



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARRERA: QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

**DIPLOMADO EN QUÍMICA LEGAL**

**NOMBRE DE LA TESINA:**

**“MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS HUMANOS Y SU DIFERENCIACIÓN  
CON LA DE OTRAS ESPECIES: COMO PRUEBA DE CONFIRMACIÓN DE  
ESPECIE”**

**Año de término de la carrera: 2008**

**No. De cuenta: 30122491-4**

**Orientación: Bioquímica clínica**

**Alumna: WENDY ARELY NIETO MORALES**

---

**Asesor: Q.F.B. María Galia Martínez Flores  
Vo. Bo.**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a Dios por haberme permitido conocer esta parte tan bonita de la Vida, el estudiar las ciencias Biológicas, el poder ser parte de una de sus servidoras para el servicio de la Salud y sobre todo la vida que me dio para poder ver sus maravillas.

A mis padres que sin ellos esto no hubiera sido posible, por sus esfuerzos y su confianza por estar siempre conmigo en el camino que está destinado para mí, por su ejemplo, por enseñarme que en la vida existen dos caminos el de los triunfadores y los derrotados, por hacerme una persona de bien, por todo lo que en estos años han estado brindándome, por su infinito amor. Por todo mil gracias.

A mis hermanos por que la vida sería muy aburrida sin ustedes 3, por sus ánimos.

A mis maestros que gracias a ellos me enseñaron lo que el día de hoy aplico con mucho gusto.

A mi jefe el Ing. José Manuel Mendoza Reyes por confiar en mí cuando muchos lo dudaron, por estar siempre apoyándome en cada decisión y que juntos hemos llevado el laboratorio de Hospitales Vivo a donde está. Gracias por confiar en una joven como yo.

## **PENSAMIENTOS**

“He recibido de la vida el regalo más bello, mi familia, lo demás no tiene importancia.”

“La vida es como una obra de teatro, no importa su duración sino lo bien que se ha interpretado.”

“El hombre es una breve aventura química sin sentido.”

“La química orgánica es la química de los compuestos de carbono. La bioquímica es el estudio de los compuestos de carbono que andan a cuatro patas.”

**Mike Adams.**

“El hombre que ha perdido la facultad de maravillarse es como un hombre muerto.”

**Albert Einstein.**

“Lo que Dios ha separado no lo puede volver a unir el hombre.”

**W. Pauli. Físico**

“Estudia no para saber más sino para saber algo mejor.”

**Lucio Anneo Séneca.**

“La verdad es un ácido corrosivo que salpica casi siempre al que la maneja.”

**Santiago Ramón y Cajal. Médico e investigador. Premio Nobel.**

## INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	3
3.1 Antecedentes	3
3.2 Conceptos	3
3.3 Hematopoyesis animal	6
3.4 Morfología de los eritrocitos	6
3.5 Eritropoyesis	9
3.6 Pruebas de orientación	10
3.7 Pruebas confirmatorias	21
4. Problema de investigación	38
4.1 Planteamiento y justificación	38
4.2 Importancia del estudio	38
4.3 Limitaciones del estudio	38
5. Objetivos	39
6. Metodología	39
6.1 Tipo de estudio	39
6.2 Procedimiento	39
7. Discusión de resultados	40
8. Conclusiones	44
9. Referencias bibliográficas	45
10. Glosario	47

## 1. Resumen

La presencia de manchas de sangre en las escenas de las investigaciones forenses tiene una gran contribución en la resolución de los casos criminales, como también la tiene la identificación de sangre proveniente de un individuo o de otras especies, siendo este último uno de los principales casos a resolver, es importante poder conocer las diferentes técnicas que pueden ayudar a la resolución de este problema.

Para la investigación de este tipo de estudio existen dos tipos de metodologías, las pruebas de orientación y las pruebas confirmatorias.

Las pruebas de orientación utilizan los elementos formes de la sangre como son la hemoglobina, la morfología de los eritrocitos. En estas se utilizan reactivos de bajo costo, con la posibilidad de ser adquiridos por el laboratorio forense, estos métodos dan una clara orientación al perito de las muestras con las que cuenta, es importante resaltar que este tipo de pruebas pueden presentar falsos positivos, en algunas sustancias como: manchas de frutas, productos biológicos, entre otras.

Las pruebas de confirmación están basadas principalmente en reacciones antígeno anticuerpo como son: reacciones inmunológicas (como la de Ouchterlony o la Prueba de la precipitinas), de formación de cristales con reactivos específicos (Takayama o de Teichman)

La diferenciación de eritrocitos humanos con otras especies, son de gran ayuda al criminalista, debido a que con esto, puede continuar con la averiguación del presunto hecho delictivo. Estas pruebas son altamente específicas, rápidas y veraces. Utilizan una cantidad de muestras muy pequeña, la cual permite la posibilidad de realizar más pruebas.

Una vez teniendo conocimiento de las diferentes técnicas es elegir una de estas dependiendo de la circunstancia en la que se presenten las diferentes muestras.

El método de elección es la inmunocromatografía, la cual no se realiza en nuestro país pero es un método altamente sensible y específico, permite realizar la prueba en el lugar de los hechos e identificar inmediatamente la presencia de sangre y al mismo tiempo la diferenciación de sangre humana con las de especies animales, tiene como ventaja principal no afectar la realización de otras técnicas por ejemplo la identificación del individuo al que pertenece la sangre.

## **2. Introducción**

El hallazgo de manchas de sangre en las investigaciones forenses, juega un papel preponderante para la resolución de casos criminales.

Una vez que se ha confirmado que la mancha es sangre, la muestra debe ser analizada para su diferenciación de especie.

Entre los procedimientos más utilizados esta el test de Ouchterlony o las Pruebas: precipitinas, formación de cristales con reactivos específicos, Takayama o de Teichman, y otras poco usadas como microscópicas, espectroscópicas, cromatograficas, reacciones como: Van Deen, Aldler, Kastel Mayer, Medinger y de Catalasas, los cuales se basan en las propiedades físico químicas de la sangre.

Para la diferenciación de eritrocitos humanos con otras especies, se aplicaran alguna(s) de estas metodologías, con ello se puede aportar una mayor confiabilidad para este tipo de estudio.

Se analizaran los pros y los contras de cada una de estas pruebas con el fin de tener resultados más veraces y rápidos.

### 3. Marco teórico

#### 3.1 Antecedentes

Para poder abordar el tema de diferenciación de especie, es necesario conocer algunos conceptos como son: la sangre, sus propiedades físico – químicas, su relación que tiene con los métodos utilizados, antecedentes históricos, interferencias, ventajas, desventajas y sus aplicaciones para la confirmación de especie en el campo forense. Las manchas de sangre fresca son fáciles de reconocer, relativamente, cuando se encuentren en lienzos blancos; sin embargo, no siempre puede contarse con esta suerte. Cuando por evaporación se desecan y oscurecen, tienden a confundirse con: tinturas, jugo de frutas, manchas de vino tinto, etc. No limitaremos la investigación con decir que se trata de sangre, debe profundizarse el análisis y asegurar que es sangre humana o animal. Esto constituye uno de los problemas más importante en medicina legal.<sup>1</sup>

Las manchas recientes de sangre son por lo general evidentes, las secas o antiguas pueden ser minimizadas por otros pigmentos, en los cuerpos putrefactos, éstas pueden ser verdes o negras.<sup>2</sup>

Para ello se puede sacar provecho de los elementos figurados de la sangre para después hacer comparaciones con los elementos de otras sangres (animales) en muestras frescas o secas.<sup>1</sup>

#### 3.2 Conceptos

**3.2.1 La sangre:** es un conjunto de células en un líquido llamado plasma que circula por el sistema vascular, formado por vasos sanguíneos de diversos calibres. En los tejidos, del sistema vascular se ramifica y disminuye progresivamente su calibre hasta constituir la llamada micro circulación formada principalmente por capilares (sistema capilar) y vasos de muy pequeño calibre. Las paredes de los capilares permiten el intercambio de agua y de sustancias diversas entre el interior del sistema vascular y los tejidos del organismo, facilitando con ello la oxigenación y el metabolismo celular.<sup>3</sup>

**3.2.2. El plasma** constituye aproximadamente un 50% del volumen total de la sangre, está formado por un 90% de agua, en el que se hallan disueltas diversas sustancias nutritivas, de recambio metabólico o de desecho celular. Entre ellas destacan principios inmediatos, enzimas, electrolitos, gases y derivados del catabolismo celular. El componente plasmático más abundante está formado por proteínas que, sintetizadas en las células de los tejidos, son vertidas al plasma a través de mecanismos diversos (excreción, exocitosis o recambio, catálisis enzimas), de defensa (inmunoglobulinas y complemento), de transporte (transcobalamina, ceruloplasmina, transferrina), endocrina (hormonas) y hemostasia (factores de la coagulación), entre otras. El 50% restante del volumen sanguíneo está constituido por células que al igual que los componentes plasmáticos, se hallan sometidas a un continuo proceso de recambio o

renovación. Estas células son de tres tipos: eritrocitos, leucocitos y plaquetas, y todas ellas tienen su origen en una única célula pluripotente (célula madre) situada en el tejido hematopoyético de la médula ósea. Una vez en la circulación sanguínea y después de un cierto tiempo, las células son eliminadas por los macrófagos del sistema mononuclear fagocítico (SMF) de la propia médula ósea (hematopoyesis) y su eliminación a nivel del SMF (muerte celular).<sup>4</sup>

**3.2.3. Los leucocitos** se clasifican en tres subpoblaciones: polimorfonucleares, linfocitos y monocitos.<sup>2</sup>

**3.2.4. Las plaquetas** tienen como misión prevenir la extravasación de sangre a nivel del sistema capilar y contribuir a la coagulación sanguínea en caso de hemorragia.<sup>4</sup>

**3.2.5. Los eritrocitos** carecen de núcleo y organelos citoplasmáticos, y su única función es el transporte de la hemoglobina a lo largo del sistema vascular con el fin de garantizar la oxigenación de los tejidos.<sup>5</sup>

**3.2.5. Hemoglobina:** Es una sustancia formada por una matriz proteica, la globina, que lleva adheridas cuatro moléculas del heme, que le dan el color al compuesto. El heme está constituido por una protoporfirina de tipo III y un átomo de hierro ferroso que se une a los cuatro núcleos pirrólicos del anillo porfirico, fijándose igualmente, por sus dos valencias libres, a un nitrógeno globínico y al oxígeno. Esta última unión es reversible. Al separarse el heme de la globina, el grupo prostético se transforma en hematina, pudiendo aislarse de la hemoglobina, cristales de hemina, que son un clorhidrato de hematina. Es la primera proteína que se ha obtenido en estado cristalino, variando su forma de cristalización en las variedades adulta y fetal. El principio de la hemoglobina, en su núcleo porfirínico, se hace a partir de la glicocola y el ácido acético, la condensación de la glicocola con el ácido succínico, produce el ácido alfa-amino-beta cetoalópico, que al descarboxilarse genera el ácido delta-amino-lebulínico.<sup>6, 10.</sup>

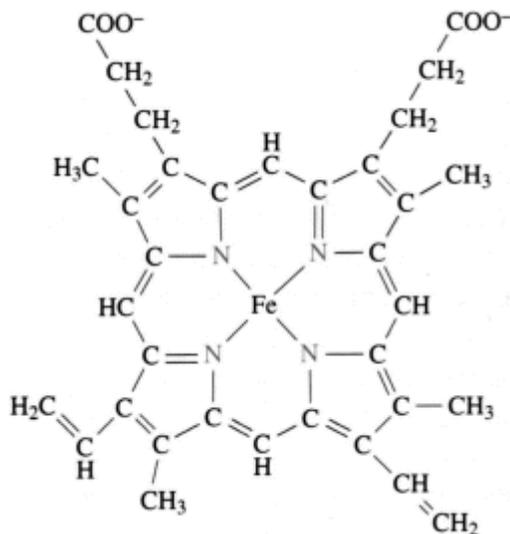


Fig. 1. Grupo Hemo, presente en la hemoglobina y la mioglobina.<sup>4</sup>

**3.2.6. La globina** está constituida por una cadena de aminoácidos y tiene un peso molecular de 66.000 D, variando la proporción de aminoácidos con su naturaleza y el tipo de su combinación, de acuerdo con las especies animales, así como en la hemoglobina fetal y en la adulta.<sup>10</sup>

**3.2.8. La porfirina** se forma a partir de cuatro moléculas de porfobilinogeno, formándose primero uroporfirina III y después coproporfirina y protoporfirina, que se presenta en cantidades muy pequeñas en los reticulocitos y aún en el eritrocito maduro, y se ve aumentada en ciertas anemias hemolíticas. Para que la globina sea sintetizada, son necesarios los aminoácidos que la constituyen, como son metionina, triptófano, tiroxina, lisina, arginina e histidina, haciéndose la síntesis en la fase de eritroblasto basófilo, lo que explica el aumento de la basofilia de su citoplasma por el acumulo de ácidos ribonucleicos.<sup>11</sup>

**3.2.9. El hierro** aparece en el eritroblasto, fijándose sobre la molécula globínica, y cuando desaparecen los ácidos ribonucleicos del protoplasma, es decir, a nivel de eritroblasto policromático. La síntesis de la hemoglobina cesa por completo en el glóbulo rojo maduro, pero las moléculas de sus elementos constituyentes se renuevan en forma continua durante toda su vida madura, aumentando la concentración del nitrógeno hasta alcanzar su máximo entre los días 15 y 20, en el día 80 comienza a disminuir.<sup>12</sup>

Una breve explicación de la hematopoyesis de las especies animales, con el fin de conocer lo que se podría encontrar en manchas de sangre que corresponden a estos géneros.<sup>10</sup>

### 3.3. Hematopoyesis de los animales

**3.3.1.** Todas las células sanguíneas tienen una vida media de finita, pero en los animales sanos el número de células en circulación se mantiene en un nivel constante. Para conseguirlo, las células que se hallan en circulación necesitan ser reemplazadas constantemente, y ello se consigue mediante la producción y emisión de células desde la médula ósea. Los centros de producción en la médula ósea se conocen normalmente como lugares medulares. En momentos de una mayor demanda, la producción puede realizarse fuera de la médula ósea en lugares como el bazo, el hígado y los ganglios linfáticos. Se trata de los lugares extramedulares. La hematopoyesis, la producción de células de la sangre, es un proceso complejo y sumamente regulado. Todas las células sanguíneas de la médula ósea surgen de una célula madre en común. Esta célula madre multipotencial origina diferentes fases de células progenitoras, que, posteriormente, se diferencian en células de la serie eritrocítica, granulocítica, megacariocítica, y agranulocítica (monocitos y linfocitos). El resultado final de este proceso es la emisión de eritrocitos, de leucocitos y de plaquetas al torrente sanguíneo. Con un microscopio óptico, resulta difícil identificar con precisión las primeras células madres de la médula ósea, pero podemos identificar los niveles más diferenciados de desarrollo, los cuales se indican en la gráfica a continuación:<sup>10</sup>

