

01484<sup>1</sup><sub>2g</sub>



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

DETERMINACION DE GRUPO SANGUINEO POR  
MEDIO DE LA SALIVA FLUIDA DILUIDA Y EN  
MANCHAS SECAS

TESIS DOCTORAL  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN ODONTOLOGIA  
PRESENTA:  
C.D.M. en C. ENRIQUE MANUEL SANCHEZ SANCHEZ

TUTOR DR. JUAN CARLOS HERNANDEZ GUERRERO



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

274422

1999



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



**DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO POR  
MEDIO DE LA SALIVA FLUIDA DILUIDA Y EN  
MANCHAS SECAS**

**Aprobado por:**

**Dr. Manuel Saavedra García**

**Asesor**

**Dra. Santa Ponce Bravo**

**Asesor**

**Dr. Juan Carlos Hernández Guerrero**

**Director de Tesis**

## **RECONOCIMIENTOS**

Por su colaboración en esta obra y en particular por haberme permitido utilizar sus acervos bibliográficos, quiero dejar testimonio de gratitud a las siguientes instituciones:

**A la Universidad Nacional Autónoma de México**

**Al Dr. Francisco Barnes de Castro** por haber logrado el cambio y la modernidad académica bajo su rectorado y situar nuevamente en el liderazgo académico a nuestra universidad.

**Al Dr. Juan Carlos Hernández Guerrero** por la atinada dirección y tutoría de este estudio

**Al Laboratorio de Genética Forense de la PGJDF .**

A MI **PADRE**, UN RECUERDO SIEMPRE VIVO.

A MI **MADRE**, SU AMOR Y APOYO INCONDICIONAL.

A MIS **HERMANOS**

A MI **NOVIA**  
QUIEN DEDICÓ INCONTABLES HORAS  
PARA LA FINALIZACIÓN DE LA PRESENTE.

# INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>La criminalística y su relación con las sustancias de grupo sanguíneo.</b>	<b>8</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Grupos sanguíneos.</b>	<b>10</b>
□ Tipificación del sistema ABO, H y Lewis.	<b>12</b>
□ Herencia de los antígenos AB.	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Secreción de sustancias de grupo sanguíneo en glándulas salivales.</b>	<b>20</b>
□ Estado secretor del individuo.	<b>20</b>
□ Sustancias de grupo en saliva.	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>Estudio de la saliva.</b>	<b>25</b>
□ Composición de la saliva.	<b>26</b>
□ Constituyentes orgánicos de la saliva.	<b>27</b>
□ Constituyentes inorgánicos de la saliva.	<b>34</b>
□ Fisiología de la saliva.	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b>Identificación de la saliva.</b>	<b>35</b>
□ Métodos para la determinación de amilasa.	<b>35</b>
□ Método de Street-Close y de Smith-Roe modificado.	<b>36</b>
<b>CAPÍTULO 6</b>	
<b>Determinación de sustancias de grupo sanguíneo con fines forenses.</b>	<b>37</b>
□ Método de inhibición de la hemaglutinación.	<b>38</b>
□ Técnica de absorción-inhibición para muestras de saliva fluida.	<b>39</b>

<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>42</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>43</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>44</b>
<b>METODOS Y MATERIALES</b>	<b>45</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
□ Determinación de la actividad amilásica en saliva fluida diluída.	<b>55</b>
□ Determinación de la actividad amilásica en manchas secas de saliva.	<b>58</b>
□ Determinación de sustancias de grupo sanguíneo en muestras de saliva fluida de voluntarios de grupo sanguíneo A, B y O.	<b>59</b>
□ Determinación de sustancias de grupo sanguíneo en manchas de saliva seca.	<b>64</b>
□ Dilución estimada a partir de la actividad amilásica determinada en mancha seca y título de anticuerpos para la determinación de sustancias de grupo sanguíneo.	<b>67</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>71</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>83</b>
<b>PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIONES FUTURAS</b>	<b>85</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>86</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>91</b>
<b>APENDICE</b>	<b>93</b>



## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Resumen de sistema sanguíneo	<b>17</b>
<b>Cuadro2.</b> Grupos sanguíneos	<b>20</b>
<b>Cuadro 3.</b> Características de las glándulas salivales mayores en el humano	<b>25</b>
<b>Cuadro 4.</b> Algunos constituyentes y características de la saliva del adulto humano	<b>28</b>
<b>Cuadro 5.</b> Interpretación de resultados	<b>52</b>
<b>Cuadro 6.</b> Ejemplo para la correlación de datos	<b>54</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura básica de la inmunoglobulina y sus propiedades funcionales	<b>13</b>
<b>Figura 2.</b> Antígenos del sistema ABO sobre la superficie de los eritrocitos	<b>15</b>
<b>Figura 3.</b> Tipos de cromosomas y concepto del estado homocigoto, heterocigoto y hemocigoto para un par de genes alelos A y a	<b>19</b>
<b>Figura 4.</b> Síntesis de los antígenos A,B, y H a partir de las cadenas de tipo I	<b>23</b>
<b>Figura 5.</b> Síntesis de los antígenos A,B y H a partir de las cadenas de tipo II	<b>24</b>
<b>Figura 6.</b> Representación diagramática de la estructura de una glucoproteína	<b>30</b>

## INDICE DE GRAFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Actividad amilásica en saliva diluida de voluntarios de tipo sanguíneo A	<b>94</b>
<b>Gráfica 2.</b> Actividad amilásica en saliva diluida de voluntarios de tipo sanguíneo B	<b>95</b>
<b>Gráfica 3.</b> Actividad amilásica en saliva diluida de voluntarios de tipo sanguíneo O	<b>96</b>
<b>Gráfica 4.</b> Recta semilogarítmica de la actividad amilásica contra diluciones de saliva	<b>97</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Actividad amilásica en muestras de saliva fluida diluida de voluntarios de grupo sanguíneo A	55
<b>Tabla 2.</b> Actividad amilásica en muestras de saliva fluida diluida de voluntarios de grupo sanguíneo B	56
<b>Tabla 3.</b> Actividad amilásica en muestras de saliva fluida diluida de voluntarios de grupo sanguíneo O	56
<b>Tabla 4.</b> Actividad amilásica promedio en muestras de saliva fluida diluida de voluntarios de grupo sanguíneo A, B y O	57
<b>Tabla 5.</b> Actividad amilásica en manchas secas de saliva	58
<b>Tabla 6.</b> Obtención del título de anticuerpos Anti-A, Anti-B y Anti-H para la determinación de las sustancias de grupo sanguíneo en salivas diluidas de voluntarios de tipo A	60
<b>Tabla 7.</b> Obtención del título de anticuerpos Anti-A, Anti-B y Anti-H para la determinación de las sustancias de grupo sanguíneo en salivas diluidas de voluntarios de tipo sanguíneo B	61
<b>Tabla 8.</b> Obtención del título de anticuerpos Anti-A, Anti-B y Anti-H para la determinación de las sustancias de grupo sanguíneo en salivas diluidas de voluntarios de tipo sanguíneo O	62
<b>Tabla 9.</b> Título máximo de anticuerpos (Anti-A, Anti-B y Anti-H) para la determinación de sustancias de grupo en saliva diluida de voluntarios de tipo sanguíneo A, B y O	63
<b>Tabla 10.</b> Determinación de grupo sanguíneo en manchas de saliva seca	65
<b>Tabla 11.</b> Relación entre dilución estimada de una manchas de saliva a partir de su actividad amilásica y título de anticuerpos Anti-A, Anti-B y Anti-H para la determinación de grupo sanguíneo en manchas de saliva seca	68

	<b>Página</b>
<b>-ANEXO I MATRIZ DE VARIABLES CONSIDERADAS EN LA INSTRUMENTACIÓN Y AUTOMATIZACIÓN DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES CHAPULTEPEC.</b>	<b>86</b>
<b>-ANEXO II PARÁMETROS DE CONTROL PARA LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES CHAPULTEPEC</b>	<b>90</b>
<b>-ANEXO III DIAGRAMAS LÓGICOS DE CONTROL (DLC) Y DIAGRAMAS ANALÓGICOS DE CONTROL (DCAN)</b>	<b>96</b>
<b>-ANEXO IV PERFILES DE OXIGENO DISUELTO EN LOS TANQUES DE AEREACIÓN DE LA PLANTA DE CHAPULTEPEC.</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO V DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIFICACIONES PARA LA INSTRUMENTACIÓN Y AUTOMATIZACIÓN.</b>	<b>124</b>
<b>-ANEXO VI FORMATOS DE HOJAS DE DATOS PARA EL EQUIPO ESPECIFICADO</b>	<b>140</b>

## RESUMEN

Las sustancias de grupo no sólo se encuentran sobre los eritrocitos, sino también en forma soluble en varios fluidos corporales, de los cuales la saliva los contiene en cantidades importantes. Los individuos que secretan estas sustancias, se conocen como secretores y constituyen el 80 % de la población. Desde un punto de vista criminalístico esto resulta importante, cuando no se cuenta con otros fluidos, siendo el estudio de la saliva útil como criterio de exclusión.

La saliva es un fluido de composición y concentración variable. La amilasa es uno de los componentes que la caracterizan debido a que se encuentra en altas concentraciones en este fluido.

Se determinó en 56 muestras de saliva la cual fue recolectada de 56 individuos de grupo sanguíneo conocido, de estas, 9 son muestras de saliva fluida y 47 son muestras de saliva preparada en manchas secas; la actividad amilásica y el título de anticuerpos (Anti-A, Anti-B y Anti-H), con el objeto de obtener las diluciones apropiadas que de una manera confiable nos permitieran identificar sustancias de grupo sanguíneo del sistema ABO.

La metodología utilizada para la identificación de saliva fluida y en manchas secas mediante la determinación de sustancias de grupo sanguíneo del sistema ABO (en saliva fluida y en manchas secas), se llevo a cabo conforme al método científico al formularse y comprobarse la hipótesis de investigación, mediante la experimentación que en este caso se logró a través de las siguientes técnicas:

- A. Técnica para la determinación de la actividad amilásica (Método de Street y Close)
- B. Técnica de hemaglutinación directa para el estudio del título de anticuerpos para la tipificación de sustancias de grupo sanguíneo en saliva fluida.
- C. Técnica de absorción-inhibición para la determinación de sustancias de grupo sanguíneo en muestras de saliva fluida y en manchas secas.

El esquema general que se siguió para la realización de la presente investigación se llevó a cabo en tres etapas:

1. Recolección y preparación de muestras de saliva fluida y en manchas secas.

2. Determinación de actividad amilásica en saliva fluida y en manchas secas; tipificación de sustancias de grupo sanguíneo en saliva fluida y en manchas secas.
3. Procesamiento e interpretación de resultados.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, utilizando 9 muestras de saliva fluida a diluciones dobles seriadas de individuos de grupo sanguíneo conocido, indican que es factible identificar actividad amilásica hasta en una dilución de 1:4096, e identificar a las sustancias de grupo hasta diluciones de 1:256 con la obtención del título de anticuerpos anti-A, anti-B y anti-H.

El estudio en 47 muestras de manchas de saliva seca, preparadas sobre papel filtro con saliva de 47 individuos voluntarios de grupo sanguíneo conocido, revelan cantidades apreciables de actividad amilásica en valores que fluctúan entre 42 y 11, 437  $\mu$ l cuyo dato sirvió de indicador para determinar de forma confiable a las sustancias de grupo.

Se llegó a la conclusión de la importancia de efectuar en este tipo de muestras, estudios de manera simultanea para establecer con certeza la presencia de saliva y de las sustancias de grupo.

Palabras claves: saliva, grupos sanguíneos

## ABSTRACT

The group substances are not only on the erythrocytes, but also in soluble form in several corporal fluids, of which the saliva contains them in important quantities. The individuals that secrete these substances, are known as secretors and they constitute 80% of the population. From a point of view *criminally* it is important, when we do not have other fluids, being the study of the useful saliva as exclusion approach.

The saliva is a composition fluid and variable concentration. Amilasa is one of the components that characterize it because it has in high concentrations in this fluid.

It determines in 56 samples of saliva which was recolected from 56 people with known blood group, from this 9 were flowing saliva samples and 47 were saliva samples of prepared dry stains, the amilasic activity and the title of antibodies (Anti-to, Anti-B and Anti-H), in order to obtain the appropriate dilutions that allowed us to identify substances of sanguine group of the system ABO in a reliable way.

The methodology used for the identification of fluid flowing salivary-saliva and in dry stains - and the determination of substances of blood group of the system ABO (in flowing saliva and in dry stains), you carries out according to the scientific method when being formulated and to be proven the investigation hypothesis, by means of the experimentation that was achieved through the following ones in this case technical:

- A. Technique for the determination of the amilasic activity (Method of Street and Close)
- B. Technique of direct hemagglutination for the study of the title of antibodies for the typification of substances of blood group in saliva fluid.
- C. Technical of absorption-inhibition for the determination of substances of blood group in samples of flowing saliva and in dry stains.

The general outline that was continued for the realization of the present investigation it carries out in three stages:

1. gathering and preparation of samples of flowing saliva and in dry stains.
2. determination of amilasic activity in flowing saliva and in dry stains; typification of substances of sanguine group in flowing saliva and in dry stains.



### 3. prosecution and interpretation of results.

The results obtained study presently, using 9 samples dilutions double serials of individuals' of well-known sanguine group in flowing saliva, they indicate that it is feasible to identify activity amilasic them until in a dilution of 1:4096, and to identify to the group substances until dilutions of 1:256 with the obtaining of title of antibodies anti-A, ant-B and anti-H.

The study in 47 stains of dry saliva, prepared on paper filter with volunteers' of well-known sanguine group saliva, they reveal appreciable quantities of activity amilasic in values that they fluctuate between 42 and 11, 437  $\mu$ l whose fact served as indicator to determine from a reliable way to the group substances.

You reaches the conclusion of the importance of making in this type of samples, studies in a simultaneous way to settle down with certainty the presence of saliva and of the group substances.

Key words: saliva, blood groups

## INTRODUCCION

La criminalística es la disciplina que aplica los conocimientos de las ciencias naturales, en el estudio de la evidencia física relacionada con un acto delictuoso, a fin de reconstruir los hechos e identificar a sus autores (Moreno, G.R., 1987):

Aproximadamente un 20% de las personas mueren en circunstancias que ameritan una investigación oficial; de ellas un 10% se identifican oficialmente como muertes violentas (Snyder, L., 1988) y en éstas, es posible establecer relación de causa-efecto entre el origen y la causa de muerte (Fernández, P.R., 1992).

Uno de los principios que hacen válido el método que aplica la criminalística es el de intercambio. Éste menciona que al cometerse un delito, se realiza un intercambio de material sensible entre su autor y el lugar de los hechos (Moreno, G.R., 1986). Es decir, cuando el *victimario entra en contacto con la víctima y con objetos que se encuentran en el lugar, deja tras de sí huellas de sí mismo, y lleva consigo huellas de las cosas que tocó* (Moreno, G.R., 1987).

Los fluidos corporales son transferibles con mayor frecuencia entre la víctima y el victimario en actos violentos, por lo que su identificación y caracterización son de gran valor evidencial para el esclarecimiento de los hechos que se investigan.

El estudio criminalístico de la sangre y la saliva comprende los siguientes aspectos: **reconstructivo e identificativo** (Moreno, G.R., 1986).

El **reconstructivo** se encarga de reestructurar el escenario donde se cometió el ilícito, así como también la localización y ubicación de fluidos corporales tales como sangre y saliva.

El **identificativo** se encarga del estudio físico de las sustancias de grupo sanguíneo y su procedencia.

Uno de los propósitos del presente estudio es dilucidar la naturaleza de fluidos como la sangre o la saliva, que generalmente se encuentran en el lugar de los hechos como manchas secas de tamaño pequeño, con horas, semanas o meses de exposición al medio

ambiente y frecuentemente mezcladas o contaminadas con material exógeno como suciedad y polvo.

Las manchas de sangre y/o saliva, en el lugar de los hechos, sobre objetos o sobre un sospechoso, constituyen muy importantes indicios (Moreno, G.R., 1986).

## ANTECEDENTES

En 1900, Landsteiner realizó la primera observación de la aglutinación de los eritrocitos humanos por el suero del mismo, lo que condujo al descubrimiento de los grupos sanguíneos A, B y O (Moreno, G.R., 1986).

Los aglutinógenos A, B y O son polisacáridos que pueden estar presentes en las cadenas laterales de las glucoproteínas salivales y se encuentran aproximadamente en las células del 80 % de las personas secretoras (Jenkins, G.N., 1983).

La actividad en la saliva de los secretores es varios cientos de veces superior a la de los eritrocitos, hecho que es importante para la criminalística, siendo factible determinar las sustancias de grupo sanguíneo a partir, por ejemplo, de un vaso recién utilizado o de una colilla de cigarro (Jenkins, G.N., 1983).

En serología forense la determinación del estado secretor de una persona generalmente se lleva a cabo en saliva, y en esas circunstancias un sospechoso puede ser excluido con certeza únicamente sobre las bases de su tipificación del grupo ABO y no por el estado secretor de su saliva.

El estado secretor se encuentra en aproximadamente el 80% de los individuos (Lie M.A., 1994; -Tills, D, Kopek A, Tills, R., 1983)

A principios del siglo XX, la criminalística podía con toda certeza científica establecer si una mancha de sangre era humana; sin embargo todavía no era posible determinar de qué individuo procedía la misma.

En nuestro país, el Ministerio Público es la figura jurisdiccional persecutoria del delito, encargada de integrar la averiguación previa, para lo cual con fundamento en los

ambiente y frecuentemente mezcladas o contaminadas con material exógeno como suciedad y polvo.

Las manchas de sangre y/o saliva, en el lugar de los hechos, sobre objetos o sobre un sospechoso, constituyen muy importantes indicios (Moreno, G.R., 1986).

## ANTECEDENTES

En 1900, Landsteiner realizó la primera observación de la aglutinación de los eritrocitos humanos por el suero del mismo, lo que condujo al descubrimiento de los grupos sanguíneos A, B y O (Moreno, G.R., 1986).

Los aglutinógenos A, B y O son polisacáridos que pueden estar presentes en las cadenas laterales de las glucoproteínas salivales y se encuentran aproximadamente en las células del 80 % de las personas secretoras (Jenkins, G.N., 1983).

La actividad en la saliva de los secretores es varios cientos de veces superior a la de los eritrocitos, hecho que es importante para la criminalística, siendo factible determinar las sustancias de grupo sanguíneo a partir, por ejemplo, de un vaso recién utilizado o de una colilla de cigarro (Jenkins, G.N., 1983).

En serología forense la determinación del estado secretor de una persona generalmente se lleva a cabo en saliva, y en esas circunstancias un sospechoso puede ser excluido con certeza únicamente sobre las bases de su tipificación del grupo ABO y no por el estado secretor de su saliva.

El estado secretor se encuentra en aproximadamente el 80% de los individuos (Lie M.A., 1994; -Tills, D, Kopek A, Tills, R., 1983)

A principios del siglo XX, la criminalística podía con toda certeza científica establecer si una mancha de sangre era humana; sin embargo todavía no era posible determinar de qué individuo procedía la misma.

En nuestro país, el Ministerio Público es la figura jurisdiccional persecutoria del delito, encargada de integrar la averiguación previa, para lo cual con fundamento en los

artículos 21 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, 1996 del Código de Procedimientos Penales para el Distrito Federal, 3ra. fracción II, 2da. fracción II y 22 de la Ley Orgánica de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal, solicita el apoyo de los servicios periciales, quienes designan a los peritos para que acudan al lugar de los hechos y utilizando todos los métodos especiales de sus áreas, tratarán de esclarecer el caso, reconstruyéndolo con apego a la verdad histórica de los hechos, utilizando para ello el método científico.

Estamos a finales del siglo XX, y la criminalística puede determinar con toda certeza de quién proceden las manchas de sangre, constituyendo esta cuestión un gran avance para todos los que cultivamos la disciplina encargada de investigar científica y técnicamente los delitos.

## **CAPÍTULO 1. LA CRIMINALÍSTICA Y SU RELACIÓN CON LAS SUSTANCIAS DE GRUPO SANGUÍNEO**

Antes del siglo XVII, el delincuente cuyas ropas se habían manchado de sangre de la víctima a consecuencia de la comisión de un ilícito, casi siempre escapaba a la acción de la justicia, en virtud de que en esa época, no se contaba con técnicas que pudieran identificar sangre.

A la resolución de los problemas antes planteados, mucho ayudó el descubrimiento de los glóbulos rojos por Leeuwenhoek en 1673, y su más precisa descripción en 1773, por W. Hewson, descubridor a su vez del linfocito, uno de los elementos figurados de la sangre (Moreno, R., 1986).

Posteriormente fueron precisadas la forma y el tamaño de los glóbulos rojos humanos, permitiendo a los investigadores determinar que la mancha además de ser de sangre, pertenecía a la especie humana (Moreno, R., 1986).

Los primeros estudios para la determinación de la sangre surgen en el año 1853, cuando el anatomista Ludwig Teichmann de Cracovia, (Franco de Ambriz, M.,1991) observa que la sangre tratada con ácido acético formaba cristales característicos (**cristales de Teichmann**), los que no se forman en presencia de metales oxidados o con sangre expuesta a más de 140°C (Franco de Ambriz, M.,1991; Moreno, R., 1986). La comprobación trajo como consecuencia que los criminalistas de aquella época aplicaran dicha técnica, para descubrir si una mancha era o no de sangre.

En 1900, Karl Landsteiner, como producto de sus observaciones (Franco de Ambriz, M.,1991) determinó que cuando la sangre de un individuo se mezclaba con la de otro, podía causar la formación de gránulos de forma irregular de células rojas y/o hemólisis, y descubrió la existencia de los grupos sanguíneos del sistema ABO, que son hasta la fecha, (Franco de Ambriz, M.,1991; Moreno, R., 1986) los grupos antígenos de sangre humana más importantes. Actualmente son casi 400 los tipos de grupos antígenos, mismos que han sido agrupados en numerosos sistemas (Franco de Ambriz, M.,1991).

En la actualidad los antígenos de grupo sanguíneo presentes en la saliva han permitido relacionarlos con la frecuencia de cierto tipo de patógenos periodontales y

microorganismos comensales de la cavidad oral (Ligtenberg, AJM. et al 1990 ; Tills, D., Kopek, A., Tills, R., 1983).

Landsteiner, en colaboración con Miller en 1925, aportaron el método clásico de absorción (Franco de Ambriz, M.,1991) para la determinación del grupo sanguíneo del sistema ABO en manchas de sangre seca. El método fue descrito por Wiener con el nombre de técnica de **absorción-inhibición**, y utilizado tanto para el sistema ABO, como para los antígenos eritrocitarios. El **sistema M,N** fue descubierto en 1927 también por Landsteiner. En 1939, Wiener, (Franco de Ambriz, M.,1991) descubre el **sistema Rhesus (Rh)**. Ducos y Reffia en 1954 demuestran la presencia de este sistema en sangre seca.

Ejemplos de estos descubrimientos con utilidad en criminalística son:

- \* Un inculpado presenta en sus vestidos manchas de sangre del grupo B; si este individuo pertenece al grupo B, no puede afirmarse que las manchas no provienen de él, pero si éste pertenece al grupo A, es evidente que las manchas provienen de otro individuo.
- \* Si en la víctima encontramos sangre del grupo O, y en el arma del inculpado se halla sangre del grupo O, la inculpación no es contradictoria. Pero si se encuentra en el arma sangre del grupo B, ésta, con toda seguridad no procede de la víctima.

Uhlenhuth, (Fernández P.R.,1992) descubrió que inyectando sueros de diferentes animales, obtenía un suero que precipitaba, pero solamente con sangre del animal cuyo suero se había inyectado. De esta manera, si se inyectaba sangre humana a un animal "X", al cabo de cuatro semanas se obtenía un suero que precipitaba solamente con sangre humana (Ganong, WF., 1988).

El procedimiento de Uhlenhuth para identificar la especie animal de la cual procede la sangre, se le denominó **Prueba de las precipitinas**, (Franco de Ambriz, M.,1991; Moreno, R., 1986) constituyendo para la criminalística, el más grande y portentoso descubrimiento de comienzos del siglo XX (Franco de Ambriz, M.,1991; Moreno, R., 1986).

En 1960, Kind introduce el **método de absorción-elución** como complemento del de absorción-inhibición, para la determinación de los grupos sanguíneos ABO (Franco de Ambriz, M.,1991) Nichols y Pereira en 1962, reportaron su uso tanto para el sistema ABO

como para el sistema M,N, y en 1968, Lincoln y Dodo efectúan pruebas con técnicas de elución de los antígenos del sistema Rh (Franco de Ambriz, M.,1991).

Actualmente existen otras formas de identificación médico-legales que utilizan las pruebas de **ELISA** en combinación con análisis fotométrico (Morita K, Itoh Y, Kimura H., 1995) ó pruebas de actividad de peroxidasa que pueden ser incluso más sensibles 200-500 veces más, para determinar la presencia de secretores tipo B y AB en saliva, comparado con el método de inhibición hemaglutinación, que es de los métodos más comúnmente utilizados en la práctica forense (Yukawa, N. et al 1995).

## **CAPÍTULO 2. GRUPOS SANGUÍNEOS.**

La sangre es un líquido rojizo que circula por todos los vasos, excepto, por los linfáticos. Tiene una temperatura aproximada de 38° C y un pH entre 7.35 y 7.45 Tortora, G., 1988).

