



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**METODOLOGÍA PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE UNA MUESTRA
DE SANGRE RECOLECTADA EN EL
LUGAR DE LOS HECHOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

MARTÍNEZ SÁENZ JOSÉ ANGEL

ASESOR: M. en C. ARACELI GARCIA DEL VALLE



México, D.F.

JUNIO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Contenido

– Resumen	1
– Introducción	2
– Marco teórico	5
– Problema de investigación	11
– Objetivos	12
– Metodología	13
– Resultados	14
1 Definición y características de la sangre	14
2 Manchas de sangre en la escena de hechos	16
2.1 Producción de las manchas	16
3 Recolección y embalaje de manchas de sangre	20
3.1 Recolección	20
3.2 Embalaje	22
4 Identificación presuntiva de manchas de sangre	24
4.1 Métodos microscópicos	24
4.2 Pruebas catalíticas	25
4.3 Método espectrofotométrico	33

5	Pruebas confirmativas para la identificación de sangre	35
5.1	Pruebas de cristales	35
5.2	Métodos electroforéticos	39
5.3	Métodos cromatográficos	42
6	Identificación de especie de la mancha de sangre	44
6.1	Pruebas para el origen de las especies	46
6.2	Métodos comerciales	60
–	Análisis de resultados	63
–	Conclusiones	68
–	Referencias bibliográficas	69

RESUMEN

Esta tesina proporciona una fuente de información útil y confiable para ser usada y consultada en los procedimientos de investigación criminalística, mediante la inclusión de temas de gran importancia en las investigaciones de sucesos presuntamente delictivos, tales como: a) Técnicas orientativas y confirmativas para la identificación de manchas de sangre; b) Método de recolección y embalaje de las muestras de sangre y c) Identificación de especie de manchas de sangre, teniendo como objetivo principal proponer y describir la metodología sugerida a seguir para la identificación de una mancha de sangre, mediante la consulta bibliográfica del fundamento de las técnicas de identificación de sangre y especie, así como su recolección y embalaje. Simultáneamente se seleccionó la información más relevante de acuerdo a los requerimientos de cada técnica, redactando de manera detallada y clara los procedimientos y aplicaciones de estas técnicas, obteniendo como resultado una propuesta de método a seguir en una investigación criminalística.

INTRODUCCIÓN

Cuando los investigadores llegan a la escena del crimen, la zona normalmente es asegurada contra la contaminación por los primeros oficiales policiales que llegaron. El lugar tendrá pruebas de la presencia física del criminal, y algunas pruebas de la escena se las habrá llevado el criminal. La prueba puede consistir en fibras de alfombra, sangre o residuos de un disparo entre otras.

La habilidad más importante que un científico forense puede tener es la capacidad de hacer observaciones precisas, tanto en la escena de un crimen como en un laboratorio. El valor de las pruebas forenses se basa a menudo en encontrar trazas de compuestos que relacionan de forma indiscutible un ambiente con otro. Muchos de los grandes descubrimientos se han realizado en el laboratorio por un científico observador que advirtió lo que otros habían ignorado. Los científicos se entrenan pronto en hacer observaciones en sus carreras empleando incontables horas en el laboratorio.

La ciencia forense se basa en la aplicación de los métodos científicos a estas pruebas, existen muchas ramas en la ciencia forense debido a que las ciencias en general tienen alguna aplicación en los asuntos públicos y criminales. Algunas de sus principales áreas son las siguientes:

- Química
- Genética
- Medicina
- Biología
- Odontología
- Patología
- Entomología
- Psicología
- Antropología¹

Entender la evidencia requiere de herramientas provenientes de muchas disciplinas como las ya mencionadas. Con el paso del tiempo la Química Analítica ha adquirido una gran importancia en la investigación criminal, sobre todo a la hora de conocer la naturaleza intrínseca de cualquier sustancia o elemento y más aún, cuando sirve para auxiliar en la investigación científica de los delitos, por lo tanto los químicos forenses tienen tres tareas

principales: primero, analizar las evidencias en el laboratorio, luego, se interpreta la información que se saca de ellas y por último, se puede llegar a defender lo encontrado, mediante la testificación del químico forense en un juicio, por lo que la Química Forense es aplicada en una gran variedad de técnicas, tanto cualitativas como cuantitativas, cuya principal finalidad es la búsqueda de respuestas provenientes de las diferentes evidencias que ayuden a la resolución de algún caso criminal.

La Química Forense es otra alternativa a los muchos caminos que puede seguir un químico en el ámbito de la investigación, además de ser una buena opción a la hora de hacer aportes significativos a la sociedad, donde su actuar, junto con su alto nivel de conocimiento analítico y su capacidad de manejo instrumental, es de vital importancia para descifrar las evidencias y contribuir a la búsqueda de la verdad.

Uno de los principios fundamentales en los cuales se rige la Ciencia Forense y específicamente la Química Forense se basa en la premisa de que cuando dos objetos entran en contacto, habrá un intercambio entre los dos. Es decir, “cada contacto deja un rastro”, frase que popularizó Edmund Locard, padre de la Criminalística moderna, provocando así un giro en la metodología investigativa. Es por esto que el químico forense rastrea este intercambio entre materiales y trae a la luz lo que es invisible a los ojos. Basándose en sus conocimientos y en las tecnologías desarrolladas, tiene la capacidad de rastrear sustancias o huellas que sean dejadas en una escena del crimen.

La investigación de manchas de sangre sigue ocupando un lugar preferente en la labor del químico forense, tradicionalmente, se ha venido realizando un sistema de investigación que incluye la realización de los siguientes diagnósticos:

1. Orientación.
2. Certeza.
3. Especie.
4. Individual (grupos, ADN, sexo).
5. Otros (antigüedad, lugar de procedencia, etc.).

Todas las pruebas usadas en la detección de sangre se basan principalmente en la actividad de las enzimas peroxidasa presentes en la sangre, las cuales reaccionan con los agentes químicos causando un cambio de color. Algunas de las pruebas usadas son: el test de bencidina, de leucomalaquita verde, fenolftaleína o tetrametil bencidina. Pero uno de los más famosos es el uso del Luminol, que se utiliza en química forense para detectar trazas de sangre. Este compuesto es un derivado del ácido ftálico que cataliza la oxidación con peróxido de hidrógeno bajo emisión de luz, es decir su mayor importancia reside en la

reacción de quimioluminiscencia que da con peróxidos en presencia de complejos de hierro como catalizador. Sin embargo todas estas son pruebas presuntivas, que requieren de la confirmación por medio de pruebas confirmativas como son los cristales de Teichmann o de Takayama.

Es importante destacar el papel fundamental que cumple la analítica instrumental dentro de las técnicas mencionadas anteriormente, ya que gracias a los avances instrumentales hechos por científicos forenses es posible llegar a resultados certeros, tan necesarios a la hora de defender las metodologías y los resultados obtenidos ante la ley. Por esta razón es cada vez más necesario contar con instrumentos más sensibles capaces de llegar a límites de detección más pequeños, mediante el uso de cantidades mínimas de muestra y técnicas analíticas acopladas, para poder determinar la presencia de sustancias donde en un pasado cercano se creía que no existían. Sin la base química necesaria, muchas de las técnicas mencionadas no podrían ser aplicadas a las Ciencias Forenses, por lo tanto es importante que el desarrollo de la Química Analítica siga avanzando y aportando a la investigación criminal. La irrupción de la tecnología de investigación de ADN ha hecho que, en el momento actual, el caudal investigador se haya centrado en este campo. Sin embargo, es la propia progresión técnica en este campo, la que debe devolver un papel fundamental a los estudios que traten de perfeccionar las técnicas de orientación en el estudio de las manchas de sangre^{2, 3, 4, 5}.

MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN A LA CRIMINALÍSTICA

El estudio de la escena de un delito constituye una investigación legal, planeada y coordinada por autoridades competentes a fin de localizar indicios o testigos del hecho. Para ello, conviene observar los siguientes pasos, aunque no necesariamente en el orden expuesto: protección y conservación de la escena; observación y fijación de la escena e indicios o material sensible significativo, incluidas en éstos, las manchas de sangre en la escena del hecho.

PROTECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA ESCENA

Se persiguen dos objetivos:

- Conservar la situación, posición y estado original de los indicios.
- Reconstruir los hechos e identificar al autor por medio del examen y evaluación de los indicios.

Para lograr estos fines, es necesario observar el siguiente procedimiento:

1. Custodia de la escena por la policía uniformada, para que aquella no se altere por la sustracción de objetos o la introducción de artificios.
2. En delitos cometidos dentro de una habitación es indispensable cerrar ventanas y puertas e impedir el acceso a extraños.
3. En delitos que hayan tenido como escena una casa aislada, se debe tener un cordón policial en un radio no menor de cincuenta metros.
4. Solo se permitirá el acceso a la escena a los funcionarios o autoridades involucradas en las investigaciones del caso.
5. Los objetos y cadáveres no deben ser tocados ni cambiados de posición hasta que intervengan los investigadores judiciales y los médicos forenses.
6. Debe levantarse un registro de las personas que se hubiesen hecho presentes antes de los funcionarios judiciales.

OBSERVACIÓN Y FIJACIÓN DE LA ESCENA

OBSERVACIÓN

Es el “escrutinio mental activo, minucioso, completo y metódico que del propio lugar realiza el investigador, con el fin de descubrir todos los elementos de evidencia física (material sensible significativo o indicios) y establecer la relación que guardan entre sí y con el hecho que se investiga. Los objetivos de dicha investigación son:

- Verificar la realidad del presunto hecho delictuoso.
- Recolectar indicios que permitan identificar el autor o autores y establecer las circunstancias en su participación.

En la observación criminalística es necesario seguir estas pautas:

- Buena iluminación e instrumentos ópticos adecuados (luz, microscopio estereoscópico, luz ultravioleta, etcétera).
- Llevarla a cabo lo antes posible (“conforme pasa el tiempo, la verdad huye”).
- No prescindir de detalle alguno.

FIJACIÓN

El registro de los detalles de la escena puede efectuarse mediante a) descripción escrita; b) fotografía; c) croquis; d) moldeado, entre otras técnicas.

a) Descripción escrita.

Debe ir de lo general a lo particular, incluirá detalles como:

- Fecha, hora y ubicación de la escena.
- Condiciones de clima e iluminación
- Identidad de otros participantes.
- Labores asignadas a cada investigador.
- Condición y posición de los indicios.

b) Fotografía.

Debe llenar los requisitos de exactitud y nitidez, así, está prohibida toda maniobra de retoque, por lo que se aconseja tomar cuatro tipos de fotografías de la escena:

- Vistas generales: donde aparezcan la víctima y objetos próximos, enfocados desde diferentes ángulos.

- Vistas medias: el cadáver en relación con objetos próximos, desde distintos ángulos.
- Acercamientos: por ejemplo, detalle del modo en que el cadáver empuñaba el arma.
- Grandes acercamientos: por ejemplo, ahumamiento en la palma de la mano que sostuvo el cañón del revólver o salpicaduras de sangre en el dorso de la mano que empuñó el arma.

c) Croquis.

Es una representación hecha a mano, un dibujo de las condiciones de la escena en el cual debe prescindirse de detalles innecesarios. No reemplaza, sino que complementa la fotografía, y se usa para mostrar:

- Dimensiones de muebles, puertas, ventanas, etcétera.
- Distancias de objetos y cadáver en relación con entradas y salidas.
- Distancias entre los objetos y del cadáver con respecto a ellos.

Asimismo, deben efectuarse mediciones que demuestren la localización exacta de los indicios, cada uno de los cuales debe ser ubicado en relación con su distancia, y con detalles fijos como puertas, paredes, etcétera. También es necesario indicar la escala utilizada y señalar los puntos cardinales, y emplear la simbología conveniente que permita identificar los objetos dibujados.

d) Moldeado.

Es un complemento de la fotografía y el dibujo; se utiliza en casos de huellas de pisada o marcas de neumáticos de vehículos. El molde obtenido debe confrontarse con la huella que se ha pretendido reproducir.



Fig. 1. Protección, conservación y fijación de la escena

INDICIOS O MATERIAL SENSIBLE SIGNIFICATIVO

Se denomina indicio o material sensible significativo todo objeto, huella o elemento íntimamente relacionado con un presunto hecho delictuoso, cuyo estudio permite reconstruirlo e identificar a su autor o autores y establecer su participación.

En relación con cada indicio deben llevarse a cabo los siguientes pasos: a) su identidad; b) manejo; c) levantamiento y embalaje, d) valor investigativo.

a) Identidad

La identidad de cada indicio obliga a considerar los siguientes conceptos:

- Probabilidad matemática: Es el valor estadístico que el indicio o evidencia física puede tener y que sustenta su confiabilidad como prueba.
- Características y semejanza de clase: Permiten la clasificación previa de un objeto antes de proceder a la determinación de características individuales para su identidad específica.
- Individualidad: Es lo que hace que una cosa sea diferente de las demás y solo igual a sí misma. La individualidad no siempre fundamenta una identificación, como es el caso de escamas de pintura, que puede pertenecer a varios vehículos.
- Comparaciones: Es útil cuando se trata de la coincidencia de dos fragmentos de una fractura o ruptura. En tal circunstancia puede ser conveniente buscar la herramienta o la contraparte utilizada o resultante, respectivamente.
- Rareza: Incrementa el valor del indicio cuando es poco común que la víctima lo portara (por ejemplo, prendas femeninas en un varón).

b) Manejo

Todo indicio debe tratarse observando las siguientes reglas:

- Levantar toda evidencia física, ya que es preferible pecar por exceso que por defecto.
- Manipular la evidencia lo estrictamente necesario para no alterarla o contaminarla.
- Emplear instrumentos limpios en el levantamiento para evitar la contaminación del indicio.
- Levantar cada indicio por separado.
- Marcar el indicio en puntos que no tengan importancia pericial, por ejemplo, un proyectil disparado puede marcarse en la base puesto que lo útil se encuentra en las caras laterales.
- Embalar individualmente a fin de mantener la integridad del indicio.

c) Levantamiento y embalaje

Levantamiento y embalaje. Se refieren a aspectos específicos del modo de recolectar y embalar cada indicio, por ejemplo:

- Una pistola o un revólver se deben tomar por los bordes del guardamonte, y embalsarse en una caja de cartón dentro de la cual el arma se mantenga fija por medio de un cordel pasado por orificios que se hayan hecho en la caja.
- Un casquillo se levanta con un aplicador o porta-algodón que se introduce por su boca, y se embala en una caja o tubo de ensayo, protegido con algodón, de manera que no reciba golpes durante el transporte.
- Los pelos deben tomarse con pinzas de tipo depilatorio y colocarse separadamente en tubos de ensayo o en pequeños sobres.

d) Valor investigativo

Constituye la aportación que los indicios hacen al esclarecimiento del caso en estudio. Por ejemplo, en el caso de un revólver, hay que determinar si fue disparado recientemente y si los proyectiles y casquillos recolectados en la escena de un homicidio fueron disparados o percutidos por esa arma^{6, 7, 8}.

En el caso particular de la sangre, una vez que se ha obtenido el rastro hemático del lugar de los hechos, será importante establecer el valor investigativo de tal indicio, el cual comprende los siguientes aspectos:

1. ¿Se trata de una mancha de sangre?
2. ¿Es sangre humana o animal?
3. Si se trata de sangre humana ¿a cuál grupo pertenece?
4. ¿De qué región orgánica procede?
5. ¿Cuál es la edad de la mancha?

Para responder éstas interrogantes, es necesario el uso de un protocolo, en el cual a menudo se emplea una prueba química de detección presuntiva o de orientación que tiende a ser seguida por una prueba de confirmación para establecer claramente la identificación. Algunas de las pruebas más comunes usadas se mencionan a continuación.

Reacciones de orientación

- Reacción de Meyer

Su base es la fenoltaleína, reactivo muy alterable y por lo que hay que prepararlo cuando se va a realizar la prueba.

- Reacción de Adler

El reactivo es una solución saturada de bencidina en alcohol de 95 grados o ácido acético, recientemente preparada.

- Reacción de las catalasas

Se pone la solución de sangre en un tubo de ensaye, se le agregan una gotas de agua oxigenada y se forman, por la acción de las peroxidasas sanguíneas, burbujas que producen una espuma blanquecina en la superficie del líquido.

- Reacción de la o- toluidina.

La o-toluidina es el 3,3'dimetil derivado de la bencidina. La reacción, similar a la de la bencidina, es conducida bajo condiciones ácidas y produce un color azul semejante a la de la bencidina.

- Reacción del verde de leucomalaquita (LMG)

Otro compuesto investigado por Adler fue la reducción o decoloración del colorante verde de malaquita, referido en ocasiones como el reactivo de Mc Phail. La oxidación del LMG es catalizada por el grupo hemo para producir un color verde.

Todas las reacciones de orientación enunciadas sirven de control recíproco y con ellas solo se tiene opinión de probabilidad.

Reacciones confirmativas o de certidumbre

Se denominan así porque permiten una afirmación categórica.