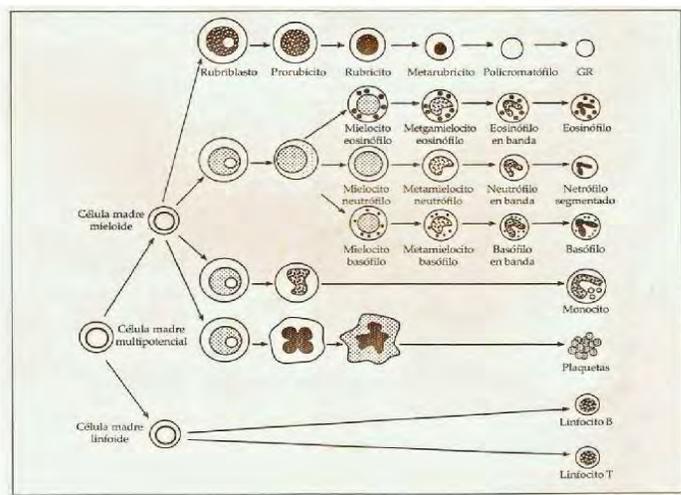


Fig2. Visión del conjunto de la hematopoyesis<sup>10</sup>

### 3.4. Morfología del eritrocito maduro de diferentes especies animales

Los rasgos morfológicos de los eritrocitos maduros de perros, gatos, caballos y rumiantes son generalmente muy parecidos, por lo que se refiere a la ausencia de núcleos, la coloración rojiza o anaranjada que generalmente son células de forma discoidal bicóncava. Las mayores diferencias se encuentran en el tamaño de los eritrocitos y el grado de palidez central. Clasificando de mayor a menor el tamaño de los eritrocitos y el grado de palidez central están los eritrocitos del perro, gato, caballo, vaca, oveja y cabra. La palidez central es el área de coloración más clara en el centro de la célula, debido a una estrecha asociación de las membranas en esa parte. Los eritrocitos de perro tienen palidez central más destacada. En gatos, caballos y rumiantes la palidez central no destaca. A diferencia de lo que ocurre en otras especies domésticas, los eritrocitos de las llamas son bastante diferentes morfológicamente. Aunque carezcan de núcleos y se tiñan de rojo o anaranjado, son pequeños discos elípticos que carecen de forma bicóncava y de palidez central. Otros dos rasgos morfológicos que pueden presentarse en animales sanos son las pilas de moneda y la anisocitosis.<sup>11,12,</sup>

En la siguiente imagen se muestra la representación gráfica de un eritrocito de un perro.

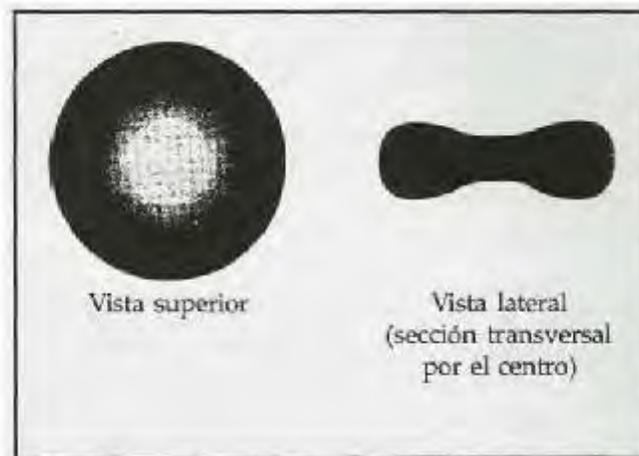


Fig. 3. Representación gráfica de un eritrocito de un perro sano. Observe que la zona de palidez central se debe a una estrecha aposición de las membranas y una cantidad disminuida de hemoglobina en esta zona.<sup>11, 12,13</sup>

En estas imágenes se muestran frotis de eritrocitos de especies.

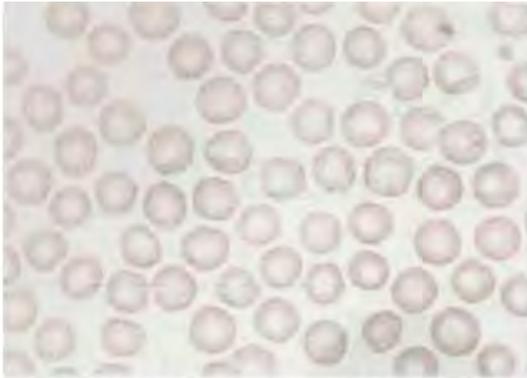


Fig. 4. Eritrocitos caninos. La mayoría de las células son de tamaño similar y tienen una palidez central destacada. Frotis de sangre canina. Objetivo 100X.<sup>15</sup>

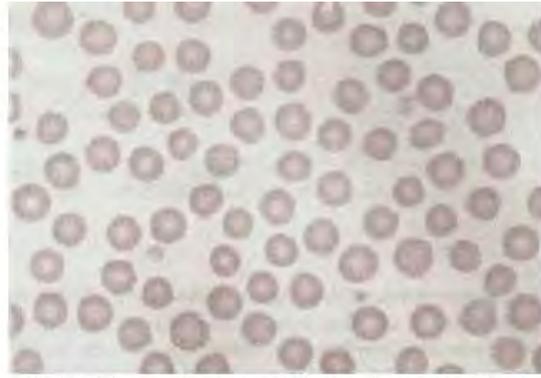


Fig. 5. Eritrocitos de vaca. Existe una ligera variación en el tamaño de estas células (anisocitosis) y tienen normalmente una palidez central limitada. Frotis de sangre bovina; objetivo 100X.<sup>15</sup>

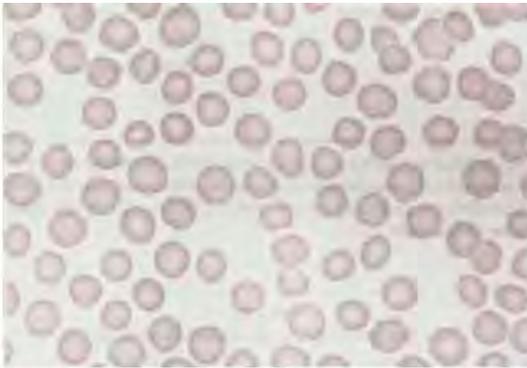


Fig. 6. Eritrocitos felinos. Estas células sea más pequeña que los eritrocitos de perro, existe una ligera variación de tamaño (anisocitosis) y tienen una palidez central limitada. Frotis de sangre felina; objetivo 100X.<sup>15</sup>

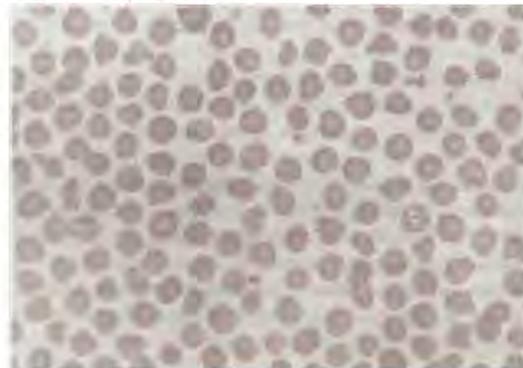


Fig. 7. Eritrocitos de Oveja. Observe el tamaño muy pequeño de estas células, al compararlo con los eritrocitos del perro y su palidez central limitada. Existe también una ligera variación de tamaño (anisocitosis) y forma (poiquilocitosis) en estas células. Frotis de sangre ovina; objetivo 100X.<sup>15</sup>

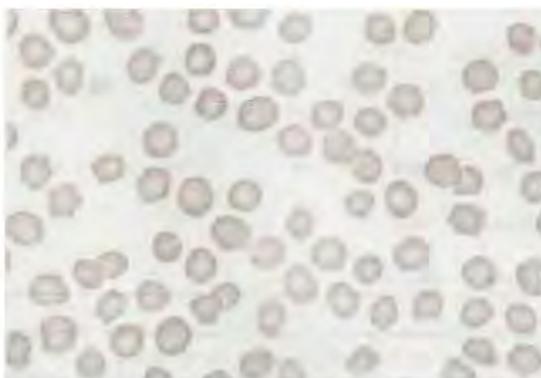


Fig. 8. Eritrocitos de caballo. Estas células son más pequeñas que los eritrocitos de perro y tienen una palidez central mínima. Frotis de sangre equina; objetivo 100x.<sup>16</sup>

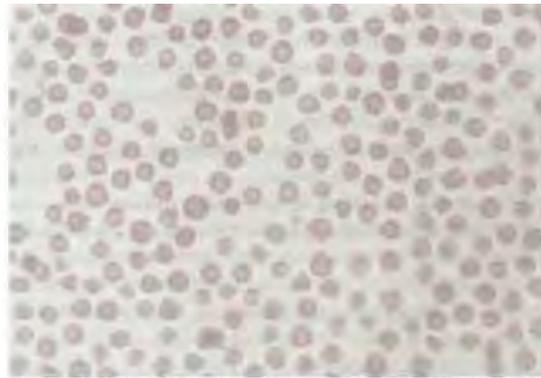


Fig. 9. Eritrocitos de cabra. Obsérvese el tamaño extremadamente pequeño de las células y la palidez central mínima. Es también normal que produzcan ligeras Variaciones de tamaño (anisocitosis) y forma (poiquilocitosis). Frotis de sangre de cabra; objetivo 100X.<sup>16</sup>



Fig. 10. Eritrocitos de llama. Estas células carecen de palidez central. Frotis de sangre de llama; objetivo 100X.<sup>16</sup>

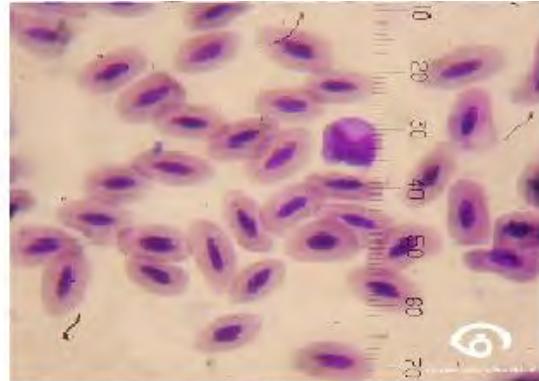


Fig. 11. Eritrocitos de Halcón. Estas células poseen núcleo. Frotis de sangre de halcón; objetivo 100X.<sup>16</sup>

### 3.5 Eritropoyesis

El desarrollo de los eritrocitos se detalla en el siguiente esquema:

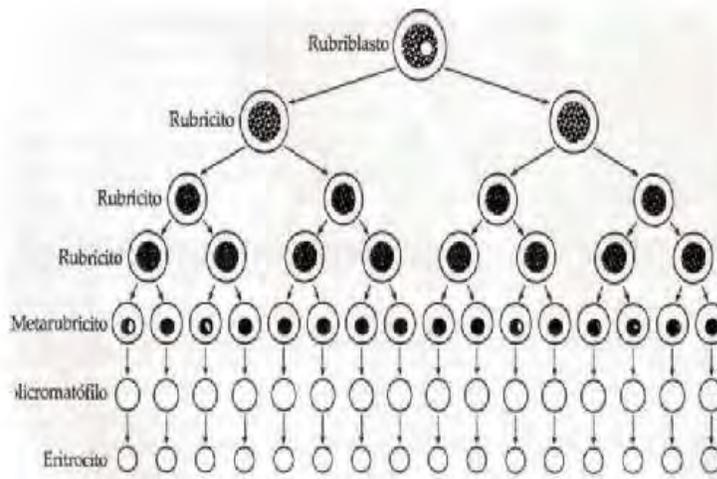


Fig. 12 Visión de conjunto de la eritropoyesis<sup>10</sup>

Como se puede observar la morfología de esta estirpe celular cambia considerablemente con la estirpe celular humana ya antes mencionada.

Existe una gran variedad de pruebas, las cuales se clasifican en dos: de orientación y de confirmación. Las primeras no son específicas y poco sensibles, las segunda son, absolutamente específicas. Lo aconsejable es empezar por estas ultimas.<sup>10</sup>

Explicaremos algunos de los métodos más utilizados para la diferenciación de sangre humana con otras especies.<sup>4</sup>

En las manchas secas por lo general no es posible extraer eritrocitos intactos para probar que en realidad es sangre, pero si permite aislar eritrocitos nucleados de

aves o reptiles para distinguir, los eritrocitos de mamíferos que no tienen núcleo (aunque esto logra hacerse con muestras líquidas frescas). Hay varias pruebas químicas presuntivas para la sangre, pero se debe tomar en cuenta que no son específicas y que quizá se obtengan falsos positivos debido a una gran variedad de sustancias, ya mencionadas.<sup>2</sup>

Contando con más elementos, pueden emplearse métodos biológicos para saber si la mancha es sangre humana o de otras especies, haciendo posible la identificación del individuo de quien procede la sangre.<sup>1</sup>

### **3.6. Pruebas de orientación**

Se basan en poner de manifiesto algún elemento característico de la sangre, bien sus elementos formes o la hemoglobina. Sobre la base de estos principios y de acuerdo con la metodología empleada, pueden dividirse en técnicas microscópicas, macroquímicas o cristalográficas, espectroscópicas y cromatográficas.<sup>4</sup>

#### **3.6.1. Técnicas microscópicas**

Tienen como fundamento el poner de manifiesto los elementos formes de la sangre, cuya presencia demuestra sin lugar a dudas la naturaleza sanguínea de la mancha. La investigación se hace unas veces directamente; otras veces requiere una preparación previa de los elementos formes para poderlos poner de relieve. Investigación directa: se realiza con un microscopio especial en el que la iluminación del objeto se hace por reflexión, lo que permite la visualización de cuerpos opacos. El más conocido es el Ultropack de la casa Leitz. Aunque se pueden examinar manchas que asienten sobre cualquier cuerpo opaco, los mejores resultados se consiguen cuando ellas se encuentran en una superficie plana, formando una costra delgada; el ejemplo más significativo es el de las manchas sobre la hoja de un arma blanca. Los hematíes aparecen a la observación como pila de monedas; cuando están bien conservados, puede apreciarse si son nucleados, así como su forma redondeada; u oval, con lo que pueden sacarse conclusiones en cuanto a la especie del animal que proceden.<sup>6</sup>