La sangre constituye un 8% del peso corporal total. Su volumen en el varón promedia entre 5-6 litros, y en la mujer entre 4-5 litros (Ganong, WF., 1988).

La sangre consiste en elementos figurados, que son células y plasma, que es el líquido que contiene sustancias en disolución. Los elementos figurados abarcan el 45% del volumen de la sangre, mientras que al plasma le corresponde el 55% restante (Ganong, WF., 1988).

Los elementos figurados son:

La concentración promedio de elementos figurados en la sangre es:

Neutrófilos 60 a 70 %

Eosinófilos 2 a 4 %

Basófilos 0.5 a 1 %

Linfocitos 20 a 25 %

Monocitos 3 a 8 %

Plaquetas 250 000 a 400 000/mm<sup>3</sup> de sangre.

Los eritrocitos, tienen aspecto de discos bicóncavos que miden 8 µm de diámetro, carecen de núcleo, y no pueden reproducirse ni llevar a cabo actividades metabólicas



como para el sistema M,N, y en 1968, Lincoln y Dodo efectúan pruebas con técnicas de elución de los antígenos del sistema Rh (Franco de Ambriz, M.,1991).

Actualmente existen otras formas de identificación médico-legales que utilizan las pruebas de **ELISA** en combinación con análisis fotométrico (Morita K, Itoh Y, Kimura H., 1995) ó pruebas de actividad de peroxidasa que pueden ser incluso más sensibles 200-500 veces más, para determinar la presencia de secretores tipo B y AB en saliva, comparado con el método de inhibición hemaglutinación, que es de los métodos más comúnmente utilizados en la práctica forense (Yukawa, N. et al 1995).

## **CAPÍTULO 2.**

### **GRUPOS SANGUÍNEOS.**

La sangre es un líquido rojizo que circula por todos los vasos, excepto, por los linfáticos. Tiene una temperatura aproximada de 38° C y un pH entre 7.35 y 7.45 Tortora, G., 1988).

La sangre constituye un 8% del peso corporal total. Su volumen en el varón promedia entre 5-6 litros, y en la mujer entre 4-5 litros (Ganong, WF., 1988).

La sangre consiste en elementos figurados, que son células y plasma, que es el líquido que contiene sustancias en disolución. Los elementos figurados abarcan el 45% del volumen de la sangre, mientras que al plasma le corresponde el 55% restante (Ganong, WF., 1988).

Los elementos figurados son:

La concentración promedio de elementos figurados en la sangre es:

Neutrófilos 60 a 70 %

Eosinófilos 2 a 4 %

Basófilos 0.5 a 1 %

Linfocitos 20 a 25 %

Monocitos 3 a 8 %

Plaquetas 250 000 a 400 000/mm<sup>3</sup> de sangre.

Los eritrocitos, tienen aspecto de discos bicóncavos que miden 8 µm de diámetro, carecen de núcleo, y no pueden reproducirse ni llevar a cabo actividades metabólicas

considerables. Su membrana plasmática es semipermeable y está compuesta por estromatina, lecitina y colesterol, y envuelve al citoplasma un pigmento rojizo la hemoglobina, que corresponde al 33% de peso del eritrocito y que es la causa del color rojo de la sangre (Ham, AW., 1984).

Los valores normales de hemoglobina son de 14 a 20 g por 100 ml de sangre en lactante; 12 a 15g por 100 ml en mujeres adultas y 14 a 16.5 g. por 100 ml en varones adultos (Tortora, G., 1981).

Los leucocitos son células nucleadas que se clasifican en dos grupos: granulocitos, que surgen de la médula ósea, tienen gránulos en el citoplasma y poseen núcleos lobulados (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y agranulocitos que derivan de los tejidos linfoides y mieloides y no presentan gránulos citoplásmicos (linfocitos y monocitos) (Ganong, WF., 1988).

Las plaquetas son fragmentos de células megacariocíticas, rodeadas por una membrana celular. Participan directamente en los procesos de coagulación (Ham, AW., 1984).

El plasma es un líquido color ámbar pálido, que queda después de separar los elementos figurados de la sangre. A las proteínas contenidas en el plasma se les llama proteínas plasmáticas. Las globulinas comprenden el 38% de las proteínas plasmáticas y son los anticuerpos que liberan las células plasmáticas. El fibrinógeno constituye el 70% de las proteínas plasmáticas y participa en la coagulación de la sangre junto con los trombocitos (Ham, AW., 1984).

El plasma o fracción líquida de la sangre, ocupa el 55% del volumen total.

El plasma contiene numerosas proteínas que, desde el punto de vista de la criminalística son importantes, ya que entre ellas se encuentran las precipitinas, fibrinógeno, albúmina y globulinas, elementos que permiten efectuar la determinación del grupo sanguíneo eritrocitario al que pertenecen (Ham, AW., 1984).

Los eritrocitos humanos están revestidos por una membrana que presenta una estructura química compleja, (Rifkind, A., 1986) que contiene diversos antígenos de grupos sanguíneos llamados **aglutinógenos** (Ganong, WF., 1988).

El término antígeno, etimológicamente significa ANTI= contra, GENNAN= engendrar (Ham, AW., 1984). Un antígeno es una sustancia (macromolécula, virus, bacteria, etc.) contra la cual se produce un anticuerpo específico, cuando dicha sustancia entra en los tejidos y se pone en contacto con líquidos y células corporales (Ham, AW., 1984).

Los anticuerpos son aquellas sustancias específicas de la sangre y líquidos de los animales inmunes, producida como reacción a la introducción de un antígeno y que ejerce una acción antagonista específica sobre la sustancia por cuya influencia se ha formado (Marcaro y Poscar, J., 1983).

La molécula estructural de los anticuerpos es simétrica y en forma de Y, formada por cuatro cadenas de polipéptidos. Dos de ellos son cadenas pesadas idénticas y los otros dos, son cadenas ligeras idénticas. Cada cadena está compuesta por aminoácidos (Ham, AW., 1984). **Fig. 1**

Entre las inmunoglobulinas IgG, IgM, e IgA existen anticuerpos activos contra antígenos eritrocitarios. Los sitios de captación del antígeno se encuentran en el extremo de la molécula aminoterminal y de la región variable (Rifkind A., 1986).

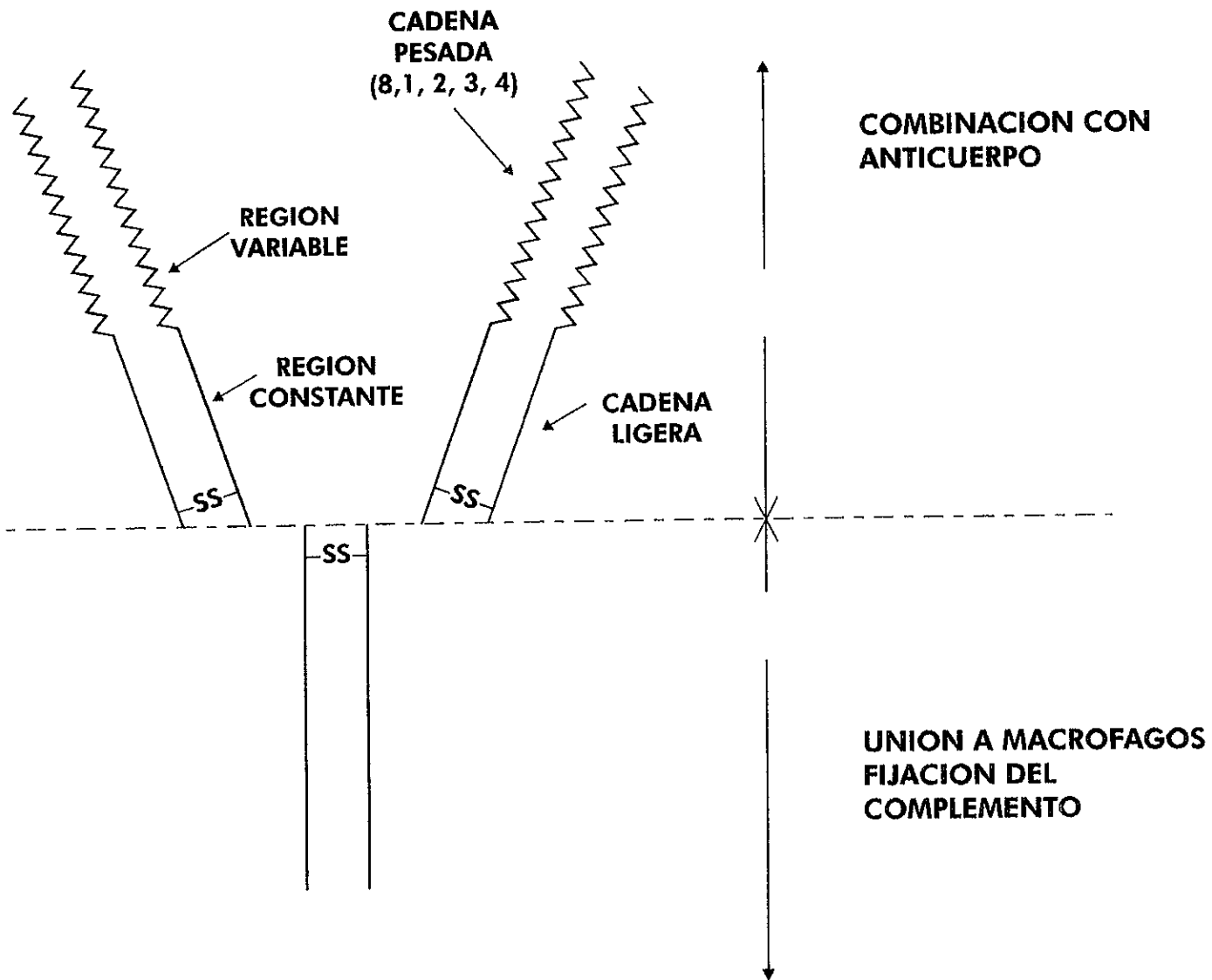
### **TIPIFICACIÓN DEL SISTEMA ABO, H Y LEWIS**

Los grupos sanguíneos humanos son comúnmente determinados por el método de hemaglutinación de eritrocitos con anticuerpos específicos de grupo sanguíneo, e incluso pueden también determinarse en secreciones y fluidos corporales (jugo gástrico, sudor, líquido espermático y saliva), (Ligtenberg, AJM., *et al* 1990) usando los mismos anticuerpos (Yazawa, S., Ohkawara, H., 1992). Así mismo se ha podido determinar la presencia de grupos sanguíneos a partir de la pulpa dental (Lessing, R., Edelmann, J., 1995).

Los individuos de tipo A, tienen un gen que codifica una transferasa, que cataliza la colocación de una N-acetilgalactosamina sobre el antígeno H. Los individuos del tipo B, presentan un gen que codifica la formación de una transferasa, que a su vez coloca una galactosa terminal. Los del tipo AB poseen las dos transferasas. Los del tipo O no tienen ninguna, por lo cual persiste el antígeno H.

# ESTRUCTURA

# PROPIEDADES FUNCIONALES



**ESTRUCTURA BASICA DE LA INMUNOGLOBULINA Y SUS PROPIEDADES FUNCIONALES**

Landsteiner descubrió la existencia del sistema ABO, al observar que la sangre humana tenía características individuales que se manifestaban por reacciones de aglutinación, pues encontró que los eritrocitos de una persona eran aglutinados o agrupados por el suero sanguíneo de solamente algunos otros individuos (Franco de Ambriz, M., 1991).

Desde el punto de vista clínico, el sistema ABO es el más importante de los grupos sanguíneos (Ganong, WF., 1988; Rifking, A., Banic A., 1986). La presencia o ausencia en los eritrocitos de los antígenos de grupo sanguíneo A y B, determinan los cuatro grupos del sistema, por lo tanto podemos encontrar a individuos pertenecientes a los siguientes grupos A, B, AB, y O, clasificación en la que el O denota la ausencia de A y de B.

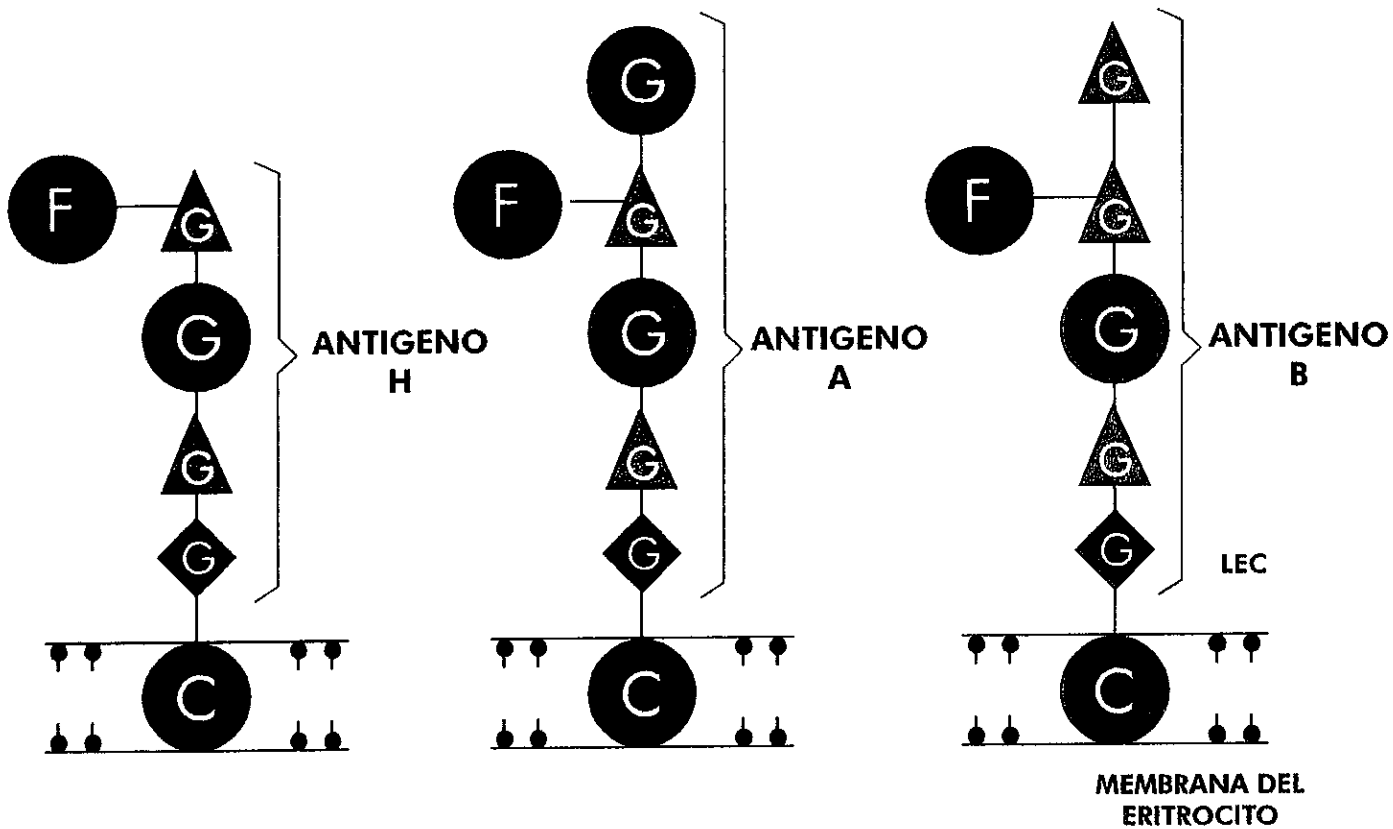
Los antígenos A y B son oligosacáridos complejos, que se diferencian por su azúcar terminal. En los eritrocitos son en su mayoría glucoesfingolípidos, mientras que en otros tejidos son glucoproteínas (Ganong, WF., 1988):

Un gen H, codifica la formación de una transferasa, que ubica a este último azúcar en el extremo de estos glucolípidos o glucoproteínas, con lo cual se forma el **antígeno H**, que suele estar presente en los sujetos de todos los tipos sanguíneos (Ganong, WF., 1988). **Fig. 2.**

Un hecho sobresaliente de este sistema es la presencia regular de anticuerpos **anti-A** y **anti-B**, en el suero de individuos cuyos eritrocitos no tienen el correspondiente aglutinógeno (Franco de Ambriz, M., 1991) Estos aglutinógenos se encuentran en muchos tejidos (glándulas salivales, páncreas, riñón, hígado, pulmón) (Lisker, R., Armendares, S., 1984) y fluidos corporales (saliva, semen y líquido amniótico), (Ganong, WF., 1988) incluyendo la sangre.

Se han descrito subgrupos en el tipo A, siendo los de mayor importancia el A1 y A2 (secretores y no secretores).

Los anticuerpos contra los aglutinógenos de los eritrocitos se llaman **aglutininas**. Los individuos del grupo A desarrollan anticuerpos anti-B, los del tipo B, anticuerpos anti-A, los del tipo O desarrollan ambos tipos y los del tipo AB, ninguno. (**Cuadro 1**)



## ANTIGENOS DEL SISTEMA ABO SOBRE LA SUPERFICIE DE LOS ERITROCITOS



Las personas con sangre de tipo AB, son **receptoras universales** porque no tienen aglutininas circulantes y se les puede dar sangre de cualquier tipo sin que presenten reacción alguna debido a incompatibilidad ABO.

Los individuos de tipo O son **donadores universales** porque no tienen antígenos A y B; la sangre tipo O puede administrarse a cualquier sujeto sin producir una reacción de transfusión, debido a la compatibilidad ABO (Ganong, WF., 1988).

La actividad del grupo sanguíneo Lewis (**lea** y **leb**) tiene relación estructural con el sistema ABO, pero difiere por ser un material antagónico plasmático soluble, que se une a la membrana eritrocítica pero no es un producto de ésta.

La actividad de Lewis es producto de un gen estructural, secretado en forma independiente de los loci ABO y H, por una transferasa que coloca L-fructuosa por enlace glucosídico en posición 1-4 con la N-acetilglucosamina en un polisacárido precursor.

Lewis es un carácter dominante, por lo que el genotipo homocigoto recesivo **le/le** no genera esta actividad (Rifkind, A., Banic, A., 1986).

El producto antigénico de la actividad de la transferasa de Lewis se llama **lea** y puede reconocerse por antiseros específicos **anti-lea**. La inserción de la fucosa determinada por **le**, y de la fucosa determinada por H genera actividad antigénica **leb**, soluble, que al igual que **lea** se una a la membrana de los eritrocitos circulantes.

Otro locus genético independiente secretor, con dos alelos es **Se** y **se**, que determina si las actividades antigénicas A, B y H genera en mucopolisacáridos solubles, como los que existen en la saliva, jugo gástrico o líquido amniótico.

La frecuencia de los genes **Se** y **se** es de 64% y 36% respectivamente. La prevalencia de las diferentes expresiones fenotípicas es de 40.83% para **Se-Se**, del 41.15% para **Se-se** y del 13.10% para **se-se** (Emeribe, AO., Igweagu, Ca., Osim, EE., 1992). El genotipo homocigoto recesivo **se-se**, no se puede introducir en A, B o H en estos líquidos, pero no obstaculiza su expresión sobre las superficies celulares.

### CUADRO 1. RESUMEN DEL SISTEMA SANGUÍNEO

GRUPO	SUBGRUPO	ANTIGENO EN ERIROCITO	ANTICUERPO EN SUERO	AGLUTININAS EN EL PLASMA
O	-	NINGUNO	ANTI A1 ANTI A ANTI B	ANTI A ANTI B
A	A1 A2	ANTI A A	ANTI B ANTI A1	ANTI B
B	-	B	ANTI A ANTI A1	ANTI A
AB	A1B A2B	ANTI A + B A + B	NO ANTI A1	NINGUNO



## HERENCIA DE LOS ANTÍGENOS A, B

Los genes pueden definirse como las unidades de transmisión hereditaria, (Grolier, 1980) y toda característica genéticamente determinada depende de la acción de cuando menos un par de genes homólogos, que se denominan alelos.

Cuando ambos alelos son iguales entre sí, se dice que el individuo es homocigoto para ese par de genes, y cuando son diferentes se le llama heterocigoto (Lisker, R., Armendares, S., 1984). **Fig. 3.**

En el estado homocigoto, al ser ambos genes iguales entre sí, tienen la misma información genética. En el heterocigoto los alelos son desiguales, lo que quiere decir que tienen información distinta para la misma característica, de lo cual derivan dos situaciones:

1) Que sólo se exprese la acción de uno de los alelos, y en este caso se dice que es dominante sobre el otro, el que por definición se conoce como recesivo (los genes recesivos sólo se pueden expresar en estado de homocigocidad).

2) Que ambos genes se expresen y entonces se dice que son codominantes (Lisker, R., Armendares, S., 1984).

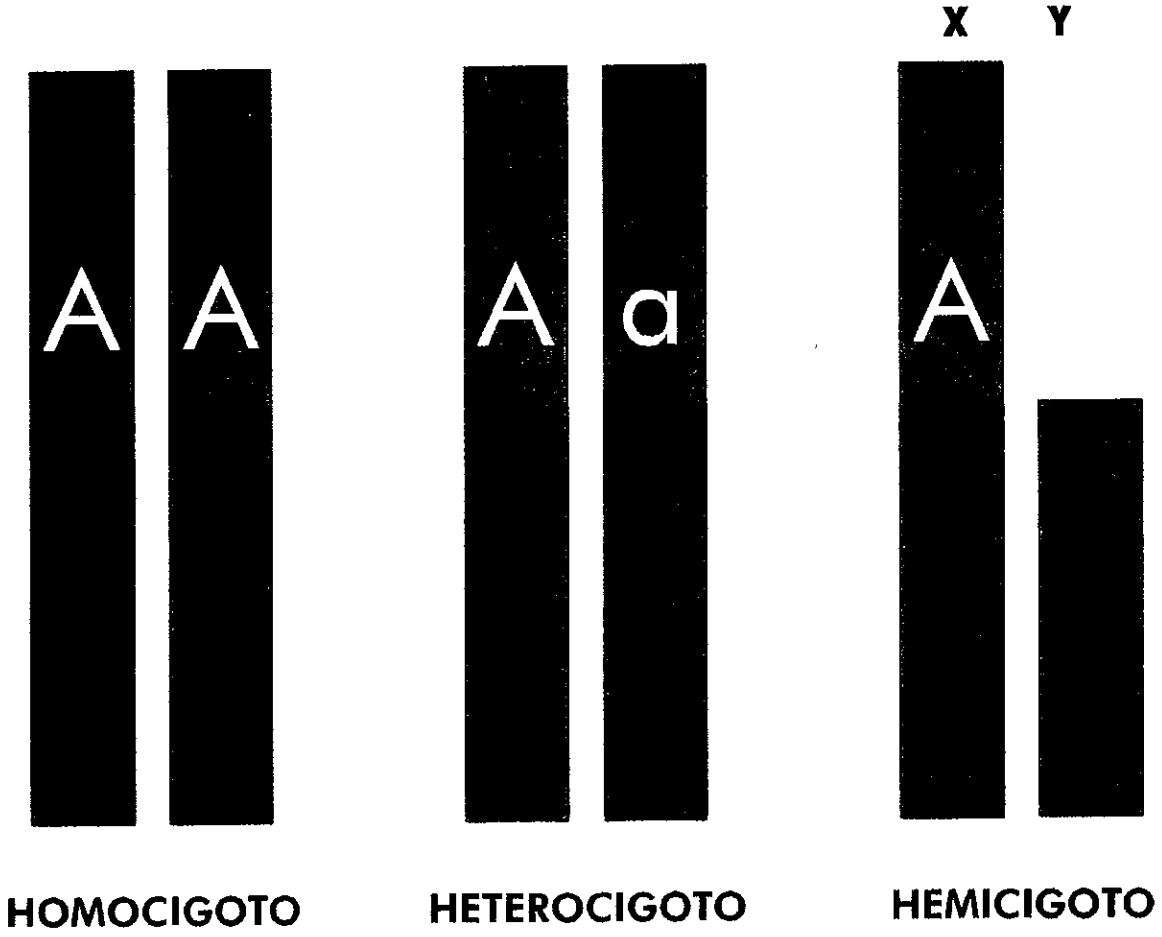
Los antígenos A y B se heredan como caracteres mendelianos dominantes y los individuos se dividen principalmente en cuatro tipos sanguíneos sobre estas bases (Ganong, WF., 1988; Grolier, 1980).

Los antígenos eritrocíticos están determinados por fenómenos genéticos, pero el mecanismo de expresión difiere según la naturaleza de cada uno de los sistemas antigénicos.

En el caso de los antígenos determinados por polisacáridos, como el sistema ABO, los productos genéticos efectivos son glucosiltransferasas capaces de formar los enlaces glucosídicos específicos que caracterizan a cada uno de los antígenos polisacáridos (Rifkind, A., Banic, A., 1986)

Los antígenos A y B son transmitidos como alelomorfos mendelianos, siendo dominantes A y B. Por ejemplo, un individuo con sangre de tipo B puede haber heredado antígeno B de cada progenitor o un antígeno B de un progenitor y uno O de otro; así, un individuo cuyo fenotipo es B puede tener el genotipo BB (homocigoto), o el genotipo BO (heterocigoto).

