



Universidad Nacional Autónoma
de México

FACULTAD DE QUIMICA

IDENTIFICACION DE MANCHAS DE SANGRE
POR ELECTROFORESIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A :

Francisco Javier Origel Coutiño

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS 1979.
AÑO ~~M.T.~~ 2624
FECHA _____
PROC. _____
S. _____



Jurado asignado originalmente
según el tema.

PRESIDENTE IGNACIO DIEZ DE URDANIVIA
VOCAL EVELVINA MEDRANO DE JAIMES
SECRETARIO CESAR DOMINGUEZ CAMACHO
1er.SUPLENTE MARTHA JIMENEZ CASTAÑEDA
2o.SUPLENTE RAUL NIETO CAMACHO

Sitio donde se desarrolló el tema: Facultad de Química

Nombre completo y firma del sustentante: *Francisco*
FRANCISCO JAVIER ORIGEL COUTIÑO

Nombre completo y firma del asesor del tema: *Ignacio Diez de Urdanivia*
IGNACIO DIEZ DE URDANIVIA

A mis padres en agradecimiento
y mucho cariño.

A todos mis maestros

A mis amigos

A mis hermanos

A los maestros de mi tesis:

Ignacio Díez de Urdañivia

Etelvina Medrano de Jaimes

Cesar Domínguez Camacho

Martha Jiménez Castañeda

Raúl Nieto Camacho

Con mucho agradecimiento y estimación
al Profesor Ignacio Diez de Urduvia

Agradezco mucho al Profesor
Cesar Dominguez Camacho por
la valiosa ayuda y colabora-
ción experimental en la tesis.

INDICE

	pág.
INTRODUCCION.....	1
GENERALIDADES.....	8
TECNICA DE ELECTROFORESIS.....	31
CONCLUSIONES.....	80
BIBLIOGRAFIA.....	90

CAPITULO I

1. INTRODUCCION.

I. INTRODUCCION.

La investigación policial se ha ido transformando para hacerse cada vez más científica y objetiva. Esto ha originado la formación de laboratorios o gabinetes donde deben ser practicadas las investigaciones científicas tendientes al encuentro de la prueba que permita emitir un dictamen.

La sangre es frecuentemente el punto de partida en una investigación de tipo legal. Un ladrón puede lesionarse durante el robo y dejar su sangre en la escena del delito, o un asesino puede manchar su ropa o algún objeto con la sangre de su víctima, etc. Si entonces es posible relacionar una identificación definitiva de la sangre con un sujeto particular, esto podrá proporcionar una buena evidencia en la investigación.

Cada delito involucra algún tipo de evidencia, que es la clave en el proceso de la investigación y muchas veces indica la inocencia o culpa en un caso determinado.

La identificación de las manchas de sangre es un problema de Química Forense para el cual han sido propuestos muchos métodos. Los resultados han sido insatisfactorios por la carencia, en muchos de los métodos sugeridos, de todos los requerimientos necesarios en ese tipo de análisis.

La identificación de las manchas de sangre es de hecho un primer paso en una serie de procedimientos analíticos concernientes a la edad de la mancha, la edad (recién nacido o adulto), el sexo, el grupo sanguíneo del sujeto, la especie, etc. En algunos casos el material a ser analizado es abundante, pero en otros las manchas son muy pequeñas y se re -

-quiere de métodos que necesiten muy poco material para la identificación sanguínea, el diagnóstico de la especie, el grupo sanguíneo, etc, y permitir la repetición como control de cada prueba y llevar a cabo el análisis sin consumir todo el material, y permitir que otros analistas puedan comparar los resultados.

Un método de análisis que sea muy sensible y específico requiere poco material y, si es posible, no altera la muestra a ser analizada. Es poco económico e inhabitual emplear métodos sensibles pero no específicos, porque ello requiere la aplicación de subsecuentes métodos más específicos. La especificidad naturalmente, es el más importante requerimiento, el cual no debe ser nunca desdeñado.

Los métodos empleados en Química Legal para identificación deben proporcionar datos fácilmente documentables, los cuales pueden ser reportados para permitir que otros expertos los comparen.

Es evidente que el esquema clásico de identificación de manchas de sangre sigue siendo útil y muy usado, pero es posible introducirle métodos adicionales que lo lleguen a ser completo. El esquema usado consiste de pruebas orientativas y métodos preliminares (que nos indican una probabilidad), y finalmente los llamados métodos confirmativos. La ejecución de reacciones de orientación y preliminares, se efectúa necesariamente en análisis toxicológicos, en los cuales es necesario bajar progresivamente el número de compuestos tóxicos sospechados e identificarlos por diferentes

métodos químicos y físicos. Por otro lado para la identificación de muestras de sangre, sólo un método sensible y específico debería ser empleado y los resultados controlarse por una repetición de la misma prueba, y por otra también sensible y específica, sin embargo esto no ha sido posible y por eso deben emplearse métodos suplementarios que en conjunto resuelvan el problema de la identificación de las manchas de sangre, y eso es lo que pretende este trabajo, presentar el estudio de las manchas de sangre, enfocándolo a la determinación de su origen humano o animal, usando la técnica electroforética para ello, con fines legales o de alguna otra aplicación, proporcionando evidencias adicionales, y en los casos particulares en los que pruebas más sencillas no sugieran nada y requieran el uso de pruebas adicionales.

Así pues la técnica de electroforésis será una prueba de uso conjunto a otras pruebas adicionales, ya sea las tradicionales, o algunas novedosas, según el caso, y de ellas poder emitir un juicio con carácter más concluyente, ya que como sabemos, no se conocen pruebas que por sí solas sean definitivas y concluyentes en el aspecto de relacionar una mancha de sangre con un sujeto determinado. De ahí que dependa del tacto que se tenga en el caso y del criterio en la interpretación de los resultados para que se realice con éxito la identificación.

Como se sabe, aun no es posible individualizar la sangre en la misma forma como se puede una huella digital, pero ésto por falta de conocimiento de técnicas y no por la naturaleza de la sangre. En el presente es posible solamente trabajar en términos de polimorfismos genéticamente controlados que ocurren en la sangre, y calcular de datos de población la frecuencia en que ocurren las combinaciones particulares de grupos obtenidos. Esto es, la ciencia forense muchas veces echa mano de la Estadística y muchas veces se basa en probabilidades, cuando las técnicas conocidas no pueden decir más. Por ejemplo, usando datos de población Británica, se tienen los siguientes grupos:

Grupo	Frecuencia del Gpo. particular(%)
O	47
MN	50
R ₁ r	34
PGM 1	58
AK 1	93
Hb-A	98
ADA 1	89
PGD A	94
G6PD B	98
PCEU	96
C ₅ -	90
H ₂ -1	36

La frecuencia combinada de estos grupos se puede obtener para la población y a partir de los grupos más comunes de cada sistema se puede sacar la frecuencia de aparición que se da como una evidencia en la corte para ayudar a darle valor al resultado obtenido.

Hace sólo diez años, las técnicas confiables eran sólo para-

-el sistema ABC de las manchas de sangre. Frecuentemente lo involucrado en un caso era del mismo grupo (ABC), así la evidencia del grupo sanguíneo tenía poco valor. Por ello podemos valernos de diferencias en la sangre, como sería el caso de las diferentes hemoglobinas en la sangre, con el fin de proporcionar evidencias adicionales en casos de semejanzas por otros sistemas y métodos.

Otra dificultad común era tener suficientes manchas de sangre para los macrométodos, que deben sustituirse por micro-métodos.

Es frecuente preguntarse cual sistema en la sangre es el más adecuado usar; idealmente tal vez todos los sistemas debían hacerse en las manchas, pero por una variedad de razones esto es frecuentemente imposible, ni decir nada económico.

El tipo de método a ser usado a ser usado es un problema que debe ser decidido para cada caso individual y con respecto al laboratorio que trabaje el caso; por ejemplo puede ser suficiente la mancha de sangre para agrupar en dos sistemas, si los grupos de la víctima y el sospechoso se conocen de sus muestras de sangre, la preferencia sería para esos sistemas que distingan uno del otro y reduzca el porcentaje de error por considerar el porcentaje de población del cual la sangre pudo haber venido.

Es altamente deseable, y esto no estaría de más, que las muestras de sangre deberían obtenerse de todos los que estén involucrados en el caso particular. Esto puede ser rápidamente procesado a través de todos los sistemas de grupo como una

-rutina, y los resultados usarse en la manera antes indicada, para elaborar la selección óptima de trabajo a efectuar sobre las manchas de sangre.

Por la obtención de muestras de sangre de un gran número de sospechosos en un caso donde el criminal ha abandonado su propia sangre en la escena del crimen, es posible ahorrar tiempo a la policía por eliminar a quienes no pertenecen al sistema sanguíneo averiguado. Este aspecto del trabajo se esta incrementando, y el ahorro de interrogaciones y tiempo de averiguaciones puede ser mucho.

Es esencial un detallado y cuidadoso registro de todo el trabajo hecho, porque los errores son mucho más probables de ocurrir por un simple error de oficina, que por el desarrollo o interpretación del trabajo experimental.

Estos registros también constituyen un conocimiento local de las frecuencias de población que pueden ser de valor en el futuro.

CAPITULO II

2.GENERALIDADES.

2.1.Introducción.

2.2.Hemoglobina.

2.3.Tipes de Hemoglobina.

2.4.Hemoglobinas en Animales.

2.5.Separación e Identificación de Hemoglobinas. (Humana y- Animal.)

2. GENERALIDADES.

2.1. Introducción.

Los métodos para la identificación de manchas de sangre están basados en la evidencia de células o en la de compuestos que son característicos de la sangre:

- a) Células rojas y leucocitos.
- b) Hemoglobina y sus derivados.

Este trabajo se ocupa de la evidencia del segundo punto a través de la técnica de electroforesis. Por eso se requiere de revisar en seguida, los aspectos de la hemoglobina relacionados al fundamento de la identificación.

2.2. Hemoglobina.

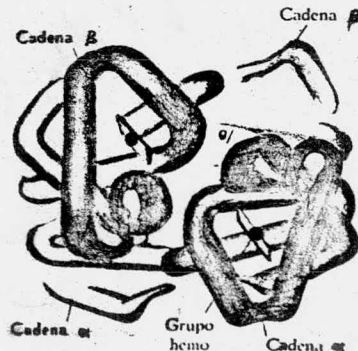
Está formada por una proteína (la globina), y un compuesto ferruginoso llamado hemo. La globina consta de cuatro cadenas peptídicas, dos cadenas llamadas alfa (141 aminoácidos cuya secuencia se conoce), y dos cadenas llamadas beta (146 aminoácidos, también de secuencia conocida), a cada una de las cadenas se halla unido un resto hemo mediante enlace covalente.

La molécula posee una estructura esferoidal compacta, cuyas dimensiones son (6.4 X 5.5 X 5.0 nm.). El peso molecular es de 68 000. Cada cadena posee una conformación irregularmente plegada, en la que ciertos tramos de regiones helicoidales alfa puras, se encuentran separados por curvaturas. Las cadenas alfa y beta poseen alrededor de un 70 % de carácter helicoidal.

Las cadenas alfa y beta son muy semejantes entre si en su estructura terciaria, la cual está constituida por longitudes semejantes de hélice alfa con curvaturas aproximadamente de los mismos ángulos y direcciones.

En la hemoglobina hay muy poco contacto entre las dos cadenas alfa y entre las dos cadenas beta, pero son numerosos los contactos de grupos R entre los pares pertenecientes a cadenas diferentes. Resulta de especial interés la localización de los cuatro grupos hemo, uno en cada subunidad, que unen las cuatro moléculas de oxígeno. Estos grupos hemo son moléculas planas en las cuales los átomos de hierro forman complejos de coordinación planares cuadrados y se hallan muy separados unos de otros y situados a diferentes ángulos relativos. Cada uno de ellos se halla parcialmente envuelto en una bolsa forrada por grupos R no polares. El quinto enlace coordinado de cada átomo de hierro se establece con un nitrógeno imidazólico de un resto de histidina de la molécula peptídica. La sexta posición queda disponible para su coordinación con una molécula de oxígeno. Existe una cavidad central dentro de la molécula de hemoglobina, forrada con grupos R polares.

Estructura cuaternaria de la hemoglobina.



Estructura Primaria y Secundaria de las cadenas de polipéptidos de la Hemoglobina.

Secuencia de amino-ácidos.

Secuencia de amino-ácidos.

Helice #	#	α	β	γ	δ	#
NA1	1	Val	Val	Gly	Val	1
NA2	2	Leu	His	His	His	2
NA3			Leu	Phe	Leu	3
A1	3	Ser	Thr	Thr	Thr	4
A2	4	Pro	Pro	Glu	Pro.	5
A3	5	Ala	Glu	Glu	Glu	6
A4	6	Asp	Glu	Asp	Glu	7
A5	7	Lys	Lys	Lys	Lys	8
A6	8	Thr	Ser	Ala	Thr	9
A7	9	Asn	Ala	Thr	Ala	10
A8	10	Val	Val	Ile	Val	11
A9	11	Lys	Thr	Thr	Asn	12
A10	12	Ala	Ala	Ser	Ala	13
A11	13	Ala	Leu	Leu	Leu	14
A12	14	Try	Try	Try	Try	15
A13	15	Gly	Gly	Gly	Gly	16
A14	16	Lys	Lys	Lys	Lys	17
A15	17	Val	Val	Val	Val	18
A16	18	Gly				
AB1	19	Ala				
B1	20	His	Asn	Asn	Asn	19
B2	21	Ala	Val	Val	Val	20
B3	22	Gly	Asp	Glu	Asp	21
B4	23	Glu	Glu	Asp	Ala	22
B5	24	Tyr	Val	Ala	Val	23
B6	25	Gly	Gly	Gly	Gly	24
B7	26	Ala	Gly	Gly	Gly	25
B8	27	Glu	Glu	Glu	Glu	26
B9	28	Ala	Ala	Thr	Ala	27
B10	29	Leu	Leu	Leu	Leu	28
B11	30	Glu	Gly	Gly	Gly	29
B12	31	Arg	Arg	Arg	Arg	30
B13	32	Met	Leu	Leu	Leu	31
B14	33	Phe	Leu	Leu	Leu	32
B15	34	Leu	Val	Val	Val	33
B16	35	Ser	Val	Val	Val	34
C1	36	Phe	Tyr	Tyr	Tyr	35
C2	37	Pro	Pro	Pro	Pro	36
C3	38	Thr	Try	Try	Try	37
C4	39	Thr	Thr	Thr	Thr	38
C5	40	Lys	Gln	Gln	Gln	39
C6	41	Thr	Arg	Arg	Arg	40
C7	42	Tyr	Phe	Phe	Phe	41
CD1	43	Phe	Phe	Phe	Phe	42
CD2	44	Pro	Glu	Asp	Glu	43
CD3	45	His	Ser	Ser	Ser	44
CD4	46	Phe	Phe	Phe	Phe	45
CD5	47	Asp	Gly	Gly	Gly	46
CD6	48	Leu	Asp	Asn	Asp	47
CD7	49	Ser	Leu	Leu	Leu	48
CD8			Ser	Ser	Ser	49

