



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

**MÉTODOS INMUNOLÓGICOS PARA  
LA IDENTIFICACIÓN DE SANGRE  
HUMANA APLICADOS A LA  
PRÁCTICA FORENSE**

**TESINA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA  
ALMA ROCÍO SOTO AQUINO

ASESOR DE TESINA: M en C ARACELI GARCÍA DEL VALLE

MÉXICO, D. F.

AGOSTO 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA

*A Dios.*

*A mis hermanos: Elizabeth, Hilda, Víctor, Reyna, Sonia, Viviana y Helen, gracias por todo su cariño, comprensión y por que siempre están a mi lado y nunca perdieron la fe en mí, los quiero mucho.*

*A mis cuñados: Alberto, Luis y en especial a Jerónimo por todo el apoyo brindado.*

*A mis sobrinos: Michelle, Diane, Josué, Danna y Diego por todo su cariño y alegría, de ustedes es mi amor.*

*A mis ahijados: Josué, Ashley y Ángel.*

*A mis compañeros: Daniel, Guadalupe, Nancy, Javier, Paulina y Vanessa por su compañía y amistad en este difícil camino de superación.*

*A mis amigos: Nancy Claudia, Zayra, Angélica, pero sobre todo a Bertha, Néstor y Carlos gracias por dedicarme su tiempo y por brindarme su generosa e incondicional amistad, todo mi cariño y admiración para ellos.*

*Sobre todo a mis Padres: Gregoria y Néstor, ustedes son las personas más importantes de mi vida, gracias por la confianza y fe depositada, sus esfuerzos son el cimiento de este logro y su amor es mi inspiración para su término, espero con esto poder compensar un poco todos sus sacrificios, les pertenece todo mi respeto y amor.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la gran oportunidad de superarme en esta gran Institución.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Al Diplomado de Química Legal en especial al M. en C. Mauro López Armenta por apoyarme en esta investigación con sus conocimientos sobre el área forense.

A la M. en C. Araceli García del Valle por sus aportaciones para mejorar esta tesina.

A los demás sinodales: la Dra. Ma. Teresa Corona Ortega, Mtra. Leonor Aguilar Santelises, Mtra. Yolanda Flores Cabrera y el Q.F.B José Oscar González Moreno por sus sugerencias para realizar esta tesina.

A mis compañeros de generación: Javier, Daniel, Guadalupe, Paulina, Nancy y Benjamín, gracias por su amistad en todo este tiempo y por hacer más placentera mi estancia.

A todos los profesores que participaron compartiendo sus conocimientos para mi formación académica en especial a Marcela Sánchez, Guillermina Rojas, Ángel Pavón, Ángel Tlapanco, Rodolfo Carreón y Rubén Marroquín.

A todos mi más sincero agradecimiento.

CONTENIDO	Pág.
Resumen	1
Introducción	2
Problema de Investigación	4
Objetivos	5
Resultados	6
CAPITULO I Hematología forense	6
1.1. Hematología reconstructora	7
1.1.1. Manchas sanguíneas y su clasificación	8
1.1.1.1 Manchas en particular	8
1.1.1.2 Manchas por proyección	9
1.1.1.3 Manchas por escurrimiento	10
1.1.1.4 Manchas por contacto	11
1.1.1.5 Manchas por impregnación	12
1.2. Hematología identificadora	13
1.3 Rastreo en hematología forense	14
1.3.1 Rastreo en el sitio del suceso	14
1.3.2 Relación entre sangre y sitio del suceso	15
1.3.3 Elementos para efectuar un rastreo hematológico	15
1.3.4 Soporte	16
CAPÍTULO II. Recolección y envío al laboratorio de muestras de sangre	17
2.1 Precaución durante la recolección	18
2.2 Tipos de contaminación presentes en los indicios biológicos	19
2.3. Toma de muestras de referencia	20
2.3.1 Toma de muestras en personas vivas	20
2.3.2 Toma de muestras en cadáveres	20
2.3.3 Toma de indicios biológicos en el lugar de los hechos	21
CAPITULO III. Técnica relativa al examen de manchas	24
3.1 Certeza	25
3.1.1 Pruebas de laboratorio para determinar la certeza	25
3.1.1.1 Reacciones de probabilidad	26
3.1.1.2 Reacciones de certidumbre	28
3.2 Género: Humana o animal	30
3.2.1 Pruebas de laboratorio para determinar el género	32
3.2.1.1 Métodos microscópicos	32
3.2.1.2 Métodos inmunológicos	32
3.3 Origen	36
3.4 Antigüedad	38
3.5 Morfología	38
3.6 Técnicas hemoclasificativas: Individualización	39
3.6.1 Pruebas de laboratorio para determinar la individualidad	39

3.6.1.1 Antígenos leucocitarios	39
3.6.1.2 Sistemas de enzimas de células rojas	40
3.6.1.3 Aplicación del examen de ADN	40
3.6.1.3.a Análisis de restricción de Southern Blot	42
3.6.1.3.b Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	46
3.6.1.3.c Secuenciación de ADN mitocondrial	49
3.7 Sexo	53
3.7.1 Pruebas de laboratorio para determinar el sexo	54
3.7.1.1 Prueba de la cromatina sexual	54
3.7.1.2 Radioinmunoensayos	56
3.7.1.3 Análisis microscópicos de cromosomas	56
3.8 Prueba de exclusión de paternidad	58
3.8.1 Antígenos de grupo sanguíneo	58
3.8.2 Tipificación por isoenzimas y proteínas	64
3.8.3 Exclusión e inclusión	66
3.8.4 Pruebas de laboratorio para determinar la paternidad	67
3.8.4.1 Examen de ADN	67
3.8.4.2 Prueba de grupo sanguíneo	67
3.9 Enfermedades venéreas	68
3.10 Estudios especiales	68
Discusión de resultados	69
Conclusiones	72
Referencias	74
Anexo 1. Electroforesis	79
Anexo 2. ADN	84
Anexo 3. ADN mitocondrial	97
Anexo 4. Otras pruebas en el diagnóstico de la sífilis	98
Anexo 5. Búsqueda de tóxicos en sangre	101
Anexo 6 Artículo 253 del código civil	104
Glosario	105
Abreviaturas	110

CONTENIDO DE CUADROS	Pág.
Cuadro 1. Clasificación de Manchas de sangre	12
Cuadro 2. Reacciones de identificación química para la certeza	26
Cuadro 3. Diámetro y forma de los eritrocitos de algunas especies	31
Cuadro 4 Valores normales en parámetros de la sangre: hombre y mujer	53
Cuadro 5 Clasificación de grupos sanguíneos	59
Cuadro 6 Porcentaje de incidencia de los grupos sanguíneos	61
Cuadro 7 Grupos sanguíneos posibles e imposibles	63
Cuadro 8 Porcentaje de exclusión por sistemas individuales	64
Cuadro 9 Enzimas de eritrocitos que se pueden detectar en sangre seca	65

CONTENIDO DE FIGURAS	Pág.
Figura 1 Morfología y tamaño de manchas sanguíneas	11
Figura 2 Recolección de manchas en estado líquido	22
Figura 3 Recolección de manchas en estado seco	23
Figura 4 Esquema de la técnica de Southern Blot	44
Figura 5 PCR con marcadores VNTR's	45
Figura 6 Reacción en cadena de la polimerasa	48
Figura 7 Imagen de cromatina sexual	55
Figura 8 Cromosomas	57
Figura 9 Frente formado por movimiento de iones	79
Figura 10 Migración de moléculas en electroforesis	80
Figura 11 Electroforesis en gel de poliacrilamida	81
Figura 12 Electroforesis en geles de gradientes	82
Figura 13 Electroforesis capilar	83
Figura 14 Estructura química del ADN	86
Figura 15 Esquema de replicación del ADN	89
Figura 16 Técnica de ELISA	99



## RESUMEN

Además de la valiosa información que deleva la práctica de la autopsia en el área forense, el análisis de diversos fluidos orgánicos como la sangre, el semen, la saliva y otros, pueden aportar datos muy importantes para el esclarecimiento de crímenes violentos y algunos otros delitos, no obstante que en la generalidad de los casos, estas sustancias segregadas del cuerpo humano y en ciertas ocasiones de animales, se examinan cuando el proceso de desecación se encuentra avanzado, es decir, en estado de manchas, las cuales deben ser afanosamente buscadas en los cadáveres y en cualquier persona que este inmiscuida en la comisión de algún ilícito. El presente estudio se realizó con el objetivo de recopilar las técnicas inmunológicas empleadas en el área de hematología forense para la identificación de sangre, se da una descripción de la recolección de una muestra de sangre: abarcando el levantamiento y embalaje de dicho indicio, así como las medidas y precauciones utilizadas en el desarrollo de esta actividad. Se exponen además, los métodos más comúnmente empleados en el estudio forense de sangre, tomando como base diez puntos de valor investigativo. Describiendo de manera separada cada uno de los puntos, así como el desarrollo de los procedimientos empleados para la obtención de resultados satisfactorios en la investigación y persecución de los delitos. Asimismo se describen los avances en dichas técnicas y otras más recientes empleadas con el mismo fin investigativo.

## INTRODUCCIÓN

La criminalística de laboratorio tiene sus inicios en 1910 al fundarse en Francia el primer laboratorio forense por Edmond Locard. Desde entonces y hasta la fecha, han sido instalados en todo el mundo diferentes tipos de laboratorios con características y funciones muy especiales, los cuales dependen tanto de los recursos económicos del país como de los delitos que se investiguen. <sup>[1]</sup>

Existen los más sofisticados y completos, como los de la Policía científica y Técnica francesa, los del FBI, que después de consultar a los expertos de diversas áreas científicas por indicación de su primer director J. Edgar Hoover, lograron integrar un laboratorio específico de ciencias forenses que inicio sus trabajos en 1932 y es, a la fecha, uno de los más reconocidos en el mundo. <sup>[1]</sup>

En México puede dividirse la criminalística del laboratorio según el delito, teniendo los Laboratorios de Servicios Periciales dependientes de la Procuraduría General de la República para delitos del fuero federal y los Servicios Periciales Estatales, así como los del Distrito Federal, para delitos del fuero común. <sup>[1]</sup>

En cualquier parte del mundo los laboratorios forenses estarán organizados dependiendo del potencial económico del país, así como de sus necesidades, pero siempre considerando que cada evidencia encontrada en el lugar del hecho requerirá su traslado al laboratorio para su estudio con el propósito de lograr su identificación, clasificación, comparación y su relación con el hecho. Por lo que será necesario contar con áreas específicas, personal altamente calificado y equipo moderno para aportar elementos suficientemente científicos en la investigación. <sup>[1]</sup>

Las principales áreas que integran los laboratorios periciales son: Química forense, Balística, Toxicología forense, Documentoscopia, Genética, Hecho de tránsito, Estudio de pelos y fibras, Incendios y explosivos, Dactiloscopia, Odontología forense, Antropología forense, Medicina forense, Fotografía forense y Hematología siendo esta última nuestro objeto de estudio. <sup>[1]</sup>

Las manchas de sangre suelen ser el principal indicio obtenido en la escena del crimen, esto ha hecho que tanto por su frecuencia, como por la importancia de los resultados obtenidos tal es el caso de la individualización, sea uno de los pilares del laboratorio de criminalística. Son cuatro las interrogantes que sustentan la hematología forense: 1. ¿Una mancha es o no de sangre? 2. En caso de serlo, cuál es su origen: humano o animal? 3. ¿A qué grupo sanguíneo pertenece? y 4. ¿De qué persona es? La pretensión de este trabajo es dar a conocer los métodos inmunológicos aplicados al área de hematología forense para la identificación de manchas de sangre, así como métodos químicos y microscópicos que permiten resolver estas preguntas.

## PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La investigación de manchas de sangre tiene un lugar preferente debido a que la información que provee puede ayudar al esclarecimiento de un hecho delictivo, pero, para poder tener la información que esta nos puede proporcionar es necesario utilizar procedimientos que se adecuen a la cantidad y a la calidad de la muestra encontrada. El presente estudio se realizó debido a que la hematología forense es un área de gran importancia en la criminalística, y los métodos inmunológicos son la base de las pruebas utilizadas para la identificación de manchas de sangre.

Desde el punto de vista legal la sangre tiene dos tipos de intereses que son, primero: la investigación de la paternidad y segundo: la identificación, este último es el principal interés de la hematología forense ya que permite resolver si ese indicio pertenece a un individuo determinado. Para obtener resultados favorables se va más allá de los grupos sanguíneos y de la identificación de isoenzimas los cuales se basan en fundamentos genéticos y técnicas inmunológicas para su determinación, en la actualidad la PCR y la secuenciación de ADN mitocondrial son los métodos más modernos y que dan resultados más específicos, ya que la incorporación de nuevos y numerosos marcadores permiten hacer más estrecha la posibilidad de que un individuo coincida con las características genéticas encontradas en el estudio de una mancha de sangre.

¿Cuáles son los métodos que debemos aplicar para obtener la identificación de una supuesta muestra de sangre según sus puntos valorables a saber como son: certeza, origen, sexo e individualidad? para responder a esta pregunta se realizó una investigación bibliográfica y monográfica acerca de la temática en hematología forense, para obtener una monografía que contiene información de la hematología reconstructora que da una descripción con respecto a sus caracteres físicos, asimismo de la hematología identificadora que detalla los procedimientos químicos e inmunológicos que permiten determinar la individualidad y por lo tanto su identificación.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Recopilar los métodos de análisis morfológico, químico e inmunológicos utilizados en el laboratorio para analizar muestras forenses de sangre en sus distintos puntos de valor investigativo.

### **Objetivos particulares.**

Describir como se lleva a cabo el levantamiento y embalaje de este tipo de indicios.

Describir los procedimientos de laboratorio básicos para el análisis morfológico y químico de manchas de sangre.

Revisar los procedimientos inmunológicos empleados para determinar la individualidad de la sangre: prueba de grupo sanguíneo, análisis de isoenzimas,

Revisar otros métodos de laboratorio para determinar la individualidad de muestras de sangre: técnica de PCR y análisis de Southern blot.

# CAPÍTULO I

## HEMATOLOGÍA FORENSE

La hematología criminalística es el estudio de la sangre con la finalidad de descubrir y verificar científicamente el delito o los delincuentes <sup>[1]</sup>.

La sangre es un tejido inmerso en una suspensión líquida, constituida por un 45% de elementos sólidos: eritrocitos, leucocitos y plaquetas y el 55% de elementos líquidos, ambos constituyentes de importancia criminalística <sup>[4]</sup>.

Los eritrocitos son aproximadamente  $5 \times 10^6/\text{mm}^3$ , carecen de núcleo en los mamíferos, y presentan como componente a la hemoglobina puede sufrir modificaciones en su color en situaciones de intoxicación por monóxido de carbono, nitritos y otros compuestos metahemoglobinizantes, fenómenos que pueden demostrarse mediante espectroscopia. Otro elemento que presentan los glóbulos rojos son los aglutinógenos que determinan el grupo sanguíneo A, B, AB, en caso de no presentarse este elemento constituyen el grupo O. Además el 85% de la población presenta el factor Rh <sup>[5]</sup>.

Los glóbulos blancos o leucocitos, que son aproximadamente  $8 \times 10^6/\text{mm}^3$  participan en la defensa del organismo frente a las infecciones y a los cuerpos extraños, en una herida traumática ocurre la afluencia de leucocitos, hecho que sirve para estimar el dato de lesión de acuerdo a la cantidad de leucocitos existentes en el foco traumático. Producida la lesión no hay glóbulos blancos pero a medida que transcurren los minutos, afluyen cada vez más leucocitos, fenómeno conocido como leucocitosis traumática de Piedelievre, por otra parte, un tipo de leucocito, el linfocito, presenta en su núcleo el ácido desoxirribonucleico (ADN), de utilidad en la identificación humana preferentemente <sup>[5]</sup>.

Las plaquetas, que son aproximadamente  $250\,000/\text{mm}^3$ , participan en el proceso de la coagulación sanguínea que dura aproximadamente 10 minutos, finalizando con la formación del coágulo de fibrina, la coagulación es un fenómeno vital, en el cadáver la

sangre no coagula, la retracción del coágulo dura más o menos 4 horas, como resultado de este fenómeno se libera suero, la presencia de suero alrededor del coágulo permite, junto a otros elementos determinar datos de la muerte <sup>[6]</sup>.

En esta especialidad la aplicación de la química es fundamental para descubrir si una mancha que se halló en el lugar del hecho es sangre y si ésta es de animal o humana; en caso de tratarse de sangre humana se determinarán los grupos, subgrupos y el factor Rh<sup>[1]</sup>.

En casos especiales podrá solicitarse la investigación de enfermedades infectocontagiosas, como el SIDA o la Hepatitis <sup>[1]</sup>.

La hematología forense comprende dos ramas.

1.1 Hematología reestructora.

1.2 Hematología identificadora.

## 1.1 HEMATOLOGÍA RECONSTRUCTORA.

La hematología reestructora se ocupa de la determinación e interpretación del mecanismo de producción de las imágenes, cada mecanismo tiene imágenes sanguíneas propias que se ven alteradas cualquiera sea el factor que las produce por las características propias del soporte <sup>[6]</sup>.