**AUTOSOMAS                      SEXUALES**



**TIPOS DE CROMOSOMAS Y CONCEPTO DEL ESTADO HOMOCIGOTO, HETEROCIGOTO Y HEMICIGOTO PARA UN PAR DE GENES ALELOS A y a.**

Hay seis genotipos que corresponden a los cuatro grupos sanguíneos. (cuadro 2)

## CUADRO 2. GRUPOS SANGUÍNEOS

GRUPO S	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO AB
OO	AAoAo	BBoBo	A/B

Landsteiner y Levine, demostraron que los subgrupos de los grupos AB son hereditarios. Thomsen, Friedenreich y Worsaae modificaron la teoría de Berstein, explicando la inclusión de los subgrupos, para lo cual incluyeron cuatro genes alélicos a saber: A1, A2, B y O.

### CAPÍTULO 3. SECRECIÓN DE SUSTANCIAS DE GRUPO SANGUÍNEO EN GLÁNDULAS SALIVALES

#### ESTADO SECRETOR DEL INDIVIDUO

Los aglutinógenos ABO, son polisacáridos que pueden estar presentes en las cadenas laterales de las glucoproteínas salivales y se encuentran en más del 80% de las personas secretoras y en menos del 15% de las no secretoras (Schneider, H., 1996).

Un individuo con la capacidad de producir sustancias reactivas de grupo sanguíneo en las glándulas exócrinas y de secretar dicha sustancia dentro de los fluidos corporales, tales como la saliva, se le denomina secretor (Green, C., 1989).

Los antígenos de grupo sanguíneo A1 han sido detectados en secreción salival y esperma mezclados con sangre, a partir del método de inmunoelectroforesis (Nikolenko, OV., Dianova, TN., 1987).

Se ha considerado una significativa correlación entre la frecuencia del estado secretor y el fenotipo de grupos sanguíneos ABO, aunque no sea evidencial una reacción con la edad o el sexo (Emeribe, AO., Igweagu, CA., Osim, EE., 1992).

En las **personas secretoras**, las sustancias de los grupos sanguíneos están presentes en concentraciones más elevadas en la saliva submandibular, y están totalmente ausentes de la saliva parotídea (Jenkins, GN., 1983).

Hay seis genotipos que corresponden a los cuatro grupos sanguíneos. (cuadro 2)

### CUADRO 2. GRUPOS SANGUÍNEOS

GRUPO O	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO AB
GENOTIPOS			
OO	AA, AO	BB, BO	AB

Landsteiner y Levine, demostraron que los subgrupos de los grupos AB son hereditarios. Thomsen, Friedenreich y Worsaae modificaron la teoría de Berstein, explicando la inclusión de los subgrupos, para lo cual incluyeron cuatro genes alélicos a saber: A1, A2, B y O.

## CAPÍTULO 3. SECRECIÓN DE SUSTANCIAS DE GRUPO SANGUÍNEO EN GLÁNDULAS SALIVALES

### ESTADO SECRETOR DEL INDIVIDUO

Los aglutinógenos ABO, son polisacáridos que pueden estar presentes en las cadenas laterales de las glucoproteínas salivales y se encuentran en más del 80% de las personas secretoras y en menos del 15% de las no secretoras (Schneider, H., 1996).

Un individuo con la capacidad de producir sustancias reactivas de grupo sanguíneo en las glándulas exócrinas y de secretar dicha sustancia dentro de los fluidos corporales, tales como la saliva, se le denomina secretor (Green, C., 1989).

Los antígenos de grupo sanguíneo A1 han sido detectados en secreción salival y esperma mezclados con sangre, a partir del método de inmunoelectroforesis (Nikolenko, OV., Dianova, TN., 1987).

Se ha considerado una significativa correlación entre la frecuencia del estado secretor y el fenotipo de grupos sanguíneos ABO, aunque no sea evidencial una reacción con la edad o el sexo (Emeribe, AO., Igweagu, CA., Osim, EE., 1992).

En las **personas secretoras**, las sustancias de los grupos sanguíneos están presentes en concentraciones más elevadas en la saliva submandibular, y están totalmente ausentes de la saliva parotídea (Jenkins, GN., 1983).

Experimentos con anti-A marcado con fluoresceína han demostrado histológicamente que la sustancia A sólo está presente en las células mucosas. Los factores M, N y Rh no están presentes en ninguna de las secreciones salivales.

El contenido de sustancias de los grupos sanguíneos en cada tipo de saliva puede relacionarse al número de células mucosas en las glándulas. La parótida casi siempre sólo contiene células serosas, pero algunas glándulas tienen unos cuantos acinos mucosos, lo que puede explicar la presencia ocasional de estas sustancias en la saliva parotídea. La saliva submandibular de los secretores contiene más carbohidratos ligados (en especial fucosa), que la de los no secretores (Jenkins, GN., 1983).

En los **no secretores** (sujetos cuyos glóbulos rojos contienen aglutinógenos, pero saliva inactiva) pueden aislarse sustancias similares, pero no poseen actividad de aglutinación (Jenkins, GN., 1983).

Los secretores A o B se reconocen porque sus salivas inhiben la aglutinación de eritrocitos A o B, con los respectivos anti-sueros (Green, C., 1989).

La saliva de los secretores de cualquiera de los grupos ABO, contiene la sustancias H, y por ello, es capaz de inhibir la aglutinación de eritrocitos tipo O por anti-H de *Ulex Europaeus* (de acuerdo con Ottensooser y Silberschmidt) (Green, C., 1989).

Las hemoaglutininas vegetales denominadas lectinas, fueron introducidas en la práctica serológica en 1948, por Renkonen. Se clasifican en inespecíficas cuando aglutinan eritrocitos de cualquier tipo, y específicas cuando aglutinan a determinados antígenos.

Entre las lectinas inespecíficas tenemos a las **lectinas** extraídas de poroto común, *Phaseus vulgaris*, de la Arveja, *Pisum sativum*, del Ricino *communis* y otras.

Entre las lectinas específicas, se mencionan especialmente las de *Dolichus biflorus* (anti-A), de *Ulex Europaeus* (anti-H) y de *Vicia gramnea* (anti-N).

La secreción o falta de secreción de las sustancias de grupo está relacionada con un gen dominante (*Se* en los secretores) o con un gen recesivo (*se* en los no secretores).

Aunque no se conocen todavía los mecanismos moleculares de la aparición de estos genes, se sabe que en los sujetos secretores, el gen *Se* dominante es la forma activa en los epitelios glandulares, donde estimula la producción de antígeno H por el tejido, lo que no puede hacer si estuviera presente el gen *se* recesivo (Rifkind, A., Banic, A., 1986).

Se cree que el gen *se*, dirige la producción de una fucosil transferasa específica de la cadena de tipo 1. Fig. 4. Mientras que otro gen H proporciona la enzima específica de la cadena de tipo 2. Fig. 5. El 90% de las sustancias de los grupos sanguíneos A y B en saliva, se relacionan con la cadena tipo 1 (Clausen, H., et al 1988; Wang, B., et al 1996).

La presencia de los grupos Lewis esta influida por el estado secretor o no secretor de los individuos de la siguiente manera: 1.El grupo *lea* presente en el 25-30% de la población, está asociado al estado de no secretor. 2.El grupo *leb* presente en el 70-75% de la población, está asociado al estado secretor.

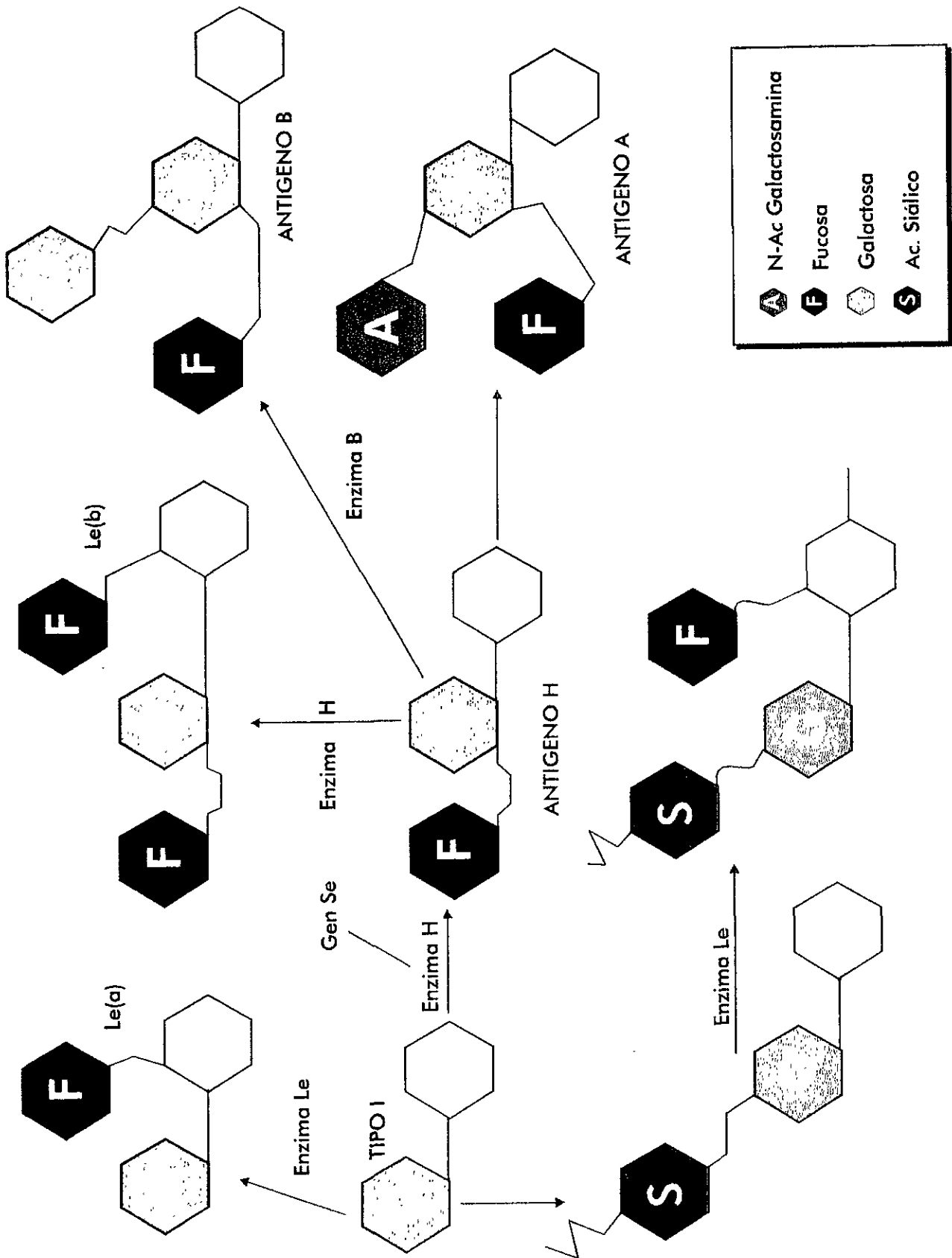
### **SUSTANCIAS DE GRUPO EN SALIVA**

En la cavidad oral, los antígenos de grupos sanguíneos se localizan ampliamente sobre las mucinas, pero también se encuentran sobre las células epiteliales (Gibbons, RJ., Qureshi, JV., 1978; Green, C., 1989; Lie, MA., et al 1994; Ligtenberg, AJM., et al 1990; Mackenzie, IC., Dabelsteen, E., Mandel, U., 1989).

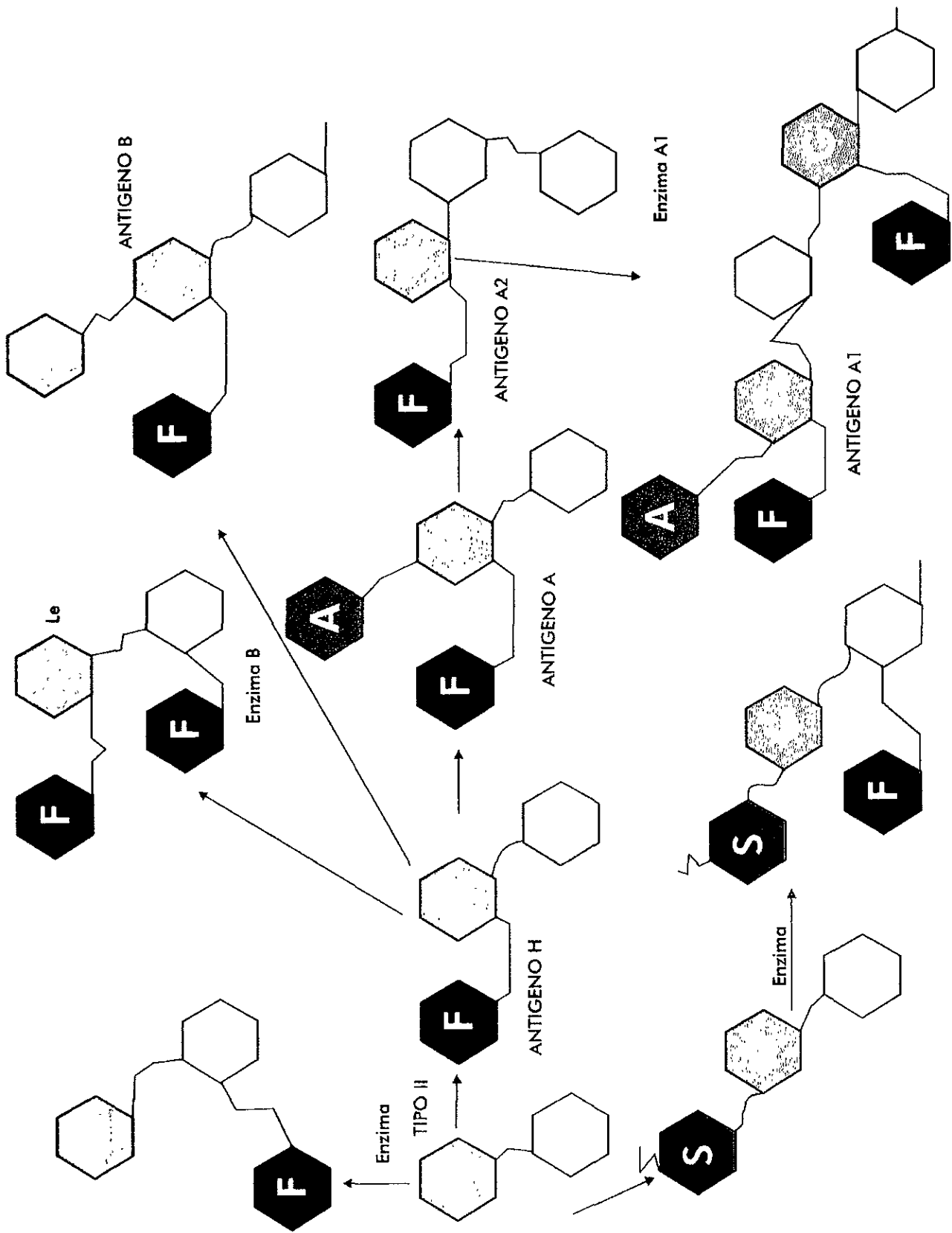
Los aglutinógenos A, B y O, son polisacáridos que pueden estar presentes en las cadenas laterales de las glucoproteínas salivales. Se encuentran en fluidos biológicos de aproximadamente el 75-80% de los individuos, los cuales por esta razón se denominan secretores, y en saliva se encuentran en concentraciones de 3 mg/100 ml, (Jenkins, GN., 1983) valor superior al determinado en glóbulos rojos, sudor, lágrimas y orina, en donde se encuentran en cantidades muy bajas. Las sustancias secretadas en saliva difieren de las sanguíneas, en que son mucoides en lugar de glucolípidas y son muy solubles en agua.

Debido al hecho de que en saliva, estas sustancias se encuentran en mayor concentración que en la sangre, se utiliza la técnica de absorción-inhibición para la tipificación en saliva de secretores (Franco de Ambriz, M., 1991).

A pesar de la concentración elevada de las sustancias específicas de grupo en saliva y semen de individuos secretores, existen serios problemas para la determinación de grupo, ya que un porcentaje pequeño de individuos de grupo A y O exhiben actividad B en fluidos corporales, algunos individuos B y O exhiben actividad B, y algunos individuos B y O exhiben actividad A.



**FIG. 4** Síntesis de los antígenos A, B y H, a partir de las cadenas de TIPO I



**FIG. 5** Síntesis de los antígenos AB y H, a partir de las cadenas de TIPO II



Aunque esta última situación es más común, dicha actividad anormal es muy baja respecto a la producida por las verdaderas sustancias de grupo, la cual puede ser determinada de manera adecuada usando las técnicas de absorción-inhibición y absorción-elución.

## CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE LA SALIVA

La saliva humana es una secreción mixta producida por tres pares de glándulas mayores: la parótida, la submandibular y la sublingual, (Dobrosielsky-Vergona, K., 1993; Jenkins, GN., 1983; Schottelius BA., 1975; Topek, M., 1975; Vick, R., 1986) y otras glándulas más pequeñas de la mucosa oral: labial, lingual, bucal y palatina, (Jenkins, GN., 1983) contribuyendo éstas con el 10% de la saliva total (Dobrosielsky-Vergona, K., 1993; Jenkins, GN., 1983).

Se secretan alrededor de 1000-1500 ml de saliva al día, (Ganong, WF., 1988; Jensen, D., 1979; Lehnartz, E., 1949; McClintic, JR., 1983; Mertz, E., 1978; Schottelius BA., 1975) y generalmente se acepta que el volumen total formado por la saliva en un día proviene en un 60-70% de la glándula submandibular, el 25-35% de la glándula parótida, y menos del 5% de la glándula sublingual. (Cuadro 3)

**CUADRO 3**  
**CARACTERÍSTICAS DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES MAYORES EN EL HUMANO**

GLÁNDULA	TIPO HISTOLÓGICO	SECRECIÓN	% DE SALIVA p/1.5 l/d
PARÓTIDA	SEROSA	SEROSA	20
SUBMANDIBULAR	MIXTA	SEROMUCOSA	70
SUBLINGUAL	MUCOSA	SEROSA	5

Las células serosas secretan ptialinas; las mucosas, mucina. El 5% restante del volumen salival lo forman glándulas linguales y otras pequeñas en la cavidad bucal.

Las células serosas secretan amilasa y las células mucosas secretan mucina. El 5% restante del volumen salival lo forman las glándulas linguales y otras glándulas pequeñas de la cavidad oral.

Aunque esta última situación es más común, dicha actividad anormal es muy baja respecto a la producida por las verdaderas sustancias de grupo, la cual puede ser determinada de manera adecuada usando las técnicas de absorción-inhibición y absorción-elución.

## **CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE LA SALIVA**

La saliva humana es una secreción mixta producida por tres pares de glándulas mayores: la parótida, la submandibular y la sublingual, (Dobrosielsky-Vergona, K., 1993; Jenkins, GN., 1983; Schottelius BA., 1975; Topek, M., 1975; Vick, R., 1986) y otras glándulas más pequeñas de la mucosa oral: labial, lingual, bucal y palatina, (Jenkins, GN., 1983) contribuyendo éstas con el 10% de la saliva total (Dobrosielsky-Vergona, K., 1993; Jenkins, GN., 1983).

Se secretan alrededor de 1000-1500 ml de saliva al día, (Ganong, WF., 1988; Jensen, D., 1979; Lehnartz, E., 1949; McClintic, JR., 1983; Mertz, E., 1978; Schottelius BA., 1975) y generalmente se acepta que el volumen total formado por la saliva en un día proviene en un 60-70% de la glándula submandibular, el 25-35% de la glándula parótida, y menos del 5% de la glándula sublingual. (Cuadro 3)

**CUADRO 3  
CARACTERÍSTICAS DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES MAYORES EN EL HUMANO**

GLÁNDULA	TIPO HISTOLÓGICO	SECRECIÓN	% DE SALIVA 1-5 l/d
PARÓTIDA	SEROSA	SEROSA	20
SUBMANDIBULAR	MIXTA	MUCOMUCOSA	70
SUBLINGUAL	MUCOSA	MUCOSA	5

Las células serosas secretan ptialinas; las mucosas, mucina. El 5% restante del volumen salival lo forman glándulas linguales y otras pequeñas en la cavidad bucal.

Las células serosas secretan amilasa y las células mucosas secretan mucina. El 5% restante del volumen salival lo forman las glándulas linguales y otras glándulas pequeñas de la cavidad oral.

A diferencia de otras glándulas del cuerpo humano, el control de la secreción salival es exclusivamente neural. La inervación de las glándulas está dada principalmente por fibras parasimpáticas de los nervios craneales facial y glossofaríngeo (VII y IX, respectivamente) (McClintic, JR., 1983).

Los nervios simpáticos relacionados, son menos importantes y se derivan del ganglio cervical superior. Las fibras parasimpáticas son las principales controladoras de la secreción (McClintic, JR., 1983). El control se ejerce fundamentalmente mediante un mecanismo reflejo que utiliza las papilas gustativas como receptores.

Cuando la saliva disuelve los alimentos, parte del material entra a las papilas gustativas de la lengua, y genera impulsos nerviosos. Estos impulsos viajan por los dos nervios craneales a los centros salivales del tallo cerebral y los impulsos de regreso, viajan por los mismos nervios craneales a las glándulas salivales. Estas últimas, actúan como efectores produciendo saliva (McClintic, JR., 1983).

La saliva contiene aproximadamente 33% de proteínas, 19% de carbohidratos y 3% de ácido siálico (Jenkins, GN., 1983).

## **COMPOSICIÓN DE LA SALIVA**

La composición de la saliva producida en cualquier glándula varía con el ritmo de flujo y modificaciones de presión osmótica, que a su vez cambia según el tipo, intensidad y duración del estímulo utilizado para obtener la muestra (Bard, P., 1975; Lehnartz, E., 1949)

En consecuencia, la composición de la saliva puede variar con los cambios en el estímulo, (Vick, R., 1986) obteniendo resultados mucho más reproducibles en el análisis de la secreción de las glándulas separadas, que en el de la saliva mezclada. Aún en este caso, se observan variaciones, relacionadas con la hora del día o con el consumo de alimentos (Jenkins, GN., 1983; Lehnartz, E., 1949).

Los componentes de la saliva más importantes son de naturaleza orgánica, específicamente la mucina, un albuminoide característico de naturaleza mucosa, que recubre a las partículas alimenticias y las lubrica, (Lehnartz, E., 1949) confiriéndole a la saliva una consistencia viscosa (Bard, P., 1975; Mertz, E., 1978).

La saliva por lo general es neutra o débilmente ácida, con un pH de 6 a 7 (Mazur, A., Harrow, B., 1987).

La saliva humana contiene aproximadamente 99.5% de agua y 0.5% de sólidos. En el **Cuadro 4** se presentan las características y los componentes de la misma.

La presencia de material suspendido (bacterias, células epiteliales, mucina), (Ocaranza, R., 1979) la pérdida espontánea de CO<sub>2</sub>, (Rein, H., 1980) después de la recolección de saliva, causan cambios en la composición en reposo, por lo que la exactitud de ciertos análisis depende del tiempo que transcurre entre la recolección y el análisis (Jenkins, GN., 1983).

## **CONSTITUYENTES ORGÁNICOS DE LA SALIVA**

### **PROTEÍNAS DE LA SALIVA**

El contenido total de proteínas en la saliva humana es en promedio de 300 mg/100 ml, pero puede variar considerablemente. Tanto en la saliva parotídea como en la submandibular están presentes varias proteínas (Jenkins, GN., 1983). Estas proteínas son:

- a) Diversas enzimas, entre las que destacan la amilasa (más elevada en la saliva parotídea) y la lisozima (más alta en la saliva submandibular).
- b) Las glucoproteínas
- c) Las inmunoglobulinas de los tipos IgA, IgM, e IgG.

**CUADRO 4**  
**ALGUNOS CONSTITUYENTES Y CARACTERÍSTICAS DE LA SALIVA DEL ADULTO HUMANO**

CONSTITUYENTE O PROPIEDAD	CONCENTRACION
pH	5.8-7.1
Agua	994 g/l
Sodio	6-25 meq/l
Potasio	1441 meq/l
Bicarbonato	2-13 mg/l
Cloruro	15-31.5 meq/l
Fósforo (Inorgánico)	81-217 mg/l
Fósforo (Orgánico)	0-133 mg/l
Calcio	2.3-5.5 meq/l
Thiocianato	24-380 mg/l
Magnesio	0.16-1.06 meq/l
Yodo	0.002-0.202 mg/l
Urea	140-750 mg/l
Amoníaco	10-120 mg/l
Aminoácidos (resultado de la acción bacteriana sobre las proteínas)	Variable Se han encontrado 21
Acido úrico	5-29 mg/l
Proteína (albumina y globulina)	1.4-6.4 g/l
Ligolizina (enzima láctica) (lactosa)	0.15 g/l
Amilasa (ptialina)	0.98 mg/ml
Glucosa	100-300 mg/l
Coolesterol	25-500 mg/l
Vitaminas C	0.58-3.78 mg/l
Mucina	0.8-6.0 g/l

## ENZIMAS

Las enzimas se definen como sustancias de origen biológico que catalizan una reacción, (Farias, G., 1991) y son moléculas proteicas gigantescas que facilitan y organizan las reacciones químicas del cuerpo (Warner, R., 1972).

