



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**DIFERENCIACION DIRECTA DE SANGRE
HUMANA, POR CITOMETRÍA DE FLUJO**

Tesina

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

NANCY MARGARITA CANALES GARCÍA

ASESOR

LEONOR AGUILAR SANTELISES

MÉXICO D.F.

FEBRERO 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a mi abuelita Angelita por ser el principal motor para la culminación de mi carrera profesional, y a pesar de que ella no llegó a ver terminado este trabajo, sabe que lo he logrado

Agradezco a mis padres Francisco y María de la Paz, que siempre me han apoyado y han estado a mi lado en cada paso de mi vida

Gracias amor porque hiciste que mi carrera fuera mas amena y ahora que ya eres parte de mi vida agradezco tu comprensión

Te agradezco mi niña preciosa por ser la luz de mi vida, y con tu sonrisa has logrado que cada día sea más agradable para mi y sobre todo para salir adelante

Agradezco a mis hermanos Emma, Martín, Lulú, Ale, Marcos y Fabián porque siempre hemos compartido buenos y malos momentos

Doy gracias también a Monis, Adolfo, Claudio y Conchis, porque siempre me han dado su mano y consejos para salir adelante

Mil gracias a la profesora Leonor por su valiosa ayuda para lograr concluir este trabajo

INDICE

	página
INTRODUCCION	
<i>Recolección y embalaje de las muestras de sangre</i>	5-7
<i>Investigación criminalística de las manchas de sangre</i>	8-14
Citometría de flujo (CF)	15-20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
OBJETIVO PRINCIPAL	21
<i>Objetivos particulares</i>	21
MATERIALES Y METODOS	
<i>Diagrama de flujo</i>	22
<i>Frotis sanguíneo (Tinción de Wright)</i>	23
<i>Tinción celular</i>	23
<i>Análisis por citometría de flujo</i>	24-25
VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA CITOMETRIA DE FLUJO PARA SU USO EN CRIMINALÍSTICA	26
CONCLUSION	27
BIBLIOGRAFÍA	28-29

INTRODUCCION

Entre los indicios que frecuentemente se producen durante la comisión de diversos delitos las manchas de sangre ocupan un lugar preponderante; de ahí la importancia de efectuar sobre esta evidencia física un estudio eficiente, que sea de verdadera utilidad para el esclarecimiento de los hechos que se investigan.

Además, no debemos conformarnos con decir que es una mancha de sangre, sino que debemos de ahondar nuestros conocimientos y decir si esa mancha es de sangre humana o de sangre de animal; esto constituye uno de los problemas más importantes de la Medicina Legal.

Para ello, contando con pocos elementos, podemos sacar provecho recordando los elementos figurados de la sangre fresca, para después hacer comparaciones con los elementos figurados de otras sangres, (animales). Una primera diferenciación, que aunque elemental puede servirnos, es la de tener en cuenta los diámetros de los elementos figurados de estas sangres. El diámetro de los glóbulos rojos del hombre es de 7.5 milésimas de diámetro, es decir que en comparación con los diámetros de los glóbulos rojos de la sangre de animales, son los mas grandes de todos, pues los de perro son de 7.2, los de conejo 6.9, los de gato 6.5, los de cerdo 6.0, los de caballo, toro y vaca de 4.6 milésimas de diámetro; los de aves y batracios son elípticos. En virtud con la comparación de los diámetros y sus formas estamos en aptitud de decir si es o no humana la sangre que se trate (4,9).

Contando con mayores elementos, podemos emplear los métodos biológicos para saber si una mancha de sangre es humana, o a que animal

pertenece, siendo posible hasta identificar al individuo de quien procede la sangre mediante la investigación del grupo sanguíneo de la mancha y del sospechoso.

Recolección y embalaje de las muestras de sangre

De primer instancia en el lugar de los hechos, se debe realizar una protección y preservación de los mismos y posteriormente la búsqueda, que puede realizarse utilizando diferentes métodos, ya sea aislados o combinados dependiendo de cada caso en particular y tomando en cuenta el área si es abierta, cerrada o mixta. Cualquiera que sea el método utilizado deberá estar encaminado para localizar la máxima cantidad de indicios en el menor tiempo posible.

Después de que la sangre se ha fijado adecuadamente mediante una descripción escrita, la planimetría y la fotografía, se realizan los siguientes pasos:

1. Tomar precauciones de seguridad cuando se esté manipulando sangre, es decir utilizar ropa protectora como bata, guantes, máscaras o lentes protectores según la situación.

2. En el caso de encontrar sangre líquida en el lugar de los hechos, deberá tomarse con ayuda de una pipeta Pasteur o de un gotero y depositarla en un tubo de ensayo limpio y seco (preferiblemente estéril), al que deberá añadirse 1 mL de solución salina estéril por cada 5 mL de sangre y un tubo más con EDTA como anticoagulante. Las muestras deben ser refrigeradas (no congeladas y enviarlas al laboratorio lo más pronto posible.