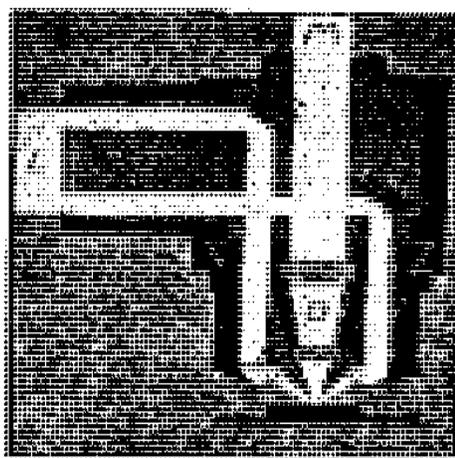


Fig. 13. Ultraviolet representation schematic of the path of light rays.<sup>6</sup>

En la tabla 1 muestra la primera diferenciación que aunque elemental puede servir para la confirmación de especie, al comparar el diámetro de los elementos figurados de estas sangres.<sup>7</sup>

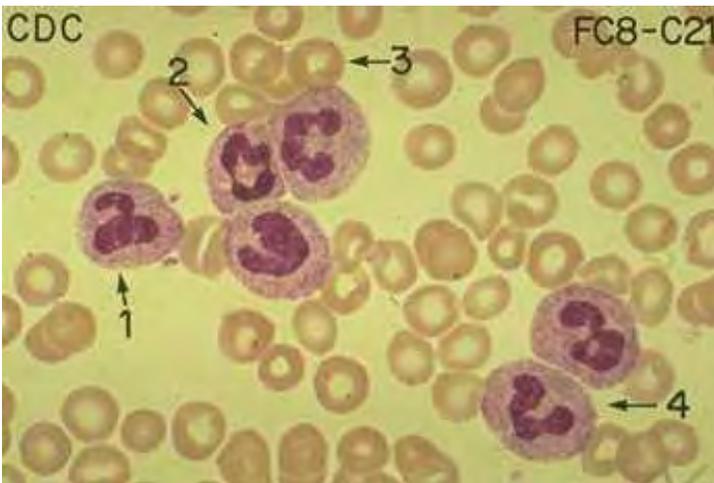
Especie	Diámetro ( $\mu$ )
Hombre	7.5
Perro	7.2
Conejo	6.9
Gato	6.5
Cerdo	6.0
Caballo, toro, vaca	4.6
Aves y batracios	Eliptocitos

Tabla 1. Diámetro de eritrocitos de diferentes especies.<sup>7</sup>

Con la comparación de los diámetros y sus formas, estamos en capacidad de decir si es o no humana la sangre que se analice.<sup>1</sup>

A menudo los elementos formes sanguíneos se rompen en la mancha y se hace imposible la investigación directa. No obstante, se han propuesto muchas técnicas para aislar y teñir los hematíes y los leucocitos en las manchas.<sup>5</sup>

Los colorantes que dan mejores resultados son la hematoxilina-eosina, May-Grünwald – Giemsa, el reactivo nuclear de Feulgen o la técnica histoquímica de Grahnan-Knol, que evidencia las peroxidasas leucocitarias. En 1965, Marcoux ha propuesto una técnica que podría ser válida para cualquier campo de la citología forense; consiste en pasar el macerado a través de un filtro Millipore, tiñendo éste directamente tras la correspondiente fijación y diafanización.<sup>5</sup>



Leucocitos normales

Referencias:

- 1- Neutrófilo en banda
- 2- Neutrófilos segmentados
- 3- Eritrocito
- 4-Neutrófilo en segmentación

Coloración:

May Grunwald – Giemsa

Fig.14. Frotis de sangre periférica (humano)<sup>8</sup>

Ventajas:

- Si el examen de la muestra es directo, no modifica la prueba de convicción en absoluto.
- Cuando el diagnóstico es positivo, puede adelantar datos referentes a la especie.

Desventaja:

- La prueba solo tiene valor si es positiva.<sup>10</sup>

### 3.6.2. Técnicas microquímicas o cristalográficas.

Estas técnicas se basan en la existencia de ciertos derivados de la hemoglobina que tienen tendencia a cristalizar. Los más importantes son las sales halogenadas de la hematina y hemocromógeno.<sup>11</sup>

#### 3.6.2.1. Cristales de Teichman

El primer cristal de halógeno de la hematina fue descrito por Teichman, en 1853: el clorhidrato de hematina, que aún es el más utilizado. El fundamento de esta reacción, consiste en tratar la hemoglobina en caliente con un ácido orgánico: la hemoglobina se desdobra en hem y globina, a la vez que se oxida el hierro del hem. En presencia de una sal halogenada de Cl, Br o I se forman cristales de clorhidrato, bromhidrato o yodhidrato de hematina, respectivamente.<sup>12</sup>

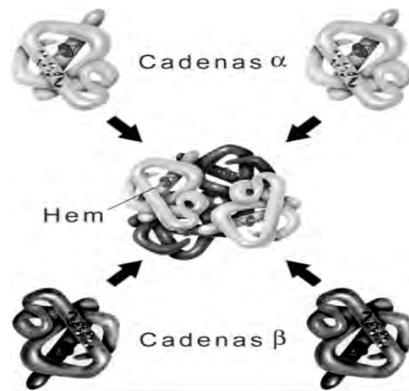


Fig. 15. Estructura de la molécula de hemoglobina (estructura cuaternaria). Formada por dos cadenas de  $\alpha$ -hemoglobina y dos cadenas de  $\beta$ -hemoglobina. Cada cadena transporta una molécula de oxígeno.<sup>6</sup>

El hemocromógeno, a su vez es un compuesto nitrogenado de la hematina, tras reducción.<sup>6</sup>

### 3.6.2.2. Método:

Es necesario partir de una costra de sangre. Si la mancha asienta sobre un tejido, se macera en agua hasta conseguir una solución coloreada al máximo.

Después se procede a fabricar una costra depositando la solución gota a gota sobre un cubreobjetos colocando en una platina calentada a 60°C. En este proceso hay que evitar un calentamiento excesivo que puede coagular las proteínas, impidiendo la reacción posterior. Una vez obtenida la costra, se cubre con un portaobjetos y se le adiciona por capilaridad unas gotas de ácido acético glacial. La preparación se calienta a la llama, hasta que se inicie la ebullición del ácido acético; en este momento se retira, se deja enfriar y se añade otra gota de ácido acético; repitiéndola maniobra. Normalmente con tres ebulliciones no aparecen cristales y se ha actuado con corrección técnica, se puede dar la prueba negativa.<sup>5, 18</sup>



Fig. 16. Cristales de Teichmann.<sup>5</sup>

La observación microscópica de la preparación nos muestra unos cristales de forma prismática alargada, de color pardo oscuro. Sus características cristalográficas son: estructura cristalina triclinica con ángulo de extinción de 45° y anisotropos que dan lugar al fenómeno del pleocromismo.<sup>5, 18</sup>

La prueba se interpreta como positiva. Si se encuentran estos cristales. Si no aparecen, puede deberse a que: la muestra no es sangre, a defectos técnicos en la cristalización (calentamiento excesivo o demasiado brusco) o a que la sangre esté alterada por tratamiento con ácidos o álcalis, la sangre “vieja” da con frecuencia reacciones negativas.<sup>5</sup>

#### Ventajas

- Reactivos accesibles
- Literalmente rápida

#### Desventajas

- Sangre antigua reacciones negativas<sup>5</sup>

### 3.6.3. Cristales de hemocromógeno

El reactivo de cristalización se compone de una base nitrogenada, generalmente la piridina, de un agente hematinizante, la sosa, y de un agente reductor. Éste ha sido modificado según los diversos autores (Ferreira, Takayama, Gisbert Calahuig), que emplean sacarosa, glucosa o ácido ascórbico, respectivamente. De ordinario se emplea la técnica de Takayama:

Sosa al	10%
Piridina	3mL
Glucosa, solución saturada	3mL
Agua destilada	10mL

La reacción del hemocromógeno no necesita calentamiento, aunque se aplica la técnica de Teichman, se consiguen mejores cristalizaciones. La cristalización está en función del envejecimiento; en sangres muy viejas los cristales sólo aparecen después de horas. Los cristales de hemocromógeno vistos al microscopio son de color naranja, tienen formas arborescentes como las hojas de pino y suelen entrelazarse.<sup>5</sup>

Si al ocular del microscopio se acopla un microespectroscopio, se verán las dos bandas de absorción de este derivado.<sup>10</sup>

### **3.6.4. Técnicas espectroscópicas**

Es un excelente procedimiento de identificación de sangre. Se disuelve la mancha en suero fisiológico, se filtra y el líquido se observa con el espectroscopio, si hay sangre se observan las dos bandas de absorción de la oxihemoglobina entre las rayas D y E, las que con unas gotas de sulfhidrato de amonio desaparecen, dando una sola banda, de absorción entre las dos anteriores, (banda de reducción de stokes).<sup>11</sup>

Tienen por objeto obtener el espectro de absorción de la hemoglobina y de alguno de sus derivados, como prueba de la naturaleza sanguínea de la mancha.

La hemoglobina tiene dos bandas de absorción en la zona de lo visible, cuyos máximos se encuentran, respectivamente, a 566 y 540 nm y la banda de Soret, típica de los derivados porfirínicos, próxima al ultravioleta, para la hemoglobina está a 412 nm, la absorción en esta banda es mucho más intensa, unas 20 veces mayor que en las otras, en el diagnóstico de las manchas de sangre no basta con establecer el espectro de la hemoglobina u otro derivado; se exige que la muestra siga la marcha espectral siguiente: hemoglobina – hematina alcalina – homocromógeno, comprobando en cada paso el espectro del correspondiente derivado.<sup>14</sup>

#### **3.6.4.1. Método:**

Se prepara una solución de la mancha en agua destilada, se filtra para que quede transparente y se somete a examen de espectro de absorción. Mejor que con los espectroscopios de visión directa es hacer el examen con un espectroscopio de doble haz, que permite realizar un barrido espectral con registro gráfico. La hemoglobina dará dos bandas negras en el amarillo y verde, o dos máximos de absorción en 577 y 540 nm. Se alcaliniza a continuación la muestra con potasa y se le añaden unas gotas de piridina; la solución toma un color verde que corresponde a la hematina alcalina. Con el espectroscopio de visión directa se aprecia que las dos bandas anteriores han desaparecido y la región del amarillo está como borrosa; el registro gráfico demuestra una ancha banda de absorción a 600 nm. A continuación se adicionan unas gotas de reductor (el sulfhidrato amónico reciente), que produce un viraje del verde al color naranja por la formación de homocromógeno. Al espectro visible aparecen dos bandas de absorción, y el registro gráfico de dos máximos de 559 y 530 nm.

Una sustancia que dé esta secuencia de espectros se puede identificar, sin causa de error, como sangre. Es un método altamente sensible, detecta hasta una millonésima parte de gota de sangre.<sup>14</sup>

En la práctica forense cotidiana en el laboratorio e la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal, se ha comprobado que una mancha es de sangre con una metodología espectroscópica mucho más simple y rápida, procediendo como sigue:

1. Impregnar un pequeño trozo de 5 X 5 mm. De tela limpia, sin apresto, de color blanco con la muestra problema.
2. Colocar la muestra así obtenida en un tubo de ensayo y añadirle 5mL. De agua destilada, dejándola reposar 10 minutos para lograr una eficiente extracción; pasado este tiempo, filtrar.
3. Efectuar el barrido espectral en la zona del espectro visible; se obtendrán tres bandas de absorción: dos finas a 575 y 540 nm. Y una banda ancha a 412. Éste espectro corresponde a la oxihemoglobina.
4. Efectuar nuevamente la extracción de la muestra problema como se indica en el punto 2, pero utilizando en vez de agua destilada, 5 mL. De una solución de ferricianuro de potasio al 0.5 %. al realizar el barrido espectral en la región del visible, se obtendrá una banda a 630 nm., banda que corresponderá a la metahemoglobina.
5. Sobre la misma celda de muestra, añadir unos gránulos de cianuro de potasio; al efectuar el registro espectroscópico, deberá desaparecer la banda de la longitud de onda correspondiente a 630nm. Y se obtendrá una banda a 50 nm. A la formación de cianometahemoglobina.

A continuación se encuentran los espectros registrados por un espectrofotómetro ultravioleta – visible, modelo DK – 2A de doble haz y provisto de monocromador.<sup>14</sup>

### 3.6.4.2. Microespectroscopio

Con el microespectroscopio se puede observar la producción de dos bandas de absorción del hemacromógeno; más a la derecha quedan los de la oxihemoglobina, una más estrecha, se oscurece y neta, entre la D y la E; la otra más tardía y pálida hacia la derecha de la E.<sup>1</sup>

### 3.6.5. Técnicas cromatográficas

Estas técnicas aprovechan la propiedad físico – química de la hemoglobina, que confiere una movilidad cromatografica concreta cuando se desarrolla en un disolvente adecuado. Se emplea una hoja de papel Whatman número 1, de 10 X 20 cm. Con un lápiz de grafito se marca la línea de partida a 4 cm. De uno de los bordes. Sobre la línea de partida se colocan las siguientes muestras: mancha problema

(10µl): hemoglobina, solución al 1% (10 µl), y hematina, solución al 1% (10 µl). La hoja se desarrolla en una cuba de cromatografía, en metanol

(10µl): hemoglobina, solución al 1% (10µl), y hematina, solución al 1% (10µl). La hoja se desarrolla en una cuba de cromatografía, en metanol – ácido acético – agua (90:3:7), hasta conseguir que el disolvente alcance el borde superior. Una vez desarrollada se seca de la cuba y se seca en estufa a 90°C durante 5 min. Se observa a la luz ultravioleta una fluorescencia roja que puede deberse a la hematoporfirina; la oxihemoglobina no tiene fluorescencia.

