

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGIA Y LEGISLACION SANITARIA

NUEVAS TECNICAS
EN
INMUNOHEMATOLOGIA FORENSE

MEMORIA PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR

FCO. JAVIER PACHON PAVON

INDICE

	Pag.
INDICE.....	1
INTRODUCCION.....	9
JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.....	17
 <u>GENERALIDADES SOBRE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS</u>	
 <u>SISTEMA GLOBULINAS G.C. (G.c.)</u>	
I. INTRODUCCION.....	22
- SINONIMOS.....	23
II. CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS.....	23
III. FUNCION.....	25
IV. GENETICA DE LOS GRUPOS Gc.....	27
 <u>SISTEMA OROSONOICOIDE (O R M)</u>	
I. INTRODUCCION.....	33
- DEFINICION.....	33
- SINONIMOS.....	34
II. CARACTERISTICAS FISICAS.....	34
III. CARACTERISTICAS QUIMICAS.....	35
- PRECIPITACION.....	35
- COMPOSICION.....	35
- ESTRUCTURA.....	35
IV. FUNCION.....	36

V. GENETICA.....	37
- POLIMORFISMOS.....	39

SISTEMA DE LAS TRANSFERRINAS (Tf)

I. INTRODUCCION.....	41
- SINONIMOS.....	42
II. CARACTERISTICAS FISICAS.....	42
III. CARACTERISTICAS QUIMICAS.....	42
- PRECIPITACION.....	42
- COMPOSICION.....	42
- ESTRUCTURA.....	43
IV. FUNCION.....	44
V. GENETICA.....	45
- POLIMORFISMOS.....	47

ALFA 2HS GLICOPROTEINA(A.H.S.G.)

I.- INTRODUCCION.....	48
- SINONIMOS.....	49
II. CARACTERISTICAS FISICAS.....	49
III. CARACTERISTICAS QUIMICAS.....	49
- PRECIPITACION.....	49
- COMP. QUIMICA Y ESTRUCTURA.....	50
IV. FUNCION.....	50
V. GENETICA.....	50
- POLIMORFISMOS.....	54

INMUNOBLOTTING

I. INTRODUCCION.....	56
II. ELECCION DE LA TECNICA.....	57
- CARACTERISTICAS DE LAS DIFERENTES TECNICAS.....	58
A.-DIFUSION.....	58
B.-FLUJO DE LIQUIDOS.....	59
C.-ELECTROBLOTTING.....	59
III. TAMPON DE TRANSFERENCIA.....	61
A.-SELECCION DEL PH ADECUADO.....	61
B.-SELECCION DE LOS ADITIVOS.....	62
C.-SELECCION DE LA T _a DE TRABAJO.....	63
IV. MEMBRANAS DE TRANSFERENCIAS.....	63
A.- MEMBRANAS DE NITROCELULOSAS (NC).....	63
B.- MEMBRANAS DE NYLON-BASED.....	64
C.- MEMBRANAS DE POLIVINILDIFLUORIDE (PVDF).....	64
V. FIJACION DE LAS MUESTRAS A LAS MEMBRANAS.....	65
VI. DETECCION DE LOS INMUNOBLOTTING.....	66
A.- TINCIONES GENERALES.....	66
B.- CON METALES COLOIDALES.....	66
C.- POR EL SEGUNDO ANTICUERPO.....	67

MATERIALES Y METODOS

I.- GENERALIDADES ANALITICAS PARA LOS SISTEMAS ESTUDIADOS	
A.- OBTENCION DE MUESTRAS.....	70
B.- METODO ELECTROFORETICO.....	72

B ₁ - MATERIALES ELECTROFORETICOS.....	72
B ₂ - CARACTERISTICAS DE LOS GELES.....	73
- MOLDE.....	73
- SOPORTE.....	74
- SOLUCION STOCK.....	78
- POLIMERIZACION.....	84
II.-PARTICULARIDADES ANALITICAS DE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS.....	86
A.- SISTEMA DE LAS GLOBULINAS Gc.....	86
A ₁ - TRATAMIENTO DE MUESTRAS.....	86
A ₂ - CARACTERISTICAS DE LOS GELES.....	87
1.- GELES CON SACAROSA.....	87
- TAMAÑO.....	87
- CONCENTRACION.....	87
- COMPOSICION.....	87
- POLIMERIZACION.....	88
2.- GELES CON GLICEROL.....	88
- TAMAÑO.....	88
- CONCENTRACION.....	88
- COMPOSICION.....	88
- POLIMERIZACION.....	89
A ₃ - CONDICIONES ELECTRICAS.....	89
B.- SISTEMA DEL OROSOMUCOIDE.....	90
B ₁ - TRATAMIENTO DE MUESTRAS.....	91
B ₂ - CARACTERISTICAS DE LOS GELES.....	92
MUESTRAS SIN DESIALIZAR.....	92

1.- GELES CON SACAROSA.....	92
- TAMAÑO.....	92
- CONCENTRACION.....	92
- COMPOSICION.....	92
- POLIMERIZACION.....	92
2.- GELES CON GLICEROL.....	93
- TAMAÑO.....	93
- CONCENTRACION.....	93
- COMPOSICION.....	93
- POLIMERIZACION.....	93
MUESTRAS DESIALIZADAS.....	94
1.- GELES CON SACAROSA.....	94
- TAMAÑO.....	94
- CONCENTRACION.....	94
- COMPOSICION.....	94
- POLIMERIZACION.....	94
2.- GELES CON GLICEROL.....	95
- TAMAÑO.....	95
- CONCENTRACION.....	95
- COMPOSICION.....	95
- POLIMERIZACION.....	95
B ₃ - CONDICIONES ELECTRICAS.....	96
C.- SISTEMA DE LAS TRANSFERRINAS.....	97
C ₁ - TRATAMIENTO DE MUESTRAS.....	97
C ₂ - CARACTERISTICAS DE LOS GELES.....	99

MUESTRAS SIN DESIALIZAR.....	99
1.- GELES CON SACAROSA	99
- TAMAÑO.....	99
- CONCENTRACION.....	99
- COMPOSICION.....	99
- POLIMERIZACION.....	99
2.- GELES CON GLICEROL.....	100
- TAMAÑO.....	100
- CONCENTRACION.....	100
- COMPOSICION.....	100
- POLIMERIZACION.....	101
MUESTRAS DESIALIZADAS.....	101
1.- GELES CON SACAROSA	101
- TAMAÑO.....	101
- CONCENTRACION.....	101
- COMPOSICION.....	101
- POLIMERIZACION.....	101
2.- GELES CON GLICEROL.....	102
- TAMAÑO.....	102
- CONCENTRACION.....	102
- COMPOSICION.....	102
- POLIMERIZACION.....	102
C ₃ - CONDICIONES ELECTRICAS.....	103
D.- SISTEMA DE LAS α_2 GLICOPROTEINAS.....	104
D ₁ - TRATAMIENTO DE MUESTRAS.....	105

D ₂ - CARACTERISTICAS DE LOS GELES.....	106
MUESTRA SIN DESIALIZAR.....	106
1.- GELES CON SACAROSA.....	106
- TAMAÑO.....	106
- CONCENTRACION.....	106
- COMPOSICION.....	106
- POLIMERIZACION.....	106
2.- GELES CON GLICEROL.....	107
- TAMAÑO.....	107
- CONCENTRACION.....	107
- COMPOSICION.....	107
- POLIMERIZACION.....	107
MUESTRA DESIALIZADAS.....	108
1.- GELES CON SACAROSA.....	108
- TAMAÑO.....	108
- CONCENTRACION.....	108
- COMPOSICION.....	108
- POLIMERIZACION.....	108
2.- GELES CON GLICEROL.....	109
- TAMAÑO.....	109
- CONCENTRACION.....	109
- COMPOSICION.....	109
- POLIMERIZACION.....	110
D ₃ - CONDICIONES ELECTRICAS.....	110
III.METODO ESTADISTICO.....	111

IV. METODOS DE TINCION	
I. INTRODUCCION.....	117
II. GENERALIDADES SOBRE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS.....	118
- INMUNOTINCION.....	118
- INMUNOBLOTTING.....	121
III.- PARTICULARIDADES SOBRE EL METODO DE INMUNOTINCION.....	124
- INMUNOFIJACION.....	124
- TINCION.....	125
IV.- PARTICULARIDADES SOBRE EL SISTEMA DE INMUNOBLOTTING.	
- INMUNOBLOTTING.....	135
- DETECCION POR EL SEGUNDO ANTICUERPO.....	137
RESULTADOS.....	142
DISCUSION.....	159
CONCLUSIONES.....	176
BIBLIOGRAFIA.....	180

I N T R O D U C C I O N

Las manchas de sangre suelen ser frecuentemente el principal indicio obtenido en la escena del crimen. Esto ha hecho que tanto por su frecuencia, como por la importancia de los resultados individualizadores obtenidos en sus estudios, sea uno de los pilares más importante dentro del campo de la Biología Forense.

Los análisis destinados a la individualización de las manchas de sangre, están perfectamente sistematizados, y es norma obligada en todos los laboratorios seguir rigurosamente los diferentes pasos del proceso, que podemos esquematizar de la siguiente forma:

1.- DIAGNOSTICO GENERICO:

A.- PRUEBAS DE ORIENTACION

B.- PRUEBAS DE CERTEZA.

2.- DIAGNOSTICO ESPECIFICO.

3.- DIAGNOSTICO INDIVIDUALIZADOR.

DIAGNOSTICO GENERICO:

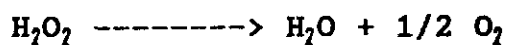
A.- Pruebas de orientación:

- Reacción de Adler.

- Reacción de Kastle-Meyer.

- Reacción del Piramidón.

Su fundamento científico consiste en poner de manifiesto la existencia de la enzima peroxidasa de los hematies, según la siguiente reacción:



Peroxidasas

La liberación del Oxígeno, produce el cambio de coloración en el reactivo utilizado. Ejem. Bencidina, Fenoftaleína, Piramidón etc.

Falsos positivos:

- Este tipo de reacciones suelen dar positivo con los oxidantes químicos.

- Las peroxidasas de las plantas, reaccionan comúnmente con la fenoftaleína. Este tipo de peroxidasa, se inactiva rápidamente con el calor y con el paso del tiempo.

- La presencia de Oxígeno libre en el Agua Oxigenada utilizada.

Falsos negativos:

- Se suelen presentar cuando las manchas de sangre han sido sometidas a lavados.

- Cuando la muestra es muy escasa.

Valor de la prueba:

Solamente tiene valor en el caso de ser negativa, pudiéndose afirmar que la mancha no es de sangre, y por tanto concluimos el análisis en este punto. En caso contrario, solamente nos indica que se debe de continuar la secuencia de estudio.

B.- Pruebas de certeza:

1.- Cristalográficas:

- Teichman.
- Gabriel Bertrand.
- Takayama.
- Nina Asvadurova.
- Szrizwosky.

2.- Métodos espectrofotométricos.

Pruebas cristalográficas:

Su fundamento científico consiste en la determinación de la existencia de Hemoglobina, mediante la formación microscópica de cristales de halogenuros de hematina, según la reacción siguiente:

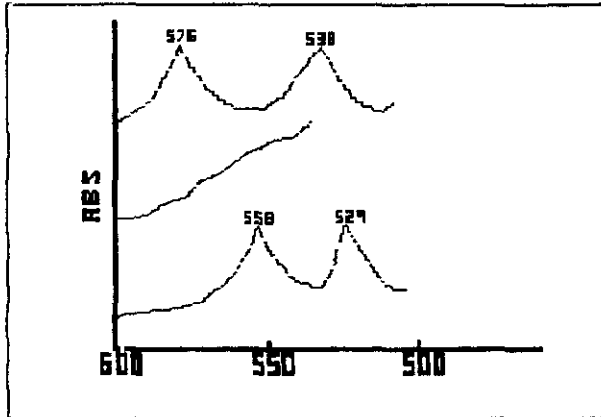




MICROFOTOGRAFIA DE CRISTALES DE TRICHMAN, SEGUN LA TECNICA DE G. BERTRAND

Pruebas espectrofotométricas:

Están indicadas cuando las manchas son de mucha antigüedad, o cuando fallan las primeras. La extracción de las manchas se realiza con Lauril sulfato sódico, en presencia de Mercaptoetanol. En estas condiciones, la Hb presenta dos picos de absorción, uno a 558nm y el otro a 529nm.



Espectrofotometría de absorción de la Hemoglobina.

NOTA: DE LA PARTE SUPERIOR A LA INFERIOR: OXIHEMOGLOBINA, MANCHA DE SANGRE EXTRAIDA CON AGUA, Y MANCHA DE SANGRE EXTRAIDA CON LAURIL SULFATO SODICO Y TRATADA POSTERIORMENTE CON AMONIACO Y MERCAPTOETANOL.

Falsos positivos:

- Es muy poco probable obtener falsos positivos.
- Cuando se presentan suelen deberse a errores de interpretación del analista.

Falsos negativos:

- La poca cantidad de muestra.
- El lavado de la misma.
- La falta de experiencia del analista para buscar los cristales entre las fibras de los tejidos textiles etc.

Valor de la prueba:

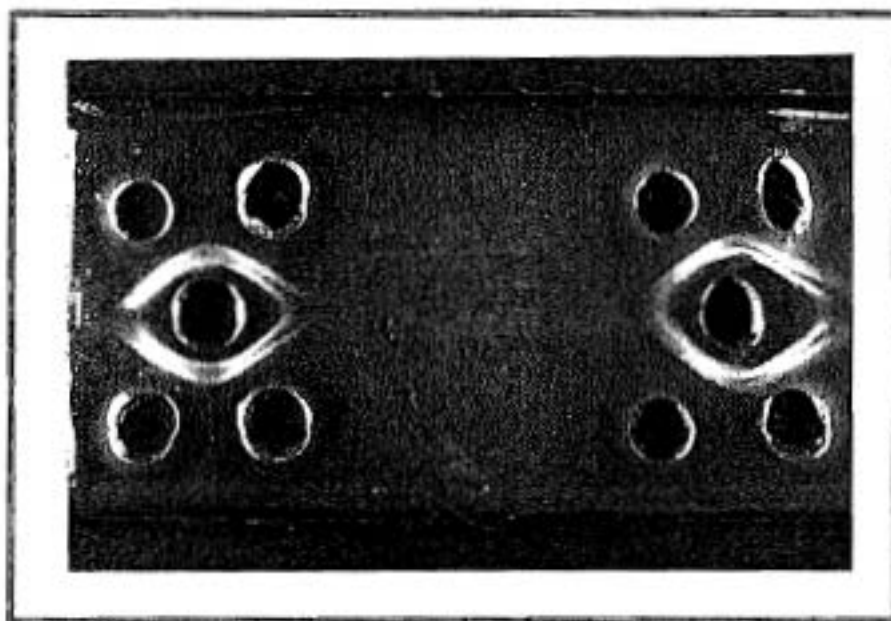
La negatividad de la prueba asegura la no presencia de sangre en la mancha. Cuando esta es positiva, indica sin lugar a duda la existencia de sangre, y obliga a continuar la marcha analítica.

DIAGNOSTICO GENERICO:

Está basado en la reacción Antígeno-Anticuerpo. El número de técnicas inmunológicas para la identificación de la especie a la que pertenece una mancha de sangre es muy variado, dependiendo siempre de la interacción Ag-Ac.

Entre todas ellas las más usadas en los laboratorios son:

- El test de Inmunodifusión radial de Ouchterlony.
- Test de precipitación de Huelenhuth.
- Inmunoelectroforesis.
- etc.



TEST DE DOBLE INMUNODIFUSION RADIAL DE OUCHERLONY

Falsos negativos:

- Baja sensibilidad del antisuero elegido.
- Deterioro de la proteína o proteínas del suero que actúan como antígenos.
- Mal desarrollo de la técnica empleada.

Falsos positivos:

- Escasa especificidad del antisuero obtenido.
- Especies animales muy próxima en la escala zoológica.

Valor de la prueba:

Cuando esta es positiva, indica la especie animal de la que proviene la mancha de sangre. Ante la negatividad de misma, se puede pensar en una falta de sensibilidad del antisuero elegido, o bien en un deterioro de las proteínas que actúan como sustancias antigénicas.

DIAGNOSTICO INDIVIDUALIZADOR:

La individualización, es el objetivo final del estudio de las manchas de sangre. A tal fin, la Biología Forense se vale de la identificación de los marcadores genéticos eritrocitarios y plasmáticos que habitualmente se utilizan en el estudio de paternidades, usando con frecuencia las mismas

técnicas que en estos casos. Desafortunadamente, no todas ellas son aplicables a diagnóstico individualizador de las manchas ya que los marcadores genéticos son muy sensibles a situaciones tales como la desecación, cambios de temperaturas, etc.

Por otra parte, en este apartado final, cada laboratorio utiliza sus propios marcadores, escogidos en base a los rendimientos que estos ofrecen y a la experiencia que con ellos se tengan. De manera representativa, podemos esquematizar los de mayor utilización de la siguiente forma:

1.- ERITROCITARIOS:

- SISTEMA ANTIGENICO ABO.
 - ABSORCION ELUCION
 - ABSORCION INHIBICION
- SISTEMAS ENZIMATICOS.
 - FOSFOGLUCOMUTASA LOCUS₁
 - FOSFATASA ACIDA ERITROCITARIA

2.- PLASMATICO:

- Gc GLOBULINAS
- HAPTOGLOBINAS
- ETC.

NOTA: EN ESTE ESQUEMA SOLAMENTE ESTAN REPRESENTADOS LOS MARCADORES QUE SUELEN SER USADOS POR LA MAYORIA DE LOS LABORATORIOS DE BIOLOGIA FORENSE.

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

La variación genética en la sangre tiene interés médico-legal desde dos puntos de vista, por un lado la investigación de la paternidad, y por otro, la identificación. En el primer caso, la tipificación de los marcadores genéticos está encaminada a demostrar si una persona es ó no el posible padre biológico de un niño. En el segundo caso, la información obtenida de la tipificación genética sanguínea, puede utilizarse por ejemplo, para determinar si una mancha de sangre pertenece a un individuo determinado. Antes de 1.965, se conocían pocas marcadores genéticos, apenas una docena de marcadores de grupos sanguíneos (ABO, Rh, etc.) y algunos de proteínas séricas. Sin embargo, desde entonces, la situación ha cambiado por completo. Con la aparición de la técnica de Isoelectroenfoque, tal y como se conoce hoy en día, desarrollada por Kolin (1.958) y Svenson(1.961), (Pharmacia Fine Chemicals, 1.982), se ha demostrado que una proporción realmente significativa de las proteínas sanguíneas (aproximamente el 30%), presentan polimorfismos genéticos frecuentes.

Posteriormente, con el desarrollo de la

técnica del "D.N.A. Fingerprint", desarrollada por Jeffrey (1.985), con sus dos variantes, Multi-locus y Single-locus, parecía que solucionaba la doble problemática médico-legal de la sangre. La realidad es que si bien el Fingerprint soluciona el 100% de los casos de paternidad, salvo gemelos monocigóticos, (ICI Innovation, 1.987), en el caso de las manchas de sangre, el estado de conservación de las muestras es crítico para dicha técnica. Por tanto, y aunque el último eslabón en el análisis de las manchas de sangre sea la individualización mediante D.N.A. Fingerprint, el estudio previo de los ya tradicionales marcadores genéticos es imprescindible, puesto que sirven para descartar a los posibles autores de una mancha de sangre. Con bastante frecuencia, y debido al estado de las muestras, son los estudios sobre polimorfismos genético-moleculares las únicas técnicas individualizadoras que se pueden realizar sobre las manchas problema.

Un marcador genético es genéticamente polimórfico cuando muestra, en distintos individuos, diferencias en sus características y en la expresión hereditaria que permiten clasificar esos individuos en tipos diversos (Harris, 1.971).

La validez de los estudios sobre

polimorfismos genéticos-moleculares utilizados con fines individualizadores por la Biología-Forense se basa en los siguientes principios:

1Q.- Sus diferentes expresiones fenotípicas permiten inferir los genotipos inherentes.

2Q.- Su distribución poblacional es de tipo discontinuo, lo que quiere decir que cada individuo queda asignado a una clase fenotípica concreta.

3Q.- Son inalterable a lo largo de la vida del individuo.

(Harrison, 1.977).

La incorporación de nuevos marcadores genéticos a los estudios individualizadores sobre manchas de sangre es un hecho necesario, ya que al definir un mayor número de características genéticas de las mismas, más estrechamos el rango de posibilidades de encontrar a una persona cuyas características fenotípicas coincidan con las obtenidas en los estudios de las manchas. De esta manera, la incorporación de los cuatro nuevos marcadores plasmáticos: Gc globulinas, Transferrinas, Orosomucoide y Alfa₂-glicoproteínas objeto del presente estudio, contribuye a aumentar el poder de

discriminación sobre las manchas de sangre.

La técnica empleada para el presente trabajo es el Isoelectroenfoque en gel de Poliacrilamida (P.A.G.I.F.), debido a que es la técnica separativa con mayor poder de discriminación, permitiendo discriminar dos sustancias con una diferencia de Ph de 0.1.

Como técnica identificativa, se ha utilizado la inmunofijación en membranas de Nitrocelulosa, Polivinil Difluoride y Nylon, seguida por la identificación mediante un segundo antisuero peroxidasa conjugado. El motivo de esta elección fue en base a:

1º.- La disponibilidad en el mercado de los cuatro antisueros correspondientes a las proteínas estudiadas.

2º.- La mayor sensibilidad que ofrece la identificación mediante antisueros específicos, frente a las tinciones convencionales.

3º.- La mejor resolución obtenida mediante la visualización con el segundo antisuero peroxidasa conjugado.

Los objetivos pues del presente trabajo son:

1º.- Aportar cuatro nuevas técnicas para

el estudio de los siguientes marcadores genéticos:
Gc-globulinas, Transferrinas, Orosomucoide y Alfa₁-
glicoproteínas.

29.- Demostrar la posibilidad de la
aplicación rutinaria de dichos marcadores en la
identificación de manchas de sangre.

30.- Demostrar que la inmunofijación,
seguida de la identificación mediante el segundo
antisuero peroxidasa conjugado, ofrece mayor
sensibilidad en el estudio de las manchas de sangre
que las tinciones convencionales.

GENERALIDADES SOBRE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS

SISTEMA GLOBULINAS G.C. (G.c.)

E S Q U E M A

I. INTRODUCCION

- SINONIMOS

II. CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS

III. FUNCION

IV. GENETICA DE LOS GRUPOS Gc.

I. INTRODUCCION.

El sistema de las Gc, son unas glucoproteínas que tradicionalmente se incluyen en la fracción α_2 de la electroforesis convencional del suero humano, donde también se encuentran las Haptoglobinas, Ceruloplasmina, Macroglobulinas α_2 y algunas Lipoproteínas entre otras.

Fue detectada por primera vez en 1.959 por Hirschfeld, quien mediante técnicas de inmuno-electroforésis encontró tres arcos de inmuno-precipitación a los que denominó "1", "2" y "3". Los tipos "1" y "3", presentaban un solo arco , mientras que el tipo "2", presentaba ambos arcos. Por otro lado el tipo "2", era electroforéticamente indistinguible de un suero fabricado con una mezcla de los tipos "1" y "3".

- SINONIMOS:

Globulinas Gc (Schultze 1.962), Factor Gc (Cleve y col. 1.964), Ps-20 (Schultze y col. 1.962), M-2 (Mehl y col. 1.949), Postalbúmina 2+3 (Smithies 1.955), Componente específico de grupo (Hirschfeld 1.959). (Recogido de Kawai. 1.977).

II. CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS Y ESTRUCTURA

Las Gc. esta formada por unos 434 aminoácidos (Kawai, 1.977) y para otros por 450 (Svasti y col. 1.979 ; Cove y col. 1.983), lo que le confiere un Pm comprendido entre 50.800 y 56.000.

En su composición intervienen como

aminoácidos principales el Aspártico y el Glutámico. No contiene Lípidos y posee un 4.2% de Hidratos de Carbono, principalmente 2% de Hexosa, 2% de Hexosamina, 0% de Acido Siálico y 0.2% de Fucosa. Bearn y col. (1.964), no encontraron diferencias obvias en la composición de aminoácidos entre las Gc1 y las Gc2.

Bowman y Bearn (1.965), llegaron a la conclusión de que en la estructura de las Gc existía dos subunidades, cada una de las cuales tendría un Pm aproximado de 25.000, y estarían unidos por puentes disulfuros. Resumiendo, podemos decir que están compuestas por dos cadenas con un 95.8% de fracción protéica y un 4.2% de azúcares, faltando los Lípidos y el ácido Neuramínico.

Precipitan bajo las siguientes condiciones: etanol al 40% (Ph 5.8, concentración iónica 0.09, proteína 1%). Sulfato Amónico 2-2.4 M (Ph 5, proteína 2%), Solución acuosa de Rivanol 0.0065 M (Ph 8, proteína 1%), Acido Tricloroacético 0.15 M (proteína 1%), Calentamiento (Ph 5, solución reguladora de Acetato 0.1 M, proteína 1%). No precipita con Acido Perclórico 0.6 M, pero adquiere ligera turbidez. (Kawai y col. 1.977).

III. FUNCIONES

Thomas y col. (1.959), encontraron una α -globulina en el suero humano a la que denominaron BDP, encargada del transporte de la Vitamina D y de sus metabolitos. Posteriormente, Daiger y col. (1.975), Bovillon y col. (1.976), Imawari y Goodman (1.977), Kawakami y Goodman (1.981), demostraron que se trataba de la misma proteína descubierta por Hirschfeld en 1.959. Por lo tanto, quedaba establecido que la función de las Gc era el transporte de la Vitamina D y sus derivados.

Las relaciones entre la Vitamina D, el color de la piel, las radiaciones solares y las proteínas Gc, sugiere la posibilidad de que los diferentes tipos de Gc estén relacionados con el clima. A este respecto, Mourant (1.976) y Constans y col.(1.980), establecieron que en poblaciones con alta intensidad de radiaciones ultravioleta, la frecuencia del alelo Gc-2 es más baja, en cambio, el subtipo Gc-1F, es más frecuente en poblaciones cuyo índice de radiación es mayor. Por otro lado el exceso de concentración de Gc con respecto a la Vitamina D y sus derivados plasmáticos, así como la idéntica afinidad que presentan las Gc-1 y las Gc-2 por la

Vitamina D, hace que la ventaja selectiva no esté clara.

Kawakami y Goodman (1.981), calcularon la concentración media de la proteína Gc en el suero humano, estableciéndola entre 3 y 6 mg/ml. Cada molécula de Gc, solamente tiene un lugar de unión para la Vitamina D, Haddad y Walgate (1.976), pero sin embargo, la Gc es tan abundante en la economía plasmática, que solamente se utiliza el 1-2% de los lugares reservados para el transporte y almacenamiento de los metabolitos de la Vit. D. (Haddad y col. 1.976).

Presenta gran afinidad por los monómeros de Actina (Cooke y col. 1.979), formando complejos 1:2 M (Van Baelen y col. 1.980). No se conoce muy bien la función de los complejos Gc-Actina, pero parece ser que evitaría que los monómeros de Actina polimericen en las fibras musculares (Lees y col. 1.984). Para otros autores, la Actina, actuaría facilitando la unión del complejo Vit.D-Gc a los receptores de superficie de las células blanco (Kamboh y Ferrell 1.986).

Se ha observado que las Gc se encuentran asociada a algunos tipos celulares como los Linfocitos B (Petrini y cols. 1.983), subpoblaciones

de Linfocitos T (Petrini y cols. 1.985) y a los citotrofoblastos placentarios (Cooke y cols. 1.986).