3. Si no se encuentra sangre fresca, pero si coágulos, se tomarán estos con el extremo de un aplicador de madera y se colocarán en el interior de un tubo de ensayo, procediendo después como en el caso anterior

4. Si únicamente se localizan manchas de sangre seca en los objetos sólidos, se levantarán con pequeños fragmentos de 2X2 cm. de tela blanca y limpia sin apresto, humedecidas con solución salina (0.85%). Tela que se colocará también en un tubo de ensayo, para su envío al laboratorio. Con otro fragmento de tela preparado de la misma forma, se tomará una muestra de control de una zona del soporte no manchada con sangre (4).

5. Un filtro de FTA puede ser usado para absorber sangre líquida o sangre coagulada (evitando áreas que contengan suero únicamente) (Figura 1).

6. Si la muestra problema se encuentra impregnada en cabellos, estos se tomarán con pinzas y se trasladarán al laboratorio dentro de pequeñas bolsas de plástico.

7. Finalmente, manchas presentes sobre el cuerpo de la víctima, y de las que se sospeche no pudieran ser originadas por su propia sangre, serán tomadas como se describe en el punto cuatro o cinco. Además se tomará sangre del cadáver, con el fin de compararla con la de las manchas.

8. La ropa con manchas de sangre húmeda se deben colocar sobre una superficie limpia y permitir que se sequen al aire libre. Una vez que la ropa y las manchas se han secado, empaquetarlo en un contenedor de cartón o de papel apropiadamente etiquetado.

Todas las muestras tomadas deberán llevar etiquetas firmemente adheridas, en las que se anotarán los datos concretos del caso:

1. Número de averiguación o expediente.
2. Fecha y hora en la que se levantó la evidencia.
3. Sitio de donde se colectó.
4. Naturaleza presunta del indicio.
5. Nombre del investigador que realizó el levantamiento y embalaje.



Figura 1. Embalaje con papel FTA para muestra de sangre líquida o sangre coagulada.

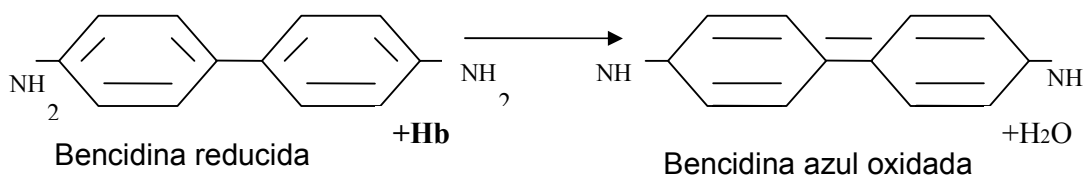
Investigación criminalística de las manchas de sangre

La metodología criminalística utilizada en la identificación de la sangre, es acorde al método científico, esto es la comprobación de la hipótesis del trabajo, mediante la experimentación que en este caso se logra a través de las siguientes técnicas:

1. Técnicas de orientación

a) Reacción de la bencidina o de Adler:

El grupo hem de la hemoglobina posee actividad enzimática, que puede catalizar la ruptura del peróxido de hidrógeno. Mientras no estén presentes otras sustancias orgánicas oxidantes, esta actividad de la hemoglobina, descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno que al reaccionar con la bencidina la oxidarán formando un compuesto intensamente azul



Es una prueba presuntiva para la identificación de sangre

b) Reacción de la fenolftaleína reducida:

Se rige el mismo principio que se señaló para la reacción de Adler

Fenolftaleína oxidada (rosa) \longrightarrow Fenolftaleína reducida (incolora)

La diferencia estriba en que la fenolftaleína debe ser reducida previamente a fenolftaleína incolora y este reactivo, por su labilidad, debe ser guardado en refrigeración en frascos ámbar. Se trabaja en medio alcalino en vez de medio ácido. Se efectuará un calentamiento previo a 100°C durante un minuto.

c) Reacción de leuco malaquita verde:

Se basa, al igual que las anteriores en una reacción de oxidación reducción. El prefijo "leuco" se refiere a la forma reducida incolora; la forma leuco puede ser preparada por reducción de la malaquita verde. Como en el caso de la fenolftaleína, la forma leuco puede ser oxidada por la acción de las peroxidasas para dar la forma oxidada verde

d) Técnicas espectroscópicas:

Estas técnicas permiten poner de manifiesto, mediante espectros de absorción, la presencia de hemoglobina y/o de alguno de sus derivados, en manchas de sangre. Se requiere someter la muestra a una marcha espectral.

e) Técnica del Luminol, para detectar manchas lavadas y/o decoloradas:

A un mililitro de la solución. A (luminol mas carbonato de sodio), se añade una gota de agua oxigenada e inmediatamente después, dos gotas de la solución B (hidracina hidratada al 95%), se espera un minuto y la mezcla se

asperje sobre la zona sospechosa. En caso positivo las manchas de sangre producen luminiscencia

2. Técnicas de confirmación

a) Cristales de hemina:

La hemoglobina cuando es tratada con ácido acético, se separa inmediatamente de las proteínas y del grupo prostético. Durante la hidrólisis la globulina se desnaturaliza.