Se pulveriza el papel con una solución acética de bencidina y se esperan unos minutos, durante los cuales no debe aparecer ninguna coloración. Se vuelve a pulverizar con una solución acética de agua oxigenada, recientemente preparada. La hemoglobina y la hematina aparecen como manchas de color azul.<sup>14</sup>

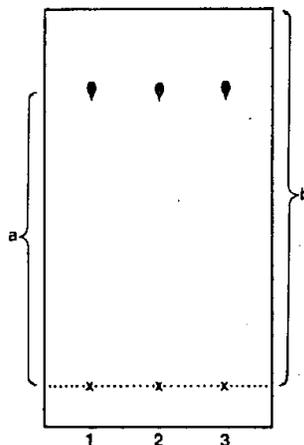


Fig.17. Cromatografía en papel de la hemoglobina: 1) hemoglobina; 2) problema, y 3) hematina. Desarrollo y revelado como en el texto.<sup>14</sup>

Si la mancha problema contenía hemoglobina o derivados, dará una mancha azul, situada al mismo nivel que los testigos. La RF de la hemoglobina en esta condición es de 0.70, aproximadamente. La cromatografía en papel puede sustituirse por cromatografía en placa fina, empleando gel de sílice, con el mismo disolvente y el mismo revelador.<sup>14</sup>

Ventajas:

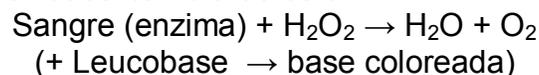
- Es una técnica muy rápida.<sup>14</sup>

### 3.6.6. Reacciones enzimáticas

Son extremadamente sensibles, por lo que permite demostrar trazas de sangre a diluciones 1:200,000. Pero carecen de especificidad.

La presencia de las peroxidasas en la sangre, son capaces de descomponer el agua oxigenada o peróxido de bario, desprendiendo oxígeno que oxida a una leucobase.

La leucobase oxibase oxidada cambia de color:



Los reactivos, con indicación del color al que viran, son los siguientes:

Reactivo de Adler: bencidina → azul.

Reactivo de Van Deen: tintura de guayaco → azul.

Reactivo de Thevenon y Roland: piramidón → violeta.

Reactivo de Kastle – Meyer: fenoltaleína → rojo.

Reactivo de Kohn – O'Kelly: ortotoluidina → verde azul.

Reactivo de Medinger: leucoverde de malaquita → verde.<sup>5</sup>

#### 3.6.6.1 Reacción de Adler

La peroxidasas sanguíneas son catalasas, que poseen actividad catalítica (enzimática) en las reacciones de oxidación, ya que tienen la propiedad de descomponer el peróxido de hidrógeno u otros peróxidos orgánicos, produciendo liberación de radicales oxidrilo. El grupo hem de la hemoglobina posee esa actividad enzimática, que puede catalizar la ruptura del peróxido de hidrógeno. Mientras no estén presentes otras sustancias orgánicas oxidantes, esta actividad de la hemoglobina, descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, que al reaccionar con la bencidina la oxidarán formando un compuesto intensamente azul. La oxidación de la bencidina es utilizada como prueba presuntiva para la identificación de sangre. La técnica tiene una sensibilidad de 1,300,000 a 500,000. El resultado negativo excluye la presencia de sangre; si la reacción es positiva requiere, como toda técnica de orientación, del empleo de reacciones de confirmación ya que se pueden obtener falsas reacciones positivas con otras sustancias que tengan actividad semejante a la de las peroxidasas o bien con otros materiales oxidantes, en la siguiente tabla se muestran algunas sustancias que

podrían causar falsos positivos.<sup>5,14</sup>

Plantas	Productos biológicos	Otras sustancias
Manzanas	Médula ósea	Herrumbre
Albaricoque	Leucocitos	Formol
Espárragos	Tejido cerebral	Estiércol
Frijol	Líquido espinal	Sulfato de cobre
Acelgas	Intestino	Dicomatos
Remolacha	Hígado	Permanganato de potasio
Zarzamora	Pulmón	Algunos blanqueadores
Alcachofa	Saliva	
Papa	Moco	
Nabo	Pus	

Tabla 2. Sustancias que pueden causar falsos positivos.<sup>14</sup>

### 3.6.6.2. Técnica Leuco malaquita verde

Se basa, en una reacción de oxidación y reducción. La estructura química de esta sustancia recuerda a la de la fenolftaleína, el prefijo leuco se refiere a la forma reducida incolora: la forma leuco puede ser preparada por la reducción del indicador verde de malaquita. La forma leuco puede ser oxidada por la acción de las peroxidasas para dar la forma oxidada verde. Esta técnica fue reportada por Hunt, quien señala que la encontró más confiable para la sangre, aunque menos sensible que la de la bencidina.<sup>15</sup>

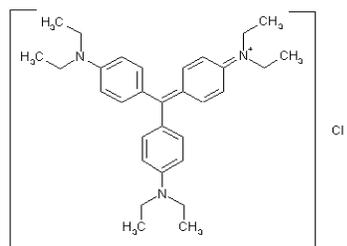


Fig. 18. Verde de malaquita.<sup>6</sup>

### 3.6.6.3. Reacciones de Meyer

La base de esta reacción es la fenolftaleína, reactivo muy alterable y por lo que hay que prepararlo cuando se va a realizar la experiencia. Esta reacción es muy sensible, se obtiene con manchas viejas y aún lavadas. No hay que olvidar que las manchas por sales cúpricas, jugos gástricos, leche cruda, también dan la misma reacción.<sup>16</sup>

Este reactivo requiere una preparación previa de la leucobase. Se parte de la fenolftaleína, que ha de reducirse en caliente en una solución concentrada de potasa con polvo de zinc; la fenolftaleína, de color rojo intenso, pasa a la leucobase, fenolftaleína incolora. La fórmula del reactivo es la siguiente:

Fenolftaleína 2g.  
Potasa anhidra 30 g.  
Agua destilada 100mL  
Polvo de zinc 20g

Se hierve hasta decoloración total, se filtra en caliente y se conserva en frascos oscuros y herméticamente cerrados. Todos los reactivos deben prepararse en el momento de su uso.<sup>5, 14</sup>

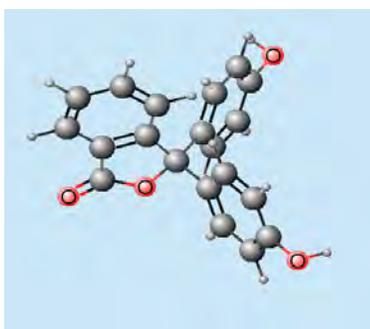


Fig.19. Estructura tridimensional de la fenolftaleína.<sup>6</sup>

### 3.6.6.3.1. Método:

La reacción puede llevarse a cabo en tubo de ensayo o sobre papel filtro. Para el primer caso se toma unas gotas del macerado empleado para las pruebas de certeza y se le adiciona un volumen similar del reactivo. Se esperan unos segundos para ver si hay viraje; si éste tiene lugar, la oxidación del reactivo es inespecífica y la reacción no puede tomarse en consideración. Si no ha habido viraje se adicionan unas gotas de agua oxigenada concentrada; si la maceración contiene peroxidasa, se produce inmediatamente el viraje del reactivo. El test papel (huella de Taylor) se emplea cuando la mancha asienta sobre un objeto que no puede rasparse, macerarse o deteriorarse: puede ser utilizado para examinar superficies que se sospechan contaminadas. Se toma un papel de filtro humedecido con agua y se aplica sobre la mancha o región sospechosa; se retira y se pulveriza, primero con el reactivo (esperar un momento por si se produjera un viraje inespecífico) y luego con agua oxigenada. La presencia de peroxidasas se revelará por el cambio de coloración correspondiente. La prueba tiene valor cuando es negativa, sirviendo entonces para ratificar la negatividad de las pruebas de certeza; su gran sensibilidad permite excluir que la negatividad de las pruebas de certeza se deba a la escasez de material sanguíneo de la mancha sospechosa. Una reacción positiva, en cambio, no autoriza a establecer la naturaleza sanguínea de la muestra; en efecto, diversas manchas ya anteriormente mencionadas dan resultados positivos por contener catalasas o peroxidasas.<sup>5</sup>

#### **3.6.6.4. Reacción de las catalasas**

El fundamento de esta reacción es la fermentación sanguínea, el cual al agregar agua oxigenada a la muestra sospechosa produce una espuma blanquecina en la superficie del líquido.<sup>1</sup>

Como cualquier tipo de método, una prueba negativa indica la ausencia de sangre, pero una reacción positiva, aunque sea muy sugestiva, no es concluyente.<sup>2</sup>

#### **3.6.6.5. Reacción de lecha marzo**

Consiste en la formación de cristales de hemocromógeno, de color anaranjado o rojo oscuro, en forma de aguja o tabletas rómbicas, a veces agrupadas en estrellas.<sup>1</sup>

### 3.7. Pruebas confirmatorias

Se denominan así porque ellas nos permiten afirmación categórica

Se subdividen a su vez en:

#### 3.7.1. Determinación del origen de la sangre para diferentes especies

##### Análisis de proteínas de suero

Las proteínas en suero constan de cinco clases: albúmina, alfa-1 globulinas, alfa-2 globulinas, globulinas beta y gammaglobulinas. La albúmina está presente en mayor concentración, y la fracción de globulina contiene anticuerpos que son importantes en la discusión de esta determinación.

En la presente grafica se representa la presencia de las proteínas séricas.<sup>37</sup>

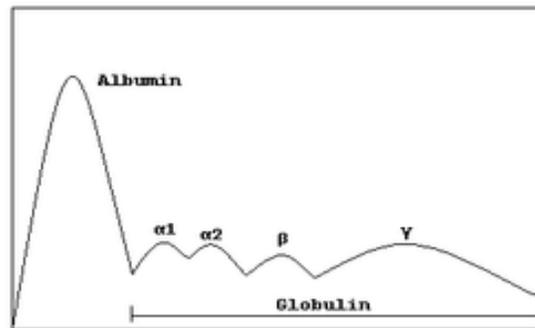


Fig. 20. Proteínas de suero.<sup>37</sup>

## Hemoglobina antihumana

La hemoglobina es una proteína que tiene características especies – específica y es única en la sangre. Si ambas características pudieran abordarse en una sola prueba, la labor de la serología se simplificará considerablemente. Lee y DeForest (1977) presentaron su trabajo sobre este tema, ofreciendo un procedimiento capaz de producir un alto - título del suero de hemoglobina antihumana. Este antisuero será potencialmente muy eficaz en cualquiera de los sistemas descritos anteriormente. Un obstáculo, es la expectativa de encontrar en la sangre la relación con primates no humanos en una investigación.<sup>27, 34</sup>

### 3.7.1.2. Antecedentes de la técnica

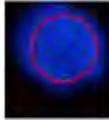
Los primeros experimentos realizados con miras a utilizar luminol como una herramienta en las ciencias forenses se llevaron a cabo en 1937 por Spech't, que fue probado en una variedad de superficies como el césped, ladrillos, piedras o paños con sangre. En 1939, Moody & Proesher probaron la composición de Spech't en la sangre humana y animal. En 1951, **Grodsky** propone una mezcla de polvo hecho de compuesto de luminol, carbonato de sodio, y perborato de sodio mezclado con agua destilada. Esto posteriormente se convirtió en la fórmula más común utilizada por los investigadores de hoy para detectar rastros de sangre en la escena de un crimen.

Sin embargo, el uso de carbonato de sodio produce una lenta reacción en el proceso de oxidación de la hemoglobina. Por lo tanto, no es muy luminoso y de breve duración. Por otra parte, una vez que los agentes reactivos se disuelven en el agua, la vida de la solución obtenida es muy corta. Esta fórmula es muy inestable y es tóxica, debido a la presencia de perborato de sodio.

En 1966, **Weber** propuso una composición hecha de luminol, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, agua oxigenada diluida en agua destilada. La solución así obtenida debe mantenerse en un lugar fresco lejos de la luz directa. Su vida es breve. La reacción luminosa obtenida por esta composición debe fotografiarse en total oscuridad o filmada con una cámara con visión nocturna.

En el año 2000, Jean-Marc Lefebvre-Despeaux, presidente de BlueStar, encargo a **Loic Blum**, Ph.D, profesor de bio-química en la Universidad Claude Bernard-Lyon y director de enzimática e ingeniería biomolecular del laboratorio, encontrar una nueva fórmula que sería a base de luminol y eliminara todos los numerosos inconvenientes. Como resultado de ello, Blum descubrió esta nueva fórmula que fue posteriormente llamado BlueStar ® FORENSIC.<sup>38</sup>

Bluestar®



Luminol 16

Fig.21. Hexagon OBTI® es una prueba inmunocromatográfica de confirmación de la presencia de trazas de sangre humana.<sup>38</sup>



Fig.22. Estuche de Hexagon OBTI® test, cómo un complemento ideal de BLUESTAR®.<sup>38</sup>

Esta prueba es muy simple de usar. DOS ó TRES minutos son suficientes para comprobar, si la traza revelada por BLUESTAR® es ó no sangre humana. La hemoglobina humana (hHb), reacciona con un conjugado compuesto de partículas azuladas y anticuerpos monoclonales de hemoglobina humana. La compañía Roc-Import, conjuntamente con el laboratorio de Ingeniería Enzimática del CNRS (Centro Nacional de Investigaciones Científicas) de Lyon y del IRCGN (Instituto Nacional de Investigación Criminal de la Gendarmería Nacional de Paris), han desarrollado una nueva línea de producto a partir de una nueva formulación del Luminol. Esta nueva formulación ha sido patentada bajo la marca registrada de BLUESTAR®, no afecta el posterior análisis del ADN y no presenta ningún peligro para el operador, dado que no es carcinogénico y es biodegradable. Hay que tener en cuenta, que únicamente es ligeramente corrosivo, dado que su pH es algo superior a 11. La compañía Monegasca Roc-Import está totalmente involucrada en los estudios de trazas de sangre y ha introducido ampliamente dicha formulación

en los departamentos de criminalística de la Gendarmería Francesa, de la Bundespolizei en Alemania, del FBI en USA, etc. Roc-Import, ha lanzado en el Mercado al mundial una línea completa de productos BLUESTAR®, que se adaptan, según el tipo de presentación en Estuches en forma Líquida ó en Tabletas, a las diferentes situaciones de los departamentos de la policía criminalística. En la Unión Europea los expertos de criminalística, utilizan de forma rutinaria los diferentes tipos de formulaciones de BLUESTAR®. Para los investigadores en escenarios de investigación criminalística, es un producto favorito dado su gran sensibilidad y facilidad de uso. Esta novedosa formulación de BLUESTAR® ha permitido resolver un gran número de casos. Las manchas invisibles de sangre reaccionan inmediatamente al BLUESTAR® provocando una intensa reacción azulada luminiscente, visible en la oscuridad directamente por el ojo humano, a 430nm de Longitud de Onda. Su sensibilidad evidencia trazas de sangre en cantidades más pequeñas del mínimo requerido para realizar una tipificación de ADN. La reacción dura varios minutos y el reactivo de BLUESTAR® pueden pulverizarse varias veces sobre una misma zona, sin afectar el ADN y tomando fácilmente evidencias visibles mediante cámaras fotográficas de tipo estándar, lo cual elimina la necesidad de utilizar equipos sofisticados.<sup>38</sup>