A través del estudio metódico de las imágenes sanguíneas se podrá obtener una información precisa de la forma en que se han producido los hechos y así determinar posición de la víctima y del agresor, los movimientos realizados en el sitio de suceso, las características del traumatismo y violencia empleada, intensidad del traumatismo, arma empleada, movimientos ejecutados con ella, incluso se podrá encontrar al autor del delito, las etapas fundamentales de la investigación se aplican a los rastreos hemáticos tanto en recintos cerrados como abiertos, por ejemplo en recintos cerrados se inspeccionará cuidadosamente las entradas, salidas, techos, muebles, instrumentos del delito sospechosos, cadáveres, servicios higiénicos, etc., mientras que en recintos abiertos se puede encontrar manchas de sangre en arbustos, piedras, pastos, hojas, en la tierra, etc <sup>[6]</sup>.

La distribución y características de las manchas de sangre, permiten reconstruir la posición y los movimientos de la víctima, la forma en que fue herida, el posible intervalo de sobrevivencia y la hora de la muerte (con base en la separación del coágulo y el suero sanguíneos) <sup>[10]</sup>.

Las manchas sanguíneas constituyen la base del estudio de la hematología forense reconstructora: estudia su mecanismo de producción, su forma, extensión, situación, cantidad y orientación, tamaño, color, aspecto, la clasificación de manchas sanguíneas se basa en su mecanismo de producción <sup>[7]</sup>.

### 1.1.1 MANCHAS SANGUÍNEAS Y SU CLASIFICACIÓN

Por su forma las manchas de sangre pueden clasificarse del siguiente modo:

1.1.1.1 Manchas de sangre en particular.

1.1.1.2 Manchas de sangre por proyección. Comprenden gotas y salpicaduras.

1.1.1.3 Manchas de sangre por escurrimiento. Son los charcos, regueros y rebabas.

1.1.1.4 Manchas de sangre por contacto. Aquí se incluyen las impresiones sangrantes de pies, manos, etcétera.

1.1.1.5 Manchas de sangre por impregnación. Se producen especialmente por inhibición de la sangre en tejidos textiles.

**1.1.1.1 Manchas en particular.**- Las manchas de sangre frescas son fáciles de reconocer, sobre todo cuando se encuentran en lienzos blancos, pero no siempre se tiene esta suerte, cuando por evaporación se desecan y oscurecen, es posible confundirlas las de herrumbre, carmín, tinturas, jugos de frutas, manchas de vino tinto, etc. <sup>[30]</sup>

Cuando una arteria ha sido cortada, la sangre salpica a cierta distancia de la herida, lo que no sucede con la hemorragia venosa que a pesar de ser abundante en cantidad, escurre sin una fuerza que la proyecte; sin embargo son comunes manchas de sangre en el lugar de los hechos, de cualquier lesión causada por laceraciones o heridas por



instrumento cortante, sin que se deba a una presión propia, sino que cae o es aventada por algún movimiento activo<sup>[8]</sup>.

Cuando una herida se localiza en una extremidad como la mano o el brazo, la hemorragia es profusa al moverlo con rapidez, como al estar peleando o gesticulando y puede en este caso regar gotas, sucede en forma similar, si la mano de la víctima o el asaltante entra en contacto con la herida sangrante, o incluso en una epistaxis, la sangre es arrojada por los dedos cuando el brazo se mueve en forma vigorosa<sup>[8]</sup>.

Otras manchas de sangre pueden causarse por la víctima al toser la sangre, la cual pasa a la boca a partir de una hemorragia nasal, heridas torácicas o hematemesis; cuando la sangre es arrojada la forma que adquiere al chocar sobre una superficie depende del ángulo de impacto, si está cae en un ángulo recto adquiere características circulares, si el contacto es violento los bordes serán alargados, mientras que al hacerlo en forma oblicua se forma una mancha ahusada con la punta adelgazada apuntando en dirección del trayecto, además un glóbulo pequeño del líquido se separa y localiza en la parte terminal de la mancha, semejante a un “signo de exclamación”, estos datos ayudan a determinar la dirección del origen de las salpicaduras en paredes, techos, suelos y otros objetos, con el fin de contribuir a la conclusión sobre la posición de la víctima cuando fue atacada, uno de los movimientos por los que el médico debe acudir al lugar de los hechos, en caso de muerte violenta, es para observar los detalles como las huellas de sangre y ayudar a la interpretación policiaca<sup>[8]</sup>.

El sentido común indicará la posición previa en caso de encontrarse en posición recostada sobre su espalda muestra escurrimiento de sangre que pasa en forma vertical hacia abajo por un lado del cuerpo, cuello o extremidades, mientras que si se encuentra de pie, la sangre corre en la dirección del eje longitudinal del cuerpo<sup>[8]</sup>.

**1.1.1.2 Manchas de sangre proyección.-** Se producen cuando la sangre es proyectada en forma más o menos violenta sobre el soporte; si la mancha de sangre proyectada al soporte se presenta en forma de imágenes aisladas y de disposición irregular constituyen las salpicaduras, distinguiéndose en ellas salpicaduras gruesas y finas, en general, las salpicaduras gruesas corresponden a la contusión repetida sobre una superficie sangrante, las salpicaduras finas se observan generalmente en la mano del suicida que se dispara sobre la sien, la rociadura se produce cuando la fuente productora se desplaza linealmente frente al soporte<sup>[9]</sup>.

**1.1.1.3 Manchas de sangre por escurrimiento.-** La sangre se desliza por el soporte impermeable, desde la fuente productora (herida); cuando el desplazamiento se hace sobre un soporte inclinado se forma el reguero, pero cuando el soporte es horizontal o presenta depresiones la sangre forma charcos, el soporte puede estar constituido por el cuerpo, suelo o piso, murallas, ropas, etc. <sup>[9]</sup>

En las manchas por proyección, si las gotas caen perpendicularmente forman un disco que, conforme va aumentando la altura muestra dentellones primero y gotas independientes más tarde. El grado de salpicadura de una gota solo depende más de la lisura de la superficie soporte que de la distancia desde la cual cae la gota; así, conforme más tosca sea la gota se rompa y salpique, si las gotas caen oblicuamente, adquieren la forma de un signo de admiración, con la parte más gruesa hacia el lugar de origen <sup>[10]</sup>.

En cuanto al aspecto general; las manchas recientes son rojas, luego parduzcas y más tarde negruzcas, debido a las transformaciones de la hemoglobina <sup>[10]</sup>.

Por motivos de algunos elementos constitutivos de la sangre como lo son su confirmación masa-líquido, su densidad que oscila entre 1.05 y 1.06, su característica de ser aproximadamente 5 veces más “espesa” que el agua en prueba comparativa en un viscosímetro y sobre todo el color de los eritrocitos, el llamado líquido hemático ya sea venoso o arterial, se convierte en una verdadera materia colorante cuando es expulsada del organismo, dejando las llamadas manchas hemáticas cuyas dimensiones y formas se relacionan con la cantidad, la distancia, el movimiento y la velocidad y que de manera general se han clasificado en: lagos, gotas, proyecciones, rastros e impresiones ensangrentadas. A continuación se presentan las principales variantes de las formaciones y sus causas:

- Las gotas al caer, al variar la distancia cambian su tamaño. [Figura 1]
- A cinco centímetros de altura, la mancha es pequeña y de bordes netos.
- A más de cinco centímetros de altura comienzan a aparecer las estrías.
- Cuando las alturas de caída se incrementan, las estrías se hacen más largas, inclusive en distancias mayores a dos metros se separan visiblemente junto con pequeñas gotitas <sup>[8]</sup>.

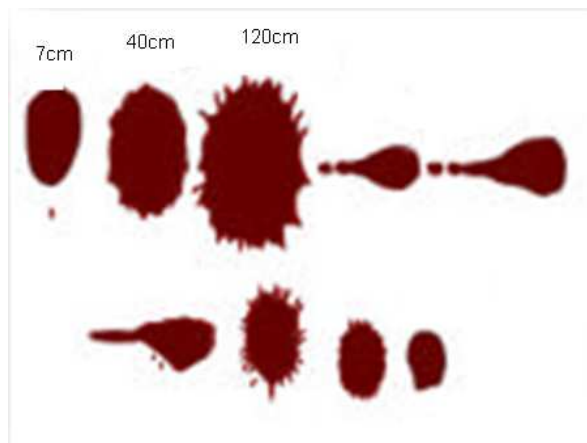


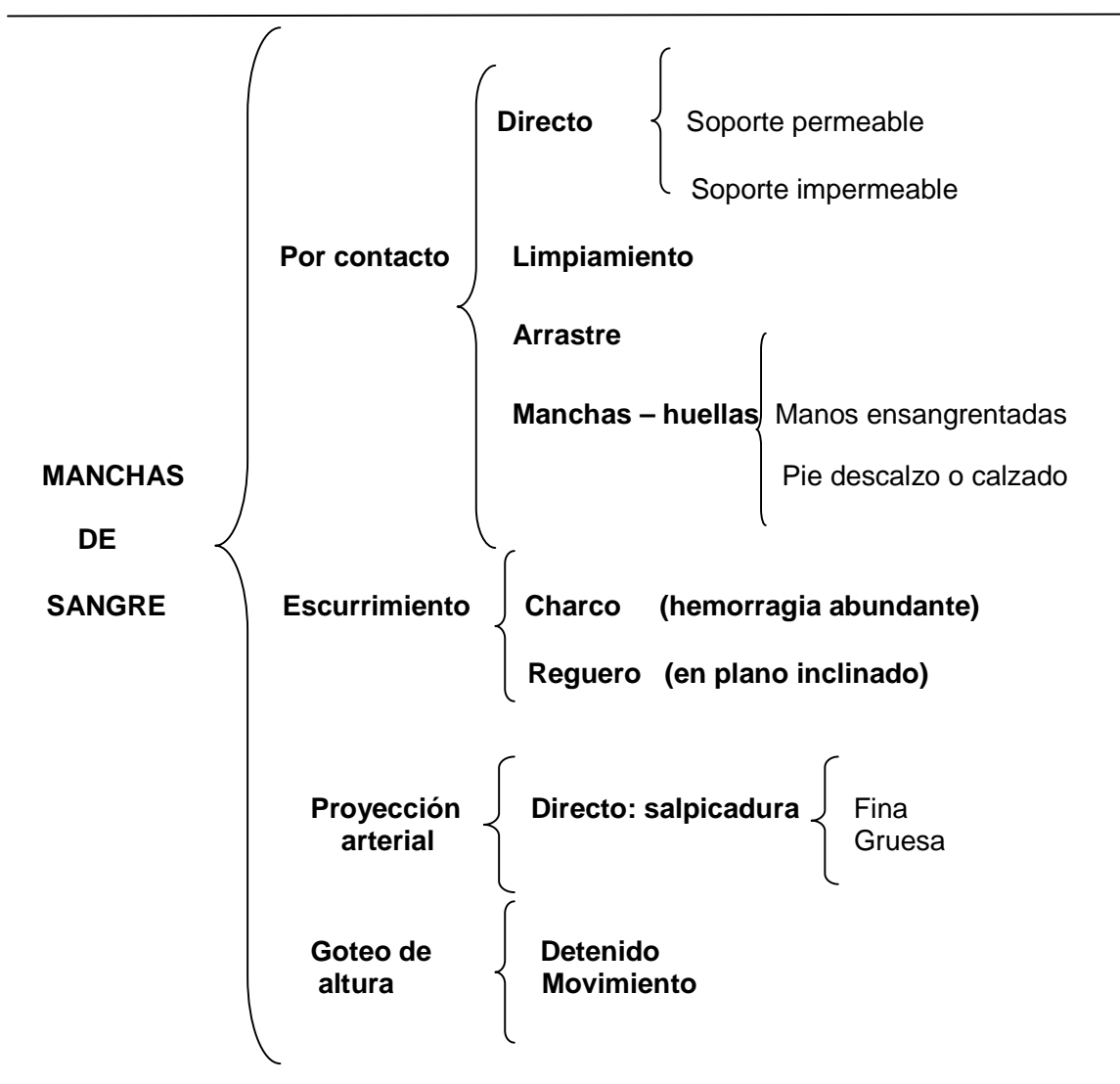
Figura1. Morfología y tamaño de las manchas sanguíneas.

Las manchas de sangre por goteo de altura se producen al caer la gota sanguínea desde la fuente productora hasta el soporte, impulsada por la fuerza de gravedad, la imagen producida toma caracteres especiales de acuerdo a la altura, al desplazamiento y detenciones del herido y a la inclinación del soporte, así a medida que la fuente productora se va alejando del soporte, la forma de la gota sufre variaciones progresivas en su contorno; de muy poca altura el contorno es regular y a medida que se aleja, el contorno se va haciendo irregular, luego presenta salientes en forma de rayos y, posteriormente, se aprecia rodeada de gotas secundarias <sup>[6]</sup>.

El desplazamiento del herido produce un contorno especial que se acentúa con la velocidad: la gota aparece de forma ovalada y con digitaciones (pata de oso) que se acentúan transformándose en proyección, estas digitaciones o proyecciones indican la dirección del desplazamiento (la punta más fina y alargada de la gota muestra el lugar hacia donde se dirige el herido) <sup>[6]</sup>.

**1.1.1.4 Manchas de sangre por contacto.** Se producen por el contacto directo de la fuente productora y el soporte, el contacto puede ser simple por ejemplo: las manchas de sangre de las ropas que estén en contacto directo con la herida, el contacto puede ser por limpiamiento, al proceder a la limpieza de manos, armas, etc., las manchas aparecen en los objetos utilizados para ello, sucede en ocasiones que las manchas de sangre por arrastre se producen cuando la víctima se arrastra o es arrastrada <sup>[9]</sup>.

**1.1.1.5 Manchas de sangre por impregnación.-** Muchas veces las manchas no se deben a que la sangre haya viajado libremente por el aire, sino al contacto directo con la piel ensangrentada, cabello, ropa, manos o armas, las embarraduras pueden indicar un movimiento deslizante, pero hay veces en que se observa una imagen fiel como sucede en la ropa, la cual es útil para indicar la forma del arma <sup>[8]</sup>.



Cuadro 1: Clasificación de las manchas de sangre, según el mecanismo de formación <sup>[31]</sup>

## 1.2 HEMATOLOGÍA IDENTIFICADORA

Es la rama de la hematología forense que se ocupa de identificar sangre. Los procedimientos empleados están destinados a investigar si es sangre, ¿a qué especie pertenece? y en lo posible su individualidad, el trabajo policial se ve frecuentemente solicitado a determinar en los delitos contra las personas, manchas sospechosas de sangre, su aspecto macroscópico induce frecuentemente a error, siendo necesario recurrir a las pruebas de laboratorio para obtener el resultado verdadero, la muestra sospechosa de sangre, puede ser fresca o antigua, sólida o líquida, pura o mezclada o aparecer en diferentes soportes, circunstancias tan variadas exigen del laboratorio especializado el empleo de técnicas adecuadas condicionadas a la naturaleza, cantidad, antigüedad, etc., de la muestra <sup>[6]</sup>.

En el enfoque legal el estudio de la hematología identificadora se lleva a cabo con las distintas técnicas de laboratorio que dan resultados reportables y que ayudan a responder cuestiones que se van planteando en el transcurso de una investigación, tales como: ¿es sangre?, ¿si es sangre es humana o de un animal?, ¿la muestra es reciente o es antigua?, ¿a qué género pertenece: hombre o mujer?, ¿a quién pertenece?, y si ¿está implicada en el ilícito? En el capítulo 3 se mencionan las técnicas de laboratorio empleadas para responder tales planteamientos, por ejemplo: para averiguar si la mancha encontrada es de sangre se lleva a cabo el estudio de certeza el cual se evalúa mediante técnicas químicas y microscópicas, es importante mencionar que si la muestra no es de sangre no se prosigue con la investigación hematológica pero en caso contrario se determinan los siguientes puntos de investigación los cuales incluyen: antigüedad, género e individualización de la muestra, siendo esta última la de mayor importancia en una investigación ya que para su determinación se requiere de métodos inmunológicos, además de otros tales como estudios de genética, también se mencionan otros puntos que según sea el caso pueden ser solicitados pero van depender del aspecto legal que se requiera como son: la prueba de paternidad y estudios especiales: búsqueda de tóxicos o algunas enfermedades (VIH, Hepatitis C, etc.)

## 1.3 RASTREO EN HEMATOLOGÍA FORENSE

El rastreo de sangre en el sitio de suceso tiene por objeto detectar, mediante una búsqueda metódica, toda clase de vestigios de sangre, tanto en el sitio de suceso mismo, como en el cadáver, vestimentas y también en el sospechoso, una vez detectada la imagen sanguínea se aplica el procedimiento criminalístico normal: **PROTEGER** el vestigio para evitar que sea alterado o borrado; **FIJAR**, mediante la fotografía y descripción escrita; **TRANSPORTAR** el vestigio al Laboratorio de Criminalística (cuando sea procedente); la imagen sanguínea, es decir, reconstruir su origen y mecanismo <sup>[6]</sup>.