En todos los individuos estudiados, jamas se ha encontrado un homocigótico para el déficit de esta proteína, lo que indica que al menos una de las funciones comentadas es crítica para la supervivencia (Cooke y cols. 1.986).

Eales (1.987), han encontrado relación entre los patrones Gc 1F-1F (terminología actual) y la mayor susceptibilidad de estos individuos a la infección por el virus HIV, mientras que los patrones Gc 2-2 (terminología actual), presentan mayor resistencia a la misma. Este hecho, parece deberse a la posibilidad de que las Gc estén implicadas en la unión del HIV a las membranas celulares, fenómeno en el cual el ácido siálico puede desempeñar un papel importante, ya que la Gc 1F presenta dos residuos de dicho ácido, mientras que las Gc 2 no contienen ninguno.

IV. GENETICA DE LOS GRUPOS GC

Los tres grupos de Gc vienen determinados por un par de alelos codominantes a los que Hirschfeld y cols. (1.960), denominaron Gc-1 y Gc-2.

De esta manera, el grupo "1" y "3", serían homocigótico para los alelos Gc-1 y Gc-2 respectivamente, mientras que el grupo "2" es heterocigótico.

De esta manera, la terminología para los grupos Gc quedó de la siguiente manera: Gc 1-1 para la fracción con mayor movilidad electroforética. Gc 2-2 para la fracción más lenta, y Gc 1-2 para la fracción de movilidad intermedia.

Por schultze y cols. (1.962), se demostraron los fenotipos anteriores mediante electroforesis en geles de almidón, (Giblett, 1.969). Por Johnsos y cols. (1.975) utilizando geles de agarosa, y por Kitchin y cols. (1.965) utilizando geles de poliacrilamida. Aceptándose en general la existencia de un fenotipo Gc 1 (homocigótico para el alelo Gc 1), un Gc 2 (homocigótico para el alelo Gc 2) y un fenotipo Gc 1-2 (heterocigótico para los dos alelos). Así mismo, se estableció que las diferencias entre las bandas 1 (rápidas) y las bandas 2 (lentas), eran de naturaleza postranscripcional, interviniendo el número de restos de ácidos siálicos (Gc 1 con dos restos y las Gc 2 que carece de ellos).

Svasti y Bowman (1.987); Cleve y Patutschnick (1.979). En los individuos con cirrosis

alcohólica se ha encontrado un resto de Ac. Siálico extra en sus Gc (Constans y cols. 1.983). Las relaciones entre los diferentes comportamientos electroforéticos y los restos de ácidos siálicos quedo demostrada por Thyman y cols, (1.985).

Gracias a la utilización de la técnica de Isoelectroenfoque en geles de Poliacrilamida con rangos de Ph estrechos (P.A.G.I.F.), han permitido el descubrimiento de un nuevo fenotipo, muy próximo al Gc 1, quedando desdoblado el Gc 1 en Gc 1F (Fast), y Gc 1S (Slow), atendiendo a la mayor velocidad de emigración de las 1 F con respecto a las 1 S. (Diferentes Puntos Isoeléctricos).

De esta manera en la actualidad, se acepta que los fenotipos de las Gc están codificados por tres alelos codominantes, que determinan a 6 genotipos diferentes, denominados: Gc 1F-1F, Gc 1S-1S, Gc 2-2, Gc 1F-2, Gc 1S-2 y Gc 1F-1S. (Constans y Vian, 1.977).

Mediante la utilización del PAGIF, se ha logrado detectar hasta 90 variantes diferentes de esta proteína, (Revisión de Kamboh y Ferrell 1.986). La terminología para designar a estas variantes, fueron propuestas por Constans y cols. (1.979), siendo la siguiente:

a.- Las variantes de doble banda son denominadas Gc 1.

b.- Las de banda simple Gc 2.

b₁.- Las bandas más anódicas a la banda 2 convencional, se les denominan Gc 2A.

b₂.- Las más catódicas a la banda 2 convencional, son denominadas Gc 2C.

c.- La banda catódica de la Gc 1S es considerada como referencia para variantes de doble banda:

c₁.- Las que son más anódica que Gc 1S se denominan Gc 1A

c₂.- Las que son más catódicas se denominan como Gc 1C.(Ver Fig.- 1).

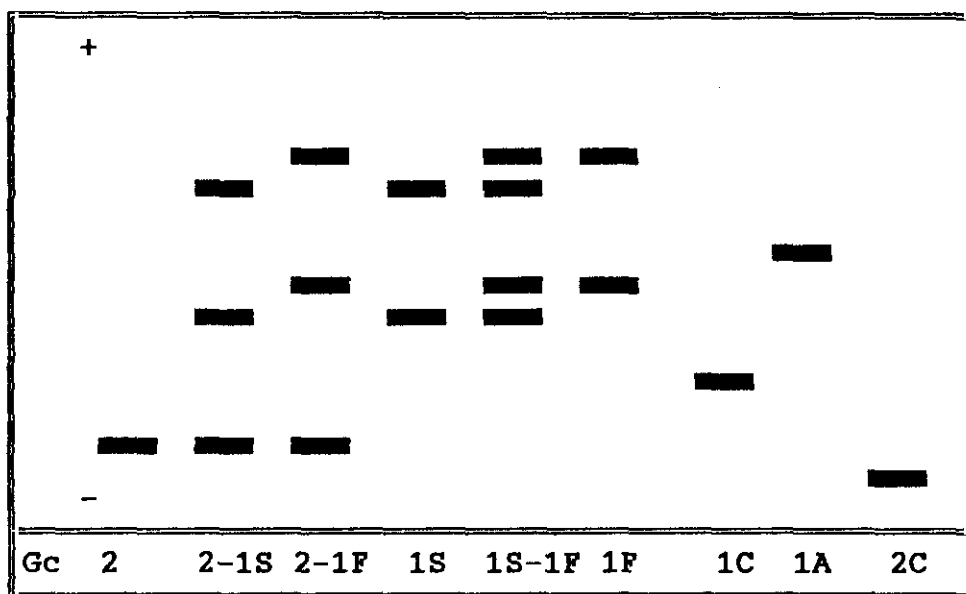
La mayoría de los alelos raros del sistema Gc tienen una distribución considerablemente restringida, pero por su especial importancia cabe destacar el fenotipo Gc-1A1, que está ampliamente distribuido en las poblaciones aborígenes de Australia y del Pacífico ,Constans y Cleve,(1.979).

Se han determinado dos alteraciones no genéticas en los fenotipos de Gc, de un lado, el tratamiento con altas dosis de Vitamina D produce modificaciones en el modelo electroforético de las

Gc, ya que el complejo Vitamina D-Gc tiene una mayor movilidad electroforética y un punto isoeléctrico más anódico; de otro lado, la hemólisis y contaminación bacteriana también pueden producir modificaciones en los patrones electroforéticos, Constans y Cleve, (1.979)

Por hibridación celular somática se ha localizado el gen de Gc en el cromosoma 4, en la zona 4 q 11, 4 q 13 (Cooke y cols, 1.986). Este gen está ligado a los que codifican la albúmina y la α -fetoproteína, presentando las tres proteínas grandes similitudes en su estructura y secuencia (Yang y cols, 1.985), (Murray y cols, 1.985). La metaloproteína 2 pseudogen 1 (MT2P1) parece que también presenta un estrecho ligamento con el locus Gc, aunque su relación con la albúmina y la α -fetoproteína no está clara (Pakstis y col, 1.986). Constans y col. (1.981), han encontrado una cierta relación entre el alelo Gc 1A1 y el alelo Tf D1 de las transferrinas de un grupo de Pigmeos.

fig. nº 1.



ESQUEMA DE LOS DISTINTOS PATRONES DE BANDAS DE GC, OBTENIDOS POR I.E.F., EN GELES DE POLIACRILAMIDA, RANGO DE Ph 2.5 - 5.4.

SISTEMA OROSOMUCOIDE O R M

E S Q U E M A

I. INTRODUCCION

DEFINICION
SINONIMOS

II. CARACTERISTICAS FISICAS

III. CARACTERISTICAS QUIMICAS

PRECIPITACION
COMPOSICION
ESTRUCTURA

IV. FUNCION

V. GENETICA POLIMORFISMOS

I. INTRODUCCION

DEFINICION:

Es una proteína que migra electroforéticamente con las α_1 - antitripsina, el orosomucoide y las lipoproteínas α_1 , en la fracción α_1 del espectro sobre geles de agarosa.

En las migraciones electroforéticas de sueros humanos normales, ocupa el segundo lugar,

inmediatamente por detrás de la Albúmina.

SINONIMOS:

Glucoproteínas ácidas α_1 (α_{1agp}) (Schmid, 1.950). Orosomucoide (Winzler, 1.955). α_1 niedermolekulares säureprotein (Schultze y cols. 1.955). Seromucoide ácido (De Vaux St. Ctr y col. 1.958). Seromucoide ácido (Montreuil, 1.957). Seromucoide α_1 (Jayle y Boussier, 1.955). Globulina α_0 (Burtin, 1.960). Componente X (Williams y Grabar, 1.955). Prealbúmina 2 (Smithies, 1.955). Zona "b" (Poulik y Smithies, 1.958). PS-1A (Schultze y cols., 1.962), MP-1 (Mehl y col., 1.949). (Recogido de Kawai. 1.977).

II. CARACTERISTICAS FISICAS

Constante de sedimentación ($S_{20,w}$) 3.11 S, coeficiente de difusión ($D_{20,w}$) 5.27, Pm entre 40.000 (Harada y cols. 1.990), (Schmid y col., 1.975) y 41.000 (Thymann y cols., 1.988); viscosidad intrínseca 0.069, movilidad electroforética 5.2; punto isoeléctrico entre 2.7 y 3.5 (Montiel y cols., 1.988); coeficiente de extinción ($e_{280m\mu}$) 8.9 (Kawai, 1.977).

III. CARACTERISTICAS QUIMICAS

PRECIPITACION:

Etanol al 70%, sulfato amónico 2.4 - 4 M; solución acuosa de Rivanol 0.0065 M (ph 8). No precipita como los otros seromucoides en Acido perclórico, tricloroacético y por calentamiento. (Kawai, 1.977).

Su alto contenido en carbohidratos minimiza su visualización con los colorantes proteicos habituales.

COMPOSICION Y ESTRUCTURA QUIMICA:

En su composición entran a formar parte 204 aminoácidos según Kawai (1.977), y 183 según Thymann (1.988). Sus aminoácidos se encuentran formando una cadena polipectídica simple, con alto grado de heterogenicidad, como se demuestra por la secuenciación de sus componentes. (Thymann y cols., 1.988).

No contiene residuos N-Terminal, y el aminoácido terminal es Serina. (kawai, 1.977).

En su composición encontramos 10.1% de Nitrógeno, entre el 42 y 45% de carbohidratos (Hexosa 14.7%, Hexosaminas 13.9%, ácido siálico 12.1% y fucosa 0.7%). Su contenido en ácido neurámico es del 12%. (Koj y cols., 1.974), (Kawai, 1.977), (Montiel y

cols., 1.988) y (Harada y cols., 1.989).

IV.- FUNCION

El orosomucoide, se encuentra en el suero humano normal a una concentración de 0.5-1mg/ml (Montiel y cols., 1.988), y en concentraciones de 0.8-2.5mg/ml según Thymann (1.988).

Se sintetiza en el hígado, y su función es al parecer desconocida. (Thymann y cols., 1.988). Para otros autores, es posible que el orosomucoide inhiba la hemoaglutinación del virus de la gripe inactivandolo, y que inactive a la progesterona. (Kawai, 1.977).

Se ha encontrado aumentada esta proteína en el plasma, en sujetos con enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, situaciones de stress, tumores malignos y diversas anomalías hematológicas, donde además, está aumentada la concentración de la α_1 antitripsina.

También se encuentra aumentada en el embarazo.

Su concentración sérica disminuye en lesiones hepáticas, síndrome nefróticos, malnutrición y caquexias.

V.- GENETICA

Desgraciadamente, la nomenclatura para los distintos fenotipos del ORM, es diferente según los autores. Hemos utilizado la nomenclatura propuesta por Johson (1.969), Thymann (1.986), Weidinger (1.987) y Eap (1.988), que difieren de la usada por Yuasa (1.986) y Escallon (1.987).

El orosomucoide, ha demostrado ser polimórfico y heterógeno en estado desializado. (Tokita y cols., 1.963) y Schmid y cols., (1.965). Fue comprobado por Tokita y Schmid (1.963), encontrando tres fenotipos dependiendo de las intensidades de las dos bandas mayores en una electroforesis sobre gel de almidón.

En 1.969, Johnson et al. (Montiel y col., 1.988), confirmó dichos polimorfismos, y concluyendo la existencia de dos alelos codominantes, demoninandoles como OR^F y OR^S .

Recientemente Thymann y Eiberg (1.986), usando técnicas de Isoelectroenfoque con rangos de Ph establecidos mediante anfolinas, y seguido de inmunotinción, encontró un tercer alelo para el OR^F , y que se presentaba fenotípicamente en un estudio poblacional en Dinamarca.

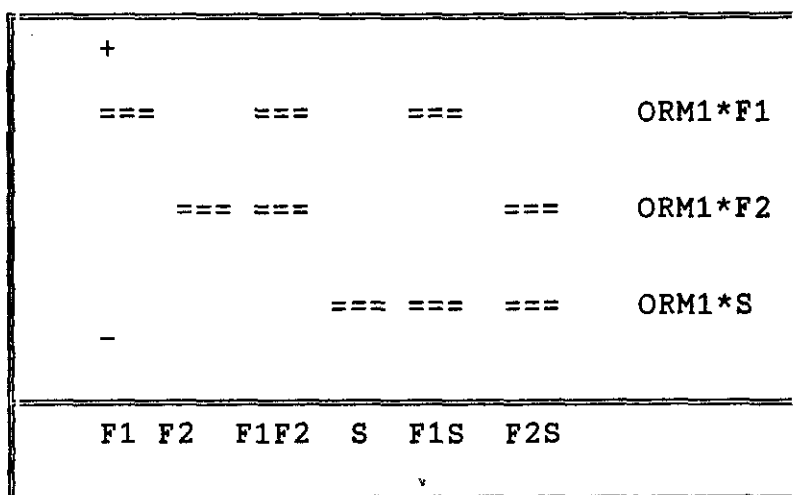
Yuasa et al., (1.986), aplicando el mismo método que Thymann, reportó la existencia de un segundo locus estructural denominado ORM2. Este hecho, fue confirmado por Escollon et al.,(1.987) y Weidinger et al., (1.987).

El locus ORM2, es poco polimórfico, y suele expresarse como un solo alelo denominado ORM2*A. Aunque se han descrito la existencia de alelos raros como el ORM2*B1, encontrado entre las Daneses y alemanes por Weidinger y cols., (1.987).

En 1.987, Yuasa y cols. encontraron un nuevo alelo en el locus ORM1, al que denominaron ORM1*2.1, y cuya expresión fenotípica, solamente ha sido demostrada en Japoneses. Probablemente se trate de un gen "híbrido" ó duplicado.

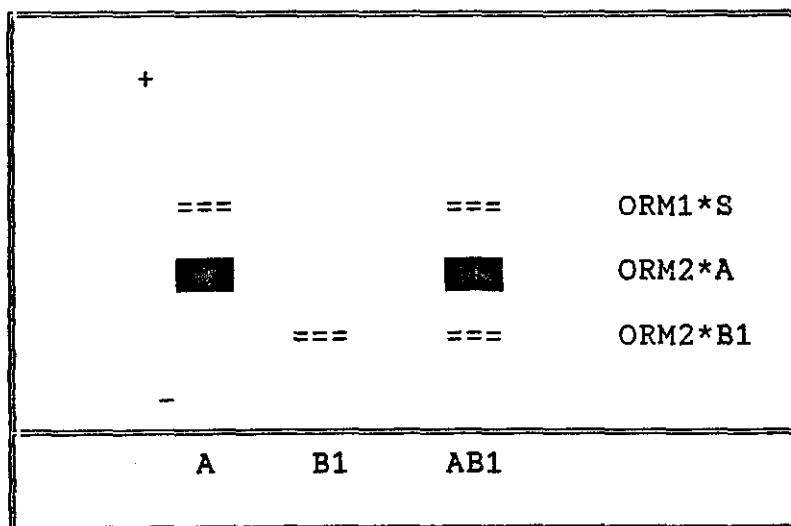
El cromosoma 9, está codificado por dos locus estructurales, situados en el cromosoma 9. El primer locus (ORM1), está muy relacionado con los genes que codifican el sistema antigénico ABO, la AK1 (adenilato-kinasa) y la ALADH (delta amino levulinato-deshidrogenasa).(Yuasa et al., 1.986) y (Thymann y cols 1.988).

FENOTIPOS (ORM1):



ESQUEMA DE LOS DISTINTOS PATRONES DE BANDAS DE ORM 1, OBTENIDOS POR I.E.F. EN GEL DE POLIACRILAMIDA, RANGO DE Ph 4.2 - 4.9.

FENOTIPOS (ORM2):



ESQUEMA DE LOS DISTINTOS PATRONES DE BANDAS DE ORM 2, OBTENIDOS POR I.E.F. EN GEL DE POLIACRILAMIDA, RANGO DE Ph 4.2 - 4.9.

NOTA RESUMEN OROSOMUCOIDE

ORM1	ORM1*F1 = ORM1*1 ORM1*F2 = ORM1*3 ORM1*S = ORM1*2
ORM2	ORM2*A ORM2*B1

SISTEMA DE LAS TRANSFERRINAS (Tf)

E S Q U E M A

I. INTRODUCCION

SINONIMOS

II. CARACTERISTICAS FISICAS

III. CARACTERISTICAS QUIMICAS

PRECIPITACION

COMPOSICION

ESTRUCTURA

IV. FUNCION

V. GENETICA

POLIMORFISMOS

I.- I N T R O D U C C I O N

Es el componente más importante de la fracción β de las bandas electroforéticas del plasma humano. (Kawai y cols. 1.977). Se encuentra en los fluidos biológicos de invertebrados (Huebers y cols. 1.984) y en vertebrados (De Jong y cols. 1.980).

SINONIMOS:

Transferrinas (Tf) (Holmberg y Laurell 1.947), Siderofilina (Schade y cols 1.949), Globulina β_1 combinada con metal (Surgenor y col. 1.949), Globulina β_{1s} (Grabar y Burtin 1.955), Metaloseromucoide β_1 (Montrenil 1.957). (Recogido de Kawai. 1.977).

II.- C A R A C T E R I S T I C A S F I S I C A S

Constante de sedimentación ($S_{20,w}$), 5.5 S.
Coeficiente de difusión ($D_{20,w}$), 5. Punto Isoeléctrico (P.I), 5.9.(Kawai, 1.977). Peso molecular aproximado de 80.000 (Pascali, 1.988).

III.-C A R A C T E R I S T I C A S Q U I M I C A

PRECIPITACION:

En etanol al 40%, Sulfato amónico 2.4-2.8 M, Acido perclórico 0.6 M, calentamiento y no precipita en soluciones acuosas de Rivanol 0.0065 M, lo que se utiliza en algunas ocasiones para purificarlas. (Kawai, 1.977).

COMPOSICION QUIMICA:

Es una glicoproteína compuesta por 679

aminoácidos (De Jong y cols, 1988), conteniendo 15.4% de N, 5.8% de Hidratos de Carbono (Hexosas 2.4%, Hexosaminas 2%, ácido Siálico 1.4% y Fucosas 0.07%).(Kawai, 1.977).

ESTRUCTURA:

Las transferrinas humanas, adoptan una estructura polipeptídicas de cadena simple, con 679 aminoácidos y dos oligosacáridos complejos situados en las posiciones 413 y 611.

Estudios secuenciales de la proteína, han demostrado la existencia de dos "REGIONES", una la N-terminal (comprendida entre los aminoácidos situados en las posiciones 1 y 336) y la otra, la llamada C-terminal (comprendida entre los aminoácidos situados en las posiciones 337 y 679). Dichas regiones, son homólogas (Pascali y cols. 1.988) y presentan en cada una el lugar de gliosilación correspondiente. Cada una de estas regiones, presentan una K_M de aproximadamente $10^{22} M^{-1}$. (De Jong y cols. 1.988), existiendo una zona de enlaces con los iones hierro denominados A para la región C-terminal y B para la N-terminal.(Willians, 1.975) y (Linebock-Zins y cols. 1.980). Para que se produzca la fijación del hierro es imprescindible la existencia de aniones,

(fisiológicamente se utilizan carbonatos y bicarbonatos) .(De Jong y cols. 1.988). La afinidad por el hierro de estos puntos de fijación, son independientes entre sí, calculándose que a un Ph de 6.7 el punto B (N-terminal) tiene 20 veces menos afinidad que el punto A (C- terminal). (De Jong y cols. 1.988).

IV.- F U N C I O N

Las funciones de las Transferrinas en el hombre, han sido descritas por Petrén y cols. (1.989) y Young y cols. (1.982), pudiéndose resumir en los siguientes puntos:

A.- La principal misión es el transporte de hierro desde la sangre hasta las células.

En el plasma normal, la concentración de Transferrina es de 200-300 mg/100ml, ocupando el 50% de las β -globulinas. Aproximadamente, un tercio de las transferrinas séricas está unida al hierro, y más del 99% del hierro sérico (110 μ g/100ml), está fijado a la transferrinas.

B.- Neutralizar los excesos de hierro

iónico. Por este mecanismo tiene la virtud de evitar la aparición de síntomas tóxicos al inyectar intravenosamente una inyección de 8-12 mg de iones hierro (Fe^{+++}).

C.- Impide la excreción urinaria de hierro. El hierro iónico atraviesa con facilidad la membrana glomerular, y como el hierro se absorbe poco o nada en los túbulos renales, al estar unido a las transferrinas, se impide su eliminación por el túbulo renal.

V.- G E N E T I C A

Las transferrinas, están codificadas por tres alelos codominantes denominados C_1 , C_2 y C_3 , localizados en el cromosoma 3. (Naylor y cols. 1.969, citado por Pascali y cols. 1.988).

La heterogenicidad de la molécula, fue estudiada por vez primera por Smithies y cols. (1.959), y considerada como poco polimórfica, con un rango de heterogenicidad de 0.05. (Giblett y cols. 1.969).

En el plasma, se puede encontrar en las siguientes formas, Diférricas (la más frecuentes),

Monoférricas (A y B) y Apotransferrinas (no férricas).(Putnam. 1.984).

Con la introducción de las técnicas de I.E.F. con geles de poliacrilamida, se pudieron diferenciar en las transferrinas diférricas hasta cinco formas diferentes, teniendo unos puntos isoeléctricos comprendidos entre 5.3 y 5.7, y diferenciándose unas de otras en 0.1 rango de Ph. (Petrén y Vesterberg. 1.989). De las cinco variantes, la más frecuente presentan un P.I. de 5.5. (D'Alessandro y cols. 1.983). Las diferencias químicas entre ellas son los restos de Acido N-acetilneuramínico y de Siálico.(Petrén y Vesterberg. 1.989).

Estudios recientes han demostrado que en caso de disfunciones hepáticas postalcóholicas, aumenta la concentración sérica de las Tf con P.I. de 5.7.(Petrén y Vesterberg. 1.989).

El alelo C₂ se ha encontrado asociado con un aumento de los abortos espontáneos, en prematuros y en la artritis reumatoide.(Petrén y cols. 1.989).

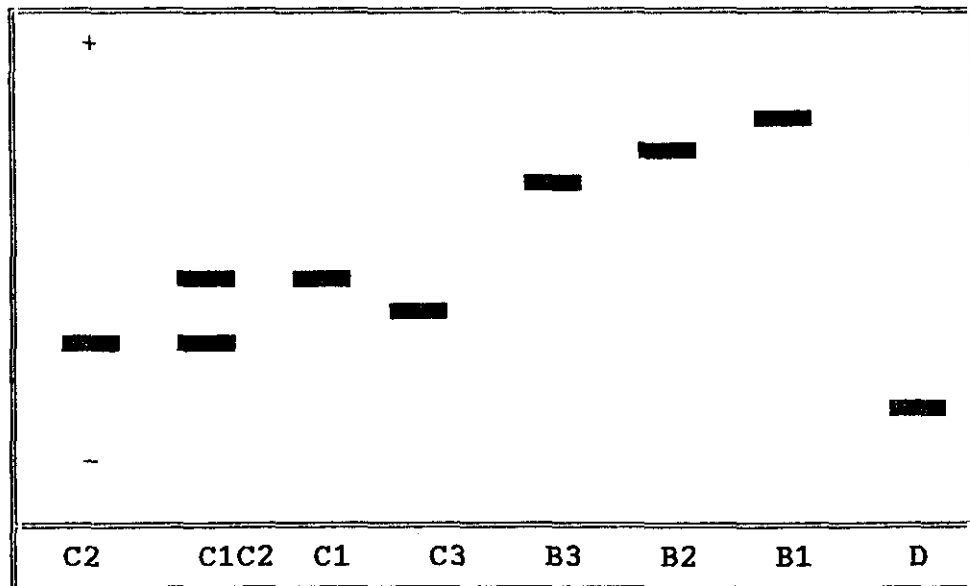
En estudios mediante I.E.F. en geles de poliacrilamida y tras la saturación férrica con FeCl₃, se han detectado los siguientes alelos: TfC₁,TfC₂ y TfC₃ como más usuales, pero han sido

detectados algunos alelos raros en estado de heterogenicidad denominados TfB, (Kühnl y cols. 1.984), con las variantes TfB₁, TfB₂ y una probable variante denominada TfB₃ ó TfC₁₅. (Estudios antropológicos realizados por Kühnl y cols. en 1.984 al sur de Italia).

Otros alelos más raros constatados por Pascali y cols. (1.987) en estudios sobre poblaciones de Pigmeos, son los denominados Tfd₁, Tfd₂, Tfd_{Teke}, Tfd_{Pygmy} y el llamado TfC₆. Ver Fig.2.

POLIMORFISMOS:

Fig. nº 2



ESQUEMA DE LOS DISTINTOS PATRONES DE BANDAS DE Tf., OBTENIDOS MEDIANTE I.R.F. EN GEL DE POLIACRILAMIDA, RANGO DE Ph 4 -6.5.

α -2 GLICOPROTEINAS (A.H.S.G.)

E S Q U E M A :

I.- INTRODUCCION

- SINONIMOS

II. CARACTERISTICAS FISICAS.

III. CARACTERISTICAS QUIMICAS.

- PRECIPITACION

- COMPOSICION QUIMICA Y ESTRUCTURA.

IV. FUNCION

V. GENETICA

- POLIMORFISMOS

I.- INTRODUCCION

La fracción α_2 de las electroforesis plasmáticas, es la más heterógena de todas. Aproximadamente existen doce componentes detectables por inmunoelectroforesis. Entre otros, cabe destacar la globulinas Gc, las macroglobulinas α_2 , haptoglobinas, ceruloplasminas, el enzima inhibidor de la tripsina (Kawai, 1.977), colinesterasas

ó pseudocolinesterasas, fosfatasas alcalina y la deshidrogenasa láctica. También focalizan las glucoproteínas α_{2HS} , la glucoproteína Zn α_2 y la neuroaminoglicoproteína α_2 . (Kawai. 1.977)

SINONIMOS:

Globulinas α_{2Z} (Heremans, 1.960), glucoproteína Ba α_2 , (Schmid y Bürgi, 1.961), mucoide α_{2HS} , (Schultze y cols. 1.962), PS-2B, (Schultze y cols. 1.962), (recogido de Kawai. 1.977), human α_2 HS-glicoproteina (AHSB, según la conferencia de Helsinki, 1.985, sobre mapeo genético humano.).