#### **3.7.1.3. Características más detectables del bluestar ®**

- Mayor sensibilidad
- Mayor intensidad de luz luminiscente.
- Mayor duración de la luminiscencia.
- La luminiscencia no requiere obscuridad total
- Puede usarse varias veces sobre una misma muestra.
- No requiere ningún tipo de equipos especiales para tomar evidencias fotográficas.
- No interfiere la tificación del ADN.
- Estable a lo largo del tiempo.
- No es toxico.
- Fácil de usar.<sup>38</sup>

#### **3.7.1.4 Descripción del bluestar®**

El BLUESTAR® se utiliza para la detección de sangre humana, para examinar zonas, que han sido previamente lavadas con varios tipos de detergentes. Esta nueva formulación no impide, ni interfiere el subsiguiente análisis de ADN por PCR. Esto concuerda con los resultados obtenidos con el Luminol, pero la diferencia con el BLUESTAR® estriba en que dicha formulación da una luminiscencia azulada más potente y de más larga duración. Esta formulación ha sido ampliamente comprobada en escenas de muchos crímenes en Francia. El procedimiento de uso es muy simple, sin embargo el usuario debe seguir cada uno de los siguientes pasos:

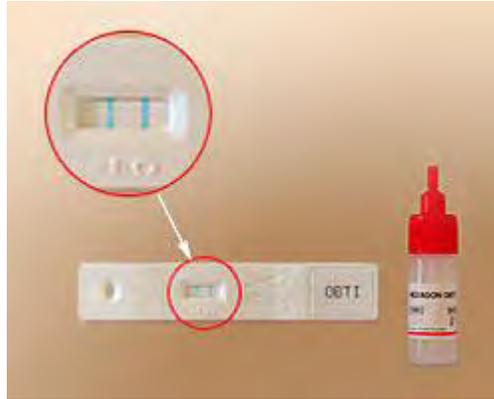


Fig.23. Interpretación de la placa BLUESTAR®.<sup>38</sup>

### 3.7.1.5. Técnica

#### En la escena del crimen

- Preparar el área sospechosa, siguiendo los pasos descritos a continuación:
- Es necesario oscurecer el área para el tratamiento con BLUESTAR®.
- El Técnico tiene que utilizar una vestimenta especial, que evite la contaminación.



Fig.24. Vestimenta para el técnico de campo.<sup>38</sup>

- Se realiza la preparación del BLUESTAR®. Todos los componentes están incluidos en el estuche comercial.
- La mezcla de trabajo se prepara añadiendo simplemente TRES tabletas de catalizador en la botella de solución líquida suministrada en el estuche.
- Unos minutos más tarde, el técnico tiene que comprobar la efectividad del

producto preparado, mediante una muestra de sangre como control positivo.

- g) A partir de este instante, el técnico puede utilizar el BLUESTAR® para detectar superficies, incluso después de haber sido lavadas con posterioridad a la exposición de sangre.

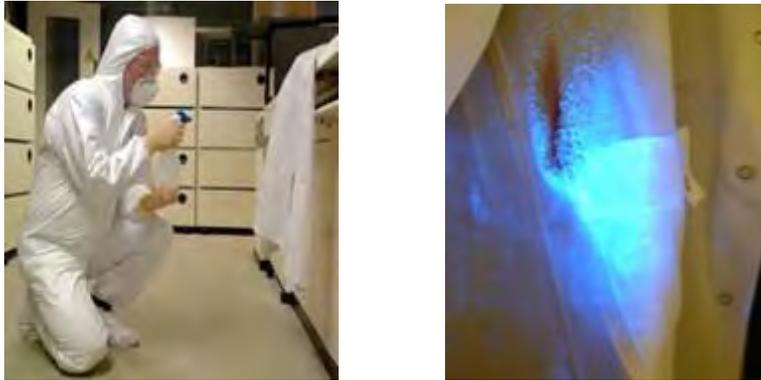


Fig. 25. Pulverización y toma de muestra.<sup>38</sup>

El técnico utiliza el atomizador, incluido en el estuche de BLUESTAR® y pulveriza a continuación la mezcla recién preparada, a unos 50 cm. de la superficie. Una coloración azulada luminiscente, nos indicará la presencia de sangre. Esta luminiscencia empieza a perder intensidad al cabo de un minuto y puede volver a ganar intensidad con una nueva pulverización. El técnico debe seguir el mismo procedimiento en una zona de la misma área, exenta de sangre, que servirá de control negativo.<sup>38</sup>

#### **3.7.1.6. EFECTO DEL BLUESTAR® EN LAS PRUEBAS DE ADN**

Por último, los estudios han demostrado que BLUESTAR® no interfiere con las pruebas de tipificación de ADN. Además de todo esto, se puede utilizar sobre muchas superficies, que hayan sido tratadas con detergentes, lo cual no las afecta en lo más mínimo. El BLUESTAR® fue utilizado en la escena de muchos crímenes, y las áreas azuladas, fueron enviadas a varios departamentos de Criminalística. Estos departamentos de Biología Molecular fueron capaces de lograr un perfil del ADN en todas las pistas tratadas con BLUESTAR®. El departamento de criminalística de la Gendarmería Francesa (IRCGN) ha estado usando este procedimiento desde principios del año 2001.<sup>38</sup>

#### **3.7.1.7. Reacción Química**

Luminol (3-Aminophthalhydrazide) fue sintetizado por primera vez en 1853. Su propiedad para producir una reacción quimio-luminiscente en una solución básica en presencia de un agente oxidante en contacto con la sangre fue observada por primera vez por Albrecht en 1928.

Los principales componentes capaces de catalizar esta reacción de emisión de luz son los metales de transición y hem peroxidasa. Hem es una estructura bioquímica que forma parte integrante de la peroxidasa. Esta estructura esta

igualmente presente en la hemoglobina. De esta manera, la presencia de hemoglobina puede ser revelada por el aprovechamiento de la capacidad de haem/hem para catalizar la propiedad quimio-luminiscentes del luminol. En otras palabras, una mezcla de luminol + agente oxidante + agente alcalino, en contacto con la sangre, emiten luz.<sup>38</sup>

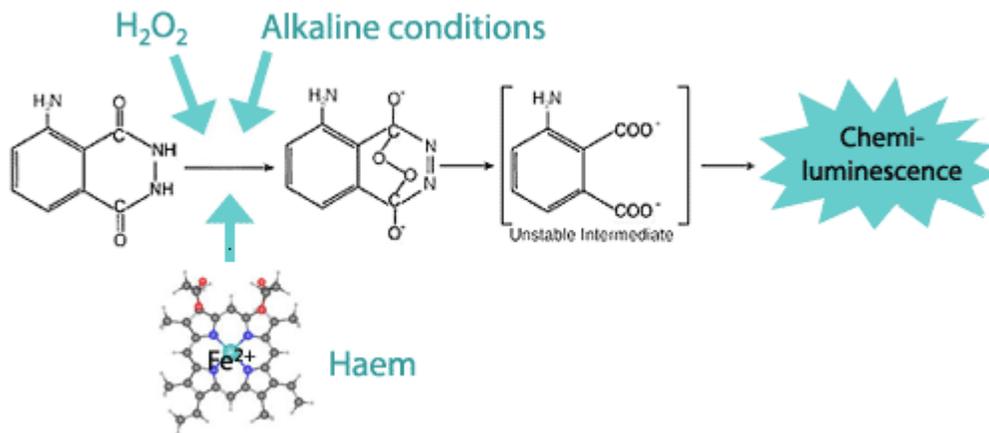


Fig.26 Reacción Química

### 3.7.1.8. Fundamento

Inmunocromatografía: Es una de las técnicas de inmunodiagnóstico más modernas cuyas principales ventajas son la sencillez y rapidez del test. Cada vez son más las aplicaciones de esta técnica, tanto en el campo agroalimentario, como test de campo forense debido a que no es necesario reactivos ni instrumentación adicional, como en el campo clínico.<sup>24</sup>

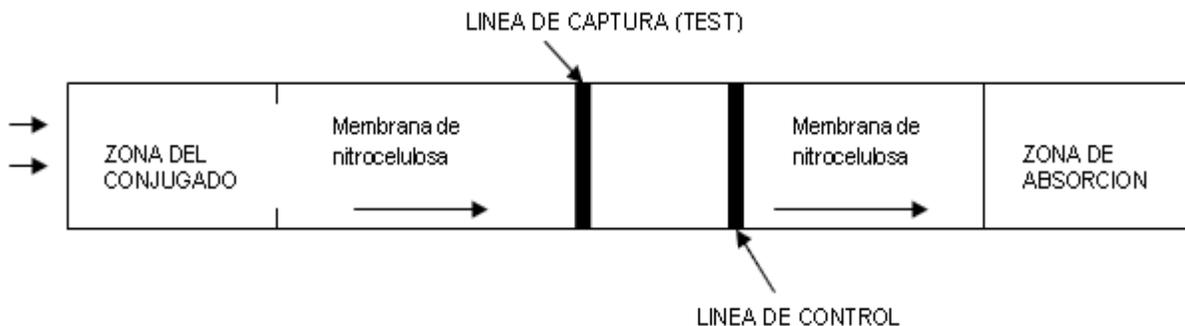


Fig. 27. Esquema de la reacción de la placa.<sup>38</sup>

En el siguiente esquema se resume el fundamento del método:

1. La muestra se pone en contacto con la zona del conjugado. Esta lleva impregnada un conjugado formado por un anticuerpo específico contra uno de los epítomos del antígeno a detectar y un reactivo de detección. Si la muestra contiene el antígeno a detectar, éste se unirá al conjugado formando un complejo y empezarán a migrar a través de la membrana de nitrocelulosa. Si no, migrarán el conjugado y la muestra sin unirse.

2. La zona de captura está formada por un segundo anticuerpo específico contra otro epítipo del antígeno. Al llegar la muestra a esta zona, los complejos formados por la unión del antígeno y conjugado quedarán retenidos y la línea se coloreará (muestras positivas). Si la muestra no contenía el antígeno, el segundo anticuerpo no captura nada y la línea queda transparente (muestras negativas).
3. La zona control está formada por un tercer anticuerpo que reconoce al reactivo de detección. Cuando el resto de muestra es alcanzada en esta zona, el anticuerpo se unirá al conjugado libre que no ha quedado retenido en la zona de captura. Esta línea es un control de que el ensayo ha funcionado bien, porque se colorea siempre, con muestras positivas y negativas.<sup>32</sup>

### **3.7.2. Reacción suero precipitante de Uhlenhat y reacción anafiláctica**

El principio básico de la reacción suero precipitante de Uhlenhat, es que la inyección de sangre o suero sanguíneo a una especie diferente, repetida a dosis a intervalos convenientes, provoca la aparición, en el suero del animal inyectado, de un proceso que tiene la propiedad de dar un precipitado en presencia de la solución de sangre o suero sanguíneo idéntico al que fue inyectado y no con la sangre o suero de animales para los que no ha sido preparado.<sup>37</sup>

El conejo es el animal de elección, debiendo de haber alcanzado su desarrollo completo.

#### **3.7.2.1. Inyecciones**

Para obtener suero precipitado humano, utilizar suero humano límpido, estéril, que se inyecta al conejo por vía endovenosa, intraperitoneal o subcutánea. La vía endovenosa es la de elección, ya que usando esta vía se obtienen mejores resultados. El mejor suero precipitado que se ha obtenido haciendo seis inyecciones endovenosas de suero humano, a las dosis de,  $t/2$ ,  $3/4$ ,  $1$ ,  $1\ t/4$ ,  $1\ 1/2$  y  $2\ c.c.$ , cada tercer día. La sangría del conejo se hará ocho días después de la última inyección, estando el animal en ayuno para evitar la opalescencia del suero. La sangría se hará en la carótida o en la vena marginal de la oreja; puede hacerse también por punción cardíaca. El suero obtenido después de la coagulación de la sangre, recogido bajo la más escrupulosa asepsia, será colocado en ampulas de 3 a 2 c.c., y se conservará en refrigerador. La titulación del suero es muy importante para la práctica médico legal; se aconseja una Sensibilidad de 1 en 20,000.<sup>37</sup>

#### **3.7.2.2. Técnica de la reacción**

Para que la reacción sea tomada en cuenta, es indispensable que tanto la solución o líquido por examinar, como el suero precipitante, estén perfectamente límpidos. Se hace la reacción empleando siete tubos delgados de 2 a 3 c.c. de capacidad y distribuidos del modo siguiente:

En todos los tubos colocar 0.9 c,c de:

1. **Primer tubo:** solución en suero fisiológico de la mancha sanguínea, (macerada de hueso, músculo etc., en los que se ha comprobado la presencia de proteínas, por la acción del ácido nítrico), perfectamente límpido y neutro.
2. **Segundo tubo:** solución sanguínea en suero fisiológico, sin agregar el suero precipitante.
3. **Tercer tubo:** suero fisiológico límpido y esterilizado que ha servido para disolver la mancha.
4. **Cuarto tubo:** solución de suero fisiológico de un lugar manchado de la tela a objeto del examen
5. **Quinto tubo:** suero normal de conejo, diluido al 1:1,000 en suero fisiológico.
6. **Sexto tubo:** suero de vaca o de caballo, carnero o polio, etc., u otro animal alejado del hombre.
7. **Séptimo tubo:** suero humano diluido al 1:1,000.

A cada tubo, menos al segundo, se le agrega 0.1 c.c. de suero precipitante, dejándolo correr suavemente por la pared del tubo; se dejan en la estufa a 37°C.

Las modificaciones, si se trata de sangre humana, son producidas en el primero y séptimo tubo, que son los que contienen la solución examinada y el suero humano, respectivamente. La reacción se produce en corto tiempo.

Reacción analítica.- "Una substancia insuficiente para matar o enfermar a un animal normal, determina accidentes fulminantes y mortales en el animal, cuando un tiempo antes se le ha inyectado la misma substancia". Richet.

**3.7.2.3. El fenómeno anafiláctico** tiene tres Fases: la sensibilización, (inyección preparante), el periodo de incubación de más o menos 20 días, (pre anafiláctica), y la inyección desencadenante, (funciones anafilácticas).

La sensibilización se hace con el cuyo, (animal de elección), practicándole una inyección única de suero, sangre complete, esperma, etc., (según la substancia que se investigue), en el tejido celular subcutáneo, en el peritoneo o en el corazón, siendo la más segura en el canal raquídeo o en el cerebro. Los fenómenos anafilácticos son de identidad variada.