### 1.3.1 RASTREO EN EL SITIO DEL SUCESO

Las manchas de sangre deben buscarse en el cuerpo de la víctima, sobre el acusado y en las ropas de ambos; en instrumentos, paredes, suelo y muebles <sup>[10]</sup>.

- En armas blancas, se debe investigar la presencia de sangre en la unión de la hoja con el mango <sup>[10]</sup>.
- En las personas, se debe buscar sangre desecada debajo de las uñas y en el pelo <sup>[10]</sup>.
- En las ropas, se pesquisan en los forros y en los bolsillos; en los zapatos, en el surco entre la suela y la parte que recubre el pie <sup>[10]</sup>.

Se puede efectuar en forma radiada, a partir del punto en que se encuentra el cadáver, en un sitio de suceso cerrado se debe examinar las vías de entrada y salida: puertas, ventanas, pasillos, etc., un especial cuidado se observa en las manillas y pasamanos de escaleras, también se rastrea sangre en muros, techo (sangre por proyección); cubiertas y bajo la cubierta de las mesas y sillas, incluso debe revisarse las patas de las sillas y las juntas del piso, ya que en muchas oportunidades el sitio de suceso (especialmente en negocios) puede haber sido lavado, pero nadie presta atención a dichos sitios donde puede haber sangre y, por lo tanto, no son lavados, otro lugar que por ningún motivo debe ser olvidado en el rastreo, es la sala de baño o toilette, se examina el lavamanos, cesto de papeles, interior del W.C., cadenilla de los tapones, toallas y otros elementos de limpiado y secado.

En los sitios de suceso abiertos, especialmente caminos polvorientos, la sangre se busca soplando ligeramente los sitios sospechosos, ya que puede aparecer entonces la mancha de sangre bajo el polvo, se debe incluir también el rastreo en arbustos, pasto, rocas, hojas, etc.<sup>[6]</sup>

### **1.3.2 RELACIÓN ENTRE SANGRE Y SITIO DE SUCESO**

El investigador policial auxiliado del médico criminalista debe establecer si existe realmente una relación entre la cantidad de sangre que se encuentra en el sitio de suceso y en el cadáver y el carácter de las lesiones, es decir, si el cadáver presenta lesiones, que necesariamente producirán un gran sangrado, pero en el sitio de suceso encontramos sólo una pequeña cantidad, es lógico suponer que hubo traslado del cadáver y, por lo tanto, el rastreo debe ampliarse y considerarse esta posibilidad, y, si por el contrario, se encuentra demasiada sangre en el sitio del suceso que no se explica por el tipo de lesiones, se debe presumir que hubo otras personas heridas en el lugar.<sup>[6]</sup>

### **1.3.3 ELEMENTOS PARA EFECTUAR UN RASTREO HEMATOLÓGICO**

El investigador debe abastecerse de un maletín que contenga una lupa, tubos de ensayo para transportar muestras, sobres de papel, papel filtro y etiquetas, cortaplumas para sacar muestras de madera o raspar otras superficies con sangre, es necesario extraer una muestra de todo vestigio sanguíneo en el sitio de suceso y del cadáver para enviarlo al laboratorio y solicitar los exámenes pertinentes, indicando en el respectivo embalaje su procedencia y el lugar donde se encontró. Las prendas de vestir o armas, se envían directamente al laboratorio, sin necesidad de sacarles muestras (calzones, pañuelos, cuchillos, pistolas), es obvio que el químico necesita una muestra de la sangre de la víctima para efectuar comparaciones y esto debe tenerse en cuenta, para sacar muestras de sangre con papel filtro, éste debe aplicarse en la mancha, humedecido en agua salada (solución salina: evita la destrucción de los glóbulos y elementos de la sangre)<sup>[6]</sup>.

#### **1.3.4 SOPORTE**

Es toda superficie de recibir manchas de sangre (cuerpo, ropas, suelo, murallas, vidrios, etc.), en el desarrollo de la clasificación se puede apreciar la importancia del soporte en la determinación de las características de las manchas de sangre, las manchas de sangre por contacto tendrán particularidades especiales atendiendo a la permeabilidad e impermeabilidad del soporte; si éste es permeable y permite la inhibición (absorber un cuerpo sólido a otro líquido) sanguínea, se observarán las manchas de sangre por impregnación, especialmente en tejidos <sup>[6]</sup>.



## CAPÍTULO II

# RECOLECCIÓN Y ENVIO AL LABORATORIO DE MUESTRAS DE SANGRE.

Se considera que de los tipos más comunes de indicios en escenarios de delitos, la sangre quizá sea la más frágil, los indicios biológicos se deterioran con el tiempo, la desecación y la congelación de las muestras retardan este deterioro <sup>[10]</sup>.

Si la sangre se encuentra en estado líquido, se recolectan aproximadamente dos mililitros (2mL) con una pipeta limpia, se colocan en un tubo de ensayo con solución salina (0.85% de cloruro de sodio en agua destilada); se tapa el tubo y se vierte dos o tres veces con el propósito de mezclar la sangre con la solución. [Figura 2] <sup>[10]</sup>.

La otra opción es recolectar la sangre líquida con un pedazo de material absorbente (papel de filtro, aplicadores con algodón y gasa de algodón), un material útil es el empleado en pañuelos de algodón, de los cuales se hacen cuadros de 0.5cm de lado, estos nos ayudan a recolectar manchas de sangre húmeda y seca. [Figura 3] <sup>[10]</sup>.

Cuando se trata de sangre seca, se recolecta por raspado con una hojilla de afeitar o de bisturí, y el polvillo se recoge sobre un pedazo de papel, que es doblado de modo que evite su pérdida <sup>[10]</sup>.

Cuando se trata de sangre seca bajo la forma de gotas o frotis, conviene recolectarla con un pedazo de tela de algodón humedecida en agua destilada y sostenida por una pinza, después de la recolección, la muestra se coloca en un tubo de ensayo seco y sin tapas, con el fin de que la mancha se seque al aire <sup>[10]</sup>.

En caso de objetos manchados de sangre, así como de ropas manchadas lo ideal es enviar el objeto o artículo completo, en vez de remover la sangre, además se debe de anotar la localización y fotografiar la mancha, pero si la sangre tiende a desprenderse, conviene recolectarla o envasarla separadamente, de una manera general, se debe especificar el lugar de procedencia, así como las dimensiones y características de las manchas <sup>[10]</sup>.

## 2.1 PRECAUCIONES DURANTE LA RECOLECCIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS.

Recomendaciones de la Sociedad Latinoamericana de Genética Forense basadas en la International Society for Forensic Genetics –ISFG- y en el GEP-ISFG <sup>[7]</sup>.

- 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, guantes y bata u otro tipo de ropa protectora.
- Utilizar material desechable, siempre que sea posible.
- No añadir conservantes a las muestras.
- 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.
- Las muestras biológicas potencialmente pueden contener agentes patógenos (VIH, hepatitis, meningitis).
- Prohibir comer, beber o fumar durante el proceso de recolección.
- Recomendar la vacunación al personal que trabaje con este tipo de muestras <sup>[7]</sup>

## 2.2 TIPOS DE CONTAMINACIÓN PRESENTES EN LOS INDICIOS BIOLÓGICOS.

- ✓ 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 <sup>[7]</sup>.
- ✓ Contaminación anterior o previa: Se debe a la aparición de material biológico en el lugar donde luego aparecerán los indicios, esta es inevitable y generalmente dificulta la valoración de la prueba <sup>[7]</sup>.
- ✓ 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 <sup>[7]</sup>.
- ✓ 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 <sup>[7]</sup>.
- ✓ Contaminación durante la transferencia de indicios biológicos: Traslado accidental de los indicios de un lugar a otro, ocasionando contaminación o pérdida de la muestra (por ej. pelos) <sup>[7]</sup>.
- ✓ Contaminación biológica no humana: Producida por microorganismos que acaban degradando el ADN por acción fundamentalmente de exonucleasas, la humedad y altas temperaturas producen la degradación del DNA y ausencia de resultados, pero nunca la alteración de los patrones genéticos, 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 <sup>[7]</sup>.
- ✓ 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 <sup>[7]</sup>.

## 2.3 TOMA DE MUESTRAS DE REFERENCIA

### 2.3.1 TOMA DE MUESTRAS EN PERSONAS VIVAS.

- Siempre con consentimiento informado <sup>[7]</sup>.
- Debe existir un documento firmado con la autorización expresa para realizar el análisis <sup>[7]</sup>.
- Existe la creencia popular de que en PERSONAS TRANSFUNDIDAS se cambia el patrón genético; esto es así sólo en teoría, ya que en la práctica la persona debería transfundirse un gran volumen de sangre (casi toda) y concurrir inmediatamente a la toma de muestra para ADN, lo cual le produciría una debilidad y características físicas fácilmente detectables por el personal que realiza la toma; un par de horas después, ya aparece en la sangre el patrón genético real del individuo, al principio mezclado con el donante de la sangre, de cualquier forma, en caso de duda pueden tomarse HISOPADOS BUCALES <sup>[7]</sup>.
- Se sugiere realizar punción dactilar, depositar una gota –de aproximadamente 1cm de diámetro- en cualquier tipo de papel de filtro y dejar secar a temperatura ambiente, embalar en sobres de papel común, en estas condiciones la muestra dura más de 10 años <sup>[7]</sup>.
- No tomar sangre líquida ya que debe conservarse en frío y se deteriora rápidamente <sup>[7]</sup>.

### 2.3.2 TOMA DE MUESTRAS EN CADÁVERES

*En buen estado de conservación.-* Sangre post-mortem: 200 µl (anticoagulante tipo EDTA), colocar sobre papel de filtro <sup>[7]</sup>.

Musculo esquelético: Aproximadamente 1g, se almacena en un recipiente de plástico y tapón de rosca. Conservar en frío (freezer) <sup>[7]</sup>.

*Quemados o parcialmente carbonizados.*- Cuando la carbonización no es total es posible analizar músculo esquelético de zonas profundas <sup>[7]</sup>.

Quando la carbonización es total, es recomendable recolectar huesos o dientes, seleccionando aquellos que a simple vista se encuentren en mejor estado <sup>[7]</sup>.

*Otras muestras de referencias de individuos fallecidos.*- En hospitales (muestras de sangre, biopsias en parafina, o preparaciones histológicas, se debe procurar no utilizar tejidos fijados en formol <sup>[7]</sup>.

Ámbito familiar (peines, maquinillas de afeitarse, saliva en sellos o sobres...) <sup>[7]</sup>

### 2.3.3 TOMA DE INDICIOS BIOLÓGICOS EN EL LUGAR DE LOS HECHOS.

*Manchas secas en soportes pequeños y de fácil transporte.*- Colillas, armas blancas, monedas, llaves, piedras, ramas, papeles, se sugiere recoger por separado e introducirlas en bolsas de papel o cajas <sup>[7]</sup>.

*Manchas secas: 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 <sup>[7]</sup>.

B) Soporte absorbente (telas, tapicerías...): recortar la mancha y guardar en bolsa de papel <sup>[7]</sup>.

*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 <sup>[7]</sup>.

*Indicios líquidos.*- En gran cantidad: recoger con pipeta de plástico y depositarla en un tubo con EDTA, o recoger con una jeringa y de igual forma depositar en un tubo con EDTA. (Figura 2) <sup>[7]</sup>.

En pequeña cantidad: recoger con hisopo y dejar secar, en caso de estar coagulada: recoger con una cucharita e introducir en tubo (Figura 3) <sup>[7]</sup>.

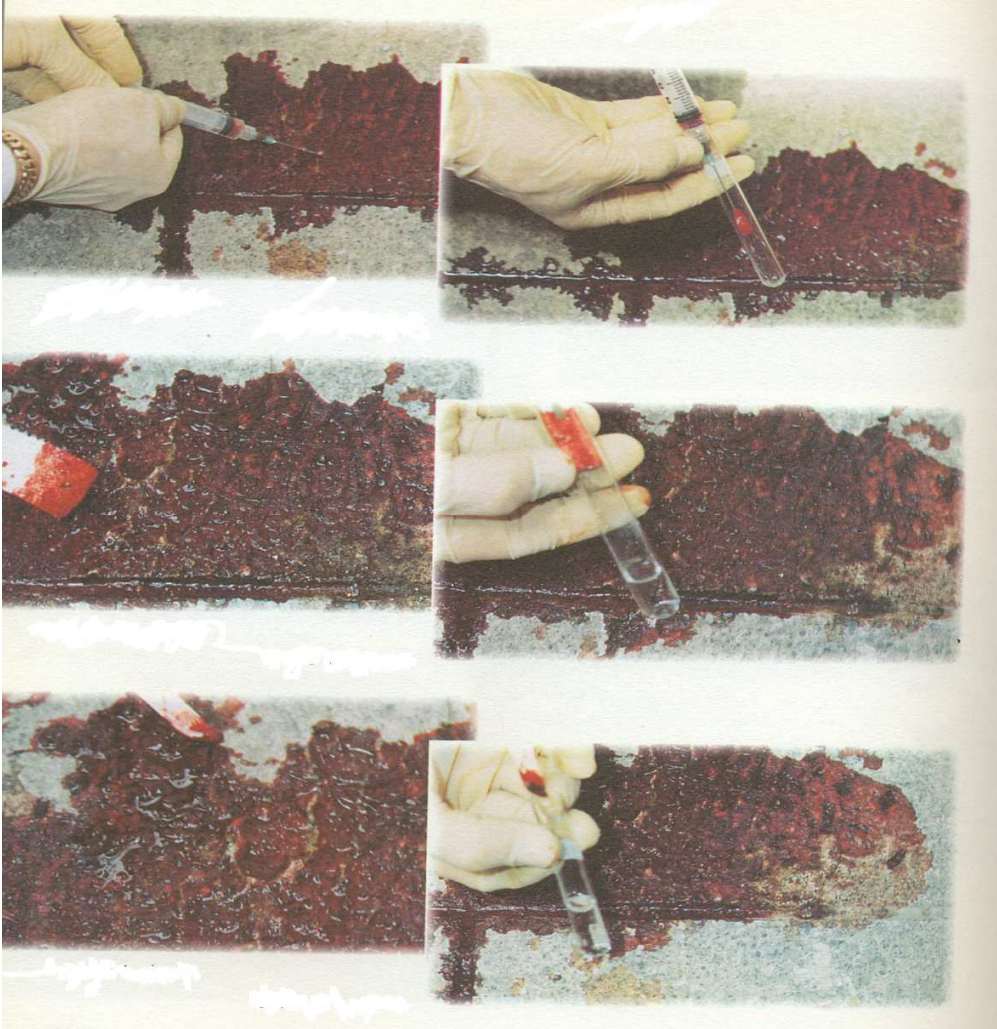


Figura 2. Levantamiento de sangre en estado líquido: se recoge con jeringa o papel filtro. Sangre coagulada: se recolecta con el extremo de un aplicador de madera o plástico. El embalaje se lleva a cabo en un tubo de ensayo, limpio o seco, con solución salina o heparina <sup>[1]</sup>.