La oxidación de fierro del grupo hem se efectúa más rápidamente en medio ácido que en medio alcalino. Si está presente un halógeno inorgánico como el cloro, se formarán cristales insolubles de cloruro de ferriprotoporfirina o hemina

b) Cristales de homocromógeno o prueba de Takamaya:

Tanto la ferroprotoporfirina como la ferriprotoporfirina tienen la propiedad de combinarse con otros compuestos nitrogenados por medio de la globulina. Tales compuestos incluyen otras proteínas, hidróxido de amonio, cianuro, nicotina y piridina y los productos resultantes se llaman hemocromógenos. Los cristales pueden formarse tanto en medio ácido como alcalino; sin embargo el reactivo de Takamaya es de naturaleza alcalina.

3. Técnicas para determinar el origen de la sangre

a) reacción de las precipitinas en capilar:

Las moléculas del anticuerpo (inmunoglobulina) reaccionan con el antígeno (proteína soluble) para formar un precipitado fácilmente visible bajo

condiciones de luz apropiadas y a las concentraciones equivalentes de antígeno y de anticuerpo.

La reacción misma tiene lugar en varias etapas. Inicialmente se forma un complejo antígeno anticuerpo soluble, conforme la reacción prosigue, ese complejo empieza a unirse y forma una tupida red compuesta de moléculas de anticuerpo bivalente y moléculas de antígeno polivalente. Esta formación crece rápidamente formando partículas del tamaño suficiente como para ser insolubles y formar un precipitado visible.

La reacción puede efectuarse observando la interfase entre los dos líquidos en un tubo de ensayo o en un capilar; también puede hacerse sobre el gel por medio del fenómeno de difusión entre las partes reaccionantes, o bien por el método de electroforesis. A continuación en el cuadro 1 se presentan las ventajas y desventajas de las técnicas de precipitinas en tubo, gel y electroforésis

Cuadro 1. Ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de precipitinas

TÉCNICA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
En tubo o en capilar.	Es rápida y sencilla.	Debe efectuarse una cuidadosa estratificación.
En gel.	Se puede utilizar una mancha de sangre aunque este turbia.	Se emplea varias horas para la difusión.
Electroforesis.	Acelera la difusión sobre el gel.	Requiere de un equipo mas costoso.

b) Inmunoelectroforesis cruzada:

Esta técnica se basa en las reacciones que se efectúan entre un antígeno que emigra anódicamente y un anticuerpo que emigra hacia el cátodo durante una electroforesis. Sobre una placa de agarosa, se hacen horadaciones en paredes; el antígeno (seroalbúminas, alfa y beta globulinas) se coloca en una de ellas y el anticuerpo (gamma globulinas) en la otra; una vez terminada la electroforesis aparecen bandas visibles de precipitación entre las perforaciones pares de los materiales proteínicos específicos.

4. Determinación del grupo sanguíneo

La determinación del grupo sanguíneo en la práctica forense aporta a los tribunales, en no pocas ocasiones, elementos de prueba muy importantes tanto para señalar si una mancha de sangre recogida del lugar de los hechos puede provenir de la víctima o bien del victimario, o con mayor certeza indicar que no puede haber analogía entre la sangre encontrada y la de la víctima o la de su presunto agresor. Se puede realizar la determinación en los siguientes tipos de muestras:

- a) En sangre fresca
- b) En manchas de sangre

5. Determinación de enzimas y proteínas

Algunas enzimas sanguíneas son de gran interés forense, por su gran polimorfismo, cuando son separadas en los componentes proteínicos llamados isoenzimas, de las cuales son particularmente importantes: fosfoglucomutasa PGM; la adenilatocinasa AK; fosfatasa ácida eritrocítica EAP; la esterasa D

EsD y entre las proteínas cobra particular interés la haptoglobina Hp, especialmente porque sobrevive por un tiempo razonable en manchas de sangre seca.

La PGM y la HP, son las más frecuentemente usadas para fines de individualización y ambas pueden separarse eficientemente por procedimientos electroforéticos. La importancia de su separación reside en el hecho de que no todas las personas tienen exactamente las mismas variantes: las tres variedades más comunes son la PGM 1-1; la PGM 2-1 y la PGM 2-2. Las de la haptoglobina corresponden también a la Hp 1-1; Hp 2-1 y Hp 2-2.

Ahora bien, uniendo los resultados inmunológicos a la combinación de estas proteínas, llamadas también marcadores genéticos, se obtienen tablas de distribución en la población que dan la pauta para aumentar las probabilidades de exclusión.

6. Técnicas de biología molecular aplicadas a la identificación forense (ADN)

Debido al principio de la individualidad genética, que esta definida por un conjunto de marcadores genéticos que el individuo hereda de sus padres, podemos obtener lo que justificadamente se ha llamado “huella digital del ADN”. Los marcadores genéticos que pueden ser útiles, deben ser muy polimórficos; tener una frecuencia alélica y genotípica muy baja y un gran poder de discriminación o capacidad de distinguir a los individuos.