II.- CARACTERISTICAS FISICAS.

Constante de sedimentación (S_{20W}) 3.3 S. Peso molecular próximo a los 49.000. Movilidad electroforética 4.2. Punto isoeléctrico desializada entre 4.5-5.0 (Yuasa, 1.988), sin desializar, P.I. de 5.5. Coeficiente de extinción ($E_{280m\mu}$) de 5.6. (Kawai, 1.977).

III. CARACTERISTICAS QUIMICAS.

PRECIPITACION:

Precipita con alcohol muy concentrado y

con una concentración relativamente baja de sulfato amónico. 1-1.4 M, solución acuosa de rivanol 0.0065M, ácido tricloroacético 0.15M, y por calentamiento.

COMPOSICION QUIMICA Y ESTRUCTURA:

Está compuesto por dos cadenas polipeptídicas unidas entre sí por dos puentes disulfuro. La cadena A con 282 aminoácidos y la cadena B con 27. La cadena A, presenta cuatro puntos de gliosilación, y la B solamente uno. (Yuasa, 1.988). Su composición en nitrógeno es del 13.4% (kawai, 1.977).

IV. FUNCION.

La AHSG, es sintetizada en el hígado y alcanza una concentración plasmática de 40-85 mg/dl.

Su función no está clara, pero se la ha relacionado con la formación del hueso y sobre el desarrollo embrionario. Es conocido que disminuye durante las fases de inflamación. (Yuasa y cols., 1.988).

V. GENETICA

El locus codificador de las AHSG, se ha

localizado en el cromosoma 3q21-qter, mediante estudios con células hibridadas. (Yuasa y cols., 1.988). Este locus está estrechamente unido a el locus que codifica a la colinesteras-1 y al de la transferrinas.

POLIMORFISMOS:

Los polimorfismos genéticos de las AHSB, fueron descubiertos por Anderson y Anderson (1.977 y 1.979), usando electroforésis Bidimensional, combinando el Isoelectroenfoque (IEF) para la primera dimensión, y electroforesis con geles de poliacrilamida con Dodecil Sulfato Sódico (SDS) para la segunda dimensión. Las AHSB podrían ser clasificadas en tres fenotipos distinguibles de acuerdo a sus PI y a el tamaño. (Yuasa y cols. 1.988). Estos mismos resultados, fueron constatados por Olaisen y cols. (1.981), usando una técnica similar a la anterior. Las electroforesis bidimensionales, es una técnica excelente, pero el tiempo empleado en realizarla, y la dificultad que encierra para el estudio comparativo, hace que en los estudios genéticos poblacionales de AHSB así como en hemogenética forense, se prefiera la aplicación de las electroforesis unidimensional.

La utilización del IEF, seguido de inmunoprecipitación y tinción con plata, demostró la existencia de dos fenotipos adicionales, como expresión de un tercer alelo.

Los estudios realizados mediante desialización de las muestras, revelan la existencia de polimorfismos, debidos probablemente a variaciones estructurales de las cadenas polipeptídicas de las AHSG. (Yuasa y cols. 1.988).

Hasta ahora, se han descubierto más de 15 alelos responsables de la expresión fenotípica de las AHSG. La designación de estos alelos es AHSG*1, AHSG*2,, AHSG*15.

Los tres fenotipos que acaparan la mayoría de la distribución poblacional, son los AHSG*1, AHSG*2 y AHSG*3, que aparecen en todas las técnicas de IEF.

Todas las variantes excepto las AHSG*15, son distinguibles por IEF con anfolinas de rangos de Ph comprendido entre 4.5 y 5.4. Debido a que algunas variantes presentan PI muy similares, se hace necesario el uso del IEF tras desialización de las muestras. (Heckmann y cols. 1.987). Ver fig.3.

Siguiendo los trabajos realizados por Yuasa y Umetsu , 1.988), y a manera de resumen,

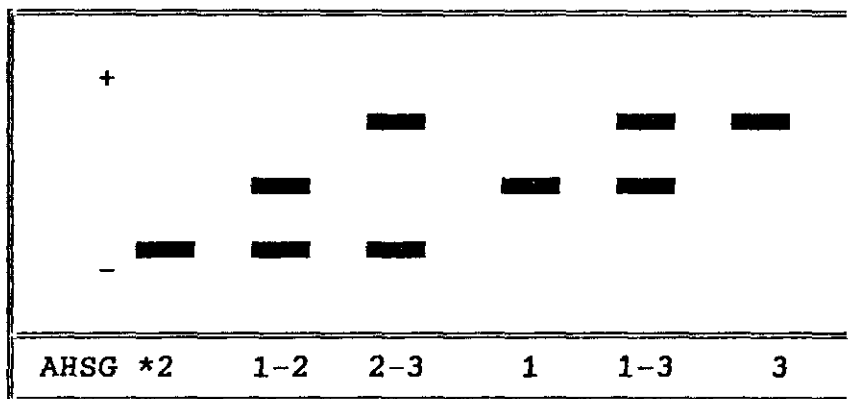
podemos establecer los siguientes patrones de movilidad electroforética de las AHSB según las técnicas empleadas:

1.- La secuencia de movilidad electroforética para los distintos alelos en estado nativo (sin desializar), fue la siguiente: AHSB 14-3-1-8-5-6-7-11-12-2-4-13(=15)-9, atendiendo al incremento de sus PI.

2.- La secuencia de movilidad electroforética de las muestras tratadas con Neuraminidasa, (desializadas), fue como sigue: 3-8-14-1=6=7=10=2=9-13-4-12-5=11-15.(dirección ánodo-cátodo).

3.- La movilidad electroforética de las AHSB utilizando IEF con anfólicas de 5-6 rangos de Ph, y en presencia de Urea 2.5M, fue la siguiente: AHSB8-14-3-1=6=7=10-2=9=4-13-15-11-12-15.(dirección ánodo-cátodo).

Fig.nº 3.



ESQUEMA DE LOS PATRONES DE BANDAS MAS FRECUENTES OBTENIDOS POR I.E.F., EN GEL DE POLIACRILAMIDA, RANGO DE Ph. 4.5 - 5.4. SIN DESIALIZAR.

I N M U N O B L O T T I N G

E S Q U E M A

I. INTRODUCCION

II. ELECCION DE LA TECNICA

CARACTERISTICAS DE LAS DIFERENTES TECNICAS

A.-DIFUSION

B.-FLUJO DE LIQUIDOS

C.-ELECTROBLOTTING

III. TAMPON DE TRANSFERENCIA

A.-SELECCION DEL PH ADECUADO

B.-SELECCION DE LOS ADITIVOS

C.-SELECCION DE LA TEMPERATURA DE TRABAJO

IV. MEMBRANAS DE TRANSFERENCIAS

A.- MEMBRANAS DE NITROCELULOSAS (n.c)

B.- MEMBRANAS DE NYLON-BASED

C.- MEMBRANAS DE POLIVINILDIFLUORIDE (p.v.d.f)

V. FIJACION DE LAS MUESTRAS A LAS MEMBRANAS

VI. DETECCION DE LOS INMUNOBLOTTING

A.- TINCIONES GENERALES

B.- CON METALES COLOIDALES

C.- ENZIMOINMUNOBLOTTING

I. - INTRODUCCION

Se define el termino **Blotting** como la transferencia a membranas de muestras que han sido separadas por técnicas electroforética, con el objeto de fijarlas, y de hacer más fácil su identificación posterior, aumentando considerablemente la sensibilidad de su detección.

El método fue descrito por primera vez por Southern (1.975) para transferir fragmentos de A.D.N. a una membrana de Nitrocelulosa (N.C.), y en 1.978, Renhart lo adaptó para las transferencias de proteínas, (Johansson, 1.987).

Las fuerzas que hacen posible la transferencia desde los geles hasta las membranas van a depender de la técnica de Blotting empleada, distinguiéndose tres tipos: difusión, capilaridad y eléctricas. (Johansson, 1.987).

Los tipos de membranas más utilizados son: la Nitrocelulosa, el Nylon-based y las de Polivinil-difluoride (PVDF). Tradicionalmente son las membranas de N.C. las de mayor aceptación, aunque cada día se está imponiendo más las de PVDF.

El método con mayor eficacia, rapidez y reproductibilidad, lo confiere el Electroblothing,

donde se puede conseguir replicas fidedignas del patrón de bandas separados por electroforesis. Su fidelidad está estimada en un 100%. (Tovey y cols. 1.987). No obstante, la mayor versatilidad, y menor necesidad de medios, es la proporcionada por la simple difusión ó por capilaridad.

II. ELECCION DE LA TECNICA ADECUADA PARA REALIZAR UN BLOTTING.

El método elegido, dependerá principalmente de las muestras que queramos transferir. De esta manera es muy importante elegir la membrana adecuada en cada caso, las condiciones de transferencias (Ph de los tampones etc.), el uso de aditivos etc. (Montelaro, 1.987).

En general, las membranas más utilizadas son la de Nitrocelulosa, aunque cada día se emplea con mayor asiduidad las PVDF y el NYLON-BASED. El punto más crítico, es la elección del tampón de transferencia, cuya misión es la de eluir las muestras separadas en el gel y transportarla hasta la membrana.

CARACTERISTICAS DE LAS DIFERENTES TECNICAS DE
BLOTTING

En 1.987, Johansson distinguió tres tipos de Blotting, atendiendo a las fuerzas que transportan las muestras hasta la membrana:

A.- BLOTTING POR DIFUSION.

En este sistema de trabajo, se requiere poco equipamiento, puesto que solamente intervienen las fuerzas de difusión creadas por el Tampón de transferencia al eluir las muestras que se encuentran en el gel.(Johansson, 1.987). Por esta técnica, se pueden llegar a transferir entre el 30% y el 35% de las muestras que están en el gel, y puede presentar problemas de transferencias cuando el peso molecular de las muestras es elevado.(Jacobson, 1.990). Sin embargo, las de bajo peso molecular pueden ser transferidas sin ningún problema.

La difusión es la técnica más empleada de rutina para realizar un Blotting, aunque cuando la concentración de la muestra es insuficiente, ó cuando se requiere una mayor precisión en la técnica se puede usar el Electroblotting ó el Vacumblotting. (Tovey y cols. 1.987).

B.- BLOTTING POR FLUJO DE LIQUIDOS.

Las muestras son transferidas a las membranas por capilaridad. Actualmente se utiliza el llamado Vacum Blotting, donde la transferencia se encuentra favorecida por un gradiente de presión que une íntimamente la membrana al gel. (Johansson, 1.987).

El poder de transferencia de esta técnica se estima en el 100% de las muestras separadas en el gel. (Tovey y cols. 1.987).

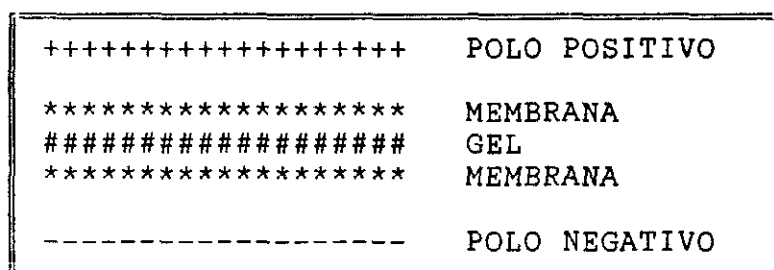
C.- ELECTROBLOTTING

Es la técnica de elección cuando se quiera obtener la mayor cantidad de muestras transferidas, y especialmente cuando se trate de muestras de alto peso molecular.

La técnica está basada en las propiedades Anfotéricas de las muestras, es decir, la capacidad que presentan ciertas sustancias de cargarse eléctricamente en soluciones con Ph ácidos (+) ó básicos (-) De esta manera, al someter las muestras a la acción de un campo eléctrico, serán atraídas ó repelidas en virtud de su carga eléctrica, creándose

una migración de las muestras separadas en el gel, que será interrumpida por la interposición de las membranas de transferencias. Fig. 4

Fig. nº 4



ESQUEMA REPRESENTATIVO DEL SANDWICH UTILIZADO EN LOS ELECTROBLOTTING.

Los dos factores más críticos en esta técnica son por un lado el Ph del Tampón de transferencia, y por otro el potencial eléctrico con que se cargue la membrana. (Johansson, 1.987), postuló que para que la transferencia sea completa, es necesario que el campo eléctrico creado sea uniforme en toda la superficie del gel y de la membrana.

La elección del diámetro del poro de la membrana de transferencia es muy importante, ya que si este es mayor que el tamaño de la muestra, esta va a pasar a través de la membrana, eluyéndose en el tampón.

III. TAMPONES DE TRANSFERENCIAS

La elección del tampón de transferencia es uno de los parámetros más crítico a la hora de obtener un buen resultado en la técnica del **BLOTTING**. Especialmente el Ph que tenga este, que debe ser adecuado a las muestras que se quieran transferir, así como los aditivos que entran en su composición. Usualmente, el Ph utilizado suele estar próximo a 8, y los aditivos más comunes son el metanol y los detergentes no iónicos del tipo Tween-20, Nonidet P-40 etc.

Las Temperaturas que intervienen en los desarrollos de los Blotting, no es un factor crítico, (siempre que se no sea lo suficientemente elevada como para producir una desnaturalización de las muestras que se van a transferir).

A.- SELECCION DEL PH ADECUADO

Debido a las propiedades anfotéricas de las muestras que se van a transferir, la elección de un Ph para el tampón de transferencia es muy importante, ya que de ello va a depender la carga eléctrica de las muestras, y por lo tanto la

migración.

La elección del Ph es particularmente crucial en los Electroblotting, donde la transferencia a la membrana se realiza mediante fuerzas eléctricas. En general se establece que para un electroblotting donde las muestras a transferir tengan un Ph de 8, (carga eléctrica -) se conseguirá una buena electroelucción y fijación en la membrana. Por el contrario, cuando la muestra está cargada positivamente la emigración será buena, pero la fijación será pobre debido a la positividad de la membrana.

B.- SELECCION DE LOS ADITIVOS

El Metanol ha sido propuesto por Johansson (1.987) como un notable fijador de proteínas a las membranas de N.C. Sin embargo, debido a que también fija las proteínas al gel, dificulta la elucción de las proteínas mayores.

Bajas concentraciones de detergentes no iónicos del tipo del Tween-20 ó del Nonidet P-40 han sido propuesta como buenos fijadores de proteínas por Bjerrum y cols. (1.987).

C.- TEMPERATURAS

Es un factor muy importante (aunque no crítico) sobre todo en las técnicas de difusión simple, pero se puede decir que en general se acepta que una Temperatura elevada favorece la difusión. Hay que tener presente en todo momento la Temperatura a que se desnaturaliza la muestra que estamos estudiando.

Hay que destacar que en los casos de Electroblotting realizados sobre geles de IEF-SDS (Iso-Electro-Enfoque Sodio-Dodecil-Sulfato), las temperaturas óptimas de transferencias son de 70º C.

IV.- MEMBRANAS DE TRANSFERENCIAS

A.- MEMBRANAS DE NITROCELULOSAS (NC)

Actualmente es la más utilizada. Su capacidad de fijación para proteínas es de 80 a 250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Montelaro 1.987). El tamaño de los poros es variable, y pueden ser usados con Ph ácidos y básicos, lo que le permite fijar tanto proteínas cargadas positivamente como negativamente. Es compatible con todo tipo de tinción general para proteínas.

B.- MEMBRANAS DE NYLON-BASED (n.b)

Están cargadas positivamente. Su poder de fijación para proteínas es de 215 a 480 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. (Montelaro 1.987). Este alto poder de fijación se debe a la interacción electrostática que se establece entre la membrana (cargada +) y las cargas (-) de las proteínas. Precisamente su alto poder de fijación es utilizado en algunos casos para fijar proteínas en bajas concentraciones.

Presentan la desventaja de que al fijarse muchas proteínas distintas suelen dar mucho fondo con las tinciones. Por lo que no se puede usar con tinciones generales para proteínas, y máxime si se usan colorantes aniónicos que quedaran fijados a la membrana.

C.- MEMBRANAS DE POLIVINIL-DIFLUORIDE (pvdf)

Tienen un poder de fijación para proteínas similar a las de N.C. (aproximadamente 190 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Montelaro 1.987). Inmovilizan proteínas por interacción hidrofóbica, y son compatible con los colorantes aniónicos.

V.FIJACION DE MUESTRAS SOMETIDAS A BLOTTING

Tan importante como la elección de la técnica de Blotting, es el proceso de fijación de las muestras transferidas a las membranas desde los geles de separación electroforética.(Moeremans y cols. 1.987).

La utilización de métodos de fijación general como el Acido tricloro-acético, metanol, etc, se emplea cuando sea necesario una fijación generalizada de todas las proteínas que se han desarrollado mediante un proceso de electroforesis.

La utilización de anticuerpos frente a sustancias específicas, han hecho que los procesos de fijación adquieran un carácter selectivo, a la vez que se consigue una mayor cantidad de muestra fijada.(Ramlau, 1.987). La técnicas de Inmunofijación, aplicada en los Blotting, recibe el nombre de Inmunoblotting, cuyas características principales son:

- a.- Selectividad de las muestras fijadas.
- b.- Mayor cantidad de las muestras fijadas.

Es por esto, por lo que será la técnica elegida para el presente estudio.

VI. METODOS DE DETECCION DEL INMUNOBLOTTING

Las técnicas de tinciones, son los procesos más importantes dentro de las técnicas separativas. (Moeremans y cols. 1.987).

A.) TINCIONES GENERALES.

Los métodos propuestos para las tinciones, son muchos y variados, tinciones generales de proteínas, métodos enzimáticos, etc, siendo tan utilizados como clásicos. Mención a parte, merecen dos técnicas que por su sensibilidad, especificidad y reproductibilidad parecen imponerse cada día más.

B.) METALES COLOIDALES.

Los metales más utilizados con este fin, son el Oro, la Plata y el Hierro. Las técnicas de tinción con Plata, son ya un método clásico, siendo más novedoso el AURODYE (tinción con oro coloidal), y el FERRIDYE (Tinción con Oxido de hierro).

La técnica del Aurodye, fue propuesto por Moeremans y col. (1.987), su sensibilidad es

semejante a la tinción con sales de plata y a las técnicas de Inmunotinción. Presenta el inconveniente de que no se puede utilizar en Blotting realizados sobre membranas de Nylon Based, debido a las particularidades Físico-químicas de las mismas, donde tampoco se pueden usar colorantes aniónicos como el Azul de Coomassie ó el Negro-Amido. A este respecto, en 1.987, Moeremans y col., concluyen que la técnica del Aurodye, solamente es aplicable a los Inmunoblotting realizados sobre membranas de N.C. y de P.D.V.F., mientras que el Ferridye, es aplicable a cualquier tipo de membranas.

C.) POR EL SEGUNDO ANTICUERPO.

Ramlau (1.987), realizó un estudio comparativo entre las diferentes formas de visualización del segundo anticuerpo, clasificando los sistema de la siguiente manera:

a.- Detección con Fluorofósforos. Según este autor, fueron utilizados en un 3% de todas las comunicaciones estudiadas.

CARACTERISTICAS:

- Requieren una cierta infraestructura especial.
- Sistemas de fotografiados.
- Muchas de estas técnicas blanquean rápidamente.

- En cuanto a su sensibilidad, no es posible establecer unas conclusiones, debido a la escasez de publicaciones existentes. (Ramlau y cols. 1.987).

b.- Radioisótopos. Se usan aproximadamente en un 50% de los casos. Johnston y Thorpe, (1.982), determinan que las Inmunoglobulinas son fácilmente radioionizables. Los isótopos más utilizados son los I^{125} . (Ramlau y cols. 1.987).

CARACTERISTICAS:

- Se necesita trabajar con pequeñas cantidades de Isótopos.

- La sensibilidad del método, vendrá dada por la calidad de los reactivos empleados. (Ramlau.1987).

- Peligro personal por la utilización de Isótopos.

- Especial infraestructura para la técnica.

c.- Enzimáticos. Las enzimas conjugadas con

anticuerpos, fueron el principal sostén del método E.L.I.S.A. y de la mayoría de las técnicas inmunohistoquímicas. (Ramlau y cols. 1.987).

Es el método más utilizado para la detección de las muestras en un inmunoblotting.

CARACTERISTICAS:

- Disminuye el Background de los inmunoblotting.
- Presenta gran afinidad y especificidad.
- No requiere equipamientos especiales para desarrollar la técnica.

Las enzimas más utilizadas son las Peroxidasas y las Fosfatasas Alcalinas. Ellas solamente, ocupan el 30% de uso de todas las técnicas estudiadas.

Ramlau (1.987), propone la utilización de la enzima Fosfatasas Alcalina frente a las Peroxidasas, ya que se obtiene una mayor sensibilidad y limpieza de fondos.

MATERIALES Y METODO

I.- GENERALIDADES ANALITICAS SOBRE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS.

A.- OBTENCION DE MUESTRAS.

Las muestras de sangre, se obtuvieron de Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Sevilla. El total de muestras recogidas fue de 50 tubos conteniendo 5cc de sangre completa, tratada con EDTA como anticoagulante. La sangre, pertenecía a 50 donantes escogidos al azar, donde no se había detectado ningún tipo de patología. Dichos tubos, fueron enumerados desde el 1 al 50.

Para la realización de las manchas de sangre controles, se usaron 50 compresas de gasa esterilizadas a 134^o C, (procedimiento "C"), formadas con hilos de algodón entrelazados (9 verticalmente y 9 horizontalmente por cada centímetro cuadrado de superficie de gasa), plegada tres veces sobre si misma, de tal manera que se disponía de un bloque de 6 superficies intimamente unidas unas a las otras, con un poder de absorción de aproximadamente

150 μ l por centímetro cuadrado. Sobre las citadas gasas, se depositaron un total de 20 gotas por cada una, dejándolas secar a Temperatura ambiente (20 C) durante 30 días, sin ningún tipo de protección sobre ellas. Las manchas así obtenidas, se enumeraron con los mismos números de los tubos a los que pertenecía.

Los tubos, fueron sometido a centrifugación (3.000 rpm) durante 3 minutos, separando la fase plasmática de las de los elementos formes mediante pipetas Pasteur, y depositando los plasmas en tubos Eppendorf. Dichos tubos se rotularon con su numeración de origen. Posteriormente, se congelaron a -20 C . De esta manera, se obtuvieron 50 controles para las verificaciones de las técnicas empleadas.

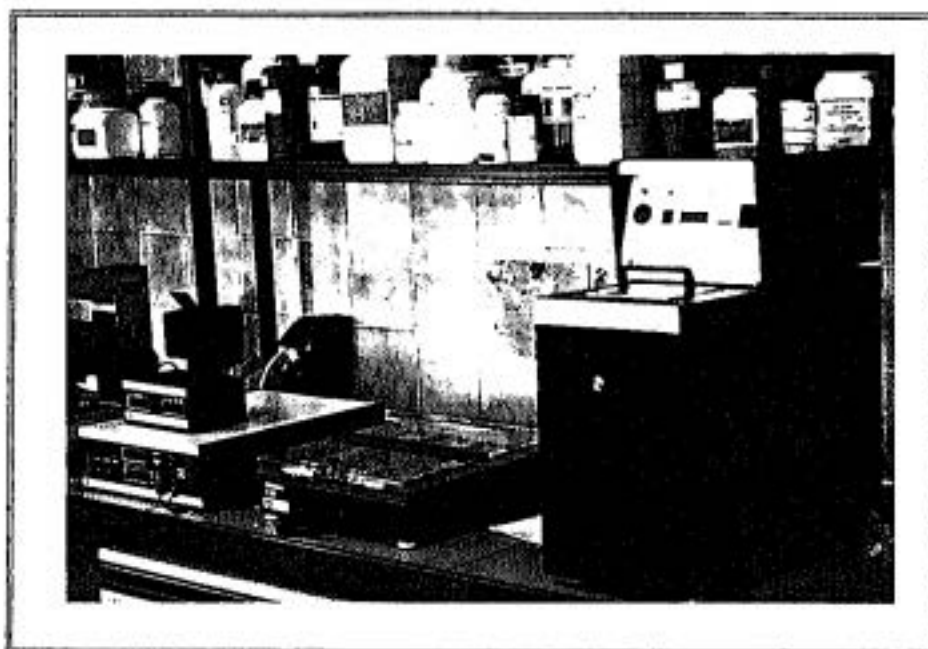
Los elementos formes sobrantes, si bien no se utilizaron para el presente trabajo, fueron sometidos a 5 lavados con suero fisiológico, seguido de otras tantas centrifugaciones a 3.000 rpm durante 3 minutos. Las series blancas, se separó mediante pipetas Pasteur, y los hematies ya separados, fueron depositados en tubos Eppendorf y congelados a -20 C . Su etiquetación, se correspondió con la serie originaria.

2.- METODO ELECTROFORETICO.

En los cuatro marcadores estudiados, se utilizó para su fenotipado la técnica de Isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida (PAGIEF), según B. Hoste (1.979).

B₁.- MATERIAL ELECTROFORETICO.

- Cubeta de Separación --FBE 3000 -- Pharmacia
- Fuente de alimentación -ECPS 3000/150-Pharmacia
- Integrador Voltoras ---VH - 1 --- Pharmacia
- Sistema de refrigeración -- 2219 ---- L.K.B.
MULTITEMP II.



B₂.- CARACTERISTICAS DE LOS GELES.

- MOLDES DE VIDRIO: Los moldes fueron realizados según la técnica de minigeles descrita por A. Alonso (1.987), para la obtención de un tamaño de gel de 50 X 40 X 0.25. Las ventajas encontradas en la utilización de estos minigeles son:

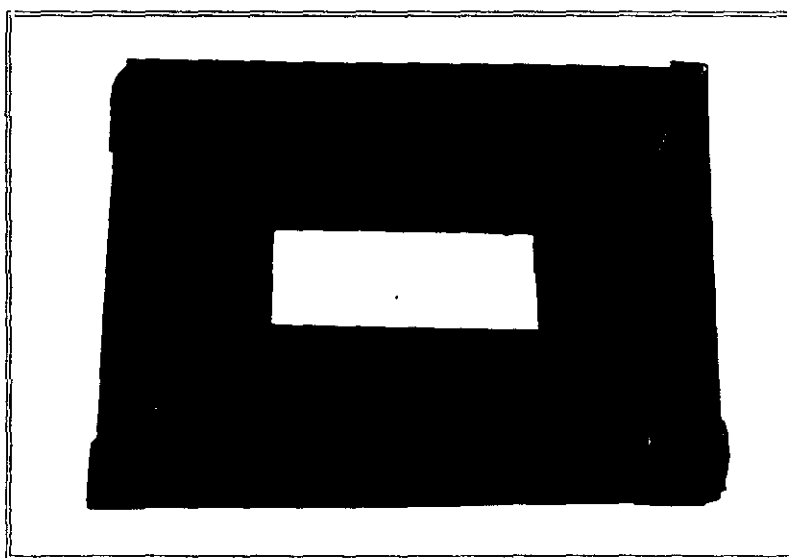
1.- Rapidez en el desarrollo de la técnica de I.E.F.

2.- No se necesitan tiras con soluciones para los electrodos.

3.- Se economiza más que con los geles clásicos.

4.- El poder de resolución es satisfactorio.

5.- Se necesita menos cantidades de muestras.



El inconveniente principal encontrado sería que el poder de resolución es menor que con geles mayores. No obstante, este problema se encuentra suficientemente compensado con el grosor del gel y con la cantidad de muestra empleada, siendo su resolución totalmente satisfactoria.

- SOPORTE DE LOS GELES: Se utilizaron dos tipos de soporte en el presente trabajo:

1.- Vidrios silanizados: Se preparó una solución de γ - Metacriloxi Propil Trimetoxisilano al 4/1000 de H_2O , llevado a Ph 3.5 con Acido Acético. El silano empleado fue el SILANE A-174 (Pharmacia).