- Reacción de los cristales de Teichman

Es una reacción microquímica de formación de cristales alargados, romboidales, de extremidades oblicuas, color marrón castaño, de clorhidrato de hemina o hematina.

- Reacción de Lecha marzo

Consiste en la formación de cristales de hemocromógeno, de color anaranjado o rojo oscuro, en forma de agujas o tabletas rómbicas, a veces agrupadas en estrellas.

- Reacción de Takayama

Si el grupo hemo es ligeramente calentado con piridina bajo condiciones alcalinas en presencia de un azúcar reductor como la glucosa, se forman cristales de piridina ferroprotoporfirina o hemocromógeno.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Las manchas de sangre fresca son fáciles de reconocer, sobre todo cuando se encuentran en lienzos blancos; sin embargo, no siempre es así. Cuando por evaporación se desecan y oscurecen, es posible confundirlas con las de herrumbre, carmín, tinturas, jugos de frutas, manchas de vino tinto, etc.

Por lo que, es importante identificar si una mancha es de sangre, así como especificar si es sangre humana o animal; lo que constituye uno de los problemas más importantes en las ciencias forenses, pues muchas veces, un sospechoso que tiene manchas de sangre en su ropa o pertenencias intenta explicarlas diciendo que estaba cortando carne, desplumando gallinas o matando conejos, etc. Con raras excepciones de identificación, como el eritrocito oval del camello o los nucleados de aves y reptiles, los exámenes previos no pueden distinguir la sangre humana de la animal. Se requiere de un laboratorio con posibilidad de realizar estudios inmunológicos.

En un lugar donde se ha cometido un hecho delictivo y se encuentran diferentes tipos de sangre, se deben tomar muestras de los mismos para analizarlos y compararlos a fin de identificar la sangre de la víctima y poder realizar una confronta con el tipo de sangre del sospechoso, por lo que el estudio de la sangre se aplica, principalmente, para la identificación de presuntos delincuentes y para deslindar casos de paternidad responsable dudosa. Sin embargo, el análisis de sangre dentro de la química legal aborda mas aspectos que los crímenes cometidos hacia los humanos, existiendo actos delictivos en los cuales se ven involucrados animales o son éstos la parte central de una investigación criminal.

Por lo antes expuesto es necesario contar con más información para emplear los métodos biológicos y saber si una mancha de sangre es humana o sino, a que animal pertenece, siendo de gran importancia contar con un procedimiento que permita la realización del análisis con mayor eficiencia y rapidez, para acelerar la investigación en curso.

OBJETIVOS

- Describir el método de recolección y embalaje de las muestras de sangre de las escenas del crimen.
- Describir las técnicas presuntivas y confirmativas para la identificación de manchas de sangre en la escena del crimen.
- Establecer las técnicas presuntivas y confirmativas que presenten mejor desempeño de acuerdo a lo señalado en la literatura.
- Establecer las técnicas para la identificación de la especie de una mancha de sangre relacionada en un hecho presuntamente delictivo.
- Establecer el método sugerido a utilizar desde la búsqueda de indicios hemáticos hasta su identificación de especie.
- Proporcionar una fuente de información útil y confiable para ser usada en los procedimientos de investigación criminalística.

METODOLOGÍA

Mediante la visita a bibliotecas de universidades, hospitales e institutos, se realizó la consulta bibliográfica del fundamento de las técnicas de identificación de sangre y especie, así como su recolección y embalaje. Simultáneamente se seleccionó la información más relevante de acuerdo a los requerimientos de cada técnica, tomando en cuenta importancia e innovación en las ciencias forenses. Finalmente se propuso el método sugerido a utilizar en la identificación de una mancha de sangre, redactando de manera detallada y clara los procedimientos y aplicaciones de esta investigación, enriqueciendo la información con los cuadros, imágenes y/o gráficas que ameritó cada tema abordado, estructurando de manera ordenada y coherente la información logrando realizar un trabajo descriptivo sobre el tema en cuestión de acuerdo a las correcciones sugeridas.



RESULTADOS

1 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA SANGRE

La sangre se compone de un líquido denominado plasma y elementos celulares, entre los cuales se encuentran leucocitos, plaquetas y eritrocitos. Un adulto normal tiene alrededor de seis litros de este líquido vital, el cual representa de 7 a 8% del peso corporal total. El plasma constituye casi 55% del volumen sanguíneo, mientras que 45% está compuesto de eritrocitos y 1 % se forma de leucocitos y trombocitos. Con frecuencia, las variaciones en estos elementos sanguíneos son el primer signo de enfermedad que se presenta en tejidos corporales. Los cambios en el tejido enfermo logran detectarse de manera frecuente mediante análisis de laboratorio que identifican las alteraciones sobre la base de valores normales en los diversos constituyentes de la sangre.

El componente más importante del plasma es el agua, la cual contiene iones disueltos, proteínas, carbohidratos, grasas, hormonas, vitaminas y enzimas. Los principales iones necesarios para una función celular normal incluyen calcio, sodio, potasio, cloro, magnesio e hidrógeno. La proteína principal que constituye al plasma es la albúmina, la cual es el componente más importante para mantener la presión osmótica; la albúmina actúa también como una molécula transportadora, llevando compuestos como bilirrubina y heme; otras proteínas sanguíneas transportan vitaminas, minerales y lípidos. Las inmunoglobulinas y el complemento son proteínas sanguíneas especializadas que participan en la respuesta inmunitaria. Las proteínas de la coagulación, encargadas de mantener una hemostasia normal, circulan en la sangre como enzimas activas hasta que se les requiere para el proceso de coagulación. Un desequilibrio en los elementos disueltos en el plasma puede ser causa de alguna enfermedad en otros tejidos corporales.

El plasma sanguíneo también interviene como un medio de transporte para los nutrientes celulares y metabolitos; por ejemplo, las hormonas elaboradas en un tejido son transportadas por la sangre hacia los tejidos blanco en otras partes del cuerpo; la bilirrubina (el principal residuo catabólico de la hemoglobina) es transportada por la albúmina desde el bazo hasta el hígado para su excreción; el nitrógeno ureico sanguíneo es conducido hacia el riñón para ser filtrado y excretado. El aumento en la concentración de estos catabolitos normales, puede indicar metabolismo celular aumentado o un defecto en órgano responsable de su excreción.

Cuando las células corporales mueren, liberan sus componentes celulares hacia el tejido circundante; finalmente, algunos de estos elementos llegan a la sangre; muchos son específicos para la función particular de la célula; por tanto, una concentración aumentada de ellos, en especial las enzimas, puede indicar destrucción celular anormal en algún órgano específico.

Cada uno de los tres elementos celulares de la sangre tiene funciones específicas. Los eritrocitos contienen una proteína vital, la hemoglobina, que se encarga del transporte de oxígeno y bióxido de carbono entre los pulmones y los tejidos corporales. Los leucocitos defienden al organismo contra antígenos extraños como bacterias y virus. Las plaquetas son necesarias para mantener la hemostasia. Las células sanguíneas circulan a través de los vasos sanguíneos distribuidos en todos los tejidos corporales. Los eritrocitos y las plaquetas desarrollan sus funciones sin abandonar los vasos; pero los leucocitos, mediante diapédesis (pasan a través de las paredes de los vasos) llegan a tejidos donde protegen contra antígenos invasores^{9, 10, 11}.

2 MANCHAS DE SANGRE EN LA ESCENA DE HECHOS

Desde hace mucho tiempo se han estudiado los caracteres físicos y las reacciones químicas que proporcionan las diversas clases de manchas, con el fin de lograr su identificación y poner a los peritos en condiciones de satisfacer las preguntas que los jueces les hagan sobre el particular. Por lo tanto, las manchas en general deben describirse lo más completo y claro que sea posible, señalando situación, tamaño, aspecto, número, etc., de cada una de estas manchas. Como las manchas son modificadas por las condiciones ambientales, es importante, estudiarlas lo más rápido posible o cuando menos protegerlas para su posterior examen. Algunas veces las manchas son demasiado antiguas; en este caso es necesario agudizar el ingenio para su identificación. Entre las manchas que más interesan al perito, se encuentran las de sangre, semen, meconio, unto sebáceo, calostro, leche, líquido amniótico, orina y materias fecales.

En química forense se estudian muestras problema de sangre, procedente del escenario del hecho, de los instrumentos del delito de la víctima o del victimario. Es muy frecuente que las ropas, objetos e instrumentos asociados al suceso se contaminen en las maniobras que se realizan para lesionar, consumir muertes violentas, etc. Por ello, el examen de los indicios originados por la sangre debe ser realizado de la mejor manera posible. Si se cuenta con muestras testigo o de confronta, se deciden los resultados en una investigación^{12, 13, 14, 15}.

2.1 PRODUCCIÓN DE LAS MANCHAS

Cuando una arteria ha sido cortada, la sangre salpica a cierta distancia de la herida, lo que no sucede con la hemorragia venosa que a pesar de ser abundante en cantidad, escurre sin una fuerza que la proyecte. Sin embargo, son comunes las manchas de sangre en el lugar de los hechos, de cualquier lesión causada por laceraciones o heridas por instrumento cortante, sin que se deba a una presión propia, sino que cae o es aventada por algún movimiento activo. Por ejemplo, si una cabeza es atacada en forma salvaje con un instrumento punzante o filoso, no es el primer golpe el que provoca la dispersión de sangre, ya que hay un pequeño retraso antes de que aparezca en abundancia; los vasos casi siempre se colapsan durante uno o dos segundos después del impacto. Sin embargo, con el segundo golpe o subsecuentes, la misma arma ocasiona que fluya sangre de la primera herida y, conforme se aleja de la cabeza, tire las gotas a veces a gran distancia, lo que depende de la velocidad del movimiento. Una situación similar se presenta cuando el cuchillo corta repetidamente a través de la garganta u otra región; las gotas se desprenden del instrumento conforme este se desplaza.

Cuando una herida se localiza en una extremidad como la mano o el brazo, la hemorragia es profusa al moverlo con rapidez, como al estar peleando o gesticulando y también puede

regar gotas. Sucede en forma similar, si la mano de la víctima o el asaltante entran en contacto con la herida sangrante, o incluso en una epistaxis, la sangre es arrojada por los dedos cuando el brazo se mueve en forma vigorosa. Otras manchas de sangre pueden causarse por la víctima al toser sangre, la cual pasa a la boca a partir de una hemorragia nasal, heridas torácicas o hematemesis.

Cuando la sangre es arrojada, la forma que adquiere al chocar sobre una superficie depende del ángulo de impacto. Si cae en ángulo recto adquiere características circulares, si el contacto es violento, los bordes serán alargados. Al hacerlo en forma oblicua, se forma una mancha ahusada con la punta adelgazada apuntando en dirección del trayecto. Además un glóbulo pequeño del líquido se separa y localiza en la parte terminal de la mancha, semejante a un signo de exclamación. Estos datos ayudan a determinar la dirección de origen de las salpicaduras en paredes, techos, suelo y otros objetos, con el fin de contribuir a la conclusión sobre la posición de la víctima cuando fue atacada.

Muchas veces las manchas no se deben a que la sangre haya viajado libremente por el aire, sino al contacto directo con la piel ensangrentada, cabello, ropa, manos o armas. Las embarraduras pueden indicar un movimiento deslizante, pero hay veces en que se observa una imagen fiel como sucede en la ropa, la cual es útil para indicar la forma del arma⁹.

Por tanto, las manchas de sangre deben buscarse sobre el cuerpo de la víctima, en el presunto victimario, en instrumentos, suelo, paredes, en las uniones de los mosaicos; en los muebles, en la parte inferior de superficies y en los cajones. En armas blancas debe investigarse la presencia de sangre en la unión de la hoja con el mango. En las personas, debe buscarse en el pelo, debajo del borde de las uñas y en los surcos periungueales. En la ropa; en los forros y en los bolsillos, y en los zapatos en el reborde del cuero del montaje de la suela. La forma y tonalidad de las manchas de sangre dependen del soporte en el que se encuentran.

De acuerdo con la forma, las manchas de sangre se pueden distinguir de la siguiente manera (figura 2):

- a) Manchas por proyección (gotas, salpicaduras).
- b) Manchas por escurrimiento (charcos, regueros, rebabas).
- c) Manchas por contacto (impresiones de pies o manos, etcétera).
- d) Manchas por impregnación (absorción en tejidos textiles).
- e) Manchas por limpieza (en una toalla, causa de limpiar un arma blanca)^{16, 17, 18}.

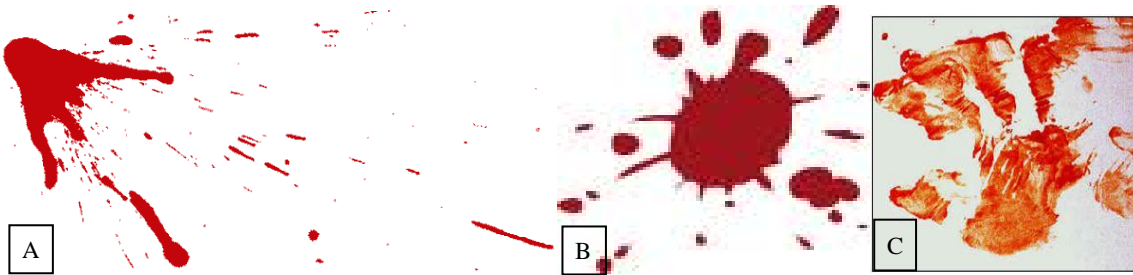


Fig. 2. Ejemplos de manchas de sangre. A) y B) Proyección; C) Contacto

Las manchas de sangre recientes son obvias, pero cuando se secan o son añejas, pueden parecerse a otros pigmentos, en los cuerpos putrefactos se observan grises o negras⁶. En lo que concierne a su edad, las manchas de sangre recientes son rojas; luego parduzcas y finalmente negruzcas, aunque estas características pueden verse afectadas en múltiples circunstancias.

Si bien puede que la identificación visual de una mancha como la sangre sería suficiente para justificar un nuevo análisis de la materia, el enfoque científico apropiado y los requisitos legales establecen que dicha identificación se establezca con certeza científica antes de que pueda ser presentado en la corte. Además, un enfoque científico dicta el uso de un protocolo de rutina que incorpora una serie lógica de los procedimientos de prueba para servir de base para la identificación de una mancha de sangre. El uso de un protocolo se destina para evitar la eliminación accidental de un paso en el proceso y asegurar un trato similar a todos los elementos de prueba que se trate. Un punto importante a señalar es que la variación en la evidencia en cuanto al tipo, condición y de cantidad requiere la flexibilidad de su aplicación. Por lo tanto, es posible que uno o más pasos puedan ser eliminados sobre la base de una cuidadosa estrategia de examen con base científica como fundamento. Tal medida sería documentada cuidadosamente acerca de qué y por qué se hicieron cambios. El uso de dicho protocolo, o una variación de la misma, se puede aplicar a cualquiera de los fluidos corporales hallados con mayor frecuencia en la serología forense.

Un ejemplo de protocolo puede ser el que se muestra a continuación:

- Examen visual cuidadoso del objeto de evidencia para localizar cualquier mancha visible o material característico de la sangre.
- Aplicación de una prueba de detección presuntiva adecuada.
- Aplicación de una prueba específica y sensible para confirmar la presencia de sangre.

- Determinación de origen biológico o especie.
- Caracterización de la sangre, utilizando uno o más marcadores genéticos o de ADN.

La identificación de sangre usando el método anterior a menudo emplea una prueba química de detección presuntiva o de orientación que tiende a ser seguida por una prueba de confirmación para establecer claramente la identificación. La observación visual de la mancha sin analizar, junto con la prueba química presuntiva y confirmatoria positivas, proporciona datos para apoyar la identificación de la sangre¹⁹. Algunas de las pruebas más comunes usadas se mencionan en los siguientes capítulos.

3 RECOLECCIÓN Y EMBALAJE DE MANCHAS DE SANGRE

3.1 RECOLECCIÓN

Todo trabajo realizado durante la inspección ocular quedaría sin validez si no se completa con la recolección y transporte a los laboratorios de manchas, sustancias, huellas, objetos y efectos, como elementos de valor indiscutible en una investigación, y por medio del informe pericial presentarlo ante los tribunales y jueces como indicios o en su caso, como evidencia.

La heterogeneidad y multiplicidad de sustancias susceptibles de interesar a la investigación, hace que el procedimiento de su recolección sea distinto en función de la naturaleza de la muestra. Cada mancha, sustancia, rastro o huella, requiere una técnica específica y concreta, variando el procedimiento de recolección en virtud del objeto de que se trate y la superficie donde asienta. El perito tiene en este punto oportunidad de poner a prueba su sagacidad, experiencia y creatividad²⁰.

En el caso de las manchas sospechosas de sangre, una vez que se ha marcado la posición en la que se encontró una mancha sospechosa, el método para la recolección de la misma dependerá de la matriz o soporte sobre la que se encuentre, es decir, dependiendo de la naturaleza del indicio, la recolección se realizará de la siguiente manera^{7, 12}.