Los sistemas más comúnmente usados en genética forense, hasta la fecha son: el HLA DQ alfa, el Polymarker, que tiene 5 marcadores, y el minisatélite D1S80, en total / marcadores, que dan un porcentaje de exclusión

de 99.972%. Para esto se realiza una excelente extracción de ADN (celular o mitocondrial según sea el caso), para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y posteriormente determinar los productos del PCR en un gel de agarosa.

Como puede observarse aún no existe una técnica para poder determinar el origen de la sangre, en el caso de origen animal o humano, en la cual se haya utilizado alguna metodología por medio de la citometría de flujo, con fines de criminalística. Aquí se propondrá una metodología utilizando la tecnología antes mencionada, sin embargo es de vital importancia conocer el fundamento de la citometría de flujo.

Citometría de flujo (CF)

La CF se vale de la inmunofluorescencia (método inmunológico para la identificación de antígenos de superficie celular con el uso de anticuerpos marcados con un fluorocromo), permite la caracterización morfológica de células en suspensión y con el uso de distintos anticuerpos monoclonales acoplados a diferentes fluorocromos (ver Cuadro 2) se pueden identificar poblaciones celulares según sus moléculas de membrana CD (cuando dos o más anticuerpos monoclonales tienen reactividad para una misma molécula, se les considera que conforman un “conjunto de diferenciación” o CD, del inglés *Cluster of differentiation*) (12). En la actualidad se conocen alrededor de 300 marcadores CD. Los fluorocromos absorben la energía de una longitud de onda determinada y emiten luz de menor energía a una mayor longitud de onda, a este fenómeno se le llama fluorescencia (2, 5, 6).

La CF de rayo láser se basa en el paso de un flujo fluido de células individuales en suspensión por la celda de detección (a una velocidad de entre 500 y 4000 células por segundo), en donde la luz de un rayo láser es dispersada ligeramente tanto hacia adelante, dependiendo del tamaño de las células que están pasando, como hacia los lados, según la granularidad de las mismas. Adicionalmente se emite fluorescencia cuando se ha incluido un anticuerpo conjugado a un fluorocromo en el sistema y éste se encuentra combinado en esa misma célula (Figura 2). De esta manera, la propiedad de una célula de dispersar la luz puede proveer información concerniente al tamaño relativo de la célula, su granularidad y complejidad interna e intensidad de fluorescencia relativa (FL1, FL2, ó FL3, ver cuadro 1). Las distintas señales

lumínicas son enviadas a diferentes detectores del citómetro, en donde son transformadas primero a pulsos eléctricos y después a señales digitales que son manejadas gráficamente en una computadora para su adquisición y análisis (2).

Cuadro 2. Fluorocromos comúnmente usados en CF y las longitudes onda en las cuales se detectan en el citómetro de flujo (2).

Fluorocromo	Longitud de onda para la excitación (nm)	Filtro de paso de banda (nm)	Canal de fluorescencia
Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	488	530-30	FL-1
R-Ficoeritrina (PE)	488	575-26	FL-2
Peridinin clorofil-proteína (PerCP)	488	680-18	FL-3

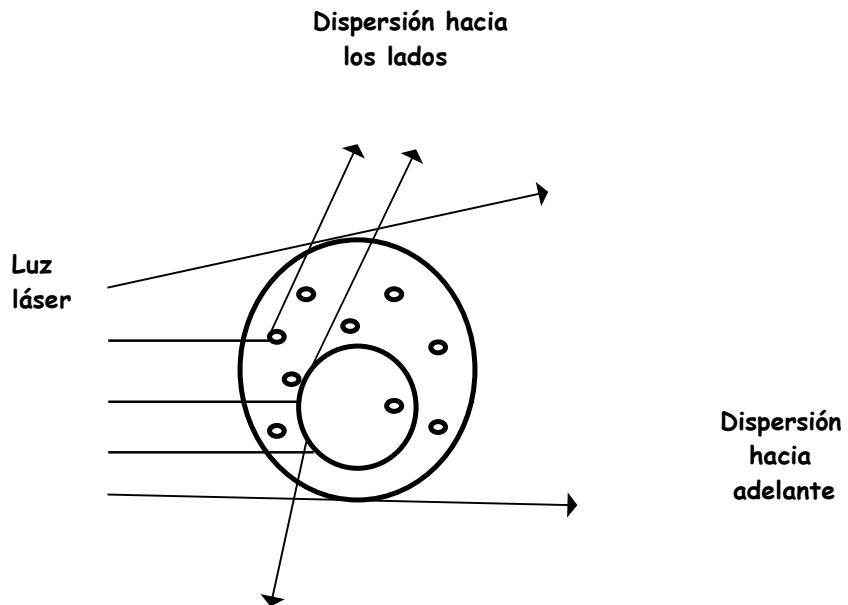


Figura 2. La luz incidente sobre la célula proporciona información acerca de su tamaño y granularidad (2).

