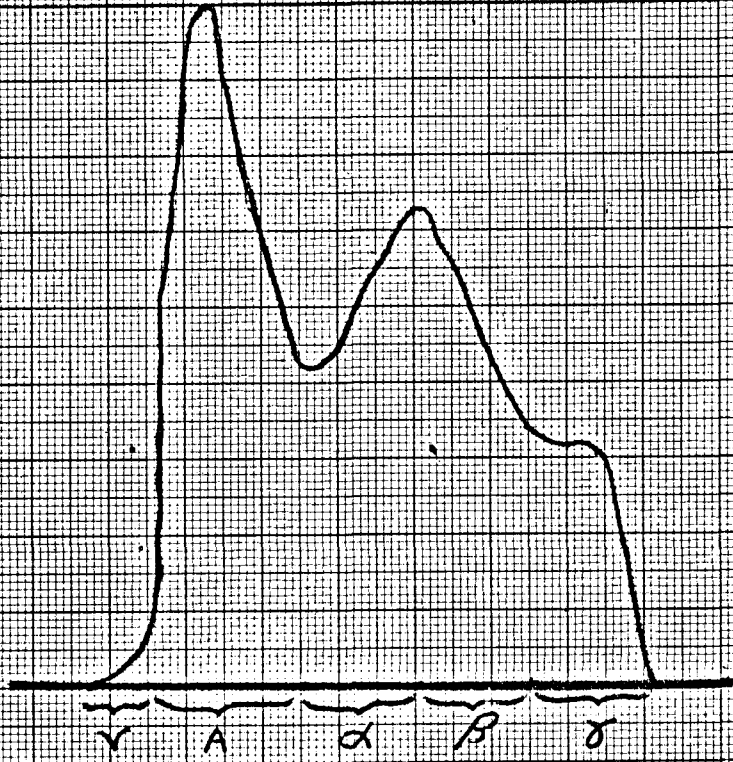
TRONCO ENCEFALO

=====

MUESTRAS	PREALBUMINA	ALBUMINA	ALFA 1	ALFA 2	BETA 1	BETA 2	GAMMA 1	GAMMA 2
MUESTRA 1	2'0	19'7	12'3	14'4	<u>22'6</u>	14'4	8'2	6'1
MUESTRA 2	3'9	13'1	11'8	<u>19'7</u>	13'1	19'7	11'8	6'5
MUESTRA 3	2'7	10'9	13'6	<u>10'9</u>	16'3	19'1	16'3	9'8
MUESTRA 4	1'1	11'2	<u>11'2</u>	14'2	20'6	18'7	11'2	11'2
MUESTRA 5	<u>8'6</u>	<u>25'8</u>	17'2	17'2	8'6	8'6	8'6	<u>5'1</u>
MUESTRA 6	1'5	9'4	15'7	15'7	14'1	11'8	<u>19'6</u>	11'8
MUESTRA 7	8'0	21'0	13'4	13'4	13'4	14'5	13'4	7'6
MUESTRA 8	1'2	10'7	<u>21'8</u>	16'7	17'1	10'7	13'3	8'1
MUESTRA 9	1'4	8'0	13'1	14'5	15'3	18'2	14'5	14'5
MUESTRA 10	2'1	8'6	12'1	12'1	12'6	13'0	17'3	<u>21'6</u>
MUESTRA 11	<u>1'0</u>	<u>4'3</u>	12'5	12'5	13'6	<u>21'5</u>	14'3	19'7
MUESTRA 12	2'2	4'4	11'3	17'0	<u>5'6</u>	<u>6'8</u>	<u>5'6</u>	5'6

Hasta aquí la exposición de la agrupación topográfica de los resultados. Ya de entrada con una visión panorámica sobre ellos, y antes de entrar en su estudio analítico, podemos ver la similitud entre los valores de las distintas fracciones de una misma región cerebral, que sin llegar al ulterior estudio mas serio, nos da una primera idea de la validez de nuestros hallazgos.

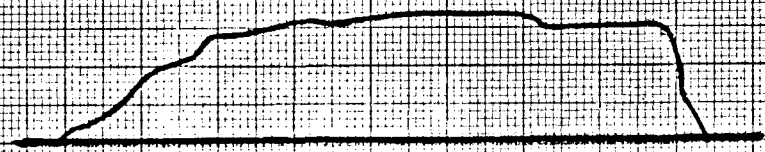
A continuación se muestran esferogramas típicos y bandas de Chlissel, mas demostrativas.