1. En casos con sangre líquida, ésta se recolecta con jeringa, pipetas o tubos estériles en un volumen aproximado de 5 mL como máximo o seguir una forma estratégica para levantar lo más que se pueda de acuerdo con el lago hemático. Conservar la muestra a temperatura de refrigeración (sobre geles congelados o hielo) y aislarla de la luz. No congelar.
2. Si la mancha está seca y en una superficie dura como un cuchillo, vidrio, etcétera, remover por raspado utilizando una navaja estéril u hoja de bisturí; si son varias, emplear una navaja nueva para cada mancha. Esta operación debe hacerse con el cuidado suficiente que evite el agregado de materiales del soporte (pintura, cemento, etcétera). Recibir el raspado directamente en un sobre de papel o bolsa de plástico.
3. Si la mancha está en una prenda de vestir u otro material similar, tirar de un hilo o cortar una pequeña pieza de la ropa que contenga la mancha y empaparla con unas

pocas gotas de solución salina. Objetos impregnados o manchados con sangre que pueden ser transportados son: prendas, zapatos, armas, piedras, envases de bebidas, artículos personales, etcétera.

4. Si las manchas se encuentran húmedas, dejar secar sin exponer directamente al sol, sobre una superficie limpia y asilada. Cuando se trate de ropa, se hace un dobléz de preferencia donde se encuentre la mancha con el propósito de protegerla. Embalar cada muestra por separado ya sea en bolsas de papel o plástico, etiquetadas con los datos ya indicados. Cuando son manchas sobre soportes que se puedan recortar, como cortinas, alfombras, etcétera, recortar la mancha y embalarla en bolsas de papel o plástico y etiquetar.
5. Si la mancha es visible y absorbida dentro de un objeto, frotar con un hisopo de algodón o papel filtro y humedecer con agua destilada. Una vez impregnado el soporte, dejar secar en un sitio limpio y aislado para evitar su contaminación, ya seco el soporte, guardar por separado en sobre de papel o bolsa de plástico, con los datos de embalaje y sellarlo. Cuando no sea posible secar el soporte, guardarlo en tubo estéril o recipiente con tapa y a temperatura de refrigeración. Enviar al laboratorio.
6. Si la mancha está mezclada con tierra o desechos remover primero por disolución de la mancha en solución salina y después concentrar por la técnica de elución:

Cortar una tira larga de papel Whatman No.1 de 1x25 cm. Sumergir un extremo en el material impregnado con la solución salina, y concentrar la solución por la acción capilar en el punto superior del papel. Luego, secar al aire el papel. Llevar a cabo la reacción de color rociando el papel con el reactivo adecuado.

7. Si la mancha no es visible puede revelarse rociando el área sospechosa con luminol. Remover y concentrar por la técnica del papel filtro:

Colocar la zona manchada sospechosa en un pedazo de esponja humedecida con agua, colocar una tira de papel filtro en la parte superior de la zona manchada. Colocar una placa de vidrio en el papel filtro sobre la mancha con un peso en ella para mantenerla firmemente en contacto con la tela y la esponja. Suspender el final de la tira un poco por encima de la horizontal. La sangre se transferirá hacia arriba y se concentrará al final del papel de filtro por capilaridad.

8. Si se trata de coágulos, levantar con aplicadores de plástico, madera o espátula estériles; utilizar uno para cada indicio y colocarlos en un tubo de ensaye, eppendorf o recipientes estériles. Etiquetar y preservar a temperatura de refrigeración sobre geles congelados o hielo^{20, 21, 22, 23}.

3.2 EMBALAJE

Algunas formas de embalaje ya fueron mencionadas, sin embargo la forma general de hacerlo es la siguiente:

Las muestras secas deben ser embaladas en papel o bolsas de plástico individualmente.

Si están húmedas o son líquidas o se trata de coágulos, deben enviarse acompañadas de geles congelados para mantenerlas en condiciones de refrigeración. Las muestras líquidas deben embalarse en recipientes de sello hermético tales como frascos o tubos de plástico, o de vidrio con tapón de goma (Tabla 1).

Todas las muestras contendrán los siguientes datos:

- Fecha de toma de la muestra.
- Hora de toma de la muestra.
- Lugar de la investigación.
- Ubicación criminalística de los indicios.
- Número de averiguación previa.
- Número de expediente.
- Nombre de quien realizó la recolección.

Una vez analizado el indicio, las prendas u objetos de donde se levanta la muestra biológica serán regresados al agente del Ministerio Público anexadas al dictamen y según sea el caso, se dirán por escrito a la autoridad el tipo, y las condiciones de almacenamiento que requiera.

Cuando se solicita apoyo sobre un estudio de genética a otro laboratorio, se deben adjuntar los dictámenes sobre los estudios presuntivos y confirmativos que indiquen la naturaleza de la muestra biológica²¹.

Tipo de muestra	Recolección	Embalaje
Sangre líquida en superficies firmes	<ul style="list-style-type: none"> • Recolectar con jeringa o pipetas 	Tubos o frascos en refrigeración
Sangre seca en superficies lisas y firmes	<ul style="list-style-type: none"> • Raspar con navaja u hoja de bisturí 	Sobre o bolsa de papel o plástico
Manchas secas en textiles	<ul style="list-style-type: none"> • Cortar fragmento 	Bolsas de papel o plástico
	<ul style="list-style-type: none"> • Humedecer un fragmento en agua destilada o solución salina 	Tubos o frascos en refrigeración
Manchas frescas en textiles	<ul style="list-style-type: none"> • Dejar secar al sol 	Bolsas de papel o plástico o proceder como con manchas secas en textiles
Sangre mezclada con tierra, basura, etc.	<ul style="list-style-type: none"> • Remover por disolución con solución salina y concentrar por la técnica de elución 	Tubos o frascos en refrigeración
Coágulos	<ul style="list-style-type: none"> • Recolectar con aplicadores de plástico, madera o espátula 	Tubos o frascos en refrigeración

Tabla 1. Recolección y embalaje de diferentes muestras de sangre.

4 IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE MANCHAS DE SANGRE

La identificación de sangre es el primer y más importante paso en la examinación de una mancha sospechosa. Su detección, especialmente en cantidades pequeñas, es tarea de los científicos forenses, pero cuando las facilidades escasean o no se cuenta con ellas, tranquilamente se pueden aplicar las pruebas presuntivas simples.

Existe abundante literatura sobre la identificación de manchas de sangre. En general, los métodos se basan en la presencia de células sanguíneas o compuestos que son característicos de la sangre como los eritrocitos y leucocitos, proteínas séricas y hemoglobina y sus derivados, clasificándose en pruebas presuntivas y pruebas confirmativas. Las pruebas químicas presuntivas a pesar de ser abundantes no son específicas y pueden dar resultados falsos positivos con gran variedad de sustancias como fruta y jugos de verduras, pus, orina y otras, incluyendo compuestos de hierro^{21, 22}.

4.1 MÉTODOS MICROSCÓPICOS

Un gran número de técnicas han sido reportadas para el examen de eritrocitos y leucocitos en manchas de sangre. El resultado obtenido con esos métodos se ve afectado por las condiciones de las mismas. El envejecimiento, los factores ambientales o el calentamiento pueden alterar considerablemente las células sanguíneas, haciendo difícil la producción de resultados interpretables y confiables. El examen microscópico de células encontradas en una mancha fresca puede no solo ayudar a la identificación de una mancha en particular como la sangre, pues puede también revelar otra información importante. Por ejemplo, eritrocitos nucleados pueden indicar la presencia de sangre de animales vertebrados; cuerpos de cromatina encontrados en leucocitos pueden ser usados para determinar el origen sexual de una muestra; eritrocitos en forma de hoz pueden indicar que la muestra de sangre posiblemente se origina de una persona con enfermedad de células falciformes.

Muchas técnicas han sido propuestas para el examen de manchas de sangre. En general, el procedimiento implica dos pasos: (1) reconstrucción de las células sanguíneas con una solución, en un esfuerzo para recuperar su forma original; y (2) tinción diferencial de la sangre con tinciones histológicas. Se puede proceder como sigue:

- 1) Poner un fragmento de sangre fresca en un portaobjetos limpio.
- 2) Adicionar una gota de la siguiente solución y mezclar suavemente hasta que la sangre esté disuelta

Albumina	20%
Glicerol	20%
NaCl	0.85%
Agua destilada	

- 3) Colocar el portaobjetos en una cámara húmeda por dos horas a temperatura ambiente.
- 4) Preparar un frotis delgado de la mezcla.
- 5) Secar al aire rápidamente.
- 6) Sin previa fijación, adicionar dos gotas de la solución de tinción de Wright y esperar dos minutos.
- 7) Adicionar dos gotas de solución buffer en el portaobjetos.

Composición del buffer (pH 6.4)

KH_2PO_4	0.66 g.
Na_2HPO_4	0.25 g.
Agua destilada	100 mL.

- 8) Mezclar el buffer con la solución de tinción y dejar por cuatro horas.
- 9) Lavar al chorro de agua suavemente
- 10) Dejar secar el portaobjetos por evaporación
- 11) Realizar el examen microscópico

La identificación de manchas de sangre por medio de métodos químicos se basa en la detección de hemoglobina y sus derivados. Estas pruebas pueden ser clasificadas bajo cualquiera de estos dos rubros: pruebas catalíticas y pruebas de cristales, siendo estas últimas abordadas en el capítulo siguiente²².

4.2 PRUEBAS CATALÍTICAS

Todas las pruebas catalíticas para la sangre dependen de una reacción de oxidación en que un oxidante, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, oxida un compuesto incoloro como la fenolftaleína o bencidina a un compuesto colorido. Alternativamente, el luminol, un compuesto incoloro, puede ser oxidado a un producto con luminiscencia. Algunas de las pruebas químicas se muestran en la figura 3.

El grupo hemo de la hemoglobina tiene una actividad como la de la peroxidasa que puede catalizar el rompimiento del peróxido de hidrógeno. La mayoría de las pruebas que han sido ideadas para la identificación forense de sangre están basadas en la oxidación mediada por el peróxido de guayacol, aloína, bencidina, verde de leucomalaquita, fenolftaleína, o-toluidina, luminol, tetrametilbencidina, fluoresceína, hidrato de eosina, dimetilanilina, rodamina, aminopirina, alizarina, hidracina, HgI y KI. Muchos de estos solo tienen interés histórico en la actualidad.

Las pruebas más empleadas comúnmente son la bencidina, fenolftaleína, o-toluidina, verde de leucomalaquita, luminol y tetrametilbencidina. Todas estas pruebas son altamente sensibles a la hemoglobina y sus derivados, pero todas sufren de interferencias por otros materiales, como la catalasa, peroxidasa, citocromos, fuertes agentes oxidantes y sales metálicas.

El procedimiento para desarrollar estas pruebas es el siguiente:

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Solución de bencidina

La bencidina es carcinógena. Ésta debe ser empleada solo con las adecuadas precauciones de salud y seguridad. La sustitución por otra prueba presuntiva es altamente recomendada. Si hay sangre se produce un color verde y luego una coloración azul de Prusia intenso y persistente.

Bencidina	0.3 g.
Etanol	100 mL.
Ácido acético glacial	0.3 g.

- Solución de fenolftaleína

La presencia de sangre se ve indicada por un color rojo. Esta reacción es muy sensible, se obtiene con manchas viejas y aun lavadas.

Solución stock

Fenolftaleína	2 g.
Hidróxido de potasio	20 g.
Agua destilada	100 mL.

La mezcla es sometida a reflujo con 20 g de polvo de zinc por dos horas hasta que la solución pierda color. La solución stock debe ser almacenada en

un frasco oscuro y refrigerada con un poco de zinc para mantenerla en la forma reducida

Solución de trabajo

Solución stock de fenolftaleína 20 mL.

Etanol 80 mL.

- o-toluidina

La o-toluidina es el 3,3´dimetil derivado de la bencidina. La reacción, similar a la de la bencidina, es conducida bajo condiciones ácidas y produce un color azul semejante a la de la bencidina. Al principio se propuso esta técnica como sustituto de la bencidina, sin embargo, el compuesto fue reportado en Holanda en 1974 como cancerígeno en ratas.

o-toluidina	1.6 g.
Etanol	40 mL.
Ácido acético glacial	30 mL.
Agua destilada	30 mL.

- Verde de leucomalaquita (LMG)

Referido en ocasiones como el reactivo de Mc Phail. La oxidación del LMG es catalizada por el grupo hemo para producir un color verde.

Perborato de sodio	3.2 g.
Verde de leucomalaquita	0.1 g.
Ácido acético glacial	66 mL.
Agua destilada	33 mL.

- Tetrametilbencidina (TMB)

Tetrametilbencidina	2 g.
Ácido acético glacial	100 mL.

- Luminol

El luminol es compuesto quimioluminiscente ampliamente estudiado. El cual es aplicado sobre objetos o áreas que contienen trazas de posibles manchas de sangre. Una luminiscencia blanquiazul o la producción de luz en el área observada en la oscuridad es un

resultado positivo. El luminol es la mejor opción para la detección de trazas de sangre que no son fácilmente observables en las escenas de crimen. La sensibilidad del luminol es de 1:5000000, y es efectiva con manchas de sangre viejas o degradadas. Los kits comerciales para la prueba del luminol son caros, sin embargo son empacados en viales para uso individual y la preparación del reactivo es más fácil^{22, 23, 24, 25, 26, 27, 28}.

3-aminofthalhidrazida	0.1 g.
Carbonado de sodio	0.5 g.
Perborato de sodio	0.7 g.
Agua destilada	100 mL.

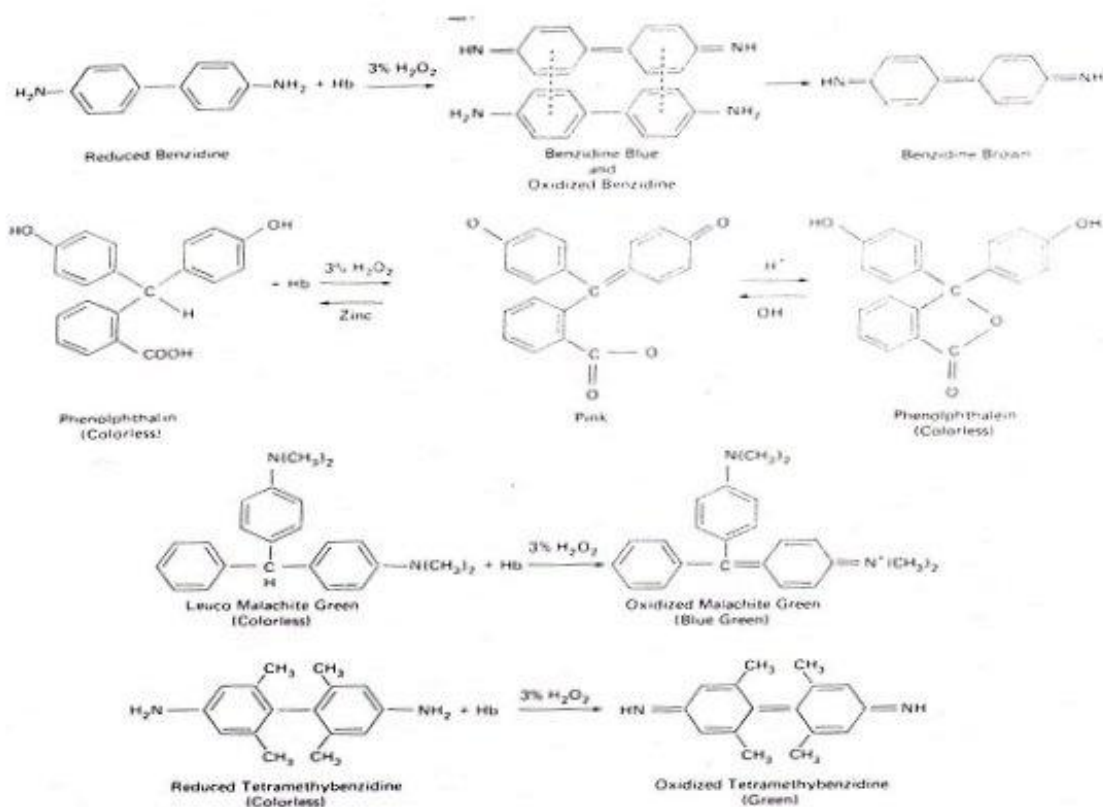


Figura 3. Reacciones químicas de las pruebas catalíticas de color.