Helice =	#	α	β	γ	δ	=
D1	50	His	Thr	Ser	Ser	50
D2	51	Gly	Pro	Ala	Pro	51
D3			Asp	Ser	Asp	52
D4			Ala	Ala	Ala	53
D5			Val	Ile	Val	54
D6			Met	Met	Met	55
D7			Gly	Gly	Gly	56
E1	52	Ser	Asn	Asn	Asn	57
E2	53	Ala	Pro	Pro	Pro	58
E3	54	Gln	Lys	Lys	Lys	59
E4	55	Val	Val	Val	Val	60
E5	56	Lys	Lys	Lys	Lys	61
E6	57	Gly	Ala	Ala	Ala	62
E7	58	His	His	His	His	63
E8	59	Gly	Gly	Gly	Gly	64
E9	60	Lys	Lys	Lys	Lys	65
E10	61	Lys	Lys	Lys	Lys	66
E11	62	Val	Val	Val	Val	67
E12	63	Ala	Leu	Leu	Leu	68
E13	64	Asp	Gly	Thr	Gly	69
E14	65	Ala	Ala	Ser	Ala	70
E15	66	Leu	Phe	Leu	Phe	71
E16	67	Thr	Ser	Gly	Ser	72
E17	68	Asn	Asp	Asp	Asp	73
E18	69	Ala	Gly	Ala	Gly	74
E19	70	Val	Leu	Ile	Leu	75
E20	71	Ala	Ala	Lys	Ala	76
EF1	72	His	His	His	His	77
EF2	73	Val	Leu	Leu	Leu	78
EF3	74	Asp	Asp	Asp	Asp	79
EF4	75	Asp	Asn	Asp	Asn	80
EF5	76	Met	Leu	Leu	Leu	81
EF6	77	Pro	Lys	Lys	Lys	82
EF7	78	Asn	Gly	Gly	Gly	83
EF8	79	Ala	Thr	Thr	Thr	84
F1	80	Leu	Phe	Phe	Phe	85
F2	81	Ser	Ala	Ala	Ser	86
F3	82	Ala	Thr	Gln	Gln	87
F4	83	Leu	Leu	Leu	Leu	88
F5	84	Ser	Ser	Ser	Ser	89
F6	85	Asp	Glu	Glu	Glu	90
F7	86	Leu	Leu	Leu	Leu	91
F8	87	His	His	His	His	92
F9	88	Ala	Cys	Cys	Cys	93
FG1	89	His	Asp	Asp	Asp	94
FG2	90	Lys	Lys	Lys	Lys	95
FG3	91	Leu	Leu	Leu	Leu	96
FG4	92	Arg	His	His	His	97
FG5	93	Val	Val	Val	Val	98

(Continuación)

Secuencia de amino ácidos.

Helice =	#	α	β	γ	δ	ϵ
G1	94	Asp	Asp	Asp	Asp	99
G2	95	Pro	Pro	Pro	Pro	100
G3	96	Val	Glu	Glu	Glu	101
G4	97	Asn	Asn	Asn	Asn	102
G5	98	Phe	Phe	Phe	Phe	103
G6	99	Lys	Arg	Lys	Arg	104
G7	100	Leu	Leu	Leu	Leu	105
G8	101	Leu	Leu	Leu	Leu	106
G9	102	Ser	Gly	Gly	Gly	107
G10	103	His	Asn	Asn	Asn	108
G11	104	Cys	Val	Val	Val	109
G12	105	Leu	Leu	Leu	Leu	110
G13	106	Leu	Val	Val	Val	111
G14	107	Val	Cys	Thr	Cys	112
G15	108	Thr	Val	Val	Val	113
G16	109	Leu	Leu	Leu	Leu	114
G17	110	Ala	Ala	Ala	Ala	115
G18	111	Ala	His	Ile	Arg	116
G19	112	His	His	His	Asn	117
GH1	113	Leu	Phe	Phe	Phe	118
GH2	114	Pro	Gly	Gly	Gly	119
GH3	115	Ala	Lys	Lys	Lys	120
GH4	116	Glu	Glu	Glu	Glu	121
GH5	117	Phe	Phe	Phe	Phe	122
H1	118	Thr	Thr	Thr	Thr	123
H2	119	Pro	Pro	Pro	Pro	124
H3	120	Ala	Pro	Glu	Gln	125
H4	121	Val	Val	Val	Met	126
H5	122	His	Gln	Gln	Gln	127
H6	123	Ala	Ala	Ala	Ala	128
H7	124	Ser	Ala	Ser	Ala	129
H8	125	Leu	Tyr	Try	Tyr	130
H9	126	Asp	Gln	Gln	Gln	131
H10	127	Lys	Lys	Lys	Lys	132
H11	128	Phe	Val	Met	Val	133
H12	129	Leu	Val	Val	Val	134
H13	130	Ala	Ala	Thr	Ala	135
H14	131	Ser	Gly	Gly	Gly	136
H15	132	Val	Val	Val	Val	137
H16	133	Ser	Ala	Ala	Ala	138
H17	134	Thr	Asn	Ser	Asn	139
H18	135	Val	Ala	Ala	Ala	140
H19	136	Leu	Leu	Leu	Leu	141
H20	137	Thr	Ala	Ser	Ala	142
H21	138	Ser	His	Ser	His	143
HC1	139	Lys	Lys	Arg	Lys	144
HC2	140	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	145
HC3	141	Arg	His	His	His	146

Ala en H 14 (136) en las cadenas gamma y delta pueden ser variantes normales.

Los aminoácidos se indican por el código de tres letras.

Aminoácidos sin carga: Gly, Ala, Val, Leu, Ileu, Gln, Asn, Met, Cys, Phe, Tyr, Try, Pro, Ser, Thr.

Aminoácidos cargados: Asp(-1) Glu(-1), Arg(+1) Lys(+1) His(+1)

2.3. Tipos de Hemoglobina.

Si el orden de aminoácidos en la cadena peptídica, difiere de las variedades alfa o beta habituales, o si se deja de formar una cadena, o se produce una recombinación anómala se producen hemoglobinas anormales.

La hemoglobina de un adulto normal contiene dos cadenas alfa y dos beta, su estructura se simboliza $\alpha_2\beta_2$, en circunstancias anormales las moléculas de hemoglobina se reasocian formando oligómeros $\alpha_4, \beta_4, \alpha\beta_3, \alpha_3\beta$.

Se han observado tres tipos de hemoglobinas normales y varias anormales.

Las variedades normales de hemoglobina contienen cinco diferentes tipos de subunidades de globina que existen en la sangre normal en uno u otro estado de la vida. Se designan con letras griegas de la alfa a la epsilon:

Clase	Nombre	Fórmula	Edad en que está presente.
Hb. embrionaria	Gower 1	E_4	Predomina en los primeros 2 meses después del 3º, desaparece.
	Gower 2	α_2E_2	
Hb. fetal	Hb.-F	$\alpha_2\zeta_2$	Predomina en la vida fetal, declina rápido después del nacimiento a menos del 2%.
Hb. adulta.	Hb-A	$\alpha_2\beta_2$	Detectable aun en gestación, predomina postparto.
	Hb-A ₂	$d_2\alpha_2$	

Hb-A: La Hb.A, es la más importante de las hemoglobinas del adulto normal. Las cadenas de polipéptidos de la parte globínica de las moléculas son de dos tipos: dos cadenas alfa idénticas, cada una con 141 aminoácidos. Cada cadena está ligada a un grupo Hem. La molécula es elipsoidal con los cuatro grupos Hem en su superficie donde funcionan combinándose reversiblemente con oxígeno o dióxido de carbono.

Hb.A₂(a₂d₂): La Hb.A₂ constituye del 1.5% al 3.5 % de la hemoglobina del adulto normal. Sus dos cadenas alfa son iguales que en la Hb.A y en la Hb-F.

Sus dos cadenas delta difieren de las cadenas beta en sólo ocho de sus 146 aminoácidos. La determinación cuantitativa ha adquirido importancia ya que en ciertos tipos de talasemia la Hb.A₂ está alterada por elevación.

Hb.A₃ : La Hb.A₃ comprende 5-15% del total de la Hb del adulto. En electroforesis de papel a pH alcalino, se transporta ligeramente más rápido que la HbA. Está caracterizada por un complejo extraglutación en la cadena beta y es probablemente resultado de la edad.

Hb-F : (a₂g₂) Es la hemoglobina principal del feto y del recién nacido. La afinidad aumentada para el oxígeno de la sangre fetal con respecto a la sangre adulta no se debe a la hemoglobina en sí, sino probablemente al medio ambiente de los hematíes .

Desde hace más de 100 años se sabe que la hemoglobina fe-

-tal es distinta de la adulta. Las dos cadenas alfa son idénticas a las de la HbA, y las dos cadenas gamma con 146 aminoácidos, difieren de las cadenas beta. Durante la vida fetal predomina la Hb-F, ya que la producción de las cadenas alfa y de las cadenas gamma es alta. La producción de la cadena beta empieza antes de las 20 semanas de la vida prenatal, de manera que la HbA es del 10% del total entre las 20 y las 35 semanas, y del 15 al 40% a la hora del parto. Después del nacimiento se producen cantidades más pequeñas de Hb-F, a los 4 meses la HbA corresponde al 90 ó 95% del total. Sólo indicios de Hb-F (menos del 0.5%) se encuentran en los adultos.

Hemoglobinas embrionarias: Hb Gower-1 (E_4) y Hb Gower-2 (a_2E_2)

Se han encontrado dos hemoglobinas distintas en los fetos humanos normales con un tiempo de gestación de menos de tres meses, ambas contienen una cadena polipeptídica (E) distinta de las cadenas a, B, g, d. Una vez que la producción de las cadenas gamma haya llegado al máximo en la primera parte de la vida del feto, cesa la producción de la cadena E.

Las Hemoglobinas anormales se distinguen de las normales por la constitución de sus cadenas peptídicas, basta el solo cambio de un aminoácido para que se formen hemoglobinas anormales (Hemoglobinopatías). Estas hemoglobinas se designan con letras del alfabeto: C, D, E, H, I, M, N, O, P, Q, S.

Un ejemplo de hemoglobina anormal, lo constituye la hemoglobina S, que produce la denominada anemia falciforme; difiere de la hemoglobina normal en solo un resto aminoácido del de la hemoglobina A, y de ahí que la movilidad electroforética de la hemoglobina de las células falciformes difiera ligeramente de la de la normal.

Existen otro tipo de anormalidades en las hemoglobinas, llamadas talasemias, en las que las cadenas de globina son de estructura normal, pero la tasa de producción de un tipo de cadena polipeptídica es inferior a la normal. Por eso en la electroforésis, las distintas hemoglobinas aparecerán o no, o se verán disminuidas según la producción de la cadena de polipéptidos de la hemoglobina.

Hemoglobinas Variantes Resultantes de la Sustitución de un aminoácido.

Variantes en cadena Alfa.

Nombre	Posición y sustitución	Anormalidades Funcionales
Aida	64(E 13) Asp → Asn	
Ann Arbor	80(F 1) Leu → Arg	U
Atago	85(F6) Asp → Tyr	
Beilinson	igual a L Ferrara	
Bibba	136(H19) Leu → Pro	U
Broussais	90(FG2) Lys → Asn	
Buda	61(E10) Lys → Asn	
Chad	23(B4) Glu → Lys	
Cheasapeake	92(FG4) Arg → Leu	E
Chiapas	114(GH2) Pro → Arg	
Columbia	igual a L Ferrara	
D.St.Louis	igual a G Philadelphia	
D.Washington	igual a G Philadelphia	
Dakar	112(G 19) His → Gln	u
Denmark Hill	95 (G2) Pro → Ala	e
Etobicoke	84 (F5) Ser → Arg	u
Fort Worth	27 (B8) Glu → Gly	
G Audhali	23 (B4) Glu → Val	
G Azuokoli	igual a G Philadelphia	
G Bristol	igual a G Philadelphia	
G Chinese	30 (B 11) Glu → Gln	
G Georgia	95 (G2) Pro → Leu	ue
G Hong Kong	igual a G Chinese	
G Honolulu	igual a G Chinese	
G Norfolk	85 (F6) Asp → Asn	
G Philadelphia	68(E17) Asn → Lys	
G Singapore	igual a G Chinese	
G Taichung	igual a Q Thailand	
Hasharon	47(CD5) Asp → His	u
Hikoshima	igual a Shimonoseki	
Hopkins-2-1	112(G 19) His → Asp	u
I	16(A14) Lys → Glu	A
I Interlaken	igual a J Oxford	
J Abidjan	51(CD9) Gly → Asp	
J Capetown	92(FG4) Arg → Gln	E
J Medellin	22(B3) Gly → Asp	
J Oxford	15(A 13) Gly → Asp	
J Paris	12(A10) Ala → Asp	
J Paris-2	igual a México	
J Rajappen	90(FG2) Lys → Thr	
J Sardegna	50(CD8) His → Asp	
J Tongariki	115(GH3) Ala → Asp	
J Toronto	5(A3) Ala → Asp	
Kagoshima	igual a Norfolk	
Knoxville-1	igual a G Philadelphia	

(Continuación)

Variantes en cadena Alfa

Nombre	Posición y sustitución /	Anormalidades Funcionales *
L Ferrara	47(CD5) Asp → Gly	U
L Persian Gulf	57(B6) Gly → Arg	
Lapin	29(B10) Leu → Val	
M Boston	58(E7) His → Tyr	M
M Gothenburg	igual a M Boston	
M Iwate	87(F8) His → Tyr	M
M Kankakee	igual a M Iwate	
M Osaka	igual a M Boston	
Mahidol	igual a Q (SE Asia)	
Manitoba	102(G9) Ser → Arg	
Memphis	23(B4) Glu → Gln	
México	54(E3) Gln → Glu	
Nishiki	igual a Norfolk	
O Indonesia	116(GH4) Glu → Lys	
O Padua	30(B11) Glu → Lys	
Q India	64(E13) Asp → His	
Q Iran	75(EF4) Asp → His	
Q Thailand	74(EF3) Asp → His	
Rampa	95(G2) Pro → Ser	ue
Russ	51(CD9) Gly → Arg	
Sealy	igual a Hasharon	
Setif	94(G1) Asp → Tyr	
Shimonoseki	54(E3) Gln → Arg	
St. Lukes	95(G2) Pro → Arg	
Sinai	igual a Hasharon	
Singapore	141(HC3) Arg → Pro	
Stanleyville-2	78(EF7) Asn → Lys	
Tagawa-1	igual a Broussais	
Tagawa-2	igual a L Ferrara	
Torino	43(CD1) Phe → Val	Uc
Ube-2	68(E17) Asn → Asp	
Umi	igual a L Ferrara	
Yukuhashi-2	igual a L Ferrara	
Zambia	60(E9) Lys → Asn	