SUERO

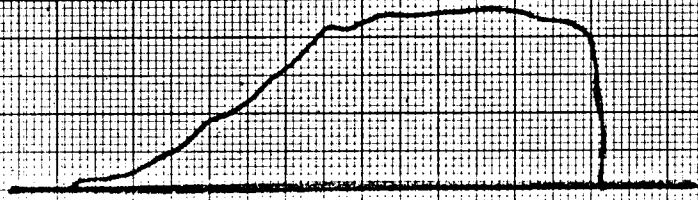


FRONTAL

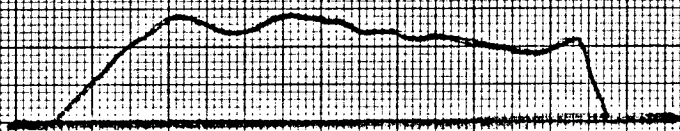


TEMPORAL

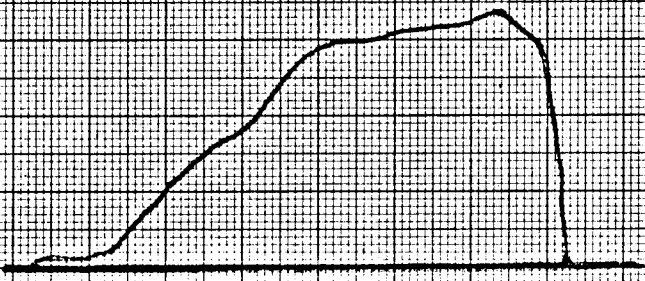
CURVAS ELECTROFORETICAS TYPICAS



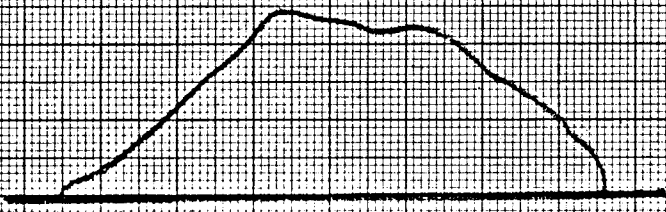
OCCIPITAL



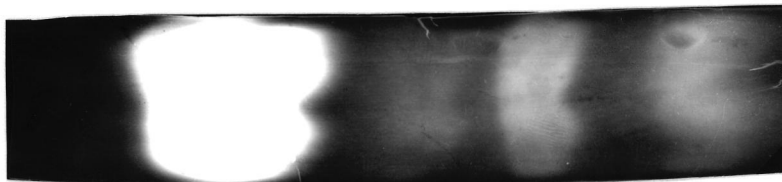
PARIETAL



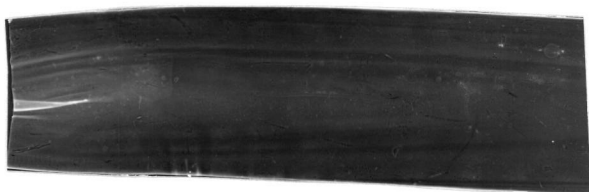
CEREBELO



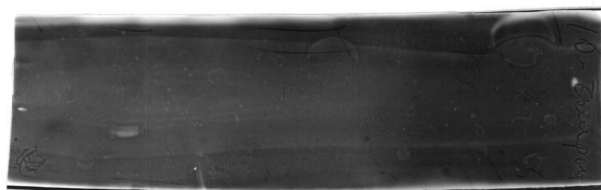
TRONCOENCEFALO



Suero



Lobulo Frontal



Lobulo Temporal



Lobulo Parietal



Lobulo Occipital



Cerebello



Troncoencefalo

CAPITULO SEXTO

ESTUDIO ESTADISTICO

La medicina, que empezó siendo una Ciencia de observaciones aisladas, de figuras, y de iconografía, cada vez pasa mas al terreno cuantitativo, (con grave peligro para el Humanismo del Médico), mas estadística, de expresar los resultados en números, tantos por ciento, y afirmaciones tan categóricas como pueden ser las que van referendadas por los números.

El investigador a la hora de plantearse un problema de resolver una experiencia, tiene ferocemente, que expresarse en este lenguaje, si quiere ser comprendido por los que los lean posteriormente, o si quiere ser veraz y concluyente, para no ser tachado de inexacto.

Por otra parte es imposible, la observación de casos y muestras numerosas en la mayoría de las experiencias, -como en la muestra-, y debido a esto es por lo que a todo estudio serio, debe aplicarse un posterior método estadístico, que nos dará la fiabilidad de los resultados y sus lími-

tes de certeza.

Seguiente todo esto, es por lo que nuestro campo, que se reducía a encontrar unos porcentajes y unos patrones electroforéticos de las proteínas cerebrales, no se podrá reducir a ofrecer los datos obtenidos, sin más ni más, sino que vamos a hallar en ellos una serie de magnitudes, típicamente estadísticas, para mayor clarificación de nuestros hallazgos. Para todo esto, y siguiendo el método Estadístico, procederemos de la siguiente manera.

- A) Recogida de datos.
- B) Elaboración de los mismos.
- C) Deducción de consecuencias.

Dada la ingente cantidad de datos manejados en estos trabajos, hemos procurado aplicar el método matemático, nos rigurosos en todos nuestros cálculos, para garantizar los resultados finales.

A) RECOGIDA DE DATOS.-

El paso previo a la realización de un estudio estadístico, es naturalmente, la recogida de todos aquellos datos, que vamos a utilizar posteriormente.

Nosotros, como hemos ofrecido anteriormente, recogimos los muestras, de 12 ejemplares de cerebros de conejos, y de ellos en 6 zonas, habiéndose pues tomado, en total unos 72 esfereogramas. En cada caso- comentábamos anteriormente-, obtuvimos 6 fracciones proteicas claramente diferenciadas, de las que se sacaron los porcentajes en cada una de ellas.

Dado, que para este estudio solo necesitábamos 10 datos mínimas, para que fuera fiable, vamos a despreciar 2 determinaciones de cada una de las fracciones proteicas, de cada una de las regiones cerebrales exploradas. Elejiremos naturalmente, los valores máximos y mínimos, que se van los que no van a falsear mas los resultados, y que por alejarse mas de los valores hallados como medios, podamos considerar como mas errados.

Los valores despreciados por nosotros, han sido señalados en el estudio descriptivo realizado anteriormente, mediante un pequeña raya debajo de cada uno de ellos, para su conocimiento.

B) ELABORACIÓN.-

Aquí, ya vamos a adelantarnos de lleno en el terreno de la Estadística, para tratar de hacer fácilmente asimilables y comprensibles los datos recogidos anteriormente.

Dado la enorme cantidad de resultados, se va a intentar su reducción por los métodos habituales, para poder interpretarlos con facilidad.

Vamos ahora a calcular las magnitudes estadísticas a que aludimos antes, que serán:

- 1.- Valor Medio
- 2.- Desviación Standard o típica
- 3.- Error Standard o típico.

1.- Valor Medio.

Con esta primera magnitud, lo que se pretende es definir el centro de gravedad de la distribución de los valores, y se conoce igualmente con el nombre de "constante de centramiento".

Viene a ser el coeficiente que se obtiene al dividir la suma de las observaciones de la serie, entre el número de observaciones.

Es importante aclarar aquí, que la propiedad más importante de esta magnitud, es que es un valor determinado de tal forma, que la suma de las desviaciones positivas, con respecto al signo, es igual a la suma de las negativas. La Media es pues el centro de gravedad o punto de suspensión de los valores de la distribución.

Se calcula según la fórmula siguientes:

$$X = \frac{\sum X}{n} \quad \text{en la que}$$

X = cada uno de los valores

\sum = suma de

n = número de valores en estudio

X = VALOR MEDIO

Aplicando pues esta fórmula a los valores obtenidos en cada una de las fracciones proteícas de cada una de las zonas exploradas del cerebro, tendremos los valores medios de cada una de ellas, de los lóbulos frontal, temporal, parietal, y occipital, del Cerebelo, y Troncoencefalo, que se expresan a continuación en un cuadro.

VALORES MEDIOS

REGIONES CEREBRALES	PREALBUMINA	ALBUMINA	ALFA 1	ALFA 2	BETA 1	BETA 2	GAMMA 1	GAMMA 2
LOBULO FRONTAL	2'5	16'1	13'4	15'3	15'3	14'6	12'6	11'2
LOBULO TEMPORAL	3'4	13'6	13'8	13'9	15'4	13'0	13'5	11'6
LOBULO PARIETAL	3'6	14'1	13'1	14'5	14'0	13'9	13'8	12'0
LOBULO OCCIPITAL	3'6	12'8	10'4	14'3	15'5	13'6	15'6	12'7
CEREBELO	2'7	11'3	11'8	14'5	15'0	15'3	16'1	11'5
TRONCOENCEFALO	2'6	11'7	13'3	14'7	13'2	14'8	12'8	10'1

2.-Desviación Standard o típica.

Una vez descritos los valores Medicamentos p₂ damos darnos por satisfechos con ellos, dado que no solo esto basta para conocer una distribución de frecuencias, sino que además es necesario saber la variabilidad de los valores de la variable con respecto a la MEDIA.