PROCEDIMIENTO DE LAS PRUEBAS

Las pruebas pueden ser realizadas por uno de los siguientes métodos:

- 1) Si la mancha está en una superficie dura como un cuchillo, vidrio, etcétera, remover por raspado y disolver en unas pocas gotas de solución salina. Adicionar dos gotas del reactivo a dos gotas del extracto de la mancha. Dejar la mezcla por treinta segundos. Posteriormente adicionar dos gotas de peróxido de hidrógeno fresco al 3%. Un cambio de color indica una reacción positiva.
- 2) Si la mancha está en una prenda de vestir u otro material similar, tirar de un hilo o cortar una pequeña pieza de la ropa que contenga la mancha y empaparla con unas pocas gotas de solución salina. Adicionar dos gotas del reactivo a dos gotas del extracto de la mancha. Dejar la mezcla por treinta segundos a temperatura ambiente. Después adicionar dos gotas de peróxido de hidrógeno fresco al 3%. Un cambio de color indica una reacción positiva.
- 3) Si la mancha es visible y absorbida dentro de un objeto, frotar con un hisopo de algodón o papel filtro y humedecer con agua destilada. Adicionar dos gotas del reactivo al hisopo o el papel filtro. Aplicar la misma cantidad de peróxido de hidrógeno después de treinta segundos. Un cambio de color indica una reacción positiva.
- 4) Si la mancha no es visible puede revelarse rociando el área sospechosa con luminol, presentando luminiscencia al oscurecer el área.
- 5) Si la muestra está en una solución muy diluida se puede concentrar por liofilización o por el uso de la técnica de concentración en papel filtro descrita previamente.
- 6) Si la mancha es vieja o está desnaturalizada disolver en una solución de hidróxido de potasio 2N y después neutralizar con ácido clorhídrico 2N previo al análisis.

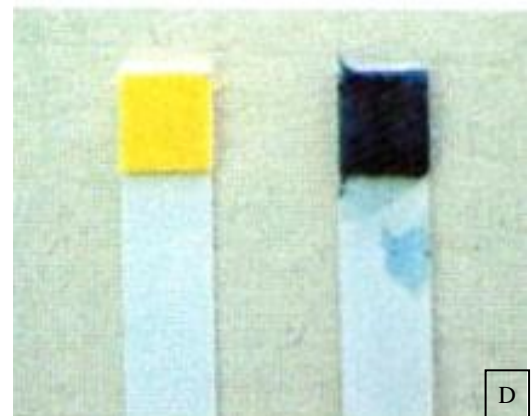


Figura 4. Reacciones de color. A Reacción negativa y positiva de fenolftaleína; B reacción positiva de o-toluidina; C Reacción negativa y positiva de leucomalaquita; D Reacción negativa y positiva de tetrametil bencidina contenida en un kit comercial.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Las pruebas catalíticas de color son muy sensibles, pero no específicas. El resultado positivo por sí solo no debe interpretarse como evidencia de sangre. Sin embargo, un resultado negativo es prueba de ausencia de cantidades cuantificables del grupo hemo o sus derivados. Cuando se obtiene un resultado positivo, es necesario considerar cuidadosamente si podría haber sido dado por algo que no sea el grupo hemo de la sangre. La especificidad de reactivos catalíticos ha sido estudiada ampliamente. Un resultado falso-positivo puede ser definido como cualquier reacción positiva dada por cualquier otra sustancia que una mancha de sangre. Estas sustancias pueden dividirse en tres grupos:

- 1) Oxidantes y catalizadores químicos. Cobre y níquel son los químicos que más frecuentemente muestran resultados falsos positivos. Otros son óxido, formalina, permanganato de potasio, dicromato de potasio, algunos blanqueadores, hipoclorito, yodo y óxidos de plomo. Fenolftaleína da resultados positivos con la oxidación de compuestos como cobre, ferrocianuro de potasio y nitratos de níquel y cobalto, y algunos sulfocianatos. El luminol reacciona con el ion cúprico y algunos compuestos de cobre, cobalto y hierro. El permanganato de potasio y el hipoclorito de sodio hidratado también dan resultados positivos para el luminol. Algunas de estas sustancias pueden estar presentes en paredes pintadas, porcelana y metal, con los cuales se ha observado que el luminol da reacciones positivas.
- 2) Plantas. Peroxidasas vegetales es la clase más importante de sustancias que muestran falsos positivos con pruebas químicas de color. Los siguientes tejidos de las plantas pueden reaccionar con la bencidina o fenolftaleína y ser equivocado para sangre: manzana, albaricoque, frijol, zarzamora, alcachofa, rábano picante, papa, nabo, col, cebolla y raíz de diente de león. Material vegetal tal como el rábano, remolacha, ajo, col, tomate y pepino reaccionan positivamente con tetrametil bencidina.
- 3) Origen animal. Las siguientes sustancias de origen animal pueden dar falsos positivos con la bencidina: pus, médula ósea, leucocitos, tejido cerebral, fluido espinal, intestinal, pulmonar, saliva y moco.

Los falsos positivos ocasionados por otro material que no es sangre pueden ser eliminados por los siguientes métodos:

- 1) Oxidantes y catalizadores químicos.

El comportamiento de los oxidantes químicos es muy diferente al de la sangre.

Los oxidantes químicos pueden sufrir una decoloración antes de la adición del peróxido de hidrógeno o perborato de sodio. Por lo tanto, un resultado falso positivo puede ser distinguido por el uso del procedimiento de solución de dos pruebas.

- A. Adicionar dos gotas de los reactivos a dos gotas del extracto de las muestras
- B. Dejar la mezcla a temperatura ambiente por treinta segundos.
- C. Si la decoloración ha ocurrido, es posible que los oxidantes químicos estén presentes en el extracto.
- D. Si el color no se desarrolla, adicionar dos gotas de peróxido de hidrógeno al 3% a la mezcla.
- E. Un cambio de color indica la presencia de sangre u otras peroxidasas

2) Peroxidasas de plantas

El grupo hemo es estable a altas temperaturas, mientras que las peroxidasas de las plantas son rápidamente desactivadas. Por lo tanto, calentar la muestra de la macha o el extracto a 100°C por cinco minutos diferenciará las peroxidasas de las plantas de las de origen sanguíneo. También se ha encontrado que bajo condiciones electroforéticas usando un sistema de buffer barbital sódico: ácido barbitúrico: lactato de calcio (0.5 g : 3.5 g : 0.5 g en 1000mL) algunas porciones de una mancha de sangre se mueven hacia el ánodo, mientras que las partes principales de la hemoglobina se mantiene en el origen. Por otro lado, la mayoría de las peroxidasas de las plantas (excepto el tomate) se mueven hacia el cátodo.

3) Otras sustancias de origen animal

La observación microscópica del espécimen distinguirá el tejido, pus y otras sustancias de origen animal de la sangre.

COMPARANDO LAS PRUEBAS

Una razonable búsqueda en la literatura muestra que existe más de un método de preparación para cada uno de los reactivos de las pruebas presuntivas mencionadas previamente. De igual forma, diversos protocolos para su aplicación pueden encontrarse. En consecuencia, diferentes sensibilidades y especificidades son reportadas basadas en diferentes diseños experimentales de varios autores. Como una forma de proporcionar una idea de la variación de éstas pruebas al compararlas cualitativamente, el resultado de varios autores han sido revisados y presentados en la siguiente tabla²².

Autor	Pruebas examinadas	Más sensible	Más específica	Más adecuado en general
Hunt et. Al (1960)	Bencidina, o-toluidina, LMG, fenolftaleína, Luminol	No declarado	No declarado	Bencidina u o-toluidina
Kirk (1963)	Bencidina, LMG, fenolftaleína, Luminol	Luminol	Fenolftaleína	No declarado
Higaki and Philip (1976)	Bencidina, fenolftaleína	Bencidina	Fenolftaleína	Fenolftaleína
Garner et al. (1976)	Bencidina, TMB	Igual	Igual	TMB
Cox (1991)	o-toluidina, LMG, fenolftaleína, TMB	o-toluidina y TMB	Fenolftaleína y LMG	Fenolftaleína

Tabla 2. Comparación de la sensibilidad y la especificidad de reactivos de pruebas presuntivas¹⁹.

4.3 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Este método está basado en la identificación de hemoglobina y sus derivados a través de su espectro de absorción específica. El espectro de absorción de la hemoglobina fue primeramente sugerido por Hoppe en 1862 como un medio para la identificación de sangre. Este método es generalmente considerado un método confirmativo para la identificación de manchas de sangre, sin embargo, los compuestos de la porfirina y sus derivados de fuentes animales o vegetales pueden compartir características espectrales con la hemoglobina, hematina o hemocromógeno. Por lo tanto, la identificación de manchas de sangre nunca debe ser inferida únicamente con un simple espectro de absorción. La determinación del espectro de absorción UV cercano y visible permite suficiente fiabilidad y sensibilidad para la identificación de hemoglobina y sus derivados como la metahemoglobina, oxihemoglobina, carboxihemoglobina y sulfahemoglobina.

En las regiones de ultravioleta cercano y visibles del espectro, un sistema complejo de absorción de bandas está presente gracias a la porción hemo de la molécula de hemoglobina. La región visible del espectro de los derivados del grupo hemo difiere sustancialmente de los propios derivados de sus derivados, pero todos tienen en común una intensa banda de absorción a 400-425 nm. La oxihemoglobina muestra dos bandas a 538 nm y 575 nm, y puede presentar una difusa alrededor de los 610 nm. La carboxihemoglobina tiene picos de absorción a 330-340 nm, 538-540 nm y 568-572 nm. La sulfahemoglobina presenta picos de absorción a 400 nm y 617-623 nm. El hemocromógeno tiene una fuerte banda en la región de 550-560 nm.

Si la mancha de sangre es fresca, puede ser examinada espectrofotométricamente para oxihemoglobina por el siguiente procedimiento:

- 1) Extraer la mancha de sangre con 0.1 mL. de agua destilada a 4°C durante una noche.
- 2) Diluir 20 µL del extracto en 1 mL con una solución de amoniaco al 1%.
- 3) Transferir la mancha de sangre diluida a la cubeta (celda del espectrofotómetro) y leer el espectro de absorción con un espectrofotómetro UV-visible.

Si la densidad óptica (O.D.) está en el rango de 0.3-0.8, la solución es adecuada para más experimentos. Si la O.D. es menor de 0.3, se debe de utilizar una solución más concentrada. Por otra parte si la O.D. es mayor a 0.8, el extracto deberá diluirse más.

- 4) La adición de químicos al extracto de la mancha de sangre para cambiar el espectro de absorción también sirve como medio de identificación. La adición de una gota de hidróxido de sodio al 1% provoca que el espectro de absorción del hemocromógeno aparezca. Esta reacción también sirve para eliminar sustancias de origen animal o vegetal que dan espectros similares a la oxihemoglobina. Con manchas de sangre viejas, si se adiciona una base débil, la hematina alcalina se forma con una absorción máxima a 385 nm, 492 nm y 610-615 nm. Si un ácido débil se adiciona, la hematina ácida se produce con una absorción máxima a 530-635 nm. La prueba para la hematóporfirina puede ser realizada por adición de ácido sulfúrico fuerte o adición de ácido clorhídrico 0.1 N y ácido tioglicólico concentrado, que producirán hematóporfirina ácida (absorción máxima a 695 nm, 563-577 nm, y 404 nm). La adición de hidróxido de potasio fuerte resultará en la formación de hematóporfirina alcalina (absorción máxima a 616 nm y 539-541 nm)^{22, 23}.

5 PRUEBAS CONFIRMATIVAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SANGRE

5.1 PRUEBAS DE CRISTALES

Estas son varias pruebas de cristales que son consideradas por muchos autores como una prueba confirmativa de manchas de sangre. Todas las pruebas de cristales se basan en la formación de cristales derivados de la hemoglobina como la hemina, hematina y hemocromógeno.

- Prueba de la hematina (Teichmann)

En 1853, Teichmann reportó que por calentamiento suave de la sangre con ácido acético glacial en presencia de sales, se formaban cristales. El resultado positivo es gracias a la combinación de un halógeno con ferriprotoporfirina. Los cristales son rómbicos o prismáticos en forma con extremidades oblicuas, café oscuro en color y alrededor de 10 micrómetros de tamaño (figura 5).

Reactivo

Cloruro potásico	0.1 g
Bromuro potásico	0.1 g
Yoduro potásico	0.1 g
Ácido acético glacial	100 mL.

Procedimiento de la prueba

- 1) Colocar una pequeña cantidad del material cuestionado como sangre en un portaobjetos. Adicionar un cubreobjetos.
- 2) Dejar fluir una gota del reactivo bajo el cubreobjetos y hacer contacto con la corteza seca. Evitar introducir cualquier burbuja de aire.
- 3) Con una pequeña flama, calentar suavemente el portaobjetos hasta que las burbujas se comiencen a formar bajo el cubreobjetos.
- 4) La observación microscópica revelará la presencia de cristales de hematina.

Algunas interacciones pueden ser el sobrecalentamiento del portaobjetos y más específicamente de los óxidos. Además de cualquier sustancia o condición que cause a la hemoglobina o hematina a la formación de sus productos de descomposición, la hematoporfirina (hematina libre de hierro), interferirá con la formación de cristales. La edad de las manchas de sangre no afecta a la formación de cristales de hematina. Manchas mayores de veinte años han sido reportadas como positivas para la prueba de Teichmann.

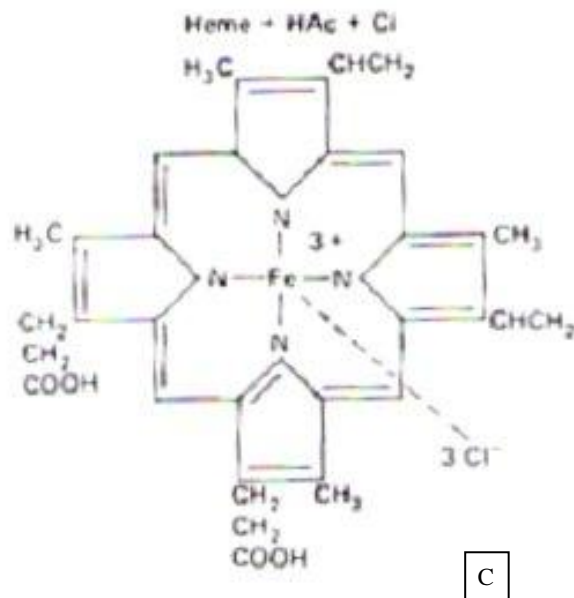
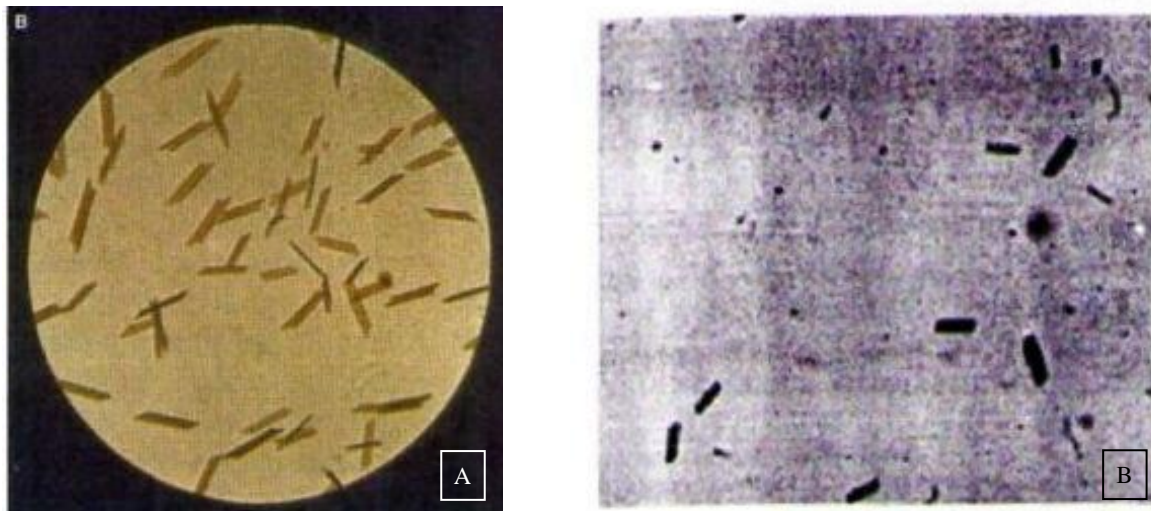


Figura 5. A y B cristales de Teichmann; C reacción de Teichmann

- Prueba de la Acetona cloro-hemina (Wagenaar)

En 1935 Wagenaar recomendó la preparación de cristales de acetona cloro-hemina

Reactivo

Acetona

HCl (10% v/v)

Procedimiento de la prueba

Unas cuantas gotas de acetona son adicionadas a la mancha de sangre seguidas de una gota de ácido clorhídrico diluido. Los cristales se forman a temperatura ambiente.

- Prueba del hemocromógeno (Takayama)

El hemocromógeno es el compuesto de la ferroprotoporfirina en que las valencias residuales del complejo hemo hexacoordinado son ocupadas por bases nitrogenadas como la piridina, nicotina, metilamina, histidina, o glicina. Los cristales de hemocromógeno pueden ser preparados a pH ácido o alcalino por varios procedimientos. El más común está basado en el método sugerido por Takayama en 1912 (Figura 6).

Reactivo

Hidróxido de sodio (10% v/v) 5 mL.

Piridina 5 mL.

Glucosa (100g/100 mL.) 5 mL.

Agua destilada 5 mL.