La **amilasa** es la enzima más importante de la saliva y se le conoce también como ptialina (Jenkins, GN., 1983; McClintic, JR., 1983) o diastasa salival (Ocaraza, F., 1979)

La amilasa es una enzima hidrolítica, (McClintic, Jr., 1983) secretada en altas concentraciones por la glándula parótida, (Jenkins, GN., 1983; Moreno, R., 1987) y es la única enzima salival que participa en forma importante en la digestión. Ha sido aislada de la saliva humana en forma de proteína cristalina (Bard, P., 1975).

Las amilasas son de dos tipos: alfa-amilasas y beta-amilasas.

Las alfa-amilasas atacan al azar los enlaces 1:4 entre las moléculas de glucosa en la amilasa y la amilopectina. Los productos finales son maltosa, algo de glucosa de la amilopectina y algunas dextrinas (Bard, P., 1975; Jenkins, GN., 1983; Rein, H., 1980).

Las beta-amilasas se encuentran en las plantas y se encuentran en la boca gracias a las bacterias. Atacan el almidón, descomponiendo las unidades de maltosa una por una, lo que gradualmente reduce el tamaño de la molécula.

El pH óptimo para la actividad de la enzima fluctúa entre 6 y 8, (Jenkins, GN., 1983; Mazur, A., Harrow, B., 1987; Topek, M., 1975; Vick, R., 1986) y es estable entre 4 y 11 (McClintic, JR., 1983; Schottelius, BA., 1975).

La amilasa hidroliza los almidones conocidos en dos fases:

- 1) digestión hasta dextrinas (unidades que contienen de unas cuantas a varios cientos de moléculas de azúcar simple); (McClintic, JR., 1983).
- 2) digestión hasta disacáridos (unidades que contienen dos moléculas de azúcar simple).

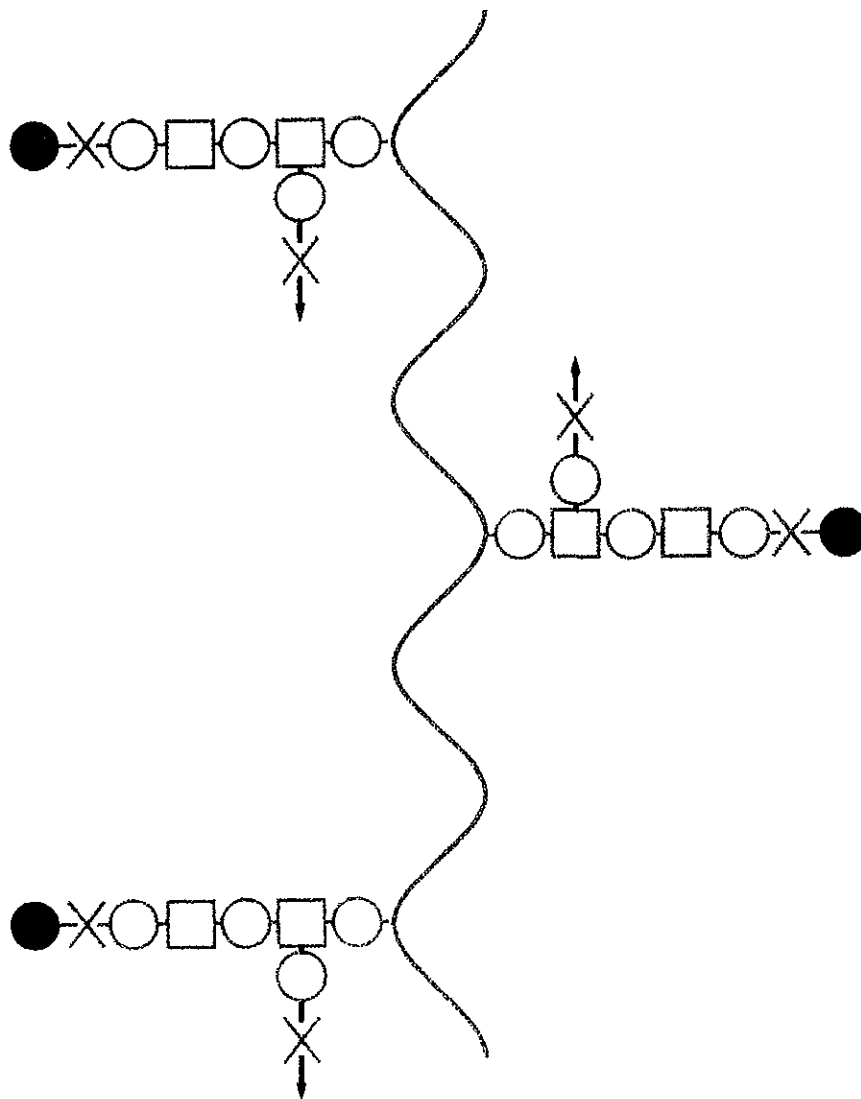
La saliva parotídea tiene una concentración de amilasa de cuando menos el cuádruple de la que hay en la saliva submandibular y los extractos de glándulas sublinguales humanas (material post-mortem).

Es evidente que el alimento permanece en la boca durante un tiempo demasiado corto para permitir que se produzca alguna digestión del almidón, (McClintic, JR., 1983) por lo que la acción principal de la amilasa salival, es digerir el almidón de los residuos alimenticios que permanecen en la boca después de las comidas, más que a contribuir al proceso completo de la digestión.

En 1922, Fleming descubrió en las lágrimas, la secreción nasal, la saliva y en la mayoría de los tejidos y fluidos corporales una sustancia que mata y disuelve al *Micrococcus lysodeikticus*. Esta sustancia se llama **lisozima** o muramidasa, cuya concentración es mayor en la glándula submandibular y, es antibacteriana por naturaleza.

La lisozima rompe los enlaces 1:4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina. Estos enlaces están presentes en las paredes de ciertas bacterias, (Ganong, WF., 1988) y su ruptura causa su muerte y desintegración (Jenkins, GN., 1983).

**FIG. 6**



**Fig. 6.** Representación diagramática de la estructura de una glucoproteína (no necesariamente idéntica a la de la saliva humana). La línea ondulada representa la hélice del polipéptido y las cadenas laterales de carbohidrato están formadas por los siguientes constituyentes: ● ácido siálico, X-D-galactosa, O-N-a-cetiglucosamina, □ -manosa, △ -fucosa. En algunas proteínas salivales también se encuentra presente sulfato.

La efectividad de la lisozima en la saliva se reduce por la presencia de mucina, que inhibe su acción.

La lisozima es detectable en el feto humano aproximadamente entre la 9a. y 12a. semana de vida intrauterina. La lisozima inhibe mediante lisis el desarrollo de numerosas bacterias patógenas (Macaro y Poscar, J., 1983).

La saliva parotídea, contiene concentraciones variables de 1) **fosfatasa ácida**, (Jenkins, GN., 1983) enzima que libera ácido fosfórico de los compuestos fosfato orgánicos, (Cantaron, A., Schepartz, B., 1988) 2) **esterasas** y 3) **colinesterasas** (Jenkins, GN., 1983) enzimas que actúan de manera principal en los glicéridos de ácidos grasos de cadena corta y otros ésteres de ácidos grasos, (Cantaron, A., Schepartz, B., 1988) 4) **aldolasas** (Jenkins, GN., 1983) enzimas que condensan el aldol entre la fosfodihidroxiacetona y aldehídos para producir ácido cetofosfórico, (Mascaro y Poscar, J., 1983) y lisozima, (Jenkins, GN., 1983) ya mencionada anteriormente.

En la saliva de los conductos salivales también se han encontrado 5) **lipasas**.

Se han detectado otras enzimas en cantidades adicionales que proceden de la flora de los tejidos orales, tales como 6) **fosfatasa alcalina**, 7) **catalasa**, 8) **hialuronidasa**, 9) **proteinasas**, 10) **ureasa** y 11) **desaminasas** y, algunas otras encargadas de convertir los carbohidratos en ácido láctico (Jenkins, GN., 1983).

### **GLUCOPROTEÍNAS**

La saliva contiene una mezcla de glucoproteínas, las cuales se conocieron anteriormente como **mucina** o mucoides, que son glucoproteínas de alto peso molecular que contienen 70-90% de carbohidratos y su unión glucopéptida está compuesta de N-acetilgalactosamina, con serina o treonina (Ligtenberg, AJM., 1990).

Las glucoproteínas son resistentes a las enzimas proteolíticas (de ahí su efecto protector sobre la pared del tracto digestivo), debido a que las cadenas laterales del carbohidrato evitan que las enzimas alcancen el núcleo de la proteína. **Fig. 6.**

El 75-85% de la molécula corresponde a las cadenas laterales de carbohidrato con un promedio de ocho residuos por cadena y que contiene **galactosa**, **glucosamina** y **galactosamina** en una relación de 4:3:1



Otros grupos en algunas de las moléculas son **fucosas** (una metil pentosa), **sulfato** y **ácido siálico** (ácido N-acetil neuroamínico -NANA-), que pueden considerarse como un producto de condensación del ácido pirúvico y una amina de azúcar, casi siempre manosamina. Algunos de estos constituyentes están distribuidos en el mismo orden que las sustancias en los grupos sanguíneos y su presencia confiere actividad de grupo sanguíneo a las **glucoproteínas**.

En la saliva completa se han detectado dieciocho aminoácidos, de éstos, nueve se han encontrado en forma constante y los otros nueve, en determinadas ocasiones.

La concentración total de aminoácidos es de aproximadamente 4 mg% y, excepto la **glicina** cuya concentración oscila alrededor de 0.8 mg%, la concentración de la mayoría de los aminoácidos individuales es inferior a 0.3 mg% (Jenkins, GN., 1983).

También se encuentran presentes algunos péptidos, y hay evidencia de que actúan como cofactores en el metabolismo de las bacterias salivales.

La **treonina** y la **serina** constituyen aproximadamente el 45-50% de los aminoácidos. El otro 30% está compuesto por **prolina** y **alanina** (Jenkins, GN., 1983).

A partir de sus bajos pesos moleculares, muchas de las proteínas de la saliva (aproximadamente un tercio de las que se encuentran en la glándula submandibular y un décimo de las proteínas de la glándula parotídea) son dialisables.

#### **INMUNOGLOBULINAS DE LOS TIPOS IgA, IgM e IgG**

La **IgA** forma la mayor parte de los anticuerpos que se encuentran en la saliva parotídea, (Turk, JL., 1972) a concentraciones aproximadas de 1-3% con respecto a las del plasma.

La cantidad de **IgM** e **IgG** es sumamente baja (menos de 0.2 mg/100 ml-1). La **IgA** entra a la glándula salival a partir del plasma, o puede ser sintetizada por las células del plasma en la glándula, y en la glándula se sintetiza una proteína adicional (secretora o pieza de transporte), que se fija a dos moléculas de **IgA** y se secreta en esta forma.

La pieza secretora que es en sí misma antigénica y emigra como una globulina, puede estar presente en la saliva en forma libre, si hay ausencia de globulinas. La concentración de la **IgA** disminuye al incrementarse el flujo salival (Jenkins, GN., 1983).

Las inmunoglobulinas del fluido gingival, están presentes en proporciones similares a las del plasma y su IgA no contiene pieza secretora. (Jenkins GN., 1983) El peso molecular aproximado para la IgA y la IgG es de 150,000 daltons. La IgM es una macromolécula de 900,000 daltons (Turk, JL., 1972).

La saliva de las glándulas parótida, submandibular y sublingual contienen cantidades muy similares de proteínas séricas (p. ej. albúmina), mientras que hay mayor presencia de sustancias de grupo sanguíneo ABO y Lewis en la saliva submaxilar y sublingual, que en la glándula parótida (Yazawa, s., Ohkawara, H., 1992).

#### **OTROS CONSTITUYENTES ORGÁNICOS**

Se ha encontrado **citrato** en la saliva, en concentraciones que varían de 0.2-2.0 mg 100/ml-1. Si la saliva se mantiene en reposo durante una hora aproximadamente, desaparece prácticamente la totalidad del citrato, debido a la acción bacteriana (Jenkins, GN., 1983).

El **lactato** está presente en cantidades muy variables, ya que es uno de los principales productos de la degradación bacteriana a partir de los carbohidratos. En la saliva del conducto parotídeo están presentes rastros de lactato (18-40 mg/ml-1) y **piruvato** (2-4 mg/ml-1) (Jenkins, GN., 1983). También se encuentran presentes en la saliva, la **calicreína**, que actúa enzimáticamente sobre una proteína del plasma, produciéndose un polipéptido conocido como bradicinina. La vasodilatación en la glándula salival durante la secreción podría deberse a la liberación de calicreína y a las sustancias solubles específicas de grupos sanguíneos, las cuales presentan las mismas características de los aglutinógenos del eritrocito (Schottelius BA., 1975).

La saliva contiene además otros albuminoides, como las **albúminas** y las **globulinas** (Lehnartz, A., 1949; Ocaraza, F., 1979; Rein, H., 1980).

La saliva también contiene **urea**, (Suñer, S., 1966) así como **ácido úrico** y **amoníaco**. La concentración de urea está muy relacionada con los niveles plasmáticos, aunque varía con la cantidad de flujo (Cantaron, A., Schepartz, B., 1988).

Virtualmente todo el amoníaco está formado por las bacterias a partir de la urea y los aminoácidos. La saliva contiene **AMPc**, producido a partir de ATP, (Conn, E., 1967) por una enzima que es la fosforilasa que se activa en presencia de adrenalina (Goldstein, L., 1978).

## CONSTITUYENTES INORGÁNICOS DE LA SALIVA

La saliva puede contener sulfocianuro potásico (tiocianato). La presencia de esta sustancia se reconoce agregando a la saliva algunas gotas de ácido clorhídrico y una solución diluida de percloruro de hierro (Bodansky, M., Fay, M., 1948).

En el caso de que exista el sulfocianuro potásico se produce un color rojo sangre, (Bodansky, M., Fay, M., 1948) se añade éter al líquido y se agita la mezcla; el éter al sobrenadar, queda teñido del color mencionado (Müller-Seifert, 1968).

La demostración de la existencia de la amilasa, o del tiocianato constituyen un medio para averiguar si un líquido vomitado o expectorado contiene saliva (Müller-Seifert, 1968).

La concentración promedio de tiocianato es aproximadamente de  $13 \text{ mg}/100 \text{ ml}^{-1}$  con una amplia variación ( $3$  a  $27 \text{ mg}/100 \text{ ml}^{-1}$ ) y la concentración parece ser menor a velocidades de flujo elevadas.

El calcio de la saliva en reposo es en valor promedio de  $5.8 \text{ mg}/100 \text{ ml}^{-1}$  y de  $16.8 \text{ mg}/100 \text{ ml}^{-1}$ , para el fosfato (Jenkins, GN., 1983). El fosfato de la saliva mixta está presente en varias formas, que incluyen aproximadamente 10% como compuestos orgánicos (en su mayoría carbohidratos, fosfolípidos, nucleótidos y nucleoproteína). Aproximadamente el 10% está presente como pirofosfato (Jenkins, GN., 1983).

Otros constituyentes son principalmente **cloruro, carbonato, sodio, potasio, magnesio** y cantidades comparativamente pequeñas de **sulfato** (Bard, P., 1975). Se encuentran presentes cantidades muy pequeñas de **fluoruro, yoduro, bromuro, nitrito, hierro y estaño**. En ciertas muestras de saliva mixta se han encontrado otros elementos residuales como **zinc, plomo, cobre y cromo** (Jenkins, GN., 1983).

El contenido del fluoruro en saliva es de 0.01-0.05 ppm en su mayoría en forma ionizada, con enlaces muy débiles.

## FISIOLOGÍA DE LA SALIVA

La saliva tiene funciones muy importantes, debido a que contribuye en forma variada al funcionamiento digestivo y antibacteriano, además de ser un fluido esencial para la salud de los dientes y las superficies mucosas de la cavidad oral.

## **FUNCIONES DIGESTIVAS DE LA SALIVA**

La única enzima verdaderamente importante de las que podemos encontrar en la saliva es la amilasa, debido a su acción desdobladora de almidón (Jenkins, GN., 1983).

El nivel óptimo de temperatura para la ptialina se encuentra entre 50-55°C, y su actividad desaparece si se calienta rápidamente la saliva hasta 75°C. Del mismo modo su actividad cesa por completo a 0°C (Suñer, Ps., 1986; Tietz, N., 1987).

## **FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LA SALIVA**

Existen dos propiedades de la saliva que están relacionadas con su poder antibacteriano:

- 1) La saliva aumenta la permeabilidad capilar.
- 2) La saliva mixta posee el poder de atraer leucocitos polimorfonucleares.

## **EFECTO AMORTIGUADOR DE LA SALIVA**

Los reguladores de la saliva contienen bicarbonatos, nitritos, fosfato y proteínas. Los reguladores trabajan convirtiendo un ácido o un álcali altamente ionizado, que tiende a alterar el pH de la solución, en otra sustancia menos ionizada, es decir, que libera menos iones  $H^+$  u  $OH^-$ , y por lo tanto, altera ligeramente el pH. Los bicarbonatos liberan el ácido carbónico débil cuando se adiciona un ácido, y puesto que este ácido se descompone rápidamente en agua y  $CO_2$ , éste sale de la solución, y el resultado no es la acumulación de un ácido más débil (como con la mayoría de los reguladores), sino la eliminación completa del ácido (Jenkins, GN., 1983).

## **LA SALIVA COMO LUBRICANTE**

Las glucoproteínas, que son las proteínas principales de la saliva, tienen la importante propiedad de dar a la saliva su carácter viscoso. La humectación de los alimentos es importante para la formación del bolo alimenticio, y su lubricación facilita la deglución.

## **CAPÍTULO 5. IDENTIFICACIÓN DE LA SALIVA**

### **MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AMILASA**

Existen diversos métodos para determinar la actividad amilásica tales como:

## **FUNCIONES DIGESTIVAS DE LA SALIVA**

La única enzima verdaderamente importante de las que podemos encontrar en la saliva es la amilasa, debido a su acción desdobladora de almidón (Jenkins, GN., 1983).

El nivel óptimo de temperatura para la ptialina se encuentra entre 50-55°C, y su actividad desaparece si se calienta rápidamente la saliva hasta 75°C. Del mismo modo su actividad cesa por completo a 0°C (Suñer, Ps., 1986; Tietz, N., 1987).

## **FUNCIÓN ANTIBACTERIANA DE LA SALIVA**

Existen dos propiedades de la saliva que están relacionadas con su poder antibacteriano:

- 1) La saliva aumenta la permeabilidad capilar.
- 2) La saliva mixta posee el poder de atraer leucocitos polimorfonucleares.

## **EFEECTO AMORTIGUADOR DE LA SALIVA**

Los reguladores de la saliva contienen bicarbonatos, nitritos, fosfato y proteínas. Los reguladores trabajan convirtiendo un ácido o un álcali altamente ionizado, que tiende a alterar el pH de la solución, en otra sustancia menos ionizada, es decir, que libera menos iones  $H^+$  u  $OH^-$ , y por lo tanto, altera ligeramente el pH. Los bicarbonatos liberan el ácido carbónico débil cuando se adiciona un ácido, y puesto que este ácido se descompone rápidamente en agua y  $CO_2$ , éste sale de la solución, y el resultado no es la acumulación de un ácido más débil (como con la mayoría de los reguladores), sino la eliminación completa del ácido (Jenkins, GN., 1983).

## **LA SALIVA COMO LUBRICANTE**

Las glucoproteínas, que son las proteínas principales de la saliva, tienen la importante propiedad de dar a la saliva su carácter viscoso. La humectación de los alimentos es importante para la formación del bolo alimenticio, y su lubricación facilita la deglución.

## **CAPÍTULO 5. IDENTIFICACIÓN DE LA SALIVA**

### **MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AMILASA**

Existen diversos métodos para determinar la actividad amilásica tales como:

Método Colorimétrico (almidón - yodo).

Método de Folin-Wu o de Somogyi-Nelson (Tietz, N., 1987).

Método de Vanloon y Wohlgemuth (Tietz, N., 1987).

Método de Peralta y Reinhold.

### **MÉTODO DE STREET-CLOSE Y DE SMITH-ROE MODIFICADO.**

Estos métodos son "amiloclásticos" y pueden evaluar la actividad enzimática siguiendo la disminución en la concentración del *substrato (almidón)* en vez de medir la cantidad de producto formado (Tietz, N., 1987).

La alfa-amilasa, degrada el almidón formando dextrinas reductoras y azúcares (Lenhinger A 1985; McClintic JR 1983; Tietz N 1987). En este método, la amilasa degrada un fragmento de almidón para determinar la actividad amilásica (PLM, 1991).

Después de un tiempo determinado, la reacción con la alfa-amilasa se compara con el blanco, la coloración azul del problema (formada por la reacción del almidón con el yodo, es medido espectrofotométricamente antes y después de la incubación con la muestra conteniendo la enzima) (PLM, 1991; Tietz, N., 1987).

El decremento en color resultante de la hidrólisis de almidón durante la incubación, es una medida de concentración enzimática, es decir, la disminución de la absorción es proporcional a la cantidad de sustrato degradado y de esta manera se calcula la actividad amilásica (Caraway, T., Wendell, T., 1960; PLM; 1991).

En la mayoría de los métodos de análisis se mantiene el pH entre 6.9 y 7.2, mediante el uso de amortiguador fosfato 0.02 M. En algunos métodos se agrega ion Cl<sup>-</sup>, pero en otros se asume que el Cl<sup>-</sup> presente en suero o en orina es suficiente para procurar activación máxima (Tietz, N., 1987).

Las unidades y valores normales para la determinación de amilasa, mediante el método de STREET-CLOSE, es la cantidad que convierte en dextrina 20 mg de almidón en 15 min (Tietz, N., 1987).

## **CAPÍTULO 6. DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS DE GRUPO SANGUÍNEO CON FINES FORENSES**

La determinación del grupo sanguíneo en la práctica forense aporta a los tribunales, elementos de prueba importantes tanto para señalar si una mancha de sangre en el lugar de los hechos puede provenir de la víctima o bien del victimario, o con mayor certeza indicar que no puede haber analogía entre la sangre encontrada y la de la víctima o la de su presunto agresor (Fernández, R., 1992; Smith, S., 1953).

El reconocimiento de las manchas de sangre constituye uno de los problemas más importantes de la medicina legal. Los dos procedimientos de gran sensibilidad son la formación de los cristales de hemina; (Balthazar, V., 1953; Harrow, B., 1942; Rojas, N., 1966; Vibert, CH., 1989) y examen espectroscópico, (Balthazar, V., 1940) que permiten caracterizar la hemoglobina y sus derivados, y en el caso de arrojar resultados positivos, el perito puede afirmar la presencia de sangre en las manchas.

Asimismo, pueden encontrarse sustancias de grupo sanguíneo en saliva depositada en comestibles u objetos inanimados (chicles, plastilina, etc.) inflingidos por mordeduras, produciendo marcas o incisiones en los cuales queda depositado el fluido salival (Thomas, CJ., 1995).

En el tejido pulpar de un diente se encuentran sustancias de grupo sanguíneo ABO, que pueden ser identificadas.

También nuevas tecnologías a nivel molecular, tales como el uso de los métodos de ingeniería genética, se llevan a cabo por el método del ADN, resultando en una mayor precisión para el segmento de un delito (Thomas, CJ., 1994).

Cuando se estudian muestras de sangre fresca, el problema es sencillo, ya que se reduce a poner en evidencia la presencia de los antígenos de superficie presentes en los eritrocitos, mediante reacciones de aglutinación con antisueros específicos.

En manchas de sangre seca, los eritrocitos se han roto y por lo tanto las pruebas de aglutinación directa no son factibles; sin embargo, los antígenos del sistema ABO no se desnaturalizan tan rápidamente y sobreviven durante algún tiempo conservando la capacidad de combinarse con anticuerpos específicos.

La formación de complejos antígeno-anticuerpo es la base de todos los métodos empleados en la detección de los antígenos de la superficie de los eritrocitos en manchas de sangre seca.

Las principales glucoproteínas ABO solubles pueden ser detectadas inmunológicamente, ya sea en solución o después de la absorción a una fase sólida (una fase sólida es generalmente un sustrato manchado que puede absorber glucoproteínas de manera natural en diferentes grados de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas.)

Cuando las muestras de sangre seca se retienen sobre un buen soporte, como lo son las fibras textiles, las partículas allí adheridas conservan eficientemente el material antigénico (Fernández, R., 1992).

Las sustancias ABO que están presentes en manchas secas, pueden extraerse humedeciéndolas en soluciones preparadas con agua destilada, solución salina, (Fernández, R., 1992) y solución amortiguadora de fosfato o de amoníaco, a partir de las cuales se recuperan parcialmente debido a la naturaleza del sustrato.

Posteriormente se llevan a cabo los métodos para detectar las sustancias de grupo ABO en manchas de fluidos corporales, que incluyen las técnicas: inhibición de la hemaglutinación y absorción-inhibición.

Algunos de los factores que pueden influir en los resultados de los métodos antes mencionadas son los siguientes:

- a) Modo de recolección de la muestra de los fluidos corporales.
- b) Edad de las manchas y condiciones de conservación de las muestras.
- c) Estado patológico del individuo (Jiménez, C., 1952).
- d) Contaminación bacteriana.
- e) Contaminación con otros fluidos corporales.

### **MÉTODO DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN.**

Se basa en la presencia o ausencia de varios aglutinógenos en los eritrocitos. Frente a éstos dos aglutinógenos o receptores A y B se encuentran en el suero dos aglutininas de alfa (anti-A) y beta (anti-B) (Horsters, H., 1957; Yazawa, S., Ohkawara, H., 1992).