La constante que se utiliza para mostrar la dispersión alrededor de la media, es la DESVIACIÓN STANDARD, que por definición, es la raíz cuadrada del promedio de las desviaciones de los valores respecto a la media, elevadas al cuadrado, es decir viene expresada por la fórmula:

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

Las ventajas de esta constante, es que las desviaciones se expresan siempre como diferencias entre cada uno de los valores de la distribución y de la Media. En segundo lugar, que al elevar al cuadrado cada uno de los sumandos, se evita la dificultad de los signos, (algunos de ellos son negativos), pues todos

resultan positivas, y por último que al prome-
dio de estas desviaciones elevadas al cuadro-
do se vuelven a transformar en unidades iguales
a la de los valores originales, mediante la ex-
tracción de la raíz cuadrada.

La utilidad de esta desviación standard,
se extrae si se reflexiona que en toda distri-
bución normal, (pues se calcula para ella), el
68% de los valores normales se encuentran den-
tro de la desviación standard a ambos lados del
valor medio de la muestra; el 95% de los valores
se encuentra dentro de tres desviaciones standard
y el 99.7% dentro de tres desviaciones standard
consideradas siempre a ambos lados del valor
medio de la muestra.

Aplicando la fórmula expuesta, a los datos
obtenidos anteriormente, y a los valores medios,
tenemos las siguientes desviaciones standard,
para cada una de las fracciones proteicas y ca-
da una de las zonas cerebrales, que se expone
en el siguiente cuadro.

DESVIACIONES STANDARD

REGIONES CEREBRALES	PREALBUMINA	ALBUMINA	ALFA 1	ALFA 2	BETA 1	BETA 2	GAMMA 1	GAMMA 2
LOBULO FRONTAL	1'6	1'9	2'5	3'3	3'9	2'8	3'7	2'0
LOBULO TEMPORAL	2'8	3'5	2'8	2'3	2'3	2'3	2'9	1'3
LOBULO PARIETAL	2'3	4'7	2'2	2'4	1'3	1'2	3'7	2'2
LOBULO OCCIPITAL	2'0	4'1	1'7	2'5	3'3	2'8	2'6	3'3
CEREBELO	1'9	3'9	3'7	3'6	3'4	2'9	2'6	3'3
TRONCOENCEFALO	1'6	4'8	1'7	1'7	3'2	3'7	2'8	4'1

1.- Error Standard e típico.

Sucede muchas veces, que el valor tanto de la media como de la desviación standard calculados, no pueden ser aplicados a una población o una serie de valores, sólo que dan intervalos demasiado amplios.

De mayor exactitud es otra magnitud, cuyo cálculo vamos a realizar ahora, y que nos da los límites del valor medio de una población o de una muestra dada, es decir la distancia a que se hallan el valor medio de la población general. A esta constante se le llama **ERROR STANDARD**.

A su vez depende ella de dos factores; del tamaño de la muestra examinada, y de la variabilidad de los individuos en la serie en que se toma la muestra.

Al no poderse aplicar el cálculo a todos los individuos de la población, (en este caso de los conejos), se aplica a todos los de la muestra, y se calcula dividiendo la Desviación Standard de los individuos de la muestra, por la raíz cuadrada del tamaño muestral, siendo la fórmula:

$$E.S._n = \frac{S_g}{n} \quad \text{y los valores obtenidos}$$

ERRORES STANDARD

REGIONES CEREBRALES	PREALBUMINA	ALBUMINA	ALFA 1	ALFA 2	BETA 1	BETA 2	GAMMA 1	GAMMA 2
LOBULO FRONTAL	0'5	0'6	0'8	1'0	1'2	0'9	1'1	0'6
LOBULO TEMPORAL	0'9	1'1	0'9	0'7	0'7	0'7	0'9	0'4
LOBULO PARIETAL	0'7	1'5	0'7	0'8	0'4	0'4	1'1	0'7
LOBULO OCCIPITAL	0'6	1'3	0'5	0'8	1'6	0'9	0'8	1'6
CEREBELO	0'6	1'2	1'1	1'1	1'1	0'9	0'8	1'0
TRONCOENCEFALO	0'5	1'5	0'5	0'5	1'0	1'1	0'9	1'3

c) INDUCCIÓN.

Con todo lo anteriormente expuesto, puede inferirse, que manejando las magnitudes por nosotros exploradas, constantes matemáticas todas ellas, y con el número reducido de las muestras por nosotros aportadas, nuestros resultados son de una validez relativamente grande.

Naturalmente una certeza del 100%, en muestras determinadas difícilmente la tendremos, puesto que para ello deberíamos haber medido una población tan enorme de conejos, que prácticamente se reduciría a todos los existentes en el orbe. Así pues nuestros resultados, nos referimos naturalmente a la Media y sus distintos valores en las fracciones proteicas y en las diversas series, no pueden tomarse como absolutos, pero sí pueden tomarse para establecer lo que ha dado en llamarse "límites de confianza", que están igualmente basados en la misma curva de la distribución normal. Así pues la posibilidad sobre la que se basa un hecho hipotético, dependerá del área de la curva normal correspondiente al número de errores estándar empleados en su determinación.

Para tener un límite de confianza del 95% se deberá determinar el intervalo : $\bar{X} \pm 2 \text{ E.S.}_q$

Si por el contrario, quisiéramos obtener un límite de confianza del 99.7%, se determinaría el intervalo : $\bar{X} \pm 3 \text{ E.S.}_q$

Nosotros vamos a trabajar con un límite de confianza del 99.7% y los resultados, nos saldrán de la aplicación de la fórmula antes expuesta, empleando los valores medios, y el error estándar, correspondiente a cada uno de los valores medios de las distintas fracciones proteicas de las distintas zonas exploradas.

Los resultados obtenidos son los que se exponen a continuación.

VALORES MEDIOS NORMALES DEL LOBULO FRONTAL.

Prealbumina	2°5 ±	2°5 - 1°0 - 4°0 %
Albumina	16°1 ±	1°6 - 14°3 - 17°9 %
Alfa 1	13°4 ±	8°4 - 11°0 - 15°8 %
Alfa 2	13°5 ±	3°0 - 10°5 - 16°5 %
Beta 1	15°3 ±	3°6 - 11°7 - 18°9 %
Beta 2	14°6 ±	2°7 - 11°9 - 17°3 %
Gamma 1	12°6 ±	3°3 - 9°3 - 15°9 %
Gamma 2	11°2 ±	1°6 - 9°4 - 13°0 %

VALORES MEDIOS NORMALES DEL LOBULO TEMPORAL.

Prealbumina	366 ±	2°1 - 1°5 - 5°7 %
Albumina	14°1 ±	4°5 - 9°6 - 18°6 %
Alfa 1	13°1 ±	2°1 - 11°0 - 15°2 %
Alfa 2	14°5 ±	2°4 - 12°1 - 16°9 %
Beta 1	14°0 ±	1°2 - 12°8 - 15°2 %
Beta 2	13°9 ±	1°2 - 12°7 - 15°1 %
Gamma 1	13°6 ±	3°3 - 10°5 - 17°1 %
Gamma 2	12°0 ±	2°1 - 9°9 - 14°1 %

VALORES MEDIOS NORMALES DEL LOBULO PARIETAL.