Procedimiento de la prueba

- 1) Colocar una pequeña porción de la mancha sospechosa (hilo, raspado, corte, extracto, etc.) en un portaobjetos y colocarle un cubreobjetos
- 2) Dejar fluir bajo el cubreobjetos dos gotas del reactivo de Takayama.
- 3) Calentar el portaobjetos a flama baja.

- 4) Dos formas de cristales rosas se forman en unos cuantos minutos y pueden ser observados microscópicamente.

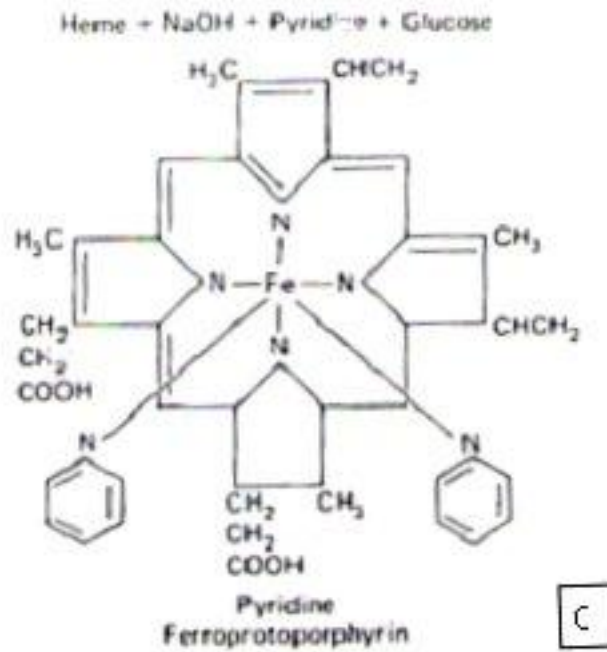
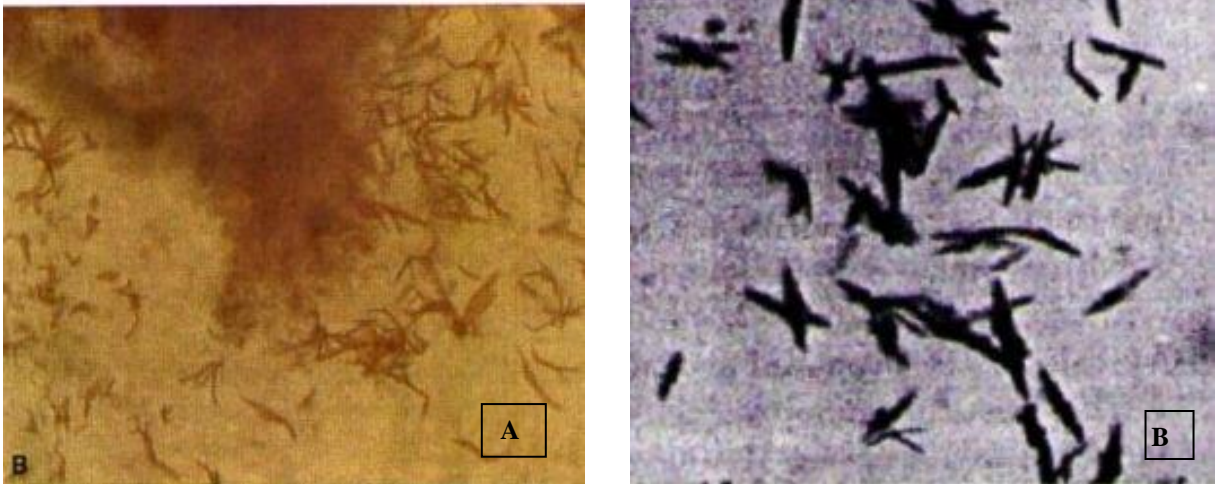


Figura 6. A y B cristales de Takayama; C reacción de Takayama

INTERPRETACIÓN

La sensibilidad y especificidad de la prueba de Takayama es esencialmente la misma que la de Teichmann. La prueba es positiva con un poco de sangre, como 0.001 mL o 0.1 mg de hemoglobina. La prueba de Takayama es superior a la de Teichmann, ya que a menudo puede dar resultados con sangre removida de madera o superficies de piel. Los inconvenientes de la prueba de Takayama sin embargo, son que una completa cristalización es difícil de obtener con muestras viejas de sangre y puede haber formación de diferentes tipos de cristales. El fallo para obtener un resultado positivo en la prueba de Takayama no necesariamente indica la ausencia de sangre.

5.2 MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS

Inicialmente, se usó papel de electroforesis en conjunto con bencidina rociada para la identificación de sangre. Posteriormente se reportó que la sangre podía ser identificada por su patrón en forma de gota después de su electroforesis en gel de agar. La técnica de electroforesis en acetato de celulosa ha sido utilizada para estudios clínicos de hemoglobinas y proteínas séricas. Estos métodos constituyen técnicas confiables para la identificación de manchas de sangre.

Dos enfoques electroforéticos se recomiendan para la identificación de manchas de sangre:
(1) separación e identificación de hemoglobina por electroforesis con acetato de celulosa y
(2) separación e identificación de proteínas séricas por inmunoelectroforesis.

- Electroforesis en acetato de celulosa

Las hemoglobinas son proteínas conjugadas. Con la selección de un buffer de pH adecuado o una molécula cargada positiva o negativamente puede ser inducida. La hemoglobina cargada después se mueve por electroforesis a través de un medio de soporte (láminas o geles de acetato de celulosa) hacia el electrodo con carga contraria. Muchas sustancias que dan falsos positivos con pruebas químicas para sangre no poseen carga o bien, tienen carga diferente a la hemoglobina. Posterior a la separación electroforética, las fracciones de hemoglobina son visualizadas por tinción con solución de verde de malaquita o cualquier otro reactivo de prueba catalítica colorida.

El procedimiento para la electroforesis en acetato de celulosa es el siguiente:

- 1) Equipo: cualquier cámara de micro electroforesis y fuente de alimentación.
- 2) Buffer:

Tris (tris-hidroximetilaminometano)	10.2g
Ácido bórico	3.2g
EDTA	0.6g

Llevarlo a 1L con agua destilada, ajustar el pH a 8.4.
- 3) Remojar la membrana de acetato de celulosa alrededor de 10 min. Llenar la cámara de electroforesis con buffer.
- 4) Remover la membrana de acetato de celulosa del buffer y secar suavemente con una almohadilla absorbente.
- 5) Aplicar el extracto de la mancha de sangre y los controles en la posición del cátodo.
- 6) Realizar la electroforesis por 20 minutos a 350 v.
- 7) Después teñir la membrana por aspersion de la solución de verde de malaquita y rociar con peróxido de hidrógeno al 3%.

Este método es usado no sólo para la identificación de manchas de sangre, pues también provee información del origen racial de las manchas de sangre por identificación de las variantes de hemoglobina (como la S y C)

- Inmunolectroforesis

La inmunolectroforesis se refiere a la combinación de las técnicas de inmunodifusión y electroforesis para el análisis de sangre y fluidos biológicos, en este procedimiento el extracto de manchas de sangre es colocado en pozos en agar o en un cubreobjetos y después sometido a electroforesis con aplicación de una corriente eléctrica. Un extracto de mancha de sangre contiene hemoglobina y proteínas séricas. Bajo esas condiciones, los componentes individuales de la proteína migrarán a través del agar a varios rangos. Después de la electroforesis, se coloca suero antihumano en un canal de corrimiento de la longitud del portaobjetos y paralelo a la ruta de migración. Las proteínas separadas y los anticuerpos humanos difunden unos hacia otros permitiendo la homologación de proteínas séricas humanas para someterse a una reacción antígeno-anticuerpo formando líneas de precipitado en los puntos de confluencia. La hemoglobina permanece cerca del punto de origen y da un anillo rosado alrededor de la muestra. Estas líneas de precipitado blanco y anillos de hemoglobina rosados son indicadores positivos de sangre. No hay otras sustancias además de la sangre que den este patrón de combinación. Otra ventaja de este

método es que el origen de las especies de las manchas de sangre se puede determinar al mismo tiempo.

El procedimiento para la inmunoelectroforesis es el siguiente:

- 1) Disolver 2 g de agar puro en 175 mL de agua destilada con 25 mL del buffer siguiente (pH 8.2):

Barbital sódico	10.31 g
Acido barbitúrico	1.84 g
Acetato de Sodio	6.8 g
Agua Destilada	100 mL.

- 2) Calentar la solución por quince minutos en un baño de agua a 100°C
- 3) Aplicar 2 mL de solución de agar caliente con una pipeta a cada portaobjetos limpio.
- 4) Después de que el agar solidifique, realizarle perforaciones y cortar canales.
- 5) Cuidadosamente llenar los pozos con las muestras a ser analizadas y colocar los portaobjetos en el aparato de electroforesis. Conectar los portaobjetos a las cámaras de buffers por medio de cuatro piezas de papel filtro.
- 6) Llevar a cabo la electroforesis a 150 volts por 45 minutos.
- 7) Apagar el aparato al final del corrimiento, remover los portaobjetos y remover el agar de los canales.
- 8) Adicionar el apropiado suero precipitante anti-humano a los canales y colocar los portaobjetos en una cámara de hidratación
- 9) Incubar los portaobjetos por 24 horas a 4°C.
- 10) Después de la incubación, observar y registrar los patrones de precipitación.
- 11) Registrar los patrones inmunoelectroforéticos tomando fotos de las líneas de precipitación, teñidas o sin teñir.

Para teñir:

- A. Lavar las placas de agar con solución salina por dos días para remover la proteína no precipitada del agar.
- B. Colocar los portaobjetos en ácido acético al 2% por cinco minutos.
- C. Teñir con Amido-Black en metanol-acido acético glacial (9:1) por cinco minutos.
- D. Lavar con metanol-ácido acético glacial hasta que el fondo se aclare.

5.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

La cromatografía en papel, en columna y en capa fina ha sido sugerida para la identificación de sangre. El principio de estos métodos es similar a las técnicas espectroscópicas y electroforéticas, ya que implican la identificación de hemoglobina y sus derivados. La separación de hemoglobina puede ser realizada en materiales como la alúmina, carboximetilcelulosa, papel o sílica gel. La hemoglobina y sus derivados son localizados por irradiación con luz UV o por rociamiento con bencidina. Se considera que el papel cromatográfico es el método más específico, práctico y sensible para la identificación de sangre. El siguiente es el procedimiento sugerido basado en este argumento:

- 1) Aplicar el extracto de la mancha de sangre en papel filtro Whatman No. 1 (14x27 cm).
- 2) Llevar a cabo la cromatografía en dirección ascendente con un sistema de disolventes consistente en metanol : ácido acético : agua (90:3:7).
- 3) Realizar la cromatografía por 1 o 2 horas.
- 4) Después del corrimiento, secar el papel en un horno a 100°C para desactivar cualquier peroxidasa vegetal.
- 5) Examinar el cromatograma bajo luz UV para detectar materiales fluorescentes que no sea la hematina (la hematina da una fluorescencia roja).
- 6) Rociar el cromatograma con bencidina al 1% en solución alcohólica acidificada. Puntos azules que se desarrollan en esta etapa representan oxidantes químicos.
- 7) Rociar el cromatograma con peróxido de hidrógeno al 3 % para revelar los puntos de la hematina. El frente de referencia (RF) normal para la hematina es alrededor de 0.7^{22, 23, 27}.

Algunas de las técnicas mencionadas en los capítulos anteriores son enlistadas y comparadas en la siguiente tabla.

Prueba o nombre químico	Fundamento	Indicación del resultado	Sensibilidad	Nota
Bencidina	Actividad peroxidasa (catalítico)	Color azul-morado	1:100000	C, P
o-toluidina	Actividad peroxidasa (catalítico)	Color azul-morado	1:1000000	C, P
LMG	Actividad peroxidasa (catalítico)	Color verde	1:100000	P
Fenoltaleína	Actividad peroxidasa (catalítico)	Color rojo	1:10000000	Seguro y ampliamente usado, P
Tetra-metil bencidina	Actividad peroxidasa (catalítico)	Color azul-morado	Igual a la bencidina	SC, P
Luminol	Catalítica modificada	Luminiscencia azul en la oscuridad	1:5000000	Irritante, P
Takayama	Formación de cristales de hemo-porfirinpiridina	Cristales característicos	1:<1000	CN
Espectrofotométrico	Espectro visible	Espectro característico	Igual a Takayama	CN

Tabla 3. Algunos de las pruebas presuntivas y confirmativas más comúnmente utilizadas en un laboratorio forense. C: carcinógeno, P: prueba presuntiva, CN: prueba confirmativa, SC: sospecha de carcinógeno²⁴.

6 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE DE LA MANCHA DE SANGRE

Después de que una mancha ha sido identificada como sangre, es necesario para el serólogo forense determinar si es o no de origen humano, y si no es de origen humano, determinar a qué especie pertenece. La mayoría de los métodos de uso común para determinar el origen de la especie son inmunológicos.

Si un animal es inyectado con una molécula proteica de otra especie, éste reconocerá esta proteína como una sustancia extraña (antígeno) y producirá un antisuero (anticuerpo) que reaccionará con cada proteína tanto *in vivo* como *in vitro*. La reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) *in vitro* es detectada por la formación de un complejo Ag-Ac. Este complejo puede ser demostrado. La prueba de precipitación inmunológica para la determinación médico-legal en manchas de sangre fue empleada por primera vez en 1901.

La reacción *in vitro* antígeno-anticuerpo es detectada por la formación de un complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). Este complejo Ag-Ac puede ser demostrado por diferentes formas como se muestra en la figura 7.

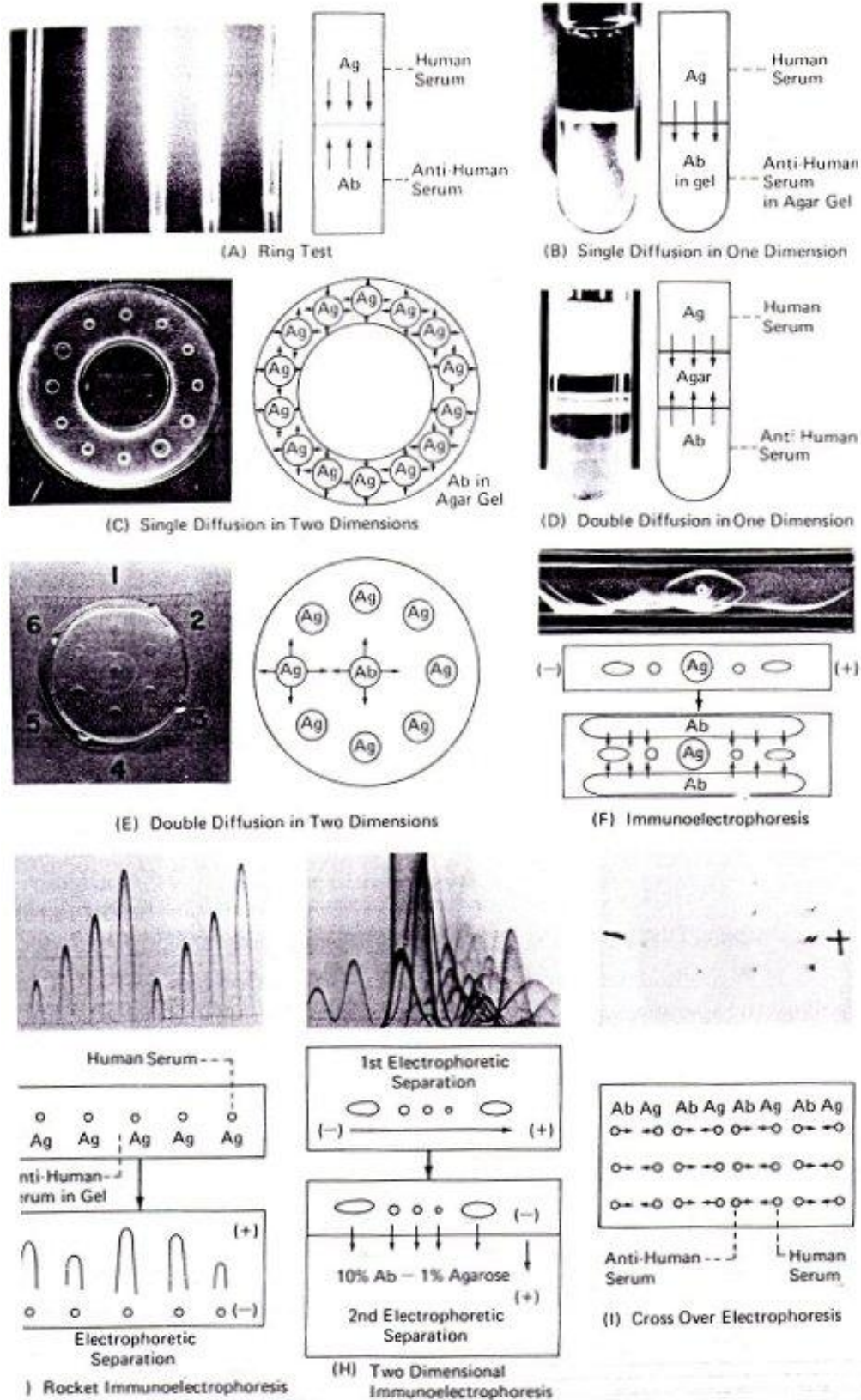


Figura 7. Métodos para la demostración de reacciones de precipitación

6.1 PRUEBAS PARA EL ORIGEN DE LAS ESPECIES

- Ring test (prueba del anillo)

La prueba del anillo o interfase es una simple pero sensible forma de la reacción de precipitación. Pequeños tubos o tubos capilares son utilizados para conservar antisuero; la solución del antígeno es cuidadosamente colocada sobre el antisuero sin mezclar. La formación de un anillo visible de precipitación en la interfase entre el anticuerpo y el antígeno puede ocurrir en unos cuantos minutos. Este método a menudo da resultados rápidos pero da poca información con respecto al contenido de anticuerpos del antisuero. Los resultados positivos también se ven afectados por los títulos del anticuerpo así como muchos otros factores.