Variantes en cadena Beta

Abruzzo	143(H21) His → Arg	
Agenogi	90(F6) Glu → Lys	c
Bethesda	145(HG2) Tyr → His	E
Borás	88(F4) Leu → Arg	Ue
Brigham	100(G2) Pro → Leu	E
Bristol	67(E11) Val → Asp	Uc
Bryn Mawr	85(F1) Phe → Ser	Ue
Bucuresti	42(CD1) Phe → Leu	Uc
C	6(A3) Glu → Lys	A
Casper	106(G8) Leu → Pro	Ue
Christchurch	71(E15) Phe → Ser	U
D Bushman	16(A13) Gly → Arg	
D Chicago	igual a DPunjab	
D Cyprus	igual a D Punjab	
D Ibadan	87(F3) Thr → Lys	
D Iran	22(B4) Glu → Gln	

(Continuación)

Variantes en cadena Beta

Nombre	Posición y sustitución /	Anormalidades Funcionales *
D Portugal	igual a D Punjab	
D Los Angeles	igual a D Punjab	
D Punjab	121(GH4) Glu → Gln	
Deer Lodge	2(NA2) His → Arg	
Dhofar	58(E2) Pro → Arg	
E	26(B8) Glu → Lys	c
E Saskatoon	22(B4) Glu → Lys	
G Accra	79(EF3) Asp → Asn	
G Copenhagen	47(CD6) Asp → Asn	
G Coushatta	22(B4) Glu → Ala	
G Galveston	43(CD2) Glu → Ala	
G Hsi-Tsou	79(H3) Asp → Gly	
G Makassar	6(A3) Glu → Ala	
G Port Arthur	igual a G Galveston	
G San José	7(A4) Glu → Gly	
G Saskatoon	igual a G Coushatta	
G Szuhu	80(EF4) Asn → Lys	
G Taiwan-Ami	25(B7) Gly → Arg	
G Texas	igual a G Galveston	
Genova	28(B10) Leu → Pro	U
Gifu	igual a G Szuhu	
Hammersmith	42(CD1) Phe → Ser	UC
Hijiyama	120(GH3) Lys → Glu	
Hikari	61(E5) Lys → Asn	
Hirose	37(C3) Try → Ser	E
Hiroshima	146(HC3) His → Asp	E
Hiroshima	igual a Hijiyama	
Hofu	126(H4) Val → Glu	
Hope	136(H14) Gly → Asp	
Hopkins-1	igual a N Baltimore	
I High Wycombe	59(E3) Lys → Glu	U
I Toulouse	66(E10) Lys → Glu	U
Istanbul	92(F8) His → Glu	
J Baltimore	16(A13) Gly → Asp	
J Bangkok	56(D7) Gly → Asp	
J Cambridge	69(E13) Gly → Asp	
J Iran	77(EF1) His → Asp	
J Ireland	igual a J Baltimore	
J Kaohsiung	59(E3) Lys → Thr	
J Korat	igual a J Bangkok	
J Meinung	igual a J Bangkok	
J Taichung	129(H7) Ala → Asp	
J Thailand	igual a J Bangkok	
J Trinidad	igual a J Baltimore	
Jenkins	igual a N Baltimore	
K Ibadan	46(CD5) Gly → Glu	
K Woolwich	132(H10) Lys → Gln	Cu
Kansas	102(G4) Asn → Thr	E
Kempsey	99(G1) Asp → Asn	
Kenwood	143(H21) His → Asp	
Khartoum	124(H2) Pro → Arg	u
Koln	98(FG5) Val → Met	Ue

(Continuación)

Variantes en cadena Beta

Nombre	Posición y sustitución	Anormalidades Funcionales
Korle Bu	73(E17) Asp → Asn	
Liberian-1	igual a N Baltimore	
Little Rock	143(H21) His → Gln	E
Louisville	42(CD1) Phe → Leu	Uc
M Akita	igual a M Hyde Park	
M Chicago	igual a M Saskatoon	
M Emory	igual a M Saskatoon	
M Hyde Park	92(F8) His → Tyr	Mu
M Kurume	igual a M Saskatoon	
M Milwaukee	67(E11) Val → Glu	M
M Radom	igual a M Saskatoon	
M Saskatoon	63(E7) His → Tyr	M
Malmo	97(FG4) His → Gln	E
N Baltimore	95(FG2) Lys → Glu	
N New Haven	igual a J Baltimore	
N Seattle	61(E5) Lys → Glu	
Nagasaki	17(A15) Lys → Glu	
New York	113(G15) Val → Glu	
O Arab	121(GH4) Glu → Lys	
Oak Ridge	igual a D Punjab	
Ocho Rios	52(D3) Asp → Ala	
Olmsted	141(H19) Leu → Arg	U
Olympia	20(B2) Val → Met	E
Osu Christianborg	52(D3) Asp → Asn	
P	117(G19) His → Arg	
Perth	32(B14) Leu → Pro	
Peterborough	111(G13) Val → Phe	Uc
Philly	35(C1) Tyr → Phe	U
Porto Allegre	9(A6) Ser → Cys	A
Rainier	145(HC2) Tyr → Cys	E
Richmond	102(G4) Asn → Lys	a
Riverdale-Bronx	24(B6) Gly → Arg	U
Rush	101(G3) Glu → Gln	U
S	6(A3) Glu → Val	
Sabine	91(F7) Leu → Pro	U
Saint Etienne	92(F8) His → Gln	Ue
St Louis	28(B10) Leu → Gln	U
San Diego	109(G11) Val → Met	E
Santa Ana	88(F4) Leu → Pro	U
Savannah	24(B6) Gly → Val	U
Seattle	76(E20) Ala → Glu	UC
Shepherds Bush	74(E 18) Gly → Asp	Ue
Siriraj	7(A4) Glu → Lys	
Sogn	14(A11) Leu → Arg	u
Southampton	106(G8) Leu → Pro	U
Sydney	67(E11) Val → Ala	U
Tacoma	30(B12) Arg → Ser	u
Taipei	22(B4) Glu → Gly	
Ta-Li	83(EF 7) Gly → Cys	A
Tokuchi	2(NA 2) His → Tyr	

(Continuación)
NombreVariantes en cadena Beta
Posición y sustitución ↙Anormalidades
Funcionales #

Nombre	Posición y sustitución ↙	Anormalidades Funcionales #
Ube-1	Igual a Köln	
Wien	130(H8) Tyr → Asp	U
Yakima	99(G1) Asp → His	E
Yoshizuka	108(G10) Asn → Asp	c
Ypsilanti	99(G1) Asp → Tyr	E
Yukuhashi	Igual a Dhofar	
Zurich	63(E7) His → Arg	Ue

Variantes en cadena Gamma

F Alexandra	12(A9) Thr → Lys	
F Dickenson	97(FG4) His → Arg	
F Hull	121(GH4) Glu → Lys	
F Jamaica	61(E5) Lys → Glu; (136 Ala)	
F Malta	117(G19) His → Arg; (136 Gly)	
F Texas I	5(A2) Glu → Lys	
F Texas II	6(A3) Glu → Lys	

Variantes en cadena Delta

A ₂	16(A13) Gly → Arg	
B ₂	Igual a A ₂	
Bábinga	136(H14) Gly → Asp	
Flatbush	22(B4) Ala → Glu	
NYU	12(A9) Asn → Lys	
Indonesia	69(E13) Gly → Arg	
Sphakia	2(WA 2) His → Arg	

↙ El número secuencial se da con el número en paréntesis

↙ Anormalidades

Funcionales :

Agregación.....A(severa),a(media).

Inestable.....U(severa),u(media).

Afinidad aumentada
por el oxígeno.....E(con eritrocitosis).
e(media).

Afinidad disminuida
por el oxígeno.....C(con cianosis).
c(media)

Methemoglobinemia.....M

2.4. Hemoglobinas en Animales.

Existen variaciones en la secuencia de proteínas homólogas según la especie. La información comprensiva sobre las secuencias de aminoácidos en proteínas homólogas de diferentes especies, ha mostrado que algunos residuos de aminoácidos en posiciones específicas de proteínas homólogas, son relativamente invariantes en todas las especies y son idénticos o reemplazados solo infrecuentemente. Las proteínas homólogas también contienen residuos variables, generalmente la mayoría de esos residuos en la cadena, la cual varía más ampliamente de una especie a otra y en la cual varios aminoácidos diferentes pueden ser reemplazados por otros.

Los términos homología y analogía son también aplicados a las estructuras moleculares de sus constituyentes celulares. Las moléculas de Hemoglobina de diferentes especies de vertebrados, contienen similares secuencias de aminoácidos que pueden llamarse moléculas homólogas. En contraste, hemoglobina y hemocianina son moléculas análogas por su función similar (Transporte de Oxígeno), pero difieren considerablemente en su estructura molecular.

Entonces la hemoglobina de animales superiores está relacionada pero no es idéntica. En invertebrados, otros pigmentos pueden tomar el lugar y función de hemoglobina.

La hemoglobina se encuentra distribuida en el Phylum del reino animal, llegando a ser más importante en los más evolucionados. En ellos, el pigmento se encuentra como miohemoglobina en músculo, y como hemoglobina en eritrocitos.

En los vertebrados más primitivos, el músculo del corazón es prácticamente el único músculo que contiene miohemoglobina. En ninguno de los vertebrados se encuentra normalmente la hemoglobina libre en la sangre.

En invertebrados es raro la presencia de hemoglobina en músculo, hasta ahora sólo ha sido reportado en unas cuantas especies. En *Gastrophilus larvae* el pigmento se encuentra en células especiales conocidas como células traqueales las cuales probablemente se originan de cuerpos celulares grasos. Existe una variación en el sistema circulatorio, esa hemoglobina se halla a veces en corpúsculos y a veces en solución física como hemocianina.

Se han observado otros pigmentos como Clorocruorina, Eritrocruorina, en invertebrados que difieren de las globinas de mamíferos. (Ver Esquema en la siguiente página). Por otro lado, han sido determinados los residuos N-terminales de hemoglobinas de un número de diferentes especies de animales superiores. Considerables diferencias de las especies, fueron evidentes por la naturaleza de los residuos N-terminales, y en el número de cadenas de polipéptidos presentes.

En el caso de Hemoglobina de caballo que se ha estudiado más en detalle, hay residuos valil-N-terminales (seis), y así seis cadenas de polipéptidos abiertos. Es interesante notar que el contenido de cistina, no es más que tres residuos, así que algunos de las cadenas deben estar unidas por otro tipo de unión cruzada.

Esquema. (Distribución Biológica de Hemoglobinas).

Phylum	Pigmento
Protozoarios	Hemoglobina en el citoplasma
Nemátodos	Eritroerutorina en la cavidad del cuerpo Miohemoglobina en la pared del cuerpo
Anélidos	Eritroerutorina en el plasma Cloroerutorina
Artrópodos y Crustáceos	Eritroerutorina en el plasma
Insectos	Eritroerutorina en el plasma
Moluscos	Eritroerutorina en el plasma Eritroerutorina en corpúsculos Miohemoglobina
Cordados y Protocordados	Hasta ahora no se ha encontrado ni hemoglobina ni mioglobina
Vertebrados	Hemoglobina en corpúsculos Miohemoglobina (presente en los ordenes inferiores como peces, anfibios y reptiles, la mayoría en músculo cardíaco)

La Hemoglobina de caballo es aproximadamente cuatro veces la medida de la mioglobina, teniendo un peso molecular de 66 000, y formada por cuatro cadenas idénticas químicamente en pares: dos alfa-y dos beta. Cada cadena tiene un grupo heme y uno sulfhidrilo fácilmente reactivo en la cadena beta y uno sulfhidrilo fácilmente reactivo en la cadena alfa. La molécula tiene una forma esferoidal aproximadamente, de dimensiones 64X55X50-Å. Las cuatro cadenas densas corresponden obviamente a las cadenas separables químicamente. Los grupos heme se encuentran en cavidades en la superficie formada por pliegues en las cadenas de polipéptidos. Las cuatro subunidades están arregladas casi tetraédricamente.

Hemoglobina	Peso Molec.	Residuo N-terminal	Núm. por molec.
(Caballo, Asno)	66 000	Valina	6
(Buey, Borrego, Chivo)	66 000	Valina Metionina	2 2
Hemoglobina -Adulto-	66 000	Valina	5
-Fetal-	66 000	Valina	2-3

Patrones en la síntesis de Hemoglobina relacionados a cambios en las líneas celulares eritropoyéticas durante el desarrollo fetal.

Especie	Embriónica	Línea Celular	Definitiva
	Hemoglobina		Hemoglobina
Ratón	E1 (XY) E11(aY) E111(aZ)		A(alfa, Beta)
Humano	Gower 1 (E) Gower 11 (aE) Portland 1 (E,g)		F(a, gamma) A(a, B) A(a, B)
Conejo	E 1 (XE) E11 (aE)		A(a, B)
Pollo	E P (aA?)		A(a?) D(a?)
Rana	Tipo I Tipo II		I II

2.5. Separación e Identificación de Hemoglobinas.

(Humana y Animal).

Con lo visto en los puntos anteriores, es claro que podemos aprovechar las diferencias de las hemoglobinas en favor de la identificación de las manchas de sangre como un auxiliar valioso en este problema. Uno de los métodos más adecuados en este caso es la Electroforesis. La técnica usa la migración de moléculas cargadas en un campo eléctrico. La migración puede ser al ánodo o al cátodo según la medida, forma, carga neta de la molécula, y la naturaleza del medio usado. La carga puede ser alterada por cambiar el pH de la solución, y esto hace posible seleccionar las condiciones óptimas para la separación electroforética de diferentes hemoglobinas.

Las moléculas de la hemoglobina en una solución alcalina tienen una carga negativa neta y se mueven hacia el ánodo a una velocidad proporcional a la fuerza de su carga.

Una gran variedad de métodos son apropiados, ellos difieren uno del otro en la naturaleza del medio de soporte, el buffer, el aparato y otros detalles metodológicos. Las técnicas basadas en papel filtro como medio de soporte, fueron las primeras que se usaron para electroforesis, sin embargo el método presenta resolución más pobre y es incapaz de demostrar la Hb-A₂, además de la dificultad de cuantificar por este método.

La electroforesis en gel de almidón rápido llegó a ser el-

-método de elección en laboratorios de investigación por su sensibilidad y su superior definición de zonas. Mucha de la información adecuada respecto de las propiedades electroforéticas de las variantes de la hemoglobina, se obtiene con el método del gel de almidón. No obstante también es laborioso, y el tiempo de migración es largo para la mayoría de los laboratorios de rutina.

Los más sencillos y comunes emplean membranas de acetato de celulosa, para la cual muchos tipos de equipos son adecuados comercialmente.

Segun el método la técnica podrá hacerse cuantitativa por elución de las zonas, y medirse espectrofotométricamente, o cualquier otro método especial.