Este método detecta la presencia de proteínas séricas y sustancias de grupo sanguíneo en saliva y determina el estado secretor del individuo (Masseyeff, R., 1957). Con esta técnica se utilizan lectinas anti-H (extractos parcialmente purificados de *Ulex Europaeus*).

Friedenreich y Worsaae determinaron que el grupo A se subdivide en dos: A1 y A2 (siendo su diferencia de orden cualitativo), los cuales funcionan como alelomorfos con los factores O y B con carácter dominantes cuando se asocia con A2 y recesivo cuando se une con el A1 (Jiménez, C., 1952). Se utilizan suspensiones de eritrocitos que varían en concentraciones del 5% y se recomiendan células A2 en lugar de células A1.

El método de todo o nada o de una etapa es el más simple, y se basa en la incubación de un volumen de antígeno (de fluido corporal, extracto de mancha, etc.) con el mismo volumen de una dilución apropiada del antisuero, antes de añadir eritrocitos apropiados.

Se puede llevar a cabo una dilución seriada por duplicado de la mezcla antígeno-anticuerpo, para determinar la pérdida del título del antisuero; éste método puede usarse para tipificar manchas sin previa extracción, sumergiendo el sustrato manchado en el antisuero (Masseyeff, R., 1957).

### **TÉCNICA DE ABSORCIÓN-INHIBICIÓN PARA MUESTRAS DE SALIVA FLUÍDA**

Las sustancias del grupo ABO solubles en agua, están presentes en el líquido seminal y en saliva de los individuos secretores, los cuales secretan la sustancia H en adición a cualquiera de las sustancias A y/o B que ellos puedan secretar (Wiener, A., 1973).

La muestra que contiene el antígeno salival se mezcla con un antisuero adecuado de especificidad conocida. Si el material cuestionado contiene el antígeno correspondiente se lleva a cabo la absorción específica del anticuerpo por el antígeno. El anticuerpo en el sobrenadante, se observa con eritrocitos de propiedades antigénicas conocidas, (Fernández, R., 1992) este es el principio de la absorción específica que puede medirse mediante la titulación del anticuerpo antes y después de haberlos mezclado con el material sometido a estudio (Schiff, F., Boyd, CW., 1952).

Si el título del anticuerpo está reducido notablemente, significa que su actividad hemaglutinante está inhibida (de ahí el nombre de inhibición) y se concluye que el antígeno correspondiente está presente en el material de prueba.

Aunque tiene ciertas desventajas la técnica de absorción-inhibición, es particularmente útil para la identificación de antígenos solubles. Las desventajas se refieren a su relativa insensibilidad, así como el considerar dentro de los límites de la variación experimental, la reducción del título de una o hasta dos diluciones entre el valor original y el valor posterior a la incubación con la muestra ensayada.

Lo anterior significa que la muestra debe absorber en forma específica al menos tres cuartas partes del contenido en anticuerpos del antisuero original, antes de concluir con certeza que el antígeno correspondiente se encuentra presente en la muestra analizada.

La sensibilidad de la prueba de inhibición depende primordialmente de la potencia del antisuero empleado.

Los valores de titulación óptima se encuentra generalmente entre 1:16 y 1:64. Cifras mas altas pueden originar inhibición, mientras que valores muy bajos favorecen la inhibición inespecífica por material que no posee el antígeno correspondiente.

Otro problema que presenta esta técnica, se relaciona con el descubrimiento del anticuerpo anti-H, el cual aglutina fuertemente células O y A2, ligeramente células A1 y también reacciona con las sustancias H, presentes en las secreciones de los individuos secretores de todos los grupos.

Si la muestra problema es probada con suero anti-H, así como con suero anti-A y anti-B, entonces, la saliva con antígenos O absorberá el anti-H. Por lo tanto manchas de secretores pueden identificarse positivamente de esta manera.

Para el procedimiento normal de absorción-inhibición para muestras de sangre, se requiere el uso de eritrocitos A2, pero la alta concentración de sustancias ABH en la saliva, hace necesario el uso de células A1.

Cuando se analiza la saliva fluida por la técnica de absorción-inhibición, es común encontrar fuerte inhibición con saliva diluida 1:1000, mientras que se obtienen resultados falsos positivos para reacciones A y B a diluciones de 1:10.

Las sustancias A y B de secretores se pueden demostrar hasta diluciones de 1:4000 o más.

Con saliva total de secretores es común obtener reacciones negativas o débiles para el antígeno apropiado A o B, pero utilizando diluciones sucesivas la potencia de aglutinación se incrementa gradualmente hasta un máximo que se mantiene constante, independientemente de las diluciones posteriores que se realicen. Este fenómeno se conoce como **EFFECTO DE PROZONA**, que es causado por la presencia de un exceso de antígenos hidrosolubles, que solubilizan en la muestra y absorben un alto porcentaje del contenido de anticuerpos, dejando un remanente insuficiente para combinarse con los antígenos absorbidos (Masseyeff, R., 1957).

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar y proponer mediante un estudio analítico y estadístico, la estandarización y establecimiento de los métodos y técnicas adecuadas que permitan la identificación de muestras de saliva y de sustancias de grupo sanguíneo en saliva fluida y en manchas secas.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Estandarizar los métodos y técnicas adecuadas para la determinación de la actividad de amilasa, como indicador de presencia de saliva y de sustancias de grupo sanguíneo en muestras de saliva fluida y en manchas secas.

Determinar la concentración mínima de saliva para identificar de manera confiable a las sustancias de grupo sanguíneo del sistema ABO.

Determinar las cantidades mínimas de saliva requeridas para identificar confiablemente al grupo sanguíneo al que pertenecen.

## HIPOTESIS

Utilizando diluciones seriadas de saliva de individuos de grupo sanguíneo conocido **SI** es factible identificar actividad amilasica hasta una dilución de 1:4096, así como **SI** es posible identificar a las sustancias de grupo sanguíneo hasta diluciones de 1:256.

Utilizando diluciones seriadas de saliva de individuos de grupo sanguíneo conocido **NO** es factible identificar actividad amilasica hasta una dilución de 1:4096, ni identificar a las sustancias de grupo sanguíneo a diluciones de 1:256.

## MÉTODOS Y MATERIALES

Se determinó en 56 muestras de saliva recolectada de 56 individuos de grupo sanguíneo conocido, de estas 9 son muestras de saliva fluida y 47 son muestras de saliva preparada en manchas secas.

Se utilizaron las siguientes técnicas:

**a) Técnica de Street y Close** para la determinación de la actividad amilásica en 9 muestras de saliva fluida; recolectadas de 9 individuos voluntarios adultos de grupo sanguíneo conocido.

Bajo las siguientes condiciones:

- I. Las diluciones de cada una de las 9 muestras se efectuaron a partir del sobrenadante utilizando agua destilada.
- II. Las diluciones de trabajo fueron: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096; con cada una de las muestras.
- III. Con los valores promedio de actividad amilásica a cada una de las muestras se les calculó su logaritmo de base 10; y se elaboró una gráfica semilogarítmica de actividad amilásica contra dilución de saliva.

Así mismo se determinó la actividad amilásica en otras 47 muestras conteniendo manchas secas de saliva; recolectada de 47 individuos voluntarios adultos de grupo sanguíneo conocido.

Bajo las siguientes condiciones:

- I. 24 muestras se diluyeron a 1:20 con agua destilada
- II. 23 muestras se trabajaron sin diluir
- III. Las 24 muestras que corresponden a las muestras diluidas 1:20; su tiempo de secado fluctuó de 1 a 90 días (3 meses); a temperatura ambiente, sin exposición al sol.

- IV. Las muestras que corresponden a las 23 muestras sin diluir; su tiempo de secado fluctuó de 1 a 7 días; cuyo soporte o contenedor fue papel filtro, con excepción de las muestras números 45,46 y 47.
- V. Las muestras No. 45,46 y 47 corresponden a colillas de cigarro de 3 individuos fumadores voluntarios de grupo sanguíneo conocido cuyo tiempo de secado fluctuó entre 1 y 90 días.

**b) Técnica de hemaglutinación directa** para el estudio del título de anticuerpos para la tipificación de sustancias de grupo sanguíneo en saliva fluida diluida en 9 individuos.

Bajo las siguientes condiciones:

Para muestras de saliva fluida y de manchas secas:

- I. Las diluciones hechas con las muestras de saliva de los 56 voluntarios, y que se trabajaron para determinar actividad amilásica, se utilizaron también para identificar las sustancias de grupo sanguíneo presentes en cada una de las muestras.
- II. Se realizó una serie de diluciones que van de 1:2 a 1:256 de las 9 muestras obtenidas de individuos de grupo sanguíneo conocido.
- III. Se les asignó un número conforme a una escala de aglutinación propuesta; con la finalidad de obtener el título máximo de antisueros para establecer las sustancias de grupo propuesta; y mediante la potencia de los hemoagrupadores se seleccionó el título de antisueros para trabajar.

**c) Técnica de absorción-inhibición** para la determinación de sustancias de grupo sanguíneo en muestra de saliva fluida y en manchas secas:

**En saliva fluida:**

- I. Se trabajó simultáneamente con las 9 muestras de saliva fluida que se recolectaron de 9 individuos voluntarios adultos de grupo sanguíneo conocido.
- II. Para la identificación de grupo sanguíneo se trabajó únicamente hasta la dilución 1:256 (antisueros A y B)



- III. Para la identificación de grupo sanguíneo se trabajó únicamente hasta la dilución 1:420 (Antisuero H)

**En manchas secas:**

- I. Se debe seguir el mismo procedimiento sólo que previamente se determina la actividad amilásica.
- II. Con la finalidad de estimar la dilución a la que podría encontrarse dicha muestra de saliva y así deducir más fácilmente el título de anticuerpos a utilizar.

**MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVO**

**a) MATERIAL**

- ◆ Tubos de ensayo 13 X10.
- ◆ Gradillas metálicas.
- ◆ Pipetas automáticas de 10 ml y 1000 ml.
- ◆ Dispensador de 10 ml.
- ◆ Termómetro de 0-100°C.
- ◆ Vasos de precipitado.
- ◆ Matraces Erlenmeyer de 125 ml.
- ◆ Puntas de plástico desechables de 0.50 ml y de 1000 ml.

**b) EQUIPO**

- ◆ Baño serológico de 0-140°C.
- ◆ Espectrofotómetro de luz visible marca Bauch & Lomb.
- ◆ Cronómetro.
- ◆ Refrigerador.

**c) REACTIVOS**

- ◆ Agua destilada.
- ◆ Kit para determinación de alfa amilasa merckotest.  
incluye el sustrato (0.2 gr. de amilosa por litro de solución de NaCl 15mM/1), amortiguador de fosfatos 20nM/1 pH 7.1, reactivo de coloración (solución de yodo 0.008N) y HCl

- ◆ Sustrato amortiguador: consiste en una mezcla de amilosa (0.2 g/l) con amortiguador de fosfato (20mM/L) en una proporción de 1:1.
- ◆ Reactivo de coloración: Sustrato de yodo 0.008N. Dilución 1:10..

Nota. Los reactivos fueron preparados de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

## **MUESTREO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

Previo aseo bucal, se tomaron 9 muestras de saliva de personas voluntarias adultas de ambos sexos (tres de cada grupo sanguíneo A, B y O).

Las muestras fueron colectadas en tubos de ensayo limpios, libres de trazas de detergente, rotulados con nombre, edad, sexo, grupo sanguíneo y fecha. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 5 minutos, separando el sobrenadante sin remover el sedimento, y se efectuaron las siguientes diluciones seriadas del sobrenadante: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 y 1:4096 se analizaron para identificar los grupos sanguíneos utilizando la técnica de absorción inhibición (únicamente hasta la dilución 1:256), y se determinó la actividad de la amilasa. El sobrenadante que no se trabajó inmediatamente se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Se prepararon manchas de saliva, sobre cigarrillos con saliva fluida de voluntarios de grupo sanguíneo conocido, y se secaron a temperatura ambiente durante aproximadamente tres meses. Posteriormente se constituyeron con 100 ml de agua destilada, de donde se tomaron alícuotas para determinar su actividad amilásica y las sustancias de grupo sanguíneo ABO. En esto se excluyeron de este estudio las muestras de saliva contaminadas con otras sustancias como lápiz labial, alimentos y bebidas alcohólicas, y pérdida de propiedades enzimáticas (inactividad amilásica de la saliva).

## **PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMILASA EN SALIVA FLUIDA**

Para cada muestra analizada se utilizaron un par de tubos de ensayo, marcados con las etiquetas "T" y "C" (Testigo y Control), respectivamente.

Después de introducir en cada uno 4.5 ml del sustrato amortiguador a  $85-90^{\circ}\text{C}$ , se trabajó una serie de tubos marcados respectivamente con diluciones: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096, y se incubaron en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 5 minutos, para alcanzar equilibrio de temperatura.

Posteriormente, con pipeta se introdujo por duplicado a cada uno de los tubos (T y C) 0.01 ml de las muestras de su respectiva saliva diluida (es 0.10 ml. de saliva diluida 1:2 al tubo marcado con dilución 1:2, 1.4 al tubo marcado con dilución 1:4 y así sucesivamente).

Mezclamos cada uno de los tubos, anotando el tiempo e incubación en agua durante 15 minutos. Al final del período de reacción se agregaron 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada a cada tubo, se adicionó entonces 0.50 ml del reactivo de coloración (mezclando bien la solución sustrato-amortiguador). El tubo testigo contiene 20 mg de almidón (4.0mg/ml), amortiguados en concentraciones 0.04M aproximadamente.

Se agitaron manualmente los tubos y se leyó la absorbancia a 620 nm frente a agua destilada, para la cual se fijó absorbancia 0, simultáneamente se procesó por duplicado un control de reactivos

### **PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMILASA EN MANCHAS SECAS DE SALIVA.**

Para el estudio en mancha seca, se corta un fragmento de papel filtro de 0.5 cm<sup>2</sup> conteniendo la mancha, y se reconstituye con 100 µl de agua destilada; se agita vigorosamente en forma manual durante 30 segundos. Se toma una alícuota de 10 ml y se determina la actividad amilásica de acuerdo con el procedimiento descrito para saliva fluida.

### **CÁLCULOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD AMILÁSICA.**

Si "At" y "Ac" son las lecturas de absorbancia de "T y C", el nivel de amilasa en unidades por 100 ml es:

$$\frac{Ac - At}{Ac} \times 400 \text{ mg/100ml}$$

Street-Close definió su unidad de amilasa como la cantidad de enzima que hidroliza 20 mg de almidón en 15 min bajo condiciones del análisis. El valor de Ac representa los 20 mg iniciales de almidón y Ac-At = ΔA los mg de almidón hidrolizados por la enzima en 0.50 ml del reactivo de coloración (Tietz, N., 1987)

Así:

$$\frac{(\Delta)A}{Ac} \times 20 \times \frac{1}{10} \times \frac{100}{0.5} = 400 \times \frac{(\Delta)A}{Ac} \text{ Unidades/100ml.}$$

El factor 400 será válido sólo si AC representa 20 mg de almidón por la preparación de las soluciones al realizar las mezclas de los reactivos a trabajar (sustrato amortiguador y solución de yodo).

## **DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS DE GRUPO SANGUÍNEO DEL SISTEMA ABO.**

### **MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS**

#### **a) MATERIALES**

- ◆ Tubos de ensayo de 10 X 75 y de 13 X 100.
- ◆ Gradillas de plástico.
- ◆ Pipetas automáticas de 0 a 20ml, de 5 a 50 ml, de 40 a 200 ml, y de 200 a 1000 ml.
- ◆ Puntas de plástico para pipetas automáticas.
- ◆ Tubos para microcentrífuga de 1.5 ml.
- ◆ Pipetas Pasteur.
- ◆ Bulbos de goma.
- ◆ Vasos y matraces de diferente volumen.

#### **b) EQUIPO**

- ◆ Microcentrífuga de 0 a 12,000 rpm (marca Dupont, Mod. SN 9300078).
- ◆ Centrífuga de 0 a 5,000 rpm con control de tiempo y temperatura (marca Baxter Scientific Mod. 2752).
- ◆ Agitador mecánico de tubos (marca Vortex)
- ◆ Cronómetro.
- ◆ Refrigerador y congelador.
- ◆ Baño ultrasónico con control de temperatura (marca Astrason Mod.13HT).

#### **c) REACTIVOS**

- ◆ Antisueros humanos policlonales anti-A (marca Organon Tecknika B.V, lote 20422253).
- ◆ Antisueros humanos policlonales anti-B (marca Organon Tecknika B.V, lote B 190).
- ◆ Lectina anti-H.
- ◆ Cloruro de sodio.
- ◆  $Na_2HPO_4$ .
- ◆ Sangre humana tipo A1, B y O.

#### **d) PREPARACIÓN DE REACTIVOS**

1. Solución salina: mezclar 0.9 g. de NaCl en 1 litro de agua destilada.
2. Amortiguador de fosfatos:  
Solución 1.- Se disuelven 9.47 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en un litro de agua destilada.  
Solución 2.- Se disuelven 9.08 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en un litro de agua destilada.  
Solución 3.- Se disuelven 8.5 g de NaCl en un litro de agua destilada, se mezclan 72 ml de la solución 1 con 28 ml de la solución 2. Aforar a 1 litro con la solución 3. Guardar en frasco ámbar a 4°C.
4. Suspensión al 2% en solución salina, de eritrocitos tipos: A1, B y O.

#### **MUESTREO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS.**

Las muestras se prepararon conforme a lo mencionado anteriormente.

#### **TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS DE GRUPO SANGUÍNEO ABH.**

**a) Técnica de hemaglutinación directa para el estudio del título de anticuerpos para la tipificación de sustancias de grupo sanguíneo en saliva fluida.**

Se agregan 300 ml de solución amortiguadora de fosfato, a una serie de tubos previamente rotulados con las diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096. Agregar 300 ml de suero anti-A al primer tubo; agitar y reposar por 1 min tomar una alícuota de 300 ml y dispensarla al segundo tubo. Proceder de igual manera hasta finalizar la serie. Una vez concluido, se depositaran alícuotas de 30 ml de cada uno de los tubos a otra serie de tubos marcados idénticamente, agregar 30 ml de suspensión de eritrocitos al 2% de grupo sanguíneo A, agitar por 30 segundos y reposar por 3 minutos, centrifugar a 2400 rpm durante 2 min. Leer la aglutinación de acuerdo con la escala que se propone (Cuadro 5). Realizar el mismo procedimiento para el suero anti-B (Franco de Ambriz, M., 1991).

## CUADRO 5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

GRUPO SANGUÍNEO	TUBO A	TUBO B	TUBO H
A1	0	4	4
A2	0	4	0
B	4	0	4
O	4	4	0

Pesar 1 mg de lectina anti-H y disolverla en 1000 ml de solución amortiguadora de fosfatos. Mantener en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, sobrepasando 5 días de haberse preparado. Realizar una serie de diluciones de 1:2 hasta 1:256. Preparar 6 ml de 1:300, 1:320, 1:340, 1:380, 1:400 y 1:420. Rotular estas mismas diluciones en una serie de tres tubos con las letras A, B y H. Agregar 30 ml de estas soluciones a los tubos. Agregar 30 ml de suspensión de eritrocitos de grupo correspondiente, al carril marcado con las letras A, B y H; agitar, reposar por 1 minuto y centrifugar. Leer la aglutinación de acuerdo a la escala propuesta.

Realizar el análisis de potencia de los hemoagrupadores y seleccionar el título de antisueros para trabajar.

En el caso de manchas secas, se debe seguir el mismo procedimiento, sólo que previamente se determina la actividad amilásica, para estimar la dilución a la que se podría encontrar dicha muestra de saliva, y deducir más fácilmente el título de anticuerpos a utilizar.

### **b) Técnica de Absorción-Inhibición para la determinación de sustancias de grupo en muestras de saliva fluída y en manchas secas.**

El método consiste básicamente en la absorción del antisuero por los correspondientes antígenos presentes en la muestra.

Al agregar posteriormente eritrocitos de tipo sanguíneo conocido, estos aglutinaron o no dependiendo del tipo de anticuerpos presentes. Es decir, los eritrocitos no aglutinaron

en ausencia de sus correspondientes anticuerpos ya que estos son absorbidos por los antígenos de la muestra (Horsters, H., 1947).

## **PROCEDIMIENTO**

### **Preparación de la muestra y de las soluciones de anticuerpos.**

Dispensar 800 ml de solución salina en una serie de tubos previamente rotulados como: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, y 1:256. Agregar 800 ml de saliva al primer tubo, agitar mecánicamente y dejar reposar por 2 min. Tomar una alícuota de igual volumen y dispensarlo al segundo tubo, completar la serie en la misma forma.

Los sueros anti-A, anti-B y anti-H se prepararon conforme a las diluciones de trabajo elegidas por su potencia de hemaglutinación. En este estudio se eligieron para los antisueros A y B, las preparaciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y para la lectina anti-H, las de 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:280, 1:300, 1:320, 1:340, 1:350, 1:400 y 1:420.

Se colocó en gradillas un total de 192 tubos a procesar y se rotularon debidamente (con el propósito de facilitar el manejo se asignó un código numérico) como se muestra en el **Cuadro 6**.

Se tomaron alícuotas de 30 ml de cada una de las diluciones de saliva, (o del extracto reconstituido de la mancha seca) y se colocaron en los 24 tubos correspondientes a su dilución. A continuación se adicionaron 30 ml de antisueros A, B y H a su correspondiente carril y dilución. Las muestras se agitaron gentilmente por 1 minuto y se dejaron reposar por espacio de 15 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo señalado, se agregaron 40 ml de suspensión de eritrocitos del grupo sanguíneo correspondiente a cada carril.

Se agitaron manualmente y dejaron reposar por 15 minutos. Se centrifugaron a 2400 rpm durante 1 minuto a temperatura de 4°C. Se leyó la aglutinación de acuerdo a la siguiente escala.

**CUADRO 6**  
**EJEMPLO PARA LA CORRELACIÓN DE DATOS**

DILUCIÓN TUBOS AG/AC	1:2 1 A B H	1:4 2 A B H	1:8 3 A B H	1:16 4 A B H	1:32 5 A B H	1:64 6 A B H	1:128 7 A B H	1:256 8 A B H	DILUCIÓN
1									1:2
2				X					1:4
3									1:8
4									1:16
5									1:32
6									1:64
7									1:128
8									1:256

**ESCALA DE AGLUTINACIÓN**

- 4 = Aglutinación abundante.
- 3 = Aglutinación mediana.
- 2 = Aglutinación regular.
- 1 = Aglutinación escasa
- 0 = Ausencia de aglutinación.

Nota. La X esta marcada en el tubo 3 del Ag y el tubo 4 del Ac obteniéndose una dilución en el Grupo A de 1:8 Ag y en 1:16 de Ac.



## RESULTADOS

### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILÁSICA EN SALIVA FLUÍDA DILUÍDA.

La actividad amilásica se determinó en muestras de saliva que fueron colectadas de 9 voluntarios de grupo sanguíneo conocido A (M1, M2, M3), B (M4, M5, M6) y O (M7, M8, M9), en tubos de ensayo limpios y centrifugados a 12,000 rpm, durante 5 minutos. Las diluciones se efectuaron a partir del sobrenadante utilizando agua destilada.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 1,2 y 3.(Ver APENDICE. Gráficas 1, 2 y 3).

Los resultados promedio se presentan en la tabla 4 .(Ver APENDICE. Gráfica 4).

**TABLA 1. ACTIVIDAD AMILÁSICA EN MUESTRAS DE SALIVA FLUIDA DILUÍDA DE VOLUNTARIOS DE GRUPO SANGUÍNEO A**

DILUCIÓN	MUESTRA 1 ( $\mu$ l)	MUESTRA 2 ( $\mu$ l)	MUESTRA 3 ( $\mu$ l)
1:2	93673	7588	105661
1:4	50038	3872	52286
1:8	27698	21950	35401
1:16	10832	3882	10898
1:32	7016	298	8061
1:64	3201	120	5120
1:128	1418	81	2070
1:256	527	20	566
1:512	312	68	473
1:1024	126	8	332
1:2048	55	4	174
1:4096	31	2	87

Se observó un decremento desde 93673  $\mu$ l (dilución 1:2) hasta 31  $\mu$ l (dilución 1:4096) de la actividad de la enzima amilasa conforme aumenta la dilución de la saliva.

**TABLA 2. ACTIVIDAD AMILASICA EN MUESTRAS DE SALIVA FLUIDA DILUIDA DE VOLUNTARIOS DE GRUPO SANGUÍNEO B**

DILUCIÓN	MUESTRA 4	MUESTRA 5	MUESTRA 6
(µl)	(µl)	(µl)	(µl)
1:2	51572	49392	91500
1:4	26063	30681	46294
1:8	13309	15433	27776
1:16	5822	10348	10021
1:32	2994	4100	7298
1:64	1108	1376	—
1:128	776	1732	1633
1:256	302	536	528
1:512	144	224	430
1:1024	63	250	261
1:2048	38	104	144
1:4096	19	55	64

A diluciones más altas de 1:4096 ya no se observó actividad amilásica, al igual que en la tabla anterior, e igualmente hubo un decremento de la actividad amilásica al aumentar la dilución de la saliva.