- Difusión simple en una dimensión

En 1946 Oudin desarrollo el método de difusión simple en tubo. Un exceso de antígeno difunde en un gel que contiene anticuerpos. Cuando la concentración del antígeno excede a la del anticuerpo el antígeno reacciona con el anticuerpo y lo inhibe. Un gradiente entonces existirá y una banda de precipitación se formará donde se alcance una cantidad equivalente de antígeno y anticuerpo. En el método de difusión simple, la cantidad de bandas de precipitación es directamente proporcional a la concentración del antígeno e inversamente proporcional a la concentración del anticuerpo. Esta técnica da al investigador un método para identificar un antígeno específico cuando un anticuerpo mono específico está presente en la matriz de gel. Hasta que el método de difusión radial simple se popularizó, ésta técnica fue ampliamente utilizada.

- Difusión simple en dos dimensiones

En ésta técnica, propuesta primero por Petrie, el antígeno difunde en una placa de gel que contiene anticuerpos. Una banda de precipitación en forma de anillo se forma y migra concéntricamente alrededor de los pozos que contienen antígeno. Después de que el antígeno difunda por un tiempo, usualmente 2 a 10 horas, la migración cesa por que la cantidad de antígeno aplicado no está en gran exceso comparado con el anticuerpo en el gel.

- Doble difusión en una dimensión

En 1953, Oakley y Fulthorpe introdujeron ésta técnica en tubo, la cual implica la presencia de compartimentos de antígeno y anticuerpo situados en un tubo a cada lado de un medio de gel común. El anticuerpo es colocado en el tubo y se cubre con gel. El antígeno es colocado en la parte superior del gel. El antígeno y el anticuerpo difunden uno hacia el otro en el gel. Un precipitado se forma en la zona de equivalencia. Esta prueba puede ser usada para análisis cuantitativos; ya que es más exacto que la difusión simple porque la prueba no se basa en el requerimiento de una adecuada concentración inicial de anticuerpo en el gel para que se forme una banda visible de precipitación.

- Difusión doble en dos dimensiones (Inmunodifusión)

Éste método fue primeramente descrito por Ouchterlony en 1949. El cual implica el uso de placas de agar con pozos para anticuerpo y antígeno. Los dos reactivos difunden en el gel donde los inmunoprecipitados se forman en el punto de equivalencia para cada par Ag-Ac.

El sitio de la formación de la banda de precipitación depende del coeficiente de difusión del antígeno y el anticuerpo y no de su concentración relativa. Cada precipitación actúa como una barrera inmunespecífica para cada par de reactivos y previene su difusión, pero no obstaculiza la difusión de otros reactivos. Si dos reactivos están razonablemente balanceados, el precipitado no migra más lejos pero crece periféricamente en líneas o arcos a ángulos constantes a la línea que une los dos pozos. Sin embargo, en una mezcla no balanceada, puede ocurrir el fenómeno llamado Liesegang o formación de múltiples bandas de precipitación. El método Ouchterlony permite la evaluación de los reactivos de manera tanto cualitativa, como la semicuantitativa.

La formación de bandas de precipitación proporciona al investigador información considerable sobre la identidad, identidad parcial o no identidad del antígeno y el anticuerpo. También proporciona los coeficientes de difusión y concentración de los reactivos.

- Inmunoelectroforesis

La inmunoelectroforesis consiste en una combinación de electroforesis e inmunodifusión en un gel. Se basa en el hecho de que en un medio de gel, el movimiento de las moléculas en un campo eléctrico es similar al medio líquido, con la ventaja de que la difusión libre se reduce después de la electroforesis. La proteína individual es definida tanto por su movilidad electroforética como por su especificidad antigénica.

Este método solo es usado para comparación cualitativa de la proteína en diferentes muestras. Las muestras se colocan primero en pozos hechos en una placa de agar, gel de agarosa u otro medio y después es separado por electroforesis. Después de que la electroforesis esté completa, el antisuero contra las muestras es colocado en un canal paralelo a la vía de migración. Como el antisuero difunde en el gel y el antígeno difunde rápidamente en todas direcciones de las zonas electroforéticas, los antígenos eventualmente encuentran los anticuerpos y se forman precipitados en puntos de equivalencia. Los patrones de arco son teñidos y comparados. El número de precipitados formados corresponde al número de proteínas independientes formadas.

- Inmunoelectroforesis cohete

Este es un método para cuantificar una muestra, en la cual, la reacción Ag-Ac ocurre durante la electroforesis de una mezcla de antígeno en un anticuerpo contenido en un gel. El antígeno es colocado en un pozo y movido por electroforesis en el gel que contiene una concentración uniforme de anticuerpos. La relación de antígeno-anticuerpo incrementa a medida que el propio antígeno se diluye durante la migración. Los antígenos se mueven de acuerdo a su movilidad electroforética. La “punta” de la alta concentración del antígeno se mueve a través del gel, mientras que cantidades menores a cada lado comienzan a formar líneas de precipitación, resultando en la formación de una zona de precipitación con forma de cohete del complejo Ag-Ac. La altura del pico de la zona de precipitación en forma de cohete es proporcional a la cantidad del antígeno.

- Inmunoelectroforesis en dos dimensiones

Este método es utilizado tanto para análisis cualitativo como cuantitativo de proteínas en una muestra. La muestra es separada primero por electroforesis en agarosa y después

sometida a una segunda electroforesis a 90° de la dirección original en un gel que contiene antisuero. Una serie de picos de precipitación superpuestos se forman; el área de cada pico es proporcional a la cantidad del antígeno.

- Electroforesis cruzada

La técnica puede ser usada para la determinación cualitativa o cuantitativa de una muestra de sangre. El sistema toma ventaja de las propiedades electroendosmóticas de un medio de gel para llevar a cabo el análisis inmunolectroforético de una reacción Ag-Ac.

Bajo la influencia de la electroforesis, el antígeno y el anticuerpo migran uno hacia otro y un precipitado se forma en el punto de su interacción. Éste método fue descrito y aplicado para la identificación forense de especies de sangre. Se realizan pequeños pozos de alrededor de 1.5 mm de diámetro en un gel de agar. El extracto de la mancha es colocado en el pozo catódico de un par vecino, y el antisuero en el pozo anódico contrario. El antisuero (principalmente fracción γ -globulina) migra hacia el cátodo a causa de la electroendosmosis, mientras que el extracto de la mancha (principalmente albúmina) migra anódicamente. Una banda de precipitación se forma en el sitio de interacción.

- Prueba de la inhibición de la globulina sérica antihumana.

Éste método serológico fue recomendado por Wiener en 1949. Mediante la medición del título de la inhibición de la globulina sérica antihumana, el origen humano de una mancha de sangre puede ser determinado. La globulina sérica antihumana aglutina los eritrocitos Rh₀(D) sensibilizados con anticuerpos incompletos. Si una mancha de sangre que contiene la globulina sérica humana es incubada con globulina sérica antihumana, se unirá con el antisuero y disminuirá su título. Cuando células sensibilizadas del grupo O Rh₀(D) se adicionan a la mezcla, la aglutinación no resulta. Si la aglutinación ocurre, la mancha de sangre no reduce la combinación de la globulina sérica antihumana y por lo tanto no es de origen humana.

- Métodos de hemaglutinación pasiva

Cuando los eritrocitos humanos son tratados con ácido tánico, absorben proteínas. Las células pueden ser lavadas y un antisuero homólogo a las proteínas absorbidas causa la aglutinación de las células rojas.

En 1956, se aplicó ésta técnica para determinar la especie de origen de la mancha de sangre. Los eritrocitos tánicos (eritrocitos que fueron tratados con ácido tánico diluido) son incubados con extracto de manchas de sangre. Las células rojas son después lavadas y sometidas a la aglutinación con globulina sérica antihumana. Sólo las células que han sido incubadas con extracto de mancha de sangre humana son aglutinadas por la globulina sérica antihumana.

Ésta prueba es muy específica pero un poco menos sensible que las pruebas de la precipitina y de la inhibición de la globulina antihumana.

- Prueba de la inhibición de la precipitación

Éste método determina el poder de las manchas ligadas a proteínas específicamente dirigidas a absorber la precipitación en suero humano. El antisuero es primero incubado con la mancha y posteriormente difundido contra proteínas séricas humanas conocidas en placas Ouchterlony. Una reacción positiva para la presencia de una mancha de sangre humana puede ser indicada por la atenuación o inhibición de la capacidad de precipitar el antisuero contra estos sueros humanos conocidos. Este proceso es mostrado en la figura 8.

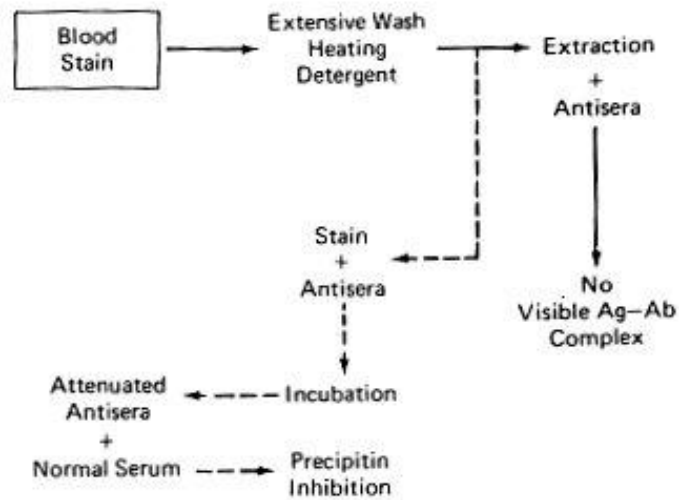


Figura 8. Prueba de la inhibición de la precipitación para la determinación del origen de la especie.

- Método de la aglutinación mixta

El principio de la aglutinación mixta fue aplicado para la identificación del origen de la especie de una mancha de sangre en 1963. El reconocimiento de una mancha como de origen humano por la reacción de la aglutinación mixta depende de la capacidad de reconocimiento serológico de la globulina de suero humano que ha sido absorbido en fibras de ropa. La globulina humana absorbida en las fibras de ropa reacciona con la globulina antihumano que a su vez está ligada a los eritrocitos humanos sensibilizados con globulina humana al hilo de las fibras. Como se reporta, la técnica no solo diferencia manchas humanas de manchas de sangre no primate, sino también puede ser usada para distinguir manchas humanas de manchas de sangre de primates, tales como el monos Rhesus o monos babuinos.

- Método de partículas de látex sensibilizadas

Las partículas de látex son sensibilizadas con inmunoglobulinas antihumano de oveja. Partes equivalentes de suspensión de partículas de látex al 2% y de antisuero son mezclados en solución salina tamponada con glicina (pH 8.2). El extracto de las manchas de sangre o el suero diluido de la muestra es después mezclado con las partículas de látex sensibilizado

en una placa de vidrio. La mezcla es agitada suavemente por dos minutos y observada macroscópicamente para aglutinación contra un fondo oscuro. La aglutinación que la mancha desconocida es de origen humano.

La prueba registra una reacción positiva con diluciones de suero humano tan altas como 1:10000. Sin embargo, un número de sustancias muestran reacciones no específicas con las partículas antihumanas. Soluciones jabonosas y suavizantes de telas dan reacciones débiles. La leche aglutina fuertemente tanto partículas sensibilizadas como no sensibilizadas. Whitehead y Brench desarrollaron más ésta técnica. Ellos fueron capaces de llevar a cabo la identificación de especies y del grupo ABO de sangre humana en el mismo fragmento de sangre seca.

PROCEDIMIENTOS DE PRUEBA

Las reacciones de inmunoprecipitación para determinación de especies tienen generalmente dos etapas. El primer paso es la unión de un anticuerpo con un determinante antigénico. El segundo paso es la formación de un precipitado visible. La reacción requiere la presencia de tres elementos: antisuero, extracto de la mancha de sangre (antígeno) y electrolitos.

Elección del antisuero

El suero antihumano puede ser producido por inyectando suero humano en varios animales, tales como caballo, cabra, oveja, pato, gallina, conejo o conejillo de indias. El antisuero de caballo forma arcos de precipitación bien definidos debido a que su complejo Ag-Ac es soluble en exceso de antígeno o anticuerpo. Sin embargo, el antisuero tipo H (caballo) trabaja en un estrecho rango de concentración y a veces puede dar lugar a múltiples inmoprecipitados bajo condiciones no balanceadas o no estables en un medio de gel. El antisuero de gallina debe ser purificado antes de ser usado ya que es hiperlipémico. El poder de precipitación del antisuero tipo B (aviar) es máximo cuando la concentración de sal es alrededor de diez veces la normalmente usada para antisuero mamífero. El antisuero más comúnmente utilizado es el tipo R, producido por conejos, cabras u ovejas. Éste tipo de antisuero produce un precipitado estable que es no soluble en un exceso de anticuerpo y solo parcialmente soluble en un exceso de antígeno. Sin embargo, las líneas de precipitación no son tan fuertes como las producidas con el tipo H.

Antisueros polivalentes y monovalentes específicos están disponibles comercialmente tanto del tipo H como del tipo R. Sin embargo el antisuero comercial a menudo sufre de

títulos bajos y reactividad cruzada. Es, por tanto, conveniente que los trabajadores de laboratorio seleccionen y valoren el antisuero. La inmunodifusión y el análisis inmunoelectroforético proporcionan información de la cantidad y aidez del anticuerpo presente; mas, los patrones de inmunodifusión dan información sobre la naturaleza y reactividad cruzada de los anticuerpos. Durante la determinación de especie, debe ser usado siempre el mismo grupo de antisuero probado. El titulo y especificidad de cada lote nuevo de antisuero debe ser determinado. Solo como un estricto control puede el serólogo forense posiblemente mantener el grado de certeza y reproducibilidad requerida para la determinación confiable de la especie.

El título de un antisuero puede ser determinado por el método de diluciones seriadas. El procedimiento es el siguiente:

- 1) Organizar en una gradilla suficientes tubos de ensayo como para exceder el título esperado del antisuero.
- 2) Pipetear 0.2 mL de suero anihumano en el primer tubo.
- 3) Pipetear 0.1 mL de solución salina en el resto de los tubos.
- 4) Transferir 0.1mL del contenido del primer tubo al segundo tubo, mezclar y transferir de la misma forma al siguiente tubo. Desechar 0.1 mL del último tubo después de mezclar.
- 5) Mezclar el contenido después de cada transferencia por aspiración del mismo en una pipeta y soplando la mayoría en seis ocasiones.
- 6) Cada tubo contiene la mitad de la concentración del antisuero que el tubo precedente.
- 7) Cuidadosamente adicionar 0.1 mL de suero humano diluido (1:1000) en la parte superior del antisuero de prueba.
- 8) Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 9) Una línea fina de precipitación aparece en la interface en cantidades variables.
- 10) El último tubo que muestre un precipitado positivo indica el título del antisuero^{22, 23}.

El resultado de una prueba típica puede aparecer como se muestra a continuación:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilución	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Resultado	-	-	+	++	+++	+++	++++	++++	+++	+++	+	-
Titulo = 1024												

Tabla 4. Ejemplo de la obtención del título del antisuero²².

Preparación del extracto de la mancha

- 1) Extraer las manchas de la tela, papel, u otros textiles cortándolos en pequeños fragmentos y sumergirlos en pequeños tubos de ensayo
- 2) Raspar la mancha de cuchillos, vidrios, y otras superficies duras y extraer con solución salina en tubos de ensayo.
- 3) Disolver manchas mezcladas con tierra, suciedad o en material soluble en solución salina y después separar por cromatografía en papel o por filtración.
- 4) Separar físicamente manchas mezcladas con químicos, detergentes u otras sustancias solubles y después extraer con solución salina.