Prealbúmina	3°6 ±	2°1 - 1°5 - 5°7 %
Albúmina	14°1 ±	4°5 - 9°6 - 16°6 %
Alfa 1	13°1 ±	2°1 - 11°0 - 15°2 %
Alfa 2	14°5 ±	2°4 - 12°1 - 16°9 %
Beta 1	14°0 ±	1°2 - 12°8 - 15°2 %
Beta 2	13°9 ±	1°2 - 12°7 - 15°1 %
Gamma 1	13°8 ±	3°3 - 10°5 - 17°1 %
Gamma 2	12°0 ±	2°1 - 9°9 - 14°1 %

VALORES MEDIOS NORMALES DEL LOBULO OCCIPITAL

Prealbúmina	3°6 ±	1°8 - 2°8 - 5°8 %
Albúmina	12°8 ±	3°9 - 8°9 - 16°7 %
Alfa 1	10°4 ±	1°5 - 8°9 - 11°9 %
Alfa 2	14°3 ±	2°4 - 11°9 - 16°7 %
Beta 1	15°5 ±	4°8 - 10°7 - 20°3 %
Beta 2	13°6 ±	2°7 - 10°9 - 16°3 %
Gamma 1	15°6 ±	4°8 - 13°2 - 18°0 %
Gamma 2	12°7 ±	4°8 - 7°9 - 17°5 %

VALORES MEDIOS NORMALES DEL CERNILLO.

Freatbúmina	2°7 ±	2°8 =	0°9 =	4°5 ±
Albúmina	11°3 ±	3°6 =	7°7 =	14°9 ±
Alfa 1	11°8 ±	3°3 =	8°5 =	15°1 ±
Alfa 2	14°5 ±	3°3 =	14°2 =	17°8 ±
Beta 1	15°0 ±	3°3 =	11°7 =	15°0 ±
Beta 2	15°3 ±	2°7 =	12°6 =	18°9 ±
Gamma 1	16°1 ±	2°4 =	13°7 =	18°5 ±
Gamma 2	11°5 ±	3°0 =	8°5 =	14°5 ±

VALORES MEDIOS NORMALES DEL TRONCOPUNTALO.

Freatbúmina	2°6 ±	1°5 =	1°1 =	4°1 ±
Albúmina	11°7 ±	4°5 =	7°2 =	16°2 ±
Alfa 1	13°3 ±	1°5 =	11°8 =	14°8 ±
Alfa 2	14°7 ±	1°5 =	13°2 =	16°2 ±
Beta 1	13°2 ±	3°0 =	10°2 =	16°2 ±
Beta 2	14°8 ±	3°3 =	11°5 =	18°1 ±
Gamma 1	12°8 ±	2°7 =	20°1 =	15°5 ±
Gamma 2	10°1 ±	3°9 =	6°2 =	14°0 ±

CAPITULO SEPTIMO

COMENTARIOS

De todo lo que anteriormente hemos expuesto, podemos extraer una serie de comentarios, como así mismo trazar un definitivo estudio crítico de nuestro trabajo.

Vamos pues en este capítulo, a la luz de todo lo precedente a resumir una serie de conclusiones, para ello dividiremos este apartado en varias subsecciones:

- A) Estudio analítico de nuestros resultados.
- B) Estudio comparativo con los resultados de otros autores.
- C) Individualidad química cerebral.

A) Estudio cualitativo.

Creemos haber encontrado, un método de obtención y manipulación de las muestras, (cerebros de conejos), que se aproxima al ideal, para el estudio de las proteínas solubles cerebrales.

Igualmente aportamos un método de electroforesis en "acetato de celulosa", - CELLOCEL-, cómodo, rápido, y de fácil manejo y aplicación a un laboratorio clínico medianamente bien montado.

Todas las manipulaciones, a que fueron sometidas las muestras, hasta obtener finalmente el líquido protéico, se basan, en métodos de otros autores, modificados sensiblemente por nosotros, en aras de una mayor simplificación y fácil uso. Así la extracción de las proteínas, con suero fisiológico, como se ha realizado, es una modificación del método de HOBUSCHI, (1.957), que lo efectuaba simplemente con agua. El pH elegido, para nuestras muestras, de 8'6, reúne las condiciones fijadas por BARNH y FOLCH, (1.959), de encontrarse entre unos límites de 6 y 9 que ellos consideraron como los óptimos para la extracción de las proteínas solubles.

Creemos que el método de lectura, resulta igualmente válido, y que el estudio estadístico realizado, a nuestros resultados, garantiza suficientemente -dado sus márgenes de seguridad del 99^o7 %- para que nuestros hallazgos tengan suficiente validez, como para considerarlos como una aportación al estudio de las proteínas cerebrales del conejo.

Igualmente de todos los datos obtenidos, nos atrevemos ahora a trazar unas breves conclusiones que quizás no sean todo lo definitivas que habríamos deseado, -dado lo limitado de nuestra casuística, que nos impide el extraerlas con firmeza-.

Nos interesa dejar bien sentado, y bien patente, de una forma cuantitativa, los perfiles proteicos de las distintas zonas del cerebro, como así mismo sus semejanzas y diferencias.

En el LOBULO FRONTAL, hemos hallado un evidente predominio de las alfa globulinas, con cifras de media de 13^o4 % y 13^o5 %, y valores de mínimos y máximos de 11^o0-15^o8 % y 10^o5-16^o5 %.

también existe un predominio casi paralelo de las beta globulinas, con medias de 15'3 % y 14'6 %, y valores mínimos y máximos de 11'7-16'9 % y 11'9-17'3 %. El valor más bajo correspondió a la fracción albúmina con un porcentaje de valor medio de 2'5 % y mínimos y máximos de 1'0 - 4'0 %. Por todo esto puede considerarse que su esferograma típico es del tipo ALFA-BETA GLOBULINAS.

En el LOBULO TEMPORAL, son las Beta Globulinas las de mayor valor de porcentaje medio con 15'4 % y 13'0 %, y mínimos y máximos de 13'9-17'9 % y 10'9-15'1 %. Le siguen muy de cerca los valores medios de las Alfa Globulinas de 13'6 % y 13'9 % y con mínimos y máximos de 11'1-16'9 % y 12'8-16'0 %. La Fractalbúmina volvió a tener su valor más bajo de media con un 3'4 % y mínimos y máximos de 0'7-6'1 %. Se trata en definitiva de un esferograma de tipo ALFA-BETA GLOBULINAS, de nuevo.

En el LOBULO PARIETAL, las Alfa Globulinas, vuelven a predominar, con medias de 13'1 % y 14'5 % y valores mínimos y máximos de 11'0-15'2 % y 12'1-16'9 %. Son seguidas de las Beta Globulinas, con porcentajes medios de 14'0 % y 13'9 %, y mínimos

y máximos de 12°6-15°2 ‰ y 12°7-15°1 ‰. La Pre-
albúmina siempre con su valor medio mas bajo, de
3°6 ‰ y mínimos y máximos de 1°5 ‰ y 5°7 ‰. Se
trata en esta ocasión de un esferograma de tipo
ALFA-BETA GLOBULINAS de nuevo.