(-) El dato correspondiente no será considerado para el promedio general, y la causa pudo deberse a la contaminación de la muestra o por saliva insuficiente.

**TABLA 3. ACTIVIDAD AMILÁSICA EN MUESTRAS DE SALIVA FLUIDA DILUIDA DE VOLUNTARIOS DE GRUPO SANGUÍNEO O**

DILUCIÓN	MUESTRA 7	MUESTRA 8	MUESTRA 9
(µl)	(µl)	(µl)	(µl)
1:2	86598	68442	58349
1:4	43571	36127	31560
1:8	23419	18678	18565
1:16	8775	6094	7213
1:32	5228	3529	3394
1:64	2287	1463	1379
1:128	871	640	742
1:256	506	384	422
1:512	313	243	257
1:1024	149	98	137
1:2048	65	40	53
1:4096	43	22	31

El comportamiento de la actividad amilásica disminuye en relación proporcional al aumento de la dilución en todas las muestras de saliva analizadas. La siguiente tabla nos presenta los resultados conjuntos de la actividad amilásica, obtenidos para las muestras de saliva estudiadas en el presente trabajo.

**TABLA 4. ACTIVIDAD AMILÁSICA PROMEDIO EN SALIVA FLUÍDA DILUÍDA DE VOLUNTARIOS DE GRUPOS A, B Y O**

DIRECCION	ACTIVIDAD AMILASICA PROMEDIO
152	6886
153	30637
154	23213
155	3298
156	5770
157	2576
158	1188
159	453
160	303
161	166
162	77
163	31

Con valores promedio de actividad amilásica a cada uno de las muestras se les calculó su logaritmo de base 10.

Se construyó una gráfica semilogarítmica como se muestra en la **Gráfica 4. (Ver APÉNDICE).**

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILÁSICA EN MANCHAS SECAS DE SALIVA.

TABLA 5. ACTIVIDAD AMILÁSICA EN MANCHAS SECAS DE SALIVA

NUMERO DE MUESTRA (MANCHA DE SALIVA)	ACTIVIDAD AMILÁSICA (U)	GRUPO SANGUINEO
1	42	A
2	3103	-
3	128	O
4	3103	A
5	8347	O
6	4173	O
7	3317	O
8	6635	A
9	8775	O
10	85	-
11	486	-
12	4173	O
13	369	O
14	444	B
15	5992	O
16	6742	O
17	2354	O
18	1708	B
19	4612	A
20	6314	O
21	8026	-
22	2889	O
23	6849	O
24	2247	O
25	163	O
26	125	A
27	420	O
28	4466	O
29	43	O
30	360	B
31	479	O
32	130	O
33	87	A
34	430	O
35	1089	A

Continúa Tabla 5

36	5991	A
37	2178	A
38	326	A
39	1633	A
40	457	A
41	490	O
42	490	O
43	152	A
44	152	O
45	11437	A
46	1532	O
47	1346	O

De cada una de las muestras conteniendo la mancha seca de saliva, se recortó aproximadamente 0.5 cm y se reconstituyó con 100 µL de agua destilada.

**\*\* Muestras diluidas 1:20 con agua destilada. El resto de las muestras se trabajaron sin diluir.**

– Muestras en las cuales no fue posible determinar el grupo sanguíneo empleando la técnica de absorción-inhibición, debido a una cantidad insuficiente de antígenos, o a la ausencia de saliva.

Muestras 1-24. Tiempo de secado fluctuó de 1 a 90 días a temperatura ambiente, sin exposición al sol.

Muestras 25-44. Las manchas de saliva sobre soporte de papel filtro fueron secadas por 1-7 días.

Muestras 45, 46 y 47 Corresponden a muestras provenientes de colillas de cigarrillos de 3 fumadores voluntarios de grupo sanguíneo conocido. Su tiempo de secado fluctuó de 1 a 90 días a temperatura ambiente, sin exposición al sol.

La actividad de la amilasa se determinó en manchas secas de saliva sobre papel y preparadas con saliva fluida de voluntarios de grupo sanguíneo conocido impregnada sobre papel filtro y secadas a temperatura ambiente.

Se trabajaron controles negativos que consistieron en fragmentos de papel filtro limpios (áreas sin manchas de saliva), e igualmente se utilizaron blancos de reactivos.

### **DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS DE GRUPO SANGUÍNEO EN MUESTRAS DE SALIVA FLUIDA DE VOLUNTARIOS DE GRUPO SANGUÍNEO A,B y O.**

Utilizando la técnica de absorción-inhibición se determinó el título de anticuerpos anti-A, anti-B y anti-H, en muestras de salivas fluidas en dilución doble seriada desde 1:2 hasta 1:256. Los resultados se presentan en las **Tablas 6, 7, 8, y 9.**

**TABLA 6. OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-A, ANTI-B Y ANTI-H, PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS SUSTANCIAS DE GRUPO SANGUÍNEO EN SALIVAS DILUIDAS DE VOLUNTARIOS DE TIPO SANGUÍNEO "A"**

DILUCIÓN SALIVAL	Número de Muestra	DILUCIONES DE ANTISUERO											
		1-2 ANTI ABH	1-4 ANTI ABH	1-8 ANTI ABH	1-16 ANTI ABH	1-32 ANTI ABH	1-64 ANTI ABH	1-128 ANTI ABH	1-256 ANTI ABH				
1-2	1	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
	2	040	044	044	040	040	040	040	040	040	040	040	040
	3	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
1-4	1	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
	2	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
	3	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
1-8	1	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
	2	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
	3	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
1-16	1	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
	2	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
	3	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
1-32	1	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
	2	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
	3	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
1-64	1	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
	2	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
	3	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
1-128	1	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
	2	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
	3	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
1-256	1	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
	2	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044
	3	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044	044

Escala de Hemaglutinación  
 4 = Aglutinación Abundante  
 3 = Aglutinación Mediana  
 2 = Aglutinación Regular  
 1 = Aglutinación Escasa  
 0 = Aglutinación ausente o inhibida

\* Los números enmarcados obtenidos representan resultados satisfactoriamente confiables de aglutinación abundante se han descartado aquellos en que la escasa aglutinación dificulta la correcta interpretación



**TABLA No. 7 OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-A, ANTI-B Y ANTI-H, PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS DE GRUPO SANGUÍNEO EN SALIVAS DILUIDAS DE VOLUNTARIOS DE TIPO SANGUÍNEO B.**

DILUCIÓN SALIVA	NUMERO DE MUESTRAS	DILUCIONES DE ANTICUERPO											
		1-2	1-4	1-8	1-16	1-32	1-64	1-128	1-256				
		ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH
1-2	4	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	5	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	6	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
1-4	4	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	5	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	6	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
1-8	4	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	5	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	6	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
1-16	4	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	5	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	6	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
1-32	4	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	5	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	6	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
1-64	4	214	403	401	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	5	403	401	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	6	401	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
1-128	4	434	404	422	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	5	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	6	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
1-256	4	424	424	444	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	5	424	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404
	6	444	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404	404

Escala de Hemaglutinación  
 4 = Aglutinación Abundante  
 3 = Aglutinación Mediana  
 2 = Aglutinación Regular  
 1 = Aglutinación Escasa  
 0 = Aglutinación ausente o inhibida

Los números enmarcados representan resultados satisfactoriamente confiables de aglutinación abundante, se han descartado aquellos en que la escasa aglutinación dificulta la correcta interpretación

**TABLA No. 8 OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-A, ANTI-B Y ANTI-H, PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS DE GRUPO SANGUINEO EN SALIVAS DILUIDAS DE VOLUNTARIOS DE TIPO SANGUINEO O.**

DILUCIÓN SALIVA	NÚMERO DE MUESTRA	DILUCIONES DE ANTISERO											
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256				
		ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH	ANTI ABH
O	7	440	440	440	330	440	120	000	000	000	000	000	000
	8	440	440	440	440	330	320	440	440	440	440	440	110
	9	440	440	440	440	210	110	000	000	000	000	000	000
B	7	440	440	440	330	440	200	000	000	000	000	000	000
	8	440	440	440	440	330	220	440	440	440	440	440	110
	9	440	440	440	440	210	110	000	000	000	000	000	000
B <sub>3</sub>	7	440	440	440	330	320	440	440	440	440	440	440	100
	8	440	440	440	440	220	220	440	440	440	440	440	100
	9	440	440	440	440	110	120	000	000	000	000	000	010
B <sub>1</sub> 16	7	440	440	440	440	320	440	440	440	440	440	440	100
	8	440	440	440	440	330	440	440	440	440	440	440	100
	9	440	440	440	440	210	120	000	000	000	000	000	010
B <sub>2</sub> 2	7	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	000
	8	440	440	440	440	330	330	440	440	440	440	440	000
	9	440	440	440	440	110	120	000	000	000	000	000	000
B <sub>2</sub> 5	7	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	000
	8	440	440	440	440	330	330	440	440	440	440	440	000
	9	440	440	440	440	110	120	000	000	000	000	000	000
B <sub>2</sub> 56	7	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	000
	8	440	440	440	440	330	330	440	440	440	440	440	000
	9	440	440	440	440	110	120	000	000	000	000	000	010

\* Los números enumerados obtendidos representan resultados satisfactoriamente confiables de aglutinación abundante se han descartado aquellos en que la escasa aglutinación dificulta la correcta interpretación

Escala de Hemaglutinación  
 4 = Aglutinación Abundante  
 3 = Aglutinación Mediana  
 2 = Aglutinación Regular  
 1 = Aglutinación Escasa  
 0 = Aglutinación ausente o inhibida



**TABLA 9. TÍTULO MÁXIMO DE ANTICUERPOS (ANTI-A, ANTI-B Y ANTI-H) PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS DE GRUPO EN SALIVA DILUIDAS DE VOLUNTARIOS DE TIPO SANGUÍNEO A, B Y O.**

DILUCIÓN DE SALIVA	TÍTULO MÁXIMO		TÍTULO MÁXIMO		TÍTULO MÁXIMO	
	MUESTRA		MUESTRA		MUESTRA	
1:24	1	1:32	4	1:64	7	1:32
	2	1:8	5	1:16	8	1:128
	3	1:32	6	1:64	9	1:16
1:48	1	1:32	4	1:64	7	1:32
	2	1:16	5	1:16	8	1:128
	3	1:64	6	1:8	9	1:16
1:96	1	1:64	4	1:32	7	1:64
	2	1:16	5	1:16	8	1:128
	3	1:128	6	1:128	9	1:32
1:192	1	1:64	4	1:32	7	1:64
	2	1:32	5	1:64	8	1:64
	3	1:128	6	1:256	9	1:32
1:384	1	1:128	4	1:32	7	1:64
	2	1:16	5	1:64	8	1:32
	3	1:64	6	1:256	9	1:16
1:768	1	1:128	4	1:64	7	1:32
	2	1:16	5	1:64	8	1:64
	3	1:64	6	1:256	9	1:32

Continúa Tabla 9

1:128	1:64	1:16	7	1:64
	1:64	1:32	8	1:64
	1:256	1:28	9	1:8
1:64	1:64	1:64	7	1:32
	1:128	1:64	8	1:64
	1:128	1:256	9	1:32

Muestras 1, 2 y 3- Salivas de voluntarios de grupo sanguíneo A.  
 Muestras 4, 5 y 6- Salivas de voluntarios de grupo sanguíneo B.  
 Muestras 7, 8 y 9- Salivas de voluntarios de grupo sanguíneo O.

#### DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS DE GRUPO SANGUÍNEO EN MANCHAS DE SALIVA SECA.

Se determinó la presencia de sustancias de grupo sanguíneo en 47 muestras de manchas de saliva seca preparadas sobre papel filtro. El tiempo de secado a condiciones ambientales varió desde un día hasta 3 meses aproximadamente.

Los resultados se muestran en la **Tabla 10**.

**TABLA 10. DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO EN MANCHAS DE SALIVA SECA**

NUMERO DE MUESTRA	GRUPO SANGUÍNEO OBTENIDO	TÍTULO DE ANTIQUERPOS ANTI A Y ANTI B	TÍTULO DE LECTINA ANTI H
1	A	1:16	1:500
2	-	-	-
3	O	1:16	1:400
4	A	1:32	1:256
5	O	1:32	1:256
6	O	1:16	1:400
7	O	1:32	1:400
8	A	1:32	1:256
9	O	1:32	1:400
10	-	-	-
11	-	-	-
12	O	1:16	1:400
13	O	1:16	1:400
14	B	1:32	1:320
15	O	1:32	1:400
16	O	1:32	1:400
17	O	1:64	1:400
18	B	1:16	1:400

Continúa Tabla 10

19	A	1-39	1-400
20	O	1-39	1-400
21	-	-	-
22	O	1-39	1-400
23	O	1-16	1-400
24	O	1-16	1-400
25	O	1-39	1-400
26	A	1-39	1-400
27	O	1-39	1-400
28	O	1-39	1-400
29	O	1-39	1-400
30	B	1-39	1-400
31	O	1-16	1-280
32	O	1-39	1-400
33	A	1-16	1-400
34	O	1-61	1-280
35	A	1-61	1-300
36	A	1-39	1-300
37	A	1-16	1-320
38	A	1-39	1-320
39	A	1-39	1-320

Continúa Tabla 10

40	A	1:32	1:400
41	O	1:32	1:400
42	O	1:32	1:400
43	A	1:32	1:400
44	O	1:32	1:400
45	A	1:16	1:320
46	O	1:32	1:400
47	O	1:32	1:400

Muestras 1-24. Las manchas de saliva sobre soporte de papel filtro secadas durante 3 meses aproximadamente.

Muestras 25-44. Las manchas de saliva sobre soporte de papel filtro fueron secadas por 1-7 días.

Muestras 45, 46 y 47, son muestras de colilla de cigarro, secadas durante tres meses aproximadamente.

— Muestras en las cuales no fue posible determinar el grupo sanguíneo empleando la técnica de absorción-inhibición, debido a una cantidad insuficiente de antígenos, o a la ausencia de saliva.

\* \* Título máximo de anticuerpos A, B y H, hasta donde se obtuvieron resultados confiables para las diluciones de trabajo seleccionadas

## DILUCIÓN ESTIMADA A PARTIR DE LA ACTIVIDAD AMILÁSICA DETERMINADA EN MANCHA SECA Y TÍTULO DE ANTICUERPOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS DE GRUPO SANGUÍNEO.

Se estimó la dilución aproximada a la que podría ubicarse cada una de las manchas de saliva seca trabajadas, utilizando los valores de actividad amilásica calculados para cada una de ellas. Los resultados se muestran en la Tabla 11.



**TABLA 11 RELACIÓN ENTRE DILUCIÓN ESTIMADA DE UNA MANCHA DE SALIVA A PARTIR DE SU ACTIVIDAD AMILÁSICA Y TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-A, ANTI-B Y ANTI-H PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO EN MANCHAS DE SALIVA SECA.**

NUMERO DE MUESTRA SANGUÍNEA	ACTIVIDAD AMILÁSICA (u)	DILUCIÓN ESTIMADA / APROXIMADA	TÍTULO DE ANTICUERPOS A, B Y H	GRUPO OBTENIDO
1	42	1:2048-1:4096	1:64, 1:64, 1:300	A
2	3103	1:32-1:248	-	
3	128	1:924-1:2048	1:16, 1:16, 1:400	O
4	3103	1:32-1:64	1:32, 1:32, 1:256	A
5	8347	1:16-1:32	1:32, 1:32, 1:256	O
6	4173	1:32-1:64	1:16, 1:16, 1:400	O
7	3317	1:32-1:64	1:32, 1:32, 1:400	O
8	6635	1:16-1:32	1:32, 1:32, 1:256	A
9	8775	1:16-1:32	1:32, 1:32, 1:400	O
10	85	1:124-1:248	-	
11	486	1:256-1:512	-	
12	4173	1:32-1:64	1:16, 1:16, 1:400	O
13	369	1:256-1:512	1:16, 1:16, 1:400	O
14	444	1:256-1:512	1:32, 1:32, 1:320	B

Continúa Tabla 11

15	5992	E1C1F52	1:32, 1:32, 1:400	C
16	6742	E110-E132	1:32, 1:32, 1:400	C
17	2354	E167-E188	1:64, 1:64, 1:400	C
18	1708	E167-E188	1:16, 1:16, 1:400	B
19	4002	E52-E164	1:32, 1:32, 1:400	A
20	6314	E16-E132	1:32, 1:32, 1:400	C
21	8026	E16-E152	-	
22	2889	E59-E164	1:32, 1:32, 1:400	C
23	6849	E16-E132	1:16, 1:16, 1:400	C
24	2247	E16-E128	1:16, 1:16, 1:400	C
25	163	E1024-E2048	1:32, 1:32, 1:400	C
26	125	E1024-E2048	1:32, 1:32, 1:400	A
27	420	E256-E512	1:32, 1:32, 1:400	C
28	4466	E32-E160	1:32, 1:32, 1:400	C
29	45	E2048-E4096	1:32, 1:32, 1:400	C
30	860	E328-E256	1:32, 1:32, 1:400	B
31	479	E128-E256	1:16, 1:16, 1:280	C
32	130	E1024-E2048	1:32, 1:32, 1:400	C

Continua Tabla 11

32	137	192, 1948	1816, 1816, 18400	3
33	430	2078, 1096	1864, 1864, 18280	3
34	1089	1928, 256	1864, 1864, 18300	3
35	5991	1932, 1832	1832, 1832, 18300	3
36	2178	1916, 1832	1816, 1816, 18320	3
37	326	256, 256	1832, 1832, 18320	3
38	1653	2078, 256	1832, 1832, 18320	3
39	457	1816, 256	1832, 1832, 18400	3
40	190	2078, 256	1832, 1832, 18400	3
41	490	1828, 256	1832, 1832, 18400	3
42	152	1928, 256	1832, 1832, 18400	3
43	1152	1928, 2078	1832, 1832, 18400	3
44	11487	1832, 1832	1816, 1816, 18320	3
45	1532	1948, 1832	1832, 1832, 18400	3
46	1346	1832, 1832	1832, 1832, 18400	3
47		1832, 1832	1832, 1832, 18400	3

Muestra 1-24. Las manchas de saliva sobre soporte de papel filtro fueron secadas durante 3 meses aproximadamente.

Muestra 25-44. Las manchas de saliva sobre soporte de papel filtro fueron secadas por 1-7 días.

Muestras 45, 46, y 47. Son manchas de saliva sobre coquilla de cigarro, secadas durante tres meses aproximadamente.

- Muestras en las cuales no fue posible determinar el grupo sanguíneo empleando la técnica de absorción-inhibición, debido a una cantidad insuficiente de antígenos. Se proceso simultáneamente un control negativo que consistió en papel filtro libre de saliva.



## DISCUSION

### **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILÁSICA.**

El método empleado en el presente estudio fue el de Street y Close, (Método amiloclástico) (Tietz, N., 1987). Este método, diseñado originalmente para estudios de tipo clínico en muestras de suero y orina, se adaptó para el análisis de amilasa (enzima más importante de la saliva) en saliva fluida y de manchas de saliva seca, indicios útiles en investigaciones de tipo forense. En comparación con otros métodos como el de Folin-Wu o el de Somogy-Nelson diseñados para fines forenses, los cuales son procedimientos cronométricos y su método se basa en el análisis sacarogénico. La técnica sacarogénica lleva su procedimiento al cabo de 60 minutos aproximadamente.

Existen otros métodos como el de Peralta y Reinhold los cuales se utilizan para determinar amilasa en suero con el mismo inconveniente anterior.

El método de Street y Close resulto rápido (el tiempo máximo de análisis para una serie de 10 muestras fue de aproximadamente 30 minutos), cuantitativo y de sensibilidad adecuada, ya que alcanzó a detectar actividad de amilasa en muestras de saliva diluida hasta 1:4096 veces, lo que nos indica cantidades traza de amilasa. Además sólo requiere de 10  $\mu$ l de la muestra (que pueden ser saliva entera o diluida, o extractos de manchas de saliva seca), aspecto importante debido a que la investigación criminalística generalmente se cuenta con cantidades limitadas de muestra. Para el caso de manchas de saliva seca, la importancia es aún mayor ya que sólo se necesita de un fragmento del soporte conteniendo la mancha de saliva, de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> muestra suficiente si consideramos al tamaño de una colilla de cigarro, de una estampilla postal, del engomado de un sobre o de una goma de mascar.

La identificación de la saliva es posible llevarla a cabo a través del estudio de sus componentes de acuerdo con lo establecido en la literatura. De los componentes salivales, la enzima amilasa es característica de este fluido se encuentra en concentraciones altas en saliva parotídea de 60 a 120 mg/100ml. La determinación de la amilasa al igual que la de otras enzimas, se realiza a través de su actividad sobre un sustrato específico que para este caso es

la amilosa. Es decir, no se mide directamente la concentración de la enzima, sino que establece su presencia indirectamente a través de su actividad enzimática.

### **DETERMINACIÓN DE AMILASA EN MUESTRAS DE SALIVA FLUIDA.**

Los resultados de la etapa del estudio correspondiente a medir la actividad enzimática de diluciones seriadas de saliva fluida de 9 individuos voluntarios de los grupos sanguíneos A, B y O (3 personas por cada grupo sanguíneo), para establecer la dilución máxima a la cual todavía es posible detectar actividad amilásica, y por consiguiente identificar saliva, se reportan en las tablas 1, 2 y 3.

Los resultados de la tabla 1, indican que la actividad amilásica es máxima a la dilución 1:2 en las 3 muestras obteniéndose valores máximos de actividad enzimática mayores a 47,383 y menores a 105,661,  $\mu$ l. Es decir, la actividad enzimática de una dilución seriada al doble mayor a 1:4096, sería de 0  $\mu$ l, lo que indicaría ausencia o cantidades insuficientes de amilasa para ser detectadas por este método. Los valores para saliva concentrada serían el doble de lo reportado en la tabla. Por otra parte los resultados obtenidos para los voluntarios de grupo sanguíneo "O" (**Tabla 3**) comparados con el de los grupos sanguíneos "A" y "B" (**Tablas 1 y 2 respectivamente**), en promedio son menores, sin poder definir si esta diferencia es significativa o debida al azar. Para tal efecto se construyo una gráfica semilogarítmica del Log. de la Actividad Enzimática vs Dilución de Saliva (**Ver Apéndice. Gráfica 4**), utilizando, los datos de la **Tabla 4**, y a partir de esta recta, interpolamos el valor de la actividad enzimática obtenida en promedio de las muestras de saliva fluida diluida y estimamos el intervalo de dilución en que probablemente se encuentre la saliva en dichas muestras. Aunque se han realizado estudios en este aspecto, se han enfocado exclusivamente a la cuantificación de sustancias de grupo sanguíneo salival. Un trabajo importante que se aproxima al problema, es el realizado por Milne y Dawes en 1973, en donde establecen la contribución relativa de las diferentes glándulas salivales a la actividad de grupo sanguíneo en la saliva entera.

Para poder esclarecer la relación entre la secreción de ambas sustancias, se tendría que diseñar una investigación enfocada a considerar la influencia de los factores que determinan sobre la concentración de amilasa en saliva, ritmo de flujo, hora de recolección y

tiempo transcurrido hasta su análisis, uno de los cuales podrían ser la relación entre secreción o presencia de las sustancias de grupo sanguíneo.

Los resultados de la actividad amilásica en saliva, confirman que este fluido presenta actividad de amilasa más alta que la reportada para suero (54-308  $\mu\text{l}$ ) y orina (143-2325  $\mu\text{l}$ ), (Tietz, N., 1987) de acuerdo con los valores citados en el manual de Merck, utilizando el mismo método que en el presente trabajo. La diferencia entre estos valores en promedio, con los de la saliva (41-78,385  $\mu\text{l}$ ) reportados en el presente trabajo, es bastante grande.

Este dato es discutible, ya que desde un punto de vista forense, para la identificación o la diferenciación de varias manchas con actividad amilásica, ya que siendo la técnica modificada que se usó en ese estudio, manchas de orinas o suero, darían resultados bajos cercanos a 0  $\mu\text{l}$  para valores de actividad amilásica a las diluciones de trabajo propuestas, ya que de acuerdo con Whilott y Griffiths, (Tietz, N., 1987) la técnica Yodo-almidón puede conducir a resultados falsos positivos para manchas de orina y suero. Sin embargo, en la técnica empleada en este ensayo, no se obtuvo ningún falso negativo a ninguna dilución, lo que resulta importante ya que es indicativo de la utilidad de la técnica para determinar la presencia de amilasa salival.

Por otra parte, la variabilidad encontrada en la actividad amilásica de las salivas estudiadas (a diluciones menores de 1:2) confirman lo reportado por Jacobsen en 1970, en cuyo trabajo afirma que la actividad amilásica es bajo antes del desayuno, aumenta durante la mañana y disminuye gradualmente durante el resto del día sin llegar a 0  $\mu\text{l}$  acaso manteniéndose en cierto rango, aún no reportado. Esto es discutible ya que se presentan factores externos como la ingesta de alimentos a diferentes horas modificando la velocidad de flujo salival; aumentando la concentración amilásica.

Otros factores que afectan la concentración de amilasa, y que refuerzan los resultados para las diferentes actividades amilásicas reportadas, es la velocidad de flujo, puesto que se sugiere que a mayor velocidad de flujo aumenta la concentración de la enzima. Esto se explica por un incremento en la relación de saliva parotídea más activa, en la composición de la mezcla salival al aumentar el estímulo. De acuerdo con Mason y Chisholom.