Dependiendo de la naturaleza de la “tinción” para CF puede ser:

a) Tinción directa, donde el anticuerpo específico tiene unido directamente al fluorocromo y éste se añade directamente a la preparación antigénica y después de los lavados sólo hay fluorescencia en donde hubo reacción antígeno-anticuerpo. Con este tipo de tinciones es posible hacer un análisis simultáneo de distintos marcadores celulares ya que con los anticuerpos adecuados se pueden ver hasta tres antígenos de superficie o incluso intracelulares en los citómetros más comunes que tienen detectores para tres distintas fluorescencias (por ejemplo CD3-PerCP/ IFN- γ -FITC y finalmente IL-4-PE de forma intracelular)(2,6).

b) Tinción indirecta, en donde la preparación antigénica se hace reaccionar con anticuerpos policlonales o monoclonales y la reacción se hace evidente al usar un segundo anticuerpo acoplado a un fluorocromo, que reconoce al primer anticuerpo. En este tipo de tinciones se pueden utilizar sistemas con biotina o avidina que amplifican más la señal.

Algunas aplicaciones importantes de la CF son en la inmunotipificación de leucocitos, separación de poblaciones celulares, análisis del ciclo celular, enumeración de reticulocitos, determinación de citocinas intracelulares, tinciones para bacterias, (2).

De esta manera, la CF (Figura 3) se ha convertido en una herramienta fundamental en la investigación básica por su capacidad de análisis simultáneo multivariado de distintas poblaciones celulares, lo que ha permitido estudiar diversos procesos biológicos desde la activación hasta la diferenciación celular. Desde un punto de vista más práctico, esta tecnología constituye hoy día un importante auxiliar en el diagnóstico y seguimiento clínico de diferentes enfermedades (5,6).



Figura.3 Citómetro de flujo FACSsort (Becton Dickinson) usando como software el programa Cell Quest (versión 3.3) (Becton Dickinson). Fotografía tomada del Instituto Nacional de Referencias Epidemiológicas (INDRE).

En la figura 4 se muestra un diagrama de puntos (*dot plot*) de una muestra de sangre de paciente alérgico con eosinofilia (fig. 4. A), en donde se indican las poblaciones leucocitarias de acuerdo a su morfología (tamaño y granularidad). En B se presenta un histograma de FL-1 que incluye todas las poblaciones leucocitarias donde se observa una población definida que presenta autofluorescencia y corresponde a los eosinófilos, la cual está

delimitada por el marcador 1 (M1) de donde se puede obtener el porcentaje y la MFL-1 de la población indicada.

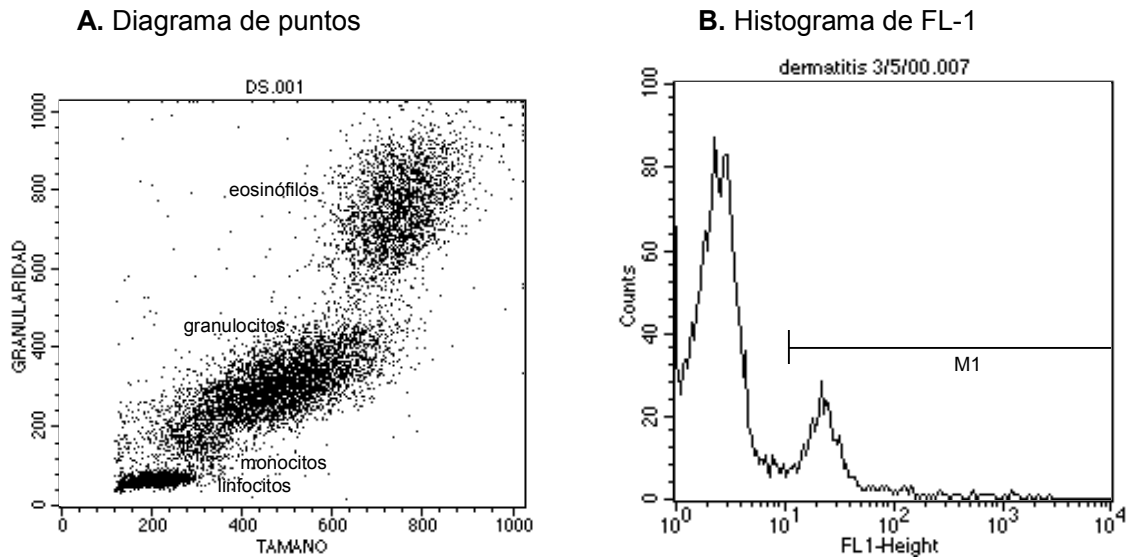


Figura. 4. En **A** se observa un diagrama de puntos mostrando las poblaciones leucocitarias en una muestra de sangre humana, dependiendo de su tamaño y granularidad (linfocitos, monolitos, granulocitos y eosinófilos). **B**, es un histograma de FL-1 donde se puede observar la población más fluorescente hacia la derecha, lo cual se identifica en el marcador uno (M1).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen hasta la fecha técnicas de la química forense en cuanto a la determinación del origen de la sangre, en el caso de ser de origen animal o humano. Sin embargo aun no se ha echado mano de la citometría de flujo, como una opción innovadora, que pudiera ser de gran utilidad en la parte de la criminalística de laboratorio, al investigar un hecho delictivo. Por tanto aquí se planteará una metodología, que aplique las bases de la citometría de flujo, realizando una identificación directa del origen de la sangre