En el LOBULO OCCIPITAL, es ahora por el
contrario las Beta Globulinas de mayor valor de
media con 25°5 ‰ y 13°6 ‰, y valores mínimos y
máximos de 10°7-20°3 ‰ y 10°9-16°3 ‰. A conti-
nuación van las Gamma Globulinas con valores
medios de 15°6 ‰ y 12°7 ‰ y mínimos y máximos
de 13°2-18°0 ‰ y 7°9-17°5 ‰. La Prealbúmina con-
tinúa con un valor mas bajo de media de 3°6 ‰ y
mínimos y máximos de 1°8 ‰ y 5°4 ‰. En esta oca-
sión se trata de un esferograma del tipo BETA-
GAMA GLOBULINAS.

En el OMBELIO, también las Beta Globuli-
nas predominan con porcentajes medios de 15°0 ‰
y 15°3 ‰ y mínimos y máximos de 11°7-15°0 ‰ y
13°7-18°5 ‰. A continuación le siguen las Gama
Globulinas con valores medios de 16°1 ‰ y
11°5 ‰ y mínimos y máximos de 12°6-18°9 ‰ y
8°5-14°5 ‰. La Prealbúmina constantemente esfr

de valores mínimos de media con un porcentaje de 2'7 % y mínimos y máximos de 0'9 % y 4'4 %.

En este caso nos hallamos ante un cerebrograma de tipo BETA-GAMMA GLOBULINAS.

En el TROMBOCITARIO, son de nuevo las Alfa Globulinas, las que predominan con valores de 13'3 y 16'7 % de media, y mínimos y máximos de 11'8-15'8 % y 13'2-16'2 % . Son seguidas a continuación de las Beta Globulinas con valores de 13'2 y 14'6 % de porcentajes medios y de mínimos y máximos de 10'2-16'2 % y 11'5-16'1 % . La Freatalbúmina sigue con un valor bajo de media con 2'6 % y mínima y máxima de 1'1 % y 4'1 % . Se trata pues de un cerebrograma del tipo ALFA-BETA GLOBULINAS.



En segundo lugar nos va a interesar el análisis ahora las diferencias porcentuales que encontramos en las diferentes zonas cerebrales exploradas.

Es curioso que la FREALBUMINA, en todas las zonas, alcanza los valores más bajos de media, de todas las fracciones, y por otra parte existe una

gran similitud, entre sus cifras, pues con un valor de media mínimo en LOBULO FRONTAL de 2'5 % pasa solo a un valor medio máximo de 3'6 % en LOBULOS PARIENTAL y OCCIPITAL.

La ALBUMINA, es ya mas patente su dispersion pues aun cuando sus valores son tambien parecidos, tiene un máximo bien contrastado de valor medio, en LOBULO FRONTAL, de 16'1 %, siendo el resto de los porcentajes bien parecidos, y teniendo un mínimo de valor medio en CEREBELO, de 11'3 %.

La ALFA 1 GLOBULINA, son ya muy parecidos sus valores y oscilan poco, teniendo un máximo de valor medio en LOBULO TEMPORAL, de 13'8 % y un valor medio mínimo de 10'4 % en LOBULO OCCIPITAL.

La ALFA 2 GLOBULINA, oscila muy poco, pues con un máximo de valor medio en FRONTOCEREBELO, de 14'7 % pasa a un mínimo de valor medio de 13'9 %, siendo el resto de los valores muy parecidos.

La BETA 1 GLOBULINA, tiene igualmente su máximo en LOBULO OCCIPITAL, con un porcentaje co-

Este de mayor valor de 15°5 ‰, seguida muy de cerca por el LOBULO TEMPORAL con 15°4 ‰ y L. FRONTAL con 15°3 ‰ y su mínimo de valor medio en TRONCOENCEFALO, con 13°2 ‰

La BETA 2 GLOBULINA, por el contrario presenta su mínimo de media en CEREBELO, con un porcentaje de 13°3 ‰ y su máximo en LOBULO TEMPORAL, con un valor porcentual de 13°6 ‰, oscilando poco al resto de los valores.

La GAMMA 1 GLOBULINA, tiene su máximo de media en CEREBELO, con 16°1 ‰ y su mínimo en LOBULO FRONTAL con un valor de 12°6 ‰

La GAMMA 2 GLOBULINA, presenta finalmente, su media mínima en LOBULO OCCIPITAL, con un porcentaje de 12°7 ‰ y su máximo por el contrario, en TRONCOENCEFALO, con un porcentaje de 10°1 ‰

Estas son pues las variaciones topográficas en la distribución proteica del cerebro de conejo, y su estudio analítico.

B) Estudio comparativo .-

Conviene además, que hagamos un breve resumen en este capítulo, sobre lo que de proteínas cerebrales se ha estudiado por los distintos autores, comparando sus resultados con los nuestros.

Ya en principio, vienen nuestros hallazgos a corroborar, los de ROSENTHAL, (1.957, y 1.960), que citamos al principio, que había señalado, la diferencia en la distribución topográfica de las proteínas del cerebro.

Manejando diferentes técnicas, los autores, encuentran diferencias en la composición proteica de las distintas partes del cerebro, así KIYOTA y colaboradores, en 1.959, entre la sustancia blanca gris, y blanca. Por otra parte, FALLADIN y FOLIAKOWA, encuentran pequeñas cantidades de albúmina en cerebro, en comparación con grandes proporciones en los nervios periféricos con características estéricas muy parecidas a las de la albúmina sérica. Ambos resultados son similares a los nuestros en la desigualdad de la composición del cerebro de unas regiones a otras.

Conviene señalar aquí, como no existe uniformidad en la literatura mundial, respecto a las técnicas seguidas para la obtención de los esferegrans, (agar, celulosa, etc.), tampoco lo existe, en lo que respecta a la forma de obtención de las muestras cerebrales, tomando unos autores trozos de sustancias gris, otros de la blanca y finalmente otros de ambas a la vez. Así mismo tampoco existe un criterio unido en cuanto al número de muestras a conseguir de los cerebros y las zonas leídas para ellas. Todo esto justifica ampliamente, quizás la pluralidad y diversidad de los resultados hallados, como queda referenciado mas arriba.

Consideración aparte merecen, en cuanto al número de fracciones proteicas obtenidas. Nuestros resultados son idénticos a los de INESI y COLOMBO, (1.956), que habían encontrado en cerebro de conejo, de ocho a diez fracciones, carecen los nuestros de una fracción prealbumina y de una alta que ellos citan. Por el contrario son paradójicos en cuanto a la Albúmina, que para ellos, el máximo valor encontrado sería en CEREBRO, y en nuestros casos ya decíamos ha sido allí precisamente el menor valor hallado.