Amilasa de saliva parotídea = 60 mg./100ml en reposo

Amilasa de saliva submandibular = 25mg./100ml en reposo.

Se sabe también que la sacarosa y el cloruro de sodio producen mayor actividad de la amilasa en la glándula parótida. Lo anterior, implica que aunque se controló parcialmente la recolección de la saliva, solicitando aseo bucal previo y período de abstinencia en el consumo de alimentos de al menos 1 hora, no se consideró la hora de la recolección. Otro factor que no se controló adecuadamente y que tal vez influyó en la variación de la actividad amilásica, se refiere al tiempo transcurrido entre la toma de muestras de saliva y el análisis ya que para las muestras iniciales fue de menos de 7 días y en las muestras finales transcurrió un período mayor a 7 días, lo que indica y es indiscutible que la actividad amilásica tiende a disminuir una vez que la saliva ha sido secretada, a pesar de almacenarse a 4°C. Es importante lo anterior, puesto que la presencia de bacterias vivas en la saliva y la pérdida espontánea de CO<sub>2</sub>, después de la recolección, causan cambios en la composición en reposo, por lo que la exactitud de los análisis depende del tiempo transcurrido entre la recolección y el análisis (Jenkins, GN., 1983).

#### **DETERMINACIÓN DE AMILASA EN MANCHAS DE SALIVA SECA.**

La identificación de amilasa en manchas es importante desde el punto de vista criminalístico.

Para el estudio de la actividad amilásica en manchas de saliva seca, se modificó la técnica de Street y Close (diseñada para estudios clínicos de amilasa en suero y orina). Las muestras problema consistieron en un soporte de papel filtro, se cortaron en fragmentos de aprox. 5mm<sup>2</sup>, que se humectaron con 100 µl de agua destilada a modo de volver a suspender la amilasa y las sustancias de grupo sanguíneo hidrosolubles, se centrifugaron y del sobrenadante se tomó una alícuota de 10 µl para el análisis de la actividad amilásica. La tabla 5, nos muestra los resultados obtenidos en las 47 muestras analizadas. Estos resultados nos muestran la utilidad de este método para determinar actividad amilásica en manchas de saliva seca, ya sea preparada sobre papel filtro o impregnada sobre colillas de cigarro, identificando indirectamente la presencia de saliva sobre todas las muestras estudiadas, ya que en todos los casos se obtuvieron resultados positivos.

La variación observada en los valores de actividad amilásica para manchas de saliva seca, se pueden explicar de acuerdo a las siguientes consideraciones:

1. Las manchas de saliva fueron preparadas sobre papel filtro de diferente grosor. Las muestras 1-24 son manchas de saliva sobre el papel filtro grueso, de poro grande, que posee una gran capacidad de absorción, mientras que las muestras 25-44 son manchas de saliva impregnadas sobre papel filtro Whatman No. 1 de poro pequeño, las manchas 45, 46 y 47 provienen de papel de una colilla de cigarro, cuyo poro y grosor es diferente a los anteriores.

Lo anterior, es indiscutible porque la cantidad de saliva impregnada es mayor sobre el papel filtro de poro grande que el papel de poro pequeño. Esto se confirma con los valores mayores de actividad amilásica obtenidos por las muestras 1-24 (que fluctuaron entre 42 y 8,775  $\mu\text{l}$ , con un valor promedio de 33,767.20  $\mu\text{l}$  que en las muestras 25-44 (con valores de 43 a 5,991  $\mu\text{l}$ , con promedio de 1,008.05  $\mu\text{l}$ ; así como las muestras 45-47 (con valores de 1346 a 11437  $\mu\text{l}$ ; con promedio de 4,771.66  $\mu\text{l}$ ) adicionalmente el tiempo de secado, que fue evaluado de manera formal esta influyendo los resultados obtenidos, puesto que las muestras 1-24 fueron impregnadas aproximadamente 3 meses antes del análisis, mientras que las muestras 25-44 fueron secadas de 1-7 días.

2. El fragmento de papel recortado para un análisis también influye en la actividad amilásica. Un fragmento mayor a 5mm<sup>2</sup> de papel filtro con manchas de saliva, dará resultados de actividad amilásica mayores, esto se explica debido a que la cantidad de saliva por extraer será mayor que la que se extrae de un fragmento de 5mm<sup>2</sup>.

3. El volumen utilizado para extraer la mancha de saliva del soporte, es importante porque si se utilizan cantidades mayores a 100  $\mu\text{l}$  de agua destilada, la actividad amilásica se verá disminuida con clara tendencia a valores de 0  $\mu\text{l}$ , cuanto más grande sea la cantidad de agua destilada para la extracción, por el contrario si se emplean cantidades menores de agua destilada para la extracción, los valores de actividad amilásica aumentarán con clara tendencia hacia los valores reportados para la saliva fluida.

4. Al igual que en la toma de muestras de saliva fluida, en la toma de salivas secas sobre soporte de papel filtro, se consideró la hora de la recolección.

## **ESTIMACIÓN DE LA DILUCIÓN DE SALIVA EN MANCHAS SECAS.**

Es sabido que los estudios forenses para identificar saliva y manchas de saliva seca se basan fundamentalmente, en la presencia de altas concentraciones de alfa-amilasa, (Tenovuo, OJ., 1989) y para tal efecto se han diseñado varias técnicas para la detección directa de amilasa por métodos isoeléctricos o su detección indirecta midiendo su actividad enzimática sobre un sustrato de almidón (Caraway, T., Wendell, T., 1960; Tietz, N., 1987).

Sin embargo, la saliva y muchos otros fluidos son frecuentemente difíciles de identificar en forma contundente debido a las cantidades limitadas de muestras únicas de que se disponen para su análisis (Jenkins, GN., 1983)

Según Culliford, B.J. (The examination and Typing of bloodstains in the crime laboratory) cuando se analiza saliva por la técnica de absorción-inhibición, es frecuente encontrar fuerte inhibición con salivas diluidas 1:1000, mientras que las reacciones falsas positivas A y B se detectan raramente a diluciones de 1:10.

Es discutible pues la inhibición al presentarse a diluciones altas como 1:1000; se deducirá que el título de anticuerpos en dicha muestra esta reducido notablemente significando que su actividad hemaglutinante esta inhibida. Mientras que a diluciones de 1:10 favorecen a la inhibición inespecífica, en virtud de presentarse el efecto prozona (debido a exceso de anticuerpo eluido)

También, es común detectar u obtener resultados negativos sí saber si son causados por la ausencia del antígeno y no por la insuficiencia de muestras.

Asimismo, tipificar una mancha seca de saliva es más difícil que en saliva fluída, puesto que involucra a esta mancha con el proceso de adsorción sobre un soporte y el grado en que pueden recuperarse las sustancias de la muestra variará con la calidad de la extracción.

Por lo antes expuesto, el presente estudio se propuso también estimar la dilución aproximada de saliva, presente en una mancha para tener un punto de partida que facilite la titulación de anticuerpos, y saber con certeza si existía o no.

La dilución estimada de las 47 manchas de saliva a partir de su actividad amilásica y título de anticuerpos se distribuyó principalmente en el rango comprendido 1:16-1:32, en el que se ubicaron 9 muestras que corresponden al 19.14% y solo 2 muestras se ubicaron en el

rango de dilución 1:2048-1:4096, que corresponden a una frecuencia del 4.25%, el resto de las muestras se distribuyeron en los otros intervalos de diluciones **Tabla 10**. Lo anterior indica, que a pesar del pequeño fragmento de papel usado en la prueba (5mm<sup>2</sup>) y de la dilución adicional realizada (100 µl de agua destilada usada para su extracción), la técnica es lo suficientemente sensible para detectar la actividad amilásica a las diluciones ensayadas. Además, es importante recalcar que no se obtuvo ningún resultado falso negativo, lo que indica que esta técnica es adecuada para realizar estudios forenses sobre este tipo de indicios.

### **DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS DE GRUPO SANGUÍNEO DEL SISTEMA ABO EN MUESTRAS DE SALIVA FLUIDA**

Las diluciones hechas con las muestras de saliva de los 9 voluntarios, de 1:2 hasta 1:4096 y que se trabajaron para determinar actividad amilásica, se utilizaron también para identificar las sustancias de grupo sanguíneo presentes en cada una de las muestras hasta la dilución 1:256. Los resultados se presentan en las **Tablas 6, 7 y 8**.

De acuerdo con los resultados de las tablas citadas, se obtuvo el título de anticuerpos de las 9 muestras en sus diferentes diluciones, haciéndolas reaccionar con diluciones seriadas al doble de antisuero, y evaluando la dilución máxima, a la cual aún se aprecia aglutinación de las células correspondientes. (El título de anticuerpo, es el límite al cual aún, puede ser diluido el antisuero sin perder su actividad inmunológica, reaccionando todavía con el antígeno correspondiente).

Para la obtención del título de anticuerpos para la determinación de sustancias de grupo sanguíneo del sistema ABO en muestras de saliva de individuos de tipo "A", **Tabla 6**, el valor de hemaglutinación adecuada para cada anticuerpo en todas las diluciones de Antígenos y Anticuerpos, debería ser de 0, 4, 4 para anti A anti B y anti H, respectivamente, ya que de acuerdo con el fundamento de la técnica de Absorción-Inhibición, las sustancias de grupo sanguíneo presentes en la muestra de saliva corresponden a la del antisuero en donde no ocurre aglutinación (inhibición de la aglutinación, valores de 0 en la escala de hemaglutinación). Sin embargo, los valores de aglutinación:

0,7,5	0,4,2	0,5,3	0,3,3
0,8,2	0,2,4	0,2,5	0,2,2

También son congruentes para la presencia de sustancia "A" en la saliva de individuos de grupo sanguíneo "A". Es decir, en todas las diluciones de trabajo de saliva y de antisuero, se debió haber obtenido un valor de aglutinación de 0 (cero) que corresponde a la inhibición de la aglutinación por la presencia del antígeno de grupo A, que se asocia al antisuero A, no quedando anticuerpos libres que se asociarán a los antígenos de los eritrocitos indicadores.

Sin embargo, esta condición no se cumplió en todas las muestras, tal y como se aprecia en la **Tabla 6**, ya que la muestra No. 3 exhibió aglutinación casi a todas las diluciones de trabajo en presencia de Anti-A, lo que indica probablemente una baja concentración de sustancia "A" en su forma hidrosoluble. Es decir, la saliva de esta muestra contiene escasa cantidad de sustancia de grupo A, la cual fija o absorbe igualmente una cantidad mínima de anticuerpos anti-A, a diluciones bajas, por lo que el exceso de anticuerpos aglutinan a las células "A" añadidas posteriormente. Sin embargo, al ir aumentando las diluciones de anticuerpos anti A, se llega a la dilución en que la cantidad de anticuerpos anti-A, son absorbidos en su totalidad por antígeno A soluble de la saliva, inhibiendo la aglutinación de las células A indicadoras.

Los resultados obtenidos para la muestra No. 3, son característicos de las personas que presentan una secreción baja de sustancias de grupo, sin llegar a considerarlas no secretoras de estas sustancias.

En la **Tabla 6**, se aprecian valores de aglutinación de 0 (cero) a diluciones altas de antisueros, lo que indica que se presenta el efecto de prozona. Es decir, teóricamente, no se debe inhibir la aglutinación de saliva "A" al reaccionar con antisueros anti-B y anti-H, pero como a títulos altos de antisueros existen pocos anticuerpos, éstos; aunque no son absorbidos por los antígenos de la saliva, no son suficientes para producir la aglutinación de las respectivas células B y O, no manifestándose hemaglutinación.

Estos datos coinciden con lo reportado en la bibliografía, en el sentido de que esta técnica requiere de cantidad suficiente de antígenos solubles para que se absorba



completamente a su anticuerpo correspondiente, para determinar en forma confiable el grupo sanguíneo en saliva.

Para la obtención del título óptimo de anticuerpos para la determinación de sustancias de grupo en saliva de voluntarios de tipo "B" (Tabla 7), los valores de aglutinación correcta para todas las diluciones de saliva y antisueros debería ser de 4, 0, 4, para anti A, anti B y anti H respectivamente. Sin embargo, se consideran igualmente aceptables los siguientes valores de aglutinación.

3:0,3	4:0,2	3:0,3	3:0,3
3:0,2	2:0,3	2:0,3	2:0,2

Es decir, siempre deber manifestarse ausencia de aglutinación al reaccionar la saliva B (a cualquier dilución) con anti B a cualquier título.

De acuerdo, con los resultados de la Tabla 7, la condición antes mencionada no se cumple cuando se trabajan diluciones altas de saliva B con diluciones bajas de anticuerpos anti B. Esto se puede explicar de la siguiente manera: En diluciones altas de saliva existe escasa cantidad de sustancias solubles B que absorben una mínima cantidad de anticuerpos anti B existen en títulos bajos, por lo que deja libre (soluble) suficiente anti B que aglutina a las células B observándose hemaglutinación.

En la Tabla 7, también se observan valores de aglutinación iguales a 0 (cero) al reaccionar saliva B con antisueros anti A o anti H, lo cual no debe interpretarse como presencia del antígeno correspondiente, sino como un efecto de prozona, debido a la escasa cantidad de anticuerpo (este efecto se manifiesta principalmente con títulos altos de los antisueros).

Respecto al análisis de la Tabla 8, donde se presentan los resultados obtenidos para el título máximo de antisueros anti A, anti B y anti H, para determinar las sustancias de grupo sanguíneo en salivas diluidas de tipo O, la interpretación de resultados es similar que la efectuada para las salivas A y B, con la salvedad, de que se consideran resultados congruentes los siguientes valores de aglutinación. Las hemaglutinaciones marcadas con "1" no se representaron en las tablas de "valores de aglutinación", en virtud de haberse considerado como una aglutinación escasa.

4,3,0	4,3,0	4,2,0
4,3,0	3,3,0	3,2,0
4,3,0	2,3,0	2,2,0

Adicionalmente, se determinó el estado secretor de las muestras analizadas mediante la inhibición de la hemaglutinación haciendo las siguiente consideraciones.

1. La muestra de saliva (a cualquier dilución) de un "no secretor" aglutinará con los antisueros anti A, anti B y anti H (a cualquier título).

2. La muestra de saliva (a cualquier dilución) de un "secretor", no aglutinará con al menos un tipo de eritrocitos A, B u O, al reaccionar con los antisueros A, B y H.

De acuerdo, con los resultados de las Tablas 6, 7 y 8, de los 9 voluntarios, 8 fueron secretores de sustancias de grupo sanguíneo, mientras que la muestra 3 se consideró un débil secretor de estas sustancias, lo que representa el 11.11% de la población estudiada.

### **OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE ANTISUEROS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS DE GRUPO EN MUESTRAS DE SALIVA FLUIDA.**

Los resultados de la Tabla 9, muestran el título más alto de los antisueros a los cuales se obtuvieron resultados confiables para la determinación de las sustancias de grupo.

En general, se observa un leve aumento en el título de anticuerpos al aumentar la dilución de la saliva, lo cual es congruente puesto que disminuye la cantidad de antígeno soluble en saliva al aumentar la dilución de la misma, entonces, el título del antisuero tiene que aumentar para que se manifieste la inhibición de la aglutinación, o de lo contrario, si se mantiene bajo el título del antisuero (muy concentrado) el exceso de anticuerpo aglutinará a los eritrocitos.

Es de notarse, que los títulos máximos obtenidos (que hacen un total de 72) en las 9 muestras trabajadas en todas sus diluciones, sólo se obtuvieron títulos bajos de dilución salival 1:4 en una muestra, lo que representa el (1.3%), y títulos altos de dilución salival 1:256 en cinco muestras que representan el (6.9%) del global de 72 muestras diluidas.

En promedio los títulos más altos en orden decreciente se observaron en las diluciones de saliva a 1:1256 y 1:16

## **DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS DE GRUPO SANGUÍNEO EN MANCHAS DE SALIVA SECA.**

Las Tablas 10 y 11 presentan los resultados obtenidos para la tipificación de sustancias de grupo sanguíneo en las 47 manchas de saliva seca analizadas. Estos resultados indican que, independientemente de la dilución de saliva estimada en cada mancha, se les tipificó con certeza el grupo sanguíneo a cada una de ellas, a excepción de las muestras 2, 10, 11 y 21 en las cuales se obtuvieron resultados negativos para la presencia de dichas sustancias.

Un aspecto importante en este trabajo fue el de haber tipificado sustancias de grupo en muestras de saliva seca provenientes de colillas de cigarro. Lo anterior, es importante por lo siguiente; se determinó actividad amilásica en dicha muestras, lo que indica presencia de saliva, por lo que la presencia de sustancias de grupo en las muestras de colillas de cigarro se debe a la saliva presente a las diluciones estimadas.

Los resultados negativos obtenidos en las muestras citadas con anterioridad indican claramente que se trata de salivas provenientes de individuos que no secretan sustancias de grupo sanguíneo en saliva. La ausencia de sustancias de grupo en las muestras 2, 10, 11 y 21 no pudo deberse a la falta de saliva ya que la actividad amilásica encontrada para cada una de ellas fue de 3.103, 85, 486 y 8026  $\mu$ l respectivamente, lo que indica diluciones estimadas de saliva dentro de los siguientes rangos 1:32-1:2048, 1:1024-1:2048, 1:256-1:512, 1:16-1:32 respectivamente. (Tabla 11).

Estas diluciones de saliva, aunque altas, aún se pueden tipificar sin problema. En cambio, si se hubieran obtenido diluciones mayores de 1:4096, la obtención de un resultado negativo para la presencia de sustancias de grupo sanguíneo en saliva, se explicaría porque no hay saliva realmente y no por tratarse de un individuo no-secretor.

Esta misma Tabla 11, nos muestra también las diluciones estimadas para cada una de las 47 manchas de saliva a partir de su actividad amilásica. Estas diluciones sirvieron como referencia para determinar el título máximo de anticuerpos hasta el cual todavía se pueden tipificar con certeza las sustancias de grupo en saliva. Lo anterior, no implica que la dilución estimada de saliva para cada mancha, sea la que marque de manera contundente el título de

anticuerpos óptimo a usar para la determinación del grupo en la saliva. La dilución estimada de saliva nos sirvió de referencia por dos razones:

1. Confirmar la presencia de saliva sobre el papel filtro o colillas de cigarro para determinar posteriormente la presencia de las sustancias de grupo sanguíneo con la confianza de que los resultados obtenidos provienen realmente de una mancha de saliva.

Como un dato de referencia, para ubicarnos sobre la cantidad de saliva presente en la muestra y poder elegir los títulos de anticuerpos a trabajar, para determinar satisfactoriamente el grupo sanguíneo de la muestra.

Como se muestra en los resultados de la **Tabla 10**, los títulos de antisueros que se trabajaron inicialmente, fueron de 1:32 para Anti A y Anti B, y 1:256 para Anti H. Estos títulos fueron seleccionados debido a que se consideraron como los títulos más altos para determinar las sustancias de grupos en muestras de saliva fluida (**Tabla 9**), y no rebasan en ningún caso el límite de dilución en cada mancha.

Finalmente, es importante mencionar que, de acuerdo con los datos de la **Tabla 11**, no se establece ninguna relación entre la secreción de amilasa con la secreción de sustancias de grupo sanguíneo, pero si es útil para definir con claridad la presencia de saliva y una cantidad aproximada de la misma, datos que sirven para establecer de manera confiable, junto con la determinación de sustancias de grupo en saliva, el estado secretor de un individuo.

## CONCLUSIONES

♦ Por la utilidad en cuanto a resultados obtenidos (ningún falso-negativo, ni falso-positivo a ninguna dilución); para identificar saliva en manchas secas y saliva fluida mediante la actividad enzimática de la amilasa, se establece que:

a) La adaptación del método de Street-Close, para el estudio cualitativo, cuantitativo de la actividad amilásica en saliva (fluida y en manchas secas), es adecuado en el estudio criminalístico de indicios. Esto se debe a su fácil y rápida aplicación, aunado a que solo requiere de cantidades escasas de saliva, ya sea fluida o como mancha seca. Adicionalmente, esta técnica es económica, lo que la hace accesible a cualquier laboratorio de química forense.

b) En diluciones de saliva mayores de 1:4096, no fue posible detectar actividad amilásica con el método seleccionado, esto no debe considerarse como desventaja del método, sino más bien como una característica de sensibilidad adecuada, en virtud de que ha dichas diluciones la presencia de saliva se consideran como trazas.

c) El valor promedio mediante resultados conjuntos de actividad amilásica para saliva fluida diluida 1:2, de voluntarios de grupo sanguíneo A, B y O es de 78,385  $\mu$ l.

d) Se determinó e identificó la presencia de manchas de saliva sobre papel filtro de diferente espesor (poro pequeño y grande), las cuales fueron expuestas-secadas durante varios días (1 a 90) a condiciones ambientales sin exposición a los rayos solares, así como también se identificaron por igual trazas de fluido salival en colillas de cigarrillo.

♦ Por la utilización del método de hemaglutinación directa y absorción-inhibición se determinó y estableció satisfactoriamente la presencia de sustancias de grupo en muestras de saliva fluida y en mancha seca.

a) El título máximo de antisuero para la determinación de sustancias de grupo en las muestras de saliva fluida analizadas a diferentes diluciones de los grupos sanguíneos "ABO", se ubicó en el rango de dilución de 1:256 y 1:16.

b) En las diluciones altas de saliva con títulos bajos de antisueros y viceversa, se dificultó la lectura de la hemaglutinación debido a que se presenta el efecto de prozona.

c) Se determinó la presencia de sustancias de grupo sanguíneo en manchas de saliva seca sobre papel filtro, así como en colillas de cigarro, en fragmentos de papel de 5mm<sup>2</sup> con actividad amilásica equivalente a la de saliva diluida hasta 1:256.

Para fines forenses, se recomienda diluir 5x5mm<sup>2</sup> del soporte con la mancha de saliva en 100 µl de solución salina y trabajar con títulos de antisueros 1:16, 1:32 y 1:64 (diluir un fragmento de soporte para cada antisuero).

d) Se trabajaron las sustancias de grupos sanguíneos presentes en las muestras de saliva mediante el análisis potencial de aglutinación, mediante una escala que se propuso de hemaglutinación, para seleccionar el título óptimo de antisueros.

e) La presencia de material suspendido como son bacterias, células epiteliales y la pérdida espontánea de CO<sub>2</sub>, después de su recolección causan cambios en la composición en reposo, de aquí que la exactitud de análisis depende del tiempo que transcurre entre la recolección y su fase analítica.

♦ La estimación de la dilución aproximada de saliva en mancha seca a partir de su actividad amilásica, se utilizó únicamente como un dato de referencia para establecer el rango de trabajo del título de anticuerpo, para determinar adecuadamente a las sustancias de grupo sanguíneo.

a) Se determinó que la actividad amilásica calculada en las manchas de saliva seca analizadas cuyo soporte fue papel filtro de diferente grosor fue menor a los 10,000 µl (muestras comprendidas entre la No. 1 y 44).

b) Se estimó la dilución equivalente de cada una de las manchas de saliva seca que se trabajaron en la presente investigación y el mayor porcentaje de ellas se situó entre las diluciones 1:16 y 1:32; correspondientes a las muestras 5, 9 y 21.

c) En las muestras de colillas de cigarrillo se determinó la actividad amilásica, y por consiguiente se identificó la presencia de saliva, asimismo, se identificaron las sustancias de grupos sanguíneos del sistema ABO en estas muestras; sin embargo, como la muestra no es representativa, se recomienda en lo general continuar con este estudio (muestras comprendidas entre la 45, 46 y 47).

## **PERSPECTIVA PARA INVESTIGACIONES FUTURAS**

Se propone diseñar proyectos de investigación que aborden las interrogantes surgidas de la presente tesis doctoral y/o profundizar ampliando lo ya escrito en la misma.

- Realizar la determinación del grupo sanguíneo en manchas secas de saliva por medio del “DNA” realizando análisis y estadísticas comparativas con respecto a las técnicas empleadas en la presente investigación.
- Crear un proyecto para la determinación de la actividad amilásica y del título de anticuerpos (anti-A, anti-B y anti-H), por medio de saliva diluida y en manchas secas de las sustancias de grupo sanguíneo “AB”.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Baez Villaseñor J. *Hematología clínica*. México, Méndez Oteo, 6ª edición, 1978.
- 2) Balthazar V. *Manual de medicina legal*. España, Salvat, 1940.
- 3) Balthazar V. *Manual de medicina legal*. España, Salvat, 1953.
- 4) Bard P. *Fisiología médica*. México, Prensa Médica, 1975.
- 5) Bodansky M, Fay M. *Laboratory manual of physiological chemistry*. Gran Bretaña, 4ª edición, 1948.
- 6) Cantaron A, Schepartz B. *Bioquímica*. Interamericana, 1988.
- 7) Caraway T, Wendell T. *Microchemical methods for blood analysis*. Gran Bretaña, Black Well Scientific Publications, 1960.
- 8) Clausen H, Stroud M, Parker J, Springer G, Hakomori SI. Monoclonal antibodies directed to the blood group a associated structure, galactosyl-A: specificity and relation to the Thomsen-Friedenreich antigen. *Molecular Immunology* 1988;25(2):199-204.
- 9) Clifford Kimber D. *Manual de anatomía y fisiología*. México, La Prensa Médica Mexicana, 1978.
- 10) Conn E, Stumpf PK. *Bioquímica fundamental*. México, Limusa, 2ª edición, 1967.
- 11) *Diccionario de especialidades en análisis clínicos*. PLM "Kits" Y Reactivos para diagnósticos, México, 1991.
- 12) Dobrosielsky-Vergona K. *Biology of the salivary glands*. United States, CRC Press, 1993.
- 13) Durante Avellanal C. *Diccionario odontológico*. Argentina, Mundi, 4ª edición, 1982.
- 14) Emeribe AO, Igweagu CA, Osim EE. ABH secretor status in saliva of Calabar Municipality residents. *East Afr Med J* 1992;69(1):27-30.
- 15) Farias Martínez G. *Elementos de bioquímica y fisiología*. México, Medicina, 1991.