El procedimiento de silanización consistió en sumergir los soportes de vidrio en dicha solución durante 20 minutos. Dejándolos secar posteriormente.

Los grupos metacrílicos que toman parte en la polimerización del gel, reaccionan con el silano, uniéndose a este covalentemente. (Ver fig. 5).

Las ventajas de la silanización son:

1.- Ofrece una buena adherencia del gel de poliacrilamida al soporte, lo que impide la deformidad e irregularidades en este.

2.- Es un método económico.

3.- Los soportes de vidrio ya silanizados,

pueden ser utilizado hasta con dos meses de antigüedad.

4.- No interfiere la migración de las proteínas, ni afecta al I.E.F.

5.- Los soportes de vidrios, pueden ser reutilizados, si son lavados con una solución de Hidróxido sódico concentrada en H₂O.

Los inconvenientes de la silanización son:

1.- El silano es altamente irritativo en contacto con la piel.

2.- Las soluciones acuosa de silano son inestables, lo que obliga a prepararla con cierta asiduidad. No obstante, se ha conseguido buenas silanizaciones con soluciones cuyo tiempo de preparación era superior a 4 meses.

2.- SOBRE PELICULAS PLASTICAS: Existen en el mercado actualmente, láminas de plástico, donde una de sus caras es adherente a los geles de poliacrilamida. Este es el caso del Gel-Bond-PAG-film, comercializado por Pharmacia.

La forma de uso de estas películas, consiste en adherirla por su cara no reservada al gel, al soporte de vidrio, mediante unas gotas de alcohol, vigilando de que no queden burbujas de aire entre el soporte y la película. De esta manera, basta con quitar el papel de protección de su cara adherente, y está lista para su utilización.

Las ventajas que ofrece el Gel-Bond-PAG-film, son la rapidez y la no manipulación de productos tóxicos.

Los inconvenientes son:

1.- Costo superior al proceso de silanización, además, cada membrana solamente puede ser utilizada una vez.

2.- La adherencia al gel es menor que la ofrecida por la silanización, aunque esta es suficiente.

3.- La adherencia al soporte de vidrio, nunca es muy estable, lo que hace que su manipulación sea a veces engorrosa, debido a que existen

desplazamientos.

4.- Las películas se degradan con la exposición continuada a la luz.

No obstante, y aunque todos estos hechos hayan sido constatados durante las pruebas realizadas en este trabajo, somos partidarios de la utilización de las películas, principalmente debido a que no presentan toxicidad, a la rapidez y a la limpieza de la técnica (menor manipulación). Este criterio se mantiene por lo tanto durante todo el presente trabajo, aunque se hayan utilizado indistintamente ambas técnicas.

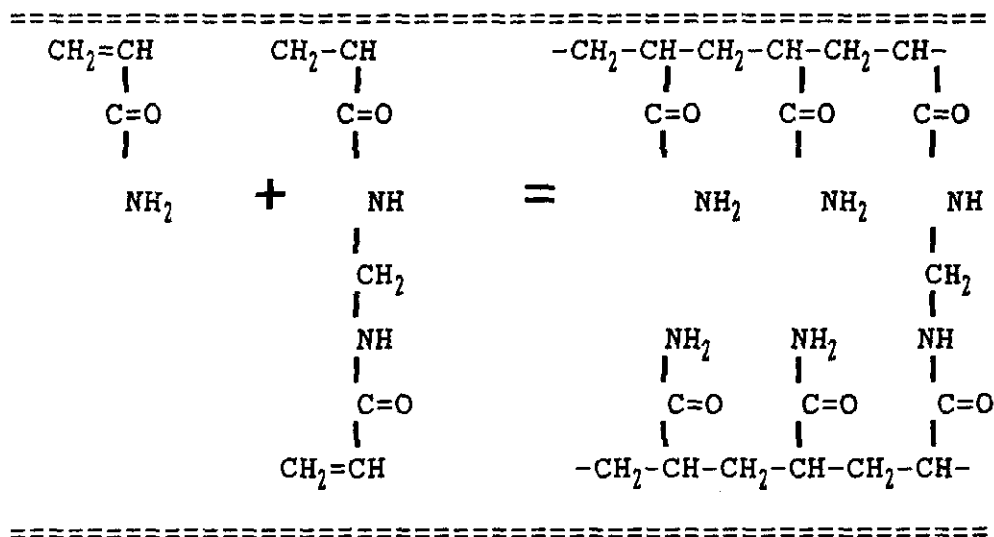
Los soportes sobre los que asentará el gel, fueron cerrados junto con los moldes, mediante Clamps, por todos sus laterales, menos por uno superior que servirá para rellenarlo. Siguiendo la técnica conocida como Sandwich.

- SOLUCION STOCK.

A.- INTRODUCCION: Los geles de poliacrilamida, están formados por la polimerización del monómero de acrilamida junto a un "Cross Linkers", (no se ha encontrado una traducción exacta de este término), que habitualmente es la

N,N',Metilen bisacrilamida, (BIS). Ver fig.6.

Fig.nº 6.



REACCION DE POLIMERIZACION DE LOS MONOMEROS DE POLIACRILAMIDA.

Esta reacción de polimerización, solamente tiene lugar en presencia de radicales libres, que químicamente los cede el Persulfato de Amonio ó la Riboflavina.

B.- VENTAJAS DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA: Las ventajas las podemos resumir en las siguientes:

- 1.- Presentan pocos grupos cargados eléctricamente, lo que les confieren una alta fiabilidad en los resultados, ya que pueden aplicarse corrientes eléctricas de hasta 300 V/cm.

2.- El tiempo de desarrollo de las técnicas separativas más corto que en otros tipos de geles.

3.- Permite utilizar geles de grosores muy finos, (hasta 0.1 mm), lo que proporciona:

- Menor tiempo de desarrollo de la técnica separativa.

- Fácil visualización de los resultados.

- Pequeñas cantidades de muestras.

4.- Son estables a cualquier Ph, excepto a Ph superiores a 10.

C.- DESVENTAJAS DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA:

1.- Retienen moléculas cuyo peso molecular sea superior a $0.4-0.5 \times 10^6$.

2.- Algunas veces, la polimerización es lenta.

3.- Toxicidad de los elementos empleados:

- La acrilamida y la bisacrilamida son tóxicas por ingestión, inhalación y por contacto.

- Los efectos son acumulativos en el caso de la bisacrilamida.

D.- OTROS "CROSS-LINKERS":

realizados con este cross-linkers, pueden contener altos niveles de material no polimerizado, lo que es tóxico y químicamente reactivo. (Boisso y col. 1.980).

- BAC (N.N'bisacrilicistamina).- No está muy difundido su uso, pero su empleo parece reservado casi exclusivamente par los geles que contengan grupos Tiol. (Hansen y col. 1.980).

- DHEBA (N.N'[1,2-Dihidroxi-etilen]-bisacrilamida).- Usada en geles altamente porosos con buenos resultados. (Righetti y col. 1.981).

E.- TAMAÑO DEL PORO: Las concentraciones de los geles de poliacrilamida se definen generalmente según la terminología de Hjerte (1.962).

$$T = \frac{A+B}{\text{Conc.}} \times 100$$

$$C = \frac{B}{A+B} \times 100$$

Donde:

B= Cantidad en gramos de Cross-linkers

A= Cantidad en gramos de Acrilamida

Conc.= Volumen (cc) total de la solución

El tamaño de poro del gel de poliacrilamida, viene determinado por dos parámetros:

1.- El diámetro de poro es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la concentración de poliacrilamida.

$$\phi = \frac{1}{\sqrt{A}}$$

2.- La concentración de B, así como el tipo de este, también controlan el tamaño del poro, obedeciendo a una distribución parabólica. (Fawcett y col. 1.966). Para una concentración ^d de C= 5%, se obtiene el mínimo tamaño de poro. Por debajo y por encima de este valor, el diámetro aumenta. (Rüchel y col. 1.966).

F.- PREPARACIÓN DE LA SOLUCION STOCK.-

Para los cuatro marcadores estudiados, se ha estandarizado unas características para la realización de los geles:

1.- T = 6.2 %, C = 3.2 %, correspondiéndose con las siguientes cantidades:

- 3 gr. de Acrilamida (L.K.B.)

- 0.1 gr. Bisacrilamida (L.K.B.)
- 50 cc. de H₂O calidad milli-Q.

2.- T = 5%, C = 3.2%, correspondiéndose con las siguientes cantidades:

- 2.43 gr. de Acrilamida (L.K.B.)
- 0.075 gr. de Bisacrilamida (L.K.B.)
- 50 cc. de agua calidad Milli-Q.

Como estabilizante del gradiente de Ph, se ha utilizado indistintamente la Sacarosa (Merck) y el Glicerol Bidestilado (Merck), ambos en proporción del 12%. En el caso de la utilización del Glicerol, no se añadió a la solución stock hasta el momento de su utilización.

Una vez realizadas las mezclas, se procedió a retirar los restos de ácido acrílicos existente en la mezcla, para ello, se añadió Amberlite MB-1 (Sigma) en proporción del 0.5% (P/V). Se dejó agitar durante 30 minutos y se filtró, conservándose en frigorífico a 4°C (*). Las soluciones así preparadas, son estables durante un mes. Recientemente, en un trabajo publicado por Pharmacia Fine Chemicals, aconseja la utilización del Amberlite MB-6 por ser esta más eficiente. En el

presente trabajo, no se ha podido constatar este hecho, por falta de dicha resina.

(*) El polímero de acrilamida no es tóxico, pero en la solución puede existir pequeñas cantidades de acrilamida libre que si lo es.

- POLIMERIZACION.

La polimerización de los geles, se realizó indistintamente de dos maneras:

1.- Mediante Persulfato amónico (Merck):

- Para geles cuyo estabilizante era la Sacarosa, se utilizó la siguiente proporción; 20% (P/V) en H₂O calidad Milli-Q.

- Para geles cuyo estabilizante era el glicerol, la proporción utilizada fue de 22,8 mg/cc de H₂O.

Ambas soluciones hay que prepararlas en el día.

2.- Mediante Riboflavina (Sigma), diluida en la siguiente proporción: 200mg/100cc de H₂O calidad Milli-Q.

Como acelerador de la reacción de polimerización, se utilizó el N,N,N',N', TETRAMETIL ETILENDIAMIDA (TEMED) (L.K.B.), basándose en la

capacidad de este producto de ceder aminas terciarias. Con respecto a la utilización del TEMED, hay que tener presente dos hechos fundamentales:

1.- Si la polimerización se realiza mediante Riboflavina, no es necesario la utilización del TEMED.

2.- Si se usan para establecer el rango de Ph del gel, anfolinas de la casa comercial Pharmacia (PHARMALYTE), los fabricantes aconsejan la no utilización del TEMED, ya que dichas anfolinas llevan incorporados los grupos aminos terciarios.

Personalmente, he comprobado que en el caso de la utilización de Pharmalyte sin TEMED, el tiempo de polimerización, no era controlable, siendo algunas veces largo y otras cortos. Por ello, es preferible la utilización del TEMED también en este caso.

El tiempo de polimerización con Riboflavina, puede llegar a ser excesivamente largo, y no exenta de fallos como ya reflejara Righetti y col. (1.981). Este hecho, también ha sido constatado en el presente trabajo, por lo que nos inclinamos a favor de la utilización de la polimerización mediante Persulfato amónico y TEMED.

SOLUCION STOCK	SOLUCION TRABAJO	POLIMERIZACION	ACELERADOR
	Volumen solución stock		
De sacarosa	‡ Anfolinas adecuadas	0.3‡ Persulfato al 2‡	
	‡ Separadores y aditivos		0.1‡ T.E.M.E.D.
		1‡ Persulfato (22.8 mg/cc)	
De glicerol			360 nm U.V.
		Riboflavina 2‡	

II.-METODO ANALITICO PARA LOS SISTEMAS ESTUDIADOS

A.- PARTICULARIDADES PARA EL SISTEMA Gc. GLOBULINAS.

A₁.- MUESTRAS.-

Las muestras, fueron tratadas de las siguientes maneras:

1.- Sueros testigos: Se diluyeron en agua calidad Milli-Q, en proporción 1/20.

2.- Manchas de sangre: Para solubilizar a las Gc, se utilizó una solución de Urea (Merck) 6M en agua, (1.8gr/5cc). Se prefirió utilizar urea frente a la Formamida, ya que no se obtuvieron referencias suficientes de la utilización y

resultados de este reactivo.

De esta manera, se maceró trozos de gasas manchadas en sangre de unos 5 X 5 mm. en 40 µl de la solución de Urea 6M. La maceración se realizó a Temperatura ambiente (20°C), y el tiempo de maceración dependió de la antigüedad de la muestra, como referencia se tomó 60 minutos para muestras con antigüedad de 1 mes.

A₇.- CARACTERISTICAS DE LOS GELES.

1.- GELES CON SACAROSA.

- TAMAÑO: 50 X 40 X 0.25 mm
- CONCENTRACION: T = 6.2%, C = 3.2%, S = 12%.
- COMPOSICION: Para 2cc de solución Stock.

a) Anfolinas:

- 6% rango Ph 4.5-5.4 = 120 µl
- 0.5% rango Ph 2.5-5 = 10 µl

b) Separadores:

- 1.3% (P/V) de [N-(2-Hidroxietil)] piperazina etanosulfónica. (HEPES) = 26 mg.
- 0.6% (P/V) de [N-(2-Acetoamida)]-2 ácido amino etanosulfónico. (ACES) = 12 mg.

- CONDICIONES DE POLIMERIZACION:

- Desgasificar en rotación continua la solución anterior durante 10 minutos.

- Añadir 7 µl de una solución fresca de Persulfato Amónico al 20% en agua calidad Milli-Q.

- Añadir 1 µl de TEMED.

- Rellenar los moldes dispuestos a tal fin mediante pipetas Pasteur. Incubar a 37°C durante 20 minutos aproximadamente.

2.- GELES CON GLICEROL.

- TAMAÑO: 50 X 40 X 0.25 mm

- CONCENTRACION: En este caso se utilizaron las siguientes características de los geles, T = 5 %, C = 3 %, G = 12%.

- COMPOSICION: Para 2cc de solución Stock, preparada solamente con Acrilamida-bisacrilamida, y desgasificada toda ella previamente durante 10 minutos.

(Este paso resultó crítico para obtener una buena polimerización).

- 12% de Glicerol = 240 µl

a) Anfolinas:

- 6% rango Ph 4.5-5.4 = 120 µl

- 0.5% rango Ph 2.5-5 = 10 µl

b) Separadores:

- 1.3% (P/V) de [N-(2-Hidroxietyl)]
piperazina etanosulfónica. (HEPES) = 26 mg.

- 0.6% (P/V) de [N-(2-Acetoamida)]-
2 ácido amino etanosulfónico. (ACES) = 12 mg.

- CONDICIONES DE POLIMERIZACIÓN:

- La mezcla fue nuevamente
desgasificada durante 10 minutos.

- Se la añadió 20 µl de una
solución de Persulfato Amónico (22.8mg/cc)

- 1 µl de TEMED.

- Se procedió a rellenar los
moldes dispuestos a tal fin, y se incubó a 37°C
durante 30 minutos.

NOTA: Las anfolinas utilizadas fueron indistintamente
la de las casas Pharmacia, L.K.B. y de Sigma, no
encontrándose diferencias consustanciales entre
ellas.

Los separadores usados, fueron indistintamente
de las casas L.K.B. y Sigma.

A₃.- CONDICIONES ELECTRICAS

La aplicación de los electrodos sobre el
gel, fue de manera directa, no utilizándose ningún

tipo de tiras empapadas en soluciones.

a) Prefocusing:

350 V ; 15 mA ; 1 W, durante 100 Vh.

b) Aplicación de muestras:

Las muestras se aplicaron mediante papel Whatman del N^o 3, de unas dimensiones de 4 X 3mm. El volumen total de muestras fue el empapado por el papel.

La aplicación se realizó a 0.5mm del Cátodo, y las condiciones eléctricas fueron:

350 V ; 15 mA ; 1 W, durante 100 Vh.

c) Focusing:

Antes de iniciar el desarrollo de las muestras, se procedió a retirar las mismas, y se establecieron las siguientes condiciones:

1.200 V ; 15 mA ; 2.5 W, durante 1.600 Vh.

Todo el sistema fue refrigerado durante el proceso completo con una temperatura de 10 \pm C.

B.- PARTICULARIDADES PARA EL SISTEMA DEL
OROSOMUCOIDE.

B₁.- PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Las muestras fueron estudiadas en estado natural, y tras ser sometidas a desialización, según el siguiente procedimiento:

1.-Sueros testigos:

-Sin desializar:

Los sueros fueron diluidos en la proporción de 1:5 (Suero/agua). El agua utilizada fue calidad Milli Q.

- Desializados:

Las muestras de sueros, fueron desializadas siguiendo el siguiente procedimiento:

- Se preparó una solución tampón de Acetato Sódico 0.005 M, Ph 5.5, conteniendo 15.4 mM de ClNa y 0.9 mM de Cl₂Ca.

- A 2 mL de dicha solución, se añadió 1 mg de Neuraminidasa del Clostridium Prefingens (Tipo V de Sigma, título 1 µl/mg).

- 10 µl de suero, fue incubado con 10 µl de solución de neuraminidasa preparada anteriormente, a 40 C, durante toda la noche.

2.- Manchas de sangre:

- Sin desializar:

En el caso de las manchas, se utilizó un trozo de gasa de unos 5 X 5mm macerándola con 40 µl de una solución de Urea 6M durante 1 a 2 horas. A temperatura ambiente (20°C). (El tiempo de maceración, dependerá de la antigüedad de la muestra).

- Desializadas:

El procedimiento fue similar al anterior, y la desialización se llevó acabo añadiendo 20 µl de solución de neuraminidasa titulo 1 µl/mg a 20 µl de macerado, dejándola a 4°C, durante toda la noche.

B₂.- CARACTERISTICAS DE LOS GELES.

MUESTRAS SIN DESIALIZAR

1.- GELES CON SACAROSA.

- TAMAÑO: 50 X 40 X 0.25 mm
- CONCENTRACION: T = 6.2%, C = 3.2%, S = 12%.
- COMPOSICION: Para 2cc de solución Stock.

Anfolinas:

- 10% rango Ph 4-6.5 = 200 µl

- CONDICIONES DE POLIMERIZACION:

- Desgasificar en rotación continua la solución anterior durante 10 minutos.

- Añadir 7 µl de una solución fresca de Persulfato Amónico al 20% en agua calidad Milli-Q.

- Añadir 1 µl de TEMED.

- Rellenar los moldes dispuestos a tal fin mediante pipetas Pasteur. Incubar a 37°C durante 20 minutos aproximadamente.

2.- GELES CON GLICEROL.

- TAMAÑO: 50 X 40 X 0.25 mm

- CONCENTRACION: En este caso se utilizaron las siguientes características de los geles, T = 5 %, C = 3 %, G = 12%.

- COMPOSICION: Para 2cc de solución Stock, preparada solamente con Acrilamida-bisacrilamida, y desgasificada toda ella previamente durante 10 minutos.

(Este paso resultó crítico para obtener una buena polimerización).

- 12% de Glicerol = 240 µl

Anfolinas:

- 10% rango Ph 4-6.5 = 200 µl

- CONDICIONES DE POLIMERIZACIÓN:

- La mezcla fue nuevamente desgasificada durante 10 minutos.
- Se la añadió 20 µl de una solución de Persulfato Amónico (22.8mg/cc)
- 1 µl de TEMED.
- Se procedió a rellenar los moldes dispuestos a tal fin, y se incubó a 37°C durante 30 minutos.

MUESTRAS DESIALIZADAS

1.- GELES CON SACAROSA.

- TAMAÑO: 50 X 40 X 0.25 mm
- CONCENTRACION: T = 6.2%, C = 3.2%, S = 12%.
- COMPOSICION: Para 2cc de solución Stock.

a) Anfolinas:

- 6% rango Ph 4.2-4.9 = 120 µl
- 6% rango Ph 4.5-5.4 = 120 µl

b) Separadores:

- 0.4% (P/V) de [N-(2-Acetoamida)]-2 ácido amino etanosulfónico. (ACES) = 8 mg.

- CONDICIONES DE POLIMERIZACION:

- Desgasificar en rotación continua

la solución anterior durante 10 minutos.

- Añadir 7 μ l de una solución fresca de Persulfato Amónico al 20% en agua calidad Milli-Q.

- Añadir 1 μ l de TEMED.

- Rellenar los moldes dispuestos a tal fin mediante pipetas Pasteur. Incubar a 37°C durante 20 minutos aproximadamente.

2.- GELES CON GLICEROL.

- TAMAÑO: 50 X 40 X 0.25 mm

- CONCENTRACION: En este caso se utilizaron las siguientes características de los geles, T = 5 %, C = 3 %, G = 12%.

- COMPOSICION: Para 2cc de solución Stock, preparada solamente con Acrilamida-bisacrilamida, y desgasificada toda ella previamente durante 10 minutos.

(Este paso resultó crítico para obtener una buena polimerización).

- 12% de Glicerol = 240 μ l

- a) Anfolinas:

- 6% rango Ph 4.5-5.4 = 120 μ l

- 6% rango Ph 4.2-4.9 = 120 μ l

b) Separadores:

- 0.4% (P/V) de [N-(2-Acetoamida)]-
2 ácido amino etanosulfónico. (ACES) = 8 mg.

- CONDICIONES DE POLIMERIZACIÓN:

- La mezcla fue nuevamente
desgasificada durante 10 minutos.

- Se le añadió 20 µl de una
solución de Persulfato Amónico (22.8mg/cc)

- 1 µl de TEMED.

- Se procedió a rellenar los moldes
dispuestos a tal fin, y se incubó a 37°C durante 30
minutos.

NOTA: Las anfolinas utilizadas fueron
indistintamente la de las casas Pharmacia, L.K.B. y
de Sigma, no encontrándose diferencias
consustanciales entre ellas.

Los separadores usados, fueron indistintamente
de las casas L.K.B. y Sigma.

B₁.- CONDICIONES ELECTRICAS.

La aplicación de los electrodos sobre el
gel, fue de manera directa, no utilizándose ningún
tipo de tiras empapadas en soluciones.

a) Prefocusing:

350 V ; 15 mA ; 1 W, durante 100 Vh.

b) Aplicación de muestras:

Las muestras se aplicaron mediante papel Whatman del N^o 3, de unas dimensiones de 4 X 3mm. El volumen total de muestras fue el empapado por el papel.

La aplicación se realizó a 0.5mm del Cátodo, y las condiciones eléctricas fueron:

350 V ; 15 mA ; 1 W, durante 100 Vh.

c) Focusing:

Antes de iniciar el desarrollo de las muestras, se procedió a retirar las mismas, y se establecieron las siguientes condiciones:

1.200 V ; 15 mA ; 2.5 W, durante 1.300 Vh.

Todo el sistema fue refrigerado durante el proceso completo con una temperatura de 10 \pm C.

C.- PARTICULARIDADES PARA EL SISTEMA DE LAS TRANSFERRINAS.

C₁.- TRATAMIENTO DE MUESTRAS.

1.-Sueros testigos:

- Sin desializar:

Los sueros testigos fueron diluidos en agua destilada (calidad Milli-Q) en la proporción de 4:7. Se añadió una proporción de 3:1 de una solución de Sulfato Amónico ferroso (SAL DE MOHR), (290mg/ml). (3 partes de Sulfato/ 1 de suero).

Se dejó en incubación durante toda la noche a 40C.

- Desializadas:

La desialización se llevó acabo mediante una solución de Neuroaminidasa Tipo V de Sigma con un título medio de 5 U/ml, en proporción de 3:1 (Neuraminidasa/suero).

- Se añadió una proporción de 3:1 de una solución de Sulfato Amónico ferroso (SAL DE MOHR), (290mg/ml). (Tres partes de Sulfato/ 1 de suero).

Se dejó en incubación durante toda la noche a 40C.

2.- Manchas de sangre:

- Sin desializar:

Un trozo de gasa de unos 5 X 5 mm, se maceró toda la noche a 40 C con la siguiente solución:

- 50 µl de una solución de Sulfato amónico ferroso (SAL DE MOHR), (290mg/ml).

- Desializadas:

Un trozo de gasa de unos 5 X 5 mm, se maceró toda la noche a 40 C con la siguiente solución:

- 20 µl de Neuraminidasa (Tipo V sigma Título 5 U/ml).

- 20 µl de una solución de Sulfato amónico ferroso (SAL DE MOHR), (290mg/ml).

C₂.- CARACTERISTICAS DE LOS GELES

MUESTRAS SIN DESIALIZAR

1.- GELES CON SACAROSA.

- TAMAÑO: 50 X 40 X 0.25 mm
- CONCENTRACION: T = 6.2%, C = 3.2%, S = 12%.
- COMPOSICION: Para 2cc de solución Stock.

a) Anfolidinas:

- 10% rango Ph 5-7 = 200 µl

b) Separadores:

- 0.2% (P/V) de [N-(2-Hidroxietyl)]

piperazina etanosulfónica. (HEPES). = 4 mg

- CONDICIONES DE POLIMERIZACION:

- Desgasificar en rotación continua la solución anterior durante 10 minutos.

- Añadir 7 µl de una solución fresca de Persulfato Amónico al 20% en agua calidad Milli-Q.

- Añadir 1 µl de TEMED.

- Rellenar los moldes dispuestos a tal fin mediante pipetas Pasteur. Incubar a 37°C durante 20 minutos aproximadamente.

2.- GELES CON GLICEROL.

- TAMAÑO: 50 X 40 X 0.25 mm

- CONCENTRACION: En este caso se utilizaron las siguientes características de los geles, T = 5 %, C = 3 %, G = 12%.

- COMPOSICION: Para 2cc de solución Stock, preparada solamente con Acrilamida-bisacrilamida, y desgasificada toda ella previamente durante 10 minutos.

(Este paso resultó crítico para obtener una buena

polimerización).

- 12% de Glicerol = 240 µl

a) Anfolinas:

- 10% rango Ph 5-7 = 200 µl

b) Separadores:

- 0.2% (P/V) de [N-(2-Hidroxietil)]
piperazina etanosulfónica. (HEPES).= 4 mg

- CONDICIONES DE POLIMERIZACIÓN:

- La mezcla fue nuevamente
desgasificada durante 10 minutos.

- Se le añadió 20 µl de una solución
de Persulfato Amónico (22.8mg/cc)

- 1 µl de TEMED.

- Se procedió a rellenar los moldes
dispuestos a tal fin, y se incubó a 37°C durante 30
minutos.

MUESTRAS DESIALIZADAS

1.- GELES CON SACAROSA.

- TAMAÑO: 50 X 40 X 0.25 mm

- CONCENTRACION: T = 6.2%, C = 3.2%, S = 12%.

- COMPOSICION: Para 2cc de solución Stock.

a) Anfolinas:

- 10% rango Ph 5-7 = 200 µl

- CONDICIONES DE POLIMERIZACION:

- Desgasificar en rotación continua la solución anterior durante 10 minutos.

- Añadir 7 µl de una solución fresca de Persulfato Amónico al 20% en agua calidad Milli-Q.

- Añadir 1 µl de TEMED.

- Rellenar los moldes dispuestos a tal fin mediante pipetas Pasteur. Incubar a 37°C durante 20 minutos aproximadamente.

2.- GELES CON GLICEROL.

- TAMAÑO: 50 X 40 X 0.25 mm

- CONCENTRACION: En este caso se utilizaron las siguientes características de los geles, T = 5 %, C = 3 %, G = 12%.