Puede igualmente a la luz de nuestros resultados trazar todo un estudio comparativo en la escala filogenética de una forma reducida, en aquellos que se ha realizado este tipo de experimentaciones. Para ello tendremos que remontarnos de nuevo a los precedentes históricos de los que dimos anteriormente noticias.

Con métodos primitivos anteriores a los de FISCHER, ya se habían separado 7 fracciones diferentes en el cerebro de rata por DICHAHN y colaboradores, es decir una menos de las que nosotros establecemos como normales en el conejo.

En cerebros de mamíferos son hallados, como decíamos 5 fracciones, es decir tres menos que nosotros por FISHI y colaboradores en 1.957. Por otra parte se consiguieron aislar seis fracciones es decir 2 menos que en nuestros conejos, por KEMP, (1.955), en el cerebro del cerdo. Ambos resultados fueron trabajando con el método de FISCHER. Las diferencias de animales y de método, hacen que la cantidad de fracciones aisladas sean diferentes a las de nuestros estudios.

Por el contrario con la Electroforesis en

papel, DEMLING, y colaboradores, en 1.954, logran separar hasta 7 fracciones en el gato, y GUBA y colaboradores en 1.960 en el cerebro de ratas separan igualmente 7 fracciones diferentes. En ambos casos puede observarse que comparativamente con nuestros hallazgos, carecen de una fracción, pues nosotros encontramos 8 bandas, diferencias explicables como antes decíamos por el diferente método empleado y los animales diferentes igualmente.

En gel de agar, y sobre almidón, también se han efectuado estos trabajos, y ALLEGRENZA y MARCHIO, (1.960), en la rata identifican siete fracciones. Recientemente entre nosotros y en contacto de células y igualmente sobre ratas, se están realizando estos trabajos electroforéticos, (CASTELLANOS MARTÍNEZ y colaboradores, 1.971).

En discos de poliacrilamida, por el contrario, y quizás debido a los mejor separado de las fracciones proteicas, en 1.965 por MONDRAU G. y CURINUS J.R., en cerebros humanos, son halladas hasta 15 bandas proteicas. Número como se observa mayor, que el obtenido en toda la literatura, por otros autores y otros animales como hemos visto.

A través de todo este estudio comparativo, de la bibliografía mundial con nuestros resultados, se desprende la enorme variabilidad de los valores de unas y otros autores, que nosotros interpretamos, como queda apuntado anteriormente, debido a las distintas metodologías seguidas por los autores, y a los complejos y variados pasos a seguir en las manipulaciones que hace, que sean difícilmente estandarizables y con ello, variables en unas y otras manos.

c) Individualidad química cerebral.-

Titulamos esta apartado, con este nombre, siguiendo las hipótesis de BOULJ, (1.959), que haha encontrado patrones bioquímicos diferentes, para cada uno de los cerebros por él analizados, llegando a la conclusión, de que existían una auténtica individualidad en cada uno de los ejemplares por él analizados.

Lo mas evidente de nuestros estudio, y de acuerdo con las teorías del autor arriba citada, ha sido el hallazgo de enfereogramas típicos, distintos de las zonas cerebrales exploradas, (Tablas 1 y 2), esto que al principio fue una sospecha, luego una hipótesis de trabajo, es ahora al final de él, una realidad palpable.

Esto nos anima a extraer una serie de deducciones científicas. Bien es sabido, que a pesar de estar ya algo pasadas de moda las viejas teorías localizacionistas, y de no admitirse hoy en día en toda su amplitud, si es cierto, que existe un relativo especialismo en las regiones cerebrales.

Por otra parte es sabido, que la estructura y morfología cerebral, varían igualmente de unas zonas a otras, y esto sucede tanto en el cortex, como en sustancia blanca, (HAM A. W. 1.969), habiéndose descrito infinidad de diferencias, que incluso han llegado a dar nombre y tipificar otras tantas formas de cortex.

Así pues existe una diferencia de morfología y estructuras en las diferentes zonas cerebrales, y una diferente composición bioquímica plasmada en nuestro trabajo en forma de unos patrones electroforéticos perfectamente deslindables de una a otra región, y finalmente decisiones más arriba, se admite un determinado especialismo en relación con la topografía cerebral. Así pues se nos ocurre de todo ello extraer, la conclusión, de que así como es evidente que la distinta morfología y estructura vayan aparejadas a distintas formas de composición proteica, también, estas últimas, podrían ir en relación con un funcionalismo distinto, y de esta forma, función, morfología y composición, formarían, -como es presumible-, un todo indiseñable, un armonioso ensamblaje.

Esta es pues, nuestra primordial conclusión, de este apartado, la especificidad distinta de los lóbulos y regiones cerebrales en cuanto a sus distintas proteínas, están unidas a una distinta morfología y bien pudiera ser causa o consecuencia remota de sus distintas funciones. Como ya decíamos antes, a parecida conclusión llega BOGGS, en relación con las sustancias blancas y gris cerebrales y sus funciones.

Todo este extrapalado a la escala sociológica puede ser de enorme importancia. Ya decíamos y veíamos, del análisis de la bibliografía mundial, como existían proteinogramas distintos para cada una de las especies animales con diferentes bandas en cada uno de ellos, viniendo a corroborar este la individualidad química cerebral de las especies animales.

Así pues complicado es el metabolismo de las proteínas cerebrales y todo cuanto en la literatura científica puede leerse apoya este acerto. Aun es mucho lo que queda por conocerse sobre ellas y muchas las hipótesis que se hacen.

En definitiva nuestros apartados este modo

te estudio sobre la naturaleza y composición del cerebro para abrir caminos y preparar rutas para ulteriores investigaciones y en este sentido lo concebimos. Siendo un trabajo experimental animal, pueden sin embargo extraerse alguna conclusión general por extrapolación hacia lo humano, y ser al menos punta de flecha hacia el futuro científico.

Semejantes estudios pueden y se están realizando en cerebros humanos y todo esto ayuda a develar nuestra oculta composición. Igualmente pueden plantearse esta metódica en cerebros patológicos, o bien realizarse en los normales, de determinadas manipulaciones que produzcan resultados patológicos para un ulterior estudio electrofisiológico.

Todo esto lo dejamos aquí planteado, como base de nuestros futuros trabajos, y así mismo para que sirva de estímulo y acicate a otros colegas en la labor investigadora.

TERCERA PARTE.
CONTENIDO.

CAPITULO OCTAVO

CONCLUSIONES

Llegados ya casi al final de nuestra experiencia, nos es obligado, trazar el correspondiente capítulo de conclusiones, para sintetizar de una forma definitiva nuestros criterios y a la luz de los hallazgos obtenidos y de sus interpretaciones ofrecer lo que obtenemos de ellos.

Todo ello, puede resumirse en diferentes puntos que detallamos a continuación.

I.- Aportamos una serie de manipulaciones, (modificadas de otros autores), para la obtención de la muestra y realización del homogeneizado posterior, que se muestran eficaces para la extracción de las proteínas solubles cerebrales del conejo.