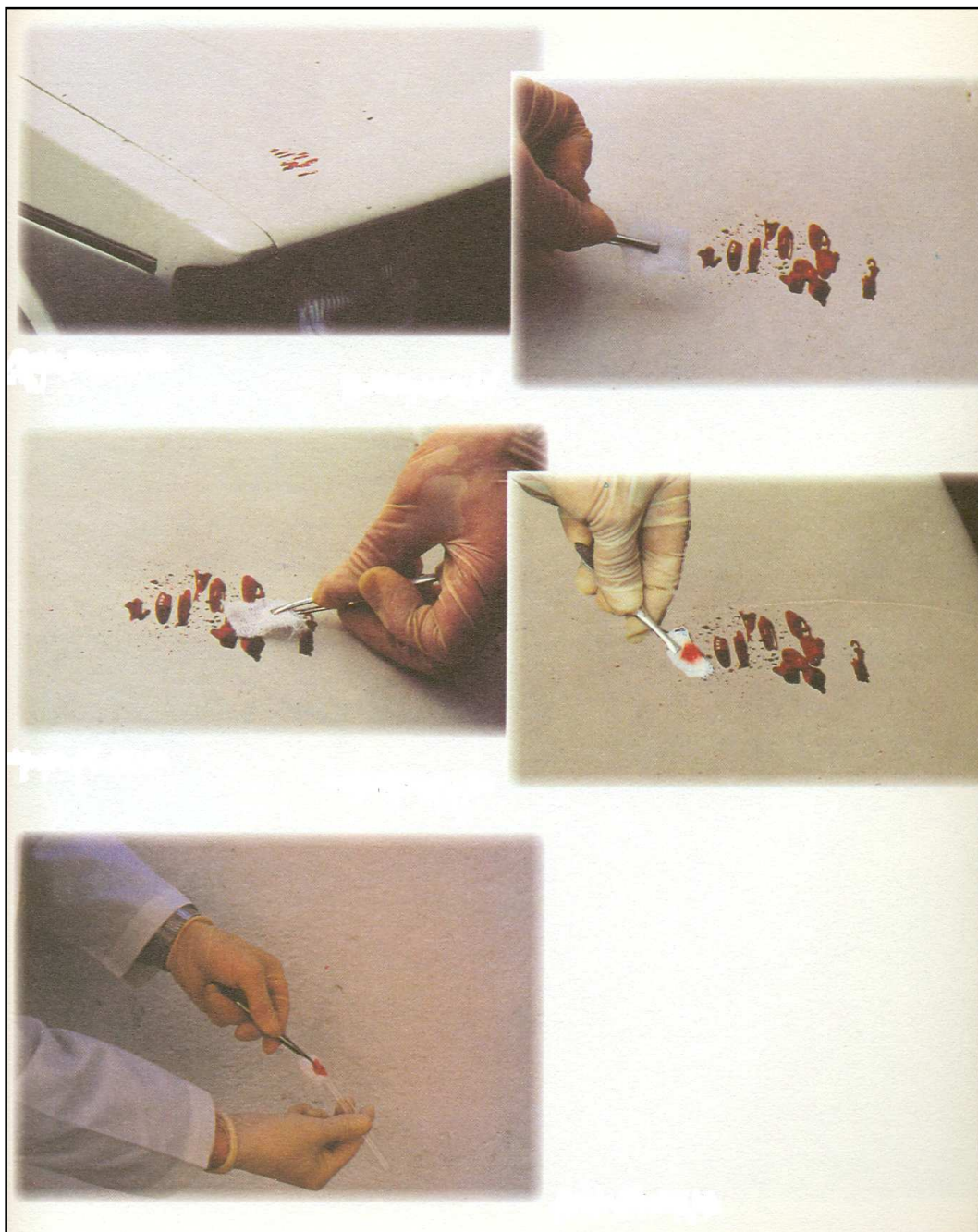


Figura 3. Levantamiento de sangre seca, en objetos sólidos o en el cuerpo de la víctima: se recolecta con gasa de 2 x 2cm, humedecida en solución fisiológica, el embalaje se lleva a cabo en un tubo de ensayo, limpio y seco <sup>[1]</sup>.

## **CAPÍTULO III**

### **TECNICA RELATIVA AL EXAMEN DE MANCHAS DE SANGRE.**

Deben describirse lo más completo y claro que sea posible, señalando situación, tamaño, aspecto, número, etc., de cada una de estas manchas, debido que las manchas son modificadas por las condiciones ambientales, es importante, siempre que sea posible, hacer su estudio lo más rápidamente que se puede, o cuando menos protegerlas para su posterior examen, algunas veces las manchas puestas a nuestra consideración son demasiado antiguas; en estos casos es necesario agudizar nuestro ingenio para su identificación <sup>[7]</sup>.

Por ejemplo: mancha de sangre vieja en un vidrio, se debe colocar el pedazo de vidrio manchado sobre una hoja de papel, si es blanco mejor; raspar la mancha con todo cuidado, empleando para ello un instrumento de acuerdo con el tamaño de la mancha; se recogen estas partículas que, aunque pequeñísimas, no son suficientes para su identificación, cuando la mancha sospechosa se encuentra en un lienzo, es necesario disolverla primero en un líquido apropiado (suero fisiológico), para su posterior estudio, en ocasiones es necesario deshilar el lienzo para facilitar este estudio <sup>[7]</sup>.

En el estudio forense de la sangre se consideran 10 puntos de alto valor investigativo que son:

- 3.1 Certeza.
- 3.2 Género (humana o animal).
- 3.3 Origen.
- 3.4 Antigüedad.



3.5 Morfología.

3.6 Técnicas hemoclasificativas. Individualización.

3.7 Sexo.

3.8 Prueba de exclusión de paternidad.

3.9 Enfermedades venéreas.

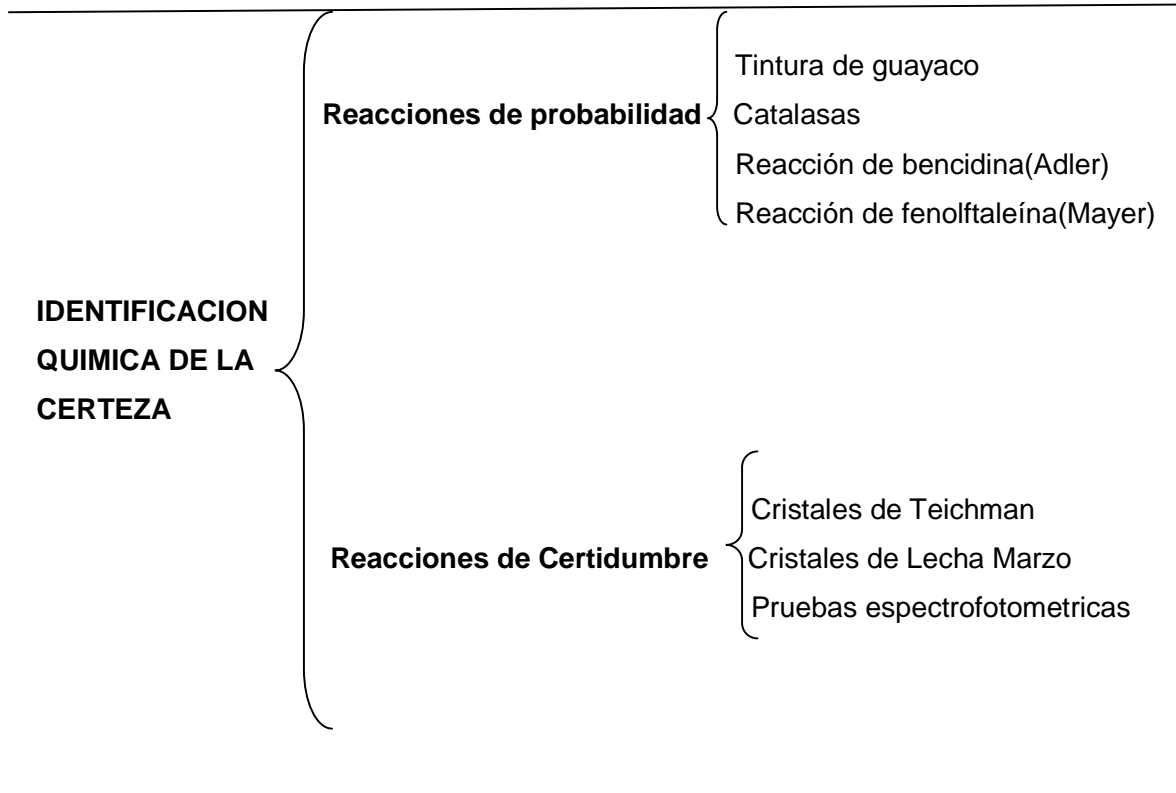
3.10 Estudios especiales <sup>[12]</sup>.

## 3.1 CERTEZA

En condiciones normales el líquido hemático es casi inconfundible, pero ya fuera del cuerpo y en estado sequizo, por el efecto del aire y el calor a través del tiempo, su apariencia se modifica provocando la duda y confusión con manchas que dejan determinados vegetales y depósitos de óxido en variados objetos, siendo los más comunes en navajas, cuchillos, utensilios de cocina, partes metálicas y en otras superficies porosas e irregulares donde las formas se vuelven atípicas. Los cambios de color se vuelven fundamentalmente a las modificaciones químicas que experimenta la hemoglobina, con varios factores con los que puede encontrarse en el exterior del cuerpo, y es precisamente que con esos mismos principios se sientan las bases para su identificación química, es decir haciendo reaccionar la cromoproteína de los glóbulos rojos<sup>[12]</sup>.

### 3.1.1 Pruebas de laboratorio para determinar la certeza

En el diagnóstico criminalístico de la sangre, las técnicas que demuestran la presencia de algún elemento característico de ésta constituyen las llamadas pruebas de certeza o ensayos decisivos. Así, para caracterizar una mancha de sangre como tal sin lugar a dudas, basta asegurarse de la presencia de alguno de sus elementos formes. Las pruebas de laboratorio para determinar la certeza se clasifican en cuanto a su fundamento y resultados de la siguiente manera:



Cuadro 2. Reacciones para la identificación química de la certeza. <sup>[12]</sup>

**3.1.1.1 Reacciones de probabilidad.** Los ensayos probabilidad se basan en la recuperación del color de sustancias que en estado reducido lo pierden (guayaco, bencidina, fenolftaleína) pero que en condiciones de oxidación (con agua oxigenada) lo obtienen de nuevo en presencia de una peroxidasa (hemoglobina). En el caso de la catalasa solo se producen burbujas <sup>[12]</sup>.

**Reacción de Mayer.-** Entre ellas tenemos la prueba de Kastle- Mayer, cuya base es la fenolftaleína, reactivo muy alterable y por lo que hay que prepararlo cuando se va a realizar la prueba <sup>[13]</sup>.

**Fórmula:** Fenolftaleína 2.0mL; potasa anhidra 20.0g; agua destilada 100mL. Se disuelven se hace hervir, se agregan 20g de polvo de cinc, se filtra; la solución debe de quedar blanca <sup>[13]</sup>.

*Técnica:* Ya disuelta la mancha sospechosa, se toma 1mL de esta solución y se pone en un tubo de ensaye o en una cápsula; allí, se agrega 1mL del reactivo y dos o tres gotas de agua oxigenada; si hay sangre aparece un color rojo <sup>[13]</sup>.

Esta reacción es muy sensible, se obtiene con manchas viejas y aún lavadas, y aún en ropa hervida, pero las manchas por sales cúpricas; jugo gástrico, leche cruda, también dan la misma reacción <sup>[30]</sup>.

Su fundamento científico consiste en poner de manifiesto la existencia de la enzima peroxidasa de los hematíes, según la siguiente reacción:



La liberación del oxígeno, produce la coloración del reactivo empleado, ejemplo, benicidina y fenolftaleína <sup>[14]</sup>.

**Reacción de Adler.-** Otra de las reacciones de orientación, es la llamada prueba de Adler, en la cual el reactivo es una solución saturada de benicidina en alcohol a 95° o ácido acético, recientemente preparada <sup>[14]</sup>.

*Técnica:* En un tubo de ensaye se pone 1mL de la solución de la mancha, se le agrega 1mL del reactivo y unas gotas de agua oxigenada. Si hay sangre se produce un color verde y luego una coloración azul de Prusia intenso y persistente. Son causas de error el herrumbre, las sales de hierro, las oxidasas de los cereales; se complementa con la reacción de Mayer <sup>[14]</sup>.

**Reacción de Van Deen.-** El reactivo es una solución de 5g de resina de guayaco en 100mL de alcohol de 95° filtrada y recientemente preparada <sup>[14]</sup>.

*Técnica:* En un tubo de ensaye se pone 1mL de solución de la mancha sospechosa, se le agrega 1mL del reactivo y unas dos gotas o tres de agua oxigenada o de esencia de trementina cargada de ozono. Si hay sangre, se produce a los pocos segundos un color verde pálido, el que vira al azul claro y después al azul oscuro <sup>[14]</sup>.

**Falsos Positivos.** Este tipo de reacciones suelen dar con los oxidantes químicos, las peroxidases de las plantas reaccionan comúnmente con la fenoltaleína, este tipo de peroxidasa se inactiva rápidamente con el calor y es paso del tiempo y a presencia de oxígeno libre en el agua oxigenada empleada <sup>[14]</sup>.

**Falsos Negativos.** Se suelen presentar cuando las manchas de sangre han sido sometidas a lavados y cuando la muestra es muy escasa <sup>[14]</sup>.

**Reacción de las catalasas.-** Se pone la solución de sangre en un tubo de ensaye, se le agregan una gotas de agua oxigenada y se forman; por la acción del fermento sanguíneo, unas burbujas que producen una espuma blanquecina en la superficie del líquido <sup>[13]</sup>.

Todas las reacciones de orientación son enunciadas, sirven de control recíproco y con ellas solo tenemos opinión de probabilidad <sup>[13]</sup>.

**Técnica del luminol.-** Otra importante técnica de identificación de manchas de sangre es **el examen de luminol**. A diferencia de la bencidina y del examen de Kastle-Meyer, la reacción del luminol con la muestra de sangre da como resultado la producción de luz mejor dicho de color. Al rociar el reactivo de luminol sobre el objeto sospechoso largas áreas son impregnadas. Los objetos así rociados si se someten a la obscuridad proyectaran luminiscencia. Sin embargo el luminol es un agente que puede destruir muchos factores importantes en la sangre y que pueden ayudar a la individualización de la sangre, debido a ello es limitado su uso y solo se utiliza en lugares donde no es visualizada una muestra <sup>[19]</sup>.

**Valor de prueba.** Solamente tienen valor en el caso de ser negativas: pudiéndose afirmar que la mancha no es de sangre, y por tanto concluimos el análisis en este punto. En caso contrario, solamente nos indica que se debe seguir la secuencia del estudio <sup>[14]</sup>.

**3.1.1.2 Reacciones de certidumbre.** Las pruebas de certeza tienen su soporte en los cambios estructurales de la molécula de hemoglobina bajo el efecto de reactivos químicos, de tal modo que con el ácido acético glacial forma cristales de hemina (Teichman) y con el sulfhidrato de amonio cristales de hemocromógeno (Lecha-Marzo). Se denominan así porque ellas nos permiten afirmación categórica <sup>[12]</sup>.

Estas pruebas se basan en la siguiente reacción:

## **Hemoglobina + Halógenos → Halogenuros de hematina**

**Cristales de Teichman.-** Es una reacción microquímica de formación de cristales alargados, romboidales, de extremidades oblicuas, color marrón castaño, de clorhidrato de hemina o hematina <sup>[12]</sup>.

**Técnica:** Previa maceración de la tela manchada en suero fisiológico, en la que se emplea tanto tiempo cuanto sea necesario; en manchas muy antiguas con frecuencia se precisan horas. Después, en un portaobjetos se depositan varias gotas de esta solución, las que se evaporan a 60°C más o menos, hasta que quede un mancha seca visible; en el centro de esta mancha se deja caer una gota de ácido acético, la que rápidamente se hace evaporar a la llama, operación que se repite varias veces; después se observa al microscopio <sup>[13]</sup>.

Puede hacerse también la investigación dejando entrar por capilaridad, sucesivas gotas de ácido acético glacial en el borde del cubreobjetos, previamente formada la mancha como en el caso anterior; una vez que estas gotas han entrado por capilaridad, se someten a la llama para que se evapore rápidamente el ácido acético. Cuando la sangre se encuentra en un cuchillo u objeto duro, se toman partículas de la sangre, se llevan a un portaobjetos donde se hace la solución primero y luego la desecación, haciendo después que actúe el ácido acético, evaporándolo rápidamente a la llama <sup>[14]</sup>.

**Reacción de Lecha Marzo.-** Consiste en la formación de cristales de hemocromógeno, de color anaranjado o rojo oscuro, en forma de agujas o tabletas rómbicas, a veces agrupada en estrellas <sup>[13]</sup>.

**Técnica:** En un portaobjetos se disuelve la mancha con una gotas de piridina y una gota de solución yodo (yoduro de potasio: 0.5g, yodo 2.5g; y alcohol de 96° 25mL), y se evapora al calor suave; se agrega después una gota de piridina y otra de sulfuro de amonio o de ácido pirogálico; se cubre la preparación y se observa al microscopio la presencia de cristales <sup>[13]</sup>.

**Falsos Negativos:** La poca cantidad de la muestra, el lavado de la misma y la falta de experiencia del analista para buscar los cristales entre las fibras de los tejidos textiles <sup>[13]</sup>.

**Valor de la prueba:** La negatividad de la prueba asegura la no presencia de sangre en la mancha. Cuando esta es positiva, indica sin lugar a duda la existencia de la sangre, y obliga a continuar la marcha analítica <sup>[13]</sup>.

**3.1.1.3. Pruebas espectrofotométricas.** Están indicadas cuando las manchas son de mucha antigüedad, o cuando fallan las técnicas ya mencionadas. La extracción de las manchas se realiza con Lauril sulfato sódico, en presencia de Mercaptoetanol. En estas condiciones, la hemoglobina presenta dos picos de absorción, uno a 558nm y otro a 529nm <sup>[13]</sup>.

**Falsos positivos para las pruebas espectrofotométricas:** Es muy poco probable obtener falsos positivos y cuando se presentan suelen deberse a errores de interpretación del analista <sup>[13]</sup>.

**Valor de la prueba:** La negatividad de la prueba asegura la no presencia de sangre en la mancha, cuando esta es positiva, indica sin lugar a duda la existencia de sangre y obliga a continuar la marcha analítica.