En el siguiente capítulo se presentan las técnicas de electroforésis en detalle, de las que se pueden utilizar en la identificación de la sangre, dandose una especial extensión en la técnica de gel de almidón, por considerarse la de mejor resolución, pero no se puede prever la manera exacta en que se usen las técnicas ya que esto dependerá absolutamente del caso que se trate, ya que puede ser suficiente el uso de una sola técnica, segun lo requiera la averiguación, o en última instancia del tiempo con el que se cuente y el material dinero, etc.

Aparte de distinguir si la mancha es de sangre y si fuera el-

caso, que en la tipificación sanguínea entre víctima y sospechoso fueran del mismo grupo, no sería posible obtener una distinción entre ambos, a menos que se obtenga otra información por otros métodos y como sería, un diferente movimiento electroforético de la hemoglobina y otras pruebas adicionales que pueden hacerse, como elución de una banda y su cuantificación, y distinguir una hemoglobina de otra como sería la Hb-A de la Hb-F que sería de un recién nacido o la Hb-A₃ que se cree es producto de la edad, etc. O alguna patológica Hb-S, Hb-C, Hb-D, Hb-E, Hb-G, etc. en este último caso por ejemplo se puede identificar Hb-S de la anemia falciforme en las manchas de uno de los involucrados, suponiendo que se sospechara o no de ésta anemia (podría sospecharse de ello en una persona de color), entonces la electroforesis lo detectaría inmediatamente. Así deben intentarse semejantes búsquedas o diferentes. Sin embargo el objetivo de nuestro estudio se encamina a la identificación del origen de la mancha de sangre, esto es, identificar si se trata de sangre humana o de animal siendo esto muy importante en la averiguación. Esto es posible porque como hemos visto al hablar de Hemoglobinas de Humano y Animal, tienen estructuras análogas o similares pero nunca idénticas, y esto obviamente produce movibilidades diferentes en el corrimiento electroforético basándose en el fundamento del método.

También se ha querido presentar en este capítulo la posibi-

-lidad de existencia de hemoglobinas anormales para evitar confusiones en el caso de presentarse durante el corrimiento, aunque el problema se minimiza ya que se deben correr estándares de hemoglobinas humanas normales o de algún animal en el caso de sospechar de alguno en especial, pero siempre junto con el hemolizado de humano.

CAPITULO III

3. TECNICA DE ELECTROFORESIS.

3.1. Introducción.

3.2. Buffers.

3.3. Electroendósmosis.

3.4. Homogeneidad del Gel.

3.5. Equipo.

3.6. Temperatura.

3.7. Fuente de Poder.

3.8. Colección de muestra y preparación
del Hemolizado.

3.9. Electroforésis en Gel de almidón.

3.9.1. Preparación de la placa.

3.9.2. Buffer para el Gel.

3.9.3. Preparación del Gel.

3.9.4. Aplicación de muestras.

3.9.5. Conexión en el tanque.

3.10. Electroforésis en papel.

3.10.1. Reactivo.

3.10.2. Procedimiento.

3.10.3. Interpretación.

3.10.4. Equipo.

3.11. Electroforésis en Gel de agar.

3.12. Electroforésis en Acetato de Celulosa.

3.12.1. Fundamento.

3.12.2. Reactivos y Equipo.

3.12.3. Procedimiento.

3.12.4. Interpretación.

3.13. Resultados.

3. TÉCNICA DE ELECTROFORESIS.

3.1. Introducción.

Muchos aspectos teóricos de la electroforesis se omitirán ya que existe ya mucho escrito al respecto, y sólo se considerarán los factores que son realmente modificados en la parte práctica.

3.2. Buffers.

Los buffers deben ser hechos siempre de reactivos analíticos y elaborados cuidadosamente. Los reactivos de grado técnico pueden contener impurezas que afectarían ciertas proteínas, o afectarían desfavorablemente la actividad de enzimas que pudieran desearse detectar. Un ejemplo de esto fue el uso de TRIS (tris-hidroximetil-metilamina) grado técnico que no era indicado para buffers. Esto ocasionó una mala separación en el caso de proteínas del suero; esta falla fue inmediatamente rectificada por cambiar el TRIS producido especialmente para buffers.

Los buffers hechos sin cuidado afectarán el pH y la movilidad del material bajo investigación. Habiendo pesado los componentes necesarios se deben llevar al volumen requerido con agua destilada, y el pH debe chequearse siempre.

Si un buffer va a permanecer a temperatura ambiente más de algunas semanas, es recomendable incluir un bacteriostático como Timerosal (merthiolate) en 1 parte por 10 000.

Un buffer como el de histidina (para adenilato cinasa), es particularmente sensible al crecimiento bacteriano que afecta la calidad de la separación. El bacteriostático usado no debe alterar el pH o la fuerza iónica del buffer.

Se ha visto que se usan innumerables sistemas de buffers diferentes para varias investigaciones, y se ha intentado obtener un sistema de buffer universal, aplicable a todas las investigaciones. Hasta hoy no se ha logrado. Los intentos que se han acercado más a la idea, aun no producen tan buenos resultados como el uso de sistema buffer individual.

Se observa que los buffers se deterioran con el tiempo, y por eso se conservan a 0-2°C. en refrigeración. A la primera sospecha de mala separación el buffer se descarta y se prepara un nuevo lote.

Los buffers se preparan normalmente a la temperatura ambiente (18-20°C), sin importar la temperatura a la que serán usados, y todos los datos de pH dados para buffers son a esa temperatura.

La fuerza iónica del buffer es la consideración restante. Si la fuerza iónica del buffer del gel es demasiado alta se produce una corriente alta para un voltaje dado, que concluye en: (1) sobrecalentamiento del gel y (2) mala separación de los componentes. El sobrecalentamiento puede

-romper el gel, precipitar proteínas causar pérdida de la actividad enzimática, y realzar la difusión.

Las cargas de las moléculas bajo exámen atrae iones de carga opuesta del electrólito formando una doble capa que tiende a oscurecer o enmascarar la carga en la molécula. Esta capa puede variar en espesor y esto depende de la fuerza iónica (μ) del electrólito o el buffer.

Asi con un electrolito de baja (μ), la capa formada será gruesa pero difusa, pero con una alta (μ) la capa es delgada pero densa, y la carga de la molécula se enmascara rapidamente no dando oportunidad para que el campo eléctrico tenga su efecto sobre la molécula.

Con valores decrecientes de fza.iónica(μ), el espesor de la doble capa aumenta .A baja(μ), la cual es frecuentemente usada en electroforesis, una variación en (μ) puede producir una diferencia considerable.

Una definición de fza.iónica(μ) se da en la siguiente ecuación:

$$(\mu) = \frac{1}{2} \sum Mv^2$$

donde:

M = Concentración Molar

V = valencia

de cada ión o radical.

\(\Sigma\) = sumatoria

La movilidad electroforética, como un resultado de este doble efecto de capa, es inversamente proporcional a la raíz de (μ)

$$\text{Movilidad} = \frac{1}{\sqrt{\mu}}$$

El orden de fza. iónica que se usa, está entre 0.1 y 0.01. Las movilidades relativas de una proteína debidas a cambios en (μ), pueden ser calculados por ejemplo :

cuando: (μ) = 0.1

$$\frac{1}{\sqrt{0.1}} = 3.162$$

mientras que (μ) = 1 Movilidad = 1

De ésto se deduce que bajar (μ) del buffer, es lo mejor.

Sin embargo hay otros factores involucrados como son:

- a. Precipitación de las proteínas que son corridas. Algunas proteínas requieren una alta fza. iónica, para mantenerse en un estado soluble o móvil.
- b. La inmunoprecipitación requiere una fza. iónica alta para la agregación de los complejos antígeno-anticuerpo, en un precipitado visible.
- c. Al bajar la fza. iónica el espesor de la doble capa, aumenta la distancia de repulsión conduciendo a una mayor difusión de las bandas.

Así es claro que la elección de la fza. iónica del buffer es un requerimiento, lo mejor es probar una serie de fzas. iónicas para cada buffer, para ver cual es el que trabaja mejor para las condiciones de laboratorio.

Por ejemplo en el sistema 6-fosfogluconato deshidrogenasa el buffer se diluye 1:15 para uso en el gel, ya que esta dilución es la que trabaja mejor en el laboratorio Forense, y otro tipo de laboratorios usan diluciones 1:10 ó 1:20.

Se recomienda que si las separaciones realizadas no son tan buenas como debían ser, un pequeño cambio de fza. iónica del buffer del gel debe probarse, y adoptar el más apropiado a las condiciones individuales.

3.3. Electroendosmosis.

La electroendosmosis es una función particular del sustrato o medio que se esté utilizando y variará de lote a lote del mismo medio. También variará con el pH y la fuerza iónica del electrolito que se use .

En un electrolito dado el medio de soporte, tal como el agar, el en si mismo llevará alguna carga en sus moléculas. Y cuando se aplica el campo eléctrico, el agar tenderá a moverse al ánodo. Esto es prácticamente imposible, y así ocurre un movimiento del agua en la dirección contraria. Este flujo del agua es en un pH ligeramente alcalino y sucede en la mayoría de los geles, en dirección contraria a las proteínas, que tienen que ir contra la corriente. Esto detiene su movilidad aparente y de hecho proporciona a la gamma globulina un movimiento hacia el cátodo en lugar de su verdadero movimiento ligeramente hacia el ánodo.

Ello tiene sin embargo ciertos riesgos si la fuente de abastecimiento de agua en el gel en el extremo del ánodo está completamente restringido, el gel se contraerá en ese lado. Y esto no sólo distorsiona mecánicamente el gel, sino que incrementa la fuerza iónica en esa área, aumentando la conductividad y todas las consecuencias que esto acarrea.

Normalmente la electroendósmosis está dentro de límites tolerables y no sólo es posible trabajar, si está presente, sino que también puede ser usada como indicador; si la electroendósmosis es excesiva habrá que reajustar todo el sistema.

3.4. Homogeneidad del Gel.

El campo eléctrico en una electroforésis está determinado por el voltaje a través de sus extremos y la naturaleza misma de la placa. Esta placa debe estar construida en forma que el campo sea homogéneo a través de la placa.

En sistemas de buffers discontinuos, habrá por supuesto una heterogeneidad en el enlace ión acarreador ión acarreado. Esto se arrastra a través del gel y mejora la separación. La heterogeneidad a mantener es algo mínimo que no afecta a todo el gel sino parte de él solamente.

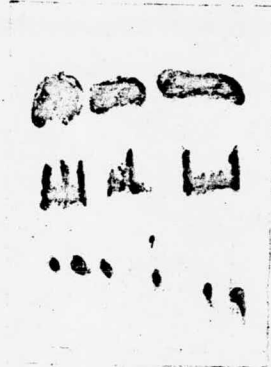
La discontinuidad en la conductividad, parece ser la fuente de error más común. Si una muestra se inserta en él con un papel filtro y los sitios del gel donde esta la abertura no encierran la muestra correctamente, los resultados serán erróneos. El uso de una muestra líquida o en gel, insertada en un volumen grande, puede causar un gran cambio en la fuerza iónica en ese punto, y causar efectos de curvatura en el corrimiento de la muestra. El corrimiento aparece más arriba o más abajo que en el centro de la muestra.

Si se sigue el concepto de alteración mínima del gel al insertar la muestra, entonces las irregularidades introducidas, serán mínimas y estarán sujetas a límites tolerables.

La heterogeneidad también puede introducirse por un gel



Gel mal preparado
No-Homogéneo.



Contacto discontinuo
en los puentes.



Alta fuerza iónica de
de la muestra a la
derecha.



Discontinuidad en el
gel a la derecha.

Fallas de la muestra
en el gel.

-mal preparado, por ejemplo un agar incompletamente fundido antes de vertirlo, o en un gel de almidón con grumos.

3.5. Equipo .

Existe una amplia variedad de equipos costosos en el mercado. El equipo de electroforésis es más complejo y costoso para las técnicas actualmente usadas en el laboratorio forense, y descrito en secciones posteriores.

Si se requiere de una cuidadosa cuantificación de los componentes de una electroforetograma, entonces se requiere de este tipo de equipo.

Tanques. Cuando este trabajo comenzaba en Inglaterra, los más útiles y adaptables tanques en el comercio, se pensaba que era el tanque "Kohn", un tanque fabricado por "Shandon-Scientific Company. Este tanque era capaz de, con la ayuda de accesorios, usar papel, acetato de celulosa, gel de sílica o alúmina, agar, gel de almidón, inmunolectroforésis.

Pero surgieron dos problemas, uno es que el uso de los tanques requería un gran desembolso de capital, y otro fue la introducción de placas de enfriamiento abajo del gel y entonces se requería de un tanque diseñado especialmente para eso. Así el tanque "Shandon" fue inadecuado. (Esta compañía ahora fabrica tanques con placas de enfriamiento adecuadas que requieren sólo una pequeña modificación en la tapa.).

La solución en el Laboratorio de Ciencia Forense, fue designar un tanque que tuviera los requerimientos del laboratorio. Las partes se compran y se cortan a la medida de una

pieza de 0.46cm de espesor de material "Perspex".

Se hacen los hoyos necesarios y se ensamblan las partes.

Los tanques probaron ser tan buenos como uno comercial.

Las partes requeridas se enlistan abajo.

Las siguientes piezas de "Perspex" de 0.47cm. de espesor serán requeridas:

a. Base:

1 de 26.67cm por 25.4cm.

4 de 25.4cm por 6.35cm.

3 de 25.4cm por 2.54cm, 2 con hoyos de 0.63cm. para el contacto con el buffer.

b. Tapa:

1 de 26.67cm por 27.94cm.

4 de 26.67cm por 2.54cm.

Varios accesorios del tanque pueden hacerse o comprarse como las partes laterales del aparato, y los accesorios de Inmuno-electroforesis como platinas para portaobjetos y el marcador del origen de la muestra, soportes del tanque y placas de enfriamiento si son necesarias. (el tanque puede usar los accesorios del tanque Shandon Kohn.)

Es mejor por experiencia, montar al menos un tanque para cada tipo de examen que se vaya a usar.

3.6. TEMPERATURA.

El control de la temperatura durante un corrimiento es de gran importancia en muchos casos. Cuando se hace a baja temperatura, reduce y da una gran claridad de separación que la obtenida en altas temperaturas. En los sistemas enzimáticos, el mantener a una temperatura baja constante, parece ser de vital importancia para un buen trabajo cualitativo.