- COMPOSICION: Para 2cc de solución Stock, preparada solamente con Acrilamida-bisacrilamida, y desgasificada toda ella previamente durante 10 minutos.

(Este paso resultó crítico para obtener una buena polimerización).

- 12% de Glicerol = 240 µl

a) Anfolinas:

- 10% rango Ph 5-7 = 200 µl

- CONDICIONES DE POLIMERIZACIÓN:

- La mezcla fue nuevamente desgasificada durante 10 minutos.

- Se le añadió 20 μ l de una solución de Persulfato Amónico (22.8mg/cc)

- 1 μ l de TEMED.

- Se procedió a rellenar los moldes dispuestos a tal fin, y se incubó a 37 \circ C durante 30 minutos.

NOTA: Las anfolinas utilizadas fueron indistintamente la de las casas Pharmacia, L.K.B. y de Sigma, no encontrándose diferencias consustanciales entre ellas.

Los separadores usados, fueron indistintamente de las casas L.K.B. y Sigma.

B₃.- CONDICIONES ELECTRICAS.

La aplicación de los electrodos sobre el gel, fue de manera directa, no utilizándose ningún tipo de tiras empapadas en soluciones.

a) Prefocusing:

250 V ; 15 mA ; 1 W, durante 100 Vh.

b) Aplicación de muestras:

Las muestras se aplicaron mediante doble papel Whatman del NQ 3, de unas dimensiones de 4 X 3mm. El volumen aplicado de muestras fue el empapado por el papel. (Aproximadamente 10 μ l).

La aplicación se realizó a 0.5mm del Cátodo, y las condiciones eléctricas fueron:

250 V ; 15 mA ; 1 W, durante 100 Vh.

c) Focusing:

Antes de iniciar el desarrollo de las muestras, se procedió a retirar las mismas, y se establecieron las siguientes condiciones:

1.200 V ; 15 mA ; 2.5 W, durante 1.600 Vh.

Todo el sistema fue refrigerado durante el proceso completo con una temperatura de 6 \circ C.

D.- PARTICULARIDADES PARA EL SISTEMA DE LAS α_2 - HS.

La detección de todos los fenotipos completos de la α -2 HS, requiere un doble análisis, por un lado, las muestras deben de ser estudiadas sin desializar. De esta manera, los fenotipos más comunes AHSG 1, AHSG 2-1 y AHSG 2, son detectados sin

dificultad, además, se pueden estudiar el resto de ellos salvo: AHSG 10 y AHSG 15 que son indistinguibles de los fenotipos AHSG 11 y AHSG 13 respectivamente. (Yuasa y col. 1.988) y (Tomas y col. 1.990).

Por otro lado, la desialización de las muestras no diferencia los fenotipos AHSG 9 y 10 de los AHSG 2 y 1 respectivamente. (Yuasa y col. 1988).

D₁.- PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

1.- Sueros testigos:

- Sin desdializar:

Los sueros fueron diluidos en agua destilada (calidad Milli-Q) en proporción 1:2 (suero/agua).

- Desialización:

Se realizó con 20 µl de Neuroaminidasa (Tipo V de Sigma, título 1 U/ml, Ph 5.5) con 5 µl de suero. Se dejó incubar toda la noche a temperatura ambiente.

2.- Manchas de sangre:

- Sin desializar:

Un trozo de gasa de unos 5 X 5mm, fue

macerado en 20 μ l de H₂O, durante 1 hora a temperatura ambiente.

- Desialización:

Un trozo de gasa de unos 5 X 5mm, fue macerado con 20 μ l de una solución de Neuroaminidasa (Tipo V de Sigma, título 1 U/ml, Ph 5.5), durante toda la noche a temperatura ambiente (20 \circ C).

D₂.- CARACTERISTICAS DE LOS GELES.

MUESTRAS SIN DESIALIZAR

1.- GELES CON SACAROSA.

- TAMAÑO: 50 X 40 X 0.25 mm
- CONCENTRACION: T = 6.2%, C = 3.2%, S = 12%.
- COMPOSICION: Para 2cc de solución Stock.

a) Anfolinas:

- 5% rango Ph 4.5-5.4 = 100 μ l
- 5% rango Ph 4.2-4.9 = 100 μ l

b) Separadores:

- 1.5% (P/V) de [N-(2-Acetoamida)]-2 ácido amino etanosulfónico. (ACES) = 30 mg.

- CONDICIONES DE POLIMERIZACION:

- Desgasificar en rotación

continua la solución anterior durante 10 minutos.

- Añadir 7 μ l de una solución fresca de Persulfato Amónico al 20% en agua calidad Milli-Q.

- Añadir 1 μ l de TEMED.

- Rellenar los moldes dispuestos a tal fin mediante pipetas Pasteur. Incubar a 37 $^{\circ}$ C durante 20 minutos aproximadamente.

2.- GELES CON GLICEROL.

- TAMAÑO: 50 X 40 X 0.25 mm

- CONCENTRACION: En este caso se utilizaron las siguientes características de los geles, T = 5 %, C = 3 %, G=12%.

- COMPOSICION: Para 2cc de solución Stock, preparada solamente con Acrilamida-bisacrilamida, y desgasificada toda ella previamente durante 10 minutos.

(Este paso resultó crítico para obtener una buena polimerización).

- 12% de Glicerol = 240 μ l

a) Anfolinas:

- 5% rango Ph 4.5-5.4 = 100 μ l

- 5% rango Ph 4.2-4.9 = 100 μ l

b) Separadores:

- 1.5% (P/V) de [N-(2-Acetoamida)]-
2 ácido amino etanosulfónico. (ACES) = 30 mg.

- CONDICIONES DE POLIMERIZACIÓN:

- La mezcla fue nuevamente
desgasificada durante 10 minutos.

- Se la añadió 20 µl de una
solución de Persulfato Amónico (22.8mg/cc)

- 1 µl de TEMED.

- Se procedió a rellenar los
moldes dispuestos a tal fin, y se incubó a 37°C
durante 30 minutos.

MUESTRA DESIALIZADA

1.- GELES CON SACAROSA.

- TAMAÑO: 50 X 40 X 0.25 mm

- CONCENTRACION: T = 6.2%, C = 3.2%, S = 12%.

- COMPOSICION: Para 2cc de solución Stock.

a) Anfollinas:

- 5% rango Ph 5 - 6 = 100 µl

b) Aditivos:

- 340 mg de Urea.

- CONDICIONES DE POLIMERIZACION:

- Desgasificar en rotación continua la solución anterior durante 10 minutos.

- Añadir 7 μ l de una solución fresca de Persulfato Amónico al 20% en agua calidad Milli-Q.

- Añadir 1 μ l de TEMED.

- Rellenar los moldes dispuestos a tal fin mediante pipetas Pasteur. Incubar a 37 \circ C durante 20 minutos aproximadamente.

2.- GELES CON GLICEROL.

- TAMAÑO: 50 X 40 X 0.25 mm

- CONCENTRACION: En este caso se utilizaron las siguientes características de los geles, T = 5 %, C = 3 %, G = 12%.

- COMPOSICION: Para 2cc de solución Stock, preparada solamente con Acrilamida-bisacrilamida, y desgasificada toda ella previamente durante 10 minutos.

(Este paso resultó crítico para obtener una buena polimerización).

- 12% de Glicerol = 240 μ l

a) Anfolinas:

- 5% rango Ph 4 - 6 = 100 μ l

b) Aditivos:

- 340 mg de Urea

- CONDICIONES DE POLIMERIZACIÓN:

- La mezcla fue nuevamente desgasificada durante 10 minutos.

- Se le añadió 20 µl de una solución de Persulfato Amónico (22.8mg/cc)

- 1 µl de TEMED.

- Se procedió a rellenar los moldes dispuestos a tal fin, y se incubó a 37°C durante 30 minutos.

D₃.- CONDICIONES ELECTRICAS.

La aplicación de los electrodos sobre el gel, fue de manera directa, no utilizándose ningún tipo de tiras empapadas en soluciones.

a) Prefocusing:

250 V ; 15 mA ; 1 W, durante 100 Vh.

b) Aplicación de muestras:

Las muestras se aplicaron mediante papel Whatman del N° 3, de unas dimensiones de 4 X 3mm. El volumen total de muestras fue el empapado por el papel.

La aplicación se realizó a 0.5mm del Cátodo, y las condiciones electricas fueron:

250 V ; 15 mA ; 1 W, durante 100 Vh.

c) Focusing:

Antes de iniciar el desarrollo de las muestras, se procedió a retirar las mismas, y se establecieron las siguientes condiciones:

1.200 V ; 15 mA ; 2.5 W, durante 1.600 Vh.

Todo el sistema fue refrigerado durante el proceso completo con una temperatura de 10 \circ C.

NOTA: Las anfolinas utilizadas fueron indistintamente la de las casas Pharmacia, L.K.B. y de Sigma, no encontrándose diferencias significativas entre ellas.

Los separadores usados, fueron indistintamente de las casas L.K.B. y Sigma.

III.- METODO ESTADISTICO.

A.- Frecuencias fenotípicas, genotípicas y alélicas:

El examen fenotípico de los individuos, es el punto inicial de estudio en todas las poblaciones.

Partiendo de la definición de la frecuencia es igual al número de sucesos favorables dividido por el número total de sucesos, podemos considerar un caso hipotético de un locus autosómico

A, con dos alelos a los que llamaremos A_1 y A_2 , los genotipos posible serán: $A_1 A_1$, $A_1 A_2$ y $A_2 A_2$. Siendo N el número de representante de la población estudiada, N_1 el número de representantes con el genotipo $A_1 A_1$, N_2 el de $A_1 A_2$ y N_3 el de $A_2 A_2$, se debe de cumplir que:

$$N = N_1 + N_2 + N_3$$

y por consiguiente:

$$N_1/N = X ; \text{ frecuencia de } A_1 A_1$$

$$N_2/N = Y ; \text{ frecuencia de } A_1 A_2$$

$$N_3/N = Z ; \text{ frecuencia de } A_2 A_2$$

$$X + Y + Z = 100\%$$

El total de gametos con el alelo A_1 en nuestro ejemplo será:

$$(N_1 + 1/2 N_2) / N = p$$

p =frecuencia génica del alelo A_1 . Del mismo modo tendremos:

$$(1/2 N_2 + N_3) / N = q$$

q = frecuencia génica del alelo A₂.

Otra forma de expresión de estas frecuencias génicas será:

$$p = X + 1/2 Y; q = 1/2 Y + Z$$

Por lo tanto, podemos decir que las frecuencias génicas (f), será igual a el N^o de Homocigótico para ese alelo (HH), más la mitad de los Heterocigóticos (Hh), partido por el N^o total de individuos de la población.

$$f = (\Sigma HH + \Sigma Hh/2) / N$$

B.- Equilibrio Hardy-Weinberg:

En 1.908, Hardy y Weinberg, independientemente, establecieron que en una población grande con apareamiento aleatorio, las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación a generación, en ausencia de migración, mutación y selección, estando las

frecuencias determinadas por las frecuencias génicas. A las poblaciones que cumplen dicha ley, se les dice que están en equilibrio de Hardy-Weinberg.

El cálculo matemático de dicha ley, parte de la base que el apareamiento aleatorio entre individuos es igual a la unión aleatoria de sus gametos.

C.- Estadístico χ^2 :

El valor del estadístico χ^2 se obtiene de la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \left(\sum (F_e - F_t)^2 \right) / F_t$$

Siendo F_e las frecuencias absolutas encontradas en el estudio poblacional, F_t , las frecuencias teóricas, calculadas a partir de las frecuencias génicas, siendo el número de grados de libertad igual al número de fenotipos menos el de alelos.

El valor de la χ^2 sirve de comparación entre los valores observados y los esperados.

D.- Índice de Heterogenicidad:

Viene expresado por la formula:

$$I.H. = Hh / N$$

donde Hh es el N^o de Heterocigóticos encontrados en la población. N es el número total de estudiados.

Indica la cuantía de polimorfismo y eficacia de cada sistema.

E.- Probabilidad acumulada de identidad y potencial acumulado de discriminación:

La probabilidad acumulada de identidad, viene expresada por la siguiente fórmula:

$$PI = \sum Pi^2$$

Indica la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar tengan el mismo fenotipo. Ofrece de esta manera un índice del valor del marcador para la individualización de las personas (Fisher, 1.951).

El potencial acumulado de discriminación, está expresado por la siguiente fórmula:

$$P.D. = (1 - \Sigma PI)$$

Expresa la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar difieran en su fenotipo. (Jones, 1.972).

METODOS DE TINCION

I.- INTRODUCCION.

El apartado más importante dentro de las técnicas electroforéticas, es sin lugar a duda los sistemas de detección de las proteínas separadas. Hasta tal punto es importante que una mala técnica de detección hace fracasar todo el proceso. Por lo tanto, resulta crítico este último apartado, fundamentalmente en elegir un método con la suficiente sensibilidad y poder de discriminación de bandas. (Moeremans y cols. 1.987).

Cada día con mayor insistencia, se está empleando como método de fijación, anticuerpos específicos contra las proteínas que se pretenden estudiar (Inmunofijación). Estos, son Inmunoglobulinas monoclonales, altamente específicas y muy purificadas, hasta el punto que según Ramlau y col. (1.987), la especificidad de una técnica de Inmunofijación, depende de la calidad de los anticuerpos empleados. Parece ser que el tipo de animal donador de estas Inmunoglobulinas, no interfiere en la calidad de esta. Algunos autores

como Ramlau y col. (1.987), proponen que se utilice una mezcla de antisueros proveniente de distintos animales inmunizados, con lo cual se disminuye las variaciones en las respuestas.

GENERALIDADES SOBRE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS.

INMUNOTINCION:

En 1.953, Grabar y Willians, descubrieron por vez primera la técnica de inmunofijación de proteínas aplicadas a las electroforesis del suero, llamándoles Inmunolectroforesis. Desde entonces, no solo las técnicas de inmunofijación han variado cuantitativa y cualitativamente, si no que las técnicas separativas, consiguen una mayor precisión en la separación de las muestras.

Básicamente, la Inmunotinción, va a consistir en tres pasos perfectamente delimitados:

A.- INMUNOFIJACION

Mediante este primer paso, todas o algunas de las muestras separadas mediante técnicas electroforéticas, y que actúan como Antígenos frente a los Anticuerpos específicos, son fijadas a la matriz donde se ha realizado la separación,

formándose un complejo Ag-Ac que queda retenido en los poros de dicha matriz.

La especificidad así como la purificación del Ac. utilizado, va a determinar la especificidad de la técnica de Inmunofijación.

Las características que debe de reunir un Anticuerpo para que pueda ser utilizado como fijador de proteínas van a ser:

1.- QUE SEA ESPECIFICO

Es decir, que reconozca una sola proteína. De esta manera, nos evitaremos errores de identificaciones posteriores.

2.- QUE ESTE ALTAMENTE PURIFICADO

El proceso de purificación es extremadamente importante cuando se utilizan como antígenos a sueros completos, o fracciones más o menos amplias de los mismos. En el primer caso, la purificación se debe de realizar en los sueros obtenidos de los animales inmunizados. En el segundo, es el suero que actúa como antígeno el que se somete a purificación.

Actualmente, los procesos de purificación, se realizan tanto en el suero del donador como en el del receptor, esto, combinado con buenas técnicas

separativas, hace que el grado de pureza de los anticuerpos sea en la mayoría de los casos del 100%.

3.- UNION ANTIGENO ANTICUERPO

También es de extremada importancia el hecho de que la unión del complejo Ag-Ac, sea lo suficientemente estable como para que no se deshaga durante los procesos de lavados y desarrollo de las técnicas de tinción.

B.- SOLUBILIZACION

Consiste en retirar todas aquellas proteínas y demás resto de las muestras que no hayan sido reconocidas por los antisueros. El procedimiento de solubilización, suele ser mediante lavados sucesivos en soluciones cuyo Ph, permitan la retirada de las proteínas no deseadas.

Es extremadamente importante el retirar los resto de muestras que no están formando complejos inmunes, ya que de ello va a depender por un lado la perfecta identificación de las proteínas, y por otro, va a eliminar los excesos de fondos coloreados (Background). Es absolutamente imprescindible su realización cuando vamos a utilizar una técnica de tinción general para proteínas.

C.- TINCION

Son muchas y muy variadas las técnicas de tinción general que se pueden utilizar en las inmunofijaciones, siendo las más utilizadas el Silverstain (Tinción de plata) y el Azul de Coomassie. Mediante la inmunofijación previamente realizada, suplimos la falta de especificidad de dichas tinciones generales.

De ambas técnicas, el Silverstain, es la que mejores resultados ofrece, necesitándose menos cantidad de muestra para que se pueda visualizar las proteínas que en el caso del azul de Coomassie. En cambio, es más costosa y laboriosa que esta.

INMUNOBLOTTING:

El blotting como técnica de fijación, fue descrita por vez primera por Southern (1.975), y más tarde adaptada a proteínas por Renhart (1.978). (Johansson, 1.987).

Básicamente, consiste en cuatro pasos fundamentales:

1.- BLOTTING

Consiste en la transferencia y fijación de las muestras separadas a membranas, siendo las más usadas las de Nitrocelulosa (NC) ó de Polivinil-difluoride (PVDF).

Las fuerzas que obligan a la transferencia son varias, pero entre ellas destacamos:

- Eléctricas, dando lugar al llamado Electroblotting.

- Osmóticas, dando origen al Blotting por difusión.

- Vacío, dando origen al denominado Vacun-blotting. (Jacobson y cols. 1.990).

La forma más utilizada desde un punto de vista rutinario, es el Blotting por difusión sobre membranas de NC, ó PVDF. En el caso del presente trabajo, estas son también las condiciones usadas.

FACTORES A TENER EN CUENTA EN LA REALIZACION DEL BLOTTING POR DIFUSION

- 1.- Solamente se transfiere entre el 30 y el 35% de las proteínas separadas.

- 2.- Presentan problemas para su realización cuando el peso molecular de las muestras es elevado.

- 3.- Es de extremada importancia el tamaño del poro que tenga la membrana usada.

- 4.- Es crítico la elección del tampón de transferencia, principalmente del Ph de este, así

como los aditivos utilizados en su fabricación.

5.- El poder de fijación de las membranas usadas va a variar según el tipo de estas, así tenemos que para las NC, se estima que son capaces de fijar entre 80 a 250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Montelaro, 1.987). En el caso de las PVDF, se estima que su poder de fijación para proteínas es de 190 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. (Montelaro, 1.987.).

Personalmente, en el presente trabajo, no se ha constatado diferencias apreciables en la capacidad fijadora de uno u otro tipo de membranas.

6.- Tanto las NC como las PVDF, pueden ser sometidas a tinciones con colorantes aniónicos.

2.-BLOQUEO DE LAS MEMBRANAS

Consiste en bloquear los poros de la membrana de transferencia, una vez que esta ha fijado las muestras. Para ello se utilizan proteínas tales como la Gelatina, Caseína, Albúmina, etc. Su objetivo es evitar que dichos poros puedan retener los antisueros que se usen para reconocer a las proteínas objeto de estudio. De esta manera, se obtiene una limpieza de fondos excelente, eliminándose así el exceso de Background.

3.- FIJACION DE LAS PROTEINAS ELEGIDAS

Se realiza mediante una reacción Ag-Ac, con Anticuerpos específicos. Dicho complejo inmune, queda retenido entre los poros de la membrana, ofreciendo una fijación muy fuerte y selectiva.

4.- SOLUBILIZACIÓN DE PROTEINAS NO FIJADAS

Tiene por objeto eliminar todas aquellas proteínas no reconocidas por el antisuero. De esta manera, se aumenta la especificidad de la técnica, así como se elimina el Background, facilitándose la identificación posterior.

PARTICULARIDADES SOBRE EL SISTEMA DE INMUNOTINCION

1.- FIJACION:

Las fijaciones de los sistemas estudiados se realizaron con Inmunoglobulinas de conejos específicas, frente a: Gc-globulinas humanas (Dakopatts), ORM Humano (Dakopatts), Tf Humana (Dakopatts) y α_2 - HS humana (Behring).

El procedimiento de realización de la inmunofijación es el siguiente:

- Una vez realizado el IEF, sumergimos las placas en una dilución del antisuero

correspondiente, a una concentración, temperatura y tiempo de incubación que dependerá de la proteína a estudiar. (Ver esquema).

- Después de realizada la inmunofijación, se procedió a realizar 4 lavados con suero fisiológico a temperatura ambiente, durante un tiempo total de 2 horas en agitación continua.

Las características de los procesos de fijación quedan resumidas en el siguiente esquema:

	GC	TF	ORM	$\alpha 2$ -HS
TITULO	100	750	450	-
TIPO	CONEJO	CONEJO	CONEJO	CONEJO
CONCENT	1:50	1:50	1:50	1:50
TEMPER	20°C	20°C	20°C	20°C
TOTAL	60'	60'	60'	60'

NOTA: Las diluciones de los antisueros, fueron realizadas en agua destilada calidad Milli. Q. Se consideró que la temperatura ambiente del laboratorio fue de 20°C.

2.- TINCION:

Los métodos empleados fueron los de más amplia utilización, el llamado Azul de Coomassie y el Silver-Staining.

- AZUL DE COOMASSIE

Se emplearon dos técnicas diferentes, a las que denominaremos A y B.

TECNICA A:

1.- Solución colorante:

- 0,1% de Azul de Coomassie tipo Phast gel blue R. (Pharmacia)
- 10% de Acido acético. (Merck)
- 30% de Metanol. (Merck)
- 60% de Agua calidad Milli. Q.

2.- Solución decolorante:

- 10% de Acido acético. (Merck)
- 30% de Metanol. (Merck)
- 60% de Agua calidad Milli. Q.

3.- Solución conservante:

- 10% de Acido acético. (Merck)
- 5% de Glicerol (Probus)
- 85% de Agua calidad Milli.Q.

TECNICA B:

1.- Solución de tinción:

- 0,2% de Azul brillante de Coomassie R-250. (Serva).

- 50% de Metanol. (Merck)
- 10% de Acido acético. (Merck)
- 40% de Agua calidad Milli. Q.

2.- Solución decolorante:

- 10% de Acido acético. (Merck)
- 45% de Metanol. (Merck)
- 45% de Agua calidad Milli. Q.

3.- Solución conservante:

- 10% de Acido acético. (Merck)
- 5% de Glicerol (Probus)
- 85% de Agua calidad Milli.Q.

Esquema del procedimiento empleado en las tinciones de Azul de Coomassie:

PASO	SOLUCIONES	TIEMPO	TEMPERATURA
1	COLORACION	8 - 10*	50°C - 20°C*
2	DECOLORACI.	5	50°C - 20°C*
3	DECOLORACI.	8	50°C - 20°C*
4	DECOLORACI.	10	50°C - 20°C*

CARACTERISTICAS PARTICULARES DE LAS TECNICAS DE AZUL DE COOMASSIE.

- Se estimó la temperatura del laboratorio en 20°C.

- Las cifras con asteriscos, representan los valores de la llamada técnica B.

- Todos los pasos se realizaron en agitación continua.

- En los pasos 2,3 y 4, se utilizaron tres soluciones nuevas en cada una de ellas.

- Las soluciones de tinción y conservante, son reciclables, siendo su tiempo de duración aproximadamente de 3 ó 4 meses.

- El proceso de decoloración aumenta si hacemos pequeñas pausas durante el mismo.

Según Ohlsson y col (1.987), si aumentamos la Tª desde 20°C hasta 40°C, el tiempo de tinción y de decoloración, decrece aproximadamente en un 40%, pero sin embargo, aunque un aumento de Tª siempre trae parejo una disminución de los tiempos de reacción, no siempre se obtienen los mismos resultados que usando una Tª baja y por lo tanto un tiempo de reacción más largo. Por otro lado, si la Tª es muy elevada, disminuye la estabilidad de los productos colorantes.

A manera de resumen, podemos establecer que: " El aumento de la sensibilidad obtenido utilizando una T_a de 20°C frente a una T_a de 40°C es del 10%, pero a cambio del doble tiempo de reacción."^u (Olsson y col. 1.987).

- SILVER-STAINING

Igual que en el caso anterior, fueron empleadas dos técnicas diferentes, a las que se les denominó A y B:

-TECNICA A:

1.- Solución de prefijado:

- Tricloroacético al 20%. (Merck)

2.- Solución lavadora de anfolinas:

- 50% Metanol (Merck)

- 10 Acido acético. (Merck)

3.- Solución de fijado:

- 8.3% de Glutaraldehido. (Sigma)

4.- Solución de plata:

- 0,5% Nitrato de plata (Merck) en

agua.

5.- Solución de desarrollo:

- 2,5% P/V de Carbonato sódico en agua.
- 40 µl de Formaldehido (Merck) al 37%,
en 100 ml de la solución de carbonato sódico. (Esta
solución debe de prepararse antes de ser usada).

6.- Solución de parado:

- Acido acético al 5% en agua.

7.- Solución conservante:

- 10% Acido acético.
- 5% de Glicerol.

TECNICA B:

Método descrito y adoptado por Carracedo
y cols.

1.- Solución de prefijado:

- Tricloroacético al 12%. (Merck)

2.- Solución lavadora de anfolinas:

- (1a) 50% Etanol (Merck)
- (2a) 5% Metanol (Merck)
- 7% Acido acético. (Merck)

3.- Solución de fijado:

- 10% de Glutaraldehido. (Sigma)

4.- Solución de plata:

- 0,1% Nitrato de plata (Merck) en
agua.

5.- Solución de desarrollo:

- 3% P/V de Carbonato sódico en agua.

- 75 µl de Formaldehido (Merck) al 37%,
en 100 ml de la solución de carbonato sódico. (Esta
solución debe de prepararse antes de ser usada).

6.- Solución de parado:

- Acido acético al 5% en agua.

7.- Solución conservante:

- 10% Acido acético.

- 5% de Glicerol.

Esquema del procedimiento de la tinción
con plata (TECNICA A) :

PASO	SOLUCION	TIEMPO	TEMPERATURA
1	PREFIJADO	10'	20°C
2	LAVADO ANFOLINAS	2'	50°C
3	FIJADO	6'	50°C
4	LAVADO	2'	50°C
5	LAVADO	2'	50°C
6	PLATA	8'	50°C
7	LAVADO	1'	20°C
8	LAVADO	1'	20°C
9	DESARROLLO	1/2'	20°C
10	DESARROLLO	5-10'	20°C
11	PARADO	5'	50°C
12	FIJADO	5'	50°C

NOTA: La solución de lavado empleada fue agua. Tanto la solución de lavado, como la desarrolladora, se utilizó dos veces consecutivas, renovándolas en cada paso.

La calidad del agua empleada fue Milli.Q.

Esquema del procedimiento utilizado en la
Técnica B:

PASO	SOLUCION	TIEMPO	TEMPERATURA
1	PREFIJADO	15'	20°C
2	LAVADO ANFOLINAS 1 Ω	20'	50°C
3	LAVADO ANFOLINAS 1 Ω	20'	50°C
4	LAVADO ANFOLINAS 1 Ω	20'	50°C
5	LAVADO ANFOLINAS 2 Ω	20'	50°C
6	FIJADO	20'	50°C
7	LAVADO	15'	20°C
8	LAVADO	15'	20°C
9	LAVADO	15'	20°C
10	LAVADO	15'	20°C
11	PLATA	30'	50°C
12	LAVADO	1'	20°C
13	DESARROLLO	5-10'	20°C
14	PARADO	5'	50°C
15	FIJADO	5'	50°C

NOTA: Los lavados fueron realizados en agua destilada calidad Milli.Q.