OBJETIVO PRINCIPAL

Desarrollar una metodología por citometría de flujo para identificar el origen de la sangre animal o humana en un hecho delictivo

Objetivos específicos

- 1.1 Comparar la identificación de sangre humana y animal muestras por las metodologías de citometría de flujo y cuenta diferencial por frotis con tinción de Wright.
- 1.2 Establecer un criterio para identificar células sanguíneas de animal doméstico y humano

MATERIALES Y MÉTODO

Diagrama de flujo

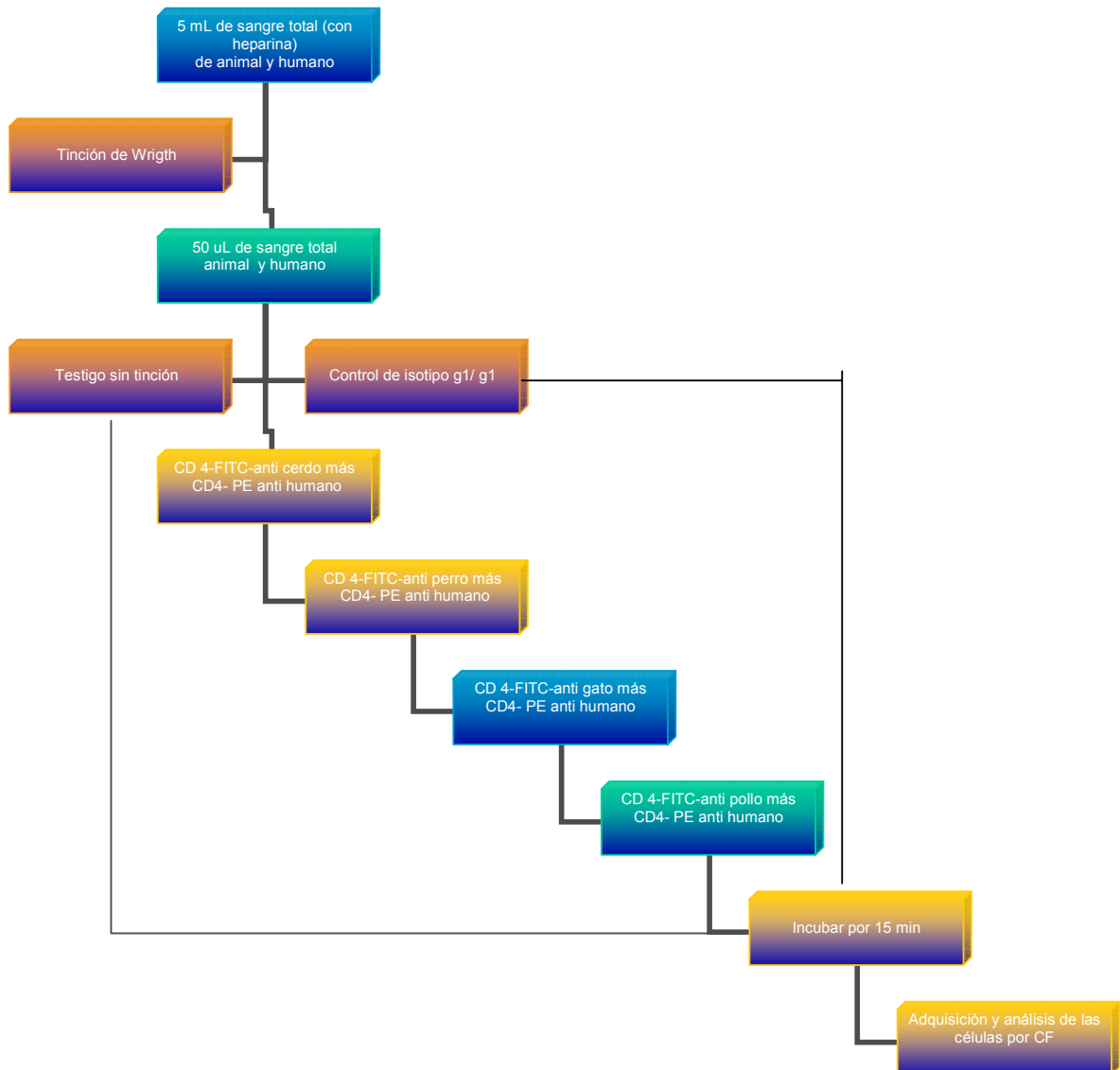


Diagrama 1 Diagrama de flujo de la metodología propuesta para la diferenciación de una muestra de sangre humana de una de origen animal

Se obtendrán 5 mL de sangre venosa del animal en cuestión, así como sangre humana, en tubos Vacutainer heparinizados. Posteriormente se procederá a realizar la siguiente metodología:

Frotis sanguíneo (Tinción de Wright)

Se realizará un frotis sanguíneo de cada una de las muestras sanguíneas en estudio, posteriormente se adicionará el colorante de *Wright* durante uno o dos minutos, para detener la actividad del colorante se adicionan dos partes de solución amortiguadora mezclando perfectamente y dejando reposar de cuatro a ocho minutos. Al término del tiempo indicado se da un lavado con agua destilada, dejándolo secar a temperatura ambiente. Finalmente, se realiza una cuenta diferencial de cien células (leucocitos en total) en el microscopio óptico con el objetivo 100X a inmersión, para así diferenciar las células sanguíneas de una muestra y otra.