Generalmente, las manchas de sangre pueden ser extraídas con un volumen mínimo de solución salina enfriada en un refrigerador por 12 a 24 horas. Manchas viejas y desnaturalizadas son en ocasiones muy difíciles de extraer en suficiente cantidad. Las siguientes soluciones siguientes pueden ser utilizadas para cada extracción:

Disolventes débiles:	1-3% de carbonato o bicarbonato de sodio o potasio, borato de sodio.
Disolventes moderados:	Frío, solución saturada de cualquiera de los disolventes débiles anteriores. También ácido bórico, ácido cítrico, clorhidrato de quinina al 15%, amoniaco-agua (50:50).
Disolventes fuertes:	Amoniaco en alcohol al 10%, hidróxido de sodio al 80%, hidróxido de potasio, sulfato de cobre-alcohol (50:50), ácido sulfúrico-alcohol, ácido clorhídrico-alcohol, hidróxido de potasio-alcohol concentrado, piridina.

- Ring test (prueba del anillo)

La técnica más simple usada por la reacción de precipitación es la prueba del anillo. Ésta prueba puede ser realizada en un tubo de ensayo o en un capilar, dependiendo de la cantidad de muestra y antisuero disponible. El procedimiento es el siguiente:

- 1) Centrifugar una pequeña cantidad de suero de conejo antihumano y transferir a una serie de tubos de ensaye.
- 2) Adicionar el extracto de mancha de sangre y el blanco en la superficie de la solución del antisuero como se muestra a continuación. Evitar burbujas de aire.

Tubo	1	2	3	4	5	6
Muestra	Suero humano conocido 1:1000	Extractos de manchas de sangre			Blanco	Solución salina de control
Suero antihumano		1	1:100	1:1000		

Tabla 5. Distribución de los tubos para la prueba del anillo²².

- 3) Llevar a cabo la prueba a temperatura ambiente. Líneas blancas de precipitación formadas en 10 minutos, indican una reacción positiva.
- 4) Un control de suero humano conocido debe dar reacción positiva, mientras que solución salina y el blanco deben dar reacciones negativas. De lo contrario, la prueba no es interpretable.
- 5) Si el espécimen de la sangre es negativo para origen humano, repetir la prueba con antisuero de varios tipos de animales.

- Inmunodifusión

El procedimiento para la prueba de inmunodifusión es el siguiente:

- 1) Mezclar 4 gramos de agar puro con 100 mL de buffer de fosfatos 0.15 M pH 7.1, y 300 mL de agua destilada. Agregar 40 mg de tiomersal como conservador.
- 2) Calentar la mezcla a 100°C hasta que la solución se aclare.
- 3) Centrifugar a 3000 rpm por 2 minutos para remover partículas no disueltas.
- 4) Pipetear 3 mL de la solución caliente de agar en una caja de Petri.
- 5) Esperar hasta que el agar solidifique.
- 6) Cortar pozos en el gel de agar mediante una perforadora de vidrio o metal. Los hoyos deberán tener alrededor de 0.5 cm de diámetro y aproximadamente 2 cm de distancia.
- 7) Sellar los agujeros con agar diluido (solución al 0.5%).
- 8) Llenar los pozos en la placa de agar con las muestras a probar y el antisuero.
- 9) Cubrir la caja Petri y dejar reposar a temperatura ambiente por 24 horas.
- 10) Examinar las líneas de precipitación y fotografiar los patrones.

- Electroforesis cruzada

La prueba es realizada como sigue:

- 1) Disolver 1 gramo de agar Difco Noble en 100 mL de buffer verona, pH 8.6 (7 g de barbiturato de sodio; 1.1g de ácido dietilbarbitúrico; 1 g de lactato de calcio en 1 litro de agua destilada).
- 2) Calentar la mezcla a 100°C hasta que la solución se aclare.
- 3) Centrifugar a 3000 rpm por 2 minutos para remover partículas no disueltas.
- 4) Pipetear 7 mL del agar caliente en placas de vidrio (7.5 por 5 cm).
- 5) Después de que al agar haya solidificado, perforar pequeños pozos en el gel apartados 1.5 mm aproximadamente.
- 6) Colocar el extracto de la mancha de sangre diluida (aproximadamente 1:1000), sangre humana conocida (aproximadamente 1:1000), el blanco y otros controles en los pozos del lado derecho.
- 7) Llenar los pozos del lado izquierdo con antisuero.
- 8) Colocar la placa en la cámara de electroforesis. Los extractos de la mancha deben estar cerca del cátodo y el antisuero del lado del ánodo.
- 9) Conectar el gel a cámaras de buffer por medio de 4 piezas de papel filtro.
- 10) Llevar a cabo la electroforesis a 150 voltios por 15 minutos. Una fina línea blanca de precipitación entre los dos agujeros de un par representa una reacción positiva.
- 11) Registrar los resultados fotográficamente y teñir la placa con amino negro u otras tinciones adecuadas para proteínas.

OTROS FACTORES EN LA PRUEBA DE PRECIPITACIÓN

El fenómeno de la precipitación es una reacción compleja Ac-Ag y requiere tres reactivos importantes: anticuerpo, antígeno y electrolitos. Todos los reactivos usados en las reacciones de precipitación tienen que ser solubles y las soluciones deben ser perfectamente claras pues la turbidez oscurece los resultados. Algunos otros factores que afectan negativamente la calidad de la prueba de la precipitación son:

- Anticuerpos precipitantes

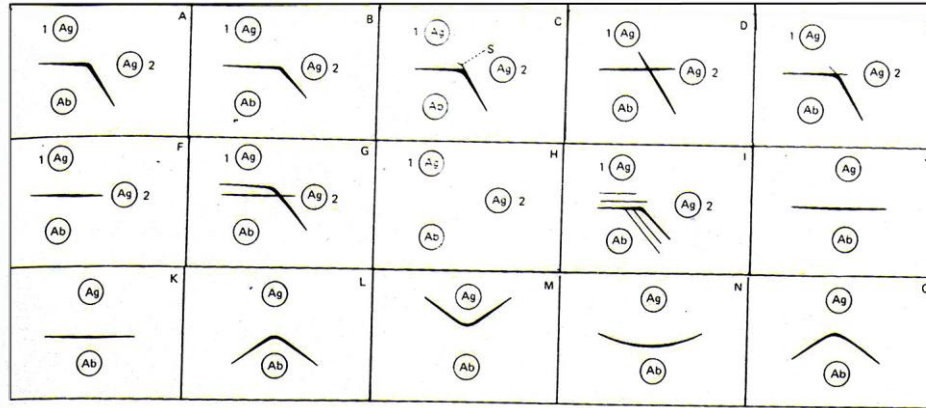
Hay muchos tipos diferentes de anticuerpos y no todos reaccionan como un anticuerpo precipitante. El antisuero usado para la reacción de precipitación debe ser capaz de formar un complejo estable e insoluble con el antígeno.

- Concentración balanceada Ac-Ag

La formación de la banda de precipitación depende de la concentración del antígeno y de la concentración del anticuerpo. Cuando la concentración del antígeno excede a la del anticuerpo, el antígeno excederá el poder de combinación del anticuerpo y la reacción de entrecruzamiento no ocurre. Por lo tanto, un exceso de antígeno inhibirá la formación de la banda de precipitación. Por otro lado, cuando la concentración del anticuerpo es mayor a la del antígeno, solo se formará un complejo soluble porque hay poco antígeno disponible para la formación de una red completa. Éste fenómeno también es llamado de prozona y es particularmente marcado cuando se usa suero antihumano de caballo en la prueba.

- El coeficiente de difusión

La calidad y la configuración de las bandas de precipitación son afectadas por los coeficientes de difusión de las moléculas del antígeno y el anticuerpo. El coeficiente de difusión es dependiente del tamaño y forma de la molécula. Las bandas de precipitación formadas por la inmunodifusión Ouchterlony proporcionan al investigador información considerable con respecto a la pureza, especificidad tamaño molecular y forma y la concentración de las moléculas del antígeno y el anticuerpo en cuestión (Figura 9)



- A.** Patrón de identidad que muestra que el antígeno 1 y el antígeno 2 son antigénicamente idénticos y en concentraciones iguales. Observar la fusión de las bandas de precipitación.
- B.** Patrón de identidad de los antígenos 1 y 2 en la que el antígeno 1 está en concentración mayor a la del antígeno 2.
- C.** Patrón de identidad parcial: el antígeno en el pozo 1 (reacción cruzada del antígeno) y antígeno en el pozo 2 (antígeno homólogo). Notar la formación de una espuela (S) por la detención de la banda de reacción cruzada por la banda del antígeno homólogo en el punto de unión. La banda del antígeno homólogo continúa desarrollándose y la longitud de la espuela es inversamente proporcional a la estrechez de la relación con el antígeno de reacción cruzada. La debilidad y curvatura de la espuela es directamente proporcional a esta relación.
- D.** Patrón de no identidad El anticuerpo es específico tanto para el antígeno 1 como para el antígeno 2, sin embargo éstos no tienen relación entre sí.
- E.** Patrón de doble espuela: Los antígenos 1 y 2 no están relacionados pero se relacionan a un tercer antígeno al que el antisuero en el pozo se dirige.
- F.** Patrón de identidad a sólo un antígeno: el anticuerpo reacciona con el antígeno 1 pero no con el 2.
- G.** Patrón de identidad y no identidad: el anticuerpo reacciona con dos antígenos del pozo 1. Uno de éstos es idéntico al antígeno en el pozo 2 y el otro no está presente en éste mismo pozo.
- H.** Patrón de no reacción: el anticuerpo no reacciona con ningún antígeno.
- I.** Patrón de no identidad: el anticuerpo no es específico. Éste reacciona con diferentes antígenos tanto en el pozo 1 como en el 2.
- J.** El antígeno y el anticuerpo tienen el mismo coeficiente de difusión y se están utilizando en equivalencia. Notar la formación de la banda (recta) a la mitad del camino de los pozos.
- K.** El antígeno y el anticuerpo tienen los mismos coeficientes de difusión, sin embargo, el antígeno está en exceso.
- L.** Antígeno con mayor coeficiente de difusión (menor peso molecular) que el anticuerpo. Se curva alrededor del pozo del anticuerpo en la equivalencia.
- M.** Anticuerpo con mayor coeficiente de difusión que el antígeno.
- N.** Exceso de antígeno pero con menor coeficiente de difusión.
- O.** Antígeno con mayor coeficiente de difusión y en equivalencia con el anticuerpo.

Figura 9. Evaluación cualitativa del antígeno y el anticuerpo por el método de la inmunodifusión.

- Medio óptimo

La temperatura, pH, tiempo de incubación y fuerza iónica en la que la reacción de precipitación es realizada tiene una influencia directa en la formación de la banda de precipitación. La temperatura más favorable es usualmente entre 25 y 37°C, el pH óptimo está entre 7 y 8 y la fuerza iónica está en el rango de 0.03 a 0.1. Sin embargo, la condición óptima exacta y la duración de la incubación deben ser determinadas para cada nuevo sistema Ac-Ag bajo investigación.

- La especificidad del antisuero

La especificidad del antisuero se define como la capacidad del anticuerpo para reconocer solo el determinante antigénico particular de un antígeno particular. La especificidad del antisuero juega el rol más importante en la determinación de especies. Trazas de anticuerpos contaminantes en antisueros comercialmente preparados pueden causar errores serios. Por lo tanto, la especificidad precisa del antisuero en uso debe ser conocida. Los anticuerpos contaminantes pueden ser removidos por absorción.

El problema de la especificidad de un antisuero está directamente relacionado a su reactividad cruzada. La reactividad cruzada usualmente se produce en una de dos formas: (1) el antisuero no es específico de tejido y puede dar reacciones con otros tejidos de la misma especie. Por ejemplo, algunos sueros antihumanos comerciales reaccionan con sangre humana, leche humana, orina humana (concentrada), y el fluido seminal humano; (2) el antisuero no es específico de especie y puede dar reacciones con otras especies.

En 1904 se realizó un estudio comprensivo de la reactividad cruzada de varios sueros precipitantes. En él se emplearon sueros sanguíneos de humano y varios animales como antígenos y 30 antisueros de conejo contra las proteínas del suero de los diferentes animales. Basado de los resultados de 16000 pruebas, se concluyó que el suero del orangután, chimpancé, gorila y monos del viejo mundo, están estrechamente más relacionados serológicamente con el suero humano que los monos del nuevo mundo y los monos tití. También encontró que el antisuero contra varias especies de mamíferos dan el mayor porcentaje de reacciones positivas cuando son probados con antígenos derivados de especies del mismo orden taxonómico. Por ejemplo, el suero antihumano reaccionó de forma cruzada con el 90% de antígenos de los primates, 13% de de los antígenos de los insectívoros, 27% de los antígenos de los carnívoros, 43% de los antígenos ungulados, 4% de los antígenos de los marsupiales y 0.3% de los antígeno de aves. El suero antivaca dio resultados positivos con 72% de los antígenos de los ungulados. Los reptiles tienen heterogeneidad entre sí y reaccionan de forma cruzada solo con otros reptiles.

Dado que el objetivo de determinar las especies es identificar positivamente el origen de la especie de una mancha, la reactividad cruzada es un factor importante. Cuatro puntos importantes han sido resumidos:

- 1) La relación de las especies está reflejada en la similitud de la secuencia de proteínas.
- 2) Las diferencias en la secuencia de proteínas incrementa en forma regular con el lapso de tiempo evolutivo.
- 3) Diferentes proteínas evolucionan a diferentes tasas.
- 4) La reactividad cruzada inmunológica, medida por la técnica de precipitación cuantitativa, se correlaciona muy bien con la similitud de secuencias de proteínas.

Por lo tanto, algunas proteínas son más adecuadas que otras para la especificidad de especies. Las proteínas humanas y de chimpancé son indistinguibles por cualquier medida; humanos y chimpancés separados a lo largo de diferentes líneas de evolución alrededor de 5 millones de años. Las reacciones de identificación reflejan ésta estrecha relación evolutiva. Muchos de los sueros probados no distinguen humanos del mono del viejo mundo, el mono Rhesus, que se separó del hombre alrededor de 22 millones de años, pero muchos de los antisueros pueden distinguir al hombre de primates más distantes, representados por un mono del nuevo mundo, el mono ateles y un prosimio, el lémur. Mucho más discriminante son los patrones de reacción dados por la anti inmunoglobulina cadena gamma y la anti inmunoglobulina cadena kappa. Este antisuero reconoce porciones discretas de la molécula de inmunoglobulina. Las cadenas kappa y gamma aparecen como buenos marcadores de identidad de especie^{22, 23}.

6.2 MÉTODOS COMERCIALES

La prueba SERATEC® HemDirect sirve para la rápida identificación de sangre humana con propósitos forenses. La detección está basada en la determinación de hemoglobina humana en la muestra por una reacción específica antígeno/anticuerpo. El resultado es interpretado visualmente por la aparición de una línea roja en muestras positivas de hemoglobina. La prueba es fácil de realizar y puede ser usada directamente en la escena del crimen, si se requiere.

Originalmente la prueba SERATEC® HemDirect fue desarrollada para la determinación de sangre oculta en muestras de heces y fue usada para la oportuna detección de cáncer de colon. En el uso forense, la prueba es empleada para la detección de hemoglobina humana con el objetivo de identificar trazas de sangre humana en material forense obtenido de una escena de crimen.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba SERATEC® HemDirect es un inmunoensayo cromatográfico (CIA por sus siglas en inglés). Ésta contiene dos anticuerpos murinos monoclonales anti-hHb (hemoglobina humana) como compuestos activados. Uno de esos anticuerpos está inmovilizado en la región de la prueba en la membrana como una línea. La zona de control contiene inmovilizado anticuerpos policlonales de cabra anti-conejo que están también fijados en la membrana como una línea. Un bloque de fibra de vidrio por debajo de la zona de la membrana se usa para cargar la muestra y transmisión a un segundo bloque de fibra que contiene seco, el segundo anticuerpo monoclonal murino anti-hHb que unirá la hemoglobina presente en la muestra. Adicionalmente el bloque contiene anticuerpos de conejo.

A través del efecto capilar de la membrana, la mezcla de reacción se mueve a través de la membrana hacia las regiones de la prueba y de control. Si la muestra tiene hHb, el complejo hH/anti hHb se unirá al anticuerpo monoclonal inmovilizado de la región de prueba que reconoce otro epítipo de la molécula de hemoglobina (complejo sándwich). Ésta unión es indicada por la formación de una línea en la región de la prueba. En cualquier caso, ocurre una reacción entre el antígeno y el anticuerpo de conejo en la región de control, resultando en la aparición de una línea de color de rojo en la parte superior de la zona del resultado. Ésta línea indica la correcta realización de la prueba.

CARACTERÍSTICAS CUALITATIVAS

- Sensibilidad

La prueba es capaz de detectar la hemoglobina en un rango de concentración de 40 ng/mL a 500µg/mL. Una concentración más alta puede dar origen al efecto de la dosis alta, observándose en un continuo decremento de la intensidad del color de la línea resultante de la prueba.

