

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**“EVALUACION DE LOS MÉTODOS USADOS EN  
INMUNOHEMATOLOGÍA FORENSE PARA LA  
DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO EN  
MANCHAS DE SANGRE.”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICA  
FARMACÉUTICO BIOLÓGICA  
PRESENTA**

**EVANGELINA RIVERA JUÁREZ**

**ASESOR**

**Q. F. B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ**

**MÉXICO, D. F.**

**MARZO 2008**



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

A mis padres CARMEN y FRANCISCO por ser quienes me dieron la vida y a pesar de las carencias me impulsaron a seguir adelante.

A mi esposo JHON quien siempre ha tenido fe en mí, por brindarme su amor, cariño y comprensión, por estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas.

A mi suegra y mis hijos, OLGA, JUAN MANUEL, JOSE ANGEL y JESSICA ESTRELLA por su amor incondicional, por tantos sacrificios en el transcurso de mi carrera, por tenerme tanta paciencia, por creer en mí y ser una figura de orgullo para ellos, por darme esos momentos de alegría cuando me sentía triste.

A mis hermanos HERIBERTO, AUREA, LUIS, VICTOR, PAULA, FRANCISCO Y NORMA que siempre me brindaron su apoyo incondicional y motivarme día con día.

A mis cuñados ALVARO, LETICIA, AMÉRICA Y ALEJANDRA quienes siempre estuvieron pendientes de mí en cada paso que daba.

A mis sobrinos ALVARITO, TOMAS, FABIAN, OSBALDO, LUIS, ITALIA, JOMA, SAMY, TADEO, ARISAEEL, PABLO quienes con su alegría me animaban a seguir adelante.

A mis compañeros y amigos, en especial a CLAUDIA, MARICELA, MIREYA, HECTOR, NOEMI, ROCIO, ALMA, FAVIOLA, JUANA, KAREN que me brindaron su amistad incondicional.

A todos y cada uno(a) de mis profesores de quienes aprendí que con empeño y esfuerzo puedo llegar a ser mejor cada día

A mi asesor Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZALEZ MELENDEZ por su apoyo y profesionalismo en la realización de este trabajo.

Por todo esto y mucho más:

**GRACIAS**

# CONTENIDO

1. JUSTIFICACIÓN.....	2
2. RESUMEN.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
4. OBJETIVOS.....	9
5. TIPO DE ESTUDIO.....	10
6. METODOLOGÍA.....	11
7. RESULTADOS.....	12
7.1 Antecedentes históricos.....	12
7.2 La sangre.....	16
7.2.1 Introducción.....	16
7.2.2 Componentes sanguíneos.....	18
7.2.3 Características y funciones de la sangre.....	23
7.2.4 Grupos sanguíneos.....	27
7.2.5 Sistema ABO.....	29
7.2.6 Genotipos.....	32
7.2.7 Bioquímica de los antígenos.....	34
7.2.8 Factor Rh.....	35
7.2.9 Frecuencia de los tipos sanguíneos.....	37
7.2.10 Importancia de los grupos sanguíneos dentro de la Química Legal.....	38
7.3 Manchas de sangre seca.....	41
7.4 Técnicas de orientación.....	44
7.5 Levantamiento, embalaje y traslado de las muestras al laboratorio.....	51
7.6 Técnicas de confirmación.....	63
7.7 Técnicas para determinar grupo sanguíneo.....	67
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	74
9. CONCLUSIONES.....	75
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
11. ANEXOS.....	80

# 1. JUSTIFICACIÓN.

La Química Legal ofrece un amplio panorama a la carrera de Química Farmacéutico-Biológica ya que los peritos químicos son requeridos para participar en diferentes situaciones durante un proceso legal. Su presencia es indispensable en diferentes especialidades como el área de genética forense, toxicología, hematología, etc.

El presente trabajo pretende ser una herramienta útil, de tipo monográfico, en el cual se apoyen los estudiantes en el desarrollo de nuevas técnicas que ayuden a esclarecer un delito. Además acercarlos al ámbito legal, ya que la sociedad siempre se encuentra regida por leyes, que al ser quebrantadas a través de un delito, se van a apoyar por la ciencia para encontrar responsables o/y víctimas.

La Inmunohematología Forense nos auxilia indicándonos si una mancha es de sangre. Nos permite conocer si la sangre encontrada es de origen humano o animal. En sangre humana, se puede determinar el grupo sanguíneo, el factor Rh, el sexo del individuo, la presencia de SIDA, etcétera. Todo esto con el propósito de identificar a víctimas y victimarios.

El propósito del presente trabajo es evaluar los diferentes métodos en la determinación de grupos sanguíneos en manchas de sangre e identificar su importancia dentro de la Química Legal, además de revisar algunas técnicas previas a la determinación de grupo sanguíneo, técnicas de orientación.

La determinación de grupos sanguíneos en manchas de sangre es el problema de estudio, ya que en el lugar de los hechos en el cual se cometió un delito se pueden encontrar manchas de sangre que no se sabe realmente si son de seres humanos o de animales, además de relacionarlo con el delito cometido. Su importancia radica en que una muestra sanguínea, ya sea seca o líquida puede ser fundamental en la resolución de un acto delictivo que conlleva a la participación del químico en el área Químico Legal.

En este estudio solo se toma como fuente principal a la sangre, existen otros tipos de indicios que se pueden analizar y que tienen igual importancia para la resolución de un hecho delictivo, como lo son otros tipos de fluidos biológicos como esperma, saliva sudor, etc.; y los cuales no se tomaran en cuenta en el presente estudio.

La ciencia ha adquirido un gran auge, no solo en el área de la medicina, computación, etc.; sino que también en el área legal y es aquí en donde el Químico Farmacéutico-Biológico desempeña un papel muy importante, al conocer y desarrollar técnicas útiles para la resolución de un delito; sin restarle importancia a otras profesiones (computación, medicina, física, psicología, etc.) u/y oficios (albañilería, carpintería, alfarería, etc.) que contribuyen en conjunto al mismo objetivo: la impartición de justicia.

## 2. RESUMEN

La presente tesis nos muestra una pequeña parte de la Química Legal o Forense, en ella se tomó como objeto de estudio a la sangre, en especial la determinación de los grupos sanguíneos en manchas de sangre, sin embargo la sangre constituye una parte muy importante en la resolución de delitos dentro de la sociedad, ya que a través de ella se puede identificar a un individuo ya sea por sistema de grupos sanguíneos o por huellas genéticas (ADN) y relacionarlo con el hecho delictivo, esto es: si estuvo presente en el lugar de los hechos, si es sangre de la víctima o del victimario, si realmente se trata de sangre humana, si es del mismo grupo sanguíneo, etc.; ya que de ello depende la resolución del hecho y hallar a la persona responsable del delito.

La Química Legal va a proporcionar herramientas justificables en la aclaración de un delito; sin embargo para realizar dicha ayuda la Química Legal se vale de métodos de laboratorio que nos ofrecen de forma veraz resultados que pueden ayudar en la impartición de justicia. Entre los métodos más usados para determinar los grupos sanguíneos en manchas de sangre encontramos:

- Absorción-elución
- Takayama
- Inhibición de la aglutinación.

Para poder realizar la presente tesis se necesito de revisiones bibliográficas, hemerográficas, artículos de revistas en formato electrónico, etc.

El estudio de la determinación sanguínea dentro del ámbito legal no es menos importante que el estudio del ADN, en la actualidad el ámbito genético ha cobrado un gran auge y sin embargo por sí sólo no puede usarse en la solución de un delito, ya que se debe de apoyar con otros estudios como lo son los grupos sanguíneos; estos a su vez también son usados en estudios de paternidad, así como también en delitos sexuales y además de ser determinado en sangre también se pueden ser identificados en muestras de cabellos, semen y otros fluidos biológicos.

### 3. INTRODUCCIÓN

Las manchas encontradas en el lugar de los hechos delictivos se han constituido como elemento esencial en la resolución de investigaciones judiciales. Establecer su origen y grupo sanguíneo aporta información útil en el proceso de inclusión o exclusión de sospechosos o víctimas.

El país conoce, dada la dura experiencia a la que se ha visto expuesto por la violencia común, las desapariciones, secuestros, homicidios, desastres masivos, etc., el problema fundamental que implica la necesidad de identificar a las víctimas y/o agresores.

Este proceso es de enorme importancia, desde el punto de vista de la justicia, y de la paz social y familiar, entendida esta última como el sosiego y la tranquilidad que se da a los allegados cuando cesa su incertidumbre, al lograrse la identificación de un familiar.

En tal sentido, la identificación por métodos científicos ha tomado una increíble fuerza en nuestra nación, entre los que destacan: características antropométricas, señales particulares, hallazgos clínicos y radiológicos coincidentes, cotejo dactiloscópico, huella genética, etc.

Esta tecnología, herramienta de gran especificidad y utilidad, tiene también un alto costo, por lo cual es imprescindible comprender que su empleo está sujeto a la obtención de recursos financieros, siempre escasos, además de la necesidad de tener evidencias de referencia contra los cuales se puedan comparar los hallazgos. La anterior afirmación se hace necesaria frente al riesgo de que el modernismo tecnológico desplace lo sustantivo y se dejen a un lado métodos más sencillos, menos onerosos, más disponibles, pero no menos útiles.

En el área criminalística se investiga si un vestigio biológico (sangre, semen, pelos, saliva, etc.) recuperado del lugar de los hechos delictivos pudo haberse originado en un individuo relacionado con los hechos, ya sea el (los) sospechoso(s) o la víctima.

En épocas pretéritas, más no tan lejanas como pudiera suponerse, la policía se afanaba por descubrir intuitivamente al delincuente y, si acaso, apenas concedía alguna importancia al examen del escenario del crimen.

En la actualidad, por el contrario, la policía aplica un criterio técnico-científico, o sea, que a la intención empírica y a la percepción sensible, es decir, al mero instinto, antepone el conocimiento científico y la comprobación experimental del fenómeno delictivo, esto es, el análisis riguroso y sistemático.

Como resultado de los avances de la ciencia, la investigación de los delitos ha dejado muy atrás las rutinas bárbaras y los métodos sangrientos, para conformar un sistema racional, una disciplina especializada provista de un marco teórico sustentado en la experiencia y la reflexión. Bajo el impulso del movimiento científico moderno, esta actividad, odiada



antiguamente por sus rudimentarios y muchas veces crueles procedimientos, adquirió un carácter muy distinto con el auxilio de las ciencias naturales, transformándose en policía científica, también denominada criminalística. Con otras palabras, si en el pasado la antesala de la justicia no era más que los cuartos de tortura, hoy en día dicha antesala se encuentra en los laboratorios de criminalística, donde prevalecen la ciencia y la técnica <sup>22</sup>.

En los delitos violentos, la sangre siempre mácula el lugar de los hechos. Su examen adecuado en las pruebas orientativas y las realizadas en el laboratorio, permite tanto el esclarecimiento como la comprobación del ilícito perpetrado.

Está plenamente demostrado que la justicia humana no puede administrarse con equidad y certeza sin las aportaciones de la ciencia. Y se asesora del experto en criminalística de campo para que examine el lugar, más o menos ensangrentado, fotografíe las manchas de sangre e informe que pasó. Es decir, interesa su concurso técnico para reconstruir el crimen por medio de las imágenes sangrientas existentes en la escena del delito, o sea, para efectuar un examen hematológico preliminar, el cual constituye el primer paso en la investigación.

En el sitio de una tragedia, donde se ha ejercido la violencia, es posible hallar múltiples y diversos indicios, pero nunca faltará el líquido purpurino manado de las heridas causadas con el objeto o arma que utilizó el victimario. Ahora bien, de todas las manchas, las de sangre son las más importantes y significativas, las más ricas en detalles y las más trascendentales desde el punto de vista forense.

El estudio de los rastros de sangre abarca dos momentos, a saber: el químico (reacciones de probabilidad, de certeza, etcétera) que se lleva a cabo en el laboratorio, fundamentalmente; y el reconstructivo, que se cumple en el escenario del delito, como signo del crimen, como indicio del violento hecho perpetrado. En efecto, por esas trazas e impresiones sangrientas, se reconstruye el crimen y, a veces, es posible llegar hasta el conocimiento del mecanismo del delito. Esta fase del examen e interpretación de las manchas y rastros de sangre en el lugar de los hechos, es la exploración preliminar, la cual constituye la primera parte del problema criminalístico a resolver. Después de esta fase, denominada hematoscópica, se procede a su levantamiento, a fin de ser transportadas y examinadas en el laboratorio.

Precisamente, es aquí, en el laboratorio, donde la sangre va a ser analizada, sometida a los métodos bioquímicos de rigor, los métodos experimentales pertinentes, es decir, donde se presenta cual un elemento básico de identificación, pues sólo allí puede determinarse si es o no humana, así como su procedencia e individualización<sup>22</sup>.

A lo largo del descubrimiento de rastros de sangre en el lugar de los hechos delictivos o en cualquier lugar, se ha marcado una diferencia. Ya que es de óptima ayuda tanto a investigadores como a laboratoristas clínicos.

Pero hay situaciones que pueden dejar en duda al investigador, es entonces que necesitará de ayuda profesional, esto es:



➤ *¿Las manchas son de sangre humana?*

Establecido lo anterior, o sea que las manchas recogidas y analizadas sí son de sangre, nos queda por resolver el anterior interrogante, que no es menos importante que el primero, puesto que una persona puede ser fácilmente acusada de homicidio, si luego de establecer varios indicios en su contra, se encuentra que también presenta manchas de sangre reciente y que, según afirma dicha persona, son de un animal poco antes sacrificado; esto se resolverá, sin lugar a dudas, en el laboratorio, mediante los procedimientos aplicados por un técnico en la materia<sup>30</sup>. Ya en el año 1250 a.C., se describe en el manual chino Hsi Yuan Lu un método para detectar manchas de sangre en un cuchillo, calentándolo y tratándolo con vinagre. La hemoglobina reacciona con el ácido acético formando cristales de hematina que aparecen como una mancha de color marrón. Tanto esta técnica como el método de Kastle-Meyer con fenolftaleína pueden ser realizadas fácilmente en el laboratorio. El análisis microscópico y el empleo de antisueros específicos en el laboratorio permiten determinar si los restos de sangre encontrados en la escena de un crimen pertenecen a la especie humana o no.

➤ *¿De qué parte del cuerpo proviene la sangre?*

Es otra pregunta que puede encerrar una solución básica", ya que en determinados casos el sospechoso puede alegar que las manchas que presenta son de sangre, pero que ella proviene de su propia nariz, lo cual se puede comprobar, mediante un análisis microscópico es posible descubrir partículas (por ejemplo, moco o pelos) que indican que de allí procede. También se puede establecer si es producto de la menstruación, posiblemente al descubrirse células epiteliales, y si es de estupro, debe contener residuos de semen y vellos de las partes genitales. Si en los análisis pertinentes no se descubre nada de lo anterior, ello no prueba que el sospechoso mienta, pero si tales residuos aparecen, es muy probable que dicha sangre sí proceda de donde él afirma<sup>30</sup>.

➤ *¿De qué persona procede la sangre?*

Este interrogante es quizá de mayor trascendencia que todos los anteriores, ya que por medio de los análisis adecuados podremos establecer con certeza por lo menos una prueba de descarte, esto es: si los análisis nos dicen que la sangre recogida es del sospechoso o el caso contrario, o sea, si dicha sangre sí es del sospechoso, nos permitirá en muchos casos dejar claro un punto básico de la investigación.

➤ *Edad de las manchas.*

Establecer el tiempo que lleva una mancha de sangre es muy difícil y se hace cada vez más a medida que va envejeciendo la misma; lo anterior se debe a que la sangre es un cuerpo orgánico y, por lo tanto, sometida a las leyes generales de la putrefacción y estas no son fijas e inmutables, puesto que están sujetas a los cambios ambientales. Es así como la humedad, la luz, el aire, etc. Cambian sus condiciones y modifican el proceso de envejecimiento. Fuera de las condiciones ambientales, tenemos otras que se

refieren a la calidad y naturaleza del soporte, puesto que también este influye para la conservación o más rápido envejecimiento de las manchas. Entre los últimos se cuenta el estaño, el cinc, y la seda; por el contrario, en la lana se conservan más tiempo en su estado normal <sup>30</sup>.

Se inició a principios de siglo un método para identificar sangre esto fue posible cuando Paúl Uhlenhuth, ayudante del Instituto de Higiene de la Universidad de Greifswald, en Alemania, escribió un ensayo científico titulado "Un método para el estudio de diferentes tipos de sangre, en particular para el diagnóstico diferencial de sangre humana", donde escribió: "Tomando sangre de los seres humanos, caballos y ganado, y disolviéndola después en una solución fisiológica (NaCl<sub>sol.</sub>) y secándola en un recipiente durante cuatro semanas, he logrado identificar la sangre humana rápidamente utilizando mi suero". Hasta entonces era imposible saber si una mancha seca era sangre, o si una mancha visible de sangre en la ropa o manos de alguien provenía de la víctima de un ataque, asesinato o violación, o simplemente de una gallina muerta.

Desde 1890, cuando Emil Von Behring descubrió el principio de las antitoxinas, los científicos de toda Europa habían buscado maneras de proteger a la gente y el ganado de diversas enfermedades. Von Behring, descubrió que cuando se inyecta a una vaca con una pequeña cantidad de la toxina de la difteria, el suero formaba antitoxinas defensoras. Estudios posteriores demostraron que la sangre formaba defensas en contra de todo tipo de proteínas provenientes del exterior, incluyendo la leche y la sangre de otros animales. Cuando la sangre poseía proteínas extrañas, el suero se oscurecía, en tanto que si se combinaba con sangre de su propia especie, permanecía claro. El suero funcionaba no sólo con sangre fresca, sino también con manchas de sangre antiguas, y obviamente secas.

Pero el saber que la sangre de una mancha es sangre humana, no es de gran ayuda para la policía y los expertos forenses. Todavía queda un largo camino que recorrer para individualizar dicha mancha. A lo largo del tiempo, los científicos han establecido varios indicadores genéticos para lograr esto<sup>33</sup>.

Dichos indicadores podemos encontrarlos dentro de los Criterios Convencionales de Identificación Humana:

- Identificación de personas vivas.
- Identificación de cadáveres.
- La identificación de individuos por técnicas bioquímicas que evalúan el fenotipo:
  - a) Grupos sanguíneos.
  - b) Proteínas plasmáticas.

c) Enzimas eritrocitarias.

d) Antígenos de histocompatibilidad (HLA). ADN.

Al llevar a cabo cada una de estas pruebas de indicadores genéticos en las muestras tomadas en el lugar de los hechos y en muestras tomadas de personas sospechosas, se va reduciendo el número de iguales posibles, ya que si un individuo no posee ninguno de los tipos, ello indica que no es el productor de la muestra del lugar de los hechos delictivos.

## **4. OBJETIVOS**

### OBJETIVO GENERAL:

- Conocer los métodos más usados en el ámbito forense, para la determinación de grupos sanguíneos, a partir de manchas de sangre.

### OBJETIVO ESPECÍFICOS:

- Adquirir conocimientos acerca de pruebas relacionadas con la determinación del grupo sanguíneo dentro de la Química Legal.
- Conocer los métodos de orientación y de confirmación utilizados para muestras sanguíneas.
- Evaluar el impacto en la procuración de justicia del estudio forense de los grupos sanguíneos.
- Promover el desarrollo científico y académico de la Química Legal y/o Forense con el fin de colaborar con una mejor administración de la Justicia.

## 5. TIPO DE ESTUDIO

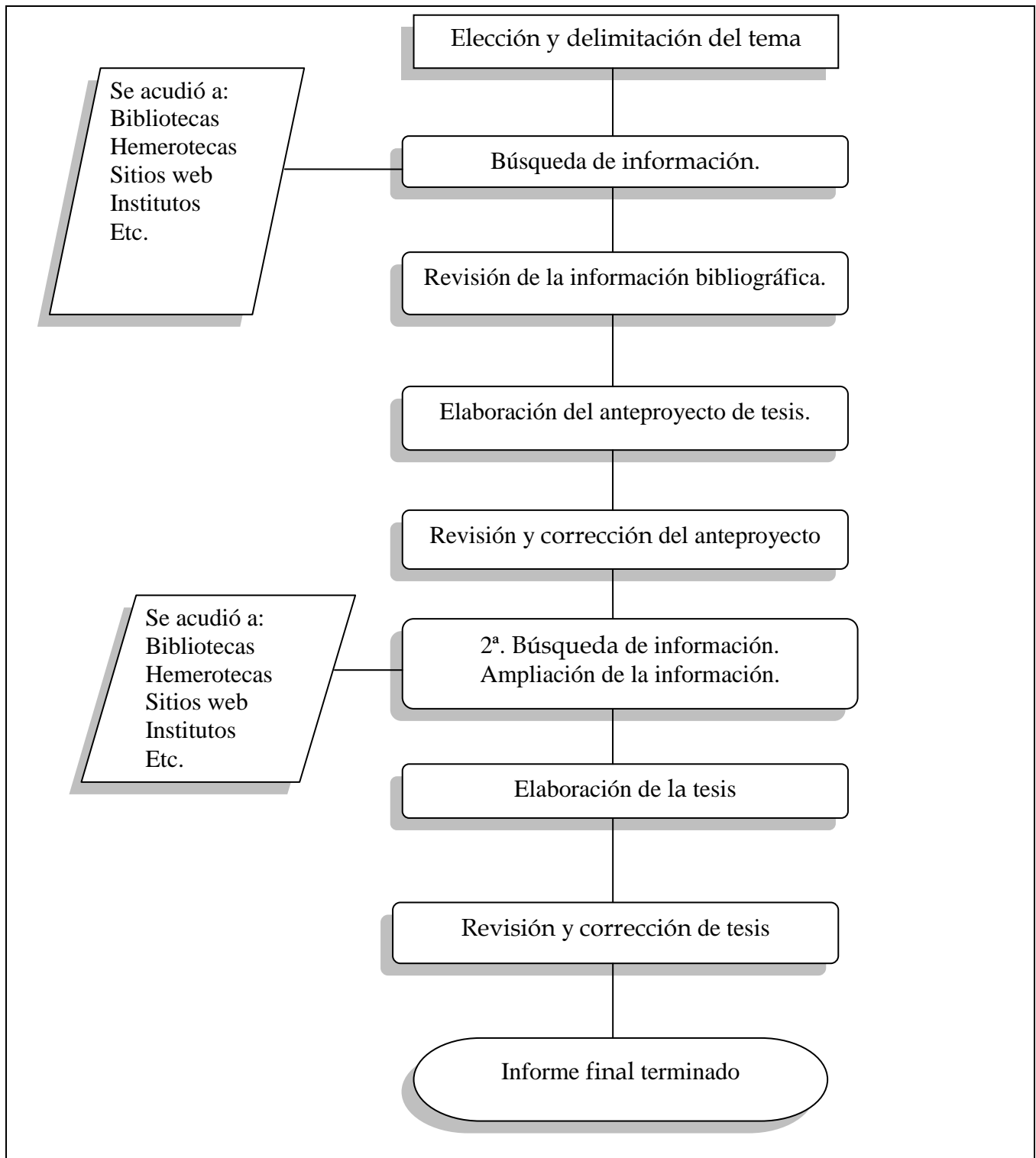
El estudio realizado es de tipo teórico monográfico, se revisaron técnicas utilizadas con mayor frecuencia en los laboratorios químicos forenses o legales.