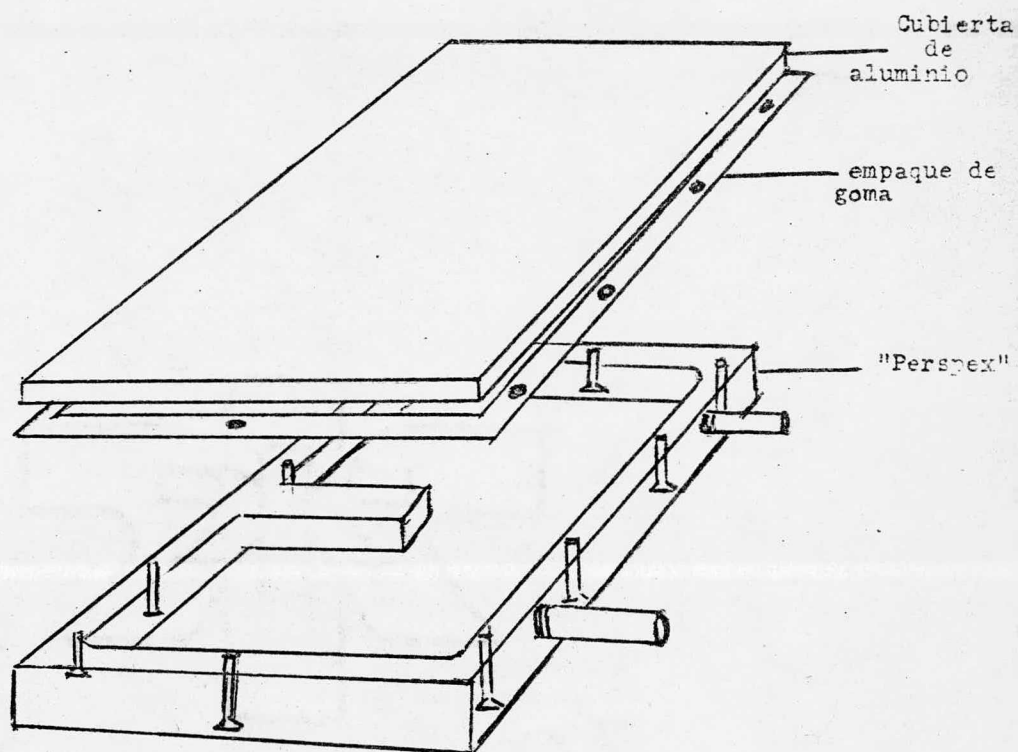
El disipar el calor cuando se forma por la corriente en la placa, reduce los efectos de las heterogeneidades mencionadas antes. El más eficiente control de la temperatura ha sido por placas metálicas, de superficie de enfriamiento que están en la forma de cajas planas por medio de las cuales el agua se bombea cuando cambia la temperatura.

Es difícil comprar una placa de enfriamiento satisfactoria a la medida correcta, aquí se describe una. Las medidas sirven para el tanque previamente descrito, y también ajustan a la medida de las placas de gel que se tomaron como estandar.

Aluminio 21.59cm. por 16.1cm. por 0.63cm.

"Perspex" 21.59cm. por 16.51cm. por 1.9cm.

empaquete de caucho.



Construcción de la placa de enfriamiento.

3.7. FUENTE DE PODER.

Es difícil definir las fuentes de poder adecuadas, porque esto depende del número del número de placas que se corren a la vez. Lo que se puede decir es que si el voltaje y los miliampers obtenidos, son adecuados para un laboratorio determinado, entonces será el apropiado. La seguridad es una de las consideraciones fundamentales, Las mejores fuentes de poder usadas, han sido las unidades Shandom-Vokam(0 a 300 volts, 0 a 80 miliampers). Hay sin embargo, muchas otras de buena calidad.

La mayoría de las fuentes son innecesariamente de alto precio y también innecesariamente complejas, para la mayoría del trabajo que se requiere. Una fuente de poder simple de voltaje fijo, puede fácilmente construirse de piezas de repuesto de radio o T.V.

El valor y tipo de componentes variará con la fuente de poder de voltaje requerido, el transformador, y la carga de la fuente.

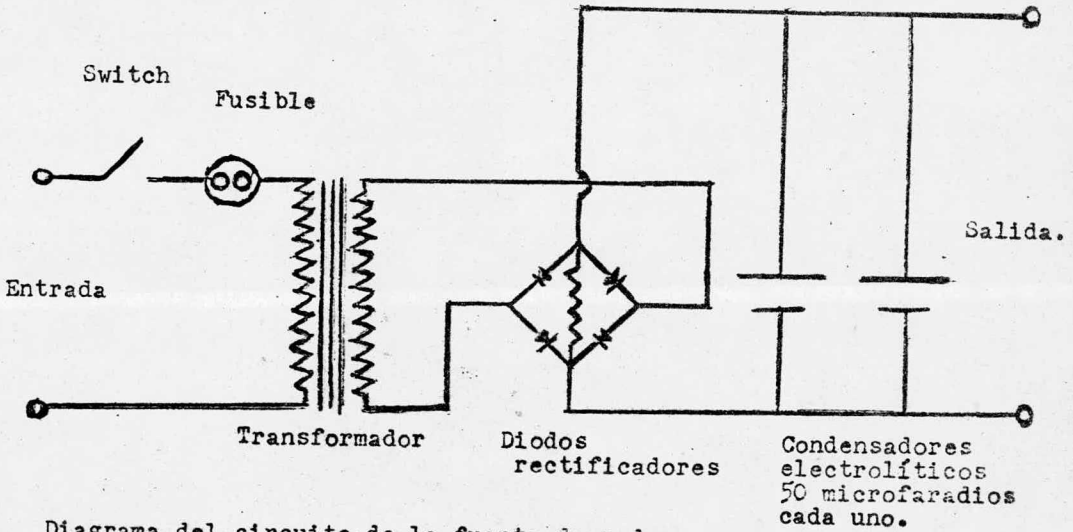


Diagrama del circuito de la fuente de poder.

3.8. COLECCION DE MUESTRA Y PREPARACION DEL HEMOLIZADO.

3.8.1. Colección de muestra.

En la mayoría de los crímenes con violencia, es importante y fundamental que se tome una muestra de sangre. En el caso de la víctima, debe tomarse una muestra ya sea que este viva o muerta, y en éste último caso es mejor tomar mucha muestra ya que si se quiere más tarde, ya no será posible hacerlo. Se toman no menos de 10 a 20 ml. Dependiendo del caso sospechado y del tiempo transcurrido después de la muerte en su caso, será la muestra, ejemplo en un accidente automovilístico se haría entre otras pruebas, una determinación de alcohol en sangre.

En un principio puede parecer no necesaria la toma, pero tal vez más tarde en la investigación sea vital, pero demasiado tarde para tomarla.

También deberá tomarse sangre del sospechoso para comparar con la sangre en cuestión. Para la mayoría de los propósitos es suficiente 1 ó 2 gotas de la punta de un dedo, sólo en casos de intoxicación, se toma sangre del brazo.

Así pues la sangre puede hallarse en escenas de violencia como asaltos, raptos, crímenes, etc. en la víctima, en la escena del crimen, en el sospechoso, en algún arma, etc. y es necesario considerar la distribución y forma de las manchas de sangre antes de proceder a la toma de la muestra, pues esto ayuda mucho a interpretar y reconstruir detalles del crimen o evento que produjo el sangrado, y la posición en el momento de arrojar la mancha y la porción del cuerpo de donde proviene.

Las muestras líquidas se pueden tomar en un tubo de ensayo seco y limpio con un gotero o una pipeta. El tubo se coloca en un recipiente frío. El residuo de la muestra líquida se seca al aire o en una zona de un ventilador, y entonces se trata la muestra como a las muestras secas.

Las muestras secas se pueden encontrar en objetos los cuales deben llevarse al laboratorio, y si se trata de un objeto no removible se toma una muestra representativa de la zona manchada y además de una zona no manchada si se trata de un material poroso, como control.

Cuando se trabaja con muestras de sangre o lisados, las inserciones usadas para la mayoría de las técnicas, se hacen con tiras de algodón de 8 a 10 mm de largo, o con papel filtro Whatman. Para el algodón se requiere de tres capas por ser delgadas.

Generalmente es simple trabajar con ropa manchada de sangre, se ocupa una hilada o fibras de la ropa manchada. Se requiere en la mayoría de las veces pero según el sistema a estudiar, remojar en solución salina o bien en el buffer del gel o sistema a usar.

En algunos materiales manchados que sean muy porosos, puede ser mejor raspar la muestra sobre un recipiente, antes de intentar limpiarla con el inserto de algodón, porque podría absorber líquido del algodón sin formar solución con la mancha de sangre en el inserto.

Es útil sostener el inserto de algodón con fórceps de relo-

-jero, cuando se recoge una mancha de una superficie o cuando se inserta en el medio.

La hemoglobina y sus derivados deben ser extraídos de las manchas de sangre para la aplicación de los métodos de su estudio.

Las manchas frescas o no muy viejas las cuales contienen oxihemoglobina o methemoglobina (un producto de oxidación donde el Fe es 3^+), se ponen en un poco de solución salina isotónica, y si es necesario se dejan decolorando en el refrigerador de 2 a 12-24 hrs. y la solución tome un color rojizo o café de variable intensidad. El aceite o la grasa en una mancha interfiere considerablemente con la solubilidad de la mancha de sangre, y debe cepillarse con un poco de eter. Para manchas de sangre más viejas, en las cuales está presente hematina insoluble en agua deben emplearse solventes particulares. Puede emplearse soluciones de hidróxido de potasio de 1 a 5 N, que son las más apropiadas. Una cuidadosa neutralización con HCl debe efectuarse antes del análisis. Para separar compuestos de hematina y antígenos del suelo y polvo, y para concentrar soluciones muy diluidas, se recomienda un método propuesto por Kirk e independientemente por Schaidt. Una tira de papel Whatman No. 1 de 1 X 25 cm, se corta en punta en un extremo. El otro extremo se sumerge en la solución a ser concentrada o en el material remojado con salina, se deja ascender hasta que el pigmento se concentra en la punta del papel. Si cuando ha migrado la solución la -

-mancha aparece aun ligeramente coloreada, debe añadirse salina y efectuarse un nuevo ascenso. El papel se seca al aire y por un descenso con salina, toda la muestra acumulada en la punta se eluye en una forma concentrada.

3.8.2. Preparación del Hemolizado.

Cualquier método que se use, las distancias de migración de hemoglobinas desconocidas, se comparan con varias hemoglobinas conocidas que se incluyen en el corrimiento.

Los controles pueden obtenerse en forma liofilizada comercialmente, y reconstituirse con buffer Tris-EDTA/Bórico a ph 9.1, requiriéndose de cada uno respectivamente: 16.1 g, 1.56 g (sal disódica), 0.92 g, y agua destilada 1000 ml. O bien preparar la solución de hemoglobina como sigue:

1. Si la sangre ha sedimentado, quite el plasma sobrenadante.

2. Tome 0.5 a 1 ml de sangre completa o, si se ha sacado el plasma, ponga 0.2 a 0.5 ml de células sedimentadas en un tubo de centrifuga (el volumen de las células no es importante), suspenda las células en 10 a 15 ml de solución salina isotónica.

3. Centrifuge a 5°C por 10 a 15 min a 900 X g.

4. Aspire el sobrenadante salino y deseche.

5. Añada 9 volúmenes de agua destilada fría por 1 volumen de células.

6. Añada 0.2 ml de xileno o tolueno. Resuspenda las células con un palillo y mezcle cuidadosamente (si se desea obtener hemoglobinas inestables como la H que se desnaturaliza en este paso, entonces se omite éste).

7. Centrifuge a 1600 X g al menos 15 min a 5 °C.
8. Aspire y descarte el sobrenadante y el xileno o tolueno.
9. El hemolizado claro que se halla entre el sobrenadante y el precipitado, se puede transferir con una pipeta, para su inmediato uso en electroforésis, o conservarse para cortos intervalos, a 5°C, ó a 0°C o menos para estudios subsecuentes.

Micrométodo.

1. Llene 1 ó varios tubos de microhematocrito (capilares) - heparinizados, hasta las dos terceras partes con sangre, permitiendo que entre hacia el lado no marcado.
 2. Seque por afuera el tubo.
 3. Incline el tubo de manera que la sangre fluya hacia el lado marcado.
 4. Ponga $\frac{1}{4}$ pulgada de saponina en el tubo y selle el lado marcado.
 5. Centrifuge el o los tubos en una centrifuga para microhematocrito, tape y centrifuge a 10 000 rpm por 3 a 5 min.
 6. Quite la tapa, conservando un dedo humedecido sobre el extremo del tubo.
 7. Aplique la primera gota de sangre sobre el papel filtro humedecido o sobre el medio que sea usado.
- Si la gota no se forma rápidamente, use un alambre delgado para liberar el estroma que se forma en lo alto de la porción de la solución de hemoglobina.

3.9. PREPARACION DEL GEL DE ALMIDON (CAPA). ELECTROFORESIS EN GEL DE ALMIDON.

3.9.1. Preparación de la placa.

La placa de vidrio de $8\frac{1}{2}$ pulg. (21.59cm) por 6 pulg. (15.24cm) se hace en un molde por adherir dos fajas de vidrio de $\frac{1}{4}$ de pulg. de ancho (0.63cm.) y 3 mm de espesor, al perímetro de la parte alta de la superficie de la placa, con grasa silicona - M.S.4.

3.9.2. Buffer para el Gel (pH 8.65)

El buffer para el gel contiene lo siguiente:

TRIS	9.196 g
Acido cítrico	1.05 g
Agua destilada	1 litro

3.9.3. Preparación del Gel.

Se colocan 180 ml del buffer del gel en un matrás de un litro y se añaden 18 g de almidón hidrolizado.*Esta mezcla se calienta en un mechero de bunsen, agitando y meneando continuamente. Llegará a ser espeso y es esencial la agitación en ese punto. Posteriormente se hará claro y soluble cuando la ebullición vaya a comenzar. Después de una ebullición muy breve, unos segundos, se retira de la flama y se continúa la agitación y el meneo.

Para quitar burbujas se conecta el matraz a la bomba de agua hasta que la mezcla hierve y llega a ser bastante clara y libre de burbujas. Entonces se vacía en el molde que se hizo

-como se describió previamente. El molde debe estar puesto en una superficie nivelada, antes de vaciarle el gel de almidón.

La mezcla se enfría a la temperatura ambiente, y se le pone una cubierta

3.9.4. Aplicación de muestras.

La cubierta se retira, y se traza una línea recta sobre el gel, paralela a uno de los lados más cortos de la placa a unos 6.35 cm del cátodo. Una hoja de rasurar de 7 a 8 mm de extensión, se inserta verticalmente hacia la parte de arriba de la placa. Una pieza de papel filtro Whatman de 3 MM de 5 por 8 mm aproximadamente, se remoja en la muestra. Éste se coloca donde está la navaja y esto cubre el gel. Se retira la navaja y se efectúa la siguiente ranura a una distancia corta, y se inserta la siguiente muestra. Usando ésta medida de muestra, la distancia entre las muestras, sería de $\frac{1}{2}$ cm ó más. Una vez llenada la placa de ésta manera puede transferirse al tanque apropiado.