#### **3.7.2.4. Primera forma (mortal de necesidad)**

**Fulminante:** el animal muere en menos de 5 minutos.

**Mortal aguda:** el animal muere más o menos en una hora.

**Mortal tardía:** el animal muere en más de una hora.

### 3.7.2.5. Segunda forma.

**Grave:** el animal tiene marcada disnea, vértigos, movimientos giratorios, secreción salival, embotamiento, descenso de la temperatura; entre 45 a. 60 minutos, el animal se normaliza o no.

### 3.7.2.6. Tercera forma.

**Benigna:** el animal tiene prurito en el hocico y en los lomos, carrera impulsiva, descenso de la temperatura, curación entre 15 a 30 minutos.

Se pueden tener los animales sensibilizados, con suero o sangre humana, de 1,12 a 1 c.c.; usándose entonces como inyección desencadenante la solución de sustancia sospechosa en suero fisiológico, de 112 a 1 c.c.; pero lo común es preparar al animal con una inyección sensibilizante, (1/2 a 1 c.c.), de solución en suero fisiológico de la mancha, con pequeña cantidad de sosa; a los 20 días o al mes, se inyecta 112 a 1 c.c. de suero humana y se observa la reacción del animal. Cuando se ha determinado para la reacción precipitante o por la fijación del complemento, la presencia de sangre humana en una Mancha, la investigación de la reacción anafiláctica, mucho más sensible que las precedentes, constituye un procedimiento de los más valiosos; insuficiente por si solo para determinar el origen de la mancha, permite descartar el origen humano si el animal no presenta ningún accidente después de la segunda inyección endovenosa de suero humano.<sup>37</sup>

Para hacer el diagnóstico diferencial entre las especies con hematíes redondos anucleados, se ha propuesto medir el diámetro. Las pequeñas diferencias existentes y la gran deformación que los hematíes experimentan en las manchas no autorizan a sacar conclusiones válidas de este examen. Los otros elementos formes de la sangre, los leucocitos, han sido poco estudiados a este respecto. El profesor Álvarez de Toledo (1922) fue el primero que publicó un trabajo sobre la identificación de la especie sobre la base de estos elementos. Muchos años después, Undritz y Hegg (1959) han confirmado los resultados del autor español. Los leucocitos presentan sobre los hematíes la ventaja de su mejor conservación en la mancha, en especial el núcleo que se mantiene intacto generalmente, aun cuando se haya destruido el protoplasma. La serie eosinófila es la que proporciona más datos al variar considerablemente las características de las granulaciones de unas especies a otras. La demostración de la hemoglobina constituye el elemento básico para el diagnóstico genérico de análoga manera, su estudio representa una característica de gran valor para el diagnóstico específico. Este estudio se ha abordado mediante técnicas diversas: estudios cristalográficos, en los que se analizan las diferencias espectrográficas y diferencias estructurales.<sup>38</sup>

Con respecto a las últimas, se han descrito diferencias no sólo entre las especies, sino incluso individuales, basadas en la composición de la globina y las secuencias de aminoácidos en las cadenas alfa y beta. Así, en la especie humana se han individualizado más de 15 tipos de hemoglobina y un estudio completo de

la estructura de la hemoglobina puede establecer: especificidad de especies y de edad (Hb fetal), y características patológicas (anemia drepanocítica y talasemia), con lo que eventualmente se llegaría a la identificación individual y racial (anemia de Cooley). El establecer la secuencia de aminoácidos de una cadena peptídica sólo puede hacerse en el laboratorio altamente especializado; sin embargo, las diferencias moleculares se traducen en peculiaridades fisicoquímicas, cuya determinación es mucho más asequible:

1. Solubilidad.
2. Desnaturalización.
3. Movilidad cromatográfica.
4. Comportamiento electroforético.
5. Diferencias antigénicas.<sup>38</sup>

El antígeno está contenido en la mancha de sangre. Para prepararlo para la reacción se ha de actuar de modo diferente según el soporte sobre el que asienta la mancha.<sup>5</sup>

1. Cuando la sangre está depositada en un soporte no absorbente, formando costras, se raspa y se disuelve en la menor cantidad posible de suero salino o fisiológico.
2. Cuando asienta en un tejido, se recorta y se pone en maceración, es prudente macerar un trozo de tejido no manchado, que sirve de control. El líquido y el tiempo de maceración dependerán de la antigüedad de la mancha. Tran Vanky y Mueller (1968) han revisado el problema y concluyeron que el mejor eluyente es el tapón fosfato de pH 7.4. La metodología a seguir es la siguiente: se corta la mancha en cuadros de 1cm<sup>2</sup>, que se ensartan en un hilo y se sumergen en solución salina fisiológica durante 24 horas a 4°C, en agitación constante: al cabo de este tiempo se centrifuga, manteniendo el tejido fuera de la superficie líquida, haciendo tracción sobre el hilo.
3. Cuando la mancha se extiende sobre un soporte de tierra, es decir, que está muy contaminada, debe purificarse, macerado por medio de la técnica de Kirk y Schaide se suspende todo el material en solución salina: Se toma una tira de papel Whatman y se sumerge en el líquido: las porciones solubles irán ascendiendo por el papel hasta llegar al borde, donde, por evaporación, se irán concentrando las sustancias solubilizadas, entre ellas las proteínas: se corta esta parte, lo más limitadamente posible, y se vuelve a redissolver en la mínima cantidad de solución salina.<sup>5, 14</sup>

Se emplean generalmente dos tipos de anticuerpos:

1. Polivalentes frente a un suero humano total.
2. Monovalentes, frente a una sola fracción antigénica.

De éstos los más usados son: suero antihemoglobina humana, y suero antigamma- globulina IgG.<sup>5, 14</sup>

### 3.7.3. Técnicas para evidenciar la reacción antígeno – anticuerpo.

La reacción antígeno – anticuerpo se puede realizar in vivo o in vitro.

La primera está representada por la reacción anafiláctica de Pfeiffer.

En cuanto a la reacción in vitro, la de precipitación es la más usada. Revela la unión del antígeno con el anticuerpo por la formación de un complejo que precipita. Según el modo de llevarla a cabo se puede distinguir las siguientes variantes:

1. En un tubo, reacción de Uhlenhuth o ring test; muy empleada anteriormente, hoy está postergada por sus dificultades técnicas.
2. En medio gelificado. La reacción en medio gelificado de agar – agar tiene dos grandes tipos:
  - a) Reacción de doble difusión, test de Ouchterlony.
  - b) Inmunolectroforesis.<sup>5, 14</sup>

### 3.7.4. Test de Ouchterlony

La inmunodifusión doble de Ouchterlony es un método inmunológico sencillo y rutinariamente usado en el laboratorio clínico para la detección de antígenos anticuerpos en una muestra biológica

#### 3.7.4.1 Técnica

Se prepara una placa de vidrio de 10 X 10 cm. Perfectamente limpia y desengrasada. Si la superficie es deslustrada, es más adherente para el gel, lo que es preferible. Se prepara una solución salina al 0.8%, o en tampón veronal de pH 8.2 y solución salina a partes iguales, agregándole de unas gotas de mertiolate. Se hierve a baño María hasta que el gel esté completamente transparente. La placa de vidrio se sitúa en una platina caliente a 50°C, perfectamente equilibrada y horizontal. Se vierte el gel con una pipeta, cuidando que no se desborde y toda la placa quede cubierta. Es aconsejable dejar secar esta primera capa de gel para asegurar la adherencia. La capa del gel queda reducida a una fina película, firmemente adherida a la superficie del cristal. Así dispuesta la placa, se coloca en la platina y vertimos nuevamente gel. Se deja enfriar unos minutos a la temperatura ambiente, hasta que se produce la gelificación. A continuación excavarse los pocillos, en los que se colocarán los antígenos y anticuerpos. Los modelos que hay que seguir varían de acuerdo con el problema. Un esquema general consiste en disponer un pocillo central de mayor diámetro, destinado al anticuerpo, y seis periféricos, equidistantes y de menor tamaño, para el antígeno problema y los sueros control. Los pocillos se excavan con un instrumento redondo de bordes cortantes, como una funda metálica de un termómetro clínico o un trocar de los empleados en oftalmología. Para que las distancias de los pocillos entre sí y con el central sean uniformes, debe realizarse un esquema en un papel milimétrico de la dispersión que se quiera dar a la placa de vidrio, se coloca sobre el dibujo y, como es transparente, puede hacerse excavaciones en los lugares precisos. Como anticuerpos se emplean dos sueros

comerciales: un suero humano total y un anti IgG. Como antígeno se coloca en los pocillos periféricos: suero humano control diluido al 1:6, extracto de la mancha problema, extracto de soporte en una parte no manchada y sueros animales. El pocillo central destinado al anticuerpo tiene un diámetro de 0.4 cm y los de los antígenos 0.2 cm. La separación entre los pocillos es de 0.7 cm. Del extracto problema.

Colocamos la cantidad necesaria para conseguir una concentración lo más parecida posible al suero diluido, es decir, rellenamos el pocillo varias veces, según la concentración proteica del extracto.

La placa cargada se coloca en una cámara húmeda y se deja difundir 48 horas, con lecturas a las 12, 24, 36 y 48 horas. Debe estar perfectamente nivelada para conseguir la difusión radial. Terminada la difusión, se coloca la placa en un dispositivo que permita un lavado continuo con solución salina durante 24 horas, a fin de eliminar las proteínas no fijadas en el gel como complejos antígeno – anticuerpo. Se sumerge en ácido acético al 2%. En este momento se puede fotografiar con película pancromática, disponiendo la placa de tal modo que quede en penumbra, con lo que las bandas blancas correspondientes a la precipitación del complejo antígeno – anticuerpo se visualizan muy bien.

Para observar las placas se desecan a la temperatura ambiente cubiertas con un papel de filtro humedecido y se tiñen con negro amido. Antes de sumergirlas en el colorante hay que humedecerlas. La placa se decolora con una solución de ácido acético al 7%.<sup>5, 14, 22, 23, 28, 38.</sup>

#### **3.7.4.2. Resultado**

Generalmente a las 6 horas ya se observa una banda de precipitación entre el pocillo del suero testigo y el anticuerpo: esta banda corresponde a la albúmina.

A las 24 horas la reacción ha concluido y se visualizan unas cinco bandas. Aunque la concentración del antígeno no es tan crítica como en la reacción de Uhlenhut, los mejores resultados se obtienen con diluciones del 1:6 al 1:8.

Un antígeno muy concentrado genera bandas muy gruesas, en torno al pocillo del anticuerpo y tienden a disgregarse en los extremos, sin embargo concentraciones débiles pueden desaparecer bandas.<sup>5, 38.</sup>

#### **3.7.4.3. Interpretación**

La presencia de una banda de precipitación entre el pocillo del antisuero humano y el problema, revela que entre ambos hay una correspondencia antígeno – anticuerpo. Sin embargo, puede haber reacciones cruzadas entre diversas especies animales afines. Para prevenir este inconveniente, que pueda interpretar erróneamente una reacción inespecífica, se agencia en el sistema un suero testigo.

Una reacción de identidad de especie se caracteriza porque las bandas de precipitación se unen, empalmado perfectamente; si se trata de una reacción de semiidentidad, el empalme no es perfecto sino que sobresale un espolón, si la identidad es aún menor las dos bandas se cruzan.<sup>36</sup>

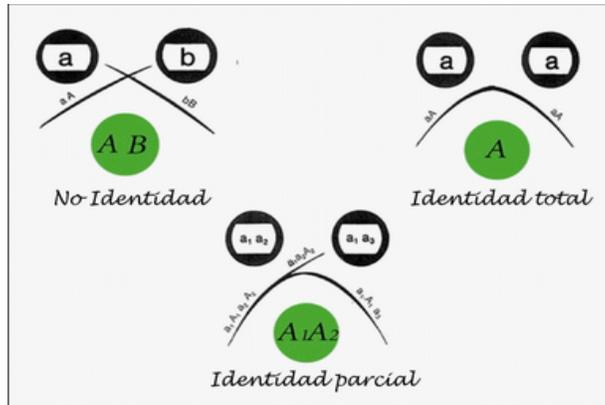


Fig. 28. Patrón de bandas en el test de Ouchterlony<sup>36</sup>.

Cuando se da el fenómeno de cruce de bandas, en el Test de Ouchterlony caben las siguientes soluciones:

- Que una de las bandas no sea una verdadera reacción de precipitación: normalmente se disolverá si se deja la difusión más tiempo.
- Emplear diluciones crecientes, hasta que desaparezca el fenómeno de cruce.
- Emplear antisueros animales testigos hasta encontrar la reacción idéntica completa.
- Purificar el anticuerpo, antisuero humano, absorbiéndolo con mezcla de sueros animales.
- Emplear un antisuero antigamma-globulina IgG humana, que suele ser la fracción proteica más específica.<sup>36</sup>

Las distintas fracciones proteicas del antígeno las bandas de precipitación aparecen como arcos, de convexidad dirigida hacia la ranura, separadas entre sí de acuerdo con la migración que hayan sufrido con la electroforesis.<sup>4</sup>

### 3.7.5. Técnica de Scherdegger inmunolectroforesis

Se realiza una electroforesis previa del antígeno en un tampón de veronal de pH 8.2 que separará las diferentes fracciones antigénicas. Después se realiza una doble dilución como en el test de Ouchterlony, empleando un antisuero humano total. La técnica es más compleja que el test de Ouchterlony, pero es más confiable y ella no se han observado nunca reacciones cruzadas.<sup>36</sup>

#### 3.7.5.1. Técnica:

Siguiendo el procedimiento antes expuesto se prepara una placa de agar en tampón veronal / solución salina.