Como se menciona en la metodología se llevó a cabo la revisión bibliográfica, hemerográficas y electrónica, en la recopilación de información acerca del tema, implicando la revisión de artículos de revista en formato electrónico, libros, revistas, manuales, enciclopedias y obviamente acudiendo a bibliotecas, hemerotecas, institutos, universidades, etc.

Se revisaron sitios web que presentaban información acerca del tema y se comparó dicha información con la obtenida de fuentes escritas e impresas, ya que este tipo de información suele contener errores.

Cabe señalar que en la búsqueda de la información se encontró muy poca acerca del tema estudiado, sin embargo fue suficiente para la realización de la tesis, sin embargo se compiló la información necesaria para leerla y posteriormente realizar la elección, justificación y delimitación del tema.

## 6. METODOLOGÍA



## 7. RESULTADOS.

### 7.1 ANTECEDENTES HISTORICOS

Ya en el año 1250 a.C., se describe en el manual chino Hsi Yuan Lu un método para detectar manchas de sangre en un cuchillo, calentándolo y tratándolo con vinagre. La hemoglobina reacciona con el ácido acético formando cristales de hematina que aparecen como una mancha de color marrón. Tanto esta técnica como el método de Kastle-Meyer con fenolftaleína pueden ser realizadas fácilmente en el laboratorio<sup>39</sup>.

Antes del siglo XVII, el delincuente cuyas ropas se habían manchado de sangre de la víctima a consecuencia de la comisión del ilícito, casi siempre escapaba a la acción de la justicia, en virtud de que en esa época no se contaba con técnicas que pudieran identificar la sangre. Por otro lado, en la actitud de la defensa, el delincuente negaba que las manchas encontradas en su ropa fueran de sangre. Ahora bien, en caso de aceptarlo, argumentaba que las manchas no eran de sangre humana, sino de cualquier otra especie animal, ante tales aseveraciones, los criminalistas se quedaban con los brazos cruzados, pues no existían técnicas confiables que dilucidaran tales cuestiones.

A la resolución del problema antes planteado, mucho ayudó el descubrimiento de los glóbulos rojos por Leeuwenhoek en 1673 y su más precisa descripción en 1773 por W. Hewson descubridor por otra parte del linfocito uno de los elementos figurados de la sangre. Tan importante aportación al campo de las ciencias fue utilizada por los médicos forenses de antaño, quienes a la vez fungían como criminalistas, para comprobar la presencia de estos corpúsculos sanguíneos en la mancha cuestionada. En caso afirmativo, no quedaba duda alguna de que la mancha era efectivamente sangre. Posteriormente fueron precisadas la forma y el tamaño de los glóbulos rojos humanos, permitiendo a los investigadores con esta nueva aportación que la mancha cuestionada además de ser sangre pertenecía a la especie humana.

La objeción que se le hizo a esta novedosa técnica consistió en que la comprobación de las células sanguíneas no se conseguía tan fácilmente tanto en manchas antiguas como en recientes, tal hecho trajo como consecuencia su empleo restringido.

En 1853, Teichmann descubrió que la hemoglobina podía descomponerse por distintos métodos en sus constituyentes. Pigmento y proteína. tan ilustre investigador fue el primero en observar al microscopio esta escisión, al someter la sangre en la acción del ácido acético glacial y el cloruro de sodio, produciéndose cristales de clorhidrato de hematina, denominados "cristales de Teichmann" en honor a su descubridor.

La comprobación científica de que los cristales de Teichmann eran absolutamente característicos de la sangre, y que, por otra parte, se podían obtener con mínimas cantidades



de esta, trajo como consecuencia que los criminalistas de la época aplicaran de inmediato dicha técnica para descubrir si una mancha era o no de sangre.

Strzyzowski hizo una variación a la técnica de Teichmann reemplazando el cloruro sódico por el yoduro sódico, y como resultado obtuvo cristales de iodohemina<sup>35</sup>.

En 1856 los alemanes Kirshhoff y Bunsen descubrieron el análisis espectral. Tres años después Hoppe Seyler, ayudante de Virchow en la universidad de Berlín en 1859 llamó la atención sobre el hecho de la materia colorante de la sangre absorbe un modo particular ciertos rayos del espectro. A partir de ese momento, se obtuvo en la técnica mencionada un excelente procedimiento para reconocer la sangre en los casos forenses.

Actualmente sabemos que la hemoglobina y la mayor parte de sus derivados poseen la propiedad de absorber los rayos luminosos de ciertas partes del espectro. De igual manera se conoce que el número, la situación, es decir, longitud de onda, y la intensidad de las bandas de absorción, caracterizan a cada sustancia.

Ahora bien, en el caso del examen criminalístico que las manchas de sangre, la búsqueda de hemocromógenos es preferida para la prueba espectroscópica, a causa de la rapidez de la preparación y sobre todo por la intensidad y limpieza de las dos bandas de absorción.

En 1861 en Groninga, el holandés Van Deen, observa que la hemoglobina no solo daba color a la sangre sino que principalmente poseía la cualidad de asimilar oxígeno al circular por los pulmones y llevarla a todo el torrente sanguíneo; por lo tanto, la hemoglobina estaba en condiciones de absorber oxígeno, pero también de liberarlo; Van Deen, al realizar experiencias, nota que los extractos alcohólicos de plantas de guayaco se teñían de azul al ponerlos en contacto con sangre y trementina el tinte azul se debía al oxígeno y no se producía en ausencia de sangre, de donde infirió Van Deen que la hemoglobina de la sangre liberaba oxígeno de la trementina y lo pasaba al guayaco.

El alemán Schönbein, en el año 1863 descubre otra prueba similar al observar que la hemoglobina tenía un fermento mediante el cual el peróxido de hidrógeno producía espuma blanca (catalasas que hidrolizan el agua oxigenada, liberando oxígeno y agua); más tarde comprobó también que esta reacción no solo se obtenía con la sangre sino también con otros oxidantes.

El hecho de existir en la sangre corpúsculos rojos y blancos, dio la oportunidad de comprobar su presencia al microscopio. Desafortunadamente, esto no es posible en manchas de sangre seca y además muchos animales también los poseen; por ello desde 1859 este método se unió al análisis espectral descubierto por Kirshhoff y Bunsen, quienes desde 1861 utilizaron los espectros de absorción para detectar las bandas de absorción de la hemoglobina. Roberto Magnanini, en 1898 señala que al tratar la sangre humana con hidróxido de potasio se formaba hematina la que poseía un espectro diferente <sup>35</sup>.

El cambio se producía a diferentes velocidades según se tratara de sangre humana o animal; con sangre humana lo obtenía en dos minutos, con la sangre de perro en seis, con la de caballo en tres, etc. El método tenía el inconveniente de ser útil solamente en sangre fresca.

Por lo antes expuesto está claro que a fines del siglo XIX la criminalística tan solo podía asegurar si una mancha era o no de sangre aplicando fundamentalmente las siguientes técnicas: visualización microscópica de glóbulos rojos, formación de “cristales de Teichmann” y análisis espectral. Esto quiere decir que quedaban las siguientes interrogantes por resolver: ¿La sangre es humana? y ¿a qué individuo pertenecen?.

En 1896, Jules Jean Baptiste Vincent Bordet, discípulo de Mechnikov, demostró que cuando un anticuerpo reacciona con un antígeno el complemento actúa en el proceso llamado fijación del complemento.

En 1900, Karl Landesteiner, biólogo austriaco, realizó la primera observación de aglutinación de los eritrocitos humanos por el suero humano, lo que condujo al genial descubrimiento de los grupos sanguíneos A, B, y O. En 1927 descubrió junto con Levine los factores M, N y P. Posteriormente, en 1937, junto con Winer, descubrió los factores Rh.

Los descubrimientos del austriaco han tenido importante aplicación en el campo de la criminalística, pues si bien es cierto que no permiten un diagnóstico, en algunos casos es posible eliminar a determinadas personas involucradas en ilícitos penales.

En 1899, Paul Uhlenhuth, quien por cierto no era médico forense, discípulo de Koch y Federico Löeffler, mientras buscaba un suero contra la fiebre aftosa, se encontró en un terreno científico del que saldría su propio descubrimiento, dicho campo era el estudio de sueros y su búsqueda le permitió observar que la sangre tenía una misteriosa capacidad para defenderse de los cuerpos extraños y para hacerlos inofensivos mediante su reacción<sup>36</sup>. El hecho de que el tejido hemático poseía la cualidad de producir anticuerpos específicos contra cualquier tipo de albumina extraña, ejerció sobre el investigador que nos ocupa particular atracción y publicó el 7 de febrero de 1901 el trabajo titulado: “Método para la diferenciación de los distintos tipos de sangre especialmente para la verificación diagnóstico diferencial de la sangre humana”. Al procedimiento de Uhlenhuth para identificar la especie animal de la cual procede la sangre se le denominó: “prueba de las precipitinas”.

En 1900, Uhlenhuth descubre que inyectando suero de diferentes animales o conejos, obtenía del conejo así tratado, un suero que precipitaba, pero solamente con la sangre del animal cuyo suero se había inyectado al conejo.

De esta manera, si se inyectaba sangre humana a los conejos, al cabo de 4 semanas se obtenía un suero que precipitaba solamente con sangre humana. Uhlenhuth da a esta prueba el nombre de “prueba de las precipitinas”.

En el año de 1904, Adler reporta su estudio sobre el empleo de la prueba de bencidina para la identificación de sangre, método que actualmente aun es utilizado por muchos investigadores forenses como prueba de orientación.

En el año de 1907, Lecha Marzo efectúa también importantes investigaciones para identificar sangre. Después de los estudios realizados por Teichmann, Takayama publica en 1912 su trabajo que consistía en un nuevo procedimiento para detectar sangre por medio de los cristales de piridina hemocromógeno.

La técnica de Kastle-Mayer que como prueba de orientación es hasta ahora la más eficiente, fue avalada por Glaister desde 1926.

En 1960, Kind introduce el método de absorción-elución que viene a abolir el tradicional de absorción-inhibición para determinaciones de los grupos A, B, O; Nichols y Pereyra en 1962, reportan su uso tanto para el sistema A, B, O, como para la detección del sistema Rh <sup>37</sup>.

Carracedo enumeró los hitos principales en el perfeccionamiento de las técnicas para determinar la identidad biológica. Los métodos iniciales (de las primeras décadas del siglo XX) consideraban los grupos sanguíneos ABO (antígenos tipo A ó B). En 1940 se descubrió el sistema Rh que luego permitió describir nuevos subgrupos sanguíneos. "De todos modos, lo único que se podía saber con certeza era si el padre presunto no era el padre biológico. No se podía determinar la inclusión", comentó el especialista. Más tarde se descubrieron los antígenos de histocompatibilidad, el HLA (Human Leukocyte Antigen), pero no se podía aplicar con material deteriorado. Hoy, este método se emplea en trasplantes de órganos.

De forma breve se han relatado los antecedentes que tienen los métodos científicos que ahora se utilizan en el laboratorio de química forense, en especial los de inmunohematología forense.

## 7.2 La sangre

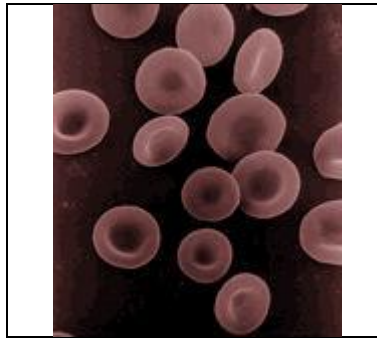


Figura 1. Eritrocitos o glóbulos rojos.

### 7.2.1. Introducción

La sangre está compuesta por muchos tipos de corpúsculos; estos elementos constituyen alrededor de un 45% de la sangre, lo que se conoce con el nombre de hematocrito. El otro 55% es plasma, un fluido amarillento que conforma el medio líquido de la sangre, compuesto por agua y sales. El pH normal de la sangre arterial humana es aproximadamente de 7.40. La sangre constituye alrededor del 7 al 8% del peso del cuerpo humano promedio y, por lo tanto, un adulto tiene un volumen de sangre de aproximadamente cinco litros, de los cuales 2.7 a 3 litros es plasma. La sumatoria de las superficies de todos los eritrocitos en la anatomía humana sería alrededor de 2000 veces mayor que la superficie exterior del cuerpo humano.

Los glóbulos rojos se conocen también como hematíes y se forman en la médula ósea roja. Los glóbulos blancos pueden ser polimorfonucleares (eosinófilos, basófilos y neutrófilos) o mononucleares como los monocitos y los linfocitos (T, B); también se originan en la médula ósea roja. Las plaquetas (trombocitos) son células anucleadas que sirven para taponar las lesiones que pudieran afectar a los vasos sanguíneos y se forman en la médula ósea a partir de la fragmentación de una célula gigante llamada megacariocito <sup>21</sup>.

La sangre es un tejido fluido de un color rojo característico por la presencia del pigmento hemoglobínico contenido en los eritrocitos. La sangre es considerada un tipo de tejido conectivo especializado, con una matriz coloidal de consistencia líquida y constitución compleja. Presenta una fase sólida, integrada por los elementos formes, que comprende a los glóbulos blancos, los glóbulos rojos y las plaquetas; y una fase líquida, o fracción acelular (matriz), representada por el plasma sanguíneo <sup>38</sup>.

La sangre es un tejido que circula a través del cuerpo. Es la encargada de transportar el oxígeno a todo el organismo y de recoger el bióxido de carbono producido por los tejidos, para transportarlo al pulmón y ahí cambiarlo nuevamente por oxígeno.

La sangre funciona principalmente como medio logístico de distribución e integración sistémica, cuya contención en los vasos sanguíneos (espacio vascular) admite su distribución (circulación sanguínea) hacia casi todo el cuerpo.

En los humanos y otras especies que utilizan la hemoglobina, la sangre arterial y oxigenada es de un color rojo brillante, mientras que la sangre venosa y parcialmente desoxigenada toma un color rojo oscuro y opaco. Sin embargo, debido a un efecto óptico causado por la forma en que la luz penetra a través de la piel, las venas se ven de un color azul <sup>38</sup>.



Figura 2. Tubo con muestra de sangre <sup>21</sup>.

Como tejido, la sangre se compone de células y componentes extracelulares (su matriz extracelular), estas dos fracciones tisulares vienen representadas por:

1. Partículas sólidas, aproximadamente en un 45-50 %. Tal magnitud porcentual se conoce con el nombre de hematocrito (fracción "celular"), adscribible casi en totalidad a la masa eritrocitaria. También llamados elementos formes, son elementos semisólidos y particulados (corpúsculos) son variados en tamaño, estructura y función, representados por células y componentes derivados de células;
  - a. Las **células sanguíneas**, que son los *glóbulos blancos* o *leucocitos*, células que "están de paso" por la sangre para cumplir su función en otros tejidos;
  - b. Los **derivados celulares**, que no son células estrictamente sino fragmentos celulares, están representados por los *eritrocitos* y las *plaquetas*, siendo los únicos componentes sanguíneos que cumplen sus funciones estrictamente dentro del espacio vascular.
2. Plasma sanguíneo, aproximadamente en un 50-55% de la sangre; es un fluido translúcido y amarillento que representa la matriz extracelular líquida en la que están suspendidos los elementos formes <sup>21</sup>.

## 7.2.1. COMPONENTES SANGUINEOS:



Figura 3. Indicio sanguíneo <sup>21</sup>.

### 1. Partículas sólidas, elementos figurados o elementos formes

#### a) Glóbulos rojos o Eritrocito

Los glóbulos rojos, hematíes o eritrocitos constituyen el 96%. En los mamíferos, estos corpúsculos carecen de núcleo y orgánulos, por lo cual no son células estrictamente hablando. Contienen la hemoglobina de la sangre y son los encargados de distribuir el oxígeno.

En los glóbulos rojos están las proteínas que definen a los distintos grupos sanguíneos. Su valor normal está entre 4 300 000 y 5 900 000 por mm<sup>3</sup>.

Los eritrocitos tienen una forma oval, aplanada, con una depresión en el centro (esta forma facilita el intercambio de oxígeno con el medio que los rodea). Carecen de núcleo, porque cuando un glóbulo rojo madura, expulsa su núcleo en la médula ósea antes de entrar en el torrente sanguíneo (esto no ocurre en aves, anfibios y ciertos animales).

Los eritrocitos en humanos adultos se forman en la médula ósea. Sin embargo, los hematíes de los animales se forman en el interior de los tejidos vasculares.

Se encargan de transportar oxígeno desde los pulmones al resto del cuerpo mediante la hemoglobina <sup>21</sup>.

La hemoglobina (Hb) es una heteroproteína de la sangre, de peso molecular 68 000 (68 kD), de color rojo característico, que transporta el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos, en mamíferos, ovíparos y otros animales.

La forman cuatro cadenas polipeptídicas (globinas) a cada una de las cuales se une un grupo hemo, cuyo átomo de hierro es capaz de unirse de forma reversible al oxígeno. Sus valores de referencia son:

- ✓ Para Hombres:  $16,0 \pm 2,0$ .
- ✓ Para Mujeres:  $14,0 \pm 2,0$
- ✓ Los niveles normales de hemoglobina están entre los 12.5 y 17 gramos por litro y es proporcional al número de hematíes.

Constituye el 90% de los eritrocitos y es la que les proporciona su color característico rojo, aunque esto sólo se da cuando el glóbulo rojo está cargado de oxígeno. Cuando un eritrocito esté cargado de dióxido de carbono, será azul. Tras una vida media de 120 días, los glóbulos rojos son destruidos y extraídos de la sangre por el bazo, el hígado y la médula, donde la hemoglobina se desintegra. Sin embargo, el hierro es reutilizado para formar nueva hemoglobina <sup>21</sup>.

El grupo hemo se forma por:

1. Unión de la Succinil CoA (formado en ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico) a un aminoácido glicina formando un grupo pirrol.
2. Cuatro grupos pirrol se unen formando la Protoporfirina IX.
3. La protoporfirina IX se une a una molécula de hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) formando el grupo hemo <sup>50</sup>.
4. La hemoglobina encerrada exclusivamente en los glóbulos rojos es una proteína que contiene el grupo "hemo" (formado por moléculas de hierro que enlazan el oxígeno en los pulmones o en los bronquios y la liberan por el resto del cuerpo). También transporta productos residuales como el dióxido de carbono, la mayoría del cual se encuentra disuelto en el plasma sanguíneo <sup>21</sup>.

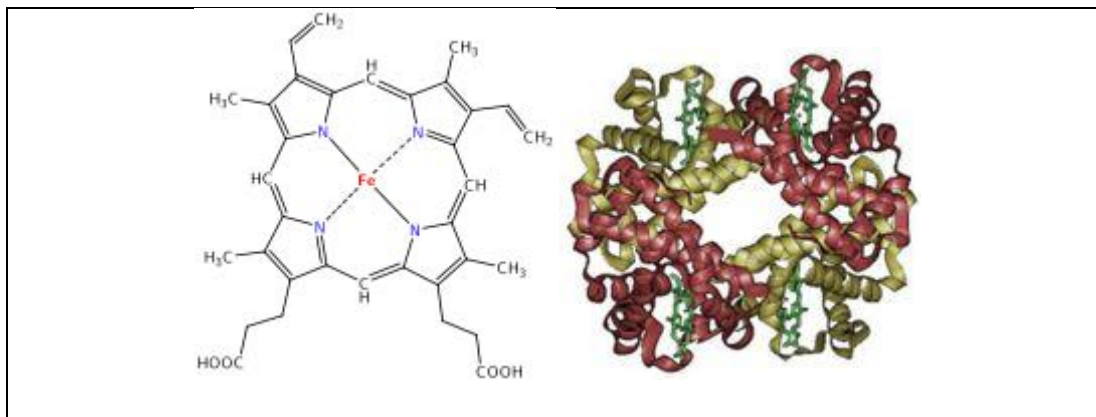


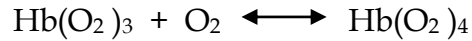
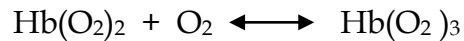
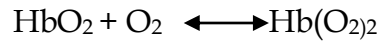
Figura 4 y 5. Grupo hemo, a la izquierda, y cadena de hemoglobina a la derecha <sup>50</sup>.

## Grupo Hemo

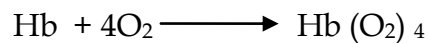
Cuando la hemoglobina está unida al oxígeno, se denomina oxihemoglobina o hemoglobina oxigenada, dando el aspecto rojo o escarlata intenso característico de la sangre arterial. Cuando pierde el oxígeno, se denomina hemoglobina reducida, y presenta el color rojo oscuro o pardó de la sangre venosa (se manifiesta clínicamente por cianosis) <sup>50</sup>.

- Reacción paso a paso:





- Reacción total:



#### b) Plaquetas

Son fragmentos celulares pequeños, ovales y sin núcleo. Se producen en la médula ósea. Aumentan cuando se produce una hemorragia aguda, una enfermedad o en caso de patología de la sangre. Disminuyen en casos de infecciones muy graves, con una actividad excesiva en el bazo (cuya función es ayudar en la defensa contra las infecciones).

Las plaquetas o trombocitos (1%), son las responsables de la cicatrización de las heridas (coagulación). Su valor normal se encuentra entre 150 000 y 450 000 por  $\text{mm}^3$  (en España, por ejemplo, el valor medio es de 226 000 por microlitro con una desviación estándar de 46 000). Son células encargadas de cerrar los vasos sanguíneos cuando se produce una herida, formando un coágulo en el lugar de la lesión encerrando glóbulos rojos en una red, lo cual ayuda a su cicatrización.

En el proceso de coagulación, las plaquetas contribuyen con tromboplastina el cual interactúa junto con iones de calcio con la protrombina activándola a trombina. Esta a su vez activa el fibrinógeno a fibrina la cual tiene la propiedad pegajosa de formar coágulos. Otros factores de coagulación intervienen en este proceso.