## 3.2 GÉNERO (HUMANA O ANIMAL).

En algunas ocasiones la sangre de un animal puede estar involucrada en el hecho violento, para diferenciarla del humano se puede hacer las mediciones de los diámetros de los eritrocitos, tomando en consideración las medidas en femtolitros (fL) son de 7.5fL, es decir que en comparación con los diámetros de los eritrocitos de los animales, son los más grandes de todos, pues en la mayoría de los animales domésticos tienden a ser menores aunque esto no es una regla, el tamaño de los eritrocitos del perro son de 7.2, los del conejo de 6.9, los del gato de 6.5, los del cerdo de 6.0, los de el chimpancé son de 7.4, los del caballo, toro y vaca de 4.6fL y los de las aves y batracios son elípticos <sup>[7]</sup>.

Muchas veces, un sospechoso que tiene manchas de sangre en su ropa o pertenencias intenta explicarlas diciendo que estaba cortando carne o desplumando gallinas o conejos.

Con raras excepciones de identificación, como el eritrocito oval del camello o los nucleados de aves y de reptiles, los exámenes previos no pueden distinguir la sangre humana de la animal, se requieren estudios inmunológicos: antisueros específicos que pueden obtenerse al inmunizar conejos e inyectándoles sangre de diversos animales para que desarrollen los anticuerpos específicos. A continuación se muestra una tabla del tamaño y la forma de los eritrocitos del humano y de algunas especies de animales <sup>[8]</sup>.

<b>Especie</b>	<b>Diámetro(μm)</b>	<b>Forma del eritrocito</b>
<b><i>Humano</i></b>	7.5	Bicóncavo
<b><i>Perro</i></b>	7.2	Cóncavo
<b><i>Conejo</i></b>	6.9	Ovalocito
<b><i>Gato</i></b>	6.5	Tiende a la crenación
<b><i>Cerdo</i></b>	6.3	Tiende a la crenación
<b><i>Caballo</i></b>	4.6	Cóncavo
<b><i>Toro</i></b>	4.6	Regular
<b><i>Vaca</i></b>	4.6	Regular
<b><i>Aves</i></b>	10 a 15	Elípticos y nucleados

**Cuadro 3. Diámetro y forma de los eritrocitos de algunas especies <sup>[8]</sup>.**

Contando con mayores elementos, podemos emplear los métodos biológicos para saber si una mancha de sangre es humana, o a qué animal pertenece, siendo posible hasta identificar al individuo de quien procede la sangre mediante la investigación del grupo sanguíneo de la mancha y del sospechoso <sup>[7]</sup>.

Antiguamente en las pruebas burdas de aglutinación tales como la del suero en extractos de manchas se esperaba produjeran una capa opaca en la interfase, los métodos modernos usan la electroforesis, en la que el extracto y el antisuero se juntan a través de una capa de gel por medio de corriente eléctrica, la interacción se hace visible por tinción. La técnica de anticuerpos fluorescentes se usa para determinación de especies, así como otros métodos que ahora se encuentran integrados a laboratorios serológicos complicados <sup>[8]</sup>.

En medicina legal tiene una enorme importancia determinar la especie animal a que pertenece la sangre encontrada, sea por que se necesita establecer que es humana o por que se busca rectificar a un acusado que atribuye la mancha a sangre de pollo o ternera, por ejemplo, ocultando su verdadero origen criminal, debido a ello se utilizan métodos inmunológicos <sup>[13]</sup>.

### 3.2.1 PRUEBAS DE LABORATORIO PARA DETERMINAR EL GÉNERO.

Las pruebas de laboratorio para determinar el género en una muestra de sangre las clasificamos en dos tipos: métodos microscópicos y métodos inmunológicos .

**3.2.1.1 Métodos microscópicos.** Uno de los métodos de microscopía para determinar el género es el citodiagnóstico in situ.

**Citodiagnóstico in situ.-** El estudio microscópico de la mancha de sangre puede ofrecer datos ciertos para su identificación y permite decir no sólo que la mancha es de sangre, sino cómo son los caracteres de los glóbulos (nucleados, forma, tamaño) y si pertenecen a mamíferos u ovíparos <sup>[13]</sup>.

**Técnica:** Se tratará la sangre con solución fisiológica y se recurrirá a los métodos corrientes de coloración. La mancha en cuerpos duros, opacos, puede ser estudiada directamente con luz lateral, con el método iniciado con el aparato de Florence. Esto sirve como investigación previa para localizar la mancha, pero permite también el estudio microscópico completo, sobre todo con modernos aparatos de microscopia (estativo Zeiss o el Ultropak) <sup>[13]</sup>.

**3.2.1.2 Métodos inmunológicos.** Estos métodos están basados en la reacción antígeno-anticuerpo, el número de técnicas inmunológicas para la identificación de la especie a la que pertenece una mancha de sangre es muy variado, dependiendo siempre de la interacción antígeno-anticuerpo.

**Prueba de las precipitinas.-** Existe otro examen con más probabilidades que el anterior, cimentado en la obtención de un antisuero específico en contra de las albúminas humanas, mismo que se produce en un conejo al cual con anterioridad se le había inyectado suero o plasma humano en condiciones estériles, la reacción antígeno-anticuerpo se hace visible por



la aparición de un anillo de precipitado color blanco, dentro de un tubo capilar en el punto de unión de la sangre analizada y el antisuero humano, a este ensayo se le ha llamado prueba de las precipitinas <sup>[12]</sup>.

**Reacción Sueroprecipitante de Uhlenhut o Test de inmunoprecipitación radial de Uhlenhut).**- El principio de este método es que la inyección de sangre o de suero sanguíneo de especie diferente repetida en dosis en intervalos convenientes ocasiona la aparición, en el suero del animal inyectado, de un proceso que tiene la propiedad de dar un precipitado en presencia de la solución de sangre o suero sanguíneo idéntico al que fue inyectado y no con la sangre o suero de otros animales para los que no ha sido preparado <sup>[13]</sup>.

El conejo es el animal de elección; debe ser joven, y que haya alcanzado su completo desarrollo <sup>[13]</sup>.

Inyecciones. Para obtener suero precipitante humano utilizar suero humano límpido y estéril que se inyecta en el conejo por vía intravenosa, intraperitoneal o subcutánea, en dosis diferentes <sup>[13]</sup>.

La vía intravenosa es la de elección ya que usando esta vía se obtienen mejores resultados <sup>[11]</sup>.

Los mejores sueros precipitantes se han obtenido haciendo seis inyecciones intravenosas de suero humano en las dosis de 0.50, 0.75, 1, 1.25, 1.50 y 2mL, cada tercer día <sup>[13]</sup>.

La sangría del conejo se hará ocho días después de la última inyección, estando el animal en ayunas para evitar la opalescencia del suero. La sangría se hará en la carótida o en la vena marginal de la oreja; puede hacerse también por punción cardíaca. El suero obtenido después de la coagulación de la sangre, recogido bajo la más escrupulosa asepsia, será colocado en tubos que se conservarán en refrigeración <sup>[11]</sup>.

La titulación del suero es importante. Para la práctica medico legal se aconseja una sensibilidad de 1 en 20 000 <sup>[11]</sup>.

**Técnica de la reacción.**- Condición indispensable para que la reacción tenga valor es que tanto la solución o líquido para examinar como el suero precipitante no presenten turbidez.

Se hace la reacción empleando siete tubos delgados de 2 a 3mL de capacidad y distribuidos del modo siguiente:

1) Primer tubo.- Se colocan 0.9mL de la solución en suero fisiológico de la mancha sanguínea, (macerado de hueso, músculo, etc., en los que se ha comprobado la presencia de proteínas, por la acción del ácido nítrico).

2) Segundo tubo.- Se colocan 0.9mL de la solución sanguínea en suero fisiológico, sin agregar el suero precipitante.

3) Tercer tubo.- Se colocan 0.9mL del suero fisiológico límpido y esterilizado que ha servido para disolver la mancha.

4) Cuarto tubo.- Se colocan 0.9mL de la solución de suero fisiológico de un lugar no manchado de la tela u objeto del examen.

5) Quinto tubo.- Se colocan 0.9mL de suero normal de conejo, diluido al 1 por 1 000 en suero fisiológico.

6) Sexto tubo.- Se colocan 0.9mL de suero de vaca o de caballo, carnero o pollo, etc., u otro animal.

7) Séptimo tubo.- Se colocan 0.9mL de suero humano diluido al 1 por 1 000 <sup>[11]</sup>.

A cada tubo menos al segundo, se le agrega 0.1mL de suero precipitante, dejándolo correr suavemente por la pared del tubo; se dejan en la estufa a 37°C <sup>[13]</sup>.

Las modificaciones si se trata de sangre humana, son producidas en el primero y séptimo, que son los que contienen la solución contaminada y el suero humano, respectivamente, la reacción se produce en corto tiempo, la opacidad o enturbamiento se inicia a los cinco minutos en el punto de contacto de los líquidos y el precipitado se producirá después de los veinte minutos; los que se formen posteriormente a ese tiempo no tienen valor <sup>[13]</sup>.

La reacción presenta gran valor medico legal, pero no es de especificidad absoluta, sino de grupo, demostrativo de la presencia de albúminas o globulinas humanas, y de algunos pocos animales (monos) <sup>[13]</sup>.

**Reacción anafiláctica.**- El fundamento de este fenómeno ha sido concretado por Richet: "Una sustancia insuficiente para matar o enfermar a un animal normal determina accidentes, fulminantes y mortales en una animal al cual un tiempo antes se le ha inyectado esa misma sustancia" <sup>[11]</sup>.

El fenómeno anafiláctico tiene tres fases: la sensibilización (inyección), el período de incubación de más o menos veinte días (o preanafiláctico) y la inyección desencadenante (fenómenos anafilácticos). La sensibilización se hace en el cobayo (animal de elección) efectuando una inyección única de suero, sangre completa, esperma, etc. (según la sustancia que se investiga), en el tejido celular subcutáneo, en el peritoneo, en una vena, en el corazón (por lo general la más segura, en el canal raquídeo o en el cerebro. Los fenómenos anafilácticos son de identidad variada <sup>[11]</sup>.

*Primera forma (mortal de necesidad)*

- Fulminante: el animal muere en menos de cinco minutos.
- Mortal aguda: el animal muere más o menos en una hora.
- Mortal tardía: el animal muere en más de una hora <sup>[11]</sup>.

*Segunda forma*

- Grave: el animal tiene marcada disnea, vértigos, movimientos giratorios, secreción salival, embotamiento, descenso de la temperatura; entre 45 a 60 minutos, el animal se normaliza o no <sup>[11]</sup>.

*Tercera forma*

- Benigna: el animal tiene prurito en el hocico y en los lomos, carrera impulsiva, descenso de la temperatura, curación entre 15 a 30 minutos <sup>[11]</sup>.

Se pueden tener a los animales sensibilizados de antemano, con suero o sangre humana, de 0.5 a 1mL; usándose entonces como inyección desencadenante la solución de sustancia sospechosa en suero fisiológico, de 0.5 a 1mL; pero lo común es preparar al animal con una inyección sensibilizante, (0.5mL a 1mL), de solución en suero fisiológico de la mancha, con pequeña cantidad de sosa; a los 20 días o al mes, se inyecta de 0.5mL a 1mL de suero humano y se observa la reacción del animal <sup>[11]</sup>.

Cuando se ha determinado por la reacción precipitante o por la fijación del complemento, la presencia de sangre humana en una mancha, la investigación de la reacción anafiláctica, mucho más sensible que las precedentes, constituye un procedimiento de lo más valioso; insuficiente por sí solo para determinar el origen de la mancha, permite descartar el origen humano si el animal no presenta ningún accidente después de la segunda inyección intravenosa de suero humano <sup>[11]</sup>.

**Falsos Negativos:** Baja sensibilidad del antisuero elegido, Deterioro de la proteína o proteínas del suero que actúan como antígenos y el mal desarrollo de la técnica empleada.

**Falsos Positivos:** Escasa especificidad del antisuero obtenido. Especies animales muy próxima en la escala zoológica.

**Valor de la prueba:** Cuando esta es positiva, indica la especie animal de la que proviene la mancha de sangre, ante la negatividad de la misma, se puede pensar en una falta de sensibilidad del antisuero elegido, o bien en un deterioro de las proteínas que actúan como sustancias antigénicas.

### 3.3 ORIGEN.

El hallazgo de manchas de sangre no siempre estará sujeto a la comisión de lesiones con los diferentes tipos de armas conocidas, también puede encontrarse por efecto de enfermedades, ataques sexuales, abortos, cuando las condiciones lo permitan deben agotarse las posibilidades de examinar ese sangrado tratando de determinar su origen, sabiendo que la sangre de una mancha es de origen humano el examen histológico puede permitir reconocer la procedencia de esa mancha: mancha de sangre menstrual, de una epistaxis, de una hemoptisis, de una hematemesis, etc. <sup>[12]</sup>.

**Sangre menstrual:** La sangre menstrual es relativamente fácil de reconocer gracias a las placas epiteliales desprendidas de la mucosa uterina que se encuentran esparcidas entre los glóbulos sanguíneos, para ponerlas en claro, es útil hemolizar los glóbulos rojos, en un frotis en placa, se observa descamación masiva del epitelio vaginal, se encuentran células epiteliales superficiales, basófilas con grandes y pequeños núcleos.

El procedimiento general llevado a cabo es: la maceración de la mancha en ácido acético al 4%, centrifugación y examen del sedimento, se fija y se colorea con azul de metileno <sup>[6]</sup>.

**Violación:** Se concibe el interés que en ciertos casos representa distinguir la sangre menstrual de la sangre que produce la desfloración, en este último caso, es posible encontrar igualmente celdillas epiteliales mezcladas con sangre, que proceden de la mucosa vulvar, pero estas celdillas nunca afectan las formas de las placas, como las que vienen de la mucosa uterina; además su núcleo es distinto, al examinar manchas hemáticas la búsqueda se enfoca a la observación de células del epitelio vaginal, así mismo a células bulbares y también de espermatozoides <sup>[6]</sup>.

**Sangre obstétrica:** Se trata de localizar residuos de la placenta, materia sebácea, vellosidades y fecal y meconio <sup>[6]</sup>.

**Hemoptisis:** Sangramiento bucal de origen pulmonar. Se observa espumosa. En los vómitos con sangrado es posible identificar al microscopio fibras elásticas pulmonares, moco bronquial y células del epitelio con pestañas vibrátiles. Además suele presentarse en el escenario en forma de salpicaduras <sup>[10]</sup>.

**Hematemesis:** Cuando hay sangre en los vómitos pueden encontrarse residuos de alimentos, drogas, venenos y células del tracto digestivo <sup>[6]</sup>.

**Restorragia:** Sangramiento de recto por heridas o ruptura de hemorroides. La sangre es de color rojo y de aspecto fluido <sup>[6]</sup>.

**Melena:** Sangramiento de origen intestinal, tubo gástrico alto. Se evidencia por deposiciones negras (alquitranadas). La sangre si es de este tipo suele contener restos de materia fecal <sup>[10]</sup>.

### 3.4 ANTIGÜEDAD.

La pretensión de determinar la antigüedad de una mancha de sangre ha sido siempre bloqueada por la acción diversa de los factores climatológicos, del soporte y fenómenos microbiológicos, por lo tanto el perito podrá solo opinar acerca del posible tiempo transcurrido o precisar si una mancha es más antigua en comparación con otra <sup>[12]</sup>.

Los siguientes son elementos de estudio que sirven de base para determinar la antigüedad de una mancha de sangre: el color es uno de los factores a considerar, la sangre puede ser venosa o arterial, ya fuera del cuerpo se va oscureciendo hasta llegar al café oscuro al cabo de unos 10 días, para luego hacerse casi negro en tiempos más prolongados.

El brillo de las manchas secas se va perdiendo poco a poco conforme pasa el tiempo, la propiedad de coagulación de la sangre se efectúa dentro de un tiempo aproximado de tres a ocho minutos, el tiempo de secado para una gota de sangre en una habitación de calcula en una hora y de 12 a 36 horas para un charco <sup>[12]</sup>.

La solubilidad de las manchas secas de la sangre, conforme pasa el tiempo presenta variaciones, en los primeros días se disuelven con facilidad en agua o suero fisiológico pero después de más días la disolución se torna más lenta, después de varias semanas puede disolverse en solución al 2% de hidróxido de potasio y al paso de varios meses la solución de potasa tiene que incrementarse al 33% para que disuelva la mancha <sup>[12]</sup>.

Existen otras técnicas fundamentales en los cambios químicos que sufre la hemoglobina, transformándose en hemocromógeno, o en hematoporfirina en el caso de sangres muy antiguas y que son detectadas con el empleo de espectroscopia de resonancia electrónica del spin, técnica no destructiva que sólo requiere 20 a 250 mg de muestra, pero los exámenes más avanzados son a base de radioinmunoensayos <sup>[12]</sup>.

### 3.5 MORFOLOGÍA.

La morfología de las manchas sanguíneas y sus características han sido tratadas en el tema de hematología reestructuradora, capítulo I.