Se dibuja en papel milimetrado el esquema de excavaciones. En un primer tiempo se excavan los pocillos, donde se coloca el antígeno problema (extracto de la

mancha) y un antígeno testigo (suero humano diluido al 1:4). Se lleva a cabo el desarrollo, se excava la ranura central, que debe marcarse en el gel antes de la electroforético a 120 V durante 2 horas. Concluido el desarrollo, se excava la ranura central, que debe marcarse en el gel antes de la electroforesis, pero sin retirar la tira de gel antes de la electroforesis, pero sin retirar la tira de gel hasta concluida ésta. La ranura se llena con los antisueros, bien el antisuero humano total o bien el antisuero anti-IgG. Se deja difundir 48 horas en cámara húmeda como antes. También puede emplearse un esquema algo más complejo, para simultanear la inmunoprecipitación con los dos antisueros. Para ello se excavan tres pocillos: en el superior se coloca suero humano testigo; en el central, el extracto de la mancha, y en el inferior, otro testigo; en el central, el extracto de la mancha, y en el inferior, otro testigo de suero humano. Entre los pocillos se excavan dos ranuras; en la primera se coloca el antisuero humano total, y en la otra el antisuero o anti – IgG. La técnica de inmunolectroforesis permite comparar mezclas complejas de antígenos, como las que se encuentran en el suero. Los antígenos son separados en un gel de agar mediante la aplicación de una carga eléctrica a lo largo del mismo. El pH del gel selecciona de tal forma que las proteínas con carga positiva se desplacen hacia el electrodo negativo y las cargadas negativamente hacia el electrodo positivo. A continuación se excava un surco entre los pocillos, se añade el anticuerpo al mismo y se deja que difunda. Los antígenos y el anticuerpo dan lugar a la formación de arcos de precipitinas. Las reacciones antígeno - anticuerpo dan lugar a la formación de inmunocomplejos que inducen la fijación del complemento a través de la vía clásica, fenómenos que pueden ser aprovechados para cuantificar la cantidad de antígeno o anticuerpo presente. La hemaglutinación y la fijación del complemento pueden detectar anticuerpos a concentraciones inferiores a 1µg/mL.<sup>36</sup>

### 3.7.5.2. Ventajas y desventajas

No se dan reacciones cruzadas, con lo que la especificidad alcanza su máximo; se puede conocer con mayor precisión el antígeno presente en la mancha, todo lo cual puede compensar las mayores dificultades técnicas que tiene su realización. Para poder entender este método es importante saber el fundamento de esta reacción las cuales se explicaran a continuación:

En muchas ocasiones los inmunólogos tienen, que aislar anticuerpos puros, ya sea anticuerpos específicos de un antígeno de terminado o inmunoglobulinas inespecíficas. El aislamiento de estas últimas a partir de suero llevar a cabo mediante una serie de pasos sucesivos de fraccionamiento proteico, entre los que se pueden encontrar:

- a) Precipitación de las gammaglobulinas con sulfato de amonio al 30 – 50%
- b) Filtración en gel para separar moléculas de un tamaño determinado.
- c) Cromatografía de intercambio iónico para aislar las moléculas que presentan carga positiva a pH neutro.
- d) Cromatografía de afinidad utilizando ligandos naturales de las inmunoglobulinas, como la proteína A (esta proteína es un componente de las paredes celulares de los estafilococos que se une a una región de C<sub>γ</sub>2 y

Cy3 que aparece en la mayoría de las subclases de IgG, concretamente en las IgG1, IgG2 e IgG4).<sup>5, 14, 22, 23, 28, 38.</sup>

### **3.7.6. Valor médico – legal de las reacciones de inmunidad**

**3.7.6.1.** Una reacción de identidad completa frente a un antisuero IgG humano identifica el origen humano de la proteína que contiene la mancha. Una clara reacción frente a un antisuero antihemoglobina humana identifica la mancha como sangre humana.

**3.7.6.2.** Una reacción clara de semiidentidad con un cruce entre las bandas del suero polivalente y negativo frente al anti – IgG demuestra que la proteína de la mancha no es humana. La inmunolectroforesis, aclara, sin lugar a dudas, el problema en sentido negativo. Debe intentarse, por lo demás, el diagnóstico positivo empleando otros antisueros animales u otras técnicas.

**3.7.6.3.** Una reacción de semiidentidad, en la que las bandas no se cruzan, sino que se unen en espón, indica que se trata de proteínas mono superiores o degeneradas.

**3.7.6.4.** Ante una reacción negativa se plantean dos posibilidades:

**3.7.6.4.1.** No es sangre humana cuando la tasa proteica medida con la técnica de Lowry da una concentración suficiente y el aspecto de la sangre, así como su espectro hemoglobínico, no indica una desnaturalización por álcalis o ácidos.

**3.7.6.4.2.** Puede ser sangre humana cuando la concentración proteica es débil y el aspecto de la mancha y sus espectros de absorción indican que las proteínas que contiene han podido sufrir un proceso de desnaturalización. Los detergentes biológicos con enzimas proteolíticas pueden destruir las proteínas, y los alquilsulfonatos y sulfatos, así como los alcoholes grasos de los detergentes, pueden dar reacciones falsas.

**3.7.6.5.** La mayor objeción que se puede oponer a estas técnicas inmunológicas es que no son muy sensibles, aunque la inmunodifusión radial de Mancini, con un antisuero anti- IgG humano no hiperinmune, puede aumentar la sensibilidad.<sup>5</sup>

### **3.7.7. INHIBICIÓN DE LA ANTIGLOBULINA**

Este método presenta algunas peculiaridades que justifican una breve exposición. Según la encuesta de Robin, de 1967, sería el test más empleado en los laboratorios de Medicina Legal para el diagnóstico específico de las manchas. Fue propuesto en 1955 por Vacher, Sutton, Derobert y Mullet, y está basado en la prueba de Coombs para evidenciar la presencia de anticuerpos bloqueantes o aglutininas incompletas que se unen a los hematíes correspondientes boqueándolos sin aglutinarlos, pero basta añadir una pequeña cantidad de

antiglobulina para producir la aglutinación. Su aplicación al diagnóstico médico legal de la especificidad de las manchas es el siguiente: hematíes O Rh + (D+), sensibilizados por anticuerpos bloqueantes, se aglutinan cuando se les adicionan suero antiglobulina o suero de Coombs. Si este anticuerpo se pone en contacto con una proteína humana, agotara su capacidad de reacción y, al adicionarlo al sistema de hematíes, ya no será capaz de aglutinarlos. El método es excelente, fácil de realizar, específico, y de una sensibilidad extraordinaria. Dodinvald ha podido obtener reacciones positivas con 1mm de hilo de gasa impregnado en sangre.<sup>5, 14, 38.</sup>

### **3.7.7.1. TÉCNICA**

- a) Se tratan hematíes O Rh + con suero anti- Rh incompleto diluido, se incuban a 37°C durante 30 minutos; se lavan varias veces con solución salina y se suspenden en solución salina al 5%.
- b) Se extrae la mancha con solución salina. El extracto se mezcla a partes iguales con suero antiglobulina de un título límite, es decir, el penúltimo que produce reacción positiva en una prueba de control. Se incuban a 37°C, de 2 a 24 horas según la antigüedad de la mancha.
- c) Se trata una gota de los hematíes sensibilizados (según 1) con una gota de la mezcla, macerado de la mancha + suero antiglobulina.

El diagnóstico es positivo en lo que respecta a la especie cuando la reacción es negativa, es decir, la no aglutinación indicaría que la capacidad de aglutinación del suero de Coombs quedó absorbida por las globulinas de la mancha y, por tanto, que estas eran humanas.<sup>5, 14, 28.</sup>

### **3.7.8. TEST DE ANTIGLOBULINA HUMANA (AGH)**

El test o prueba de antiglobulina humana (AGH) inventado por Coombs (de ahí que en muchas ocasiones se denomine Test o prueba de Coombs), es por sí sola la prueba más importante que se realiza para detectar anticuerpos anti-eritrocitarios. Dado que los anticuerpos son gammaglobulinas, un anticuerpo puede formar puentes de unión entre hematíes sensibilizados a dicho anticuerpo y una gammaglobulina, y dar origen a una aglutinación de los hematíes. Dado que la mayoría de anticuerpos son IgG, la AGH mono-específica contiene anti-IgG; pero como algún anticuerpo IgG y muchos IgM pueden hacer que el factor 3 del complemento (C3) se adhiera a los hematíes y éstos aglutinen, el suero poliespecífico de AGH, también contiene anti-C3.<sup>23.</sup>

## **4. Problema de investigación**

### **4.1. Planteamiento y justificación**

En la escena del crimen más de 90% de los casos se encuentra la presencia de sangre, la cual el primer problema que se enfrenta el perito es una adecuada toma de muestra para posteriormente investigar si se trata de sangre humana o corresponde a otras especies, este último punto puede llevarse a cabo teniendo en cuenta los elementos formes de la sangre como son: estructura y hemoglobina. El personal de laboratorio forense puede basarse en técnicas que pueden orientarlo; como la técnica de malaquita verde, fenolftaleína etc. O bien realizar la confirmación de especie mediante técnicas selectivas y específicas como son la inmunocromatografía, el test de Ouchterlony, o inmunoelectroforesis.

### **4.2. Importancia del estudio**

La importancia de la investigación bibliográfica radica en resaltar las diferentes formas de poder llevar a cabo el proceso de muestras que pudieran tratarse sangre de especies humanas o de otras especies, se menciona también, las técnicas con las que se cuentan para poder llevar a cabo la diferenciación de glóbulos rojos humanos con otras especies como prueba confirmatoria.

En esta investigación se analizan diferentes técnicas basadas en confirmar los elementos formes de la sangre el más utilizado es evidenciar la presencia de hemoglobina presente en los eritrocitos.

### **4.3. Limitaciones del estudio**

La información bibliográfica que se encuentra en nuestro país acerca de este tema es muy escasa, además de que los avances en estos campos han sido muy poco desarrollados por expertos en el área. Además la información sobre el tema esta aplicada a otros países que cuentan con la posibilidad económica de adquirir reactivos de alto costo, pero que facilitan el trabajo del perito, y que a diferencia de nuestro país que no cuenta con la infraestructura para la investigación de nuevas técnicas que pudieran realizarse para estudios como el que se está analizando

## **5. OBJETIVO GENERAL.**

- 1.1. Conocer los distintos métodos existentes para la diferenciación de eritrocitos humanos con otras especies en el campo forense.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- 5.2. Conocer las pruebas que ayudan a distinguir los eritrocitos humanos con los de otras especies.
- 5.3. Estipular la importancia de la diferenciación de eritrocitos humanos con otras especies.
- 5.4. Establecer cuál es el mejor método que existe para la diferenciación y confirmación de especie en el área forense.

## **6. Metodología**

**6.1. Tipo de estudio:** Es una tesina monográfica, descriptiva, retrospectiva

**6.2.Procedimiento:** Para la realización de esta investigación bibliografía se analizan primeramente algunos conceptos básicos para poder comprender los fundamentos de las técnicas, se describen algunos principios para ir analizando y comparando diferentes técnicas que son utilizadas actualmente y también como fueron diseñándose estas con el transcurso de las necesidades del personal del laboratorio forense, hasta llegar a la actualidad con técnicas modernas y que son de gran ayuda para la confirmación de especie.

## 7. Discusión de resultados

La presencia probable de sangre en el lugar de los hechos es un indicio preponderante que puede ayudar a la solución de una investigación del presunto hecho delictivo, uno de los principales problemas al que se enfrenta el perito de campo es primero, la recolección de las muestras (no perdiendo de vista que van a depender mucho del escenario en la que estas se encuentren y que serán determinantes para el resultado), posteriormente la confirmación de sangre y por último, determinar la diferenciación de sangre humana con otras especies.

El perito previamente debe verificar si es o no para la diferenciación de sangre humana con otras especies

La diferenciación de eritrocitos humanos con otras especies puede llevarse a cabo a partir de diferentes métodos como son:

**Orientación:** En este tipo de reacciones tienden principalmente de poner en manifiesto los diferentes elementos presentes en la sangre, los métodos que se incluyen en este tipo de métodos se enlistan a continuación

**Pruebas microscópicas:** Comparación de los diámetros y forma de los eritrocitos

Se analizaran las principales desventajas para la realización de este método

No existen técnicas para aislar componentes sanguíneos y realizar tinción para identificación.

A menudo las células se rompen e impiden la investigación directa.

**Técnicas microquímicas o cristalográficas:** Existencia de ciertos derivados de la hemoglobina que tiene tendencia a cristalizar cuando se someten la muestra a calentamiento y haciéndola reaccionar con un ácido orgánico, ocurriendo una reacción oxido reducción, produciendo cristales halogenados de hematina.

Para la realización de este tipo de prueba es necesario partir de una costra de sangre, es importante señalar que para realizar este método debe constarse con sangre fresca, debido a que la sangre "vieja" presenta frecuentemente reacciones negativas, limitando la investigación para este tipo de muestras.

Debe tenerse cuidado en el calentamiento que se le aplica a la reacción ya que por este factor pueden presentarse falsos negativos.

**Técnicas espectroscópicas:** Obtención de un espectro de absorción de la hemoglobina y alguno de sus derivados, como prueba de la naturaleza de la mancha.

La hemoglobina tiene dos bandas de absorción en la zona visible cuyos máximos se encuentran, respectivamente, a 566 y 540 nm

El tiempo de preparación de la muestra es muy tardado lo cual requiere tiempo.

**Técnicas cromatográficas:** Propiedades físico – químicas de la hemoglobina, que confiere una movilidad cromatografica concreta cuando se desarrollo en un disolvente adecuado.

La mayor desventaja de esta técnica para su realización se necesita un testigo y disolventes adecuados.

**Técnicas enzimáticas:** Presencia de sangre de peroxidasas que son capaces de descomponer un peróxido, desprendiendo oxígeno que oxida a una leucobase. La leucobase oxibase oxidada cambia de color.

**Confirmativas:** Fundamentalmente son reacciones antígeno - anticuerpo basadas en el área Inmuno-hematología, por lo tanto son reacciones más específicas aunque en algunos caso son también las mas tardas y costosas, a continuación se enlistan los métodos que se encuentran en esta clasificación.

**Reacción de suero precipitante de Uhlenhat y reacción anafiláctica:** La inyección de sangre o suero sanguíneo de especies diferentes, provoca la aparición, en el animal inyectado de un proceso que tiene la propiedad de dar un precipitado en presencia de la solución de sangre o suero sanguíneo idéntico al que fue inyectado y no con la sangre o suero de animales para los que no ha sido preparado.

**Test de Ouchterlony:** Reacción antígeno anticuerpo sometidas en un gel de agarosa las cuales forman bandas de precipitación que aparecen como arcos mostrando la identidad de la reacción.

**Inmunolectroforesis:** Reacción antígeno anticuerpo sometidas a 120 volts durante 2 horas.

**Inmunorreoforesis:** La técnica consiste en efectuar un desarrollo electroforético del antígeno y anticuerpo sobre la misma placa

**Inhibición de la antiglobulina:** Esta basado en la prueba de Coombs para evidenciar la presencia de anticuerpos bloqueantes o aglutininas incompletas que se unen a los hematíes correspondientes boqueándolos sin aglutinarlos

Los diferentes métodos cuentan con ventajas y desventajas que deben ser evaluadas por la persona que realizara este tipo de reacciones, lo importante de la selección del método a utilizar son las circunstancias, cantidad de muestra y sobre todo la aportación que pueda realizarse en la investigación del presunto hecho delictivo para la confirmación de especie dentro del campo forense.