#### c) Glóbulos blancos o leucocito

Los glóbulos blancos o leucocitos (3%) forman parte del sistema inmunológico; son los encargados de destruir los agentes infecciosos. Su valor normal está entre 3500 y 11000 por  $\text{mm}^3$ . Tienen como función principal defender al organismo contra las infecciones. Según su citoplasma y su núcleo se dividen en granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) con núcleo redondeado y numerosos gránulos en su citoplasma, formados en las células madres de la médula ósea, y agranulocitos, es decir, sin gránulos en el citoplasma (monocitos y linfocitos), formados también en la médula ósea y en el timo.

## Granulocitos

- Neutrófilos: Valor normal entre 2000 y 7500 por  $\text{mm}^3$ . Son los más numerosos, ocupando un 65% a 75% de los leucocitos. Se encargan de atacar y fagocitar sustancias extrañas (bacterias, agentes externos, etc.) que entran en el organismo. En situaciones de infección o inflamación su número aumenta en la sangre.
- Basófilos: Segregan sustancias como la heparina, de propiedades anticoagulantes, y la histamina que estimula el proceso de la inflamación. Componen un 0.5% de los glóbulos blancos.
- Eosinófilos: Aumentan en enfermedades producidas por parásitos, en las alergias y en el asma. Son aproximadamente 2% a 5% de los leucocitos.

## Agranulocitos

- Monocitos: Valor normal entre 200 y 800 por  $\text{mm}^3$  (3% a 8% del total de glóbulos blancos). Esta cifra se eleva casi siempre por infecciones originadas por virus o parásitos. También en algunos tumores o leucemias. Son células con núcleo definido y con forma de riñón.
- Linfocitos: Valor normal entre 1000 y 4500 por  $\text{mm}^3$  (3% a 8% del total de glóbulos blancos). Aumentan sobre todo en infecciones por virus o parásitos. También en algunos tumores o leucemias, etc.

## 2. Plasma sanguíneo

El plasma sanguíneo es esencialmente una solución acuosa conteniendo 96% agua, 4% proteínas y algunos rastros de otros materiales (hormonas, electrolitos, anticuerpos, etc.). El plasma sanguíneo es la porción líquida de la sangre en la que están inmersos los elementos formes. Es salado y de color amarillento. Además de transportar las células de la sangre, también lleva los alimentos y las sustancias de desecho recogidas de las células. El plasma origina el suero sanguíneo cuando se coagula la sangre.

El plasma es una mezcla de proteínas, aminoácidos, glúcidos, lípidos, sales, hormonas, enzimas, anticuerpos, urea, gases en disolución y sustancias inorgánicas como sodio, potasio, cloruro de calcio, carbonato y bicarbonato.

El agua constituye el 91% y las proteínas el 8%. Estas proteínas son: fibrógeno (para la coagulación), globulinas (regulan el contenido del agua en la célula, forman anticuerpos contra enfermedades infecciosas), albúminas (ejercen presión osmótica para distribuir el agua entre el plasma y los líquidos del cuerpo) y lipoproteínas (amortiguan los cambios de pH de la sangre y de las células y hacen que la sangre sea más viscosa que el agua). Otras proteínas plasmáticas importantes actúan como transportadores hasta los tejidos de nutrientes esenciales como el cobre, el hierro, otros metales y diversas hormonas. Los componentes del plasma se forman en el hígado (albúmina y fibrógeno), las glándulas endocrinas (hormonas), y otros en el intestino.

Componentes del plasma sanguíneo:

- ✚ Albúmina
- ✚ factores de coagulación de la sangre
- ✚ inmunoglobulinas (anticuerpos)
- ✚ hormonas
- ✚ otras proteínas varias
- ✚ varios electrolitos (principalmente sodio, potasio y cloro)

Juntos, plasma y corpúsculos forman un fluido no-newtoniano, cuyas propiedades de flujo son adaptadas únicamente a la arquitectura de los vasos sanguíneos.

### 7.2.3. CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES DE LA SANGRE

A continuación se mencionan las principales características de la sangre y sus funciones:

#### ❖ pH

La sangre suele tener un pH entre 7.1 y 7.4. Sus variaciones más allá de esos valores son condiciones que deben corregirse pronto (alcalosis, cuando el pH es demasiado básico, y acidosis, cuando el pH es demasiado ácido).

#### ❖ Elementos que transporta

También debe transportar el O<sub>2</sub> (para su consumo por las células) y el CO<sub>2</sub> (para su eliminación).

El O<sub>2</sub> es transportado por la hemoglobina de los hematíes y el CO<sub>2</sub> en parte por los hematíes y otra parte disuelto en plasma y en forma de carbonatos. Estos carbonatos y el CO<sub>2</sub>, entre otros, contribuyen a tamponar la sangre haciendo el pH más estable.

Las proporciones de estos gases varían de la sangre venosa a la arterial y son de 100 Hgmm presión parcial de O<sub>2</sub> y 40 Hgmm de CO<sub>2</sub> en la arterial y 40 Hgmm de O<sub>2</sub> y 46 Hgmm de CO<sub>2</sub> en la venosa.

#### ❖ Algunos valores promedio

Una persona adulta tiene alrededor de 4-5 litros de sangre, a razón de unos 65 a 71 ml de sangre por kilogramo de peso corporal (8%).

Silenciosa pero eficientemente el plasma sanguíneo hace el trabajo, proveyendo alimentación para cada célula en el cuerpo. Reparte hidratos de carbono, grasas, proteínas, minerales, sales y vitaminas a donde se necesitan.

En un milímetro cúbico, el hombre tiene unos cinco millones de glóbulos rojos. Una mujer tiene aproximadamente medio millón menos. Cada glóbulo rojo es un diminuto disco bicóncavo. No se pueden ver a simple vista, porque se requiere unos 1280 glóbulos colocados lado a lado para llenar un centímetro.

Los glóbulos blancos quedan eclipsados por sus compañeros rojos, en cantidad y no en importancia, hay unos 5,000 a 10,000 en cada milímetro cúbico. Éstos, a diferencia de los glóbulos rojos, son capaces de movimientos independientes. Se pueden mover a donde se les necesite, sea dentro de la corriente sanguínea o fuera de ésta. Dicho sencillamente, su tarea crucial es la defensa contra los microorganismos que ingresan a diario al torrente vascular.

## ❖ Fisiología.

La fisiología de la sangre está relacionada con los elementos que la componen y por los vasos que la transportan, de tal manera que:

- Transporta el oxígeno desde los pulmones al resto del organismo, vehiculizado por la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos.
- Transporta el anhídrido carbónico desde todas las células del cuerpo hasta los pulmones.
- Transporta los nutrientes contenidos en el plasma sanguíneo, como glucosa, aminoácidos, lípidos y sales minerales desde el hígado, procedentes del aparato digestivo a todas las células del cuerpo.
- Transporta mensajeros químicos, como las hormonas.
- Defiende el cuerpo de las infecciones, gracias a las células de defensa o glóbulo blanco.
- Responde a las lesiones que producen inflamación, por medio de tipos especiales de leucocitos y otras células.
- Coagulación de la sangre y hemostasia: Gracias a las plaquetas y a los factores de coagulación.
- Rechaza el trasplante de órganos ajenos y alergias, como respuesta del sistema inmunitario.
- Homeostasis en el transporte del líquido extracelular, es decir en el líquido intravascular.

## ❖ Producción y degradación

Las células sanguíneas son producidas en la médula ósea; este proceso es llamado hematopoyesis. El componente proteico es producido en el hígado, mientras que las hormonas son producidas en las glándulas endocrinas y la fracción acuosa es mantenida por el riñón y el tubo digestivo.

Las células sanguíneas son degradadas por el bazo y las células Kupffer en el hígado. Este último, también elimina las proteínas y los aminoácidos (el hígado secreta muchas pequeñas proteínas en la orina). Los eritrocitos usualmente viven algo más de 120 días antes de que sean sistemáticamente reemplazados por nuevos eritrocitos creados en el proceso de hematopoyesis.

### ❖ Transporte de oxígeno

La oxigenación de la sangre es medida según la presión parcial del oxígeno, 98.5% del oxígeno es combinado con la hemoglobina. Solo el 1.5% es físicamente disuelto. La molécula de hemoglobina es la encargada del transporte de oxígeno en los mamíferos y otras especies.

Con la excepción de la arteria pulmonar y la arteria umbilical, y sus venas correspondientes, las arterias transportan la sangre oxigenada desde el corazón y la entregan al cuerpo a través de las arteriolas y los tubos capilares, donde el oxígeno es consumido; luego las venas transportan la sangre desoxigenada de regreso al corazón.

Bajo condiciones normales, en humanos, la hemoglobina en la sangre que abandona los pulmones está alrededor del 96-97% saturada con oxígeno; la sangre "desoxigenada" que retorna a los pulmones está saturada con oxígeno en un 75% . Un feto, recibiendo oxígeno a través de la placenta, es expuesto a una menor presión de oxígeno (alrededor del 20% del nivel encontrado en los pulmones de un adulto), es por eso que los fetos producen otra clase de hemoglobina con mayor afinidad al oxígeno (hemoglobina F) para poder extraer la mayor cantidad posible de oxígeno de su escaso suministro.

### ❖ Transporte de dióxido de carbono

Cuando la sangre sistémica arterial fluye a través de los capilares, el dióxido de carbono se dispersa de los tejidos a la sangre. Algo del dióxido de carbono es disuelto en la sangre. Algo del dióxido de carbono reacciona con la hemoglobina para formar carboamino hemoglobina. El resto del dióxido de carbono es convertido en bicarbonato e iones de hidrógeno. La mayoría del dióxido de carbono es transportado a través de la sangre en forma de iones de bicarbonato.

### ❖ Transporte de iones de hidrógeno

Algo de la oxihemoglobina pierde oxígeno y se convierte en desoxihemoglobina. La desoxihemoglobina tiene una mayor afinidad con  $H^+$  que la oxihemoglobina por lo cual se asocia con la mayoría de los iones de hidrógeno.

### ❖ Color

En los humanos y otras especies que utilizan la hemoglobina, la sangre oxigenada es de un color rojo y brillante. La sangre desoxigenada es de un color rojo oscuro y opaco, que puede ser vista durante una donación de sangre o cuando se toman muestra de sangre de las venas. Sin embargo, debido a un efecto óptico causado por la forma en que la luz penetra a través de la piel, las venas se ven de un color azul. Esto ha llevado a la concepción errónea de que antes que la sangre de las venas sea expuesta al aire es de color azul.

## ❖ Circulación de la sangre

La función más importante de la circulación es el transporte de sustancias para que un organismo realice sus actividades vitales. En los seres unicelulares, los nutrientes y el oxígeno son obtenidos directamente del medio ambiente y penetran al interior de las células a través del sistema membranal. En las plantas como los helechos, las gimnospermas y las angiospermas se encuentran un conjunto de vasos a través del cual se transportan las sustancias nutritivas <sup>21, 38, 43, 50</sup>.



### 7.3 Grupos sanguíneos.

Existen unos 15 sistemas de grupos sanguíneos bien establecidos, pero con frecuencia sólo se emplean unos cuantos para analizar manchas de sangre en casos forenses (ver tabla 1). Los grupos sanguíneos son definidos por antígenos en la superficie de los glóbulos rojos. Un antígeno es una sustancia que reacciona a determinada proteína.

Tabla 1. Sistemas Antigénicos Eritrocitarios.

Sistema	Antígenos	Año de descubrimiento
ABO	A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , B, O	1900
MNSs	M, N, S, s	1927
P	P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub>	1927
Rh	D, C, E, c, e	1940
Lutheran	Lu <sup>a</sup> , Lu <sup>b</sup>	1945
Kell	K, k	1946
Lewis	Le <sup>a</sup> , Le <sup>b</sup>	1946
Duffy	Fy <sup>a</sup> , Fy <sup>b</sup>	1950
Kidd	Jk <sup>a</sup> , Jk <sup>b</sup>	1951
Diego	Di <sup>a</sup> , Di <sup>b</sup>	1954
Catwright	Yt <sup>a</sup> , Yt <sup>b</sup>	1956
I	I, I	1956
Xg	Xg <sup>a</sup>	1962
Dombrock	Do <sup>a</sup> , Do <sup>b</sup>	1965
Colton	Co <sup>a</sup> , Co <sup>b</sup>	1965

Las dos clasificaciones más importantes para describir grupos sanguíneos en humanos son **los** antígenos y el factor Rh. Las transfusiones de sangre entre grupos incompatibles pueden provocar una reacción inmunológica que puede desembocar en hemólisis, anemia, fallo renal, shock, o muerte <sup>51</sup>.

Tal vez el sistema más conocido de grupos sanguíneos es el ABO; el cual fue el primer sistema descrito a principios del siglo XX. Se realiza la tipificación de sangre entera separando el suero de la sangre entera, y sometiendo a prueba el suero con sueros anti-A y anti-B.

Las reacciones determinan si el tipo sanguíneo es A, B, AB ú O. Las pruebas de manchas de sangre con ABO también pueden realizarse con otros métodos algunos de los cuales se han utilizado desde la década de 1930.

En dicha década también quedó establecido que gran parte de las manchas ocasionadas por líquidos corporales contienen sustancias solubles del grupo sanguíneo ABO. Con el tiempo, se determinó que la mayoría de la gente emite sustancias ABO en su semen, saliva y muchos otros fluidos corporales. A estas personas se les conoce como secretores.

Hasta el momento se conoce que en otros países se aplican tres pruebas de grupo sanguíneo: ABO, Rhesus (Rh) y Lewis (Le) <sup>33</sup>.

Se determina el tipo sanguíneo humano por alelos co-dominantes. Un alelo es una de varias formas distintas de información genética que está presente en nuestro ADN en un lugar específico en un cromosoma específico.

Los grupos sanguíneos están constituidos por aloantígenos presentes en la superficie de la membrana de los eritrocitos o glóbulos rojos, que se transmiten hereditariamente de padres a hijos según las leyes de la genética mendeliana. Su importancia clínica se debe a sus propiedades sensibilizantes, es decir, son capaces de provocar la formación de anticuerpos e inducir una reacción inmune.

El sistema Rh fue descubierto en 1940 por Landsteiner y Wiener tras investigaciones realizadas con el mono Rhesus. Como resultado de dichas investigaciones se pasó a denominar Rh + (positivos) a los individuos que poseían el antígeno Rh, llamado posteriormente antígeno D, presente en el 85% de las personas, y Rh - (negativos) aquellos que no lo tienen. Su importancia clínica radica en la gran inmunogenicidad del antígeno D. Ello conlleva que toda persona D -, deba recibir sangre D - (44).

### 7.3.1. Sistema ABO

Una de las cosas más ampliamente divulgadas acerca de la sangre humana es que hay varios tipos de sangre o grupos sanguíneos. Por ejemplo, la sangre del tipo (o grupo) A, o de algunos de los otros tipos comunes, B, AB y O. Si a una persona con un tipo de sangre se le transfunde sangre de otro tipo se puede enfermar gravemente e incluso morir. Así es que los hospitales tratan de hallar sangre compatible en los bancos de sangre, es decir, sangre del mismo tipo que la del paciente. Un grupo sanguíneo es una forma de agrupar ciertas características de la sangre que dependen de los antígenos presentes en la superficie de los glóbulos rojos y en el suero de la sangre.

El sistema ABO fue el primer sistema antigénico que se describió y sigue siendo el más importante en la práctica transfusional. El grupo sanguíneo ABO viene determinado por la presencia o ausencia de dos antígenos diferentes, A o B, sobre la superficie del hematíe y por la presencia constante en el suero de cada individuo de anticuerpos que reaccionan con los antígenos ausentes en sus hematíes.

La importancia transfusional del sistema ABO radica en las características de sus anticuerpos: naturales, presentes en todos los individuos, activos a 37°C y capaces de activar el complemento y de provocar una destrucción intravascular de los hematíes, por lo que, si no se respetan escrupulosamente las reglas de compatibilidad, pueden producirse reacciones graves, incluso fatales.

La determinación de los grupos ABO es fundamental en la práctica transfusional, en medicina forense, en genética y junto con la determinación de otros grupos sanguíneos, en antropología y medicina legal <sup>44</sup>. El tipo de sangre es determinado, en parte, por los antígenos de los grupos sanguíneos A, B, O presentes en los glóbulos rojos.

Las personas con sangre del tipo A tienen glóbulos rojos que expresan antígenos de tipo A en su superficie y anticuerpos contra los antígenos B en el suero de su sangre. Las personas con sangre del tipo B tienen la combinación contraria, glóbulos rojos con antígenos de tipo B en su superficie y anticuerpos contra los antígenos A en el suero de su sangre.

Los individuos con sangre del tipo O ó 0 (cero) no expresan ninguno de los dos antígenos (A o B) en la superficie de sus glóbulos rojos pero pueden fabricar anticuerpos contra ambos tipos, mientras que las personas con tipo AB expresan ambos antígenos en su superficie y no fabrican ninguno de los dos anticuerpos.

A causa de estas combinaciones, el tipo 0 puede ser transfundido sin ningún problema a cualquier persona con cualquier tipo AB0 y el tipo AB puede recibir de cualquier tipo AB0. La denominación «O» y «cero» es confusa, y ambas están muy extendidas. El austríaco Karl Landsteiner designó los grupos sanguíneos a principios del s. XX. Algunas fuentes indican que "O" podría deberse a la preposición *Ohne*, que es "sin" en alemán (Sin antígeno). Sin embargo allí se dice *Null Blutgruppe*, y casi nunca la alternativa *O Blutgruppe*. En alemán «O» se dice /o/ y 0 (cero) se dice *Null*. En inglés «O» se lee /ou/ y a veces el cero se lee /ou/ (por

ejemplo en un nº de teléfono). Sistema ABO y *O blood-group* es de uso mayoritario en inglés. Otros idiomas de Europa mantienen la designación «null», en sus variantes *zero, cero, nula*, etc. En Latinoamérica es más común «O positivo», evitando la similitud «cero positivo» con el término «seropositivo», referido al VIH, que nada tiene que ver con los grupos sanguíneos.

El motivo exacto por el que las personas nacen con anticuerpos contra un antígeno al que nunca han sido expuestas es desconocido. Se piensa que algunos antígenos bacterianos son lo bastante similares a estos antígenos A y B que los anticuerpos creados contra la bacteria reaccionan con los glóbulos rojos ABO-incompatibles. El científico austríaco Karl Landsteiner fue premiado con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1930 por sus trabajos en la caracterización de los tipos sanguíneos ABO (Anexo 1).

	Grupo A	Grupo B	Grupo AB	Grupo O
Sangre roja célula				
Anticuerpos	Anti-B	Anti-A	Ningunos	Anti-A y Anti-B
Antígenos	A antígeno	B antígeno	A y B antígeno	No antígenos

Figura 6: Los grupos sanguíneos <sup>52</sup>.

### Herencia del tipo A, B, O

Son controlados por un solo gen con tres alelos: O (SIN, por no poseer los antígenos ni del grupo A ni del grupo B), A, B. El alelo A da tipos A, el B tipos B y el alelo i tipos O siendo A y B alelos dominantes sobre i. Así, las personas que heredan dos alelos ii tienen tipo O; AA o Ai dan lugar a tipos A; y BB o Bi dan lugar a tipos B. Las personas AB tienen ambos fenotipos debido a que la relación entre los alelos A y B es de codominancia. Por tanto, es prácticamente imposible para unos progenitores AB el tener un hijo con tipo O.

## Fenotipo Bombay

Una posible explicación a este hecho es que el hijo o los progenitores clasificados como tipo O tengan en realidad el, muy raro, *fenotipo Bombay*; ambos han heredado dos alelos recesivos del gen **H**, (su grupo sanguíneo es  $O_h$  y su genotipo es "hh"), y por tanto no producen la proteína "H" que es la precursora de los antígenos A y B. De esta forma no supone ningún problema la presencia de anticuerpos A o B en el suero pues los antígenos respectivos no son producidos al no existir su precursor. Las escasas personas con este fenotipo no expresan el antígeno "H" en sus glóbulos rojos y, por tanto, tampoco producen antígenos A o B. Sin embargo sí producen anticuerpos para H (que está presente en todos los glóbulos rojos excepto en aquellos con fenotipo hh) así como para A y B y por tanto sólo son compatibles con donantes del mismo tipo hh, es decir, las personas con el grupo sanguíneo con el fenotipo Bombay pueden ser únicamente transfundidas con personas del mismo grupo sanguíneo<sup>51</sup>.

### 7.3.2. Genotipos

La herencia del sistema ABO es controlada de acuerdo a las Leyes de Mendel y se hace mediante 4 genes comunes: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, y O y una serie de genes alelos menos frecuentes como son A<sub>3</sub>, A<sub>x</sub>, A<sub>m</sub>, etc.

En la gran mayoría de los casos, la herencia es directa y la combinación de los tres alelos A, B, y O, determinan los cuatro grupos sanguíneos: A, B, AB y O <sup>60</sup>.

Tabla 2. Antígenos y Anticuerpos del sistema ABO <sup>60</sup>.

Grupo sanguíneo	Antígenos	Anticuerpos	Genotipo
O	H	Anti-A, B	OO
A	A	Anti-B	AO-AA
B	B	Anti-A	BO-BB
AB	A y B	Ninguno	AB

Alelos codominantes

Se determina el tipo sanguíneo humano por alelos co-dominantes. Un alelo es una de varias formas distintas de información genética que está presente en nuestro ADN en un lugar específico en un cromosoma específico.

Tabla 3. Alelos diferentes por el tipo sanguíneo en el ser humano <sup>43</sup>:

Tipos Sanguíneos	Para sencillez se llaman
I <sup>A</sup>	A
I <sup>B</sup>	B
i	O

Cada persona tiene dos alelos del sistema ABO porque heredamos un alelo de nuestra madre biológica y un alelo de nuestro padre biológico.

Una descripción de la pareja de alelos en nuestro ADN se llama genotipo.

Porque hay tres alelos distintos, existen seis genotipos diferentes al locus genético del sistema sanguíneo humano.

Se usa un análisis de sangre para determinar si las características de A y/o B están presentes en la muestra.