CARACTERISTICAS PARTICULARES DE LA TECNICA DE SILVER-STAINING

- Es imprescindible que la calidad de los reactivos empleados sea elevada, principalmente la del agua destilada, debiendo estar exentas del mayor número de iones posibles.

- La intensidad de las bandas obtenidas, va a depender del tiempo de actuación de las soluciones de desarrollo.

- Se ha estimado que la temperatura ambiente del laboratorio es de 20°C.

- Todas las soluciones son estables por largo tiempo, excepto la de desarrollo que hubo de ser realizada antes de su utilización.

- Es importante realizar a temperatura ambiente los pasos de fijación en tricloroacético y el desarrollo, ya que de ello va a depender la mayor o menor intensidad del Background obtenido.

- Según Ohlsson y cols. (1.987), el tiempo de actuación de la solución de desarrollo va a depender de la calidad del glutaraldehído y del formaldehído utilizado.

- Las temperaturas de 50°C fue especialmente escogida en base a la relación Sensibilidad/tiempo de reacción, estimándose la más

adecuada.

PARTICULARIDADES SOBRE EL SISTEMA DE INMUNOBLOTTING

INTRODUCCION:

El sistema de inmunoblotting empleado en el presente trabajo consistió en la fijación en membranas de Nitrocelulosa y de Polivinil-difluoride indistintamente, seguido por detección mediante anticuerpos peroxidasas conjugados (HRP). Para este último paso, se emplearon dos técnicas diferentes.

TECNICA A:

1.- BLOTTING.

El sistema de Blotting empleado fue el de difusión simple, según la siguiente técnica:

- PREPARACION DEL TAMPON DE TRANSFERENCIA

- * 0,30 gr de TRIS (Sigma)
- * 1,45 gr Glicina (Sigma)
- * 20cc de Metanol.(Merck)
- * 80cc de agua Milli.Q.

Ajustar a Ph 8.3 con Acido clorhídrico.

1.1.- Se utilizaron en primer lugar membranas de Nitrocelulosa de 0.45 μm de diámetro medio.(Millipore).

1.2.- Sumergir la membrana en la solución de transferencia durante 5 minutos.

1.3.- Colocar la membrana encima del gel de IEF, evitando que queden burbujas de aire, y sobre ella, 1 cm. de trozos de papel de filtro, donde los dos primeros fueron empapados en la solución de transferencia, encima de todo se colocó un peso aproximado de 100 gr.

En esta situación, se esperó 20 minutos a T_a ambiente.

2.- BLOQUEO DE LA MEMBRANA.

El bloqueo o saturación de la membrana se llevó a cabo sumergiéndola durante 30 minutos a T_a ambiente en la siguiente solución saturadora:

- PREPARACION DE LA SOLUCION BLOQUEANTE

- * 0,24 gr de TRIS (Sigma)
- * 2,9 gr de Cloruro Sódico (Merck)
- * 3 gr de Gelatina (Sigma)
- * 100 cc de Agua Milli. Q.

3.- INMUNOFIJACION.

Se realizó siguiendo el esquema de la página 125.

3.1.- La incubación con el antisuero, se realizó en agitación continua.

3.2.- Un vez retirada la solución del antisuero, se sometió a la membrana a dos lavados en agua Milli. Q, de unos 10 minutos de duración.

4.- VISUALIZACION

- Utilización del segundo anticuerpo.

Como segundo anticuerpo, se usó Inmunoglobulinas obtenidas de gato (Sigma) ó de cerdo (Dacopatts), frente a sueros de conejos, con la particularidad de ser Peroxidasa conjugada, (HRP).

Las diluciones de este segundo antisuero fueron:

a.- 1:250 para tiempos de incubación de 60'.

b.- 1:500 para tiempos de incubación superior a 120'.(Ej. Toda la noche).

4.1.- La membrana fue incubada en este segundo antisuero diluido 1:250 en agua Milli. Q, durante 60' a T_a ambiente y en agitación continua.

4.2.- Una vez retirado el segundo

antisuero, se sometió la membrana a dos lavados en agua durante 10 minutos cada uno.

4.3 .- Para poner de manifiesto la actividad de la enzima peroxidasa conjugada con el segundo antisuero, se introduce la membrana en la siguiente solución reveladora:

- SOLUCION REVELADORA

- * 10mg de 4-cloro naftol (Sigma)
- * 3.3cc de metanol (Merck)
- * 16,7 cc del tampón saturador de gelatina.

- * 10µl de Agua Oxigenada al 30%

La actividad de las peroxidasas, queda detenida retirando la solución reveladora y lavando abundantemente con agua, cuando la intensidad de las bandas sea la adecuada.

TECNICA B:

- SOLUCIONES Y TAMPONES EMPLEADOS

19.- SOLUCION DE TRANSFERENCIA.

- * 6,06 gr de TRIS (Sigma)
- * 28.8 gr de Glicina (Sigma)

- * 400cc de Metanol (Merck)
- * 1.600cc de agua (Milli. Q.)

20.- SOLUCION DE LAVADO.

- * 13,6 gr Fosfato disódico dibásico dihidratado (Merck).
- * 4,9 gr Fosfato básico de potasio (Merck).
- * 17,2 gr de cloruro sódico (Merck)
- * 3 cc de Tween-20 (Sigma)
- * 2.000 cc de agua (Milli. Q).

Ajustar a Ph 7.2.

30.- SOLUCION REVELADORA.

- * 30 mgr 4-cloro-1-naftol (Sigma)
- * 3 cc Acetona (Merck)
- * 50 cc de una solución de cloruro sódico 0.2M.
- * 59cc de TRIS- CLH (Sigma)

Ajustar a Ph 7.4.

PROCEDIMIENTO DE LA TECNICA:

- 1.- Sumergir la membrana de NC en la solución de transferencia durante 30 minutos.
- 2.- Colocarla encima del gel con un

peso de 500 gr, separados por el centro por un centímetro de papel secante, durante 30 minutos.

3.- Lavar con la solución preparada a tal fin durante dos horas, cambiando cada 15 minutos la solución.

4.- Diluir el primer antisuero en la solución de lavado, e incubar con la membrana en agitación continua según el esquema de la página 125.

5.- Lavar durante una hora con la solución preparada a tal fin, cambiándola cada 15 minutos.

6.- Diluir el segundo antisuero (HRP), 1:250 en la solución de lavado, y dejar incubar la membrana durante 1 hora.

7.- Lavar con la solución durante 1 hora cambiándola cada 15 minutos.

8.- Añadir la solución reveladora con 40 µl de agua oxigenada al 30%, añadida en el último momento.

MEMBRANAS DE POLIVINIL-DIFLUORIDE (PVDF)

Las membranas de PVDF utilizadas fueron de 0.45 µm de diámetro (Millipore). Dichas membranas presentan la particularidad de ser hidrofóbicas,

teniéndolas que transformarlas en hidrófilas para que sirvan como inmovilizantes de proteínas. A tal fin, se procedió a sumergir dichas membranas en dos baños sucesivos, el primero en etanol absoluto, y el segundo en agua. Después de esto, el procedimiento a seguir fue el mismo que en las membranas de NC.

RESULTADOS

A.- COMPORTAMIENTO DE LOS FENOTIPOS DE LOS DISTINTOS MARCADORES ESTUDIADOS CON RESPECTO AL TIEMPO.

Los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas, fueron evaluados cada siete días, hasta un total de tres meses, al objeto de precisar la fiabilidad y reproductibilidad de las distintas técnicas con respecto al tiempo.

GC-GLOBULINAS.

PRECIPITACION, TECNICA DE B.HOSTE

A.- RESULTADO EN PLASMA.

FENOTIPOS	Nº OBSERVADOS
2	5
1S	1
1F	16
2-1S	18
2-1F	4
1F-1S	6
TOTAL	50

TABLA A

B.- RESULTADOS EN MANCHAS DE SANGRE.

FENOTIPOS	SEMANAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1S	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-1S	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-1F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1F-1S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA B

INMUNOBLOTTING Y DETECCION CON SEGUNDO ANTISUERO

RESULTADOS EN LAS MANCHAS DE SANGRE.

FENOTIPOS	SEMANAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1S	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
2-1S	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
2-1F	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1F-1S	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
TOTAL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

TABLA C

SISTEMA DEL OROSOMUCOIDE.

INMUNOFIJACION Y TINCION PLATA

1.A.- MUESTRAS SIN DESIALIZAR

1.A.1.- RESULTADOS EN PLASMA.

FENOTIPOS	Nº OBSERVADO
F	18
S	9
F-S	23
TOTAL	50

TABLA 1.A.1.

1.A.2 RESULTADOS EN LAS MANCHAS DE SANGRE.

FENOTIPOS	SEMANAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
F	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
S	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
F-S	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
TOTAL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

TABLA 1.A.2

1.B.- MUESTRAS DESIALIZADAS.

1.B.1.- RESULTADOS EN PLASMA.

FENOTIPOS	Nº ODBERVADO
F1	15
F2	0
S	9
F1-F2	3
F1-S	22
F2-S	1
TOTAL	50

TABLA 1.B.1.

1.B.2.- RESULTADOS EN LAS MANCHAS DE SANGRE.

FENOTIPOS	SEMANAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
F1	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
F2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
F1-F2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
F1-S	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
F2-S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TOTAL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

TABLA 1.B.2.

INMUNOBLOTTING Y DETECCION CON SEGUNDO ANTISUERO

2.A.- MUESTRAS SIN DESIALIZAR

2.A.1.- RESULTADOS EN PLASMA.

FENOTIPOS	Nº OBSERVADO
F	18
S	9
F-S	23
TOTAL	50

TABLA 2.A.1.

2.A.2 RESULTADOS EN LAS MANCHAS DE SANGRE.

FENOTIPOS	SEMANAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
F	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
S	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
F-S	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
TOTAL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

TABLA 2.A.2

2.B.- MUESTRAS DESIALIZADAS.

2.B.1.- RESULTADOS EN PLASMA.

FENOTIPOS	Nº OBSERVADO
F1	15
F2	0
S	9
F1-F2	3
F1-S	22
F2-S	1
TOTAL	50

TABLA 2.B.1.

2.B.2.- RESULTADOS EN LAS MANCHAS DE SANGRE.

FENOTIPOS	SEMANAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
F1	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
F2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
F1-F2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
F1-S	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
F2-S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TOTAL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

TABLA 2.B.2.

SISTEMA DE LAS TRANSFERRINAS.

INMUNOFIJACION Y TINCION CON PLATA

3.A.- MUESTRAS SIN DESIALIZAR

3.A.1.- RESULTADOS EN PLASMA.

FENOTIPOS	Nº OBSERVADOS
C1	29
C2	1
C3	0
C1-C2	20
TOTAL	50

TABLA 3.A.1

3.A.2.- RESULTADOS DE LAS MANCHAS DE SANGRE.

FENOTIPOS	SEMANAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C1	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
C2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C1-C2	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
TOTAL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

TABLA 3.A.2

3.B.- MUESTRAS DESIALIZADAS.

3.B.1.- RESULTADOS EN PLASMA.

FENOTIPOS	Nº OBSERVADOS
C1	29
C2	1
C3	0
C1-C2	20
TOTAL	50

TABLA 3.B.1

3.B.2.- RESULTADOS DE LAS MANCHAS DE SANGRE.

FENOTIPOS	SEMANAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C1	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
C2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C1-C2	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
TOTAL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

TABLA 3.B.2

INMUNOBLOTTING Y DETECCION CON SEGUNDO ANTISUERO

4.A.- MUESTRAS SIN DESIALIZAR

4.A.1.- RESULTADOS EN PLASMA.

FENOTIPOS	Nº OBSERVADOS
C1	29
C2	1
C3	0
C1-C2	20
TOTAL	50

TABLA 4.A.1

4.A.2.- RESULTADOS DE LAS MANCHAS DE SANGRE.

FENOTIPOS	SEMANAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C1	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
C2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C1-C2	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
TOTAL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

TABLA 4.A.2

4.B.- MUESTRAS DESIALIZADAS.

4.B.1.- RESULTADOS EN PLASMA.

FENOTIPOS	Nº OBSERVADOS
C1	29
C2	1
C3	0
C1-C2	20
TOTAL	50

TABLA 4.B.1

4.B.2.- RESULTADOS DE LAS MANCHAS DE SANGRE.

FENOTIPOS	SEMANAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C1	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
C2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C1-C2	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
TOTAL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

TABLA 4.B.2

SISTEMA DE LAS α_2 HS- GLICOPROTEINAS.

INMUNOFIJACION Y TINCION CON PLATA

A.- MUESTRAS SIN DESIALIZAR.

5.A.1.- RESULTADOS EN PLASMA.

FENOTIPOS	NOOBSERVADOS
1	21
2	2
1-2	27
TOTAL	50

TABLA 5.A.1

5.A.2.- RESULTADOS EN MANCHAS DE SANGRE.

FENOTIPOS	SEMANAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1-2	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27
TOTAL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

TABLA 5.A.2

NOTA: No se evidenciaron ningún otro tipo de alelos, salvos los representados en el cuadro.

B.- MUESTRAS DESIALIZADAS.

La desialización de las muestras en el estudio de las $\alpha 2$ -HS, está encaminada a la diferenciación de los alelos AHS*10 y AHS*15, no encontrándose en el presente estudio ninguno de los anteriores.

De esta manera, las tablas de distribución fenotípicas de las muestras de $\alpha 2$ -HS desializadas, son idénticas a las de las muestras sin desializar; motivo por el que se prescinde de su representación.

INMUNOBLOTTING Y DETECCION CON SEGUNDO ANTISUERO

A.- MUESTRAS SIN DESIALIZAR.

6.A.1.- RESULTADOS EN PLASMA.

FENOTIPOS	Nº OBSERVADOS
1	21
2	2
1-2	27
TOTAL	50

TABLA 6.A.1

6.A.2.- RESULTADOS EN MANCHAS DE SANGRE.

FENOTIPOS	SEMANAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1-2	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27
TOTAL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

TABLA 6.A.2

NOTA: No se evidenciaron ningún otro tipo de alelos, salvos los representados en el cuadro.

B.- CALCULO DE FRECUENCIAS GENOTIPICAS DE LOS
DISTINTOS MARCADORES ESTUDIADOS.

Partiendo de la base de que la frecuencia génica de un alelo (g), es igual al nº de homocigótico para ese alelo (HH), más la mitad de la suma de los heterocigóticos (Hh)/2, dividido por el nº total de individuos estudiados, tendremos :

SISTEMAS							
GC		GRM		TF		HS	
GEN	PRECUCENCIA	GEN	PRECUCENCIA	GEN	PRECUCENCIA	GEN	PRECUCENCIA
2	0.32±0.047	F1	0.55±0.050	C1	0.78±0.041	1	0.69±0.046
1F	0.12±0.032	F2	0.04±0.020	C2	0.22±0.041	2	0.31±0.046
1S	0.56±0.050	S	0.41±0.050				

C.- VALORES ESPERADOS Y EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG.

NOTA: LA χ^2 , AUNQUE FUE CALCULADA, NO ES SIGNIFICATIVA

1.- Sistema Gc-Globulinas:

FENOTIPOS	OBSERVADOS		ESPERADOS	
	Nº	%	Nº	%
1F	1	2.0	0.72	1.44
1S	16	32.0	15.68	31.36
2	5	10.0	5.12	10.24
1F-1S	6	12.0	6.72	13.44
1F-2	4	8.0	3.84	7.68
1S-2	18	36.0	17.92	35.84
TOTAL	50	100.0	50.00	100.00

$\chi^2 = 0.2374$ PARA 3 GRADOS DE LIBERTAD.

2.- Sistema Orosomucoide:

FENOTIPOS	OBSERVADOS		ESPERADOS	
	Nº	%	Nº	%
F1	15	30	15.125	30.25
F2	0	0	0.08	0.0016
S	9	18	8.405	16.81
F1-F2	3	6	2.2	4.4
F1-S	22	44	22.5	45.1
F2-S	1	2	1.64	3.28
TOTAL	50	100	49.95	99.8416

$$X_2 = 0.6780 \text{ PARA 2 GRADOS DE LIBERTAD.}$$

3.- Sistema Transferrinas:

FENOTIPOS	OBSERVADOS		ESPERADOS	
	Nº	%	Nº	%
C1	29	58	30.42	60.84
C2	1	2	2.42	4.84
C3	0	0	0.0	0.0
C1-C2	20	40	17.16	34.32
TOTAL	50	100	50.0	100.00

$$X^2 = 1.3695 \text{ PARA UN GRADO DE LIBERTAD.}$$

4.- Sistema α_2 HS- Glicoproteínas:

FENOTIPOS	OBSERVADOS		ESPERADOS	
	Nº	%	Nº	%
1	21	42	23.805	47.61
2	2	4	4.805	9.61
1-2	27	54	21.39	42.78
TOTAL	50	100	52.00	100.00

$$X_2 = 3.4393 \text{ PARA UN GRADO DE LIBERTAD.}$$

D.- POTENCIAL DE INDIVIDUALIZACION (PI) Y
DISCRIMINACION (1-PI).

	GC	ORM	TF	α_2 HS	ΣP_i	$1-\Sigma P_i$
PI	0.261	0.326	0.49	0.419	0.017	0.983
1-PI	0.738	0.673	0.509	0.581	-	-

ΣP_i = Probabilidad de identidad acumulada al azar (Fisher, 1.951).

$$\Sigma P_i = 0.017$$

$(1-\Sigma P_i)$ = Potencial acumulado de discriminación (Jones, 1.972).

$$1-\Sigma P_i = 0.983$$

NOTA: LOS VALORES ΣP_i Y $(1-\Sigma P_i)$, ESTAN REFERIDOS SOLAMENTE A LOS FENOTIPOS ENCONTRADOS EN EL ESTUDIO.

E.- CALCULO DE SENSIBILIDAD DE LA TECNICA EMPLEADA.

1.- El volumen medio por aplicación fue de unos 10 µL.

2.- Los valores tomados para las concentraciones séricas de las diferentes proteínas fueron:

E.1.- INMUNOFIJACION Y TINCION CON PLATA

MARCADOR	CONCENTRACION	DILUCION	DETECCION(ng)
*GC	3-6 mg/ml	0	3.000 - 6.000
ORM	0.5-1 mg/ml	1/70	7 - 14
TF	2-3 mg/ml	1/30	66 -100
α2HS	4-8.5 mg/ml	(**)	(**)

*NOTA: ESTE VALOR CORRESPONDE A LA TECNICA DE B.HOSTE

E.2.- INMUNOBLOTTING MAS SEGUNDO ANTISUERO

MARCADOR	CONCENTRACION	DILUCION	DETECCION(ng)
*GC	3-6 mg/ml	1/80	37.5 - 75
ORM	0.5-1 mg/ml	1/90	5.5 - 11.2
TF	2-3 mg/ml	1/50	40 - 60
α2HS	4-8.5 mg/ml	(**)	(**)

(**) NOTA: No fue posible la determinación de la sensibilidad de la técnica para las α2-HS, debido a que la casa fabricante del antisuero lo dejó de comercializar. Los límites de detección, están referidos a las concentraciones plasmáticas, y no a las cantidades de muestras aplicadas.

DISCUSION

1.- CONSIDERACIONES SOBRE LOS METODOS USADOS.

A.- MUESTREO:

Las muestras estudiadas en el presente trabajo, fueron de 50 donadores sanos, no emparentados entre sí, no se tuvo en cuenta la edad, el sexo ni la raza, ya que el objetivo del presente trabajo no es realizar un estudio genético poblacional de estos marcadores. Por lo tanto, el resultado, no se verá afectado por estos parámetros.

Como los donadores fueron escogidos de pacientes ambulatorios del Hospital Universitario de Sevilla, se tuvo especial cuidado en seleccionar a 50 pacientes cuyas analíticas fuesen normales, y los datos clínicos obtenidos, no revelasen ningún problema patológico. De esta manera, de un total de 110 muestras escogidas en una primera fase, fueron descartados un total de 60 pacientes, los cuales presentaban algún tipo de patología evidente, especialmente hepática, ya que podían distorsionar ciertos fenotipos de los estudiados como por ejemplo

las Transferrinas.

La realización de manchas experimentales de sangre sobre gasas estériles y envejecidas a temperatura ambiente, (20º C), no reproduce con total fidelidad la multitud de situaciones que pueden afectar a una mancha de sangre en un caso real. Sin embargo fue considerada la mejor forma de estudiar el comportamiento de estos marcadores frente a situaciones reales de las que no se disponen de controles serológicos.

Por otro lado, hay que destacar que el tejido de gasa, absorbe más cantidad de muestra que los tejidos habituales, ej. pantalón vaquero, fibras sintéticas, etc.

B.- METODO ELECTROFORETICO.

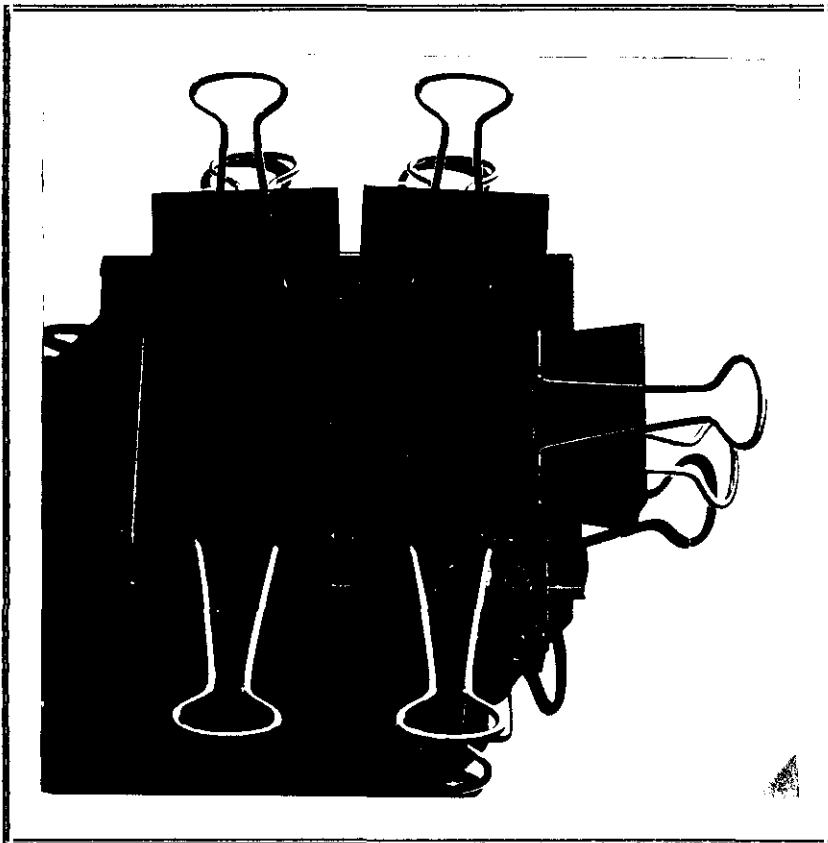
El tamaño y grosor de los geles empleados para todos los marcadores estudiados fue de 50 X 40 X 0.25 mm.

La aplicación de los electrodos se realizó directamente sobre los geles. Las ventajas encontradas en la utilización de estos minigeles fueron las siguientes:

- 1.- Rapidez de la técnica a

desarrollar.

2.- Poder de resolución satisfactorio, ya que si en cuanto a tamaño, la resolución es menor que con los geles clásicos, este defecto, queda perfectamente compensado con el grosor del mismo.



PREPARACION DE UN MOLDE PARA GELES DE 40x50x0.25mm.

A su vez, estos tamaños de geles hacen que el calentamiento sea menor, con lo que las muestras sufren menor desnaturalización.

3.- Se emplean menor cantidad de

muestras. Punto este muy importante a la hora de utilizar manchas de sangre, ya que estas con frecuencia son muy pequeñas.

Como soporte de los geles, se prefirió la utilización de películas plásticas, especialmente el Gel-Bond-PAG-Film, comercializado por la casa Pharmacia. Esta elección se realizó en base a que estas películas son atóxicas, a la rapidez de su uso y a la menor manipulación sobre los geles. Su adherencia al gel es lo suficientemente buena, presentando escasos fallos en esta. Por todo lo cual se aceptó como medio de soporte para todos los geles desarrollados durante el presente trabajo.

Las soluciones Stock empleadas fueron standard para todos los métodos empleados, siendo estas las siguientes:

- Geles con Sacarosa T= 6.2 % y C= 3.2 %
- Geles con Glicerol T= 5 % y C= 3 %

De las dos soluciones empleadas durante los estudios realizados, se ha preferido la primera, principalmente por no encontrarse grandes diferencias en las resoluciones obtenidas, y por ser esta más sencilla en su realización.

Como polimerizante, se utilizó el persulfato amónico en solución al 2%, prefiriéndose

este método a la riboflavina, a pesar de tener que usar como acelerador de la polimerización el N,N,N',N' Tetrametil etilendiamida (TEMED) y también un preenfoque previo, ya que el uso de la riboflavina reportó algunos fallos durante la polimerización.

C.- METODO DE TINCION.

El método de visualización escogido para todos los cuatro marcadores estudiados, fue el inmunoblotting en membranas de NC, seguido de reconocimiento mediante el segundo anticuerpo peroxidasa conjugado. El método ha sido standarizado para todos los marcadores estudiados, variando únicamente las concentraciones del primer y del segundo antisuero de una a otra técnica.

La elección de esta técnica, se realizó en base a su sencillez, economía y sensibilidad.

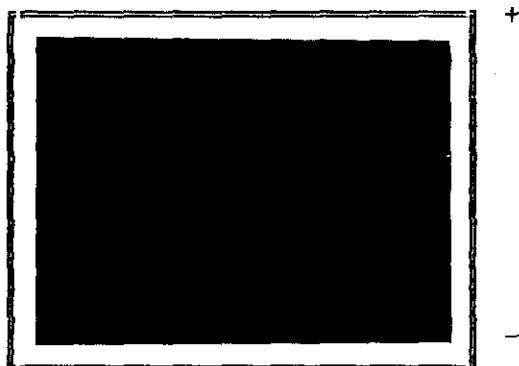
2.- PARTICULARIDADES SOBRE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS.-

A.- SISTEMA Gc. GLOBULINAS.

Los fenotipos Gc fueron estudiados con un rango de anfolinas comprendido entre 2.5 - 5.4, obtenidos a partir de la mezcla entre 2.5 - 5 y 4.5 - 5.4. Así mismo, se ha observado que la adición de

separadores del tipo [N - (2 - HIDROXIETIL)] PIPERAZINA ETANOSULFONICO (HEPES) y de [N - (2 - ACETOAMIDA)] - 2 ACIDO AMINO ETANOSULFONICO (ACES) en proporciones 1.3% (P/V) para el primero, y de 0.6% (P/V) para el segundo, es imprescindible para la separación entre los fenotipos 1S y 1F, que son los que suelen dar problemas de identificación. Las proporciones de HEPES y de ACES, son críticas para obtener una buena separación.