- 16) Fernández Pérez R. Elementos básicos de medicina forense. México, Méndez, 1992.
- 17) Franco de Ambriz, M. Hematología forense. México, Porrúa, 1991.
- 18) Ganong WF. Fisiología médica. México, Manual Moderno, 11ª edición, 1988.
- 19) Gibbons RJ, Qureshi JV. Selective binding of blood group-reactive salivary mucins by *Streptococcus mutans* and other oral organisms. Infection and Immunity 1978;Dec:665-671.
- 20) Goldstein L. Fisiología comparada. México, Méndez Oteo, 1978.
- 21) Green C. The ABO, Lewis and related blood group antigens; a review of structure and biosynthesis. FEMS Microbiology Immunology. 1989;47:321-330.
- 22) Grolier. Enciclopedia de las ciencias. México, Cumbre, 1980.
- 23) Guyton A. Fisiología humana. México, Interamericana, 4ª edición, 1975.
- 24) Ham, A.W. Tratado de histología. México, Interamericana, 8ª edición, 1984.
- 25) Harper AH. Manual de química fisiológica. México, El Manual Moderno, 6ª edición, 1976.
- 26) Harrow B. Laboratory manual of biochemistry. United States, Philadelphia and London, 1942.
- 27) Horsters H. Manual de diagnóstico clínico. Alemania, Leverkusen, 1957.
- 28) Jenkins GN. Fisiología y bioquímica bucal. México, Limusa, 1983.
- 29) Jensen D. Fisiología. México, Interamericana, 1979.
- 30) Jiménez C. Nuevos aspectos de la hematología. Científica Medicina, 1952.
- 31) Junqueira LL. Histología Básica. México, Masson, 4ª edición, 1996.
- 32) Kelman GR. Fisiología un enfoque clínico. México, El Manual Moderno, 1981.
- 33) Lazzari E. Bioquímica dental. México, Interamericana, 2ª edición, 19 .
- 34) Lehnartz E. Fisiología química. México, Nacional, 1949.
- 35) Lehninger A. Bioquímica. España, Omega, 2ª edición, 1985.
- 36) Lessing R, Edelman J. Individualisation of dental tissue and aid for odontological identification 1995; 13(1):1-4.
- 37) Lie MA, van der Weijden GA, Timmerman MF, Abbas F, de Graaff J, Henskens YMC, van der Velden U. Relationship between salivary blood group antigens,

- microbial flora and periodontal condition in young adults. *J Clin Periodontol* 1994;21:171-176
- 38) Ligtenberg AJM, Veerman ECI, de Graaff J, Nieuw Amerongen AV. Influence of the blood group reactive substances in saliva on the aggregation of *Streptococcus rattus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 1990;57:97-107.
- 39) Lisker R, Armendares S. *La genética y usted*. México, Siglo XXI, 1984.
- 40) Mackenzie IC, Dabelsteen E, Mandel U. Expression of blood group antigen-related carbohydrates by human gingival epithelia. *J Periodont Res* 1989;24:289-297.
- 41) *Manual de laboratorios de Química Merck*. Kit para la determinación de alfa amilasa Merck o test.
- 42) Mascaro y Poscar J. *Diccionario terminológico de ciencias médicas*. México, Salvat, 2ª edición, 1983.
- 43) Masseyeff R. *Methods of immunological analysis*. Alemania, 1957.
- 44) Mazur A, Harrow B. *Bioquímica médica*. México, Interamericana, 1987.
- 45) McClintic JR. *Fisiología del cuerpo humano*. México, Limusa, 1983.
- 46) Mertz E. *Bioquímica*. México, Publicaciones Culturales, 1978.
- 47) Mitchell PH. *Tratado de fisiología general*. México, Labor, 2ª edición, 1956.
- 48) Moreno González R. *La investigación científica*. México, Porrúa, 1986.
- 49) Moreno González R. *Manual de introducción de la criminalística*. México, Porrúa, 1986.
- 50) Moreno González R. *Balística forense*. México, Porrúa, 1987.
- 51) Moreno González R. *Ensayos médicos forenses y criminalísticos*. México, Porrúa, 1987.
- 52) Morita K, Itoh Y, Kimura H, Kaneko Y, Matsuzawa S. Simple determination methods for blood grouping from biological stains 1. Immunologic gold colloid aspiration test and dot ELISA test by membrane aspiration method for determining ABO blood groups from saliva specimens. *Nippon Hoigaku Zasshi* 1995;49(2):80-86.

- 53) Muller-Seifert. Manual de exploración y de diagnóstico médico. España, Manuel Marín, 1968.
- 54) Nikolenko OV, Dianova TN. Detection of the group antigen A1 in stains of saliva and sperm mixed with blood by immunoelectrophoresis methods. *Sud Med Exspert* 1987;30(3):27-28.
- 55) Ocaraza F. Fisiología humana. México, 1979.
- 56) Peregrín Suárez E. Manual técnico de análisis clínicos. España, Urania, 1937.
- 57) Rein H. Fisiología humana. España, Manuel Marian y G. Campo. 1980.
- 58) Richard L, Bithell T, Foerster J. *Clinical hematology. United States*, 1993.
- 59) Rifkind A, Banic A. Hematología clínica. México, Interamericana-Mc Graw, 1986.
- 60) Rojas N. Medicina legal. México, El Ateneo, 1966.
- 61) Schiff F, Boyd CW. Blood grouping technic. United States, Interscience, 1952.
- 62) Schneider H, Neuhuber F. Detection of saliva traces on perpetrator masks and their attribution to a particular criminal. *Arch Kriminol* 1996;198(1-2):31-37.
- 63) Schottelius Byron A. Fisiología. México Interamericana, 1975.
- 64) Schumm D. Principios de Bioquímica. México, El Manual Moderno, 1988.
- 65) Smith S. Forensic medicine. 1953.
- 66) Snyder L. Investigación de homicidios. México, Limusa, 1988.
- 67) Suñer Pi S. Bioquímica. España, Paz Moltalvo, 1966.
- 68) Tenovuo OJ. Human saliva clinical chemistry and microbiology. United States, CRC Press, 1989.
- 69) Thomas CJ. Comparative review of bitemark cases from pretoria. *Journal of Forensic Odonto-Stomatol.* 1994;12:2.
- 70) Thomas CJ. Individualisation of dental tissue. *Journal of Forensic Odonto-Stomatol.* 1995; 13:1.
- 71) Tietz N. Química clínica moderna. México, 1987.
- 72) Tills D, Kopek A, Tills R. The distribution of the human blood groups and other polymorphisms. *Oxford Monographs on medical genetics. Oxford University Press, Oxford*, 114-124, 1983.

- 73) Topek, M. Bioquímica. México, Interamericana, 1975.
- 74) Tortora G. Principios de Anatomía y Fisiología. México, Hara, 5ª edición, 1981.
- 75) Turk JL. Inmunología en medicina clínica. México, El Manual Moderno, 2ª edición, 1972.
- 76) Vibert CH. Tratado de medicina legal y toxicología. España, José Espasa, 1989.
- 77) Vick R. Fisiología médica contemporánea. México, Mc Graw-Hill, 1986.
- 78) Wang B, Wang Q, Koda Y, Akiyama K, Kimura H. Measurement of ABH blood group substances in human saliva by immunoassay using artificial antigens as standard substances. Nippon Hoigaku Zasshi 1996;50(2):43-49.
- 79) Warner Chamber R. De la célula al tubo de ensayo. La ciencia de la bioquímica. México, Limusa, 1972.
- 80) Wiener A. Blood groups and transfusion. United States, 1973.
- 81) Williams RAD. Bioquímica dental básica y aplicada. México, El Manual Moderno, 1989.
- 82) Yazawa S, Ohkawara H. A simple and sensitive method for the determination of blood group antigens in secretions. J Immunol Methods 1992;147:221-5.
- 83) Yukawa N, Kohno T, Osawa M, Saito T, Nakajima Y, Ishikawa E, Takahama K, Takeichi S. Sandwich capture enzyme immunoassay for water soluble blood group B substances in secretor saliva. J Immunoassay 1995; 16(3): 247-261.

## **CURRICULUM VITAE**

### **DATOS PERSONALES**

**NOMBRE:** ENRIQUE MANUEL SANCHEZ SANCHEZ

**FECHA DE NACIMIENTO:** 16 DE MARZO DE 1962

**LUGAR DE NACIMIENTO:** MEXICO D.F.

**PROFESION:** CIRUJANO DENTISTA

**DOMICILIO** CALLE 1-A No. 29 COL. VIVEROS DEL VALLE  
TLALNEPANTLA ESTADO DE MEXICO  
C.P. 54060 TELS 3984646 Y 5279093

**PADRES:**  
Dr. ENRIQUE SANCHEZ GARAY  
CRISTINA SANCHEZ GARZA

### **ESTUDIOS REALIZADOS**

**LICENCIATURA:** FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
ENEP, IZTACALA  
UNAM  
LOS REYES IZTACALA  
TLALNEPANTLA, EDO. DE MEXICO  
CICLO ESCOLAR 1979-1983

**MAESTRIA EN CIENCIAS CON LA ESPECIALIDAD EN CRIMINALISTICA:** INSTITUTO DE CIENCIAS PENALES  
P.G.R. (I.N.A.C.I.P.E)  
TLALPAN, MEXICO D.F.  
CICLO ESCOLAR 1987-1989

**DIPLOMADO EN PROTECCION CIVIL Y PREVENCION DE DESASTRES:** UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA  
PROLONGACION PASEO DE LA  
REFORMA No. 880  
LOMAS DE SANTA FE  
ALVARO OBREGON  
MEXICO D.F.  
CICLO ESCOLAR 1992-1993

**DOCTORADO EN  
ODONTOLOGIA:**

**FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACION  
UNAM  
CICLO ESCOLAR 1999**

**DATOS LABORALES**

**1989-1999**

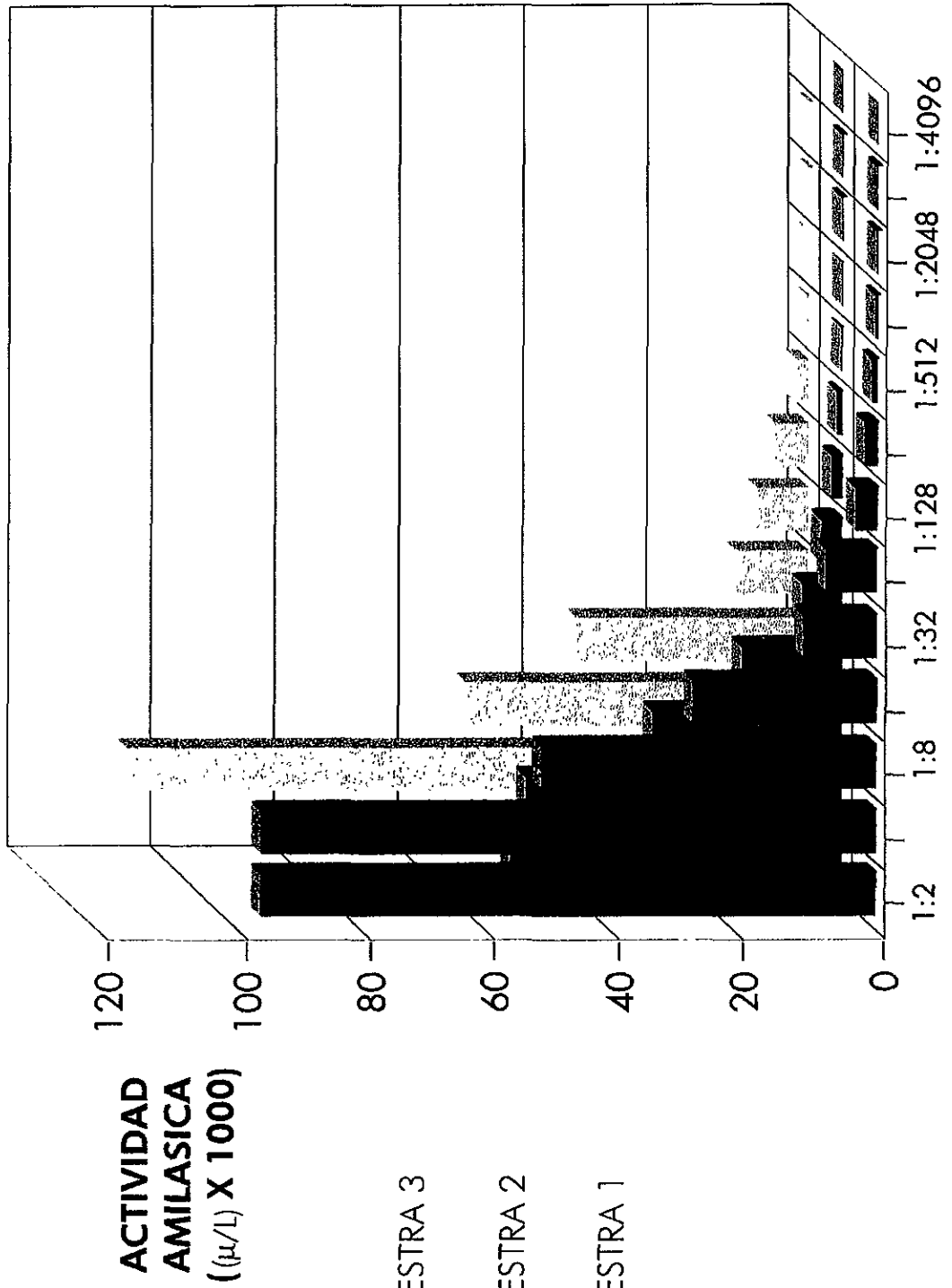
**CARGO  
PERITO DE DEPARTAMENTO  
DEL DISTRITO FEDERAL  
DEPENDENCIA PGJ DF  
DIRECCION DE ADSCRIPCION  
DIRECCION GENERAL DE SERVICIOS  
PERICIALES  
DEPARTAMENTO  
ARCHIVO DACTILOSCOPICO  
Y NOMINAL**

**1981-1999**

**CONSULTA PRIVADA EN  
ODONTOLOGIA**

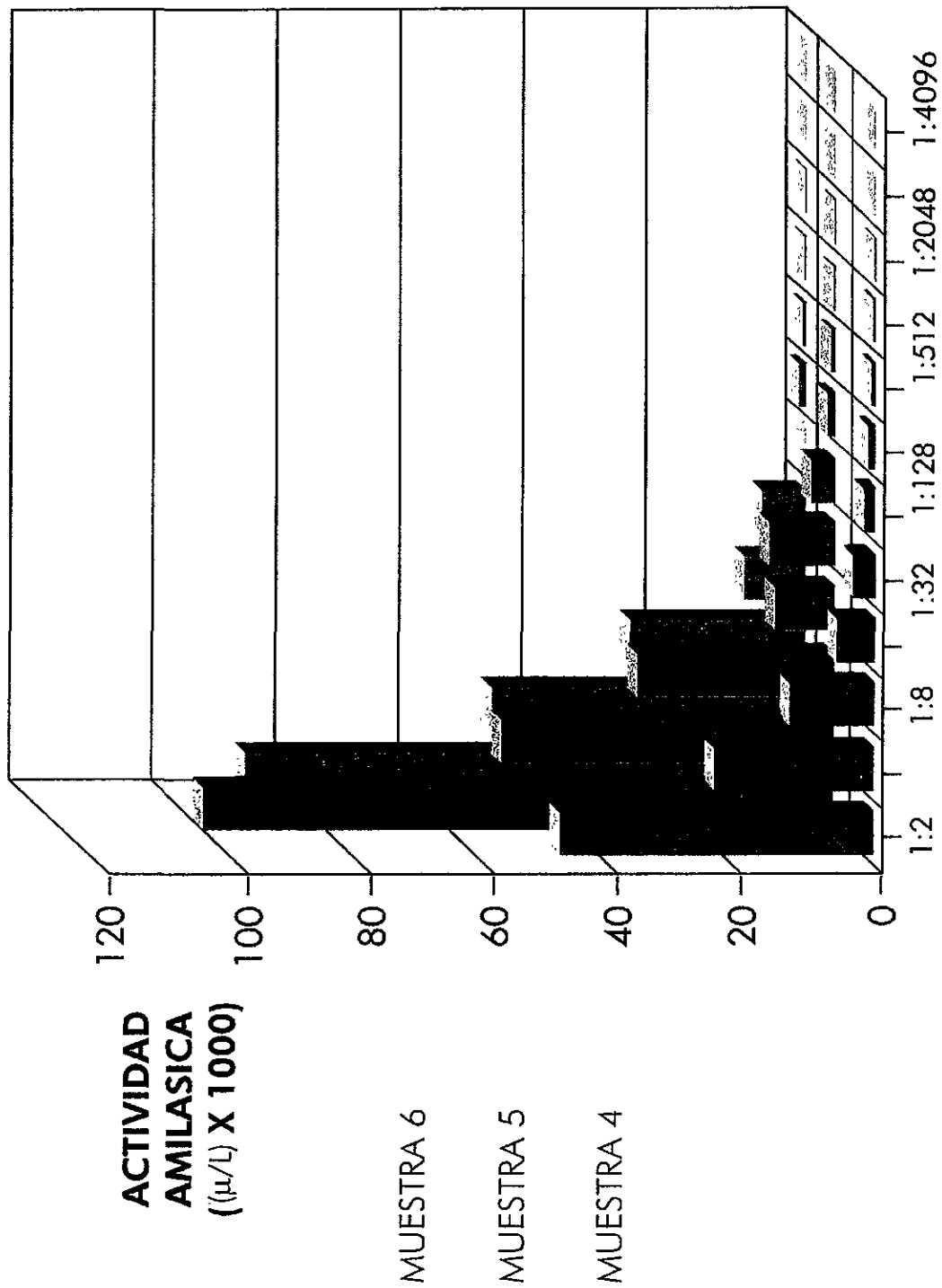
# APÉNDICE

**GRAFICA 1. ACTIVIDAD AMILASICA EN SALIVA  
DILUIDA DE VOLUNTARIOS DE TIPO SANGUINEO "A"**

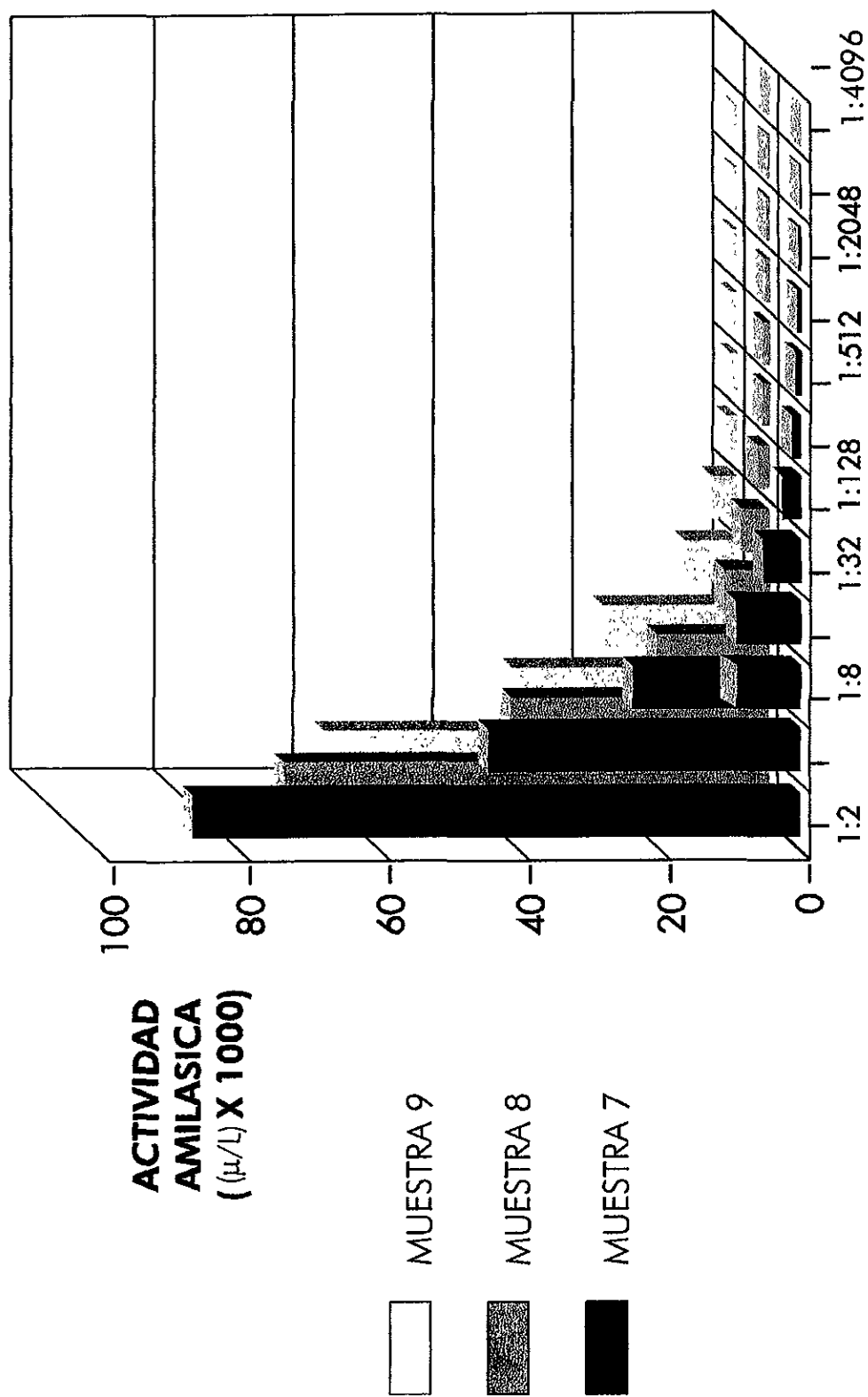




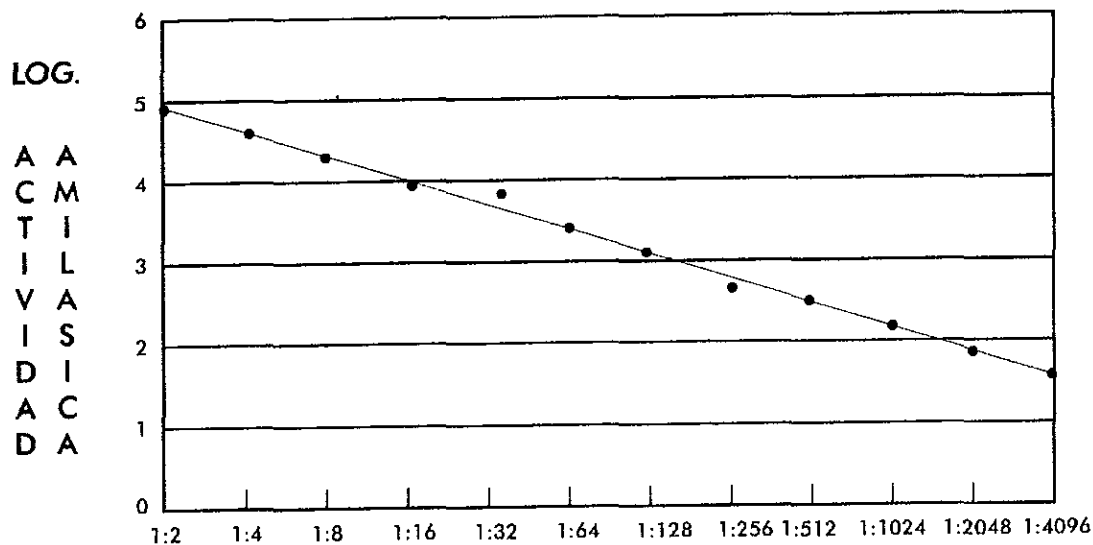
**GRAFICA 2. ACTIVIDAD AMILASICA EN SALIVA  
DILUIDA DE VOLUNTARIOS DE TIPO SANGUINEO "B"**



**GRAFICA 3. ACTIVIDAD AMILASICA EN SALIVA  
DILUIDA DE VOLUNTARIOS DE TIPO SANGUINEO "O"**



# GRAFICA 4. RECTA SEMILOGARITMICA DE LA ACTIVIDAD AMILASICA CONTRA DILUCIONES DE SALIVA



## DILUCIONES DE SALIVA

VALORES AJUSTADOS POR MINIMOS CUADRADOS

DILUCION	ACT. AMILASICA PROM. ( $\mu/L$ )	LOGARITMO
1:2	78385	4.89
1:4	40547	4.60
1:8	23213	4.36
1:16	8428	3.92
1:32	5770	3.76
1:64	2576	3.41
1:128	1193	3.07
1:256	453	2.65
1:512	303	2.48
1:1024	166	2.22
1:2048	77	1.38
1:4096	41	1.61