Tabla 4. Alelos diferentes por el tipo sanguíneo en el ser humano <sup>43</sup>

Alelo de la madre	Alelo del padre	El genotipo del descendiente	Tipo sanguíneo del descendiente
A	A	AA	A
A	B	AB*	AB
A	O	AO	A
B	A	AB*	AB
B	B	BB	B
B	O	BO	B
O	O	OO	O



### 7.3.3. Bioquímica de los antígenos.

Gran parte del conocimiento que se tiene acerca de la bioquímica de los antígenos ABH provienen de los estudios realizados en las sustancias A, B, y H presente en las secreciones. La razón para ello es que estas sustancias se encuentran en muy pequeñas cantidades en los glóbulos rojos, en cambio su concentración es superior en las secreciones. Las investigaciones en estos productos establecieron, que la especificidad de estas sustancias ABH era debida a estructuras de carbohidratos unidos a polipéptidos. La purificación de las glicoproteínas específicas de los grupos sanguíneos demostró que están formados en un 80 a 90% por carbohidratos y 10 al 20% restante de aminoácidos (15 a.a.), los cuales estos últimos aparentemente no juegan ningún papel en la especificidad del grupo sanguíneo de la molécula. Cinco azúcares son comunes a estas glicoproteínas: L-fucosa, D-galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido siálico. Los azúcares que ocupan la posición terminal en las cadenas, se han denominado azúcares inmunodominantes. La N-acetilgalactosamina es el azúcar responsable de la especificidad del grupo A, la D-galactosa para el grupo B y la L-fucosa de la sustancia H<sup>60</sup>. La transferencia de los azúcares para formar los antígenos H, A y B, se realiza por medio de transferasas específicas. La ausencia de la sustancia H, caracteriza al fenotipo Bombay (O<sub>b</sub>), ver figura 7.

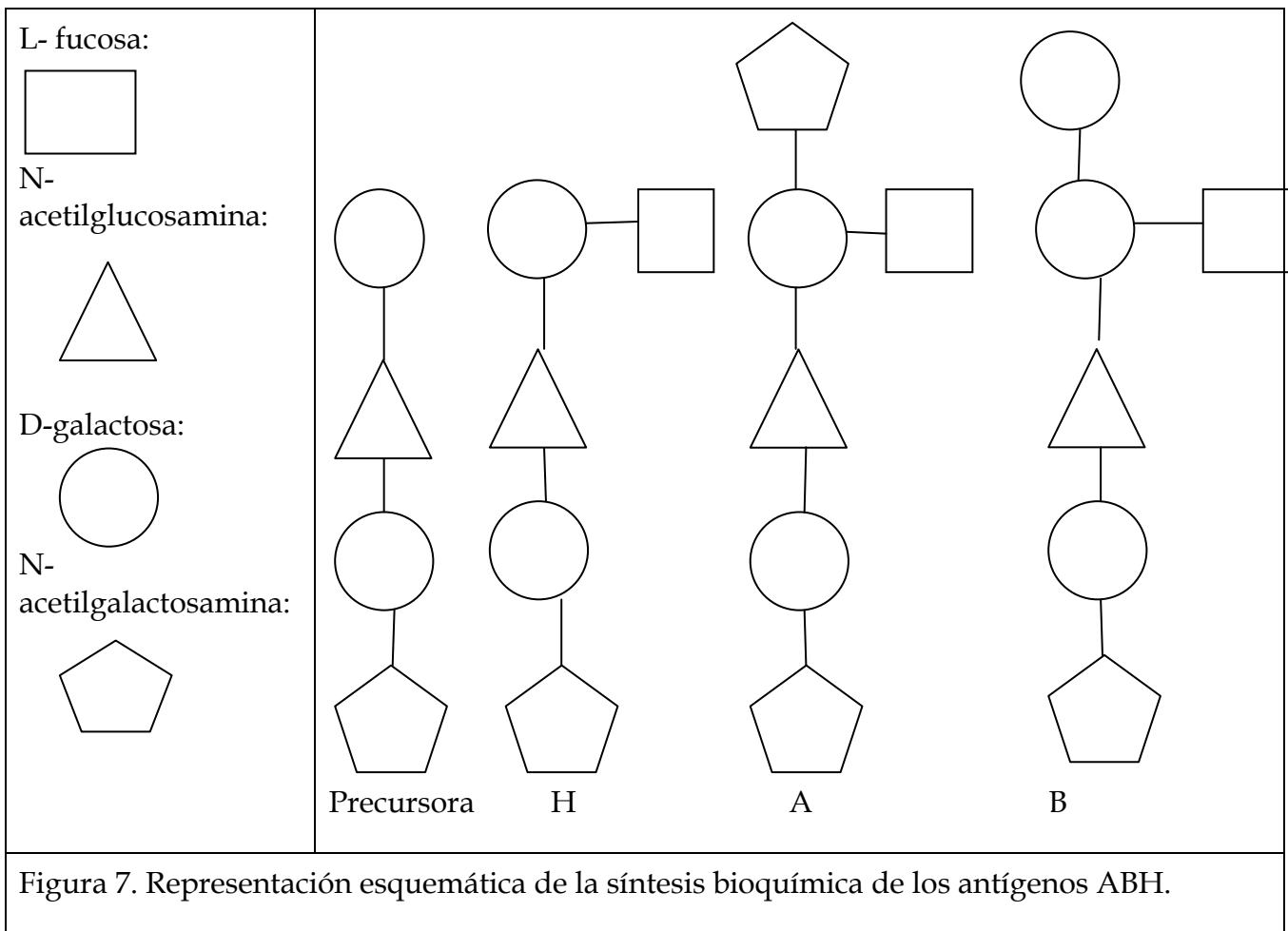


Figura 7. Representación esquemática de la síntesis bioquímica de los antígenos ABH.

### 7.3.4. Factor Rh

#### Herencia del factor Rh

El factor Rh es heredado de la misma forma, con la diferencia de que hay dos alelos y el Rh es dominante. La enfermedad del Rh es provocada por una madre Rh- que concibe un hijo Rh+. Los anticuerpos de la sangre materna destruyen los Rh+ del bebé. Si la madre piensa tener un segundo hijo debe aplicarse una vacuna que elimina los anti-Rh, llamada la gammainmunoglobulina. Ésta debe ser aplicada dentro de las 72 horas después del primer parto, ya que si se tiene un segundo bebe con Rh+ la madre producirá anti-Rh en exceso que destruirá la sangre del hijo, produciendo una enfermedad llamada Eritoblastosis fetal (anemia severa), si el hijo nace debido a la producción en exceso de los anti-Rh el hijo puede morir intrauterinamente.

Los grupos sanguíneos Rh tiene un interés clínico similar a los grupos ABO dada su relación con la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN) y su importancia en la transfusión. Landsteiner y Wiener descubrieron otro grupo de antígenos que se denominaron factores Rhesus (factores Rh), porque fueron descubiertos durante unos experimentos con monos Rhesus. Las personas con factores Rhesus en su sangre se clasifican como Rh positivas; mientras que aquellas sin los factores se clasifican RH negativas. Las personas Rh negativas forman anticuerpos contra el factor Rh, si están expuestas a sangre Rh positiva.

La presencia de anticuerpos contra los antígenos de la sangre determina las compatibilidades e incompatibilidades de los grupos sanguíneos. La transfusión de sangre entre grupos compatibles generalmente no causa ningún problema. La transfusión de sangre entre grupos incompatibles origina una respuesta inmune contra las células que portan el antígeno y produce una reacción a la transfusión. El sistema inmune ataca las células de la sangre donada, causando su fragmentación (hemolización).

Esto puede causar serios problemas, incluyendo temperatura alta, presión arterial elevada, taquicardia, insuficiencia renal y shock. Los antígenos también están presentes en otros componentes de la sangre, como los glóbulos blancos, las plaquetas y las proteínas del plasma. Estos componentes también causan un tipo de reacción similar a la transfusión como shock anafiláctico grave, hipotensión, bronco espasmo, urticaria, púrpura-post-transfusional, diarrea, hepatitis. Hoy en día, toda la sangre para transfusión es verificada cuidadosamente<sup>51</sup>.

La información genética del grupo sanguíneo Rh también está heredada de nuestros padres pero de una manera independiente de los alelos del sistema ABO. Hay 2 alelos distintos por el factor Rh: se llaman Rh+ y Rh-.

Una persona "Rh positiva" o "Rh+" tiene por lo menos un alelo de Rh+, pero también puede tener dos. Su genotipo puede ser Rh+/Rh+ o Rh+/Rh-. Una persona Rh negativa o "Rh-" tiene el genotipo de Rh-/Rh-.

Así como el sistema ABO, la madre y el padre biológico donan uno de sus dos alelos Rh a su hijo.

Una madre que es Rh- solamente puede repartir un alelo Rh- a su hijo. Un padre Rh+ puede pasar un alelo Rh- o Rh +. Esta pareja puede tener hijos del tipo Rh+ (Rh- de la madre y Rh+ del padre) o Rh- (Rh- de la madre y del padre) .

Los genotipos posibles de un hombre con tipo sanguíneo B son BB o BO y el genotipo de una mujer del tipo AB es AB. El hijo recibiría un alelo A o un alelo B de la madre y un alelo B u O del padre. Por eso, no es posible que el hijo tenga el tipo sanguíneo O. Los diagramas siguientes son cuadros de Punnet por las dos combinaciones posibles, es decir AB x BB o AB x BO <sup>43</sup>.

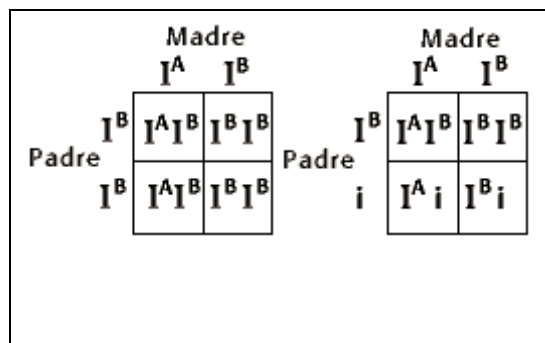


Figura 8. Cuadros de Punnet <sup>53</sup>.

### 7.3.5. Frecuencia de los tipos sanguíneos.

La distribución de los grupos sanguíneos en la población humana no es uniforme. El más común es O+, mientras que el más infrecuente es AB-. Además, hay variaciones en la distribución en las distintas subpoblaciones humanas <sup>51</sup>.

**Tabla 5. Distribución porcentual por países de los grupos sanguíneos (ABO y Rh) <sup>51</sup>.**

Country	O+	A+	B+	AB+	O-	A-	B-	AB-
Argentina	53.8%	34.7%	8.8%	2.7%	8.4%	0.44%	0.21%	0.06%
Austria	30%	33%	12%	6%	7%	8%	3%	1%
Australia	40%	31%	8%	2%	9%	7%	2%	1%
Bélgica	38.1%	34%	8.5%	4.1%	7%	6%	1.5%	0.8%
Canadá	39%	36%	7.6%	2.5%	7%	7%	1.4%	0.5%
Dinamarca	35%	37%	8%	4%	6%	7%	2%	1%
Finlandia	27%	38%	15%	7%	4%	6%	2%	1%
Francia	36%	37%	9%	3%	6%	7%	1%	1%
Hong Kong, China	40%	26%	27%	7%	<0.3%	<0.3%	<0.3%	<0.3%
Corea del Sur	27.4%	34.4%	26.8%	11.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.05%
Holanda	39.5%	35%	6.7%	2.5%	7.5%	7%	1.3%	0.5%
Polonia	31%	32%	15%	7%	6%	6%	2%	1%
Suecia	32%	37%	10%	5%	6%	7%	2%	1%
Reino Unido	37%	35%	8%	3%	7%	7%	2%	1%
Estados Unidos	38%	34%	9%	3%	7%	6%	2%	1%

Tabla 6: Frecuencia fenotípica en Población blanca <sup>33</sup>.

	Antígeno eritrocitario	Anticuerpo sérico	Frecuencia fenotípica (población blanca)
Grupo A	A	Anti-B	45%
Grupo O	Ni A, ni B	Anti-A, Anti-B, Anti-A+B	43%
Grupo B	B	Anti-A	9%
Grupo AB	A y B	Ninguno	3%

### 7.3.6. Importancia de los grupos sanguíneos dentro de la Química Legal.

Un ejemplo de la frecuencia en que aparecen los grupos sanguíneos es el del grupo A y su particular individualización dentro del ámbito forense.

El reconocimiento de subgrupos débiles del grupo A reviste importancia en la práctica forense y en el estudio de la dinámica de poblaciones. El estudio de la variante  $A_{int}$  (subgrupo intermedio) es relevante en Inmunogenética Poblacional, por su contribución al conocimiento del mestizaje con poblaciones negras. El sistema de grupos sanguíneos ABO sigue siendo el primero a tener en cuenta en el momento de realizar una transfusión de sangre.

Las cadenas sacáridas de glucoproteínas o de glucolípidos que lo componen están presentes, salvo excepciones, en todas las membranas celulares, en particular la membrana eritrocitaria. En la mayoría de los individuos también se encuentran en secreciones y líquidos biológicos.

Los antígenos A y B son productos génicos fácilmente detectables y constituyen marcadores genéticos de gran valor. Entre los individuos A, se distinguen 2 categorías:  $A_1$ , definido por un anticuerpo particular (anti- $A_1$ ), y  $A_2$ , que no es reconocido por este anticuerpo. Los glóbulos rojos de los individuos  $A_1$  presentan aproximadamente  $10^6$  sitios antigénicos por célula; en cambio, los  $A_2$  sólo poseen entre  $0.2$  y  $0.4 \times 10^6$  sitios por glóbulo.

Existen otros subgrupos A considerados débiles ( $A_3$ ,  $A_x$ ,  $A_{end}$ ,  $A_m$ ,  $A_{el}$ ), en los que la reactividad antigénica es inferior a la de los glóbulos  $A_2$ <sup>34</sup>. La distinción entre  $A_1$  y  $A_2$  corresponde a una diferencia en el número y distribución de los receptores A en la membrana eritrocitaria y a una diferencia cualitativa de estructura.

La diferenciación entre ambas se realiza mediante la utilización de anticuerpos monoclonales y lectinas específicas de grupo sanguíneo *Dolichos biflorus* (anti- $A_1$ ) y *Ulex europaeus* (anti-H)<sup>1, 14</sup>.

Se definen como A intermedio ( $A_{int}$ ) aquellos hematíes en los que se observan ciertos caracteres  $A_1$  y ciertos caracteres  $A_2$ . El  $A_{int}$  presenta una mayor frecuencia en la raza negra que en caucásicos<sup>23</sup>. Diferentes grupos de trabajo han utilizado diversos criterios para clasificar el  $A_{int}$ . Algunos clasifican como  $A_{int}$  aquellas células con reacciones débiles con *Dolichos*, pero con reactividad H más fuerte que las  $A_2$ , mientras que otros las clasifican por su fuerte reactividad con *Dolichos* y *Ulex*<sup>1, 4, 26-29</sup>.

Tabla 7. Distribución de los individuos estudiados según el grupo sanguíneo ABO<sup>34</sup>.

Grupo	No. de muestras (n total = 1 301) %
O	703 (54,04)
A	468 (35,97)
B	106 (8,15)
AB	18 $A_1B$ (1,38)

6 A <sub>2</sub> B (0,46)
---------------------------

Tabla 8. Distribución de los individuos estudiados según el grupo A <sup>34</sup>.

Grupo A	No. de muestras (n total = 468) %
A <sub>1</sub>	346 (73,93)
A <sub>int</sub>	40 (8,55)
A <sub>2</sub>	82 (17,52)

La intensidad de la reacción de aglutinación se definió por cruces, y se transformaron luego en un valor numérico asignado según la convención: ++++ = 10, +++ = 8, ++ = 5, + = 2 y reacción negativa = 0<sup>34</sup>.

Tabla 9. Escores cuali-cuantitativos de la reacción de aglutinación (media  $\pm$  desviación estándar) <sup>34</sup>.

Eritrocitos	Sueros y lectinas			
	anti-A	anti-A <sub>1</sub>	anti-H	anti-B
A <sub>1</sub>	7.7 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	0	0
A <sub>1</sub> B	8 $\pm$ 0	7 $\pm$ 1.5	0	7 $\pm$ 1.5
A <sub>int</sub>	7.5 $\pm$ 1.5	6 $\pm$ 2.5	5 $\pm$ 3	0
A <sub>2</sub> B	8 $\pm$ 0	0	6 $\pm$ 1.7	2 $\pm$ 0
A <sub>2</sub>	6.8 $\pm$ 2	0	6.1 $\pm$ 2.6	0

La prueba serológica de Simonin demostró la presencia de un solo anticuerpo (anti-B) en los individuos A<sub>1</sub> y A<sub>int</sub>, mientras que en los individuos A<sub>2</sub> este anticuerpo estaba acompañado en algunos casos por otro anticuerpo de especificidad anti-A<sub>1</sub>, lo que señala la presencia

irregular de este anticuerpo.<sup>1, 11, 20,21</sup> Las tablas 7 y 8 presentan valores de distribución poblacional para la ciudad de Rosario, referida a los distintos grupos del sistema ABO, y la tabla 9 los escores calculados a partir de la aglutinación producida para los distintos grupos A. La reacción con anti-A<sub>1</sub> decrece desde el grupo A<sub>1</sub> hacia el A<sub>int</sub>. La reactividad con el anti-H se incrementa desde el A<sub>int</sub> hacia el A<sub>2</sub>. Observamos una marcada heterogeneidad en la expresión antigénica de los hematíes A<sub>int</sub>.<sup>1</sup>

El reconocimiento de variantes débiles del grupo A reviste importancia en la práctica forense. Consideramos importante señalar el valor de este estudio en dinámica de poblaciones por su contribución al conocimiento del mestizaje con poblaciones negras<sup>34</sup>.

## 7.4 Manchas de sangre seca

El hallazgo de sangre en manchas obtenidas en las escenas de las investigaciones forenses juega un papel fundamental en la resolución de los casos criminales. Además de la identificación de sangre proveniente de un ser humano se puede tipificar el grupo sanguíneo al que pertenece y posteriormente realizar análisis de ADN<sup>3</sup>.

Las huellas producidas por la sangre, son características de apoyo, embarramiento, estáticas dinámicas, escurrimiento, etc. Son las que más frecuentemente se encuentran en delitos contra las personas y constituyen el indicio más constante en el crimen, debiendo observar lo siguiente:

- a) Ofrecen posibilidades de reconstrucción del mecanismo de los hechos.
- b) Una vez manchado determinado soporte, la sangre permanece durante un tiempo prolongado y se encuentra con más facilidad en aquellos lugares que le ofrecen mejor superficie para su adherencia.
- c) Esas superficies pueden ser: piel, ropas, muros de tabique o madera, linóleo, alfombras, etc.
- d) Mientras que difícilmente permanecen en superficies poco adherentes, como: metales, cristales, porcelana, superficies pulidas, enceradas o barnizadas<sup>40</sup>.

Las manchas de sangre deben buscarse sobre el cuerpo de la víctima, en el presunto victimario, en instrumentos, suelo, paredes y muebles. En armas blancas debe investigarse la presencia de sangre en la unión de la hoja con el mango, en el suelo, en las uniones de los mosaicos, en los muebles, en la parte inferior de superficies y en los cajones.

En las personas, debe buscarse en el pelo, debajo del borde de las uñas y en los surcos peringuinales. En las ropas, en los forros, en los bolsillos y en los zapatos, en el reborde del cuero del montaje de la suela<sup>41</sup>.

Las manchas de sangre que se hallan en la víctima suelen encontrarse en sus prendas de vestir, sobre su cuerpo o en las cavidades naturales, independientemente del área de influencia de un hecho delictivo. Por tanto, se debe buscar en torno de la víctima, sobre el camino supuesto del victimario, y en el suelo, las paredes, las placas, los vidrios, las puertas, las escaleras, las alfombras, las entradas, etc., en forma cuidadosa para evitar que las manchas se modifiquen estructuralmente<sup>42</sup>.

La investigación de manchas de sangre sigue ocupando un lugar preferente en Criminalística. Tradicionalmente, se ha venido realizando un sistema de investigación que incluye la realización de los siguientes diagnósticos<sup>18</sup>:



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

Sin embargo dentro de la inmunohematología forense encontramos los pasos anteriores para analizar una supuesta mancha de sangre descritos de la siguiente manera:

- Diagnóstico genérico: Demuestra la naturaleza sanguínea de una mancha de sangre.
- Diagnóstico específico: Determina el origen humano o animal de una mancha de sangre.
- Diagnóstico individual: establece el grupo sanguíneo en el sistema ABO en una mancha de sangre humana. Coteja el grupo sanguíneo de muestras de sangre enviadas por la autoridad con el grupo sanguíneo del occiso, sindicado y/o herido.

La irrupción de la tecnología de investigación de ADN ha hecho que, en el momento actual, el caudal investigador se haya centrado precisamente 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<sup>45</sup>.

En efecto, desde que se introdujo la investigación del ADN en Criminalística hasta el momento actual, la técnica ha ido precisando su sensibilidad. Cada vez se necesita una cantidad menor de sangre para que, si otros factores son favorables, se pueda obtener el perfil genético del donante de la mancha <sup>19</sup>.

Pensemos en tres situaciones:

a.- En la primera, se remite a un laboratorio una prenda de ropa verdaderamente manchada de sangre. El sentido científico del investigador, hará que centre su esfuerzo en la obtención de la prueba de mayor peso.

b.- En la segunda, la pieza remitida parece que está manchada de sangre. En función de la cantidad de sustrato que pueda obtenerse, con la intención de aportar algo de prueba, el investigador podrá diversificar las técnicas. Orientación, certeza y ADN parecería una buena elección.

c.- En la tercera situación, la ropa remitida al laboratorio, simplemente está manchada. La orientación, en estos casos, debería ser la elección del investigador. Y si los resultados son favorables, tratar de individualizar el espécimen<sup>45</sup>.

En las situaciones b y c, por tanto, se precisa un conocimiento exquisito de estas técnicas de orientación. Una elección inadecuada de la técnica a aplicar o una interpretación errónea del resultado, puede hacer perder un elemento de prueba que, finalmente, puede ser trascendental <sup>31</sup>.

Las manchas encontradas en la escena del crimen se han constituido como elemento esencial en la resolución de investigaciones judiciales. Establecer su origen y grupo sanguíneo aporta información útil en el proceso de inclusión o exclusión de sospechosos o víctimas <sup>32</sup>.

El hallazgo de sangre en manchas obtenidas en las escenas de las investigaciones forenses juega un papel fundamental en la resolución de los casos criminales. Además de la identificación de sangre proveniente de un ser humano se puede tipificar el grupo sanguíneo al que pertenece y posteriormente realizar análisis de ADN <sup>3</sup>. Entre las técnicas más utilizadas están las de Luminol, Fenolftaleína y Piramidón, como indicadoras de la existencia de sangre, Takayama para confirmar su presencia, Inhibición de la Aglutinación para comprobar si la sangre es humana y Absorción-Elución para determinar el grupo ABO de la muestra <sup>13</sup>. Aunque son ampliamente utilizadas es importante establecer su sensibilidad y efectividad cuando las muestras han sido sometidas a diferentes condiciones ambientales en diferentes soportes en vista que la mayoría de casos en criminalística presentan evidencias biológicas de diversos orígenes <sup>7</sup>.