Se realizara un análisis global de las diferentes metodologías:

**Pruebas de orientación:** Este tipo de métodos muestran una panorámica general, como su nombre lo indica solo orientan al perito en la averiguación que está realizando, cabe resaltar las diferentes limitantes que existen para poder llevar a cabo estos métodos que son:

- El uso del indicio para este tipo de pruebas no permite recuperar la muestra para otros fines.
- Los recursos de los cuales se dispongan (reactivos)
- Reacciones falsos positivos
- No son específicas
- Son poco sensibles
- En la recopilación de la muestra se pueden presentar distintos escenarios que interfieren en la obtención del resultado como es encontrar:
  - Manchas secas: Dificulta llevar a cabo la extracción de células
  - Degradadas: obtención de poca muestra y la posibilidad de contaminación
  - Contaminadas con diferentes elementos como: tierra, cuerpos putrefactos
  - Presentes en telas
  - Exposición a los factores ambientales: lluvia, sol.

Así como se describieron las limitaciones o desventajas de este método, se describirá las ventajas que pueden ayudar a la determinación buscada.

- Tiempo: Estos métodos son rápidos
- Determina trazas de sangre
- Son relativamente bajas en el costo (dependiendo de la técnica a emplear)

**Métodos confirmatorios:** Estos son altamente específicos, las ventajas y desventajas de estas técnicas son:

Desventajas:

- ❖ Son costosas
- ❖ Preparación de la muestra (condiciones especiales para poder llevar a cabo estas reacciones)
- ❖ No determinan trazas
- ❖ Reacciones cruzadas con especies afines
- ❖ Tiempo de obtención de resultados prolongado
- ❖ No se puede recuperar la muestra para ser utilizada con otros fines

Ventajas:

- ❖ Es altamente específica
- ❖ Es sensible
- ❖ Fácil interpretación

Es importante realizar un análisis a una de las pruebas confirmatorias; la prueba de **inmunocromatografía** (Hexágono OBT1®). Este tipo de pruebas no se realizan en nuestro país debido al costo que implica realizarla, considero una gran limitante para los peritos Mexicanos el no tener acceso a esta técnica debido a que puede aportar información confiable, rápida y específica para la diferenciación de especie.

Esta prueba no se ve afectada por factores del medio ambiente que a diferencia con otros métodos los cuales si se ven afectados por este factor, también la prueba puede utilizarse en conjunto con otras áreas como es genética forense, debido a que no hay pérdida ni interferencia en el ADN y este puede ser utilizado para otros fines correspondientes del área, otra aportación importante es que puede utilizarse material degradado sin presentar falsos positivos, además de su fácil interpretación de resultados.

Se puede observar que los métodos de orientación y los confirmatorios tienen limitantes importantes que deberán considerarse dependiendo de diversos factores, entre ellos, los recursos económicos y circunstanciales a los cuales se enfrente el perito, este último factor es muy importante, como se había mencionado anteriormente dependerá de la cantidad de muestra y el tiempo que se disponga para la entrega de un resultado y con ello podrá elegir el tipo de técnica a utilizar.

Cabe señalar que el tipo de técnica a elegir dependerá de las condiciones en las que se encuentre la muestra, y de la cantidad de esta, como mencionan algunos autores lo recomendable es realizar una de las pruebas confirmatorias y si se cuentan con los recursos tanto cantidad suficiente de muestra como los reactivos necesarios, deberán realizarse también la prueba de orientación.

Es muy importante en este tipo de diferenciación tener en cuenta que la muestra no va a ser recuperada debido a la manipulación que llevo la realización de estos métodos, y que no puede ser utilizada para otras áreas u otros exámenes que se requieran. Es necesario resaltar este punto ya que no hay que perder de vista que los indicios son únicos y son determinantes para la resolución o aportación de la averiguación.

## **8. Conclusión**

Se tienen las herramientas necesarias para llevar a cabo la diferenciación de sangre humana con otras especies.

El aplicar correctamente los métodos de orientación o confirmación aporta resultados rápidos y veraces

El perito tiene la selección de las pruebas o métodos para aplicar la diferenciación de sangre humana con otra especie, de una manera rápida y veraz

El método de elección recomendado para llevar a cabo la diferenciación de especie es la inmunocromatografía.

Una vez realizada la confirmación de especie puede llevarse a cabo la correlación con otras áreas como la genética forense, generando la identificación del individuo mediante el ADN.

## 10. Referencias bibliográficas

1. Martínez. Medicina legal. Décima sexta ed. Méndez editores S.A. de C.V. 2000.
2. Kingh B. Medicina forense. 2ª ed. Manual moderno, 1999.
3. J. Vives, J. Aguilar. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 2ª ed. Manson, S.A.1997.
4. Gisbert J, Villanueva E. Medicina Legal y Toxicología. 6a ed. Elzevir España, 2005 cap. X
5. Roitt I, J Brostoff D. Male. Inmunología. 5ª ed. Harcourt, p. 381-389
6. [http://images.google.com.mx/imgres?imgurl=http://www.genomasur.com/lecturas/02-59-G.gif&imgrefurl=http://www.genomasur.com/lecturas/Guia02-2.htm&usq=\\_okkZYGKZtuYp6ylz7-ij65Grnd3k=&h=285&w=312&sz=9&hl=es&start=11&tbnid=4uBruNs4vEHvIM:&tbnh=107&tbnw=117&prev=/images%3Fq%3Dgrupo%2Bheme%26gbv%3D2%26hl%3Des](http://images.google.com.mx/imgres?imgurl=http://www.genomasur.com/lecturas/02-59-G.gif&imgrefurl=http://www.genomasur.com/lecturas/Guia02-2.htm&usq=_okkZYGKZtuYp6ylz7-ij65Grnd3k=&h=285&w=312&sz=9&hl=es&start=11&tbnid=4uBruNs4vEHvIM:&tbnh=107&tbnw=117&prev=/images%3Fq%3Dgrupo%2Bheme%26gbv%3D2%26hl%3Des) [imagen internet] [ 15 de marzo 2009]
7. Altman, Clubb, Dorrestein, Quesenberry. Hematologic, Biochemical, and Morphometric Values of Selected Raptor Species. Appendix 1D. Avian Medicine and Surgery.1997.
8. [http://html.rincondelvago.com/sangre\\_10.html](http://html.rincondelvago.com/sangre_10.html) [imagen internet][15 de marzo]
9. <http://www.diagnosticoveterinario.com/aves/valores-de-hematologia-en-falco-peregrinus-spp/> [imagen internet][15 de marzo]
10. Reagan W, T. Sanders, D. DeNicofa. Atlas de especies domésticas comunes, ed. Harcourt.
11. Alleman A. R. Y Harvet. J. W. 1993. The morphologic effects of vincristine sulfate on canine bone marrow celles. Veterinary Clinical Pathology 22 (2): 33-41
12. Jain, Nemi C. 1986. Schalns Veterinary Hermatology. 4' ed. Philadelphia: Lea and Febiger.
13. Jain, Nemi C. 1993. Schalns Veterinary Hermatology. 4' ed. Philadelphia: Lea and Febiger
14. Franco M. Hematología forense, cuarta edición, ed. Porrúa, México, 2002.
15. Duncan J, Prasse R, Keith W; and Mahaffey, Edward A. 1994 Veterinary Laboratory Medicine: Clinical pathology, 3a ed. Ames Iowa State University Press
16. Kenneth L, Leucocytes in health and diseade. In textbook of Veterinary Internal Medicine: Disease of the Dog and Cat. 4a ed. Vol. 2. Editorial Sthephen J. Ettinger y Edwar C. Feldman, 1995. Philadelphia
17. Peña J, Inmunología. Pirámide Ediciones, 1998 p. 166-171
18. Van Houen D, Weiser, MG Johonson L, Y Gany. 1992 Reference hematologic values and morphological features of blood cell in healthy adult llamas American Journal of Veterinary Reseca 53 (10): 1773 – 1779.
19. Ernest B M, A. Marsahall. Williams hematology, 6<sup>th</sup> edition. Editor Mc Graw Hill professional, November 28, 2000.
20. Regueiro G, L. Larrea. Inmunología Biología y patología del sistema inmune, 3ª ed. Medicina Panamericana. España 1998.

21. Bernadette F. Hematología: Fundamentos y aplicaciones clínicas. 2ª ed. Médica Panamericana, 2005.
22. Lichtman A, J. Pober. Inmunología Celular y Molecular. 5ª Ed. Mc Graw Hill. 2003. México.
23. Roitt I, J. Brostoff. Inmunología. 5a ed. Elsevier - Health Sciences Division. 2000.
24. Rojas W, Inmunología 7ª ed. Corporación para Investigaciones Biológicas, 1988.
25. Rojas N, Medicina Legal. V. 2. "El Ateneo", 1936. Universidad de California.
26. Castellanos I, Hematología Forense. La Propagandista, 1932.
27. Cuellar F, Falabella F. Hematología. 6ª ed. ilustrada. Corporación para Investigaciones Biológicas, 2006.
28. Quiroz A, Medicina forense. 3ª ed. Porrúa. Universidad de Texas. 1982.
29. Revista de Medicina y cirugía practicas. Universidad de California. Abr. 2007. v.
30. Roa R, Manual razonado de práctica criminal y médico-legal forense mexicana: Obra escrita con arreglo a las leyes antiguas y modernas vigentes, y a las doctrinas de los mejores autores bajo un plan nuevo y al alcance de todos. 2ª ed. E. Maillefert, 2008.
31. [http://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/mariamc/lacteos/practica8.htm](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mariamc/lacteos/practica8.htm)
32. Lachman PJ, K, Rosen FS and Walport M.J. (Eds) Clinical Aspects of Immunology, 5th end Blackwell Scientific Publications. Oxford p. 2176
33. Roitt M. essential Immunology 8<sup>th</sup> end. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
34. Kubly J. Immunology. 2<sup>nd</sup> end. WH Freeman New York.
35. Roitt M. and Delves P.J. Encyclopedia of Immunology. Academic Press, London 1992.
36. Stites D. Terr A. and Parslow G. Basic and Clinical Immunology 8<sup>th</sup>. End E. Prentice- Hall. London 1994.
37. Ponsold, A. Sumersión en Manual de Medicina Legal. E. Científico-médica, Barcelona, 1995.
38. Simonin C. Medicina Legal Judicial. Ed. Jims. 2º edición, Barcelona, 2006
39. Riú J, A. y Travella de Riú, G. Lesiones. Aspectos médico-legales. Lema Editora, Buenos Aires, 1994.
40. Rojas, N. *Medicina Legal*. El Ateneo, 9º ed., Buenos Aires, 1966.
41. Wheeler P, Lori J. Wilson Practical Forensic Microscopy. Wiley- Blackwell, USA 2008
42. Eduardo V, Medicina Legal. E. Trillas
43. Alan H, Hemogram Interpretation for dogs and cats. Clinical Handbook Series.
44. Feldman B, Platelet Dysfunction. Textbook of Veterinary Internal Medicine; Disease of Dog and Cat. 3rd e. W.B. Saunders, Philadelphia, 1989.
45. Gorman N, L. Werner. Immune – mediated Diseases of the dog and Cat. I, II, III, IV. Br Vet J 142:395.

## 9. Glosario

**Aglutinación:** forma de reacción antígeno-anticuerpo en la cual son necesarios anticuerpos solubles divalentes o polivalentes y antígenos celulares o particulados<sup>35</sup>

**Anticuerpos:** Son las globulinas séricas que poseen un amplio rango de diversidad y especificidad para los antígenos del hábitat. Se encuentran en el suero, otros humores y tejidos del cuerpo. Existen 5 tipos: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM.<sup>22</sup>

**Antígeno:** Es toda aquella sustancia que induce la producción de anticuerpos. Es aquel que estimula una respuesta inmune adaptativa. Pueden ser proteínas, polisacáridos, bacterias, células, o sea elementos extraños al organismo que provoca una reacción específica.<sup>20</sup>

**CMH:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Es un locus genético muy polimórfico que determina la expresión de los antígenos de histocompatibilidad que participan en las interacciones celulares durante la respuesta inmune.<sup>21</sup>

**IgA:** Es la más importante en las secreciones, como lágrimas, sudor, etc., donde gracias a su pieza secretora se protege de la digestión enzimática. Su gran valor es el de bloquear la entrada de los microorganismos patógenos al organismo a través de las mucosas.<sup>32</sup>

**IgD:** Está presente en la superficie de la mayor parte de linfocitos B circulantes, indicando que las células B vírgenes están listas para entrar en contacto con el antígeno. La IgD se pierde durante la estimulación antigénica, las células memoria han perdido esta inmunoglobulina.<sup>32</sup>

**IgE:** Es una molécula peculiar que se une a receptores de alta afinidad existentes en mastocitos y basófilos y que determina su degranulación con consecuencias benéficas y adversas.<sup>32</sup>

**IgG:** Más tardíamente producido, es de gran valor por su capacidad de activar al complemento y unirse a receptores celulares de fagocitos. Atraviesa la placenta y llega al feto, al igual que el espacio extravascular. En la mayoría de las especies evidencia subclases.<sup>32</sup>

**IgM:** Es el primer anticuerpo en aparecer. Es pentamérico presenta diez sitios de atrapamiento antigénico.<sup>32</sup>

**Inmunohematología:** Es la parte de la hematología que estudia los sistemas de los grupos sanguíneos, así como las complicaciones inmunológicas en las que se ven implicados.<sup>34</sup>

**Presentación antigénica:** Es un fenómeno mediante el cual los macrófagos presentan al linfocito T un péptido antigénico en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad de clases I y II, para iniciar una respuesta inmune adaptativa.<sup>22</sup>

**Reacción Antígena – Anticuerpo:** En las reacciones antígeno-anticuerpo se distinguen 2 fases: la primera consiste en la unión del antígeno con el anticuerpo y la segunda en las manifestaciones que resultan de dicha unión. La primera fase se realiza por la combinación de áreas pequeñas tanto del antígeno como del anticuerpo, denominadas respectivamente determinante antigénica y sitio activo, que al unirse forman un complejo antígeno-anticuerpo.<sup>33</sup>

Respuesta inmune adaptativa: es el desarrollo o incremento de los mecanismos defensivos contra un patógeno (específico) particular.<sup>21</sup>