3.9.5. Conexión en el tanque.

El gel se conecta al tanque, el cual ha sido llenado con el buffer, por medio de esponjas (de Spontex), o con 6 tiras de papel filtro (3 MM) en toda la extensión del gel. Éstas deben tocar el gel aproximadamente 1 cm. Se coloca la cubierta. La fuente de poder se conecta al tanque, se enciende y se ajusta a un voltaje de 100 volts. Éste es el voltaje a-

-decuado en un corrimiento en un cuarto frío a 4°C .Si el corrimiento es a temperatura ambiente el voltaje sería de 60 volts.El corrimiento puede ser toda la noche (15 a 17- horas).

*** Preparación del almidón soluble.**

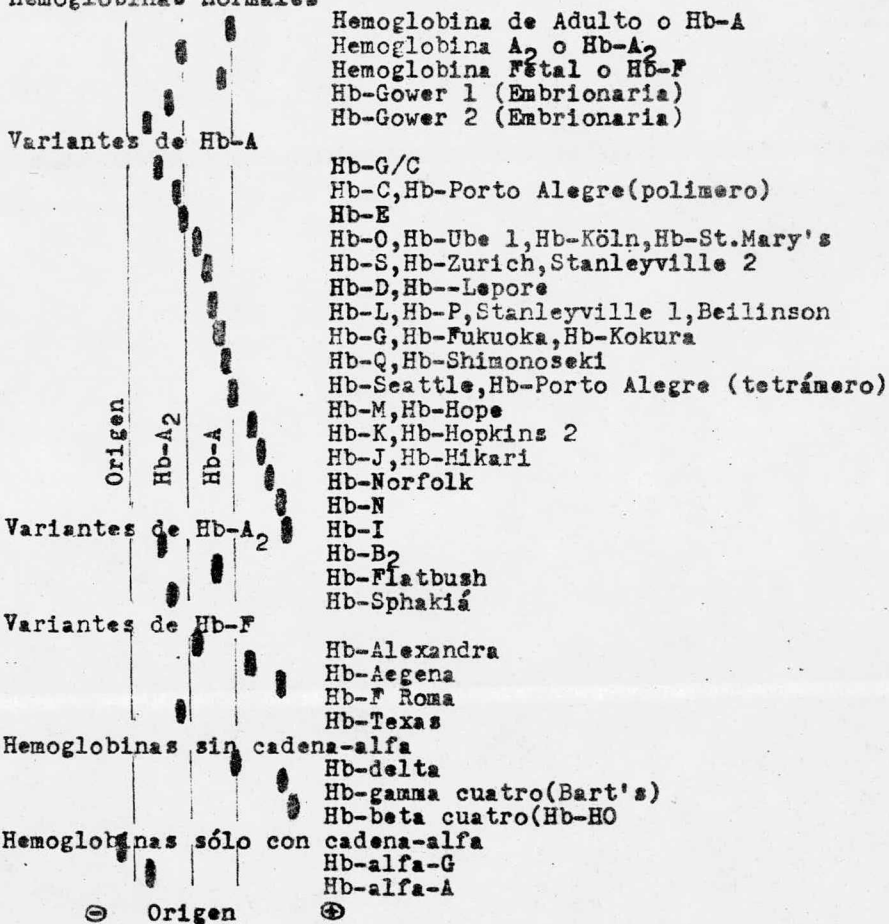
Colocar en un matraz 300g de almidón de papa, en otro 600 ml de reactivo de acetona (grado reactivo) al que se añade la cantidad necesaria de HCl 12N(normalmente 6-10 ml de HCl 12 N por cada 300 g de almidón.).Ambos matraces se dejan en incubación a 37°C para equilibrar la temperatura.Se mezclan cuidadosamente los contenidos de ambos matraces y se deja a 37°C por 15 min.La hidrólisis se para por añadir solución acuosa molar de acetato de sodio en exceso de la cantidad equivalente de Ac. clorhídrico;se agita vigorosamente.El almidón se filtra en un Buchner y se lava con agua destilada.Para el acetato que aun quede,se resuspende el almidón en agua destilada por una noche,y entonces se suspende en el buffer que se usa para el gel,dejando asentar,y agitando otra vez.Después de nuevos lavados con agua destilada en un buchner,el almidón se deshidrata en acetona.El almidón se remueve del buchner y se suspende en acetona (puede usarse un matraz cónico de 5 l).Se decanta la acetona después de sedimentar el almidón, se repite el proceso dos veces (la acetona puede usarse para esto mas de una vez).El almidón suspendido en la acetona

se filtra en un buchner después de lo cual se extiende en una tira de papel filtro larga, y se seca en la noche a la temperatura ambiente (después de secar a 45-50°C, el almidón puede contener aun granulos pequeños duros.)

El alidón está listo para preparar el gel.

La proporción de hidrólisis puede variar por cambiar el tiempo, la temperatura, la cantidad de ácido clorhídrico.

Hemoglobinas normales



Movilidad electrofóretica relativa de hemoglobinas humanas a pH 8.6 en gel de almidón.

3.10. ELECTROFORESIS EN PAPEL.

3.10.1. Reactivo:

Buffer estándar de barbiturato, pH 8.6, fuerza iónica 0.05

Dietilbarbiturato de sodio.....10.3g

Acido dietilbarbitúrico..... 0.9g

Agua destilada (c.b.p.).....1000 ml.

3.10.2. Procedimiento:

1. llene ambos sitios de la cámara de electroforésis con el buffer.

2. Marque cada tira de papel con los datos de la muestra, y marque la mitad con un lápiz.

3. Coloque 8 tiras (siempre que haya menos de 8 muestras).

4. Moje las tiras del papel con buffer, iguale el nivel en ambas cámaras, y deje que las tiras escurran por 15 min en la cámara cerrada.

5. Aplique 10-15 microlitros de problema y de control conocido (solución de hemoglobina) con el aplicador en la línea trazada.

6. Deje que la electroforésis corra por 16 hrs. a 190 volts.

7. Seque las tiras inmediatamente en un horno precalentado (48.8°C-58.8°C). No requiere teñirse.

8. El Analytrol (Spinco Division, Beckman Instruments, Inc, Palo Alto, Calif.), puede usarse para cuantificación.

9. La polaridad del electródo se debe invertir después de cada corrimiento si se va a usar el mismo buffer.

3.10.3. Interpretación.

La movilidad de varias hemoglobinas a pH 8.6 en papel y su progreso hacia el ánodo(+) es como sigue:

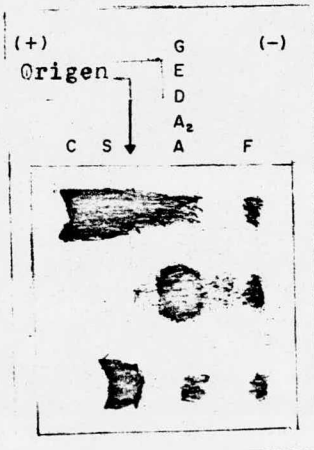
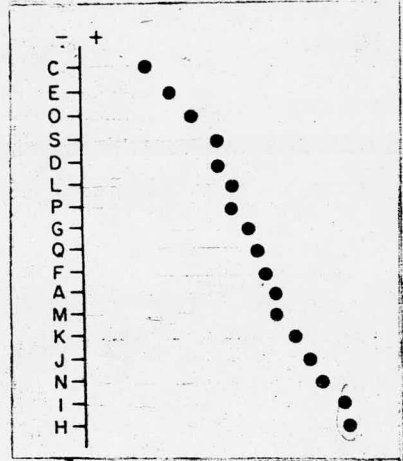
$C \leftarrow E = A_2 < S = D < G < Q < A = M = F < K < I < H.$

La electroforésis en papel no es lo suficientemente sensible para detectar pequeñas cantidades (menos del 15%) de hemoglobina y las siguientes hemoglobinas no pueden diferenciarse: HbA₂ de Hb E, HbE de HbC, HbF de HbA, y HbS de HbD. Y deben usarse otros métodos para distinguir las hemoglobinas con el mismo comportamiento electroforético.

3.10.4. Equipo.

Puede usarse el equipo Beckman de electroforesis (Spinco - División, Beckman Instruments, Inc. Palo Alto, Calif.) o algún otro método para soporte de la tira.

Movilidad electroforética
relativa de hemoglobinas
en papel filtro, buffer ve-
ronal, pH 8.6



Electroforesis de hemoglo-
binas en gel de agar mos-
trando su movimiento del
ánodo al cátodo en un pH -
6.2 .

3.11. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAR.

Quizá la mejor combinación de separación neta y técnica sencilla, corresponda al gel de agar ; además existe en el comercio un equipo completo (Hyland Hemoglobin Electrophoresis Test, Hyland Laboratories, Los Angeles California). La técnica detallada se encontrará en las instrucciones del fabricante, pero daremos un resumen.

La unidad de electroforé^sis utiliza un sistema amortiguador discontinuo; el gel de agar, sobre placas especiales, se lleva a pH 8.75 con amortiguador tris-EDTA-ácido bórico. Los compartimientos de electrodos, en la base del aparato, contienen un amortiguador de veronal, de fuerza iónica 0.025 y de pH 8.6. Los electrodos de papel de aluminio son desechables. Los pozos para depositar los hemolizados en el gel de agar se elaboran con una serie de láminas cortantes sobre una placa de aluminio, que se aprovecha además para disipar el calor producido durante la electroforé^sis, junto con el equipo enfriador de plástico.

Los pozos se secan con pequeñas tiras de papel filtro, y los hemolizados se depositan con una pipeta capilar fina. Después de someter el material a la electroforé^sis, durante 20 a 25 minutos, bajo 175 voltios, se comparan bandas rojas separadas del problema con testigos estudiados en paralelo (Hb-A, Hb-A-con C, HbA con S y Hb-A₂ aumentada). Para registro permanente las bandas pueden teñirse con Ponceau S, igual que en la electroforé^sis de proteínas del suero, después de secar y fijar

-al aire la capa de agar bajo la forma de una película delgada y resistente .

Si se necesitan valores cuantitativos, pueden obtenerse por densitometría, o eluyendo las bandas cortadas con NaOH 0.1N. Añadiendo ácido acético al 40% al líquido de elución, reaparece el color rojo del colorante Ponceau S, que puede entonces medirse a 525 milimicras en el espectrofotómetro.

La experiencia en éste método permite dar algunos consejos prácticos.

El contacto inicial de los pozos, y la introducción de las tiras de papel filtro para eliminar la humedad, deben hacerse con todo cuidado. El cortador debe hacerse descender verticalmente en el agar, y sacarse verticalmente también. Las cintas de papel filtro se encuentran unidas por un extremo; es preciso utilizar el otro extremo, de corte neto.

También se deben quitar con cierta habilidad las cintas de papel filtro, so pena de que el pozo ya no sea utilizable.

En el momento de la aplicación, si los capilares presentan la inclinación conveniente, las muestras penetran fácilmente a los pozos.

Después de los 20-30 min. aconsejados para que tenga lugar la difusión de las muestras en el agar (bajo ninguna circunstancia debe esperarse más), el agar se desprende de ambos extremos del soporte de plástico con una pequeña espátula, y los pozos que contienen los hemolizados se cierran aplicando una ligera presión con los dedos, desde los extremos del

-soporte hacia el pozo. En general, esto se acompaña de rebo-
samiento de una pequeña cantidad de muestra, que debe qui-
tarse de inmediato con un trozo de papel filtro limpio.

La electroforésis en si produce bastante calor (la corriente
final es del orden de 60 miliampers) para evitar imágenes i-
rregulares, es necesario un buen contacto entre el soporte
enfriador, el conductor de calor de aluminio, y la superficie
superior del agar. El procedimiento recomendado por el fa-
bricante (emplear una pequeña cantidad de agua como conductor
del calor) es bueno, pero este volumen debe ser suficiente.

El sistema enfriador debe ponerse en el congelador, sobre una
superficie lisa, de modo que en el uso se establezca un con-
tacto estrecho con el conductor de calor de aluminio.

La tinción recomendada se puede modificar utilizando un
tiempo menor y una solución colorante cuya concentración
sea la mitad de la mencionada. Se han obtenido buenos resul-
tados de todas las fracciones separadas, incluyendo proteínas
sin heme, con una tinción en cinco minutos. De ésta manera es
más fácil quitar el exceso de colorante del agar, y las imá-
genes son más claras. Si la hoja de agar teñida se quita con
cuidado del soporte de plástico después del aclaramiento, se
puede extender sobre un cartón blanco y se deja secar toda
la noche. Las bandas de hemoglobina teñidas se destacan bien
sobre fondo blanco, y pueden fotografiarse. Una vez seca la
tarjeta puede conservarse como registro permanente.

3.12. ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA

3.12.1. Fundamento.

Diferentes especies moleculares de hemoglobina se separan por electroforésis a pH 8.4 en acetato de celulosa. Las hemoglobinas separadas en bandas, se tiñen con Ponceau S (colorante), y se compara con hemoglobinas conocidas estándares y teñidas en igual manera.

3.12.2. Reactivos y Equipo.

Buffer Tris-EDTA-Bórico, pH 8.4 :

Trishidroximetilaminometano.....	10.2 g
EDTA	0.6 g
Acido Bórico	6.4 g
(en 300 ml de H ₂ O)	
Agua dest.	1000 ml

Guardar a temperatura ambiente y checar el pH

Ponceau S 0.5% en ácido tricloroacético al 0.5% :

Disuelva 5 g de ác. tricloroacético y 0.5 g de Ponceau S (Allied Chemical Co.) en 95 ml de agua. Deje a la temperatura ambiente. Esta solución es estable aproximadamente un mes.

Acido acético al 5%

Metanol absoluto

Acido acético al 20% en metanol absoluto.

Estándares de Hemoglobina. Un estándar que contenga iguales concentraciones de Hb-A, Hb-S, y Hb-C en forma de Hemolizado que puede adquirirse de fuentes comerciales (Hyland Laboratories entre otros), o bien pueden prepararse como se describe en "Colección de muestra y preparación del hemolizado". Después de la preparación del hemolizado, la concentración aproximada de las diferentes variantes de hemoglobina en cada hemolizado. Las proporciones adecuadas de los diferentes hemolizados se mezclan para dar iguales concentraciones de los estándares de hemoglobina deseados. La mezcla de hemolizados se pone en alícuotas en porciones pequeñas y se almacena a 4°C o en congelador. La solución refrigerada es estable al menos 2 semanas y la congelada al menos 1 mes.

Tiras de Acetato de Celulosa. Existen gran variedad de equipos y suplementos apropiados a esta técnica. (Se han obtenido resultados satisfactorios con "Titan III" placas de acetato de celulosa obtenidas como No. 2560 de "Fotovolt" ó como No. 3023 de Helena Laboratories.

Papel secante. "Helena No. 5034 ó 5098 "Beckman" No. 319329 o equivalente.

Papel para las cámaras.

Sobres de plástico.