Con el fin de evaluar estas técnicas y determinar la capacidad de los procedimientos para alcanzar un resultado confiable se sometieron muestras conocidas a diferentes condiciones de temperatura, clase de soporte, dilución, ambiente y tiempo de exposición<sup>32</sup>.

## 7.5 Técnicas de orientación

Entre las técnicas más utilizadas están las de luminol, fenolftaleína y piramidón, como indicadoras de la existencia de sangre<sup>13</sup>. El espectacular avance en la tecnología de investigación de ADN, ha supuesto un cambio radical en el estudio de indicios criminalísticos. Sin embargo, el éxito de la investigación depende, en gran medida, de las técnicas que permiten la detección y el estudio previo de la muestra. En diferentes estudios se analiza la fiabilidad de estas pruebas sobre muestras contaminadas en el laboratorio con distintos productos y utilizando diferentes reactivos de orientación. Como consecuencia de la contaminación, se obtienen falsos resultados tanto positivos como negativos, comprobándose que el reactivo más fiable es el luminol. En una experiencia complementaria se comprueba la eficacia del reactivo sobre muestras lavadas<sup>45</sup>.

Numerosos trabajos se han centrado en dos aspectos fundamentales: la sensibilidad de las distintas técnicas de orientación y los efectos de la mezcla de sustancias con la sangre investigada<sup>7, 31, 45</sup>.

A continuación se mencionan diferentes métodos donde se pone a prueba la sensibilidad de las pruebas de orientación.

### MÉTODO A:

- ❖ Reactivos: bencidina (panreac), o-tolidina (probus), fenolftaleína (panreac), perborato de sodio (prolabo), etanol (panreac), hidróxido de potasio (panreac), polvo de zinc (lab. d'hemio), peróxido de hidrógeno (prolabo), ácido acético glacial (probus), luminol (merk), carbonato de sodio (panreac), agua destilada
- ❖ MATERIAL: Material de vidrio para medida de volúmenes. Material para la preparación y estudio de las muestras. Material para la extracción de sangre, soporte de la muestra (placas de cerámica). Balanza analítica. Refrigerador. Cámara de observación. Rodillete de presión.
- ❖ PROCEDIMIENTO:

I.- Pruebas de orientación sobre muestras preparadas con sangre y sustancias contaminantes (sin diluir):

- Preparación de la muestra: se utiliza sangre humana recién extraída (conservante EDTA). Se mezcla en tubo de ensayo 1 ml de sangre con 1 ml de sustancia contaminante. A continuación se obtienen manchas sobre el soporte de porcelana. Cada mancha contiene una gota de la muestra.
- Preparación de muestras control: sobre los mismos soportes se forman manchas a partir de una gota de sustancia contaminante.

- Reactivos: En su uso se debe tener en cuenta las normas de seguridad indicadas para productos potencialmente peligrosos<sup>9, 49</sup>.

A. Pruebas de orientación con bencidina, o-tolidina y fenoltaleína:

- Se realizan pruebas de control comprobando por una parte el buen estado de los reactivos con manchas preparadas sobre papel, y de otra la reacción negativa del soporte utilizado para las muestras.
- Se obtiene una huella de la muestra problema sobre papel de filtro humedecido con agua destilada. La prueba se aplica sobre esta huella.
- Se repite el mismo proceso con las muestras control.

B. Pruebas con luminol:

- También en este caso se realizan pruebas de control, que permiten comprobar el buen estado del reactivo, así como la reacción negativa del soporte utilizado.
- La prueba de orientación se aplica directamente sobre la muestra problema. Las características del reactivo obligan a trabajar en cámara oscura.
- Se realiza el mismo ensayo con las muestras control.

II.- Pruebas complementarias sobre muestras preparadas con sangre diluida y sustancias contaminantes:

- a. Preparación de la muestra: se utiliza sangre humana recién extraída que se diluye al 50%. Se seleccionan los contaminantes que en las pruebas descritas en el apartado I del método, dieron negativo en el control y positivo en la prueba de orientación. Obviamente las muestras en las que se obtuvo negativo o falso positivo, darán el mismo resultado con sangre diluida. Para obtener las manchas se sigue el mismo procedimiento descrito en el apartado I (a) del procedimiento.
- b. Se repite los puntos b, c,d y e del apartado I del procedimiento.

III.- Prueba del luminol sobre muestras sometidas a lavado:

- ❖ Se lava con agua corriente las muestras que se prepararon y estudiaron en el apartado I, a continuación se aplica la prueba del luminol.

En las condiciones experimentales de este estudio los resultados indicaran que es posible que la presencia de un contaminante pueda impedir detectar la sangre presente en una muestra. Y esto puede ocurrir incluso en muestras con alta concentración en sangre. Todos los reactivos de orientación con los que se ha trabajado, excepto el luminol, darán casos de falsos negativos. Este reactivo da resultados también positivos sobre muestras sometidas a lavado.

Permite detectar y delimitar las zonas donde aún quedan restos de sangre que a simple vista, no se observan<sup>45</sup>.

Otro dato ya conocido sobre el luminol es que su aplicación sobre la muestra no interfiere en las pruebas de ADN que posteriormente se realicen sobre ella <sup>8,9</sup>. Este reactivo es de uso muy frecuente en los Estados Unidos <sup>15</sup>, sin embargo, curiosamente en España su utilización es muy restringida si no nula. Quizá a la vista de los resultados que se van obteniendo sobre su rendimiento su uso como reactivo de orientación debería replantearse <sup>45</sup>.

### **MÉTODO B:**

En otro estudio se evaluaron pruebas presuntivas de piramidón, luminol y fenolftaleína con el fin de determinar su sensibilidad e interferencia frente a diferentes condiciones de soporte, temperatura, tiempo y ambiente.

#### **MATERIAL Y MÉTODO:**

1. Muestras, soportes y condiciones. Se procede a realizar manchas patrón con una muestra conocida para evaluar la efectividad de los procedimientos frente a diferentes soportes, temperaturas, tiempo, contaminantes y diluciones para analizar la sensibilidad de la técnica. Se toma muestra de sangre por punción venosa en tubo con anticoagulante EDTA y posteriormente se procede a realizar manchas sobre Algodón, Tela de Algodón, Seda, Lino, Satín, Jean delgado y Jean grueso. Se expone a una temperatura de -20°, 4°, 37° y 60° C por periodos de tiempo de 24 horas, una semana y un mes.

2. Test de piramidón, fenolftaleína, luminol.

Pretratamiento de las muestras. En tubos de ensayo de 16 x 100 mm marcados con el número de muestra se coloca un fragmento de la mancha de 0.5 x 0.5 cm y se agregó 1 ml de solución salina al 0.85%, dejando por el tiempo que sea necesario para separar la mancha del soporte<sup>32</sup>.

- a. Test de piramidón. A tres gotas de la muestra pretratada se le adicionan 3 gotas de los reactivos de piramidón, ácido acético y perhidrol evidenciando la reacción por un cambio de color. (+) = coloración violeta, (-) = sin cambio de color (13).
- b. Test de fenolftaleína y luminol. Estas técnicas se realizaron con el método descrito por Cox, M en 1991 <sup>7</sup> para fenolftaleína y Castello, A et al. en 2002 <sup>5</sup> para luminol.

Interferencia de sustancias similares a la sangre. Con el fin de evaluar la interferencia de sustancias que puedan generar resultados falsos positivos en la técnica de piramidón se hicieron manchas sobre tela de algodón de la siguientes frutas: banano, cereza, ciruela, durazno, fresa, limón, mandarina, manzana, melón, mora, naranja, pera, piña y uva roja; verduras: cebolla, rábano, papa, espinaca, uva verde, aguacate, frijol rojo, repollo, zanahoria, coliflor, maíz, apio, pepino, berenjena, ajo, lechuga, tomate, remolacha y pimentón; Otras sustancias: vino tinto, salsa de tomate, café, gelatina, bebida carbonatada y óxido; fluidos biológicos como saliva y orina <sup>32</sup>.

3. Manchas lavadas. Simultáneamente se toma una muestra de sangre por punción venosa en tubo con anticoagulante de citrato de sodio y se realizan cuatro manchas sobre tela de algodón las cuales fueron sometidas a un lavado con agua únicamente, con agua y jabón, agua y blanqueador y a la última se le adiciona aceite de cocina.

4. Sensibilidad de las pruebas. Se tomaran muestras de sangre por punción venosa en tubo con anticoagulante EDTA, a cuatro personas con hemoclasificación A, B, AB y O, a las que se les hará diluciones seriadas base 10, a partir de una dilución 1/10, así: 1/100, 1/500, 1/1.000, 1/ 5.000, 1/10.000. De estas se harán manchas sobre algodón para la prueba de Piramidón. Ya obtenidas las diluciones de cada grupo sanguíneo se harán manchas por triplicado sobre diferentes soportes como: algodón, tela de algodón y papel filtro. Para las pruebas de piramidón, fenolftaleína y luminol. para la prueba de detección de sangre por quimioluminiscencia (luminol) se adicionaran otras diluciones además de las ya mencionadas: 1/100.000, 1/500.000, 1/1.000.000.

En dicho estudio se encontró que el test de piramidón demostró ser una excelente prueba presuntiva en diferentes soportes y condiciones. Los resultados indicaron que hay que ser cuidadoso en su interpretación cuando las muestras han sido enterradas. No se observaron resultados falsos positivos al analizar sustancias con apariencia similar a la sangre. Para manchas que han sido sometidas a lavado con agua o detergentes el luminol se muestra superior en su detección al piramidón.

Cuando se compara la sensibilidad de los tres test presuntivos se observa que el más sensible es el luminol (hasta 1/500,000) seguido de fenolftaleína (hasta 1/5,000). Estos resultados son similares a los descritos por Cox, M. en 1991 para fenolftaleína.

Se obtuvieron las siguientes conclusiones: Las pruebas presuntivas y confirmatorias son una herramienta útil en el estudio de manchas de sangre en casos de investigación judicial.

Las pruebas presuntivas no se ven afectadas en su mayoría al variar los soportes, la temperatura o las condiciones ambientales bajo las cuales fueron almacenadas. Respecto a la sensibilidad se encontró que en las pruebas presuntivas es alta en contraposición a las confirmatorias que requieren de muestras que no hayan sido sometidas a diluciones o lavados<sup>32</sup>.

## Quimioluminiscencia

Una reacción ampliamente utilizada en química forense es la oxidación de luminol con agua oxigenada en presencia de un catalizador de hierro. Esta reacción se utiliza por ejemplo en la detección de restos de sangre que sirve en este caso para catalizarla.

Fundamentos teóricos: Habitualmente en las reacciones de quimioluminiscencia se liberan moléculas en estado excitado (por ejemplo oxígeno en estado de singulete) que al bajar en el estado fundamental (el estado de triplete en el ejemplo del oxígeno) emiten la diferencia de energía en forma de luz <sup>48</sup>.

### El luminol (C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>).

Es un derivado del ácido ftálico. Se trata de un sólido verdoso poco soluble. Su mayor importancia reside en la reacción de quimioluminiscencia que da con peróxidos en presencia de complejos de hierro como catalizadores. El luminol se utiliza en química forense para detectar trazas de sangre ya que éste cataliza la oxidación con peróxido de hidrógeno bajo emisión de luz.

El mismo efecto catalizador lo tienen también diversos otros complejos de hierro como los hexacianoferratos  $[[Fe(CN)_6]^{3-}]$  y  $[[Fe(CN)_6]^{4-}]$ . Con éstos se utiliza el luminol en la fabricación de luces frías químicas. Las soluciones de Luminol son sensibles a la luz y a los cationes metálicos, son estables en períodos de 8-12 horas, y son térmicamente inestables.

Es capaz de detectar cerca de 1 microlitro de sangre en 1 litro de solución <sup>47</sup>.

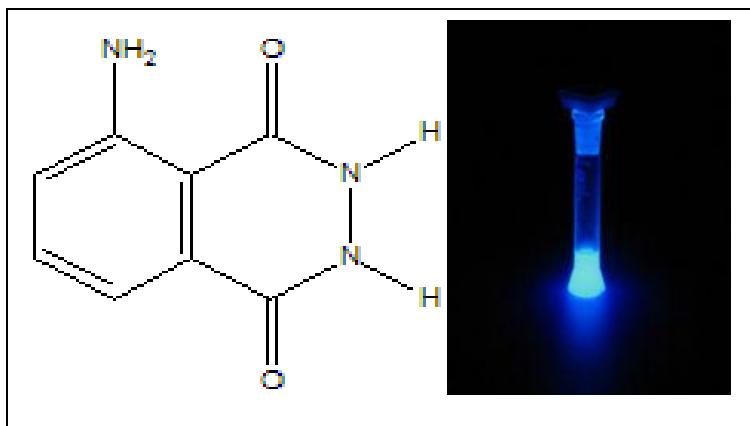


Figura 9. Luminol <sup>47</sup>

La luminiscencia es un fenómeno producido por las moléculas de materia, que al ser lo suficientemente excitadas, emiten luz visible. Generalmente, la energía proviene de fuentes externas, como es el caso de la electricidad en las lámparas de neón, o el calor proveniente de una combustión. Sin embargo, también es posible producir luz por medio de reacciones químicas, que tienen como ventaja la baja producción de calor, aunque la emisión es bastante

breve. Esta es la llamada luz fría. Existen distintos modos de producir luz fría. Principalmente está la quimioluminiscencia, fluorescencia, y la fosforescencia.

La fluorescencia se debe a la absorción de ondas electromagnéticas de alta frecuencia, y la inmediata emisión de fotones de frecuencia más baja (léase, luz visible), como por ejemplo, en las lámparas de ultravioletas.

La fosforescencia consiste en la reemisión progresiva de la energía captada inicialmente por el material, como por ejemplo, en las pantallas de rayos catódicos.

En cambio, la quimioluminiscencia es propia de reacciones donde uno de los reactivos recibe una alta excitación, con la posterior emisión de luz visible. En la naturaleza se encuentran varias proteínas quimioluminiscentes, como las presentes en las luciérnagas, los peces de la región abisal, y algunas bacterias. Creadas por el hombre, hay infinidad de compuestos, pero el más usado en la industria y la investigación es el luminol ( $C_8H_7N_3O_2$ . 5-Amino-1,2,3,4-tetrahidro-phtalazin-1,4-dion).

El luminol posee la capacidad de lucir cuando es oxidado. Por esto es una herramienta muy utilizada en la investigación forense, ya que gracias a sus propiedades; puede revelar, en solución con un oxidante, hasta los rastros más ínfimos de sangre, por medio de un brillo azulado. Esta peculiar característica facilita el reconocimiento de aquellas sustancias oxidantes o sus catalizadores en situaciones que requieren rapidez y efectividad, tal como el lugar de los hechos donde se demanda la señalización de cualquier trazo de sangre.

La reacción del luminol precisa de un medio alcalino, el cual sirve para disolver y cargar negativamente la molécula. El oxidante, que suele ser peróxido de hidrogeno, libera y reemplaza dos de los nitrógenos, llevando así a la molécula a el mencionado estado de excitación.

Finalmente se obtiene el luminol oxidado y cargado, el fotón, y nitrógeno gaseoso. Las reacciones de luminol requieren de un catalizador. Usualmente es una sal o metal de transición, los cuales son muy accesibles. Específicamente en el caso de la sangre, el hierro (fe) de la hemoglobina es un poderoso catalizador. Las propiedades de la sangre permiten una excelente optimización de la oxidación del luminol, esta reacción cuenta con la suficiente sensibilidad como para detectar manchas diminutas de sangre, gracias a que puede reaccionar a 1ppm.

Pulverizando una solución de luminol en un área sospechosa se reduce quimioluminiscencia en los lugares en que ha habido sangre, incluso si esta ha sido lavada y no es perceptible a simple vista.

En las reacciones de bioluminiscencia, como se observa en las luciérnagas y diversos organismos marinos, el papel del luminol lo juegan las luciferinas <sup>46</sup>.

Un producto químico sensible, puede detectar sangre en una porción por millón.



Las víctimas de crímenes sangrientos, violentos no pueden desaparecer sin un rastro que es la asunción básica en la cual los investigadores del lugar de los hechos funcionan. No importa cómo el asesino intenta difícilmente limpiar encima de la sangre y disponer del cuerpo, seguirá habiendo algunos rastros indicadores de la sangre. Las partículas minúsculas de la sangre pueden aferrarse en la mayoría de las superficies por años en extremo, sin siempre ser considerado.

El luminol se utiliza típicamente en el lugar de los hechos o del hallazgo donde el delito se sospecha pudo haber sucedido y en donde no hay rastros de la sangre visibles al ojo desnudo. Se oscurece el cuarto y entonces el producto químico se rocía sobre un área grande. Si se revelan los rastros de la sangre, entonces los investigadores video graban o fotografía el lugar donde se cometió el delito.

El inconveniente que presenta el luminol es que las sustancias (tales como blanqueadores) con excepción de la sangre pueden también reaccionar con el luminol y por ende brillar intensamente. Por lo tanto, un resplandor revela simplemente a los investigadores la posibilidad de sangre en el área. Un investigador experimentado, observando la velocidad de la reacción química puede juzgar si la sustancia era sangre o algo más. Pero para ser absolutamente seguras que era sangre, otras pruebas necesitan ser funcionadas.

El luminol ayuda a proporcionar pistas en cuanto a cómo los acontecimientos pudieron haber revelado o la clase de arma que se ha utilizado. Por ejemplo, los patrones de la salpicadura de la sangre de un objeto embotado contra los de un cuchillo agudo serán diferentes. A veces, las impresiones sangrientas del zapato dan muchos de pistas sobre los movimientos del asaltador después del ataque, también puede conducir a investigadores a descubrir nueva evidencia. Por ejemplo, si hay una reacción positiva al luminol rociado en una alfombra, después quitar la manta puede revelar entarimados con sangre<sup>53</sup>.

## 7.6 Levantamiento, embalaje y traslado de las muestras al laboratorio

En una sociedad tan compleja como la nuestra, en donde cada día tenemos menos testigos dispuestos a testificar, la evidencia física relacionada a los fluidos corporales tiene un valor incalculable. Por eso es tan importante que los investigadores forenses sigan los procedimientos establecidos para garantizar que las muestras levantadas en la escena no se contaminen o destruyan, perdiendo así su valor probatorio.

Mientras más conserven sus características originales más fácil y confiable será el trabajo de los especialistas en inmunohematología forense. Se podrá lograr la identificación del sospechoso, la evidencia será admisible en los tribunales, se lograra la convicción y castigo del verdadero autor del delito.

Son muchos los que desean trabajar como investigadores forenses; pero son pocos los que tienen las cualidades necesarias para seguir los procedimientos establecidos para recolectar y embalar adecuadamente la evidencia de fluidos corporales en la escena del crimen. Se pueden adiestrar y proveerles las herramientas necesarias para realizar un trabajo de excelencia que garantice el cumplimiento de la justicia.

La evidencia de sangre es común en los delitos violentos como el asesinato, homicidio, mutilación y agresión, entre otros. Generalmente se encuentra en las armas utilizadas, objetos e instrumentos, cristales rotos, ropa de la víctima y el sospechoso, superficies lisas o porosas, etc.

La muestra debe tomarse líquida o sólida o en forma de manchas secas o unidas a otras partículas. Su color puede variar dependiendo del lugar en donde ha estado expuesta. Se debe tomar en consideración que también se descompone.

Al buscar evidencia de sangre se debe tener en mente las siguientes interrogantes:

1. ¿Es sangre?
2. ¿Es humana o animal?
3. ¿A cuál clasificación pertenece?
4. ¿Cuál es la edad de la mancha?
5. ¿De qué parte del cuerpo es?

Para recoger muestras de la sangre del sospechoso, la misma se extrae y se deposita en tubos de ensayo que contienen anticoagulantes.

Recomendaciones para levantar la evidencia en el lugar de los hechos:

1. Proteger la escena
2. Localizarlas (inspección ocular)
3. Fotografiarlas cuidadosamente: acercamiento, por secciones, a distancia.
4. Grabar en video y ubicar su posición en el croquis.

5. Levantarla y embalarla cuidadosamente.
6. Transportarlas al laboratorio inmediatamente.
7. La sangre seca se recoge con un papel absorbente.
8. Objetos pequeños que contengan sangre se llevan al laboratorio.

El investigador forense debe poder identificar los patrones que establecen las manchas. Estos son el resultado de la transferencia de la sangre líquida, cuando ésta entra en contacto con una superficie húmeda o mojada. El estudio de los patrones incluye:

1. Localización de la mancha y descripción de los patrones.
2. Cómo se crearon las manchas
3. Dirección en que viajaron las gotas
4. Origen
5. Objeto utilizado durante el ataque
6. Cantidad de heridas
7. Presencia del sospechoso en la escena
8. Posición de la víctima, el sospechoso y los objetos durante la comisión del delito.
9. La secuencia de los eventos

#### Clasificación de los patrones de sangre

- Se clasifican en tres grupos: pasiva, proyectadas y transferidas.
  - *Pasiva*: se crea cuando la fuerza que la produce actúa sobre su gravedad. Puede ser un patrón producido por goteo o flujo.
  - *Proyectadas*: Las manchas que son creadas cuando sale la sangre expuesta por un objeto en acción o una fuerza mayor que la fuerza de gravedad. El tamaño, la figura y el número que resultan de la mancha van a depender del tipo de fuerza que se utilice para hacer brotar la sangre.
  - *Transferidas*: se produce cuando un objeto con sangre entra en contacto con la superficie de otro que no tiene sangre.

Lo anterior no describe la velocidad de las gotas de sangre cuando viajan por el aire. Solo describe la cantidad de energía necesaria para crear las manchas.

Las manchas o gotas que se encuentran en superficies horizontales son de forma circular, dependiendo de la altura desde donde caen. A mayor altura, el impacto puede ocasionar que se proyecten en forma de estrellas o coronas. Si la distancia es menor serán completamente redondas. Si caen de una altura considerable se desplaza y forma gotas más pequeñas. Las manchas húmedas en ropas y telas se deben dejar secar antes de embalarlas y no exponerlas nunca al sol o calor.

## Recomendaciones para recoger indicios:

1. Se deben documentar todas las manchas de sangre durante la investigación preliminar.
2. Los proyectiles pueden contener restos de tejido y sangre.
3. Para extraer una muestra de la sangre seca, se puede utilizar una navaja de afeitar. Hay que desinfectarla aunque sea nueva.
4. Se coloca un papel limpio, previamente doblado y pegado con cinta adhesiva, debajo de la mancha, de modo que se reciba la costra al ser raspada. Luego se dobla el papel y se guarda en un sobre sellado.
5. Si la sangre cayó en tierra y fue absorbida por ésta, se debe recoger una cantidad suficiente para obtener toda la sangre. Se coloca en un envase de vidrio o plástico, se sella y se anota la información necesaria. Esta muestra se tiene que enviar rápidamente al laboratorio para evitar que las bacterias y moho de la tierra destruyan el valor de la prueba.
6. La ropa de las personas y la de cama, cuando están húmedas, deben ser envueltas de manera que no pasen a las partes limpias de la prenda. Para evitar la transferencia se puede colocar un trozo de papel limpio entre cada capa de tela. Esta evidencia puede contener también pelo, vello púbico, fibras o manchas de semen.