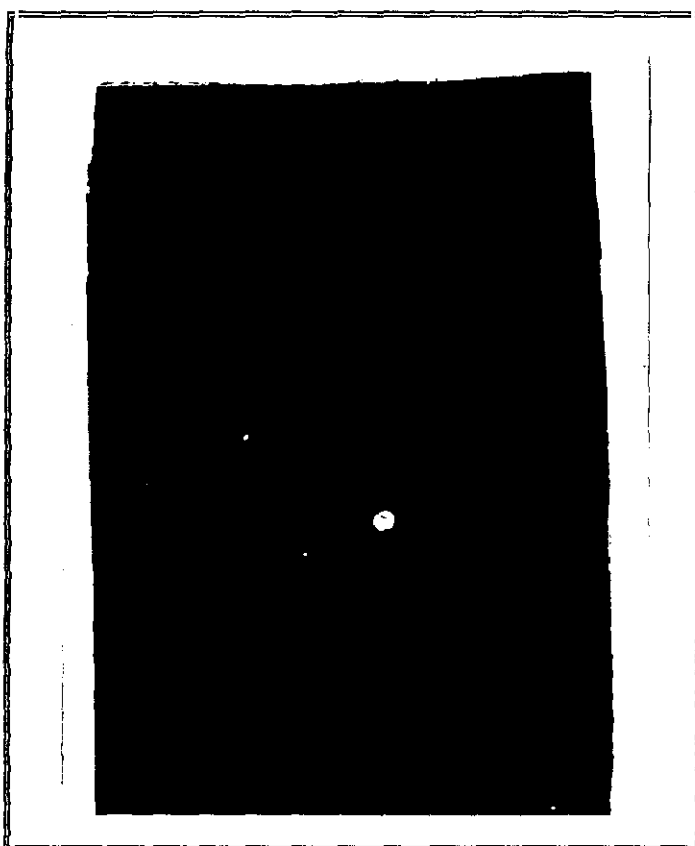
La elección en cuanto a geles con sacarosa ó con glicerol, es indiferente a la hora de los resultados obtenidos.



INMUNOBLOTTING DE Gc, SEGUIDO DE DETECCIÓN MEDIANTE SEGUNDO ANTISUERO. ANODO EN LA PARTE SUPERIOR. RANGO DE Ph 2.5 - 5.4. DE IZQUIERDA A DERECHA. 2-1S DILUCION 1/60, 2-1S DILUCION 1/70, 2-1S DILUCION 1/80, SUERO CONCENTRADO 2-1S, TESTIGO 2-1S-1F.

La identificación se realizó con inmunoblotting seguido de reconocimiento mediante el segundo anticuerpo peroxidasa conjugado,

prefiriéndose esta técnica a la propuesta por B. Hoste (precipitación de bandas), ya que en este caso, las bandas de las Gc de manchas de sangre, no se identificaban plenamente.



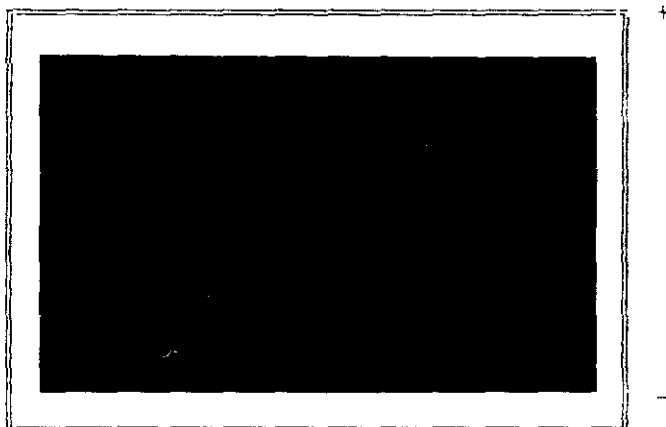
FOTOGRAFIA DE LA PRECIPITACION DE BANDAS DE Gc, SEGUN LA TECNICA DE B. HOSTE. DE IZQUIERDA A DERECHA: 1ª Gc 2-1S (PLASMA CONCENTRADO), 2ª Gc 2-2 (PLASMA CONCENTRADO), 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª Y 8ª, DILUCIONES DE LA MUESTRA Nº 1 A 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/25 Y 1/30. ANODO EN LA PARTE SUPERIOR Y RANGO DE ANFOLINAS DE 4 - 6.5.

B.- SISTEMA OROSOMUCOIDE.

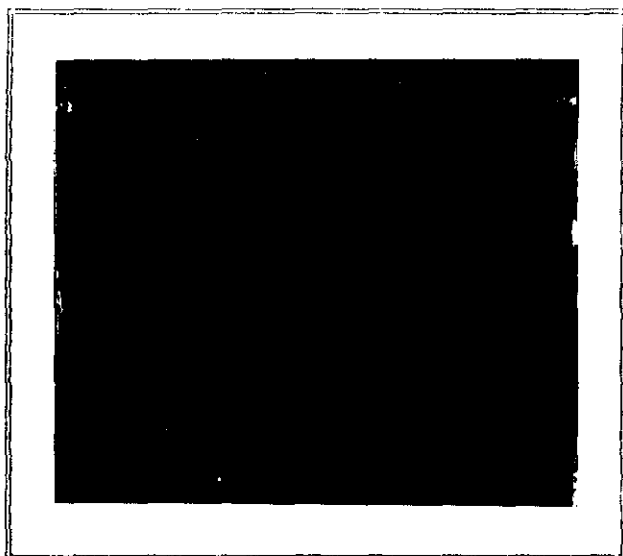
Para el fenotipado de esta proteína, se utilizaron dos técnicas diferentes:

1.- Geles con rango de Ph entre 4 - 6.5.

Las separaciones entre bandas obtenidas mediante esta método no fue lo suficientemente amplia como para definir los distintos fenotipos, tanto con muestras desializadas como sin desializar.



INMUNOBLOTTING SEGUIDO DE DETECCION MEDIANTE 2º ANTISUERO. MUESTRAS DE OROSOMUCOIDE SIN DESIALIZAR MEDIANTE NEURAMINIDASA. ANODO EN LA PARTE SUPERIOR. RANGO DE PH 4 - 6.5. OBSERVAMOS LA IMPOSIBILIDAD DE DISTINGUIR LOS FENOTIPOS F1 Y F2. TODAS LAS MUESTRAS SON ORN F-S.



INMUNOFIJACION Y TINCION CON PLATA DE ORM. MUESTRAS SIN DESIALIZAR. RANGO DE Ph 4 -6.5. ANODO EN LA PARTE SUPERIOR. DE IZQUIERDA A DERECHA DILUCIONES SUCESIVAS DE ORM F-S. 1/10.....1/90. LA ULTIMA MUESTRA ES SUERO CONCENTRADO.

2.- Geles con rango de Ph entre 4.2 - 5.4.

Dicho rango de Ph, se obtuvo mediante la mezcla de anfolinas de rango 4.2 - 4.9 y de 4.5 - 5.4. A dicho gel se le añadió 0.4% (P/V) de ACES, resultando este imprescindible y crítico en su concentración para las definiciones de los fenotipos F_1 , F_2 y entre S y A.

Es de destacar que en este rango de Ph, no focalizan las proteínas sin desializar.

Como método de desialización se utilizaron los propuestos en la Pag. 91 y 92, obtenidos de

manera experimental, siendo estos los más adecuados. Hay que destacar que en el caso de la utilización de una solución de Urea para las extracciones de las manchas de sangre, modifica los P.I, acidificandolos aproximadamente en 0.10-0.15 rango de Ph.

(Ver Fig.nº 7).

FENOTIPOS	P. ISO. (DES)	P. ISO. (DES+UREA)
ORM F1	4.93 ± 0.01	4.80 ± 0.01
ORM F2	4.95 ± 0.01	4.82 ± 0.01
ORM S	5.03 ± 0.01	4.89 ± 0.01
ORM A	5.06 ± 0.01	5.01 ± 0.01

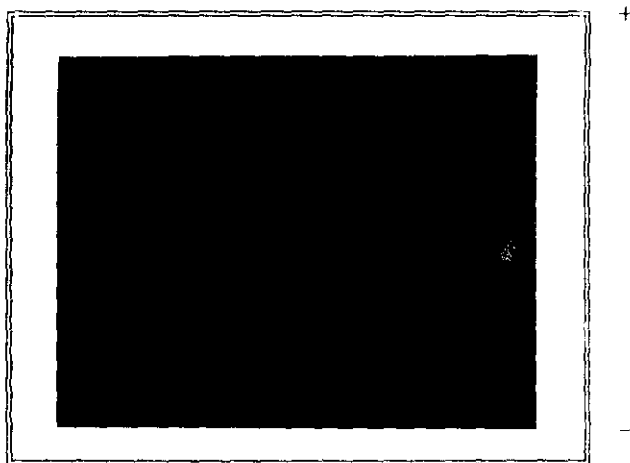
Fig. nº 7: P.I. de ORM. Datos obtenidos de C.B. Eap (1.988).

La identificación se realizó con inmunoblotting seguido de reconocimiento mediante el segundo anticuerpo peroxidasa conjugado.

C.- SISTEMA TRANSFERRINAS

El rango de Ph utilizado en este método fue el de 5 - 7. En el caso de las muestras sin

desializar, se utilizó como separador el HEPES a concentración de 0.2% (P/V), resultando imprescindible su uso, así como la proporción establecida, para la obtención de una buena resolución de los fenotipos C_1 y C_2 (en el presente estudio no se encontró ningún alelo C_3).



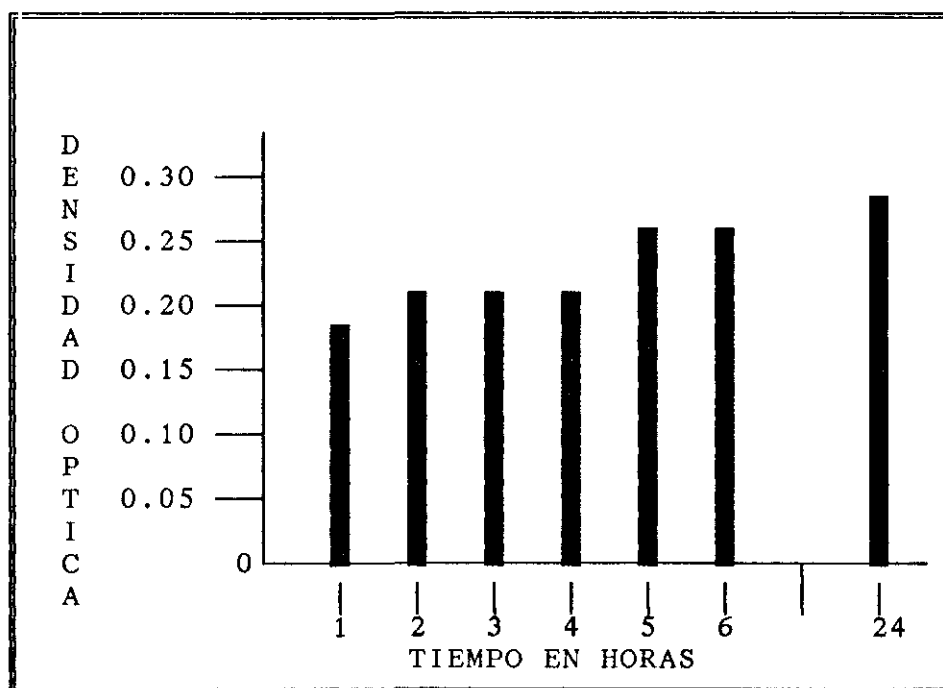
INMUNOBLOTTING DE Tf, SEGUIDO DE DETECCION MEDIANTE SEGUNDO ANTISUERO. ANODO EN LA PARTE SUPERIOR, RANGO DE Ph= 5-7, CON ADICION DE HEPES. DE IZQUIERDA A DERECHA: C_1 , C_1 , C_1-C_2 , C_1-C_2 , C_1 , C_1 , C_1 , C_1-C_2 , C_1 .

Mediante este método, la Tf C_1 está representada por dos bandas paralelas, separadas una de otra aproximadamente en 1 mm, pudiendo dificultar la lectura de una hipotética Tf B existente. No obstante, debido a lo extremadamente infrecuente de este fenotipo Tf B, no se ha podido constatar este

hecho.

El tiempo de actuación de la Sal de MOHR (Sulfato amónico ferroso), se realizó mediante los incrementos con respecto al tiempo de la densidad óptica, experimentados por un suero patrón, al ser expuesto a una luz con longitud de onda de 470 nm. (Ver gráfica N^o 8).

Fig. n^o 8 : DENSITOMETRIA OPTICA DE LA SATURACION DE Tf CON $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$



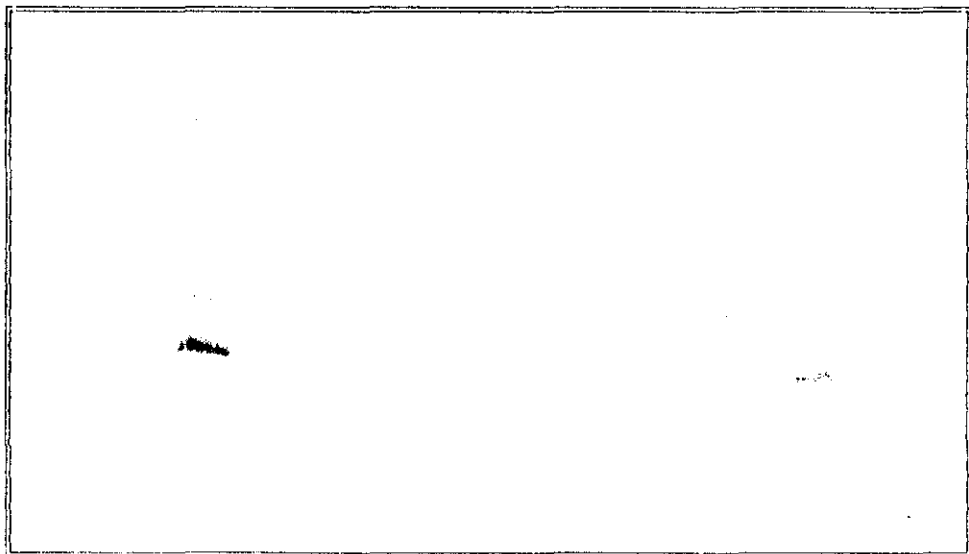
El tiempo de actuación de la sal de Mohr se estableció de esta manera en unas 3 horas aproximadamente. Se prefirió utilizar esta a el Cl_3Fe , ya que este último precipitaba las muestras de

SUERO.

Las condiciones de desialización de las muestras fueron escogidas experimentalmente, estimándose las más adecuadas las descritas en la páginas 98 y 99 de este trabajo.

No se evidenciaron diferencias de resultados utilizando geles con Glicerol ó con Sacarosa.

La identificación se realizó con inmunoblotting seguido de reconocimiento mediante el segundo anticuerpo peroxidasa conjugado.



INMUNOBLOTTING DE TÍ, CON RANGO DE Ph 4 - 6.5, Y DETECCIÓN MEDIANTE SEGUNDO ANTISUERO. MUESTRAS DESIALIZADAS. DE IZQUIERDA A DERECHA DILUCIONES DE TÍ CI : 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/60, 1/70, 1/80, 1/90, 1/100 Y SUERO CONCENTRADO. ANODO EN LA PARTE SUPERIOR

D.- SISTEMA DE LAS α -2 HS.

El fenotipado completo de esta proteína, requiere un doble análisis, por un lado desializando las muestras, para estudiar los fenotipos AHSG - 10 y 15, y por otro, las muestras en estado nativo, para estudiar los fenotipos de la mayoría de los alelos, principalmente los 1, 2 y 2-1, que son por su frecuencia los más importantes.

A.- Muestras sin desializar.

El rango de Ph usado fue de 4.2 - 5.4, obtenido a partir de la mezcla de anfolinas de rango 4.2 - 4.9 y 4.5 - 5.4.

Para obtener una buena separación de bandas, se hizo imprescindible el uso de ACES como separador, en proporciones de 1.5% (P/V). Siendo determinante su uso como la proporción para la obtención de una buena resolución de las bandas.

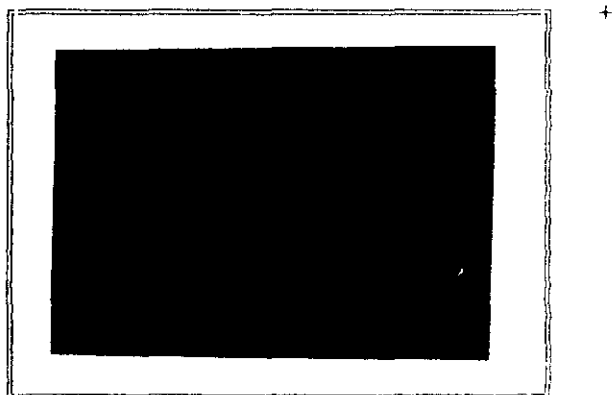
B.- Muestras desializadas.

El rango de Ph usado fue de 5 - 6, usando como aditivo la urea, con lo que se obtiene una mayor limpieza de fondos.

Las condiciones de desialización, fueron escogidas experimentalmente y son descritas en las páginas 105 y 106 de este trabajo, estimándose estas las más idóneas para el buen desarrollo de la técnica.

No se han encontrado diferencias en los resultados obtenidos al usar geles con Glicerol ó con Sacarosa.

La identificación se realizó con inmunoblotting seguido de reconocimiento mediante el segundo anticuerpo peroxidasa conjugado.



INMUNOBLOTTING DE α 2-HS, SEGUIDO DE DETECCION MEDIANTE SEGUNDO ANTISUERO. MUESTRAS DESIALIZADAS. ANODO EN LA PARTE SUPERIOR. DE IZQUIERDA A DERECHA: HS-1, 2, 1-2, 1-2, 1, 1-2, 1, 1, 1, 2.

3.- CALCULO DE SENSIBILIDAD DE LAS TECNICAS EMPLEADAS, PROBABILIDAD DE IDENTIDAD ACUMULADA Y POTENCIAL DE DISCRIMINACION ACUMULADA.

Los cálculos de sensibilidad de las diferentes técnicas, se realizaron con cinco plasmas controles, tomándose como valor máximo de dilución la media de los mismos. Las muestras fueron aplicadas en su estado natural, (sin desializar).

El ΣPI (probabilidad de identidad acumulada), expresa la probabilidad de identidad por azar, y el $(1-\Sigma PI)$, (potencial de discriminación acumulado), expresa la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar difieran en su fenotipo. Estos valores, facilitan un índice sencillo y útil para ponderar la bondad de los sistemas de marcadores estudiados (solamente para los fenotipos encontrados) en los problemas de identidad y discriminación. Debe de destacarse que dichos valores están sujetos a la ley de retornos decrecientes, es decir, cada sistema de marcador unido a la acumulación, disminuye proporcionalmente la probabilidad acumulada, y , una vez se alcanza un cierto punto, la adición de nuevos marcadores a la acumulación, incrementa muy poco los valores de esta.

El valor PI acumulado, no expresa

totalmente la calidad de estos marcadores en los estudios de individualización, ya que en el presente trabajo, solamente se han obtenido los fenotipos más frecuentes de cada marcador, y sería imprescindible obtener un PI referido a todos los posibles fenotipos, teniendo en cuenta a los alelos de menor frecuencia de representación. De esta manera hay que destacar que el valor del PI está referido a los fenotipos encontrados en el presente estudio, que por otra parte, son los de más amplia distribución dentro de la población.

4.- RESPECTO A LA ANTIGÜEDAD DE LAS MANCHAS DE SANGRE.

El tiempo máximo de antigüedad de las muestras para realizar el presente trabajo, se consideró de tres meses, ya que el objetivo del presente estudio, está destinado a la aplicación de dichos marcadores en los estudios de individualización de manchas de sangre que llegan a nuestro lugar de trabajo habitual; el tiempo transcurrido entre la comisión del delito y la llegada de las muestras al laboratorio nunca suele ser superior a 30 días.

CONCLUSIONES

1.- La utilización del Isoelectroenfoque en minigeles de poliacrilamida (P.A.G.I.F.), permiten obtener excelentes resultados en el fenotipado de los marcadores estudiados, a la vez que ofrece mayor rapidez y economía que las técnicas convencionales.

2.- No se han encontrado diferencias importantes, en cuanto a los resultados obtenidos, entre la utilización de geles realizados con sacarosa y los realizados con glicerol.

3.- No se encontraron diferencias ostensibles entre la utilización de soportes de vidrios silanizados y las películas plásticas del tipo GEL-BOND-PAG-FILM. Si bien, por su comodidad, y por su atoxicidad, se recomienda la utilización de estas últimas.

4.- La utilización del inmunoblotting, seguido de la detección mediante el segundo antisuero, facilita la posibilidad de la aplicación de estos cuatro marcadores al estudio de la identificación de manchas de sangre de hasta tres meses de antigüedad.

5.- La realización del inmunoblotting con membranas de Nitrocelulosa, o con las de Polivinil-difluoride, no reportaron diferencias en cuanto a los resultados obtenidos.

6.- Con respecto a la desialización de las muestras, se concluye que:

a.- No dan buenos resultados en el caso de las Gc-Globulinas.

b.- Su utilización es imprescindible en el caso del Orosomucoide (ORM 1), ya que nos permite diferenciar los fenotipos F1 y F2.

c.- En el caso de las Transferrinas, no son absolutamente imprescindibles.

d.- Para las α_2 HS-Glicoproteínas, son imprescindibles en el caso de que se quieran fenotipar alelos poco frecuentes como AHSG 10 y 15. Los alelos más comunes como son AHSG 1 y 2, se estudian perfectamente con las muestras sin desializar.

7.- La técnica de fijación mediante inmunoblotting, seguida de visualización mediante un segundo antisuero peroxidado conjugado, se presenta, a la vista de los resultados obtenidos más sensible que

las técnicas habituales de fijación y tinción con colorantes del tipo Coomassie y Silver-stain.

8.- Los índices de heterogenicidad obtenidos para los cuatro locis estudiados son:

Gc= 0.56	ORM= 0.46	Tf= 0.4	AHSG= 0.54
----------	-----------	---------	------------

Los valores de estos índices próximo o superiores al 50%, nos indican que son excelentes marcadores a efectos de discriminación genética.

9.- La probabilidad de identidad al azar acumulada para estos marcadores, es del 1.7%, valor que por sí solo nos permite incorporar el conjunto de estos cuatro marcadores como un sistema de estudio para la individualización genética en manchas de sangre.

10.- Tanto por la fiabilidad y reproductividad de los resultados obtenidos, por la seguridad en el fenotipado y por su bajo índice de probabilidad de

identidad al azar, recomendamos el uso sistemático de estos cuatro marcadores en los estudios de individualizadores de manchas de sangre de hasta tres meses de antigüedad.

BIBLIOGRAFIA

ALONSO, A.; GASCO, P. (1.987)

The use of separation I.E.F. in ultrathin polyacrylamide gel in characterisation of polyamorphic proteins of forensic significance.

Journal Forensic Sciences. 1987, V.32, Nº 6,1.558-1564.

ANDREWS, A.T. (1.989)

Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical applications.

(Ed.) Oxford Science Publications. Oxford University Press. New York.

BARGAGNA, M. (1.978)

Polymorphism of the red cell acid-phosphatase in Tuscany by strach-gel in thin layer electrophoresis and fluorogenic substrate.

BARK, J.E.; HARRIS, M.J.; FIRTH, M. (1.976)

Typing of common phosphoglucomutase variants using isoelectric focusing - a new interpretation of the phosphoglucomutase system.

J. forensic Sci. Soc. 16:115-120

BEARN, A.C.; BOWMAN, B.H.; KITCHIN, F.D. (1.964)

Genetic and biochemical consideration of the serum grup-specific component.

BECK, W. (1.979)

Diferential function of phosphoglucomutase isozymes PGM₁ and PGM₂
Hum. Genetic 50:93-100. Diferential function of phosphoglucomutase

isozymes PGM 1 and PGM 2

Hum. Genetic 50:93-100. Cold Sprg. Harbor Symp. Quant. Biol.

BECKER, P.E. (1.980)

Genética humana. Tomo 1/3: Variantes de proteínas y enzimas.

Ed. Toray, Barcelona.

BJERRUM, O.J.; SELMER, J.C.; LIHME, A. (1.987)

Native immunoblotting: Transfer of membrane proteins in the presence of non-ionic detergent.

Electrophoresis 1.987,8, 388-397

BJERRUN, O.J.; HINNERFELDT, F.R. (1.987)

Visualitation of molecular weight standars after electroblotting: Detection by means of corresponding antibodies.

Electrophoresis 1987,8,439-444

BLAKE, N.M.; BARNES, K.R.; THOMPSON, J.M. (1.973)

Expresion of human red cell acid phosphatase activity in placenta and other tissues.

Jpn. J. Hum. Genetic. 18:10-23

BOUILLON, R.; VAN BAELEN, H.; ROMBAUTS, W.; DE MOOR, P. (1.976)

The purification and characterization of the human serum binding protein for the 25-hydroxy cholecalciferol (transcalciferin) identity with group-specific component.

Eur. J. Biochem. 66: 285-291.

BOWMAN, B.H.; BEARN, A.G. (1.965)

The presence of subunits in the inherited group-specific proteins of human serum.

Proc. Nat. Acad. Sci. Usa. 53:722-729.

BUDOWLE, B.(1.985)

Transferrin subtypes determined by ultrathin layer polyacrylamide gel IEF.

Electrophoresis, 1.985, NO 6, pag. 97-99.

BUDOWLE, B.; SCOTT, E. (1.986)

Transferrin subtyping of human bloodstains.

Forensic Science International, 1.986, NO 28, pag. 269-275.

BUDOWLE, B. (1.986)

Subtyping group specific component or esterase D using the same ultrathin layer polyacrilamide gel format.

Electrophoresis 2: 141-144.

CARRACEDO, A.; CONCHEIRO, L. (1.983)

Enzyme polymorphisms in Galicia (NW Spain).

Hum. Hered. 33:160-162.

CARRACEDO, A.; CONCHERIO, L. (1.983)

Distribution of the Pi, Tfc, and Gc subtypes in Galicia (North West Spain).

Z. Rechtsmed. 90:153-158. 29:435-442.

CLEVE, H.; PATUTSCHNICK, W. (1.979)

Neuraminidase treatment reveals sialic acid differences in certain genetic variants of the Gc system (Vitamin-D-binding protein).

Human Genetic 47:193-198.

CLEVE, H.; CONSTANS, J.; BERG, S.; HOSTE, B.; ISHIMOTO, G.; MATSUMOTO, H.; SPEES, E.K.; WEBER, W. (1.981)

Six further Gc-phenotypes delineated by IEF and by polyacrilamide gel electrophoresis.

Human Genet. 57: 312-316.

CLEVE, H.; PATUTSCHNICK, W.; POSTEL, W.; WESER, J.; GÖRG, A. (1.982)

Analysis of the genetic variants of the human Gc system (VDBP) by IEF in immobilized Ph gradients.

Electrophoresis 3: 342-345.

CONSTANS, J.; VIAU, M.; MOATTI, J.P.; CLAVERE, J.L. (1.978)

Gc subtypes demonstrated by isoelectric focusing further data and description of new variants among an African sample (Fula) from Senegal.

Jinrvi Idengaku Zasshi. 23:111-117.

CONSTANS, J.; VIAU, M.; CLEVE, M.; JAEGER, G.; QUILICI, J.C.; PALISSON, M.J. (1.978)

Analysis of the Gc polymorphism in human populations by isoelectric focusing on polyacrylamide gels: demonstration of subtypes of Gc1 alleles and of additional Gc variants.

Human Genetic. 41:53-60.

CONSTANS, J.; CLEVE, H.; BENNET, A.; BOUILLON, R.; COX, D.W.; DAIGER, S.P.; EHNOL, C.; FUJIKI, N.; JOHNSON, A.M.; KIRK, R.L.; KUHN, P.; MARTIN, W.; MATSUMOTO, M.; MAVI, W.R.; MIVAKE, K.; MIYAZAKI, T.; OMOTO, K.; PORCK, H.j.; SEGER, I.; THYMANN, M.; TILLS, D.; TOYOMASUR, M.; VAU BAELEN, H.; VAURUSA, B.; VIAU, M. (1979)

Group specific component. Report on the first international workshop. Human genetic. 40:143-149.