- Especificidad

El SERATEC® HemDirect no muestra reacción cruzada con hemoglobina bovina, de perro, gato, puerco, jabalí, caballo, pollo, oveja, mula, cabra o ciervo. Sin embargo, la sangre de primates y la de hurón reaccionan positivamente con la prueba.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Llevar a temperatura ambiente la muestra y el reactivo antes de la prueba. Retirar la prueba de la bolsa protectora cuando se esté listo para comenzar el ensayo, procurando tener a la mano el inserto del dispositivo con fines de identificación si es necesario.
- Adicionar 3 gotas de la muestra (aproximadamente 100 μL) en la abertura redonda (pocillo de la muestra). Iniciar el temporizador. Mantener la muestra restante en caso de que sea necesario realizar diluciones.
- Esperar por 5 minutos. Durante este tiempo una o dos líneas aparecerán en la ventana de resultados. Los resultados negativos deben ser confirmados después de 10 minutos.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Resultados negativos (sin hemoglobina en la muestra o hemoglobina fuera de los límites de detección)

Solo una línea de color de rojo aparece en la región de control (C). La ausencia de una línea en la región T de la prueba indica un resultado negativo. En éste caso, la muestra muy probablemente no contiene sangre humana o hemoglobina humana. Tener cuidado en que la dilución de la muestra entre en el rango de detección de la concentración de hemoglobina.

- Resultados positivos (hemoglobina humana presente en la muestra)

Dos líneas de color de rojo aparecen en la ventana de resultados, una en la región de control (C) y otra en la región de resultado de la prueba (T). La intensidad del color de las dos líneas puede variar. Incluso una línea de resultado de la prueba débil indica un resultado positivo. En éste caso es muy probable que la muestra contenga hemoglobina humana.

- Resultado inválido

La línea de control no aparece. En éste caso la prueba es inválida y debe ser repetida con un nuevo kit.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Un estudio de serología incluye el examen y análisis de fluidos corporales, entre ellos la sangre. En el campo médico, la sangre es analizada para asegurar un estado de salud. En la rama forense, la sangre debe ser analizada para determinar su fuente en una escena de crimen o en un objeto de evidencia. La diferencia no acaba aquí. Un químico clínico comúnmente trabaja con muestras que están frescas, por lo general están líquidas y usualmente recientemente adquiridas de una fuente individual. Por otra parte, el químico dedicado al área forense no solo trabaja con una variedad de fluidos (sangre, saliva, semen, orina), sino también y más frecuentemente, con muestras que están en forma de manchas y a menudo deterioradas o degradadas, haciendo más difícil la obtención de un análisis exitoso.

La cantidad y condición (grado de degradación o putrefacción) de las manchas evidenciales puede depender de cierto número de factores, algunos de los cuales el analista forense no tiene el poder de controlar. La cantidad de la muestra y la condición a menudo dictan la manera o estrategia adoptada para trabajar con una pieza específica de indicio. Los requerimientos del sistema legal deben ser seguidos para proteger la seguridad del indicio y su posterior introducción a la corte. La integridad del indicio puede ser fácilmente comprometida por fallas en el control total o el mantenimiento del mismo en condiciones inadecuadas. La exposición no controlada del indicio a condiciones de calor o humedad, pueden en el sentido bioquímico, destruir mucha de la información contenida en la mancha, por la degradación de sustancias químicas de importancia para el analista. Éste hecho puede ocurrir antes o después de la recepción del indicio por el laboratorio.

Como ya se mencionó previamente, la forma y el estado en que se encuentran los indicios biológicos, específicamente la sangre, no son los más óptimos para realizar su análisis, de ahí la importancia de contar con los conocimientos necesarios para realizarlo de la mejor manera posible para emitir un dictamen confiable. El mismo, independientemente del resultado que contenga, deberá ser proporcionado a la autoridad que los solicita con la mayor brevedad posible y mostrando en su contenido técnicas avaladas y aprobadas, tanto nacional como internacionalmente, para los requerimientos que la investigación requiere. De ahí, que la correcta aplicación de una técnica permita la realización del análisis con mayor eficiencia y rapidez, para acelerar la investigación en curso. De igual forma, el correcto trato que se le da al indicio al levantarlo y embalarlo, permite mayor confianza al analista.

En referencia a la aplicación de una técnica presuntiva para la identificación de una mancha de sangre cabe mencionar que permite acelerar el proceso de la investigación, pues como su nombre lo dice, estas pruebas permiten señalar presuntamente una mancha como sangre, con la seguridad de que si la prueba es negativa, la presencia de sangre es nula o se encuentra en cantidades que no entra en el límite de detección de la misma, sin embargo si

la reacción es positiva solo se puede afirmar que posiblemente existe una mancha de sangre, pues la gran variedad de sustancias que dan falsos positivos impiden lo contrario. Es aquí donde radica la importancia de las técnicas confirmativas, pues éstas permiten afirmar categóricamente la presencia de sangre.

Es importante mencionar que la realización de las pruebas presuntivas requiere que se confronte con un control positivo y uno negativo, para asegurar que los reactivos trabajan apropiadamente y la correcta coloración ocurre. Para esto es necesario contar con sangre humana identificada, para que actúe como control positivo, así mismo, para la obtención de un resultado negativo se puede emplear una muestra tomada de un área no manchada o ensangrentada de la superficie sobre la cual se encuentra la posible mancha de sangre.

La gran variedad de técnicas presuntivas requiere que se haga un comparativo para optimizar el tiempo del analista, de igual forma las técnicas confirmativas pueden ser comparadas para emplear la que mejor desempeño represente, por lo que al observar la información contenida en los resultados, se puede observar que la tetrametil-bencidina, la fenoltaleína e incluso la o-toluidina son las técnicas que presentan mejores características de reacción, incluso son señaladas por los autores por sus ventajas. Al comparar las tres, se observa que la TMB a pesar de presentar buen desempeño, su uso puede presentar un riesgo, pues aun no se establece si es o no carcinógena, además de que su sensibilidad de acuerdo a la tabla 2, al igual que la de la o-toluidina, son menores a la de la fenoltaleína, que también es señalada como más específica, por lo que es la que se sugiere sobre las otras técnicas de color, incluso que las técnicas espectrofotométricas o la observación microscópica, pues la velocidad en que se obtiene el resultado es mayor.

Previo a la realización de cualquier técnica, es aconsejable el empleo del luminol, pues éste, a pesar de no destacar entre las técnicas de mejor desempeño, permite la observación de manchas posibles de sangre que no son observables a simple vista, además también resulta efectiva con manchas de sangre viejas o degradadas.

Por parte de las técnicas confirmativas las pruebas de cristales son por su rapidez las sugeridas sobre las demás, pues la velocidad con la que confirman la presencia de sangre es superior. Sin embargo entre las dos técnicas más utilizadas (Teichmann y Takayama), no existe mayor diferencia, pues a menudo puede dar resultados con sangre removida de madera o superficies de piel. Los inconvenientes de la prueba de Takayama sin embargo, son que una completa cristalización es difícil de obtener con muestras viejas de sangre y puede haber formación de diferentes tipos de cristales.

La importancia de la determinación de especie cobra mayor valor al enfocarse no sólo al aspecto humano, pues existen varios hechos o actividades clasificables como delitos en las que se puede encontrar sangre de animales. Tal es el caso del tráfico y la compra-venta de aves exóticas, especies protegidas, matanza clandestina de ganado, peleas de perros, entre

otras. Mientras que al identificarse una mancha de sangre como humana, se puede proseguir en el análisis para determinar el tipo de sangre que posee la víctima o el victimario, en la detección de alcohol o sustancias prohibidas que pudieran guiar una investigación, en la determinación de la región anatómica de procedencia de la sangre o en la edad de la misma, siendo estos temas, posibles puntos de partida para la elaboración de posteriores tesis.

La metodología sugerida para la identificación de una mancha de sangre recolectada en el lugar de los hechos es la siguiente:

MATERIALES:

- Guantes, cofias, cubrebocas y batas desechables.
- Hisopos estériles, tela libre de apresto o papel FTA.
- Pinzas estériles.
- Encendedor.
- Navajas para bisturí o tijeras.
- Solución salina estéril.
- Sobres de papel, bolsas de papel o microtubos (tipo eppendorf).
- Marcador de tinta indeleble.
- Contenedores y geles congelados para mantener temperatura en refrigeración.

IDENTIFICACIÓN DE LA MANCHA DE SANGRE

1. Identificar una posible mancha de sangre con el uso de luminol.
2. Llevar a cabo la técnica de identificación de sangre con el kit comercial.

PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN:

1. Humedecer el hisopo, la tela o el papel FTA con solución salina.
2. Colocar la tela, el hisopo el papel FTA sobre la mancha hasta que no se impregne de ésta. Si es necesario, frotar ligeramente el soporte para transferir la mancha al hisopo, la tela o el papel.

3. Una vez impregnado el soporte, dejar secar en un sitio limpio y aislado para evitar su contaminación.
4. Ya seco el soporte, guardar por separado en sobre de papel o bolsa de plástico, con los datos de embalaje y sellarlo.
5. Cuando no sea posible secar el soporte, guardarlo en tubo estéril o recipiente con tapa y a temperatura de refrigeración (sobre geles congelados o hielo) y aislarla de la luz. No congelar.
6. Enviar al laboratorio.

EMBALAJE

Las muestras secas deben ser embaladas en papel o bolsas de plástico individualmente.

Si están húmedas o son líquidas o se trata de tejidos, deben enviarse acompañadas de geles congelados para mantenerlas en condiciones de refrigeración.

Las muestras líquidas deben embalsarse en recipientes de sello hermético tales como frascos o tubos de plástico, o de vidrio con tapón de goma.

Todas las muestras contendrán los siguientes datos:

- Fecha de toma de la muestra.
- Hora de toma de la muestra.
- Lugar de la investigación.
- Ubicación criminalística de los indicios.
- Número de averiguación previa.
- Número de expediente.
- Nombre de quien realizó la recolección.

Las prendas u objetos de donde se levanta la muestra biológica serán regresados al agente del Ministerio Público anexadas al dictamen y según sea el caso, se dirán por escrito a la autoridad el tipo, y las condiciones de almacenamiento que requiera.

Cuando se solicita apoyo sobre un estudio de genética a otro laboratorio, se deben adjuntar los dictámenes sobre los estudios presuntivos y confirmativos que indiquen la naturaleza de la muestra biológica.

La elección de las técnicas incluidas en la metodología sugerida, se realizó con base en el riesgo para la salud, sensibilidad, especificidad y rapidez que representan. El método comercial fue el elegido de entre todos, porque permite definir en una sola reacción si se trata de sangre humana o no, con lo cual se logra dirigir rápidamente una investigación.

La metodología sugerida se realizó con los procedimientos y/o técnicas que de acuerdo a la literatura presentan mejor desempeño, sin embargo, es difícil empatar los conocimientos y resultados teóricos con los recursos y preparación que existen en las unidades que se dedican a los análisis de esta índole, lo cual hace casi imposible establecer y homogeneizar un método único para el esclarecimiento de la verdad, pues cada unidad de investigación se adecúa a los recursos y conocimientos que poseen, aunado a que las técnicas que den resultados de una manera más rápida, no siempre serán las más adecuadas para todos los tipos de muestras o evidencias que se encuentre, por ejemplo, en las técnicas orientativas, un reactivo puede ser más sensible que otro o que todos, pero presentar reacciones más difícilmente apreciables a la vista del analista. Con esto se llega a la conclusión de que no existe una metodología que encaje en un lugar de trabajo, por el contrario, el perito especializado en la materia es el encargado de realizar los manuales de procedimientos que se adecuen de mejor forma a los requerimientos y demanda de casos con que cuente y hacer uso de su pericia o experticia para discernir entre la aplicación de las diversas técnicas existentes para la identificación de sangre y la aclaración de si es de origen animal o humana.

El análisis de las manchas encontradas en la escena de hechos implica un punto de inflexión importante en la investigación del mismo, pues se ve directamente relacionado con la búsqueda de los sujetos relacionados en tal hecho, además, da una idea de la naturaleza del delito que se cometió, lo cual puede ayudar a dirigir el caso a las instancias correspondientes de darle seguimiento.

Por tal motivo, en esta tesina se hacen presentes las técnicas que permiten introducir al área forense con la inclusión de temas como: a) técnicas orientativas para la identificación de manchas de sangre; b) técnicas confirmativas para la identificación de manchas de sangre; c) método de recolección y embalaje de las muestras de sangre y d) identificación de especie de manchas de sangre, con lo que se pretende además facilitar la elección de una técnica a los profesionales encargados de aplicarlas.

CONCLUSIONES

En la comisión de un delito con violencia, inevitablemente la sangre no cesa de brotar, correr y macular la escena de la tragedia. De ahí que la mano criminal, armada de un palo, cuchillo o arma de fuego, deje siempre a su alrededor, como ya se refirió, una estela biológica perdurable: la sangre. Este indicio suele ofrecer, como testigo mudo, pero elocuente, inapreciables datos sobre las circunstancias del hecho, así como acerca de la identidad de los autores²⁹. Basados en este fundamento y de acuerdo a éste trabajo y a los objetivos contenidos en el mismo, se concluyen los siguientes puntos:

- La recolección y embalaje del indicio hemático dependerá de la naturaleza y el estado del mismo.
- El correcto trato que se le da al indicio proporciona mayor confiabilidad en los resultados.
- Las pruebas presuntivas representan únicamente un tamiz que permite decir que la mancha analizada es probablemente sangre, mientras que las pruebas confirmativas permiten asegurar que indudablemente se trata de sangre.
- La prueba presuntiva que emplea el reactivo de la fenolftaleína es el más recomendado por diversos autores, debido a su alta sensibilidad y especificidad.
- El uso de luminol es de gran ayuda en la ubicación de manchas no observables a simple vista.
- Los kits comerciales son la mejor opción para afirmar la presencia de sangre, permitiendo asegurar que se trata de sangre humana.
- La determinación de especie dictará el camino a seguir y la clasificación del acto delictivo.
- La metodología a seguir en una investigación será establecida por los requerimientos de la misma siendo los peritos especializados en el área los encargados de realizar los manuales y seleccionar las técnicas que mejor se adecuen al caso en cuestión.
- Ésta tesina proporciona un conjunto de técnicas con su fundamento que acercan al Q.F.B. al área forense, significando una fuente de información útil y veraz para consultar en una investigación criminalística.

REFERENCIAS:

1. Johll M. Química e investigación criminal. Barcelona: Reverté; 2008.
2. Kiely T. Forensic Evidence: Science and the criminal law. 2ª ed. U.S.A.: Taylor and Francis Group; 2006.
3. Caro P. Manual de química forense. Buenos Aires: Ediciones La Roca; 2004.
4. García M. Manchas de sangre. Perú: Ed. Salvat; 2008.
5. Hernán S. Medicina legal y psiquiatría forense. Santiago de Chile: Ed. Jurídica de Chile; 1991.
6. Vargas-Alvarado E. Medicina legal. México: Ed. Trillas; 2008.
7. Vargas-Alvarado E. Medicina forense y deontología médica. México: Trillas; 1991.
8. Gutiérrez C. Manual de ciencias forenses y criminalística. México: 2004.
9. Mackenzie S. Hematología clínica. 2a edición. México: El manual moderno; 2000.
10. Ulloa A, Ulloa T. Hematología básica. 2ª ed. México: Ed. Masson-Salvat medicina; 1995.
11. Hillman S. Manual de hematología. México: Ed. El Manual moderno; 1985.
12. Martínez S, Saldivar L. Medicina legal. 18ª ed. México: Méndez Editores; 2009.
13. Correa A. Identificación forense. México: Trillas; 1990.
14. Melon C, et al. Criminalistics. 6ª ed. U.S.A.: Prentice-Hall; 1998.
15. Stark M. A physician's guide to clinical Forensic Medicine. U.S.A.: Human Press; 2000.
16. Lorente M. EL ADN y la identificación en la investigación criminal y en la paternidad biológica. España: Ed. Comares; 1995.
17. Knight B. Medicina forense de Simpson. México: El manual moderno; 1994.

18. Hueske E. Practical analysis and reconstruction of shooting incidents. U.S.A.: Taylor and Francis Group; 2006.
19. James S, Nordby J. Forensic science. 2ª ed. U.S.A.: Taylor and Francis Group; 2005.
20. De Luis y Turegano J. Policía científica II. España: Universidad de Valencia; 1990.
21. INACIPE. Manual metodológico para la investigación criminalística de los homicidios de ciudad Juárez. México: INACIPE; 2004.
22. Saferstein R. Forensic science handbook. U.S.A.: Prentice-Hall; 1982.
23. Franco de Ambriz M. Hematología forense. 5ª ed. México: Porrúa; 2009.
24. Eckert W. Introduction to forensic sciences. 2ª ed. U.S.A.: CRC Press; 1997.
25. James S., Eckert W. Interpretation of bloodstain evidence at crime Scene. 2ª ed. U.S.A.: CRC Press; 1998.
26. James S. Scientific and legal applications of bloodstain pattern interpretation. U.S.A.: CRC Press; 1999.
27. Rojas N. Medicina legal. 12ª ed. México: El ateneo; 1982.
28. Wecht C., Rago J. Forensic science and law. U.S.A.: Taylor and Francis Group; 2006.
29. Moreno R. Los indicios biológicos del delito. 2ª ed. México: INACIPE; 2003.