II.- La electroforesis de tiras de acetato de celulosa, -CELLOCEL, como así mismo nuestros métodos de coloración y lectura nos proporcionan correctos electrogramas de las citadas proteínas solubles.

III.- En todos los casos de muestras 78 esferogramas, se obtuvieron 6 bandas distintas que identificamos como: una Prealbúmina; una Albúmina; una Alfa 1; una Alfa 2; una Beta 1; una Beta 2; una Gamma 1; y una Gamma 2 Globulinas.

IV.- El método estadístico aplicado a nuestros resultados, valores medios, desviaciones standard, errores standard, y valores extremos, da suficiente validez a los porcentajes hallados por nosotros, como para considerarlos como los patrones electroforéticos normales de las regiones cerebrales del conejo estudiadas.

V.- Los patrones electroforéticos confeccionados, tanto para los valores medios de cada lóbulo y región cerebral recogidos en las muestras, con los que se exponen en el cuadro de la página siguiente.

VI.- El hallazgo de unos esferogramas distintos y típicos de cada una de los lóbulos y regiones cerebrales explorados en otra de nuestras aportaciones.

VII.- El análisis de cada uno de los esfe-

VALORES MEDIOS

=====

REGIONES CEREBRALES	PREALBUMINA	ALBUMINA	ALFA 1	ALFA 2	BETA 1	BETA 2	GAMMA 1	GAMMA 2
LOBULO FRONTAL	2'5	16'1	13'4	15'3	15'3	14'6	12'6	11'2
LOBULO TEMPORAL	3'4	13'6	13'8	13'9	15'4	13'0	13'5	11'6
LOBULO PARIETAL	3'6	14'1	13'1	14'5	14'0	13'9	13'8	12'0
LOBULO OCCIPITAL	3'6	12'8	10'4	14'3	15'5	13'6	15'6	12'7
CEREBELO	2'7	11'3	11'8	14'5	15'0	15'3	16'1	11'5
TRONCOENCEFALO	2'6	11'7	13'3	14'7	13'2	14'8	12'8	10'1

regresos distintos de cada una de las zonas y el estudio porcentual de cada una de las fracciones nos hizo dividirlos en grupos según el predominio en ellos de cada una de las fracciones.

Encontramos entre esferogramas del tipo ALFA-BETA GLOBULINAS, por encontrarse en ellos un claro predominio de estas fracciones en LOBULO FRONTAL, TEMPORAL, PARIETAL, y TRUCCOENCEFALO.

Por el contrario hallamos los esferogramas del tipo BETA-GAMMA GLOBULINAS, por claro predominio de estas fracciones en LOBULO OCCIPITAL y CEREBELO.

VIII.- Por otra parte del análisis de los valores porcentuales diferentes para cada una de las fracciones por separado pueden extraerse otras series de consecuencias.

La Frenalbúmina es la fracción que constantemente alcanza unos menores porcentajes, con un mínimo de valor medio en LOBULO FRONTAL, de 2'5 %, y un valor medio máximo de 3'6 % en LOBULOS PARIETALES y OCCIPITALES.

La Albúmina presenta el valor medio máximo, en

LOBULO FRONTAL, con 16°1 ‰, y su valor mínimo de media, con 11°3 ‰ en el CEREBELO.

II.- La ALFA 1 GLOBULINA, posee su máximo de media, en LOBULO TEMPORAL, con 13°8 ‰ y su valor menor de media con 10°4 ‰ en LOBULO OCCIPITAL.

La ALFA 2 GLOBULINA, posee su mayor valor de media, en TRONCOENCEFALO, con un 14°7 ‰, y su mínimo de media, en LOBULO TEMPORAL, con un 13°9 ‰.

I.- La BETA 1 GLOBULINA, posee su máximo en LOBULO OCCIPITAL, con un 15°5 ‰ de media, y su media mas baja en TRONCOENCEFALO, con 13°2 ‰.

La BETA 2 GLOBULINA, tiene su máximo de media, en CEREBELO, con un 15°3 ‰ y su mínima de media, en LOBULO TEMPORAL, con un 13°0 ‰.

II.- La GAMMA 1 GLOBULINA, tiene su máximo en CEREBELO, con un 16°1 ‰ y su menor valor de media, en LOBULO FRONTAL, con un 12°6 ‰.

La GAMMA 2 GLOBULINA, por el contrario, tiene su máximo en LOBULO OCCIPITAL, con una media de 12°7 ‰ y su mínimo de media por el contrario en TRONCOENCEFALO, con un 10°1 ‰.

III.- Finalmente, de la observación del hecho primordial de nuestro trabajo, es decir del hallazgo de esferogramas típicos y distintos de cada una de las zonas cerebrales investigadas, nos induce a concluir, que la distinta composición proteica, se encuentra, en relación con la distinta estructura de las diversas regiones, y que bien pudiera ser causa o consecuencia lejana, de sus diferentes morfologías y funciones.

CAPITULO NOVENO

RESUMEN

Hemos realizado, un trabajo sobre potenciales cerebrales solubles en el cerebro del conejo, habiéndose elegido 12 ejemplares adultos normales de esta especie.

Se obtienen las muestras cerebrales, mediante determinadas manipulaciones, modificadas de las técnicas de otros autores.

Se describen detalladamente nuestros métodos electroforéticos en tiras de acetato de celulosa, -CELLOGEL-, justificando su uso y su preferencia sobre otros métodos.

Se describen los métodos de coloración y lectura para finalmente obtener los electrogramas en total en número de 72.

Finalmente se aplican los métodos estadísticos a nuestros resultados hasta la obtención de los patrones electroforéticos normales de las distintas regiones cerebrales exploradas.

A la vista de los resultados, se realiza

un estudio analítico, estableciendo unos patrones electroforéticos de tipo ALFA-BETA, y BETA-GAMMA, en virtud del predominio de esas fracciones en ellos.

Se establecen los índices de cada una de las fracciones proteicas y sus máximos y mínimos de cada una de las regiones.

Se realiza una comparación con los hallazgos de otros autores viendo la disimilitud de los resultados, que interpretamos en virtud de los distintos métodos y animales empleados.

Se establece la individualidad química cerebral de acuerdo con los distintos electrogramas de las diversas regiones analizadas concluyéndose que la diversidad de composición proteica va unida a una diversa estructura y puede ser causa e consecuencia lejana de ésta y de sus diferentes funciones.

Finalmente en 12 puntos concretos exponemos nuestras conclusiones aportadas.

CAPITULO DECIMO

BIBLIOGRAFIA

ALLIGRERA A. MARCHIO C. 1.960

"Electroforesi in agar di pro-
teine solubili di cervello di
ratto". Atti. Accad. Med. Lon-
bardia 15-32

ALLIGRERA A. MARCHIO C. 1.960

"Electroforesi in agar di pro-
teine solubili di cervello di
ratto" Giorn. Biochim. 9-1

ALLIGRERA A. MARCHIO C. 1.961

"Agar electroforesis of rat
and human brain soluble pro-
teins". The Protides of the
Biological Fluids . Bruges

BERNARD C. 1.966

"Introduction a l'etude de
la medicine experimental"
Editions Pierre Beland.
Paris.