Equipo. Han sido satisfactorios los manufacturados por Photovolt, Gelman, Beckman, Helena, y otros. Este método se describe como efectuado con "Titan No. 1500," Zip Zone Cámara No. 1283, Zip Zone 8-muestras No. 4080, Zip Zone placa de muestra No. 4081, y Zip Zone base de alineación No. 4082 de Helena Laboratories.

3.12.3. Procedimiento.

1. Ponga 100ml de buffer Tris-EDTA-Ac. Bórico (TEB), en cada lado de la cámara. Remoje dos tiras del papel para la cámara y cuelgue una en cada puente de soporte asegurándose de que el buffer haga contacto.
2. Sumerja la placa de acetato de celulosa en el buffer TEB muy lentamente y deje remojando al menos 5 min. o lo que especifique la etiqueta.
3. Usando tubos capilares, llene el hueco en la placa de muestras con el hemolizado (ver Colección de Muestra), incluyendo una hemoglobina conocida estándar conteniendo Hb-A, Hb-S, y Hb-C, o las requeridas.
4. Saque la placa de acetato de celulosa del buffer y seque entre dos piezas de papel secante y quite el exceso de buffer.
5. Aplique la muestra a 1 pulgada del cátodo. Ponga dos portaobjetos sobre la placa para asegurar un buen contacto.
6. Aplique 450 volts por 15 min. a la temperatura ambiente.

7. Apague la fuente de poder. saque la placa de la cámara, y tiña al menos por 10 min. con el colorante Ponceau S.
8. Saque la placa del colorante y lave en tres platos sucesivos de ác. acético al 5%, 2 min. en cada uno.
9. Fije la placa en metanol absoluto por 3-5 min.
10. Sumerja la placa en ac. acético glacial al 20% en metanol por 10 min. para aclarar.
11. Seque la placa en horno a 65°C por 10 min, coloque en el sobre de plástico, y etiquete.

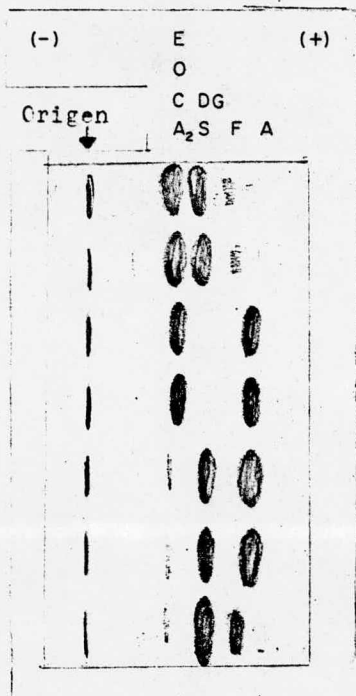
3.12.4. Interpretación.

Las bandas de hemoglobina se identifican por comparación con estándares conocidos en la misma placa. El orden de migración de los tipos más comunes es en el orden:

Hb-H Hb-A Hb-F Hb-S Hb-C.

Es posible para una banda dada en electroforésis, que resulte de la presencia de más de una variante de hemoglobina. Por ejemplo Hb-D y Hb-S migren en idénticas proporciones, como el grupo Hb-C, Hb-E, y Hb-A₂.

Cuando se somete una sangre normal a este procedimiento, se obtiene una intensa banda en la zona de Hb-A, con una ligera banda en la zona de Hb-A₂. Esta última puede ser tan ligera que puede perderse, y la presencia de Hb-A₂ puede ser demostrable sólo por elución de la tira electroforética.



Electroforésis de hemoglobinas en acetato de celulosa a pH 8.6, mostrando las posiciones relativas de varias hemoglobinas. La Hb-F no se resuelve bien de la A que la arrastra ligeramente. Las hemoglobinas D, G, y Lepore, tienen casi la misma movilidad que la Hb-S. Las hemoglobinas O, E, C, tienen casi la misma movilidad lenta de la Hb-A₂.

3.13. Resultados.

Electroforésis con Hemolizados de humano y animales.

Las sangres usadas para obtener los hemolizados son:
Humano, ganso, cobayo, vaca, conejo gallo.

La forma de obtener el hemolizado, se describe en la sección
-3.8.2. ("Preparación del hemolizado").

Medio _____ Acetato de Celulosa

Muestra _____ Hemolizados de sangre completa.

pH _____ 8.4

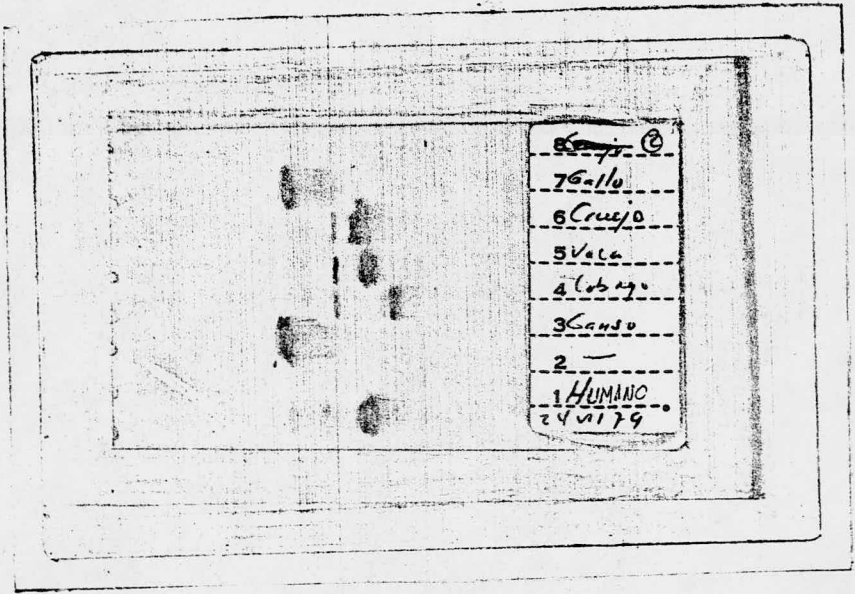
Buffer _____ TRIS-EDTA-AC.BORICO (TEB)

Tiempo _____ 15-30 min

Voltaje _____ 450V

Tinción _____ Ponceau S

Observación _____ Bandas de hemoglobina bien definidas y
distinguibiles por su diferente movilidad.



8. ---
 7. Galle
 6. Conejo
 5. Vaca
 4. Cebayo
 3. Ganso
 2. ---
 1. Humano

Electreferésis con Hemolizados de humano y animales.

Electroforésis utilizando muestras problema con manchas de sangre en tela y papel.

Las manchas de sangre utilizadas son:

4 manchas de Humano, 1 mancha de caballo, 1 mancha de carnero, 1 mancha de vaca.

La forma de obtener la muestra, se describe en la sección -3.8.1 "Colección de muestra".

Medio ___ Acetato de Celulosa

Muestra ___ Manchas de sangre

pH ___ 8.4

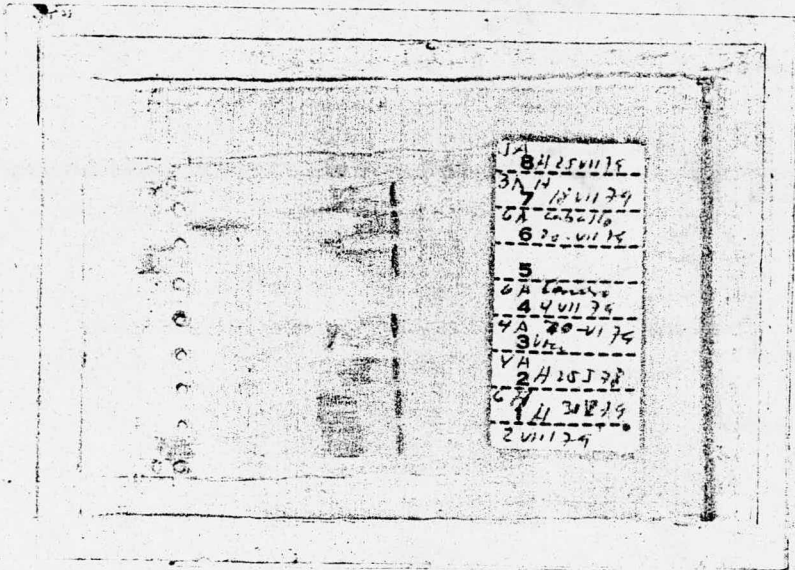
Buffer ___ (TEB)

Tiempo ___ 15-30 min.

Voltaje ___ 450V

Tinción ___ Ponceau S

Observación ___ Formación de bandas de hemoglobina no muy definidas y bien distinguibles entre si. Formación de otras proteínas distinguibles por su movilidad mayor.



Edad:

8. Humano	25 VII 79	5	Aplic.
7. Humano	18 VII 79	3	Aplic.
6. Caballo	20 VII 79	6	Aplic.
5. ---			
4. Carnero	4 VII 79	6	Aplic.
3. Vaca	20 VI 79	4	Aplic.
2. Humano	25 I 78	4	Aplic.
1. Humano	30 V 79	6	Aplic.

Electroforésis de manchas
de sangre en tela y papel

Electroforésis en manchas de sangre, utilizando como tinción los reactivos en la determinación de Hemoglobina.

Las manchas de sangre utilizadas son:

2 manchas de humano, 2 manchas de hemolizado diluido y concentrado de humano, 1 mancha de conejo, 1 mancha de carnero, 2 manchas de hemolizado de conejo concentrado y diluido.

Las manchas y los hemolizados se obtienen como se describe en la sección 3.8.

Medio___ Acetato de Celulosa

Muestra___ Manchas de sangre

pH_____ 8.4

Buffer___ (TEB)

Tiempo___ 15-30 min.

Voltaje___ 450V

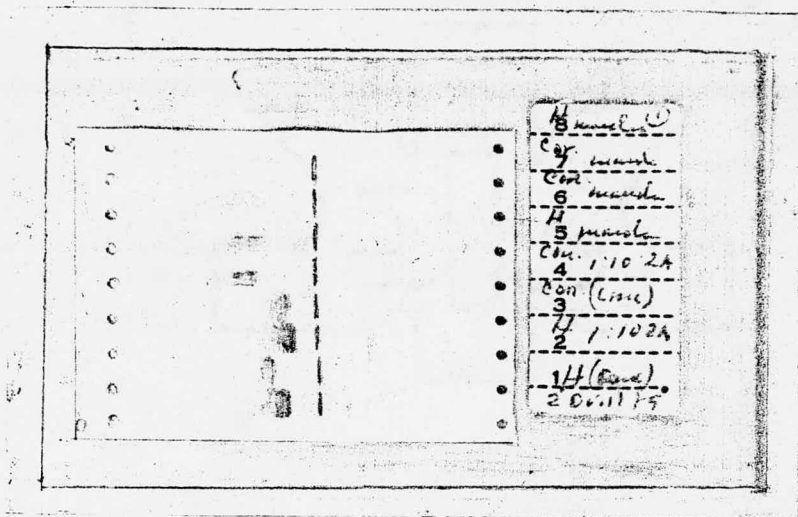
Tinción___ Se uso una solución reactiva formada por mezcla de los siguientes reactivos: (Merck)

1. Hexacianoferrate (III) de potasio en solución. (20ml)

2. Cianuro de potasio en solución (20ml)

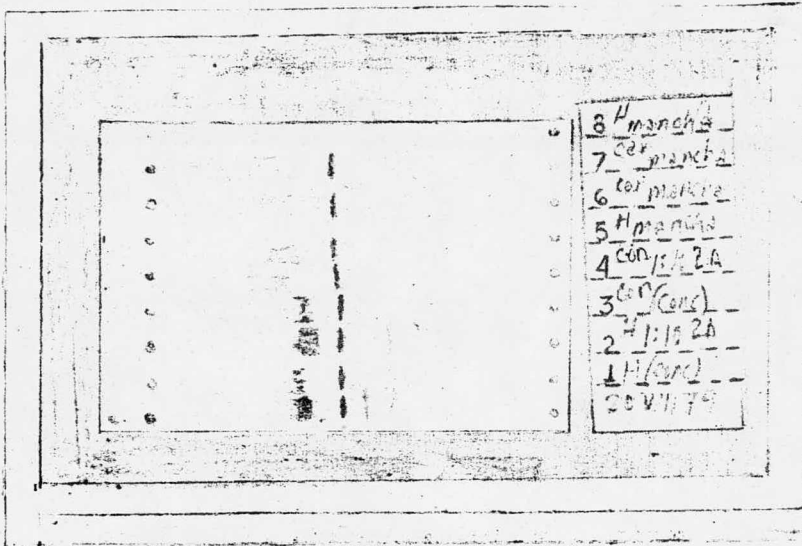
Aforando en agua bidestilada a 1 litro

Observación___ La tinción de las bandas de hemoglobina es débil



8. Humano (mancha)
7. Carnero (mancha)
6. Conejo (mancha)
5. Humano (mancha)
4. Conejo (hemolizado dil 1:10)
(2 Aplicaciones)
3. Conejo (hemolizado conc.)
2. Humano (hemolizado dil 1:10)
(2 Aplicaciones)
1. Humano (hemolizado conc.)

**Electroforésis de manchas
de sangre y hemolizados**



8. Humano (mancha)
7. Carnero (mancha)
6. Conejo (mancha)
5. Humano (mancha)
4. Conejo (hemolizado dil 1:10)
(2 Aplicaciones)
3. Conejo (hemolizado conc.)
2. Humano (hemolizado dil 1:10)
(2 Aplicaciones)
1. Humano (hemolizado conc.)

Electroforésis de manchas de sangre y hemolizados, teñidos con reactivo para determinación de hemoglobina.

Electroforésis de manchas de sangre "concentradas".

Las manchas de sangre utilizadas son:

3 manchas de humano, 1 mancha de humano con anticoagulante (oxalato de sodio), 2 manchas de conejo, 1 mancha de gallina.

Las manchas "concentradas" tenían un espesor de 1 mm aprox. y un diámetro promedio de 1 cm, se colectaron como muestra sólida (ver 3.8.1. "Colección de muestra") y entonces se prepararon hemolizados (3.8.2).

Medio ___ Acetato de Celulosa

Muestra ___ Manchas de sangre "concentradas".

pH _____ 8.4

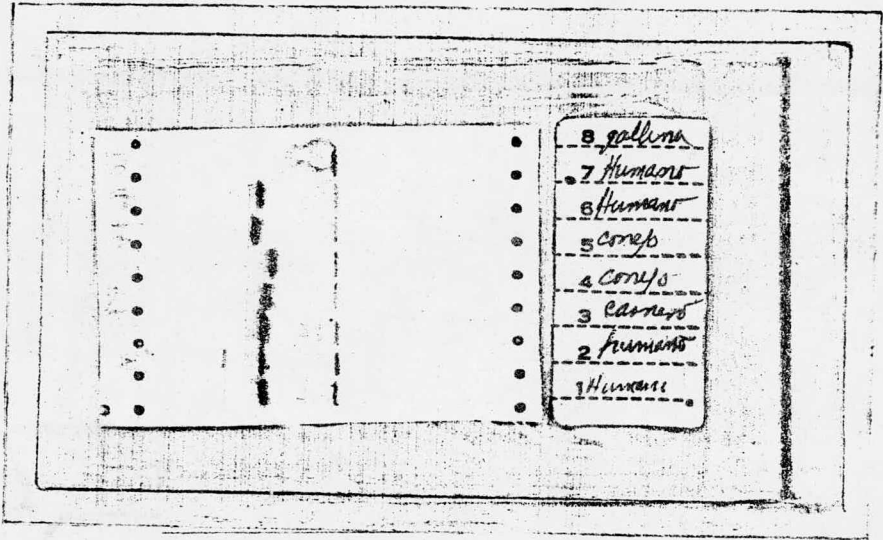
Buffer _____ (TEB)

Tiempo _____ 15-30 min.