### 3.6 TÉCNICAS HEMOCLASIFICATIVAS: INDIVIDUALIZACIÓN.

Una vez que se ha certificado que alguna mancha sospechosa resultó ser de origen hemático y, con posterioridad se pudo comprobar que proviene del género humano, se presenta en seguida una de las preguntas capitales de la investigación forense, consistente en intentar saber ¿a quien pertenecía esa sangre? <sup>[12]</sup>.

La individualización, es el objetivo final del estudio de las manchas de sangre, a tal fin la hematología forense se vale de la identificación de los marcadores genéticos eritrocitarios y plasmáticos que habitualmente se utilizan en el estudio de las paternidades, usando con frecuencia las mismas técnicas que en esos casos. Desafortunadamente no todas ellas son aplicables a diagnostico individualizador de las manchas ya que los marcadores genéticos son muy sensibles a situaciones tales como la desecación, cambio de temperaturas, etc.

#### 3.6.1 PRUEBAS DE LABORATORIO PARA DETERMINAR LA INDIVIDUALIZACIÓN.

Las pruebas de laboratorio para determinar la individualización de sangre son:

3.6.1.1 Antígenos leucocitarios.

3.6.1.2 Sistemas de enzimas de células rojas.

3.6.1.3 Examen de ADN.

**3.6.1.1 Antígenos leucocitarios humanos (Sistema HLA).** Al igual que en los glóbulos rojos, en diferentes tipos de leucocitos también se ha demostrado la presencia de antígenos en las membranas de estas células nucleadas, los de mayor importancia pertenecen al sistema HL-A los cuales están codificados por los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, ubicados en los loci A, B, C, D, DR, DQ y DP del brazo corto del cromosoma 6. Los antígenos HLA-A, B y C están presentes en todas las células nucleadas del organismo; en cambio los HLA-D y R se distribuyen en forma más limitada: sobre linfocitos B, macrófagos, espermatozoides, células de Langerhans, etc., presentan en su conjunto un rango de probabilidad de exclusión de aproximadamente 95 %. utilizando la técnica de leucoaglutinación, aunque desafortunadamente la escasez de anticuerpos

específicos ha impedido que esta metodología se generalice, sin embargo su aplicación persiste en estudios relacionados con transfusiones sanguíneas, trasplantes, pudiendo aportar una gran información en los trabajos analíticos para la diferenciación de la sangre [12].

**3.6.1.2 Sistemas de enzimas de células rojas.** Aprovechando los diversos tipos del contenido enzimático de los eritrocitos, se han formalizado sistemas que amplían de manera significativa la posibilidad de descartar que dos muestras de sangre pertenezcan a una sola persona, o en su caso tener más peso acusativo para algún sujeto sospechoso, los sistemas más utilizados son la Fosfoglucomutasa locus<sub>1</sub> y la Fosfatasa ácida eritrocitaria, haciendo la observación que en este caso no se utilizan técnicas de aglutinación sino ensayos especializados de la electroforesis explicadas en el anexo [12].

**3.6.1.3 Examen de ADN.** El análisis forense de ácido desoxirribonucleico es la herramienta más avanzada para llegar a la individualización de la sangre y otros tejidos, la información genética que proporciona ha sido comparada con la huella digital de un individuo, los fundamentos analíticos están basados en las variaciones individuales en las secuencias de los nucleótidos que se traducen en elementos de individualización, las zonas diferenciales de las cadenas de los nucleótidos son aprovechadas por los ensayos analíticos, existen diversas metodologías entre las que se encuentran el HLA DQ alfa, el Polimarker y el D1S80, aunque con fines de individualización completa la técnica más adecuada es la Southern Blot que proporciona la llamada “huella genética” [1].

El desarrollo social ha traído consigo una modificación de la tipología delictiva, que ha hecho relativamente frecuentes determinados tipos de actos criminales caracterizados por su violencia con una notable desproporción de fuerzas entre víctima y agresor y por la utilización de instrumentos y armas que hacen que las evidencias o indicios dejados en el lugar de los hechos por el autor o autores sean mínimas.

Paralelamente, el desarrollo científico ha posibilitado la aplicación de nuevas tecnologías que han ido profundizando en su capacidad identificadora sobre indicios cada vez más pequeños; el máximo exponente en el momento actual es la denominada tecnología del ADN, la cual es parte de la genética forense esta última definida como: una especialidad de la ciencias forenses que se ocupa del estudio de los caracteres hereditarios y el análisis del polimorfismo o variabilidad genética humana aplicada a problemas de orden legal [23].



Hablar hoy día del ADN en el campo de la Medicina Forense no resulta desconocido, ni siquiera novedoso, desde su primera aplicación en Inglaterra por parte de Alec Jeffreys en el año 1985 para la resolución de un caso de inmigración de un joven procedente de Ghana, y, sobre todo, su posterior aplicación dos años más tarde, a la investigación criminal, posibilitando identificar a Robert Melias, un peón de Bristol de 32 años de edad, como autor de una agresión sexual a una mujer enferma de polio, y a Nigel Davis como autor del denominado "caso del condado de Leicestershire", en el que se produjo la violación y muerte de dos mujeres del condado, la primera en 1983 y la segunda en 1985 y donde los métodos serológicos clásicos no pudieron lograr una individualización suficiente con los indicios biológicos obtenidos de las víctimas, su uso se ha extendido y generalizado a una velocidad sólo comprensible y justificable por la efectividad y versatilidad de esta tecnología.

Esta aceptación general ha conllevado un desarrollo que ha obligado a una notable evolución de la técnicas aplicables en la identificación forense y así en el breve periodo de tiempo de 10 años hemos pasado de sólo poder estudiar determinados fragmentos del ADN de una longitud relativamente grande a analizar pequeñas regiones procedentes de indicios mínimos por medio de su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Todo ello ha supuesto una importante modificación tanto en lo cuantitativo como en lo cualitativo de los indicios biológicos <sup>[23]</sup>

En el análisis e identificación se emplean estas técnicas:

3.6.1.3.a *Southern blot e hibridación (con sondas): VNTR*

3.6.1.3.b *PCR*

3.6.1.3.c *Secuenciación de ADN mitocondrial*

Los médicos forenses pueden utilizar el ADN presente en la sangre, el semen, la piel, la saliva o el pelo en la escena de un crimen para identificar al responsable, esta técnica se denomina huella genética, o también "perfil de ADN", al realizar la huella genética, se compara la longitud de secciones altamente variables de ADN repetitivo, como los microsatélites, entre personas diferentes, este método es frecuentemente muy fiable para identificar a un criminal, sin embargo, la identificación puede complicarse si la escena está contaminada con ADN de personas diferentes <sup>[23]</sup>.

La técnica de la huella genética fue desarrollada en 1984 por el genetista británico Sir Alec Jeffreys,<sup>146</sup> y fue utilizada por primera vez en medicina forense para condenar a Colin Pitchfork en los asesinatos de Narborough (UK) en 1983 y 1986. Se puede requerir a las personas acusadas de ciertos tipos de crímenes que proporcionen una muestra de ADN para introducirlos en una base de datos, esto ha facilitado la labor de los investigadores en la resolución de casos antiguos, donde sólo se obtuvo una muestra de ADN de la escena del crimen, en algunos casos permitiendo exonerar a un convicto.

La huella genética también puede utilizarse para identificar víctimas de accidentes en masa o para realizar pruebas de consanguinidad <sup>[23]</sup>.

**3.6.1.3.a Análisis de restricción de Southern Blot.** Las endonucleasas de restricción son enzimas que cortan el ADN guiadas por secuencias definidas como blancos, por lo general se hace referencia a ellas simplemente como enzimas de restricción, debido a que cada enzima corta el ADN sólo por su secuencia de reconocimiento específica, el ADN total de un individuo presente en las células nucleadas se puede cortar en pedazos de tamaños manejables y definidos de modo reproducible <sup>[15]</sup>.

Luego, los fragmentos de ADN individuales se seleccionan, se ligan en vectores adecuados, se multiplican y se examinan. Debido a la distribución dispereja de los sitios de reconocimiento, los fragmentos de ADN difieren en su tamaño <sup>[15]</sup>.

Una mezcla inicial de fragmentos de ADN puede ordenarse de acuerdo a su tamaño. Dos procedimientos detectan el ADN blanco o los fragmentos de RNA luego que fueron ordenados por tamaño mediante electroforesis en gel: hibridación por Southern Blot para el ADN, y la hibridación por Northern blot para el RNA <sup>[15]</sup>.

*Técnica.*- La técnica de Southern blot se utiliza principalmente para revelar patrones de asociación polimórficas y con ello para resolver la identidad, son siete los pasos numerados para la realización de esta técnica, descritos a continuación:

1. El análisis comienza con ADN total que se aísla y corta con enzimas de restricción.
2. Uno de los fragmentos aún no identificados contiene el gen de interés o parte del gen. Los fragmentos se ordenan por tamaño en un gel (por lo general de agarosa) en un campo eléctrico (electroforesis).

3. Cuanto menor es el fragmento, más rápido migra; cuanto más grande, más lento, luego se realiza la impronta ("blot"): los fragmentos contenidos en el gel se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o de nailon.

4. Allí el ADN se desnaturaliza (se vuelve de cadena simple) con un álcali y se fija a la membrana, mediante un calentamiento moderado (80°C) o por un ligamiento cruzado con UV, la muestra se incuba con una sonda de ADN de cadena simple complementaria del gen.

5. La sonda hibrida solo con el fragmento complementario buscado y no con otros.

6. Dado que la sonda esta marcada con <sup>32</sup> radiactivo, el fragmento de interés se puede identificar poniendo en contacto una película de rayos X con la membrana; allí aparece como una banda negra en la película una vez que esta es revelada (autorradiografía).

7. El tamaño correspondiente a la posición, se determina corriendo fragmentos de ADN de tamaños conocidos en la electroforesis <sup>[17]</sup>.

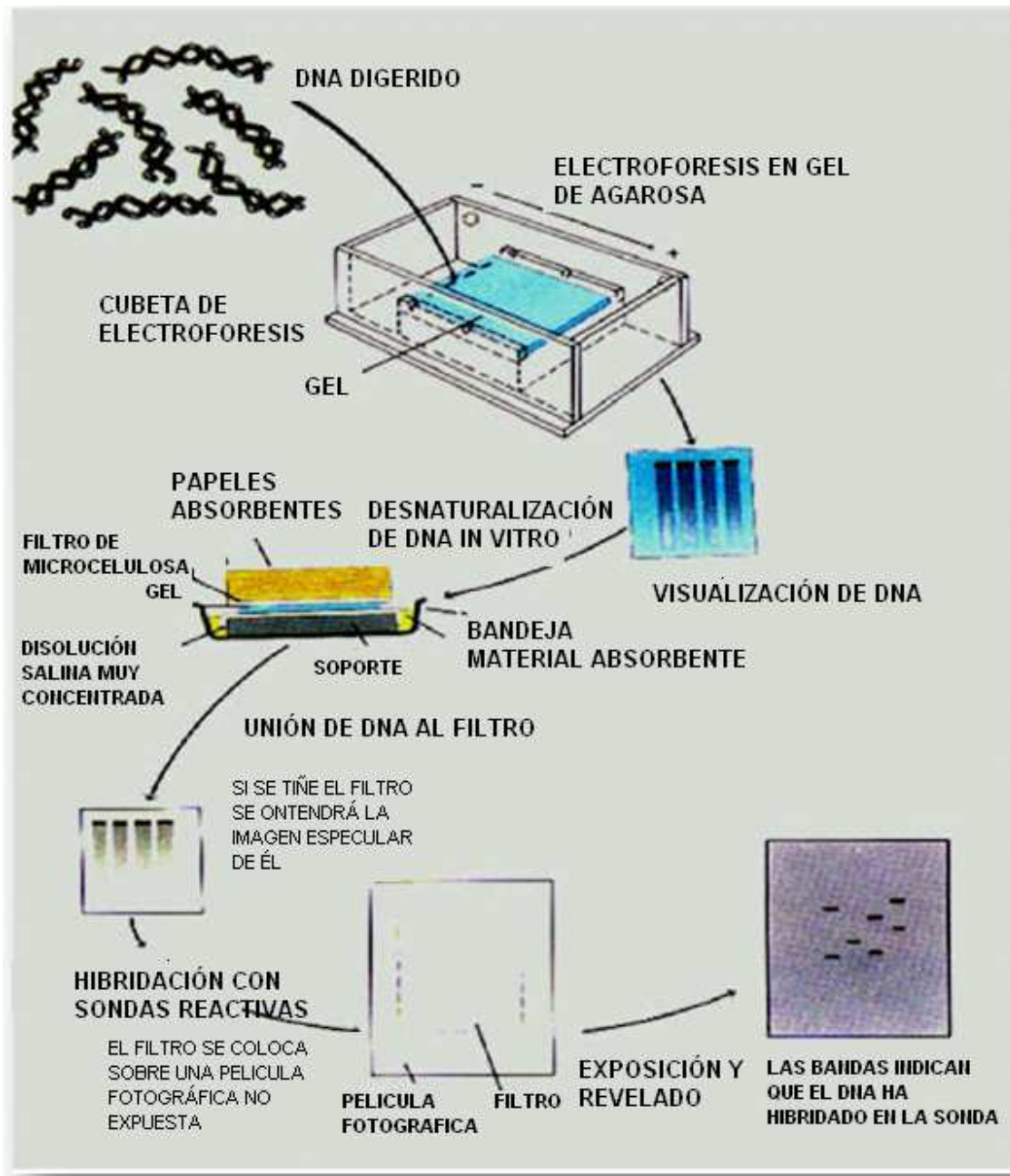


Figura 4: Pasos de la técnica de Southern Blot <sup>[29]</sup>.

**Tipificación del ADN.-** Las pruebas forenses de ADN como se conocen hoy tienen una historia relativamente breve, en 1985, Sir Alec Jeffreys desarrolló un método para usarse en las pruebas forenses de identidad de ADN. Este método se basaba en el descubrimiento de que determinadas regiones del genoma humano contenían segmentos de ADN que se repetían múltiples veces y mostraban un notable grado de variación genética (y, por tanto, individual) [17].

**Tipificación del ADN-VNTR.-** Las regiones de interés se llaman número variable de repeticiones en tandem (VNTR) y, con excepción de los gemelos idénticos, la gente varía en el número de copias que tienen de una secuencia de ADN repetida en particular, por ejemplo, el cromosoma de una persona puede contener 18 copias de una secuencia en particular, mientras que el mismo cromosoma de un individuo distinto puede contener 25 copias de esa misma secuencia [21].

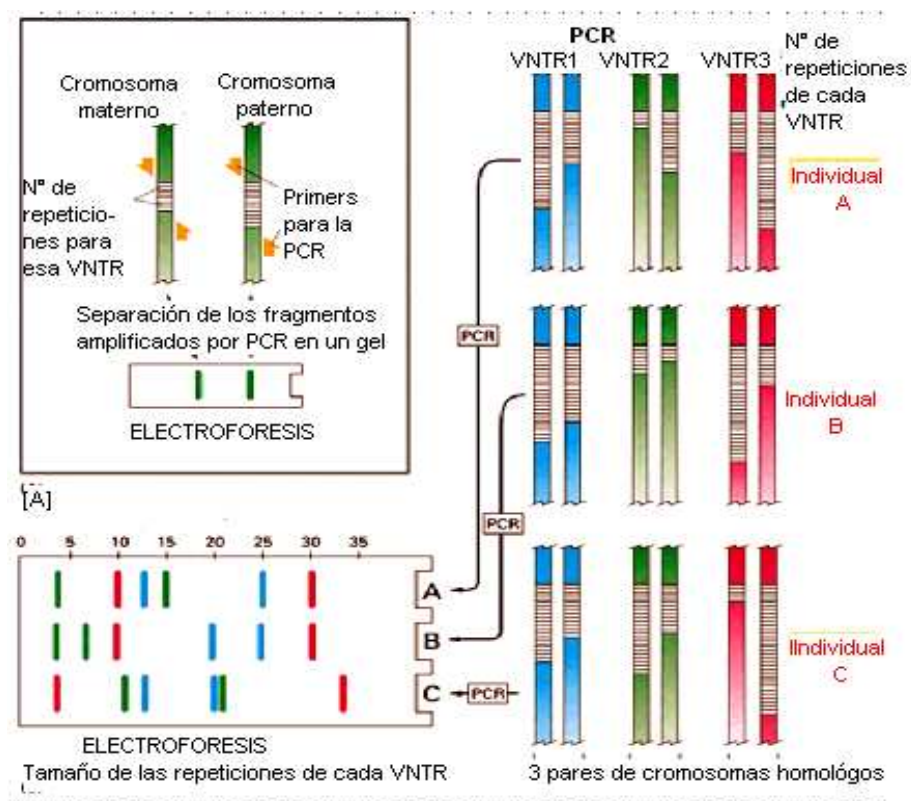


Figura 5. PCR con marcadores VNTR's [21].