### Precauciones durante la recolección y envío de muestras



Figura 10. Indicios sanguíneos.

#### 1. Protección del personal

Las muestras biológicas potencialmente pueden contener agentes patógenos (VIH, hepatitis, meningitis...).

Evitar contacto con la muestra mediante uso de guantes, mascarilla y bata.

Si es posible emplear material desechable

Prohibir comer, beber o fumar durante el proceso de recolección

Recomendar la vacunación al personal que trabaje con este tipo de muestras

## 2. Protección de la muestra

### 2.1 Contaminación por material biológico humano:

Se debe a la aparición en el propio indicio biológico de un aporte de material biológico humano ajeno al propio indicio. Produce como resultado la mezcla de perfiles genéticos.

Contaminación anterior o previa: Se debe a la aparición de material biológico en el lugar donde luego aparecerán los indicios. Es inevitable y generalmente dificulta la valoración de la prueba.

Contaminación coetánea o paralela: El material genético de un indicio se mezcla con ADN de otro origen en el momento de los hechos. Es inevitable y favorece la valoración.

Contaminación posterior: Debido al depósito de material genético de diversos orígenes en el indicio con posterioridad al momento de los hechos. Es evitable mediante estrictos protocolos de recolección, embalaje y envío de las muestras, que se detallan en el presente documento.

### 2.2 Transferencia de indicios biológicos:

Traslado accidental de los indicios de un lugar a otro, ocasionando contaminación o pérdida de la muestra (por ej. pelos).

### 2.3 Contaminación biológica no humana:

Producida por microorganismos que acaban degradando el ADN por acción, fundamentalmente de exonucleasas (humedad y altas temperaturas).

- Puede ocurrir “a priori” a la recolección de indicios (muestras expuestas a condiciones que favorecen la proliferación bacteriana).
- Tras la recolección del indicio si el empaquetado y conservación no es el adecuado.

Produce la degradación del ADN y ausencia de resultados, pero nunca la alteración de los patrones genéticos.

### 2.4 Contaminación química:

Producida cuando las muestras se preservan (formol) o se tratan con determinados productos químicos. Por ejemplo, es nocivo cuando para el estudio de huellas dactilares se utilizan líquidos reactivos; los polvos minerales –carbón, talco, etc.- no producen alteración alguna.

Afecta principalmente a las fases de extracción y amplificación del ADN, ya que modifican la estructura química del mismo, lo cual se manifiesta como ausencia de resultados evaluables, pero nunca como modificación del patrón genético.

### 3. Precauciones que se deben adoptar

Aislar y proteger, lo más rápidamente posible la escena del delito

Recoger, si es posible, en primer lugar los indicios biológicos

Usar guantes limpios que deben cambiarse con frecuencia.

Evitar hablar o estornudar sobre las muestras. Usar mascarilla.

Usar bata u otro tipo de ropa protectora.

Utilizar material desechable, siempre que sea posible.

No añadir conservantes a las muestras a menos que lo requiera.

Dejar secar a temperatura ambiente previamente a ser empaquetadas.

Empaquetar por separado las muestras.

Empaquetar en bolsas de papel o cartón, evitar las bolsas de plástico, que condensan la humedad y favorecen la proliferación de bacterias que degradan el ADN.

Eliminar todo el material desechable empleado en la recogida de muestras.

En la búsqueda de indicios podemos encontrarlos en diferentes sitios entre los cuales encontramos:

#### ❖ Toma de indicios biológicos en el lugar de los hechos

##### 1. Manchas secas

En soportes pequeños y de fácil transporte:

Colillas, armas blancas, monedas, llaves, piedras, ramas, papeles. Recoger por separado e introducirlas en bolsas de papel o cajas.

En soportes grandes no transportables:

A) Soporte no absorbente (cristal, metal...): Recoger con un hisopo mojado en agua destilada (dejar secar antes de guardar) o raspar con bisturí y guardar en bolsa de papel.

B) Soporte absorbente (telas, tapicerías...): Recortar la mancha y guardar en bolsa de papel.

##### 2. Indicios húmedos

Ropas, tapicerías, toallas: Introducir por separado en bolsas de papel madera, Trasladar rápidamente a instalaciones adecuadas, Dejar secar en lugar protegido y sobre una superficie limpia y envolver en papel (por separado). Guardar en bolsas de papel.

### 3. Indicios líquidos (guardar siempre en refrigeración)

- Sangre

- En gran cantidad: recoger con pipeta de plástico y depositarla en un tubo con EDTA
- En pequeña cantidad: recoger con hisopo y dejar secar.
- Coagulada: recoger con una cucharita e introducir en tubo o frasco de plástico.

- ❖ Toma de indicios biológicos en el cuerpo de la víctima

### 1. Manchas de sangre, semen u otros fluidos biológicos

- ❖ Toma de indicios biológicos en casos de agresión sexual

- ❖ Toma de indicios biológicos en casos de investigación biológica de la paternidad

Para transportar muestras al laboratorio se necesitan de sistemas de empaquetamiento y preservación de muestras donde es importante mantenerlas y enviarlas refrigeradas y por un medio de transporte rápido cuando se trata de: indicios líquidos, tejidos blandos y órganos, y otras muestras húmedas (que no puedan secarse). En el caso de manchas de sangre seca se envían sin refrigeración.

Las muestras deben de ser identificadas de la siguiente manera:

- ✓ Tipo de muestra
- ✓ Pertenencia y/o procedencia
- ✓ N° de referencia de la muestra
- ✓ Custodia de la muestra
- ✓ Identificación y firma de la persona que recoge la muestra
- ✓ Fecha y hora de recolección

Para el empaquetado se necesita:

1. Evitar el uso de bolsas de plástico
2. Emplear cajas de cartón o sobre de papel

3. Cada muestra en un recipiente precintado o cerrado herméticamente.

En la recepción de muestras en el laboratorio se debe:

1º Rellenar la hoja de custodia:

Nombre de la persona que entrega las muestras

Fecha y hora de entrega

Nombre de la persona que recibe las muestras

Empresa que realiza el transporte

2º Chequear número de referencia de cada muestra y contrastar con el formulario enviado.

3º Comprobar la integridad de los precintos

4º Al abrir los recipientes comprobar que identificación y descripción son correctas

5º Si fuera posible, fotografiar las muestras.

Anotar discrepancias si las hubiera y establecer acciones correctoras <sup>54</sup>.

Las muestras de sangre nunca deben ser expuestas a calor o a humedad excesiva. Si es posible, la evidencia de sangre debe ser refrigerada hasta que pueda ser transportada al laboratorio, o bien, ésta puede ser recolectada en un papel filtro especial llamado FTA. La evidencia debe ser llevada al laboratorio tan pronto como sea posible.

La sangre derramada o lanzada, vertida o proyectada, babeada o arrojada, es el indicio más valioso, el rastro más importante que puede encontrarse en el lugar de los hechos. No solamente tiene una importancia decisiva para demostrar la perpetración del delito, sino que también aporta un sólido fundamento para la acusación, constituyendo muchas veces la única prueba plena y fehaciente, la prueba técnica que conduce inequívocamente a la condenatoria del probable responsable.



## Muestras de Sangre Líquida de un Individuo

- La sangre líquida de una persona debe ser recolectada por peritos técnicos o profesionales, Figura 11.
- Recolectar la sangre en un tubo vacutainer de aproximadamente 5 ml, con EDTA como anticoagulante y etiquetarlo.
- Cada tubo debe ser etiquetado con la fecha, hora, nombre del Perito, lugar, número de caso, intervención o llamado, Averiguación Previa y nombre del donador.
- Las muestras de sangre deben ser refrigeradas preferentemente a 4 °C (no congeladas).
- Enviarlas al laboratorio tan pronto como sea posible.



**Figura 11 Toma de muestra.**

## Muestras de sangre líquida en el lugar de los hechos

- La sangre líquida debe ser colectada con una pipeta desechable (preferiblemente estéril) y transferida a un tubo de ensaye limpio (preferiblemente estéril).
- Un coágulo de sangre puede ser transferido a un tubo de ensaye limpio con una espátula limpia.
- Un filtro de FTA puede ser usado para absorber sangre líquida o sangre coagulada (evitando áreas que contengan suero únicamente).
- Etiquetar las muestras con número de caso, intervención o llamado, averiguación previa, número de artículo, fecha, hora, lugar y nombre del recolector.
- Si se recolectan muestras líquidas, se deben preservar en refrigeración. Estas muestras se deben llevar al Laboratorio tan pronto como sea posible.

### Muestras de sangre líquida en nieve o agua

- Muestras de sangre encontradas en nieve o agua se deben recolectar inmediatamente para evitar una dilución excesiva.
- La máxima cantidad posible de estas muestras se debe recolectar dentro de un contenedor limpio o en papel FTA evitando cualquier contaminante tanto como sea posible.
- Etiquetar la muestra como se ha indicado anteriormente.
- Enviar las muestras al laboratorio tan pronto como sea posible.

### Manchas de sangre húmeda en ropa

- La ropa con manchas de sangre húmeda se debe colocar sobre una superficie limpia y permitir que se seque al aire libre.
- Nunca recolectar ropa húmeda o ropa con manchas de sangre húmedas en un contenedor sellado herméticamente o bolsas de plástico. Esto causará que la muestra retenga humedad y provocaría el crecimiento de bacterias y el deterioro de la misma.
- Una vez que la ropa y las manchas se han secado, empaquetar en un contenedor de cartón o de papel apropiadamente etiquetado (Figura 12).

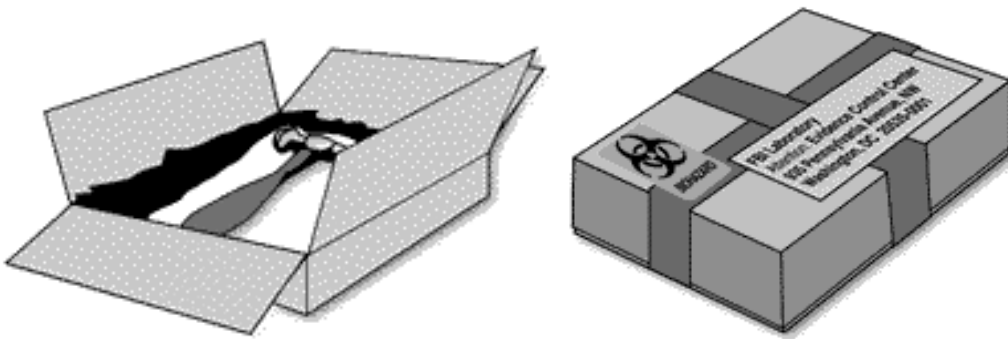


Figura 12 Contenedores

### Manchas de sangre húmeda en objetos

- Los objetos pequeños con manchas de sangre húmeda, se deben secar al aire libre para posteriormente recolectarlos.
- Se debe hacer un esfuerzo para preservar la integridad de cualquier mancha de sangre durante el empaquetado y la transportación.

- Los objetos grandes no pueden ser movidos del lugar de los hechos porque podrían tener manchas de sangre húmeda en ellos. La sangre húmeda debe ser absorbida en un hisopo estéril o con un filtro FTA.



Figura 13 filtro FTA

- Las manchas de sangre en el hisopo estéril o en FTA, se deben secar al aire libre antes de ser empaquetadas.
- Cada objeto y contenedor debe ser apropiadamente etiquetado.

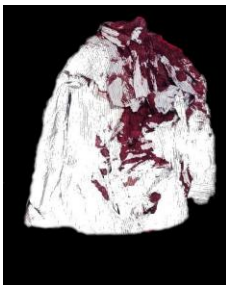


Figura 14 Ropa con manchas de sangre

#### Manchas de sangre seca en objetos movibles

- Las manchas de sangre seca en armas, vestimentas y otros objetos movibles se deben recolectar individualmente.
- Cada artículo se debe colocar en un contenedor (papel o cartón) individualmente, y éste debe ser sellado y etiquetado apropiadamente.

#### Manchas de sangre seca sobre sólidos o superficies no absorbentes de objetos fijos

- Las manchas de sangre se deben documentar de manera detallada.
- La mancha puede ser levantada con una cinta o raspada (con una herramienta filosa) del objeto y colocada dentro de una pieza de papel limpio, o bien con un hisopo estéril previamente humedecido con solución salina estéril que se encuentra en frasco gotero de plástico, rotando la superficie del mismo para recolección del indicio.
- La cinta o el papel con sangre adherida puede ser colocado dentro de un sobre sellado, el hisopo se colocará en una caja porta hisopos (swab box) para su transporte.
- Cada objeto debe ser adecuadamente etiquetado.

Manchas de sangre seca sobre objetos grandes o fijos donde las manchas no pueden ser raspadas y los objetos no se pueden cortar

- Hacer un bosquejo de la mancha de sangre y documentarla.
- La mancha de sangre puede ser tomada con un hisopo previamente humedecido con solución salina esterilizada rotando el hisopo en el área de la mancha.
- El hisopo se deja secar al aire.
- El hisopo se coloca en una caja porta hisopos (swab box), debidamente etiquetado.
- Siempre debe tenerse un control repitiendo el procedimiento en un área adyacente pero sin mancha de la superficie donde se extrajo la mancha de sangre.

Manchas de sangre seca sobre carpetas, tapicería u otros objetos que puedan ser cortados

- El área manchada debe ser documentada como se indicó anteriormente.
- Una porción del objeto que contenga la mancha de sangre se puede extraer cortando con una herramienta limpia.
- Cada corte se debe empaquetar individualmente y etiquetar de manera adecuada.
- Una porción del objeto sin mancha debe ser recolectado y empaquetado como un control.

Salpicadura de sangre seca

- Las salpicaduras a menudo son difíciles de recolectar de las superficies.
- Después de una documentación adecuada se puede utilizar cinta limpia de huellas digitales para levantar las salpicaduras de sangre de la superficie.
- Cada pieza de la cinta utilizada se debe empaquetar dentro de un contenedor plástico. Las puntas de la cinta utilizada se deben colocar de tal manera que resguarden la muestra.
- Colocar la cinta con la muestra de sangre en la mitad del contenedor.
- Sellar y etiquetar el contenedor adecuadamente.
- Tomar un control negativo con la cinta y colocarlo en otro contenedor, sellar y etiquetar adecuadamente.
- Alternativamente, puede procederse como en el numeral

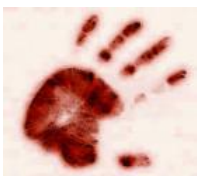


Figura 15. Mancha de sangre en forma de mano.

## **Procedimientos generales**

1. El primer oficial que llegue a la escena protege la misma en su totalidad. Se incluyen los fluidos para evitar su contaminación, posible pérdida o destrucción.
2. Si están expuestos a las inclemencias del tiempo se deben cubrir con un recipiente de metal.
3. Se debe buscar en lugares no obvios. Si el sospechoso se lavó las manos, el caño de curva debajo de desagüe se debe dejar secar y enviar al laboratorio.
4. El sospechoso pudo limpiarse las manos en lugares poco visibles como debajo de un mueble, alfombra u objetos oscuros.
5. Se debe buscar en las rajaduras o hendiduras del piso, en especial entre las losetas.

## 7.7 Técnicas de confirmación

Entre las técnicas de confirmación podemos encontrar la de Takayama para confirmar la presencia de sangre, Inhibición de la aglutinación para comprobar si la sangre es humana y Absorción-Elución para determinar el grupo ABO de la muestra <sup>13</sup>. Aunque son ampliamente utilizadas es importante establecer su sensibilidad y efectividad cuando las muestras han sido sometidas a diferentes condiciones ambientales en diferentes soportes en vista que la mayoría de casos en criminalística presentan evidencias biológicas de diversos orígenes <sup>7</sup>.

Prueba de Takayama o cristales de hemocromógeno: 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 Takayama es de naturaleza alcalina <sup>36</sup>.

Método:

- Se prepara el reactivo de Takayama mezclando una parte de solución saturada de glucosa, una parte de solución de NaOH al 10%, una parte de piridina y dos partes de agua destilada.
- Se coloca una gota de muestra en un porta objetos y un cubre objetos.
- Se desliza por capilaridad 2 gotas del reactivo de Takayama.
- Se calienta la laminilla a baja temperatura por 30 segundos.
- Se observa al microscopio.

Interpretación de resultados:

En caso positivo se observara la formación de cristales romboides de color rosa.

Otra técnica de confirmación es la de Teichman, o cristales de Hemina. En esta técnica la hemoglobina, cuando es tratada con ácido acético, se separa inmediatamente de las proteínas del grupo prostético. Durante la hidrólisis la globulina se desnaturaliza.

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

Método:

- En un portaobjetos se coloca una gota de muestra y se le coloca un cubreobjetos.
- Por capilaridad se deslizan 2 gotas del reactivo de Teichman.
- Se calienta suavemente hasta evaporación.
- Se deja enfriar y se observa al microscopio.

Interpretación de resultados:

En caso positivo se formarán cristales romboides de color café.

Tenemos que una de las técnicas utilizadas en la determinación de la naturaleza humana de una mancha presumiblemente de sangre, es la reacción de las precipitinas.

En esta, las moléculas del anticuerpo (inmunoglobulina) reacciona con el antígeno (proteína soluble) para formar un precipitado fácilmente visible bajo condiciones de luz apropiadas y a las concentraciones equivalentes de antígeno y anticuerpo.

Esta técnica se puede realizar en tubo capilar, en gel y electroforéticamente, se elige la que al investigador más le convenga. Aquí se presenta la técnica en capilar.

Método:

- Se corta un pequeño fragmento de la mancha y se extrae en un tubo de ensayo con unas gotas de solución salina.
- Si la solución esta turbia es conveniente centrifugar y utilizar el sobrenadante.
- Dos gotas del extracto se colocan en un tubo capilar.
- Una cantidad igual de antisuero se absorbe en el mismo capilar de manera que quede abajo del extracto de la muestra.
- El tubo se fija perpendicularmente sobre un soporte por 20 minutos máximo, ya que después de ese tiempo el resultado deja de ser confiable.
- La observación se hace con luz indirecta y sobre un fondo oscuro.

Interpretación de resultados:

La aparición de un anillo de precipitación en la interface de los dos líquidos indica una reacción positiva.

La determinación de los grupos sanguíneos en la química legal, se pueden llevar a cabo por diferentes técnicas, pero recordemos que antes de analizar una muestra debemos de identificar que realmente se trate de sangre humana y de esta manera poder individualizarla posteriormente.

### Evaluación de los métodos de confirmación.

Como se observó en las técnicas de orientación en el método B se evaluaron los test de Takayama, Inhibición de la aglutinación y Absorción-elución que determinan el origen de la sangre y tipifican su grupo sanguíneo <sup>32</sup>, con el fin de determinar su sensibilidad e interferencia frente a diferentes condiciones de soporte, temperatura, tiempo y ambiente de la forma siguiente:

#### 1. Test de Takayama.

Muestras, soportes y condiciones. Se toma muestra de sangre por punción venosa en tubo con anticoagulante EDTA y posteriormente se procederá a realizar manchas sobre Algodón, Tela de Algodón, Seda, Lino, Satín, Jean delgado y Jean grueso. Se expone a una temperatura de -20°, 4°, 37° y 60° C por periodos de tiempo de 24 horas, una semana y un mes. A las manchas de 24 horas se someten a ambientes cerrados, abiertos y en un recipiente con tierra negra.

Sensibilidad de la prueba. Se toman muestras de sangre por punción venosa en tubo con anticoagulante EDTA, a personas con hemoclasificación de los cuatro grupos sanguíneos del sistema ABO (A, B, AB, O), a las que se les hará diluciones seriadas a partir de 1/10, así: 1/100, 1/500, 1/1.000, 1/ 5.000, 1/10.000.

Test de Takayama. Con una hoja de bisturí se hará un raspado de la mancha con el fin de obtener pequeñas escamas, las cuales se colocaran entre lámina y laminilla. Luego se agrega por capilaridad una gota del reactivo de Takayama dejando en reposo de 10 a 20 minutos. Se observa al microscopio con objetivo de 10X y 40X incluyendo controles positivos y negativos.

#### 2. Determinación de sangre humana en manchas. Inhibición de la aglutinación.

Muestras, soportes y condiciones. Las mismas del método de Takayama.

Sensibilidad de la prueba. Igual que en el test de Piramidón.

Prueba de Inhibición de la aglutinación. Se titula el suero de Coombs y se seleccionaron las 2 diluciones que demuestren mejor lectura. La muestra pretratada (Ver test de Piramidón) se pone en contacto con las diluciones escogidas y glóbulos rojos sensibilizados al 2%. Se realizaran controles con sangre humana, sangre animal y solución salina al 0.85%<sup>32</sup>.

#### 3. Absorción - Elución.



Muestras, soportes y condiciones. Igual al test de Piramidón.

Método de absorción-elución. Esta prueba se llevó a cabo siguiendo el descrito por Nishi, K en 1985<sup>24</sup>.

Resultados:

El test de Takayama se ve afectado cuando la muestra ha sido expuesta a temperaturas altas sin importar el tiempo de exposición. La inhibición de la aglutinación se vio alterada cuando las muestras fueron enterradas y su soporte era Seda o Satín. La sensibilidad de las dos pruebas anteriores es muy baja, detectando presencia de sangre y sangre humana en muestras diluidas hasta 1/100. Se confirma que se requiere abundante cantidad de muestra para obtener un resultado confiable<sup>32</sup>.

La técnica de Absorción-elución para determinar el grupo sanguíneo se vio afectado principalmente por el soporte de tela Jean delgada o gruesa. La temperatura de almacenamiento elevada (60°C) solo alteró el algodón luego de un mes de recogida la muestra. Katsuji, reportó que los antígenos son termoestables inclusive cuando han sido purificados. El tiempo de almacenamiento no afectó los resultados. La sensibilidad de esta prueba se ve afectada cuando las muestras son diluidas en concordancia con otros reportes donde se encuentran resultados discrepantes cuando se trabaja con muestras húmedas<sup>25</sup>.

Se obtuvieron las siguientes conclusiones:

Las pruebas confirmatorias no se ven afectadas en su mayoría al variar los soportes, la temperatura o las condiciones ambientales bajo las cuales fueron almacenadas. Respecto a la sensibilidad se encontró que en las pruebas presuntivas es alta en contraposición a las confirmatorias que requieren de muestras que no hayan sido sometidas a diluciones o lavados<sup>32</sup>.