Voltaje _____ 450V

Tinción ___ Ponceau S

Observación _ Formación de bandas de hemoglobina de diferente movilidad y definición aceptable.



8. Gallina	(hemolizado de la mancha)				
7. Humano	"	"	"	"	"
6. Humano	"	"	"	"	"
5. Conejo	"	"	"	"	"
4. Conejo	"	"	"	"	"
3. Carnero	"	"	"	"	"
2. Humano	"	"	"	"	"
1. Humano	"	"	"	"	"

CAPITULO IV**4. CONCLUSIONES.**

4.1. Medios donde se efectua la Electroferésis.

4.2. Conclusiones de los Resultados.

4.3. Comentarios.



4. CONCLUSIONES.

4.1. Medios donde se efectua la electroforésis.

Papel.

El papel se escoge en base a la distancia de migración, cantidad de la separación, y cualidades de manejo, secado, decoloración, etc. En general un papel delgado, suave (como el Whatman 1 ó el 3 MM) es el mejor para la resolución de proteínas, pero la electroendósmosis es más prominente que con un papel duro.

Este fue uno de los primeros medios, el tiempo que tomaba el corrimiento era largo y la resolución pobre si se comparaba con otro medio de corrimiento más rápido. Las ventajas del papel son su alta resistencia a la tensión, su bajo costo, y su fácil manejo.

CAM (Membrana de acetato de celulosa).

La CAM se parece a la de papel en capa fina. Cuando se seca es muy frágil y debe ser manejado con cuidado. Seco o mojado se marcan muy fácil los dedos, es mejor manejarlo con pinzas; la resolución obtenida por este medio es mejor que la del papel o el agar, para material proteínico.

Se ha usado este medio para inmunoelectroforésis y varios otros han descrito su uso para enzimogramas.

Se encontró que este medio no es tan bueno en la resolución como los geles de almidón o acrilamida. La cantidad de muestra requerida es más pequeña que con la mayoría de los

-métodos con los otros medios.

La CAM una vez seca, se coloca en la superficie de una placa con buffer, y se remoja, entonces se sumerge en el buffer y se remoja por unos minutos. Si se sumerge en el buffer cuando está seca, entonces el aire queda atrapado en la CAM y la tira no puede ser remojada completamente en el buffer .

Al remojarlo se quita y se seca con un papel filtro liso para quitar el exceso de buffer y se coloca en el tanque. En este paso es cuando la tira puede indebidamente secarse, y debe efectuarse cuidadosamente para que no suceda.

Algunos recomiendan dejar la tira por media a una hora en el tanque, y de un cuarto a una hora, con el switch de la corriente encendido, antes de la aplicación de la muestra. Esto se debe a la dificultad de repetir el paso de secar el exceso de buffer.

La experiencia, la práctica y una buena técnica, son los mejores cuidados para evitar repeticiones del proceso.

Debe tenerse también cuidado en la aplicación de la muestra en la tira de CAM.

Es adecuado usar 0.1 0.5 microlitros de hemolizado para separación de hemoglobina.

Existen muchos aplicadores pero puede usarse el del tubo capilar en su aplicador, que permite vaciar la muestra en línea recta sobre el canal.

Agar.

El agar es un producto biológico y así muy variable de una manufactura a otra, y de un lote a otro. Los dos factores más importantes en la elección de un agar para la electroforé^{sis}, son el grado de endósmosis con el sistema buffer a usar y la claridad del gel.

Un número de agares, ahora se producen especialmente para electroforé^{sis}, y algunos de esos son de buena calidad. El agar Difco tiene excelente claridad, y adaptado a las técnicas de inmunodifusión, pero algunos lotes usados han mostrado todos una fuerte endósmosis si son usados sin un tratamiento previo.

El agar Difco Bacto tiene mucha menor endósmosis, pero la claridad es muy mala.

Este último punto se aplica a casi todas las producidas para trabajo bacteriológico. Si el agar está tan opaco como la mayoría de ellas, las líneas débiles de precipitado no pueden ser observadas adecuadamente. El agar "Behringwerke" es excelente pero su precio es muy alto para su uso de rutina.

Se encontró que la mayoría de los lotes de Oxoid Ionagar-No.2, daba todos los requerimientos de claridad, poseía baja endósmosis, y es de precio razonable. Algo de endósmosis es necesaria para la técnica de reacción de precipitación. Cuando se hacen los geles de agar es mucho más fácil hacer una buena cantidad de agar en agua destilada a un 2% de -

-agar y entonces hacer cada buffer al doble de lo normal en fuerza. Entonces es fácil fundir cantidades iguales de buffer y agar, para obtener el gel final rápido y fácilmente y cuando se requiere.

El agar para la electroforésis resulta entonces bueno para el análisis de hemoglobina, pero también lo es para enzimas lipoproteínas, proteínas del suero.

De hecho este medio es similar al de acetato de celulosa en versatilidad, y en general compite con otros medios en aplicación a las demandas de aplicación en laboratorios de rutina.

El agar impuro o purificado está compuesto de al menos dos fracciones; agaropectina y agarosa. La última contiene grupos sulfato y ácidos carboxílicos y explica la considerable endósmosis y el color de fondo que se observa en el agar no fraccionado. La fracción del agar purificada, llamada agarosa es esencialmente neutral y exhibe poca endósmosis. Este llega a ser el medio de elección.

La ventaja de la electroforésis en agar sobre la de papel es su baja afinidad por proteínas y su claridad después de secado.

La medida de la muestra empleada en la técnica es relativamente pequeña (1 a 3 microlitros) y el tiempo de electroforesis es relativamente corto (30 a 60 min. dependiendo de las condiciones experimentales.). Generalmente se usan de 0.5 a 1.0g por 100 ml de agar .

Almidón.

El almidón usado en la electroforésis es parcialmente hidrolizado, porque el almidón natural no hace gel.

Los geles de almidón en las concentraciones usuales, forman un tamiz, así que las proteínas y enzimas se separan de acuerdo a su carga y las medidas moleculares.

El gel se debe preparar cuidadosamente, ya que es común calentar insuficientemente o también quemar el almidón. Ambas circunstancias producirán corrimientos de mala calidad. La preparación del gel es una operación difícil, y requiere de un operador con habilidad.

El almidón apropiado puede obtenerse por hidrolizarse por un método, pero tal vez sería menos económico, que obtenerse comercialmente, por ejemplo de la Merck Company, o de Connaught Medical Research Lab. (Toronto, Ontario Canadá)

Acrilamida.

Este tipo de gel da separaciones similares a las del almidón; es más fácil controlar la medida molecular del poro del tamiz en éste gel que en el almidón. Al igual que éste puede proporcionar unas 20 zonas de separación. El medio es muy útil, pero la experiencia muestra que no es tan fácil montarlo como un método de rutina, como sería con el almidón, y por eso es más usado el almidón como rutina que el de acrilamida.

4.2. Conclusiones de los Resultados.

En La electroforésis con hemelizados de humano y animales se ve claramente la migración de bandas de hemoglobina que se mueven a diferente distancia del punto de origen, lo que indica que puede establecerse una diferencia entre sangre animal y humana ya que las diferencias en su estructura se ponen de manifiesto al aplicarlas en el campo electrofórico y aunque la secuencia de aminoácidos puede ser análoga, no es idéntica o aun su función similar (transporte de oxígeno) pero su estructura molecular y arreglo diferente, determinan la diferencia .

La experiencia y el uso de estándares de hemoglobina evitan la dificultad en la interpretación de las bandas formadas y de la posibilidad de existencia de hemoglobinas anormales.

Al hacer el estudio en manchas de sangre de diferentes edades y tamaños pero sin mayor espesor que el del papel o la tela donde se encontraban, nos encontramos con lo siguiente:

La extracción de la mancha se dificulta con la edad de la misma, y es necesario muchas veces dejar una noche, y emplear un baño a temperatura no mayor de 40°C, o el empleo del buffer con que se trabajen las muestras, todo eso para solubilizarlas. Sin embargo la mancha es en sí sangre completa, seguramente hemolizada pero en la cual aun pueden hallarse otras proteínas y elementos además de hemoglobina en donde otras proteínas tomen el colorante al igual que la hemoglobina, por supuesto su movilidad difiere en un buen grado de la hemoglobina pero

su eliminación resulta deseable como en los hemolizados mediante los lavados que se efectúan.

En realidad el mayor inconveniente que se presenta es porque la mancha no aporta una cantidad suficiente de hemoglobina como para dar lugar a la formación de bandas en la manera en que lo hacen los hemolizados, en donde se recomienda que la concentración de hemoglobina antes de su aplicación en el medio que se usará, se ajuste la concentración de la hemoglobina a unos 10 g/100 ml de donde se desprende que concentraciones menores irán desapareciendo proporcionalmente de las posibilidades del método.

El uso de un reactivo usado en la determinación espectrofotométrica de hemoglobina pretendía teñir específicamente a la hemoglobina y hacerla más visible, sin embargo la coloración es proporcional a la cantidad de hemoglobina presente por lo que volvemos nuevamente al problema de la cantidad de hemoglobina de la mancha por lo que haremos las siguientes consideraciones basándonos en las observaciones efectuadas.

Se observa que si la mancha proporciona menor cantidad de hemoglobina conforme se halle menos concentrada ya sea por su edad o por su tamaño, aparecen las hemoglobinas cada vez más claras en el medio electroforético, y además su corrimiento es más rápido ligeramente con respecto al hemolizado obtenido en una concentración adecuada, siendo esto posible porque el método no sólo se basa en la migración por las cargas sino también en el peso molecular. Entonces la dilución de la

mancha nos daría un movimiento inesperado con respecto al de una mancha concentrada, de ahí que sería necesario conocer la concentración de hemoglobina de la mancha, digamos espectrofotométricamente, y en los casos en que la cantidad de muestra lo permita, para efectuar el corrimiento de la mancha junto al de un hemolizado diluido a la misma concentración del problema. El hemolizado estándar es de humano y de esta manera al comparar con el problema, tendremos una mayor certeza del origen animal o humano.

A pesar de ello ya se dijo que la electroforésis utiliza hemolizados ajustados a una concentración de 10 g/100 ml de hemoglobina. Por ello al usar manchas concentradas los resultados son más satisfactorios. Debemos aclarar que hemos llamado manchas concentradas a las que presentan un cierto espesor notable y que resulta en una concentración adecuada de hemoglobina.

4.3. Comentarios.

La electroforésis es entonces el procedimiento más útil de laboratorio para la determinación y detección de hemoglobinas tanto normales como anormales; su íntima relación en la constitución de la sangre establece una forma fácil de detectarlas e identificarlas.

Se calcula que teóricamente pueden existir 2 200 hemoglobinas anormales en la naturaleza, como resultado de tan sólo una sustitución de un aminoácido. Una tercera parte de las hemoglobinas anormales que se formaran tendrían una carga anormal y su corrimiento electroforético sería anormal. Una limitación existiría si la carga no se altera.

Como ya se dijo antes este método no pretende ser un estudio aislado de las manchas de sangre, sino parte de él, por lo que su aplicación requiere de mucho criterio y es muy importante la experiencia y el entendimiento de los antecedentes en el caso particular que se investiga ya que son esenciales si se quiere obtener mejores resultados y presentarlos en el tribunal. Lo importante es que el presente trabajo pueda contribuir en alguna manera a las intenciones de la química legal y de la investigación policial, ya que cuanto progreso se logre en este campo, será posible que los delincuentes tengan tipificada su sangre en su cárDEX, como una huella digital o una fotografía, y así en el futuro criminales conocidos pueden ser identificados por la sangre que abandonen en las escenas de sus actividades.

CAPITULO V

5. BIBLIOGRAFIA.

5. BIBLIOGRAFIA.

1.- The Examination and Typing of Bloodstains
in the Crime Laboratory.

By Bryan J. Culliford

Senior Principal Scientific officer

Metropolitan Police

Forensic Laboratory

London, England.

PR 71-7.

2.- Clinical Chemistry

R. Henry M.D.

D. C. Cannon.

J. Winkelman

Medical Department

Harper E Row Publishers

Hagerstown, Maryland, N. York, Evanston, Sn. Fco.

Copyright by Harper-Row.

3.- Fundamentals of Clinical Hematology

Leavell and Thorup

Saunders Company Philadelphia London

4.- Methods of Forensic Science

Edited by Frank Lundquist

Volúmenes I y II.

Interscience Publishers

A División of John Wiley

Sons, New York/London.

5.- Bioquímica

Lehninger

Ed. Omega S.A. 1978.

6.- Fisiología Humana

B.A.Houssay.

Ed. El Ateneo S.A.

4ª Edición.

7.- Diagnóstico Clínico por el

laboratorio.

Toodd Sanford.

I Davidsohn.

J.B.Henry.

Salvat Editores S.A.

5ª Edición 1977.

- 8.- Crime Investigation
Paul.L.Kirk.
Interscience Publishers, Inc.N.York.
2^a Edición.
- 9.- Métodos de Laboratorio
Lynch,Raphael,Mellor,Spare,Inwood.
2^a Ed.Editorial Interamericana.
- 10.- Clinical Laboratory Methods and
Diagnosis.
Gradwohl's.
Vol.I 17 Ed.
Mosby Company.
- 11.- Fundamentals of Clinical Chemistry.
Tietz.
Ed.Saunders 2^a Ed.
- 12.- Clinical Hematology
Wintrobe Maxwell
Lee,Boggs,Bithell,Athens,Foerster.
Lea - Febiger
Seventh edition
Philadelphia.

13.-Advances in Protein Chemistry**Anson Kenneth Edsall****Vol. VII New York****Academic Press.****14.-Chemical Abstracts****Vol 67 (105083 r)y(105222 k)****PTE 12 -1967-****PTE 10 -1967- (87743 z)****Vol 69 (33840 b)****-1968-****15.-The Proteins II****Composition, Structure, and Function****Neurath****2nd Ed. Academic Press N.Y. and London****16.-Hematin Compounds and Bile Pigments****Lemberg & Legge****Interscience Publishers****Ine. N.Y. LTD London****17.-Técnicas de Hematología Animal****R.K. Archer****Ed. Acribia.**