Tinción celular

Se adicionan 30 μ L de sangre a tubos de polipropileno (Falcon-BD). Posteriormente se realizará una “tinción” doble con 5 μ L de los anticuerpos monoclonales, es decir primero se adiciona CD4-FITC antihumano y después el anticuerpo con PERCP (como se ilustra en el diagrama de flujo, para tener un total de cuatro tubos) (1). Incubar por 25 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Después se tratan los eritrocitos con solución de lisis 1:10 (BD) diluida en agua, dejando actuar a la solución por 10 minutos. Finalmente se lavan las células con una solución amortiguadora de fosfatos con 0.5% de azida de sodio y 1%

de suero de bovino fetal (PBA) y se centrifugando a 1500 rpm durante 5 min., desechando el sobrenadante. Cabe mencionar que se debe contar con los respectivos controles de cada reactivo utilizado, así como el testigo sin tinción y control de isotipo; a los cuales también se les aplicará el mismo procedimiento de lisis y lavado. Para el análisis por CF, la células se resuspenden en 500 μ L de PBS y se analizaran con el programa de FACS dentro de un periodo de 24 h (1,3, 8, 7, 11). En el diagrama de flujo se ejemplifica la metodología al igual que los diferentes tratamientos de la muestra y los controles respectivos (ver Diagrama 1).

Análisis por citometría de flujo

Equipo

Para el análisis y adquisición de las muestras, se puede utilizar el citómetro de flujo FACSort (Becton Dickinson) usando como software el programa Cell Quest (versión 3.3) (Becton Dickinson).

Adquisición de las muestras por citometría de flujo

Para “adquirir” (término utilizado en CF para indicar que las muestras con células, son captadas por el FACS y los datos correspondientes son guardados en archivos de computadora) las muestras de sangre periférica humana procesadas, se corre el programa del equipo para autoajuste en el FACS, *AUTO-COMP*, el cual está diseñando para ajustar los parámetros para el análisis de células sanguíneas humanas y para la sangre de animal solo basta con ajustar el equipo con la sangre de cada uno de los animales en cuestión. Posteriormente, se adquieren 10,000

células por cada muestra, utilizando el programa Cell Quest, y se analizaran por medio de un gráfico de puntos o histograma de FL1 (para determinar la población leucocitaria de la sangre humana) y FL2 (para determinar la población leucocitaria de los animales en cuestión) como se muestra en la Fig 5. De esta manera se obtuvieron las medias de FL-1 y FL-2, así como el porcentaje de linfocitos CD-4 en cada una de las muestras. Finalmente corroborar el resultado por frotis y por citometría de flujo de las muestras de sangre en cuestión.