BIRCH R. N. POLCH J. 1.959

"The effect of pH and salt con-
centration on aqueous extrac-
tion of brain proteins and li-
poproteins". J. Neurochem.
4-1.

BRILL J. 1.957

"Cerebral function and chemi-
cal composition". Acta Physiol.
Pharmacol. Neurl. 6-640.

CARAVALLI G. CHIARELLI P. 1.956

"Paper electrophoresis of solu-
ble proteins of the central
nervous tissue". experientia
12-303

CASTELLANOS F. 1.967

"Estudio electroforético de las proteínas del l.c.r.". Anales de la Universidad Hispalense. Volumen XXVII.

CASTELLANOS F. 1.969

"Estudio electroforético del l.c.r. en las atrofias cerebrales". Folia Neuropo. del E.S. de España. Vol. IV nº 2.

CASTELLANOS F. 1.969

"Estudio electroforético de las lipoproteínas y glicoproteínas del l.c.r.". Rev. Inf. Médico-Terapéutica. Año XLIV nº 10

CASTELLANOS F. 1.972

"Estudio electroforético de las proteínas solubles del cerebro de rata" in prensa

CHATAIGNON C. CHATAIGNON F. 1.960

"Etudes sur les protéines solubles de l'ammonin" II "électrophorèse en gelose et immunoelectrophorèse". Ann Biol. Clin 79-1

CHATAIGNON C. CHATAIGNON F. 1.960

"Etudes sur les protéines solubles du tissu nerveux" Ann. de Biol. Clin. nº 3-4 Mars-Avril

HOLLING y colaboradores 1.954

"Ulor die quantitative Zusammensetzung der or. onproteine" Ztsch. exp. Med. 122-416

- BINGHAM W., BRADY H.A., DAVIES H.C. 1.959
"The chemical fractionation
of rat brain proteins" J.N.
Neurochem. 4-154-1
- CHANDRAN R., DASGUPTA S. 1.954
"Beiträge zur Methodik der
papierelektrophoretischen
Serumanalyse" Klin. Wochenschr.
32-638
- GUHA S.K. y colaboradores. 1.960
"Paper electrophoresis of
soluble proteins of rat
brain" Ann. Biochem.
20-52
- GUY ROBERTS, GUNING J.M. 1.965
"Polyacrylamide disc elec-
trophoresis of the proteins
of cerebrospinal fluid and
brains"
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.
28-56
- HESSELVICK L. 1.959
"An electrophoretical study
of normal and pathological
body fluids". Act. Med.
Scand. 161-15
- IRISI G., COLAGONGO G. 1.958
"Influenza delle tossine neu-
rotrope sulle proteine indici
solubili del tessuto nervoso"
Nota II. Tossine botanica Spe-
rimentale 12-123
- SILVERI CARMELO J. 1.965
"Lecciones de Neuroanatomia Cli-
nica" 2ª Ed. G. & H.A. Sevilla.

KUPF . 1.955.

"Zur Kenntnis der Eiweißkörper
des Gehirns" Confin. Neurol. 15

KABAT L.A., LATOUCHE H., MOORE D.H. 1.942

"Electrophoretic patterns of con-
centrated C.S.F. Proc. Soc. Exper.
Biol. Med. 49-260

KARCHER D., VAN BASTEN B., LONJHEVAL A. 1.957

"Electrophoresis des proteines
du L.C.F." Act. Clin. Belg.
4-538

KA CHEN P., VAN SCHAPEL C., LONJHEVAL A. 1.957

"Interet clinique des electropho-
regrammes des proteines du L.C.F."
Act. Clin. Belg. 12-538

KIYOTA K. y colaboradores 1.959

"Electrophoretic fraction of
the soluble brain". Folia
Psych. Neurol. Jap. 13-23

LACHURE CH. 1.965

"Les proteines du liquide C.S.F.
a l'etat normal et pathologique"
Editions Arscia S.A.

ROBERTSON D.K. 1.957

"The electrophoretic separation
of the soluble proteins of the
brain" J. Neurochem. 1-358

ROBERTSON D.K. 1.960

"The paper electrophoretic distri-
bution of soluble proteins in
different regions of human brain"
J. Neurochem. 5-145

RODRIGUEZ L. S. G. 1.957

"Fraccionamento electroforético de extractos acuosos de tegumento cerebral" Giorn. Mich. Neurop. 85-103

RODRIGUEZ B.F. 1.944

"Elektrische (Kathoden) Trennung der Eiweißkörper in Liquor cerebrospinalis von entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems" Arch. Psych. 219-251

RODRIGUEZ F.O. 1.957

"Ions Metabolism of the nervous system" Edit. B. Richter Pergamon Press, London p. 35

RODRIGUEZ F.O. 1.

"Zoologia General" p. 937

SALLAS H.H. STAIN H.H. 1.951

"Studies on lysozyme" J. Am. Chem. Soc. 73-2.971

TAYLOR D.C. H. DE GAARD G.A. 1.956

"The analysis of complex protein solutions by solubility methods and its application to the proteins of the central nervous system". Psych. Res. Reports Am. Psych. Assoc. p. 31

TAYLOR G. 1.937

"Ein neuer Apparat für die elektrophoretische Analyse von Kolloidmischungen" Zentr. f. Phys. Chem. 33-524

TONINI G. MICHAEL G. 1.957

"Compartimento elettroforético
di estratti proteici cerebrali
in tamponi ad alta forza ionica"
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.
11-204

VAN BASTEL G. 1.962

"Contribution a l'étude des pro-
teines cerebrales et deux enzy-
mes, (la deshydrogenase de l'a-
cide lactique et la deshydrogenase
de l'acide malique) du système
nerveux central. Ann. Soc. Sc.
Med. et Natur de Bruxelles.
Vol 19-1

WIKERMAN G. MOYER A.

"An Anatomical Guide to Experi-
mental Research on the Rabbit's
Brain"

CAPITULO UNICO.

INDICE

I	JUStIFICACION	5
II	PLAN DE LA OBRA	11

PRIMERA PARTE
ESTADÍSTICA GENERAL

III	CAPITULO PRIMERO " Introducción" ..	15
IV	CAPITULO SEGUNDO "Concepto y evolu- ción histórica"	20
V	CAPITULO TERCERO " Materiales"	20
VI	CAPITULO CUARTO " Métodos"	34

SEGUNDA PARTE
ESTADÍSTICA DE LA INDUSTRIA

VII	CAPITULO QUINTO "Resultados"	64
VIII	CAPITULO SEXTO "Estudio estadístico	74
IX	CAPITULO SEPTIMO " Comentarios" ...	93

TERCERA PARTE
ESTADÍSTICA DE LA AGRICULTURA

X	CAPITULO OCTAVO " Conclusiones" ...	112
XI	CAPITULO NOVENO "Focuseo"	119
XII	CAPITULO DECIMO " Bibliografía"....	121