CONSTANS, J.; LEFEVRE-WITIER, PH.; RICHARD, P.; JAEGER, G. (1980)

Gc (vitamin D binding protein) subtype polymorphism and variants distribution among Saharan, Middle East and African populations. Am. J. Phys. Anthropology. 52:435-441.

CONSTANS, J.; VIAU, M.; JAEGER, G.; PALISSON, M.j. (1981) Gc, Tf, Hp subtype and alfa-antitrypsin polymorphism in a Pygmy Bi-Aka sample. Human genetic. 31:129-137.

CONSTANS, J.; ARLET, PH.; VIAU, M.; BOISSU, C. (1983)

Unusual sialylation of the serum DBP associated with the Gc1 allele in alcoholic cirrhosis of the liver. Clin. Chim. Acta 130: 224-227.

CONSTANS, J.; HAZOUT, S.; GARRUTO, R.M.; GAJDUSEK, D.C. (1985)

Population distribution of the human vitamin D binding protein: Anthropological considerations. Amer. J. Phys. Anthropol. 68:107-122.

CONSTANS, J.; KÜHNLE, P.; VIAU, M.; SPIELMANN, W. (1980)

A new procedure for the determination of transferrin (Tf^G) subtypes by I.E.F.: existence of two additional alleles, Tf^{C4} and Tf^{C5}.
Human Genetic 1980,55,111-114

CONSTANS, J.; VIAU, M. (1977)

Group-specific component: Evidence for two subtypes of the Gc gene.
Science, 198: 1070-1071.

CONSTANS, J. (1978)

Analysis of the Gc polymorphism in human populations by IEF on polyacrylamide gels.
Human genetics 41: 53-60.

COOKE, N.E.; WALGATE, J.; HADDAD, J.G. (1979)

Human serum binding protein for vitamin D and its metabolites. II. Specific high-affinity association with protein in nucleated tissue.
J. Biol. Chem. 254:5965-5971.

COOKE, N.E.; WILLARD, H.F.; DAVID, E.V.; GEORGE, D.L. (1986)

Direct regional assignment of the gene for vitamin D binding protein (Gc-globulin) to human chromosome 4q11-q13 and identification of an associated DNA polymorphism.
Human Genetic 73:225-229

COVE, M.; CONSTANS, J.; VIAU, M.; OLOMUCKI, A. (1983)

The effect of serum vitamin D binding protein of polymerization and depolymerization of actin is similar to the effect of profilin on actin.

Biochim. Biophys. Acta 759:137-135.

D'ALESSANDRO, A.M.; D'ANDREA, A.; ORATOR, A. (1988)

Different patterns of human serum transferrin on isoelectric focusing using synthetic carrier ampholytes or immobilized pH gradients.

Electrophoresis 1988, Vol 9, No 2, 80-83.

DAIGER, S.P.; SCHANFIELD, M.S.; CAVALLI-SFORZA, L.L. (1975)

Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxy vitamin D.

Proc. Natl. Acad. Sci. 72 : 2076-2080.

DAIGER, S.P.; CAVALLI-SFORZA, L.L. (1977)

Detection of genetic variation with radioactive ligands II. Genetic variants of vitamin D-labelled group-specific component (Gc) proteins.

Am. J. Hum. Genetic 29 : 593-604.

DE JONG, G.; VAN EIJK, H.G. (1988)

Microheterogeneity of human serum transferrin: A biological phenomenon studied by isoelectric focusing in immobilized Ph gradients.

Electrophoresis 1988, Vol 9, No 9, 589-598.

DYKES, D., D., DeFURIO, C., POLESKY, H., (1982)

Transferrin subtypes in US amerindians, Whites and Blacks using thin-layer agarose gels: Report on a new variant Tf_{C8}

Electrophoresis No.3, 1982, pag. 162-164.

DYKES, D.D.; DeFURIO, C.; POLESKY, H. (1.983)

IEF for transferrin subtypes in parentage testing.
American Journal of Clinical Pathology, 1.983, NQ. 79. pag. 725-727.

DYKES, D.D.; MILLER, S.A.; POLESKY, H.F. (1.985)

Transferrin and plasminogen phenotyping of ageing blood stains using IEF and Silver-stain.
Electrophoresis, 1.985, NQ. 6, pag. 90-93.

DYKES, D.D.; POLESKY, H.; COX, E. (1.979)

IEF de Gc (Vitamin D binding globulin) in parentage testing.
Human Genetics 58: 174-175.

DYKES, D.D.; POLESKY, H. (1.982)

Gc 1C12: A new Gc variant.
Human Hered. 32: 136-138.

DYKES, D.D.; CRAWFORD, M.; POLESKY, H. (1.985)

Gc subtypes identified by IEF in baboons.
Human Genet., 69: 89-90.

EALES, L.S. (1.987)

Association of different allelic forms group specific component with susceptibility to and clinical manifestation of human immunodeficiency virus infection. Lancet, 1:999.

EAP, C.B., BAUMANN, P. (1.988)

I.E.F. of alfa-1 acid glycoprotein (orosomuroid) in immobilized ph-

gradients with 8M urea: Detection of its desialylated variants using an alkaline phosphatase-linked secondary antibody system.

Electrophoresis Vol. 9 No 10. 1.988. 560-654.

ELKON, K.B.; BONFA, E.; LI-CHU, J.; PARNASSA, A.P. (1.987)

Characterization of autoantigens and autoantibodies by immunoblotting.

Electrophoresis 1987,8,445-451

ESCALLON, M.H., FERRELL, R.E., KOMBOH,M.I.(1.987)

Genetic studies of low-abundance human plasma proteins: Evidence for a second ORM structural locus (ORM2) expressed in plasma.

Ame.Journal of Human genetics. Vol. 41. No 3. 1.987. 418-427.

FISHER, R.A.,(1.951)

Standard calculations for evaluating a blood-group system.

Heredity. Vol. 5. 95-102.

GENE, M.; HUGUET, E; CARRACEDO, A; ERCILLA, G.; CORBELLA, J. (1.986)

Frequency and distribution of Pi, Gc, Tf and Plg. Subtypes by I.E.F. in Barcelona.

Advances in Forensic haemogenetics 1:235-239. Brinkmann and Henningsen (eds.) Springer-Verlag.

GERSHONI, J.M. 1.987

The application of ligand overlay of protein blots to the estudy of the nicotinic acetylcholine receptor.

Electrophoresis 1987,8,428-431.

GIBLETT, E.R. (1.969)

Genetic Markers in human blood.

Ed. Blackwell, Oxford 1969,127-159.

GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P.J. (1.985)

Effects of liquid binding upon measurement of Gc by rocket immunoelectrophoresis: Implications for protein determination and for studies of protein/liquid interactions.

Electrophoresis 6: 155-161.

**GÖRG, A.; WESER, J.; WESTERMEIER, R.; POSTEL, W.; WEIDINGER, S.;
PATUTSCHNICK, W.; CLEVE, H. (1.983)**

Isoelectric focusing with immobilized Ph gradients for the analysis of transferrin subtypes and variants.

Human Genetic, 1.983, NO. 64, pag. 222-226.

GREMO, A. (1.989)

Estudio de polimorfismos genéticos en la población madrileña y su aplicación a la investigación biológica de la paternidad.

(Ed.) Universidad Complutense. Madrid. 1.989.

HADDAD, J.G., Jr.; WALGATE, J. (1.976)

25-Hydroxy vitamin D transport in human plasma. Isolation and partial characterization of calcifodiol binding protein.

J. Biol. Chem. 251:4803-4809.

HARADA, A.; UNETSU, K.; YUASA, I.; IKEDA, N.; SUZUKI, T. (1.990)

Orosomuroid I phenotyping from human urine by I.E.F.

Journal of forensic sciences. Vol.35, No 5, 1.990, 1.191-1195.

HARADA, A.; UNETSU, K.; YUASA, I.; IKEDA, N.; SUZUKI, T. (1.989)

Detection of orosomuroid I phenotypes in semen y semen stain.

Journal of forensic sciences. Vol 34, No 3, 1.989. 665-669.

HECKMANN, C. (1.987)

Proceeding of the 12th International Congress of the Society of Forensic Haemogenetics, Wien 1987, pag. 23.

HEREMANS, J.F. (1.960)

Les globulines sériques du système gamma.

Arscia, Bruselas 1.960, p-103.

HARRIS,H. (1.971)

The principles of human biochemical genetics.

Ansterdan and New York: North holland-American Elsevier.

HARRISON,G.A. (1.977)

Polupation structure and human variation.

Cambridge University Press.

HIRSCHFELD, J.; JONSSON, B.; RASMUSON, N. (1.960)

Inheritance of a new group-specific system demonstrated in normal human sera by means of an inmuno-electrophoretic technique.

Nature 185:931-932.

HIRSCHFELD, J.; HEIKEN, A. (1.963)

Application of the Gc system in paternity cases.
Am. J. Hum. Genet. 15:19-23.

HOSTE, B.(1.979)

Gc y transferrin subtypes ascertained by IEF.
Human Genetic, 1979, Nº 50, pag. 75-79.

HOSTE, B. (1.979)

Group-specific component (Gc) and transferrin (Tf) subtypes ascertained by I.E.F. A simple nonimmunological staining procedure for Gc.
Human Genetic 50: 75-79

HUMMEL, K. (1.981)

The Gc system in paternity examinations, application of Gc subtyping by I.E.F. in Biomathematical evidence of paternity.
Gerchow (eds.). Berlin, Heidelberg. New York. Pag. 113-121.

ICI INNOVATION (1.987)

La mezcla exacta. Nº 13 pag. 18-19.

HIDA, R.; YASUDA, T.; NADANO, D.; KISHI, k. (1.990)

Intensification of peroxidase-diaminobenzidine staining using gold-sulfide-silver: A rapid and Highly sensitive method for visualization in immunoblotting.
Electrophoresis 1990,11,852-855

IMAWARI, M.; GOODMAN, D.S. (1.977)

Immunological and immunoassay studies of the binding protein for vitamin D and its metabolites in human serum.

J. Clin. Invest. 59:432-442.

JACOBSON, G.; KARSNIS, P. (1.990)

Important parameters in semi-dry electrophoretic transfer.

Electrophoresis 1990,11,46-52.

JEFFREY, A.S.; WILSON, V.; THEIN, S.L. (1.985)

Individual specific "Fingerprint" of human DNA.

Nature Vol. 316:76-79.

JOHANSSON, K.E. (1.987)

Double replica electroblotting by oscillating electrotransfer.

Electroforesis 1.987,8,379-383.

JOHNSON, A.M., SCHMID, K., ALPER, C. A. (1.969)

Inheritance of human alfa acid glycoprotein (orosomuroid) variants.

Journal of clinical investigation. Vol 8. No 12. 1.969. 2.293-2299.

JOHNSON, A.M.; CLEVE, H.; ALPER, C.A. (1.975)

Variants of the group-specific component system as demonstrated by immunofixation electrophoresis. Report of new variant, Gc Boston (Gc B).

Am. J. Human Genetic 27:728-736.

JONES, D.A.,(1.972)

Blood samples: probability of discrimination.

Journal of the Forensic Science Society. Vol. 12. 355-360.

KAMBOH, M.; KIRK, R., L (1.983)

Distribution of transferrin subtypes in Asian, Pacific and Australians
Aboriginal populations: Evidence for the existence of a new subtype Tf_{c6}
Human Hered. 1.983, No. 33, pag. 237-243.

KAMBOH, M.I.; RANFORD, P.R.; KIRK, K.L. (1.984)

Population genetics of the Vitamin D binding protein (Gc) subtypes in
the Asian- Pacific Area.
Human Genetic 67:378-384.

KAMBOH, M.I.; FERRELL, R.E. (1.986)

Ethnic variation in vitamin D-binding protein (Gc): a review of I.E.F.
studies in human populations.
Human Genetic 72:281-293.

**KARLSSON, S.; SKAFTADOTTIR, I.; ARNASON, A.; THORDARSON, G.; JENSSON,
O. (1.983)**

Gc subtypes in Icelanders.
Human Heredit 33:5-8

KARLSSON, S. (1.983)

Gc subtypes in Icelanders.
Human Hered. 33: 5-8.

KAWAI, T. (1.977)

Proteínas plasmáticas. Aplicaciones clínicas.

Ed. Panamericana. 1.977

KAWAKAMI, M.; GOODMAN, D.S. (1.981)

Effect of protein modification procedures on the interaction between 25-hydroxy vitamin D and Human plasma binding protein for vitamin D and its metabolites.

Biochemistry 20: 5881-5887

KITCHIN, F.D. (1.965)

Demonstration of the inherited serum group-specific component by acrylamide electrophoresis.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119:1153-1155

KOICHIRO, K.; IKEHARA, Y.; YASUDA, T.; MIZUTA, K. (1.990)

Transferrin polymorphism detected in human urine using I.E.F. followed by immunoblotting.

Forensic Science International 1990, 45, 225-230

KOJ, A., ALLISON, A.C. (ed):(1.974)

Structure and function of plasma proteins.

Plenum Press, London 1.974. 73-125.

KOVASTI, A.; TRIANTAPHYLIDIS, C.D. (1.987)

Gc and Tf subtypes in Greece.

Human Heredit. 37: 62-64.

KUHNLE (1.984)

Abstracts of the 18th congress of the international society of blood

transfusion.

Munich, Kargen, Basel. 1984 pag. 59.

KÜHNL, P.; SPIELMANN, W. (1.979)

A third common allele in the transferrin system, Tf^{c3}, detected by I.E.F.

Human Genetic 1979,50,193-198

KÜHNL, P.; SPIELMANN, W. (1.978)

Transferrin: Evidence for two common subtypes of the Tf_c allele. Human Genetic 1978,43, pag. 91-95.

KÜHNL, P.; SPIELMANN, W.; WEBER, W. (1.979)

IEF of rare transferrin variants and common subtypes. Human Genetic, 1.979, NO. 46, pag. 83-87.

KÜHNL, P.; SPIELMAN, W.; LOA, W. (1.978)

An improved method for the identification of Gc subtypes (group-specific component) by I.E.F. Vox Sang. 35: 401-404

KUO, S.E. (1.987)

Group-specific component subtyping: A high resolution method employing short run cathodic drift. Electrophoresis 8:160-162.

LEES, A.; HADDAD, J.G.; LIN, S. (1.984)

Brevin and vitamin D binding protein: comparison of the effects of two

serum proteins on actin assembly and disassembly.

Biochemistry 23: 3038-3047.

LEFRANC, M.P.; CHIBANI, J.; HELAL, A.N.; BOUKEF, K.; SEGER, K.; LEFRANC,
G. (1.981)

Human transferrin (Tf) and Group-specific Component (Gc) subtypes
in Tunissia.

Human Genetic 56: 60-63.

LEHNINGER, A.L. (1.978)

bioquímica.

Ed. Worth Publishers, inc.

LUKKA, M.; TURUNEN, P.; KATAJA, M.; EHNHOLM, C. (1.986)

Group-specific component (Gc): Subtypes in the Finish population.

Human Heredic. 36: 229-303.

MARTIN, W.; SACHS, V.(1.984)

Subtyping mittels direkter Immunfixation nach isoelektrischer
Fokussierung im aragosegel.

Arztl. Lab. 30: 28-30.

MATSUMOTO, H.; MATSUI, K; ISHIDA, N.; OHKURA, K.; TENG, Y.S. (1.980)

The distribution of Gc subtypes among the Mongoloid populations.

Amer. Journal of phisical anthropology 53: 505-508.

MOEREMANS, M. (1.987)

The use of colloidal metal particles in protein blotting.

Electrophoresis 1987,8,403-409.

MONTELARO, R.C. (1.987)

Protein antigen purification by preparative protein blotting.

Electrophoresis 1987,8,432-438.

MONTIEL, M.D., CARRACEDO. A., LOPEZ-RODRIGUEZ, I., RODRIGUEZ-CALVO, M.S., CONCEIRO, L., HUGUET, E., GENÉ, H. (1.988)

Comparison between I.E.F. methods for the detection of orosomucoid phenotypes.

Electrophoresis. Vol 9, NO 6. 1.988. 268-272.

MOURANT, A.E.; TILLS, D.; DOMANIEWSKI-SOBCZAK, K. (1.976)

Sunshine and the geographical distribution of the alleles of the Gc systems of plasma proteins.

Human Genetic. 33: 307-314.

MURRAY, J.C.; BUETOW, K.; CHUNG, D; ASCHBACHER, A. (1.985)

Linkage disequilibrium of RFLP's at the beta fibrinogen (FGB) and gamma fibrinogen (FGG) loci on chromosome 4. Eighth International Workshop on human gene mapping.

Cytogenet. Cell Genet. 40: 707-708.

NAKASOMO, I. (1.983)

A new single band variant of the Gc subtypes determined by IEF.

Human Genetics 64: 184-185

NERSTROM, B. (1.963)

On the inheritance of Gc-system. A Danish family study.
Acta Genet. Stat. Med. 13: 30-43.

OHLSSON, B.G.; WESTÖM, B.R; KARLSSON, B.W. (1.987)

Enzymoblotting: Visualization of electrophoretically separated enzymes on nitrocellulose membranes using specific substrates.
Electrophoresis 1987,8,415-420

OLAISEN, B.; MEGAV, B.; TEISBERG, P.; GEDDE-DAHL T.Jr.; HELLAND, R.; SIVERTS, A. (1.981)

Proceedings of the 9th International Congress of Society of Forensic Haemogenetics, Bern 1981, pag. 161-168.

OMOTO, k; MIYAKE, K. (1.979)

The distribution of the group-specific component (Gc) subtypes in Japanese.
Jap. Hum. Genet. 23: 119-125.

PAKSTIS, A.J.; KIDD, J.R.; CASTIGLIONI, C.; SPARKES, R.S.; KIDD, K.K. (1.986)

Close linkage of MT^{PI} with Gc on chromosome a.
Cytogenet. Cell Genet. 41: 189-190.

PAPIHA, S.S.; WHITE, I.; ROBERTS, D.F. (1.983)

Some genetic implications of IEF of human red cell PGMI and serum Gc: Genetic diversity in the population of Himachal Pradesh, India.
Human Genetics 63: 67-72.

PARCHMENT, R.E.; SHAPER, J.H. (1.987)

Glycosyltransferases as probes for non-reducing terminal monosaccharide residues on nitrocellulose immobilized glycoproteins: The beta(1-4) galactosyltransferase model.

Electrophoresis 1987,8,421-427.

PASCALI,V.L.; DOBOSZ,M.; DESTRO-BISOL,G.; D'ALOJA,E. (1.988)

Characterization of genetic variants of human serum transferrin by isoelectric focusing: Comparison between conventional and immobilized Ph gradients, and application to a protocol for paternity testing.

Electrophoresis Vol.9 Nº 8, 1988 ,411-417.

PASCALI,V.L.; RANALETTA,A.; AUCOMI,P. (1.982)

Improved typing of human serum transferrin by IEF on ultrathin layer polyacrylamide slab gels.

Human Genetic, 1.982, Nº 61, pag. 39-41.

PASCALI, V.L.; AUCONI, D. (1.983)

Transferrin: Common and rare variants in Italy: Evidence for the existence of rare Tf_{c6} among caucasians.

Human Genetic, 1.983, Nº. 64, pag. 232-234.

PASCALI, V.L.; RANALLETTA, D. (1.986)

Antitrypsin and Gc polymorphisms in some populations of Congo: an unusual, highly frequent mutant, Pi^{S*}, in Bakete and Bagenda.

Ann. of Hum. Biol. 13/3: 267-271.

PETRÉN, S.; VESTERBERG, O. (1.989)

Separation of different forms of transferrin by isoelectric focusing to detect effects on the liver caused by xenobiotics.

Electrophoresis 1989, Vol 10, No 8-9, 600-604.

PETRINI, M.; EMERSON, D.L.; GALBRAITH, R.M. (1.983)

Linkage between surface immunoglobulin and cytoskeleton of a lymphocytes may involve Gc protein.

Nature 306: 73-74.

PETRINI, M.; GALBRAITH, R.M.; EMERSON, D.L.; NEL, A.E.; ARNAUD, P. (1.985)

Structural studies of T lymphocyte Fc receptors: association of Gc protein with Ig G binding to Fc.

J. Biol. Chem. 260: 1804-1810.

PHARMACIA FINE CHEMICALS (1.985)

Isoelectric Focusing, Principles and Methods.

PFLUG, W.(1.986)

Sensitive alkaline phosphatase linked secondary antibody system for determination of group specific component after IEF on 250 um thick reusable immobilized Ph gradients.

Electrophoresis 7: 273-278.

PUTNAM, F.W. (1.984)

The plasma proteins.

Academic press Inc. Ed: Putnam. Orlando. 1984,4,46-166.

RAMLAU, J. (1.987)

Use of secondary antibodies for visualization of bound primary reagents in blotting procedures.

Electrophoresis 1987,8,398-402

RAYMONS, S. (1.964)

Acrylamide gel electrophoresis.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 350.

RIGHETTI, P. (1.983)

Isoelectric focusing: theory, methodology and applications.

Elsevier Biomedical Press, Amsterdam - New York.

RITTER, H. (1.963)

Der Gc-Factor nach Hirschfeld in der Vaterschaftsbegutachtung: Mutmasslichkeitswerte nach der Essen Möller-Formel.

Anthropol. Anz. 26: 78-80.

SCHERZ, R. (1.985)

Genetic polymorphism of human serum transferrin in the Swiss population: Evidence for three "new" transferrin variants.

Electrophoresis, 1.985, No 6, pag. 569-571.

SCHMID, K., TOKITA, K., YOSHISOKI, R. (1.965)

The alfa-1 Acid glycoproteins variants of normal caucasian and Japanese individuals.

Journal of clinical investigation. Vol. 44. No 8. 1.965. 1394-1401.

SCHMID, K. IN : PUTNAM, F.W.(ed). (1.975)

The plasma proteins.

Academic press, New York, 1.975, vol 1. 183-228.

STRAHLER, J.R.; ROSENBLUM, B.B.; HANASH, S.; BUTKUNAS, R. (1.983)

Separation of transferrin types in human plasma by anion-exchange high-performance liquid chromatography.

Journal of Chromatography 1983, 266, 281-291.

SVASTI, J.; BOWMAN, B.H. (1.978)

Human group-specific component. Changes in electrophoretic mobility resulting from vitamin D binding and from neuraminidase digestion.

J. Biol. Chem. 253: 4188-4194.

SVASTI, J.; KUROSKY, A.; BENNETT, A.; BOWMAN, B.H. (1.979)

Molecular basis for the three major forms of human serum vitamin D binding protein (group-specific component).

Biochemistry 18: 1611-1617.

TAKETA, K. (1.987)

A tetrazolium method for peroxidase staining: Application to the antibody-affinity blotting of α -fetoprotein separated by lectin affinity electrophoresis.

Electrophoresis 1987,3,409-414

THOMAS, A.S.; AASCOV, J.G. (1.990)

Routine phenotyping of native and desialyzed α 2-hs-glycoprotein from blood stains.

Forensic Science International 1990, 47, 173-180

THYMANN, M. (1.978)

Identification of a new serum protein polymorphism as transferrin.

Human Genetic 1978, 43,91-95

THYMANN, M., WEIDINGER, W. (1.988)

Subtyping of orosomuroid 1 (ORM1) by I.E.F. in agarosa and polyacrilamide gels.

Electrophoresis. Vol 9, No 8. 380-383

THYMANN, M., EIBERG, H., IN: BRIKMAM, B. Y HEMINGREN, K.(EDS)(1.986)

Advances in forensic haemogenetics.

Springer, Berlin 1.986. Vol 1. 162-166.

THYMANN, M.; HOSTE, B.; SCHEFFRAHN, W.; CONSTANS, J.; CLEVE, H. (1.985)

Unusual sialilation of three different rare genetic variant of serum BDP: Gc 1A17, Gc 1A16 and Gc 1A11.

Hum. Genet. 69: 224-227.

THYMANN, M. (1.981)

Gc subtypes determined by agarosa IEF.

Human Hered. 31: 214-221

THYMANN, N.; HJALMARSSON, K.; SVENSSON, M. (1.982)

Five new Gc variants detected by IEF in agarosa gel.

Human Genetics 60: 340-343.

TOKITA, K., SCHMID, K. (1.963)

Variants of alfa-1 Acid glycoproteins.

Nature Vol 200. Nº 19, 1.963. 266-267.

TOVEY, E.R.; BALDO, B.A. (1.987)

Comparison of semi-dry and conventional tank-buffer electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose membranes.

Electrophoresis 1987,8,384-387.

TOVEY, E.R.; BALDO, B.A. (1.987)

Characterisation of allergens by protein blotting

Electrophoresis 1987,8,452-463.

VAN BAELEN, H.; BOUILLON, R.; DE MOOR, P. (1.980)

Vitamin D binding protein (Gc-globulin) binds action.

J. Biol. Chem. 255: 2270-2272.

VAN BAELEN, H.; BOUILLON, R.; DE MOOR, P. (1.978)

The heterogeneity of human Gc-globulin.

J. Biol. Chem. 253: 6344-6345.

VAN BAELEN, H.; BOUILLON, R.; DE MOOR, P. (1.980)

Vitamin D binding protein (Gc-globulin) binds action.

J. Biol. Chem. 255: 2270-2272.

VAN BAELEN, H.; BOUILLON, R.; DE MOOR, P. (1.978)

The heterogeneity of human Gc-globulin.

J. Biol. Chem. 253: 6344-6345.

VAVARUSA, B.; CLEVE, H.; CONSTANS, J. (1.983)

A deficiency mutant of the Gc system.

Human Genetics 65: 102-107

WALTER, H.; KANNAPINN, G.; DANNEWITZ, A.; RICHARDS, O.; DE ESTEFANO, G.F. (1.986)

On the variability of Gc subtypes in Italy.

Hum. Hered. 36: 50-53

WEIDINGER, S., MÜLLER, T., SCHWARZFISCHER, F., CLEVE, H. (1.987)

Three new ORM variants revealed by I.E.F. and print immunofixation.

Human genetic, Vol 77, No 3, 1.987. 286-288.

WEIDINGER, S.; CLEVE, H.; SCHWARZFISCHER, F.; POSTEL, W.; WESTER, J.; GÖRG, A. (1.984)

Transferring subtypes and variants in Germany: Further evidence for a Tf null allele.

Human Genetic, 1.979, No. 66, pag. 356-360.

WEIDINGER, S.; CLEVE, H.; SCHWARZFISCHER, F.; PATUTSCHNICK, W. (1.981)

The Gc system in paternity examinations: Application of Gc subtyping by IEF.

In: Biomathematical evidence of paternity. K. Hummel, J. Gerchow (Eds.)

Springer-Verl. Berlin-Heidelberg. pag. 113-121.

WESTWOOD, S.A.; (1.988)

The use of alfa₂-hs-glycoprotein and group specific component in typing forensic blood samples for discriminative and investigative

purposes.

Electrophoresis 1988,9,432-437

**YANG, F.; BRUNE, J.L.; NAYLOR, S.L.; CUPPLES, R.L.; NABERHAUS, H.;
BOWMAN, B.H. (1.985)**

Human group-specific component (Gc) is a member of the albumin family.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7994-7998.

YOUNG (1.982)

The liver: Biology and pathology.

Ed. Romen Press. New York 1982,393-404

YUASA, I.; UMETSU, K.(1.988)

Genetic polymorphism of human alfa-2-HS-glycoprotein: Characterization and application to forensic hemogenetics

Electrophoresis 1988,9,404-410

YUASA,I.,SUENAGA,K.,UNETSU,K.,ITO,K.,ROBINET-LÉVY,M.(1.986)

Orosomucoide (ORM) typing by I.E.F.: Evidence for two structural loci, ORM1 and ORM2.

Humann Genetics. Vol 74. N^o 2. 1.986. 160-161.