**3.6.1.3.b Amplificación de ADN por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** La introducción de métodos sin la utilización de células para multiplicar fragmentos de DNA de origen definido (amplificación de ADN) en 1985, condujo a una nueva era en genética molecular, esta tecnología fundamental se ha difundido drásticamente con el desarrollo del equipamiento automatizado utilizado en investigación básica y aplicada <sup>[17]</sup>.

Gracias a esta técnica se puede amplificar una determinada región del ADN que está delimitada por una secuencia específica y complementaria a unas pequeñas sondas denominadas primers que actúan como iniciadores de la reacción de polimerización que lleva a cabo una enzima, habitualmente la Taq polimerasa. Esta enzima va uniendo desoxinucleótidos, que nosotros incluimos en la reacción, de forma complementaria a cada una de los fragmentos de las cadenas que se delimitan por los primers que son tomadas como moldes, la repetición cíclica de este proceso permite la obtención de múltiples copias de dicha región en una cantidad suficiente para ser estudiada, posteriormente, el ADN amplificado se puede visualizar mediante la separación de los alelos de diferente tamaño y tinción o estudiando las variaciones de su secuencia, de este modo es posible que cuando dispongamos de muy escasa cantidad de ADN en un indicio o esté parcialmente degradado, sea posible amplificarlo y obtener una cantidad suficiente <sup>[17]</sup>.

La PCR estándar es un procedimiento in vitro para amplificar secuencias definidas de ADN blanco, aun partiendo de muy pocas cantidades de material o de material antiguo, la amplificación selectiva requiere alguna información previa acerca de las secuencias que flanquean el ADN blanco, sobre la base de esta información se diseñan dos oligonucleótidos cebadores (primers) de alrededor de 15 a 25 pares de bases de longitud <sup>[18]</sup>.

Los cebadores son complementarios de las secuencias por fuera de los extremos 3' del sitio blanco y se unen a ellas en forma específica <sup>[18]</sup>.

La PCR es una reacción en cadena porque las cadenas de DNA nuevas sintetizadas actúan como molde para la posterior síntesis de ADN en los 25 o 35 ciclos subsiguientes, en teoría, cada ciclo dobla la cantidad de ADN amplificado, al final, hay al menos  $10^5$  copias de la secuencia blanco específica, esta se puede visualizar como una banda distintiva de un tamaño específico luego de una electroforesis en gel <sup>[23]</sup> (Figura 6).

Cada ciclo, que involucra tres reacciones rigurosamente controladas en tiempo y temperatura en los termocicladores automáticos, lleva alrededor de 1-5 minutos <sup>[23]</sup>.

Los tres pasos en cada ciclo son:

- 1) Desnaturalización del ADN de cadena doble, alrededor de 93° - 95° C para el ADN humano,
- 2) Hibridación (annealing) del cebador a unos 50° - 70°C, dependiendo de la temperatura de fusión esperada del dúplex de ADN y
- 3) Síntesis del ADN utilizando una polimerasa de ADN termorresistente (proveniente de microorganismos que viven en fuentes calientes como la *Thermophilus aquaticus*, Taq polimerasa), típicamente a unos 70°C – 75°C.

En cada ciclo subsiguiente el molde inicial y el ADN nuevo, sintetizado durante el ciclo anterior, actúan como molde para otra vuelta de síntesis.

El primer ciclo da como resultado la síntesis de ADN nuevo de longitudes variables en el extremo 3' por que la síntesis continúa más allá de la secuencia blanco.

Lo mismo ocurre en los ciclos subsiguientes, pero las cadenas variables son rápidamente superadas en número por nuevo ADN de longitud fija en ambos extremos porque la síntesis no puede sobrepasar el final del cebador en el molde de ADN opuesto <sup>[23]</sup>.

El uso de la PCR exige mucho cuidado, lo más importante es evitar la contaminación de la mezcla reactiva la cual es muy sensible y que permite multiplicar accidentalmente cantidades mínimas de ADN contaminante, debido a ello se utilizan procedimientos normalizados para evitar la contaminación.

Una vez amplificado el ADN, los fragmentos resultantes son separados por medio de un proceso de electroforesis , proceso en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

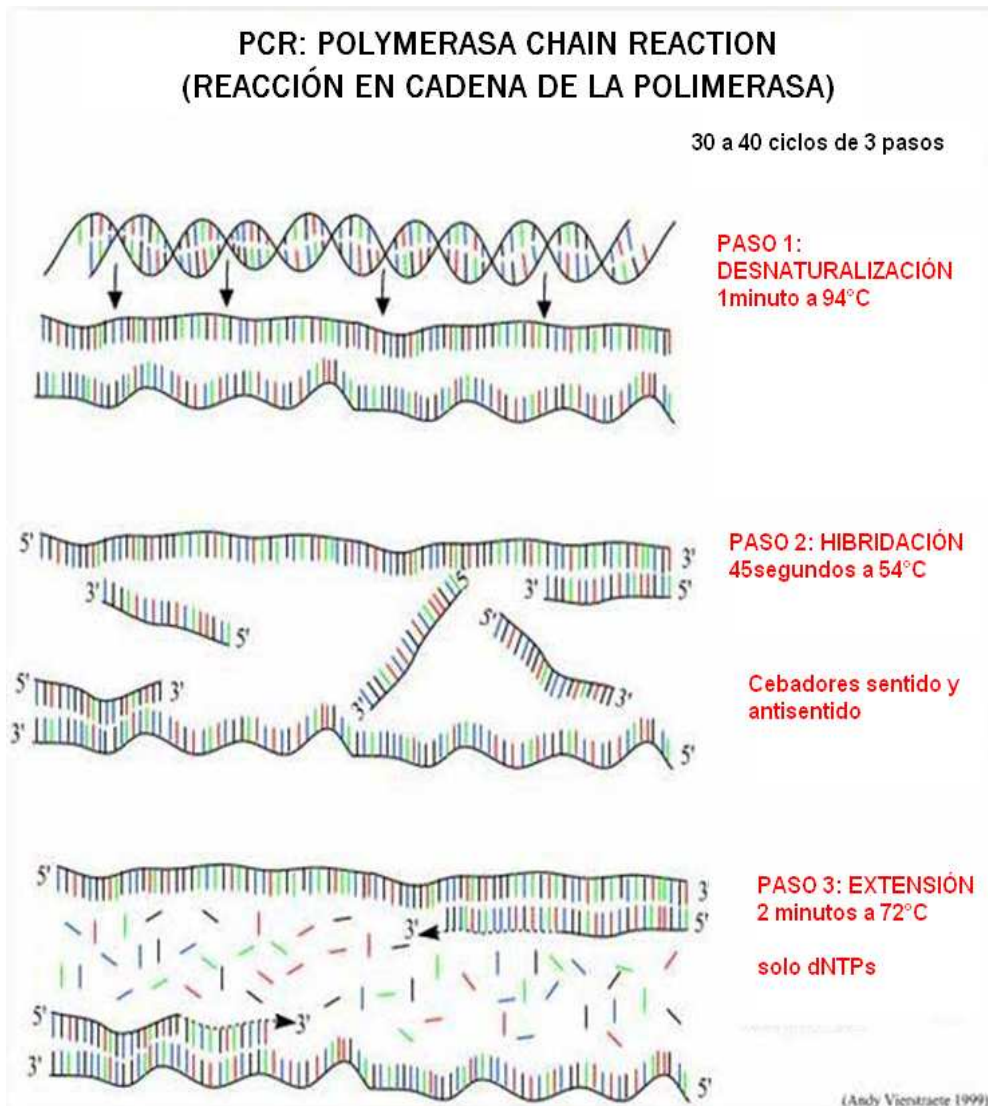


Figura 6. Pasos de la reacción en cadena de la polimerasa [28].

**3.6.1.3.c Secuenciación de ADN mitocondrial.** El análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) es útil en los casos forenses en los que el ADN nuclear es insuficiente para la tipificación de repeticiones cortas en tándem (STR). Los cabellos caídos del cuerpo, cabeza y púbicos sin material celular (folículo piloso) conectado al bulbo de la raíz y los restos esqueléticos de cierta edad son las muestras más comúnmente analizadas en busca de ADNmt porque el ADN nuclear no es recuperable en estos tejidos, el ADN mitocondrial no



tiene nada de especial en su composición bioquímica respecto al ADN nuclear, sin embargo, su ubicación y arreglo interior de la mitocondria en la célula le confieren características particulares, como características adicionales, se tiene que el ADN mitocondrial es menos propenso a la degradación, por lo cual, puede estar presente en células y tejidos dañados y/o antiguos, e inclusive en muestras carente de ADN nuclear, y que fuera hasta no hace mucho, único material biológico necesario para la tipificación genética, pero su mayor importancia estriba en que presenta regiones hipervariables que permiten distinguir un individuo de otro en muestras tan comprometidas de las que apenas y se suele tener restos óseos o pelo, ocasionalmente uno, sin embargo dado que se encuentra en grandes cantidades, es más susceptible a la contaminación, implicando cuidados especiales <sup>[47]</sup>.

El uso del ADNmt como herramienta forense evolucionó a partir de su papel en el estudio de la historia y la enfermedad humana, el análisis de ADN mitocondrial resolvió varios misterios históricos, como la identificación de los restos del Zar en Rusia y el esqueleto de Jesse James, los antropólogos han recuperado ADN mitocondrial de esqueletos de neandertales de al menos 30,000 años de antigüedad. Este tipo de análisis forense ayuda rutinariamente a la identificación de bajas de guerra, entre ellas un soldado que luchó en Vietnam, ahora enterrado en la Tumba del Soldado Desconocido, recientemente aumentó las pruebas de STR de los restos de los ataques del World Trade Center (11/09/01).

El análisis forense de ADN mitocondrial se ha admitido en juicios en al menos la mitad de los EE.UU. desde su introducción en un caso de homicidio infantil en Tennessee en 1996, y sigue sometido a audiencias de *Frye* y *Daubert* en algunas jurisdicciones <sup>[47]</sup>.

En 1990, el laboratorio de la Oficina Federal de Investigación (FBI) comenzó un proyecto piloto llamado Sistema de índice de ADN combinado [Combined DNA Index System (CODIS)] creando un software que permite a los laboratorios federales, estatales y locales intercambiar y comparar perfiles de ADN de modo electrónico, la Ley federal de identificación de ADN se promulgó como parte de la Ley de control de los delitos violentos y el trabajo policiaco de 1995 (Ley pública N° 103-322); esa ley autorizaba al FBI a establecer un índice nacional de ADN para el trabajo policiaco, desde entonces, los gobiernos federal y estatal han invertido importantes recursos para el desarrollo de un sistema nacional de base de datos <sup>[47]</sup>.

El valor forense del ADN mitocondrial surge de su capacidad para expresar resultados aún en presencia de ADN nuclear muy escaso o seriamente deteriorado, al que se suma la presencia de igual estructura genética mitocondrial en todas las generaciones que comparten un mismo linaje materno, circunstancia que responde a su transmisión hereditaria sólo por vía materna y sin sufrir modificaciones de su pasaje de madres a hijos. También resulta significativo desde el punto de vista identificador, su presencia en células sin núcleo (anucleadas) como son las que componen el tallo del pelo<sup>[47]</sup>.

Estas características favorecen su empleo en circunstancias que impiden o limitan severamente la obtención de ADN nuclear, siendo indicaciones específicas para su utilización las siguientes:

- a) análisis de restos humanos de larga data o sometidos a situaciones externas altamente desfavorables,
- b) muestras con escasa cantidad de ADN nuclear disponible y/o en estado de degradación importante,
- c) identificación con familiares lejanos siempre que el parentesco reclamado lo sea por vía materna.
- d) análisis de pelos hallados en el lugar de un hecho criminal<sup>[47]</sup>.

Si bien las aplicaciones mencionadas resultan de interés forense y constituyen, en ocasiones, la única posibilidad de identificación genética, debe señalarse, que en la práctica, los resultados obtenidos no satisfacen las expectativas generadas por el empleo de la técnica<sup>[47]</sup>.

Ya mencionado que la propiedad del ADN mitocondrial se encuentra en su pasaje de generación a generación sin sufrir modificaciones estructurales, existe la posibilidad de observar variaciones menores entre familiares, generadas por fenómenos de mutación, ello puede complicar la comparación de los resultados favoreciendo falsas exclusiones, por lo cual dicha mutación deberá ser contemplada como situación especial<sup>[47]</sup>.

## Técnica para la realización de la secuenciación de ADN mitocondrial

*Paso 1. Extracción:* Aísla el ADN de todo el resto del material de la muestra <sup>[23]</sup>.

*Paso 2. Amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR):* Se dirige a las dos regiones hipervariables del ADN mitocondrial para hacer millones de copias para su análisis posterior <sup>[23]</sup>.

*Paso 3. Secuenciación:* la secuenciación dideoxi, coloca marcadores químicos fluorescentes en los nucleótidos terminales de los fragmentos de ADN que difieren en longitud por un solo nucleótido, cuando se someten estos fragmentos a electroforesis mediante un instrumento de detección de secuencias, un láser excita cada marcador fluorescente al pasar y una cámara detecta la fluorescencia emitida y "lee" la secuencia u orden de los nucleótidos de ADN <sup>[23]</sup>.

*Secuencias de ADN:* Las secuencias de ADN se visualizan en un electroferograma, los picos coloreados se marcan "A", "C", "G", "T" y, ocasionalmente, "N" (cuando el instrumento de detección de secuencias no puede designar a un nucleótido específico), en un análisis común de ADNmt, se analizan unos 700 nucleótidos en cada muestra, el electroferograma se puede ver en una pantalla de computadora o imprimirse en papel. Las secuencias de ADN recogidas por el instrumento de detección de secuencias se importan a un programa de computadora de modo que dos examinadores de ADN puedan comprobar su calidad. Si los datos de electroferograma de todas las muestras son de calidad aceptable, las secuencias de ADNmt de distintas muestras de un caso se comparan para determinar si dos de ellas podrían compartir una fuente común <sup>[23]</sup>.

## Resultados reportables

Un análisis de ADN mitocondrial tiene dos principales resultados reportables:

- *Falta de exclusión:* "Las secuencias de ADN mitocondrial de la muestra de cabello A y de la persona B comparten un nucleótido común en todas las posiciones. Por tanto, la persona B y sus parientes maternos no se pueden excluir como contribuyentes de la muestra de cabello A". En este resultado, se ofrece un contexto estadístico de la falta de exclusión.

- *Exclusión:* "Las secuencias de ADN mitocondrial de la muestra de cabello A y de la persona B son distintas. Por tanto, la persona B y sus parientes maternos están excluidos como contribuyentes de la muestra de cabello A". Dado que una mutación de un solo nucleótido puede ocurrir dentro de una persona, deben observarse al menos dos diferencias de nucleótidos para una exclusión <sup>[23]</sup>.

En ambos casos, el informe da cuenta del hecho de que los parientes maternos de la persona B tienen el mismo tipo de ADN mitocondrial que dicha persona <sup>[23]</sup>.

Los siguientes resultados adicionales pueden ser reportados, aunque son mucho más infrecuentes:

- Sin resultados: "Se obtuvo ADN mitocondrial insuficiente de la muestra de cabello A para obtener un perfil" <sup>[23]</sup>.
- No concluyente: "Las secuencias de ADN mitocondrial de la muestra de cabello A y de la persona B difieren en la posición de sólo un nucleótido. Por tanto, la persona B y sus parientes maternos no se pueden incluir ni excluir como contribuyentes de la muestra de cabello A" <sup>[23]</sup>.
- Los análisis forenses de ADN mitocondrial pueden tolerar una mínima contaminación, y la probabilidad de que ocurra en un pequeño porcentaje de casos se reconoce en la literatura científica. Los laboratorios deben desarrollar lineamientos validados para la interpretación de los datos en presencia de contaminación <sup>[23]</sup>.

### 3.7 SEXO

La diferenciación sexual constituye un paso trascendental en el proceso evolutivo, ya que permite una variabilidad génica en las especies, se sabe de tiempo atrás que la determinación del sexo en los mamíferos depende del dimorfismo cromosómico XX y XY. Con la dotación cromosómica se desencadena un proceso secuencial que implica la diferenciación progresiva de las gónadas, de los genitales internos, de la morfología de los genitales externos, la asignación del sexo al nacimiento, la identidad de cada uno con su propio papel sexual o sexo psicológico, la aparición de los caracteres sexuales secundarios y el establecimiento del sexo familiar, social y legal.

El cuestionamiento sobre alguna muestra de sangre para saber si es de hombre o de mujer, puede ocurrir en diversos casos sobre todo cuando el cadáver o la persona lesionada están desaparecidos. Existe una gran cantidad de parámetros clínicos que nos darían una idea clara acerca del sexo del individuo al que pertenecía la muestra hemática, desafortunadamente estos análisis se ven severamente restringidos en lo que se refiere al estudio en manchas de sangre, de cualquier forma se considero importante mostrar una tabla de valores normales comparativa entre el hombre y la mujer (Cuadro 8) <sup>[12]</sup>.