# 7.8 TECNICAS PARA DETERMINAR GRUPO SANGUÍNEO:

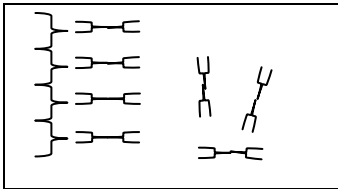
Son numerosas las técnicas para determinar el grupo sanguíneo de un individuo, con solo analizar sus cabellos. Sin embargo, en la actualidad, las técnicas que arrojan resultados confiables en la búsqueda de aglutinógenos responsables del grupo, son las siguientes:

## A) Absorción - Elución:

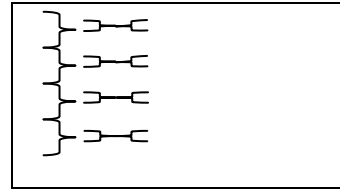
Básicamente la técnica de Absorción-Elución en pelo; consiste en cortar 6 cm del pelo en estudio en tres partes iguales, luego de ser lavado con jabón y éter. Cada trozo se deja 3 hs. con su antisuero correspondiente (anti A, anti B, anti H), de títulos 128,64 y 32, respectivamente, con constante agitación: Etapa de Absorción. Luego se lavan los trozos del pelo en solución salina, se agregan suspensiones al 0.2 % de glóbulos correspondientes al antisuero colocado inicialmente. Se someten los trozos de pelo en contacto con glóbulos rojos a temperatura de 50°C durante 10 minutos y se completa la etapa de elución con ayuda de vibraciones ultrasónicas. Finalmente se centrifuga a 1200 durante 2 minutos y se observa la aglutinación formada.

## TECNICA DE ABSORCIÓN-ELUCIÓN PARA SANGRE

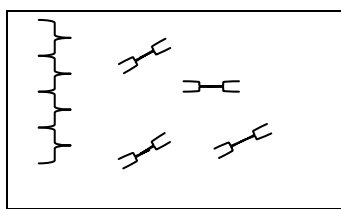
La técnica de absorción-elución tiene como fundamento un primer proceso de absorción específica entre la mancha problema y su anticuerpo homólogo; después que la absorción es completa, el excedente de anticuerpo se elimina por medio de lavados con solución salina fría. El complejo antígeno anticuerpo se disocia por calentamiento generalmente a 56°C; el anticuerpo eluido se pone en contacto con eritrocitos lavados de propiedades antigénicas conocidas; finalmente la aglutinación indica la presencia de un antígeno de la misma especificidad que el de las células usadas como testigo conocido <sup>36</sup>.



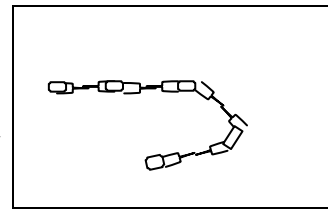
1.- Tratamiento con antisuero el anticuerpo se une a su antígeno específico.



2.- El exceso de anticuerpo se remueve mediante lavados.



Agregar glóbulos rojos conocidos



3.- Si hubo reacción Ag-Ab, uno y otro se separan al eluir por calentamiento, quedando el Ab en la fase líquida.

4.- Se observara aglutinación si el Ag presente en los glóbulos rojos agregados, se encuentra en la muestra problema.

---

Figura 16. Técnica de absorción-elución, para determinar grupos sanguíneos en manchas de sangre seca<sup>36</sup>.

- I. Determinación de grupo sanguíneo en el sistema ABO por medio de la técnica de absorción-elución.

#### Material empleado

1. Sueros hemoclasificadores Anti-A, anti-B, Anti-AB y lecitina Anti-H.
2. Metanol CH<sub>3</sub>OH.
3. Fosfato ácido de sodio Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.
4. Fosfato diácido de potasio KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
5. Cloruro de sodio NaCl
6. Tubos de ensayo de 13 x 100.
7. Pipetas Pasteur.
8. Bulbos de goma.
9. Tijeras.
10. Aplicadores de madera.
11. Guantes desechables.
12. Tela estéril de algodón y sin apresto.
13. Gradillas para tubos de ensayo de 13 x 100.
14. Refrigerador.
15. Centrifuga.
16. Baño maría a temperatura constante.
17. Horno.

#### Procedimiento:

1. Cortar 4 fragmentos de tela impregnada con sangre problema, que medirán 3 mm<sup>2</sup> (cuando la mancha problema no se encuentre sobre tela, absorberla con solución salina en pequeños trozos de tela de algodón, de color blanco, sin apresto y esterilizada, que en caso necesario puede secarse en la estufa) y colocar cada recorte en los tubos necesarios.
2. Los tubos se colocan en una misma columna de una gradilla como se ilustra en la figura 17, columna que se marcará como problema.
3. En la forma antes descrita se prepara otra serie de tubos, en cuyo interior se colocarán fragmentos de tela manchadas con sangre de grupo conocido: A, B, AB y O, marcándose tal columna como testigo.
4. Igualmente se colocará otra serie de tubos, que contengan fragmentos de una parte de tela en estudio, que no se encuentre maculada con sangre y se pondrán en una tercera columna asignada como control.

5. Obsérvese en la figura 17 como las hileras horizontales de la gradilla se marcarán: Anti-A, Anti-B, Anti-AB y Anti-H, en cada una de ellas y en la columna correspondiente al testigo; se encontrará al respectivo tubo conteniendo muestras de grupo conocido, requisito sin el cual la técnica carece de validez.
6. Fijar las manchas de sangre impregnadas en la tela, cubriéndolas con metanol cuando menos durante 15 minutos, después de ese tiempo eliminarlo totalmente.
7. Agregar a cada tubo de la hilera Anti-A, dos gotas de suero Anti-A; a los de la hilera Anti-B, suero Anti-B; a los de la hilera Anti-AB, suero anti-AB y a los de la hilera Anti-H, lecitina Anti-H.
8. Dejar en refrigeración durante toda la noche a 4°C.
9. Lavar con solución salina fría 6 veces o hasta obtener una solución clara e incolora.
10. Añadir a cada tubo, 2 gotas de solución salina a temperatura ambiente.
11. Colocar la gradilla en el baño maría a 56°C, durante 10 o 15 minutos.
12. Sacar cuidadosamente los trozos de tela con un aplicador de madera, diferente para cada tubo.
13. Agregar una gota de solución de glóbulos rojos lavados al 2% de la siguiente manera:  
Del grupo A, a los tubos de la hilera A.  
Del grupo B, a los tubos de la hilera B.  
Del grupo AB, a los tubos de la hilera AB.  
Del grupo O, a los tubos de la hilera H.  
(Problemas, control, testigo) figura 17.
14. centrifugar durante 30 segundos a 3400 rpm.
15. Observar la presencia o ausencia de aglutinación.

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

- A. Si hay aglutinación en el tubo problema de la hilera marcada como Anti-A, el grupo corresponderá al A; puede aglutinar ligeramente en el tubo problema de Anti-AB.
- B. Si hay aglutinación en el tubo problema de la hilera marcada como Anti-B, el grupo corresponderá al B; también puede aglutinar ligeramente en el tubo problema de Anti-AB.
- C. Si hay aglutinación en los tubos marcados: Anti-A, Anti-B y Anti-AB; pero no la hilera asignada como Anti-H, el grupo de la muestra analizada corresponderá al AB.

- D. Si existe aglutinación en el tubo problema de la hilera marcada como Anti-H y simultáneamente en el problema de la hilera asignada como Anti-A, el grupo en cuestión corresponderá al A2.
- E. Si no hay aglutinación en los tubos problema de las tres primeras hileras, pero sí en el de la hilera marcada como Anti-H, el grupo sanguíneo corresponderá al O.

	Problema	Testigo	Control
Anti-A	○	Ⓐ	○
Anti-B	○	Ⓑ	○
Anti-AB	○	ⒶⒷ	○
Anti-H	○	⓪	○

Figura 17 Técnica de absorción elución.

II. Determinación de grupo sanguíneo del sistema Rh en manchas de sangre por la técnica de absorción-elución.

Para efectuar estas determinaciones es indispensable contar con una muestra de sangre fresca del grupo O que contenga los cinco antígenos del sistema Rh ( $R_1, R_2$ ).

a. Preparación de las células testigo:

Estas células deberán prepararse inmediatamente antes de ser utilizadas, a partir de una muestra de sangre con las características anotadas anteriormente, lavándolas tres veces con solución salina y tratándolas posteriormente con bromelina comercial diluida 1:10 con una solución buffer de fosfatos de pH 5.7.

Se colocan dos gotas de glóbulos lavados  $R_1R_2$  en un tubo de 12 x 75, se agrega a un segundo tubo 0.1 mL de solución de bromelina y 0.9 mL de la solución buffer, quedando así la enzima diluida 1:10; se mezcla perfectamente para después colocar cada tubo en la incubadora durante 5 a 6 minutos. Se añaden 4 gotas de buffer con bromelina a las dos gotas del paquete globular  $R_1R_2$  y se mezcla. Este tubo se coloca en la incubadora a 37°C, durante 10 minutos. Pasado el tiempo se saca de la incubadora y se llena con solución salina fresca y estéril; centrifugar y realizar tres lavados con solución salina. Con los glóbulos lavados hacer una suspensión al 3.5%.

b. Preparación de las muestras.

Diluir los sueros anti-D y anti-C usando una gota de suero y 9 gotas de solución salina (dil. 1:10). Los sueros anti-C, anti-e y anti-E se diluirán 1:2. Una gota de suero y dos de solución salina. La albúmina bovina se diluirá al 1.5% con solución salina. Se cortarán fragmentos de tela manchada con sangre, este se marcará como problema y también de sangre testigo (3 mm). Para los grupos C, E y e de 4 x 4mm; de 3x3 mm. Para los grupos C y D.

c. Procedimiento

- i. Colocar los fragmentos de tela en sus respectivos tubos, ver figura 18. Añadir una gota de antisuero específico en cada una de los tubos.
- ii. Tapar bien los tubos y colocar la gradilla en la incubadora a 37°C durante toda la noche.
- iii. Lavar con solución salina durante 2 horas, cambiando 6 veces esa solución con intervalos de 20 minutos.
- iv. Quitar la última solución y agregar 3 gotas de albúmina diluida a cada tubo para la elución.
- v. Incubar durante 40 minutos a baño maría a 60°C sin tapar.
- vi. Sacar la gradilla del baño y retirar rápido las piezas de tela con ayuda de aplicadores de madera.
- vii. Agregar células testigo R1, R2 tratadas con bromelina y tapar los tubos.
- viii. Incubar a 37°C durante hora y media.
- ix. Centrifugar durante 1 minuto a 3400 rpm.
- x. Leer macroscópicamente.
- xi. Pasar el contenido de cada tubo a una mirilla que contenga una gota de solución salina.
- xii. Mezcla y leer al microscopio.

	C	c	D	E	e
Testigo positivo	○	○	○	○	○
Problema	○	○	○	○	○
Testigo negativo	○	○	○	○	○

Figura 18. Determinación del factor Rh por la técnica de absorción elución.

III. Determinación de grupo sanguíneo del sistema MN en manchas de sangre por medio de la técnica de absorción-elución.

Esta técnica se realiza por un experto en la materia debido a que los antígenos MN son difícilmente detectables por la inespecificidad y mala calidad de los antisueros disponibles.

Procedimiento:

- i. Colocar fragmentos de tela de 15 mm<sup>2</sup> manchados con sangre en tubos, colocarlos en la primera columna y marcarlos como problema, ver figura 19.
- ii. Colocar fragmento de tela manchadas con sangre con propiedades antigénicas conocidos del grupo M en un tubo en la primera fila y del grupo N en la segunda hilera y marcar la columna como testigo.
- iii. Colocar fragmentos de la tela en estudio sin manchas de sangre en la tercer columna y marcarla como control.
- iv. No fijar con metanol.

- v. Colocar una gota de suero anti-M sin diluir a la hilera anti-M y de suero anti-N a la hilera anti-N.
- vi. Dejar en refrigeración toda la noche a 4°C
- vii. Lavar con solución salina 5 veces.
- viii. Agregar 3 gotas de las células conocidas M a la hilera 1 y de N a la hilera 2.
- ix. Poner a ebullición por 15 minutos.
- x. Leer aglutinación.

Interpretación.

Si aglutina la hilera anti-M, el grupo será M.

Si aglutina la hilera anti-N, el grupo será N.

Si aglutina en ambas hileras el grupo será MN.

	Problema	Testigo	Control
1. Anti-M		M	
2. Anti-N		N	

Figura 19.

En resumen, la técnica de absorción-elución es la más satisfactoria para determinar el grupo sanguíneo del sistema ABO, en manchas de sangre seca en algunas literaturas se reporta que este método puede usarse para el sistema MN y para determinar Rh, aun cuando se tiene el inconveniente, en el caso del sistema MN, de que sus antígenos son difícilmente detectables por la inespecificidad y mala calidad de los antisueros disponibles; en el caso de el Rh, se requiere de mayores cantidades de muestra por tener que estudiarse.

## B) TECNICA DE ABSORCIÓN-INHIBICION

La técnica de absorción-inhibición, para la determinación del grupo sanguíneo, se utiliza además de manchas de sangre, preferencialmente en saliva y líquido seminal, fluidos orgánicos en los que el antígeno se encuentra en forma soluble<sup>36</sup>.

El material antigénico se coloca en contacto con su anticuerpo homologo a fin de efectuar su absorción específica. El anticuerpo en el sobrenadante, se observa con eritrocitos de propiedades antigénicas conocidas; es conveniente trabajar con testigos de grupo conocido.

Procedimiento:

1. cortar fragmentos de tela impregnada de muestra problema (3mm<sup>2</sup>) así mismo del control y testigos en hileras de tubos etiquetadas como: Anti-A, Anti-B y Anti-H.
2. poner tres gotas de cada uno de los sueros en sus respectivas hileras como se ilustra en la siguiente figura:

	Problema	Testigo	Control
Anti-A	O	O	O
Anti-B	O	O	O
Anti-H	O	O	O

Figura 20: Técnica de absorción-inhibición.

#### INTERPRETACIÓN:

- A. Si se observa aglutinación con Anti-A y con Anti-B, pero no con Anti-H el grupo será O.
- B. Si hay aglutinación en los tubos con anti-B y con Anti-H, pero no en el de Anti-A, el grupo será A.
- C. Si no existe aglutinación con Anti-A ni con anti-B, pero sí con Anti-H, el grupo será AB.
- D. Si se obtiene aglutinación con Anti-B pero no la hay con Anti-A ni con Anti-H, el grupo será A2.
- E. Si se obtiene aglutinación con Anti-A y con Anti-H, pero no con Anti-B, el grupo será B.



Figura 21.



## 8. DISCUSION DE RESULTADOS

Como puede observarse se realizó una exhaustiva búsqueda de información para poder mostrar aspectos importantes en la determinación de los grupos sanguíneos en manchas de sangre, ya que el presente trabajo tiene como propósito introducir al Químico Farmacéutico-Biológico en el área forense y por ende en el esclarecimiento del delito.

Cabe señalar que la información acerca de los grupos sanguíneos, recae en su mayoría en el tema de transfusiones sanguíneas, y, como herramienta de identificación, dentro del ámbito forense, se desvía la atención a la huella genética, restándole importancia a los grupos sanguíneos. Es por ello que se recopiló la información necesaria para abordar el tema de los grupos sanguíneos dentro de la Química Legal, dándole la importancia que tienen en dicha área, esto es: el ADN por sí solo no puede ser utilizado en la resolución del delito, ya que sólo es parte del rompecabezas en el que se encuentran embebidos los grupos sanguíneos, además de otro tipo de indicios, y que en conjunto reflejan como ocurrió el hecho delictivo; además de señalar perpetradores, quienes cometen el delito, y a sus víctimas.

Observamos que existen variedad de sistemas de grupos sanguíneos, sin embargo no todos pueden ser determinados por las diversas técnicas inmunohematológicas, por ello el sistema ABO sigue siendo el más utilizado y de esta manera sirve de apoyo en la identificación de individuos. El sistema ABO ofrece características peculiares que hacen más factible la identificación de un sospechosos, el casos del grupo A que presenta subtipos es un claro ejemplo de ello; la frecuencia con que se manifiestan y el tipo de raza se relacionan con los grupos sanguíneos.

En la búsqueda de información se encontró que el método de absorción-elución es el más utilizado en la determinación de grupos sanguíneos en manchas de sangre, y podría decirse que el más confiable, por lo cual en la actualidad necesitamos que se realicen nuevas técnicas más sensibles y más específicas.

El presente trabajo es una herramienta útil en la que se apoyen y sirva de base en la creación de nuevos proyectos acerca del tema aquí tratado, intentando acercar y motivar a estudiantes universitarios, profesores, profesionistas expertos en el área, etc., a que desarrollen nuevas técnicas y estudios acerca de los grupos sanguíneos y su uso en el área Químico-Legal, mejorando de esta manera la impartición de justicia.

## 9. CONCLUSIONES

El presente trabajo se realizó con el fin de proporcionar herramientas teóricas al Químico Farmacéutico-Biológico, ya que se proporcionan, en su mayoría, aspectos teóricos que son útiles en el campo de la investigación química forense, inmunológica, genética y hematológica.

Es importante considerar el hecho que la ciencia ha logrado connotados avances en los últimos años en relación a la investigación forense, lo que hace más confiable la procuración de justicia, apoyada por la ciencia y la tecnología.

La importancia que ha adquirido con el paso del tiempo la Química Analítica en la investigación Criminalística proviene de su estrecha relación con estudios periciales de otro tipo como son la Balística, Hematología, Genética Forense, Grafoscopia, Incendios y Explosivos. La Química está presente cuando existe la necesidad de conocer la naturaleza intrínseca de cualquier sustancia o elemento, y más aún, cuando sirve para auxiliar en la investigación científica de los delitos.

Los peritos químicos son requeridos para participar en diferentes situaciones durante un proceso legal. Su presencia es indispensable en las diferentes especialidades.

Por ello la determinación de grupos sanguíneos no es menos importante, en la identificación de individuos, que el estudio de la huella genética, porque al igual que los peritos y sus diferentes especialidades, los grupos sanguíneos son un apoyo importante en la solución de un delito.

Sin embargo aun no se ha realizado un método nuevo, en la determinación de grupos sanguíneos ya que en la bibliografía revisada sólo se encontró que el método de absorción - elución sigue siendo el método más usado aun en la actualidad.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bencomo Hernández A, Alfonso Valdés Y, Alfonso Valdés M, González Sampedro R, Fernández Estrada J, Ballester Santovenia A. Frecuencia de los grupos sanguíneos A1, A2, Aint, Ael, B y O en donantes de sangre. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1997;13(2):122-31.
2. Bevel T, Gardner RM. *Bloodstain Pattern Análisis*. 2ª ed. USA: Ed. CRC PRESS, 1998.
3. Budowle B., Leggitt JL., Defenbaugh DA, Keys KM, Malkiewicz, SF. The Presumptive Reagent Fluorescein for Detection of Dilute Bloodstains and Subsequent STR Typing of Recovered DNA. *J Forensic Sci*. 2000; 45(5): 1090-1092.
4. Bird GWG. A-intermediates in Maharastrian blood donors. *Vox Sang* 1964;9:629.
5. Castelló PA, Álvarez SM, Feucht M, Verdú-Pascual F.A. Revelado de Manchas Latentes: Efectividad del Luminol y Evaluación de su Efecto Sobre el Estudio del DNA. *Cuad Med Forense*. 2002; 28: 33-36.
6. Castelló A, Verdú PF. Critical Revision of Presumptive Tests for Bloodstains. *Forensic Science Communications*. 1999; 1(2).
7. Cox M. A Study of the Sensitive and Specificity of Four Presumptive Tests for Blood. *J Forensic Sci*. 1991; 36(5): 1503-1511.
8. Della Manna A, Montpetit S. A Novel Approach to Obtaining Reliable PCR Results from Luminol Treated Bloodstains. *J Forensic Sci*. 2000; 45(4): 886-890.
9. Eckert, W. G., James, S. H. *Interpretation of bloodstain evidence at crime scenes*. New York: Elsevier; 1989.
10. Escrito HTML: Serology Forensic. Recuperado el 21 Jul. 2006 <http://faculty.ncwc.edu/toconnor/425/425lect13.htm>.
11. Foresto P, Arriaga S, Biondi C, Racca A, Ruiz S, Viglione P, García Rosasco M, Solís E, Valverde J, Méndez N, Pivetta M. Determinación de subgrupos del antígeno A. Sus implicancias en Inmunohematología. *Rev Arg Trasnf XIII* 1987;3:141.
12. Gross A M et al. The effect of Luminol on presumptive tests and DNA analysis using the polymerase chain reaction. *J Forensic Sci* 1999; 44(4): 837-40.
13. Gisbert JA., Villanueva E. *Medicina legal y toxicología*. 6a Ed. Masson, Barcelona, 2004.

14. Goldstein IJ, Hayes CE. The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1978;35:127.
15. James S. H., Eckert W. G. Interpretation of bloodstains evidence at crime scenes 2<sup>a</sup> Ed. New York: CRC Press; 1999.
16. Kent JM, Elliot DA, Miskelly GM. Inhibition of Bleach-Induced Luminol Chemiluminescence. *J Forensic Sci.* 2003; 48(1): 64-67.
17. Lee HC, Gaensslen RE, Bigbee PD, Kearney JJ. Guía para la recolección y preservación de evidencia del DNA. USA: Departamento de justicia de los Estados Unidos de América, 1999.
18. Los indicios en Medicina Legal. En: Gisbert Calabuig JA. Medicina Legal y Toxicología 5<sup>a</sup> Ed. Barcelona: Salvat; 1998. p. 1103-27.
19. Lorente JA, Lorente M. El ADN y la identificación en la investigación criminal y en la paternidad biológica. Granada: Editorial Comares; 1995.
20. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine. 9<sup>th</sup>. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993.
21. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/13/Redbloodcells>.
22. Moreno LR. Los indicios biológicos del delito. 1<sup>a</sup> ed. México (DF) : Instituto Nacional de Ciencias Penales, 2003.
23. Mourant AE, Kopéc AC, Domaniewska-Sobczak K. The distribution of the human blood groups and other polymorphisms. Londres: Oxford University Press, 1976.
24. Nishi K, Ito N, Mizumoto J, Wada K, Tsuji T, Kimura A. Reliability of blood grouping of aged blood to direct hemagglutination methods and absorption elution method. *Nippon Hoigaku Zasshi.* 1985; 39(2): 131-137.
25. Nishi K, Rand S, Nakagawa AY, Yamasaki S, Yamamoto Y, Kobayashi A, Kane M, Morimoto A, Spalthoff H, Annuss B. ABO Blood Typing from Forensic Materials - Merits and demerits of detection methods utilized in our laboratories, and biological significance of the antigens. Anil Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology [serial online], 2005;6(2). [http://www.geradts.com/anil/ij/vol\\_006\\_no\\_002/papers/paper001.html](http://www.geradts.com/anil/ij/vol_006_no_002/papers/paper001.html)
26. Palatnik M. A and AB blood group variants in Brazil. *Rev Brasil Genet* VII 1984;4:727.
27. Palatnik M, Schull WJ. The ABO blood groups and the B atypical gene in Brazil: A serologic and population genetic approach to the issue. *Am J Human Genet* 1986;38:390.