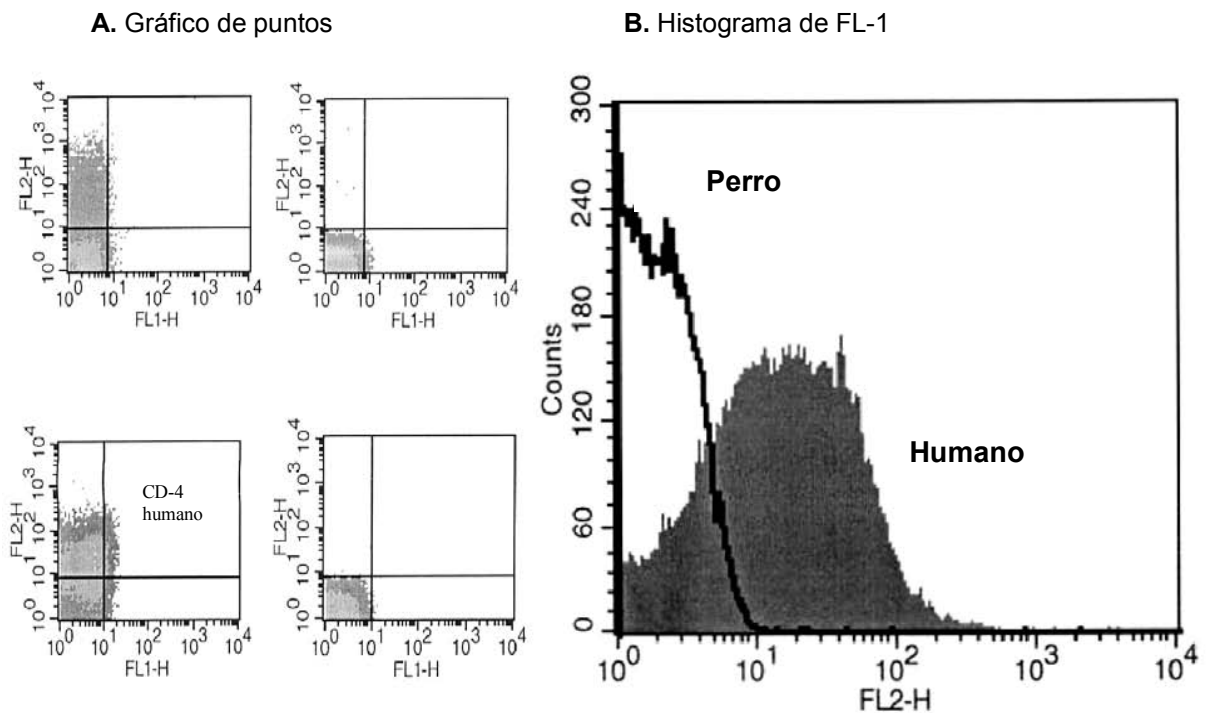


Figura 5. En **A** se observa un gráfico de puntos mostrando las poblaciones de linfocitos CD4-FITC perro (FL-1) y linfocitos CD4-PE humano (FL-2) granularidad **B**, es un histograma de FL-2 donde se puede observar la población de linfocitos CD4 de humano (3)

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA CITOMETRIA DE FLUJO PARA SU USO EN CRIMINALÍSTICA

Ventajas

- Se puede identificar de una manera específica el tipo de célula sanguínea en cuestión, es decir se puede identificar a que tipo de animal corresponde la sangre.
- Es una técnica muy rápida, en aproximadamente una o dos horas se tiene el resultado final.
- Se emplea tecnología con alta especificidad
- Sólo se requiere de 5 uL de sangre fresca para su análisis.

Desventajas

- Se emplean reactivos muy costosos (principalmente los anticuerpos monoclonales), así como el mantenimiento del equipo
- Se requiere de sangre fresca para su análisis.
- No se cuenta con el equipo en diferentes instituciones

CONCLUSION

- Si bien es cierto, existen diferentes técnicas para identificar sangre humana con fines de criminalística, y en especial dos para diferenciar la sangre humana y de un animal, como lo son la reacción de las precipitinas en capilar e inmunolectroforesis
- Sin embargo podrían existir algunas limitantes con el uso de las técnicas antes mencionadas, y presentarse resultados falsos positivos debido a la presencia de sales de sodio o sulfonatos que contienen los polvos para lavado
- En este tipo de situaciones donde existe la incertidumbre, puede emplearse la técnica de CF para obtener resultados confiables, incluso en menor tiempo, con la finalidad de entregar un informe a tiempo
- Cabe mencionar que la técnica de CF podría emplearse en casos extremos, ya que requiere de un equipo costoso como es el citómetro de flujo al igual que los reactivos a utilizar (anticuerpos monoclonales)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aasted B, Blixenkroner M, Bang E L, Bielefeldt H O. Reactivity of eleven anti-human leucocyte monoclonal antibodies with lymphocytes from several domestic animals. *Vet Immunol and Immunopathology* 1988. 19: 31-38
2. Becton Dickinson Immunocytometry Systems. FACS Lysis II program. User's manual. San José, CA, 1998, pp. 16-50.
3. Brodersen R, Bijlsma F, Gori K, Jensen K T. Analysis of the immunological cross reactivities of 213 well characterized monoclonal antibodies with specificities against various leucocyte surface antigens of human and 11 animal species. *Vet Immunol and Immunopathology* 1998. 64: 1-13
4. Franco de Ambriz M. *Hematología Forense*. México Ed. Porrúa, 2002, pp. 1-130.
5. Gavilondo JV. *Anticuerpos monoclonales*. Colección Teoría y Práctica Elfos Scientific. Cuba, 1995, pp. 170-171..
6. Goetzman EA. Flow cytometry: basic concepts and clinical applications in immunodiagnosics. *Clin Lab Sci* 1993; 6: 177-182.
7. Galkowska H, Waldemar L O, Wojewodzka U. Reactivity of antibodies directed against human antigens with surface markers on canine leucocytes. *Vet Immunol and Immunopathology* 1996. 53: 329-334
8. Jacobsen CN, Aasted B, Broe MK, Petersen JL. Reactivities of 20 anti-human monoclonal antibodies with leucocytes from ten different animal species. *Vet Immunol and Immunopathology*. 1993. 39(4): 461-6

9. Mazza J J. Manual de hematología Clínica. Ed. Salvat. Barcelona España, pp. 171-176. 1990
10. Martínez MS. Medicina Legal. 16ª ed. México. Ed Editores Méndez, 1994, pp 241-250
11. Pedersen L G, Castelruiz Y, Jacobsen S, Aasted B. Identification of monoclonal antibodies that cross-react with cytokines from different animal species Vet Immunol and Immunopathology. 2002. 88: 11-122
12. Stites DP. Inmunología básica y clínica. 7a. ed. México: Ed El Manual Moderno, 1991: 302-304.