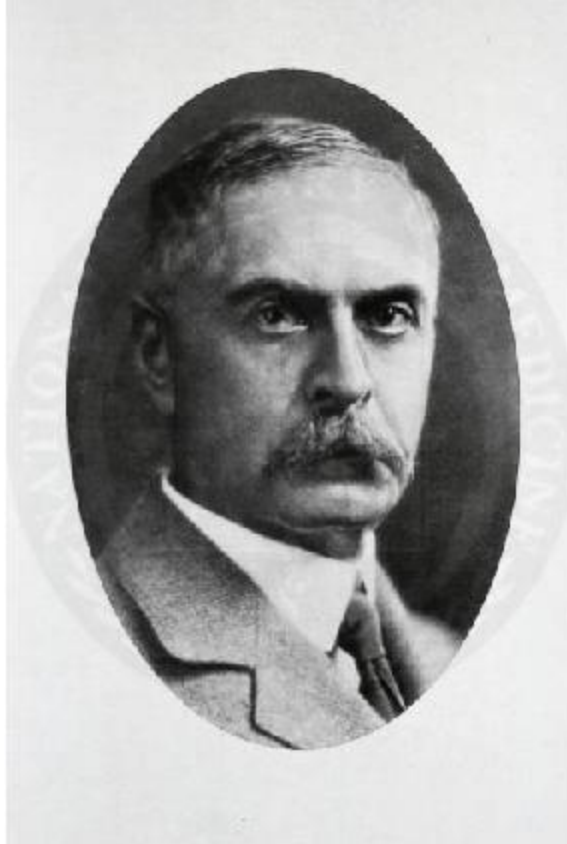
28. Salmon Ch, Cartron JP, Rouger Ph. Les groupes sanguins chez l'homme. Paris: Ed. Masson, 1991.
29. Salmon Ch. Les groupes sanguins ou l'écriture des genes. Paris: Ed. Masson, 1997.
30. Vélez AA. Criminalística general. 1ª ed. Bogotá: Ed. Temis, 1971.
31. Verdú, F, Castelló, A. Avances científicos frente a exigencias de la Justicia, Rev Esp Med Leg 1998; XXII ( 84-85): 5-9.
32. Villegas, MR, Acevedo, ML, Miranda, J. *et al.* Validación de técnicas para detección de sangre, sangre humana y grupo sanguíneo ABO en diferentes soportes y condiciones con fines forenses. *Cuad. med. forense*. [online]. oct. 2005, no.42 [citado 12 Febrero 2007], p.267-274. Disponible en la World Wide Web: <[http://www.scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1135-76062005000400004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-76062005000400004&lng=es&nrm=iso)>.
33. Zonderman J. Beyond the crime lab. The New Science of investigation. 1ª ed. USA (NY): Ed. John Wiley and Sons, Inc; 1999.
34. García RM, Lippi S, Sigot, V, Rasia, RJ; Valverde JR. Frecuencia de los grupos sanguíneos A1, A2, Aint, B y O en individuos normales. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter, sep.-dic. 2001, vol.17, no.3, p.171-174.
35. Thorwald, J. El siglo de la investigación criminal. España: Editorial Labor. Traducción del alemán por Formosa F. 1999:206-227.
36. Franco DAM. Hematología Forense. 3ª ed. México: Editorial Porrúa, 1999: 6-81.
37. Moreno GR. Introducción a la criminalística. 9º ed. México: Editorial Porrúa, 2000: 17-26, 307-320.
38. [www.bloodcenters.org](http://www.bloodcenters.org): 56. Facts About Blood and Blood Donation.
39. Bastian BJ., Carolina Tips, (1986). 49: 25.
40. Montiel SJ. Criminalística. México: Ed. Limusa Noriega Editores, 1993: 85-98.
41. Vargas AE. Medicina forense y deotología médica. México: Editorial trillas, 1991: 92-97.
42. Rico G. La fotografía forense en la peritación legal. México: Limusa Noriega editores, 1991: 140,141.
43. [http://www.biología.arizona.edu/human/sets/blood\\_types/02q.html](http://www.biología.arizona.edu/human/sets/blood_types/02q.html)
44. <http://www.cun.es/aicntic/dep16.html>

45. Negre M, M.C., Castello PA, Gil PP. ¿Manchas de sangre?: seguridad en pruebas de orientación. *Cuad. Med. Forense*. [on line]. 2003, no. 34 [citado 2007-07-05], pp. 29-34. Disponible en: [http://www.scielo.icsii.es/scielo.php?scrip=sci\\_arttext&pid=s1135-76062003000400003&nrm=iso.ISSN1135-7606](http://www.scielo.icsii.es/scielo.php?scrip=sci_arttext&pid=s1135-76062003000400003&nrm=iso.ISSN1135-7606).
46. <http://www.blog.marcosdelvalle.com/2007/05/07/quimioluminiscencia/>
47. <http://es.wikipedia.org/wiki/Luminol>
48. <http://es.wikipedia.org/wiki/Quimioluminiscencia>
49. Islas PV. Análisis Biológico y Bioquímico de la evidencia. UNAM, México, DF, 2007 : 7-66
50. <http://es.wikipedia.org/wiki/Hemoglobina#column-one#column-one>
51. [http://es.wikipedia.org/wiki/Grupo\\_sangu%C3%ADneo](http://es.wikipedia.org/wiki/Grupo_sangu%C3%ADneo)
52. [http://es.wikipedia.org/wiki/Imagen:ABO\\_sangre\\_tipo.svg](http://es.wikipedia.org/wiki/Imagen:ABO_sangre_tipo.svg)
53. [http://www.articset.com/Adminiculos-y-Gizmos\\_artic\\_es\\_Como-la-ayuda-de-Luminol-solucion-a-crmenes.htm](http://www.articset.com/Adminiculos-y-Gizmos_artic_es_Como-la-ayuda-de-Luminol-solucion-a-crmenes.htm)
54. <http://www.slagf.org/toma> .
55. <http://centros5.pntic.mec.es/ies.victoria.kent/Rincon-C/rincon.htm>
56. <http://es.wikipedia.org/wiki/Fenolftale%C3%ADna>
57. <http://es.wikipedia.org/wiki/Quimioluminiscencia>
58. <http://es.wikipedia.org/wiki/Luminol>
59. Hockberger, P. E. (2002): "[A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms](#)", en *Photochem. Photobiol.*, vol. 76. 561-579.
60. Ríos OG. Manual de prácticas para el laboratorio de análisis bioquímico clínico 1. Hematología. UNAM, FESZ, México, DF. 2004: 173-190.

## 11. ANEXO 1

### KARL LANDSTEINER

Figura 22. Karl Landsteiner y los grupos sanguíneos



La primera transfusión humana con éxito fue probablemente la que realizó en 1667 Jean-Baptiste Denis administró tres pintas o gotas de sangre de carnero a una persona sin observar ninguna reacción postransfusional. Aparentemente ello le animó a inocular sangre de ternera a un joven de vida licenciosa para aplacar su estado de agitación, con un desenlace mortal. Aunque fue exonerado por los tribunales, la facultad de París prohibió las prácticas transfusionales. La incompatibilidad sanguínea entre especies había sido ya puesta de manifiesto en 1873 por Landois y por Ponfick en 1874.

Nos encontramos a finales del siglo XIX, y una nueva ciencia está naciendo, la inmunología, interesada en sus inicios por los sueros y las vacunas. Las investigaciones llevadas a cabo por Ehrlich, Bordet, Behring y otros inmunólogos, sientan las bases para el conocimiento de las reacciones inmunológicas, responsables de los accidentes postransfusionales. Karl Landsteiner, médico austriaco (1868-1943), enseñaba entonces anatomía patológica en la Universidad de

Viena. Uno de sus campos de investigación fue la genética de la sangre humana que comparó con la de los simios. Landsteiner observó que al mezclar la sangre de dos personas había ocasiones en que los glóbulos rojos se aglutinaban formando grumos visibles. Analizó la sangre de un total de 22 personas, incluyendo la suya y la de cinco colaboradores de su laboratorio, para lo cual procedía a separar el suero de la sangre total, lavaba después los glóbulos rojos y los sumergía en una solución de suero salino fisiológico. A continuación ensayaba cada suero con los diferentes glóbulos rojos obtenidos y tabulaba los resultados. Llegó así a descubrir tres tipos distintos de hematíes, denominados A, B y O, que daban lugar a reacciones de aglutinación. Estos hallazgos los realizó en Viena hacia 1901. Dos años más tarde, dos discípulos suyos, Alfredo de Castello y Adriano Sturli, analizando 155 muestras (de 121 pacientes y 34 controles sanos), descubren un cuarto grupo, al que llaman AB, sin poder aglutinante.

La sangre humana posee de forma natural unas moléculas conocidas como anticuerpos capaces de reaccionar con otras moléculas de los glóbulos rojos llamadas antígenos o aglutinógenos, produciendo como resultado de la interacción antígeno-anticuerpo su aglutinación. Estos anticuerpos o isoaglutininas (que no existen en el tipo AB) son las responsables de la incompatibilidad de las transfusiones sanguíneas si no se selecciona o se tipa (es así como se dice técnicamente en el argot del laboratorio) la sangre a transfundir del donante. Ottenberg en 1911 acuñó el término de “donante universal” para el grupo O por carecer de antígenos en los eritrocitos. En 1908 Epstein y Ottenberg sugieren que los grupos sanguíneos son hereditarios. Y en 1910, E. von Dungern y L. Hirsfeld descubren que la herencia de estos grupos sanguíneos sigue las leyes de Mendel con un patrón dominante para los tipos A y B. En 1927 junto con Philip Levine, inmunizando conejos, Landsteiner descubrió tres antígenos más (M, N y P) similares a los antígenos de los grupos A y B pero que, a diferencia de éstos, su presencia en los hematíes no supone la existencia en la sangre humana normal de aglutininas naturales.

Posteriormente en 1940, junto con Alexander Salomon Wiener, descubre otro antígeno en los hematíes al que bautiza como factor Rh, al haberse hallado en el suero de conejos inmunizados con sangre procedente de un mono de la India, el *Macacus Rhesus*. Un niño que tiene el factor Rh, es decir, es Rh+, puede inmunizar a su madre Rh- durante la gestación. Ésta desarrolla anticuerpos específicos anti-Rh que pueden en su segundo embarazo atravesar la placenta y producir el aborto o una enfermedad hemolítica en el recién nacido que cursa con ictericia, la temible eritroblastosis fetal. Más tarde Ronald A. Fisher describe otros sistemas de antígenos eritrocitarios y hoy en día se conocen un total de hasta 42 antígenos distintos en los glóbulos rojos humanos.

Gracias a sus trabajos pioneros en inmunohematología se estableció la compatibilidad sanguínea entre las distintas sangres de los seres humanos. El descubrimiento de los grupos sanguíneos por Karl Landsteiner, del que ahora se cumple el primer centenario, facilitó la labor de la justicia al permitir los análisis periciales en casos de litigio de paternidad, y lo que es más importante, hizo posible las transfusiones sanguíneas seguras basadas en criterios científicos,



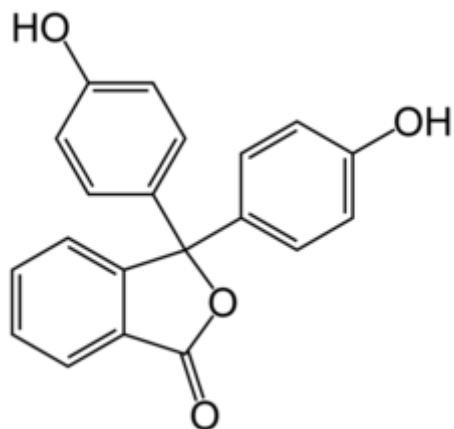
evitando los temibles accidentes postransfusionales (hemólisis o destrucción de los glóbulos rojos y lesiones renales) por la falta de compatibilidad sanguínea.

El día 19 de noviembre de 1914, E. Merlo, a la sazón administrador de la Clínica Médica de la Universidad de Buenos Aires, lleva a cabo con éxito la primera transfusión indirecta en el hombre siendo el donante R. Mosquera, un portero del establecimiento. Luego, muchos otros investigadores (Carrel, Crile, Ellsberg, Unger) pusieron a punto multitud de técnicas para optimizar la transfusión sanguínea, que han hecho posible que en los modernos bancos de sangre la transfusión sea una práctica rutinaria.

En el campo de la antropología, el tipaje de los grupos sanguíneos favoreció los estudios sobre la distribución de los grupos sanguíneos en las distintas razas y etnias. La importancia de las aportaciones de Landsteiner tuvieron justa recompensa y reconocimiento internacional por la comunidad científica. Fue galardonado por la Academia sueca con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1930<sup>55</sup>.

## ANEXO 2

### Fenolftaleína



<b>Fenolftaleína</b> (Indicador de pH )	
<i>Inferior a pH 7</i>	<i>Sobre pH 7</i>
<b>Incoloro</b>	↔ <b>Rosa</b>

Figuras 23 y 24.

Estructura de la Fenolftaleína en pH inferior a 8,2.

La **fenolftaleína** es un indicador de pH que en soluciones ácidas permanece incoloro, pero en presencia de bases se torna rosa o violeta.

Es un sólido blanco, inodoro que se forma principalmente por reacción del fenol, anhídrido ftálico y ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ); sus cristales son incoloros. Tiene un punto de fusión de  $254^{\circ}C$ .

Su fórmula es  $C_{20}H_{14}O_4$ .

El cambio de color está dado por la siguiente ecuación química:



No es soluble en agua, con lo que normalmente se disuelve en alcohol para su uso en experimentos. La fenolftaleína es un ácido débil que pierde cationes  $H^+$  en solución. La molécula de fenolftaleína es incolora, en cambio el anión derivado de la fenolftaleína es de color rosa. Cuando se agrega una base la fenolftaleína (siendo esta inicialmente incolora) pierde  $H^+$  formándose el anión y haciendo que tome coloración rosa.

Se utiliza en investigaciones forenses, para detectar manchas y posteriormente agua oxigenada, si el color se tornó de rosa a violeta, hay trazas de sangre <sup>56</sup>.

## ANEXO 3

### Quimioluminiscencia:

Bajo quimioluminiscencia se entiende el fenómeno que en algunas reacciones químicas la energía liberada no sólo se emite en forma de calor o de energía química sino en forma de luz.

Ejemplos: El ejemplo más conocido es la oxidación de los vapores del fósforo blanco al oxígeno que emite una luz pálida y que ha dado nombre a este elemento. Las reacciones de quimioluminiscencia son más extendidas que se suele suponer aunque el rendimiento cuántico es habitualmente muy bajo y por lo tanto se requieren instrumentos muy potentes (fotomultiplicadores) para detectarlas.

### Fenómenos relacionados

La bioluminiscencia demostrada por unos organismos se basa igualmente en la quimioluminiscencia aunque se oxidan otras sustancias que las habitualmente utilizados en el laboratorio, p. ej. la luziferina <sup>57</sup>.

**Luminol** es un derivado del ácido ftálico. Se trata de un sólido verdoso poco soluble. Su mayor importancia reside en la reacción de quimioluminiscencia que da con peróxidos en presencia de complejos de hierro como catalizadores.

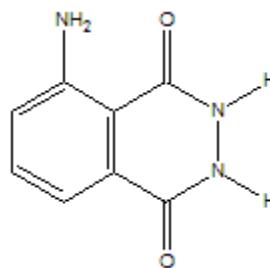
### *Datos fisicoquímicos*

Fórmula:  $C_8H_7N_3O_2$

Masa molecular: 177,7 g/mol

Punto de fusión: 317 °C

Nº CAS: 521-31-3



### *Síntesis*

El luminol es accesible en dos etapas a partir de 3-nitro ácido ftálico e hidracina. El grupo nitro del producto de esta reacción, la hidrazida cíclica del ácido, es reducida después a grupo amino mediante el ditionito de sodio bisulfito sódico.

### *Reacciones de Luminol*

En las reacciones de bioluminiscencia, como se observa en las luciérnagas y diversos organismos marinos, el papel del luminol lo juegan las luciferinas <sup>58</sup>.

## ANEXO 4

### Radiación ultravioleta



Figura 26.

Lámpara fluorescente de luz ultravioleta. La radiación ultravioleta no es visible; sin embargo, muchas de las lámparas ultravioletas emiten marginalmente parte de su luz en la zona adyacente del espectro visible, con lo que se observan de un color violeta.

Se denomina **radiación ultravioleta** o radiación **UV** a la radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida aproximadamente entre los 400 nm ( $4 \times 10^{-7}$  m) y los 15 nm ( $1,5 \times 10^{-8}$  m). Su nombre proviene de que su rango empieza desde longitudes de onda más cortas de lo que los humanos identificamos como el color violeta.

#### *Descubrimiento*

El descubrimiento de la radiación ultravioleta está asociado a la observación del oscurecimiento de las sales de plata al ser expuestas a la luz solar. En 1801 el físico alemán Johann Wilhelm Ritter descubrió que los rayos invisibles situados justo detrás del extremo violeta del espectro visible eran especialmente efectivos oscureciendo el papel impregnado con cloruro de plata. Denominó a estos rayos "rayos desoxidantes" para enfatizar su reactividad química y para distinguirlos de los "rayos calóricos" (descubiertos por William Herschel) que se encontraban al otro lado del espectro visible. Poco después se adoptó el término "rayos químicos". Estos dos términos, "rayos calóricos" y "rayos químicos" permanecieron siendo bastante populares a lo largo del siglo XIX. Finalmente estos términos fueron dando paso a los más modernos de radiación ultravioleta e infrarroja respectivamente.

#### Subtipos

Según su longitud de onda, se distinguen varios subtipos de rayos ultravioleta:

Nombre	Abreviación	Longitud de onda (nm)	Energía por fotón (eV)
<b>Ultravioleta cercano</b>	NUV	400 - 200	3.10 - 6.20
Onda larga	UVA	400 - 320	3.10 - 3.87
Onda media	UVB	320 - 280	3.87 - 4.43
Onda corta	UVC	280 - 200	4.43 - 6.20
<b>Ultravioleta lejano</b>	FUV, VUV	200 - 10	6.20 - 124
<b>Ultravioleta extremo</b>	EUV, XUV	31 - 1	40 - 1240

## Usos

La luz ultravioleta tiene diversas aplicaciones.

Una de las aplicaciones de los rayos ultravioleta es como forma de esterilización, junto con los rayos infrarrojos.

## Lámparas fluorescentes

Producen radiación UV a través de la ionización de gas de mercurio a baja presión. Un recubrimiento fosforescente en el interior de los tubos absorbe la radiación UV y la convierte en luz visible.

Parte de las longitudes de onda emitidas por el gas de mercurio están en el rango UVC. La exposición sin protección de la piel y ojos a lámparas de mercurio que no tienen un *fósforo de conversión* es sumamente peligrosa.

La luz obtenida de una lámpara de mercurio se encuentra principalmente en longitudes de onda discretas. Otras fuentes de radiación UV prácticas con de espectro más continuo incluyen las lámparas de xenón, las lámparas de deuterio, las lámparas de mercurio-xenón, las lámparas de halúro metálico y la Lámpara halógena.

## Luz ultravioleta

La luz ultravioleta también es conocida coloquialmente como *luz negra*. Para generar este tipo de luz se usan unas lámparas fluorescentes especiales. En estas lámparas se usa sólo un tipo de

fósforo en lugar de los varios usados en las lámparas fluorescentes normales. También se reemplaza el vidrio claro por uno de color azul-violeta, llamado Cristal de Wood.

El vidrio de Wood contiene óxido de níquel, y óxido de cobalto, y bloquea casi toda la luz visible que supere los 400 nanómetros. El fósforo normalmente usado para un espectro de emisión de 368nm a 371nm puede ser tanto una mezcla de europio y fluoroborato de estroncio ( $\text{SrB}_4\text{O}_7\text{:Eu}^{2+}$ ), o una mezcla de europio y borato de estroncio ( $\text{SrB}_4\text{O}_7\text{:Eu}^{2+}$ ), mientras que el fósforo usado para el rango de 350nm a 353nm nanómetros es plomo asociado con silicato de bario ( $\text{BaSi}_2\text{O}_5\text{:Pb}^+$ ).

La radiación ultravioleta, al iluminar ciertos materiales, se hace visible debido al fenómeno denominado fluorescencia. Éste método es usado comúnmente para autenticar antigüedades y billetes, pues es un método no invasivo y no destructivo de exanimación. Líquidos fluorescentes se aplican a estructuras metálicas iluminadas con una luz negra. De este modo, rajaduras y otros defectos pueden ser fácilmente identificados.

En Ciencia forense, la luz negra se usa para detectar rastros de sangre, orina, semen y saliva (entre otros), causando que estos líquidos adquieran fluorescencia. Usando esta misma técnica, algunos reporteros han revelado la falta de higiene en las habitaciones de los hoteles, o manchas en ropa que de otra manera serían más difíciles de detectar.

## **Control de plagas**

Las trampas de moscas ultravioleta se usan para eliminar pequeños insectos voladores. Dichas criaturas son atraídas a la luz UV para luego ser eliminadas por shock eléctrico, o atrapadas después de tocar la trampa.

## **Espectrofotometría**

El espectroscopio UV/VIS (de ultravioleta/visible) es ampliamente usado en química para analizar estructuras químicas.

## ***Efectos en la salud***

La mayor parte de la radiación ultravioleta que llega a la Tierra lo hace en las formas UV-C, UV-B y UV-A; principalmente en esta última, a causa de la absorción por parte de la atmósfera terrestre. Estos rangos están relacionados con el daño que producen en el ser humano: la radiación UV-C —la más perjudicial para la vida— no llega a la tierra al ser absorbida por el oxígeno y el ozono de la atmósfera; la radiación UV-B es parcialmente absorbida por el ozono y sólo llega a la superficie de la tierra en un porcentaje mínimo, pese a lo que puede producir daños en la piel.

Entre los daños que los rayos ultravioleta pueden provocar se incluyen el cáncer de piel, envejecimiento de ésta, irritación, arrugas, manchas o pérdida de elasticidad <sup>59</sup>.