**Cuadro 4: Tabla de valores en algunos parámetros de hombre y mujer <sup>[12]</sup>.**

<b>Prueba</b>	<b>Valor Normal Hombre</b>	<b>Valor Normal Mujer</b>
<b>Volumen</b>	69mL/kg	65mL/kg
<b>Recuento de eritrocitos</b>	4.6 -6.2 x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	4.2 – 5.4 x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>
<b>Hemoglobina</b>	13.5 – 18 g/dL	12 – 16 g/dL
<b>Acido úrico</b>	2.1 – 7.8 mg/dL	2- 6.4 mg/dL
<b>Cobre</b>	70 -140 g/dL	85 – 155 g/dL
<b>Creatina</b>	0.2 – 0.6 mg/dL	0.6 – 1.0 mg/dL
<b>17-Hidroxicorticosteroides</b>	7 – 19 g/dL	9 - 21 g/dL
<b>Testosterona</b>	400 – 1200 ng/dL	30 – 120 ng/dL
<b>Vitamina B12</b>	200 – 800 pg/dL	100 – 650 pg/dL

**Es importante hacer la observación que en diversas enfermedades estos valores se modifican.**

En cuanto al mecanismo cromosómico podemos citar que existe una diferencia entre las células masculinas y femeninas en el período de la interfase, el establecimiento de este dimorfismo sexual es las células de los mamíferos fue alcanzado por Barr y Bertram los cuales observaron un pequeño corpúsculo de una a dos micras de diámetro adherido a la membrana nuclear en las células de gatos hembra y que no aparece en las células masculinas normales y que durante mucho tiempo se denominó corpúsculo de Barr en honor a su descubridor y cuyo corpúsculo por la relación que guarda con la presencia de los cromosomas X se le denomina actualmente Cromatina X, así mismo Barr demostró que la

cromatina sexual podía ser estudiada en las células provenientes de la mucosa oral, en este aspecto Davidson y Smith observaron que en los neutrófilos la cromatina presenta una morfología diferente ya que aparece como un palillo de tambor <sup>[53]</sup>.

### **3.7.1 PRUEBAS DE LABORATORIO PARA DETERMINAR A QUE SEXO PERTENECE LA MUESTRA DE SANGRE.**

**3.7.1.1 Prueba de la cromatina sexual.** La búsqueda microscópica en los núcleos de los leucocitos polimorfonucleados del apéndice de cromatina llamado palillo de tambor que se localizan en la sangre de la hembra, se ha convertido en una prueba de fácil ejecución con probabilidades de aplicación forense, siempre y cuando el líquido hemático todavía esté en regulares condiciones ya que en estado de sequedad ya no es posible realizar. En el desarrollo del examen debe considerarse que estos “palillos” solo aparecen en los núcleos, es más común en las masas multilobulados y que se da en las hembras en 6 de cada 500 polimorfonucleados <sup>[53]</sup>.

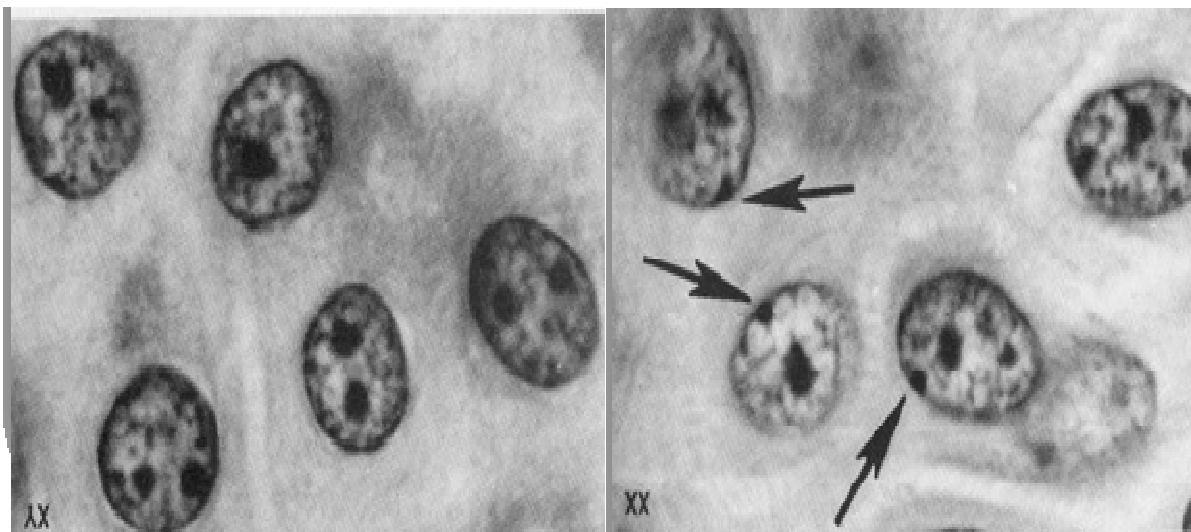
*Técnica:* Consiste en realizar un frotis ordinario en placa de la muestra de sangre obtenida con EDTA y estos frotis deben ser gruesos para que los glóbulos rojos se toquen unos a otros, pero sin cabalgarse, sucede que si los frotis son demasiado espesos, las células se encogen y los palillos de tambor no se observan y si los frotis son muy delgados la búsqueda se prolonga mucho, son convenientes los colorantes de Wright, Leishman y Giemsa, luego se observa al microscopio y se realiza un recuento hasta llegar a seis palillos de tambor o 500 polimorfonucleares. Barr cita las siguientes frecuencias de palillos de tambor en frotis de sangre de mujer: 0.6 a 8.8 por 100 de polimorfonucleares, con un promedio de 3.1 por 100. Es preciso distinguir los palillos de tambor verdaderos de los pequeños apéndices en barra más comunes en frotis de sangre de hombres normales <sup>[12]</sup>.

La proporción de núcleos en los cuales se puede apreciar la cromatina varía según las células estudiadas, la técnica de tinción empleada y la influencia de algunas sustancias hormonales y drogas. En las neuronas los porcentajes de cromatina son muy altos, ya que se alcanzan valores de hasta 98 por ciento; en la mucosa vaginal, también los valores son altos y, en otros tejidos, la positividad varía entre el 30 y el 60 por ciento. Los varones normales no muestran corpúsculo de Barr y solo ocasionalmente algunos cromocentros pueden ser confundidos, también existe el hallazgo en donde sujetos con síndrome de

Turner resultan cromatina-negativos, mientras que los pacientes con síndrome de Klinefelter eran cromatina-positivos <sup>[53]</sup>.

Algunos factores que modifican la cromatina sexual son: la aplicación local o general de ciertos antibióticos (clortetraciclina, cloramfenicol, bencilpenicilina y sulfafurazol o gantrisin ya que estos producen una disminución reversible de 5 a 60 por 100 del tamaño de la cromatina sexual. Además se debe tener cuidado al interpretar los estudios de cromatina sexual en frotis de niñas recién nacidas, la frecuencia de cromatina sexual en las células puede ser muy baja antes del cuarto día, época en la cual se alcanzan los valores normales. Las dosis terapéuticas de cortisona pueden reducir la proporción de células positivas a la cromatina <sup>[53]</sup>.

**Figura 7. Imagen de cromatina sexual observada al microscopio, también denominada palillo de tambor<sup>[48]</sup>.**



**3.7.1.2 Radioinmunoensayos.** Esta metodología clínica-analítica ha sido utilizada con éxito para investigación de hormonas masculinas y femeninas, encontrando su aplicación forense en determinar si las manchas de sangre examinadas pertenecían a un hombre o a una mujer, estos exámenes requieren de un antisuero específico para la hormona y hormonas marcadas <sup>[16]</sup>.

**3.7.1.3 Análisis microscópico de cromosomas.** Se han aplicado también métodos de cultivo para linfocitos en búsqueda de los cromosomas XX o XY y determinar el sexo <sup>[12]</sup>.

Para analizar los cromosomas del humano se emplea generalmente sangre periférica con heparina estéril la cual se utiliza como anticoagulante, se estimula de preferencia el crecimiento de linfocitos con el uso de mitógenos que son diferentes lectinas, una de las más utilizadas es la fitohemaglutinina, estimula la síntesis de RNA una hora después de su adición al medio de cultivo y de ADN 24 horas después; actuando sobre la membrana celular produce aglutinación. Para tener éxito en la obtención de cromosomas es imprescindible tomar en cuenta el lavado y esterilización del material, los medios de cultivo utilizados, el control de la temperatura, el pH y la humedad, los agentes antimicrobianos empleados y las condiciones de esterilidad en que deben ser obtenidas las muestras <sup>[53]</sup>.

Técnica: Se toma la muestra en condiciones de esterilidad, en jeringa impregnada con heparina por 2mL de muestra 0.1mL de heparina prepara en solución acuosa a una concentración de 1 000 unidades por 1mL, se mezcla suavemente la sangre con la heparina y se siembra en la campana de flujo laminar de ser posible por duplicado 10 gotas de sangre total en cada frasco de cultivo que contenga 4mL de medio de cultivo y 1mL de suero fetal de ternera el medio de cultivo le proporciona el soporte y las condiciones que las células necesitan para sobrevivir y proliferar en cuanto al suero fetal de ternera no se conoce el papel preciso pero sin el no sobreviven largos períodos de tiempo <sup>[53]</sup>.

Se añade 0.2mL de fitohemaglutinina que es un mitógeno y el cual induce la transformación de linfocitos a linfoblastos, se agrega 0.1mL de la solución de antibióticos penicilina-antiestreptomina los cuales se utilizan para controlar la contaminación microbiana además de que son los antibióticos más estables a 37°C y tienen una vida media de 72 horas <sup>[53]</sup>.

Se incuba durante 72 horas a 37°C; después de este tiempo se agrega 0.2mL de una solución de colchicina la cual ayuda detener la división celular en metafase, se incuba de 1 a 2 horas a 37°C; pasado este tiempo se vierte el contenido de los frascos de cultivo en tubos cónicos de centrifuga, con banda roja, de 15mL y se centrifuga a 1 000rpm durante 10 minutos, se descarta cuidadosamente el sobrenadante, el botón obtenido se resuspende con solución hipotónica de cloruro de sodio [0.075M], se incuba nuevamente durante 20 a 30 minutos a 37°C y se centrifuga a 1 000rpm durante 10 minutos, se elimina el



sobrenadante y el botón se resuspende hasta homogeneizar con una solución de Carnoy (metanol ácido acético 3:1) hasta completar 10mL la cual sirve para fijar a este proceso último paso se le conoce como proceso de fijación, después se deja en temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifuga a 1 000rpm por 10 minutos y se elimina el sobrenadante, se repite dos veces el proceso de fijación y se deja en solución fijadora en refrigeración por 24 horas <sup>[53]</sup>.

Pasado este tiempo se centrifuga a 1 000rpm durante 10 minutos, se elimina el sobrenadante y se agrega solución fijadora de acuerdo al botón obtenido, se hacen las preparaciones sobre portaobjetos previamente sumergidos en etanol al 70 % dejando caer dos gotas de la suspensión celular desde una altura suficiente para lograr una dispersión adecuada de los cromosomas, se seca al aire, se colorea con Giemsa por los procedimientos usuales y por último se realiza la observación microscópica, la toma de microfotografías y se realiza el montaje de cariotipos <sup>[53]</sup>.

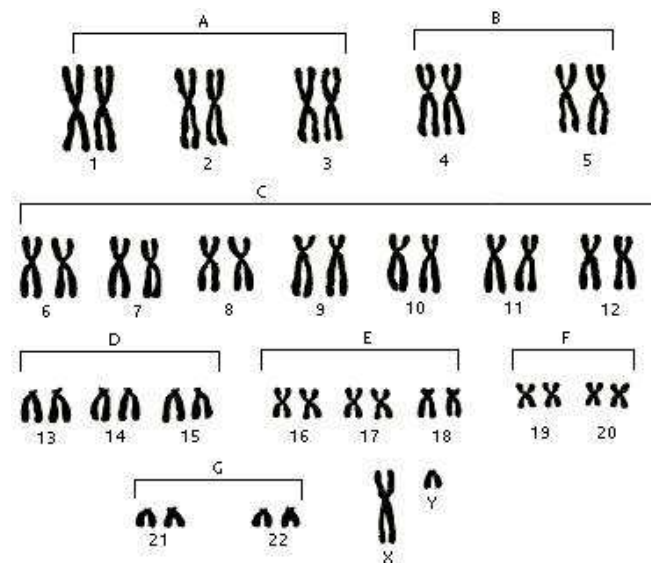


Figura 8. Cromosomas <sup>[49]</sup>.

### 3.8 PRUEBA DE EXCLUSIÓN DE PATERNIDAD.

La aplicación principal de este examen genético, consiste en descartar el parentesco Padre-hijo y también el de madre-hijo, con la finalidad de llegar a esclarecer situaciones legales tales como incestos, embarazo como producto de una violación, niños entregados a

una madre equivocada, divorcios por motivos de infidelidad, tráfico de niños. Cabe aclarar que estas pruebas no solamente sirven para excluir sino por el contrario también se utilizan para acumular probabilidades para demostrar la paternidad, sobre todo cuando se agotan todos los recursos posibles. Los ensayos analíticos para estos fines se basan en la detección de los grupos sanguíneos y la aplicación de las leyes de la herencia [22].

En México se aplica el artículo 253 del Código civil –Investigación de la filiación.- Algunos tipos genéticos morfológicos. “Las pruebas biológicas”. Exclusión e inclusión. [22] (Anexo).

Los grupos hemoclasificativos se heredan según las leyes genéticas de Mendel partiendo de la existencia de los 23 pares de cromosomas, y código para la producción de sustancias particulares del grupo sanguíneo, el sitio donde se encuentra se llama foco, a las codificaciones se les llama alelos y cada progenitor aportará el suyo [2].

### 3.8.1 ANTÍGENOS DE GRUPO SANGUÍNEO.

Los antígenos de grupo sanguíneo son un conjunto de antígenos (glicoproteínas, glicolípidos y proteínas) presentes predominantemente en la membrana de los eritrocitos y sus precursores y, en algunos casos, en las secreciones de los individuos.

Los antígenos, junto con los de histocompatibilidad, constituyen importantes antígenos de trasplante y son responsables de las reacciones post-transfusionales que aparecen cuando se administra sangre no compatible de un individuo a otro. Se encuentran agrupados en sistemas de los que actualmente se conocen 23 en el ser humano, incluyendo los sistemas ABO, Rh, Mn, Lewis, Kell, Duffy, Kidd, Lutheran, Chido/Rodgers, Diego, por sus antígenos tienen diversas funciones biológicas, en esta sección solo nos referiremos a los sistemas ABO y Rh [2].

**Sistema ABO.-** El sistema ABO, es el primero descrito y continúa siendo el de mayor importancia clínica en medicina, seguido por el sistema Rh, contrario a lo que podría esperarse, los antígenos del sistema ABO no sólo se encuentran en los eritrocitos, se expresan en la mayoría de los líquidos biológicos, su expresión es el resultado de varios genes separados, pero íntimamente relacionados, dentro de los que se incluyen los genes

A, B, H, Le y Se. En el sistema ABO se reconocen 4 grupos sanguíneos, según se tenga el antígeno A o el antígeno B, cuadro 3 <sup>[16]</sup>.

Antígeno sobre los eritrocitos	Isoaglutininas	Grupo sanguíneo
Substancia A	Anti-B	A
Substancia B	Anti- A	B
Substancia A y B	Ninguna	AB
Substancia H	Anti-A y Anti-B	O

Cuadro 5. Clasificación de los seres humanos en función de sus antígenos de grupo sanguíneo.

Las personas del grupo A tienen en sus eritrocitos el antígeno A; las personas del grupo B tienen el antígeno B, las personas que poseen tanto el antígeno A como el antígeno B se clasifican como AB y aquellas que carecen de estos antígenos constituyen el grupo cero, al mismo tiempo, las personas del grupo A tienen en la sangre anticuerpos contra el antígeno B; aquellas del grupo B, anticuerpos contra el antígeno A; los individuos del grupo AB no tienen anticuerpos ni contra A ni contra B y los individuos del grupo O tienen anticuerpos contra los antígenos A y B. A los anticuerpos contra las sustancias de grupo sanguíneo se les llama isoaglutininas y son predominantemente de la clase IgM, aunque existen también pequeñas cantidades de isoaglutininas IgG e IgA <sup>[16]</sup>.

**Sistema Rh.-** El otro sistema importante de antígenos eritrocitarios es el sistema Rh, el cual está determinado por dos genes estructurales, los genes RhD y RhCE. El RhD codifica para el antígeno D y el gene RhCE para los antígenos C y E y sus alelos c y e. A diferencia del sistema ABO, en el sistema Rh no hay isoaglutininas circulantes contra los antígenos Rh; éstas solo se producen como consecuencia de la inmunización de los individuos Rh negativos (Rh-), con eritrocitos (Rh+) <sup>[16]</sup>.

De los muchos antígenos que componen el sistema Rh, el antígeno inmunodominante es el antígeno D y su existencia o ausencia determina que el individuo sea Rh+ o Rh-, respectivamente. En el inicio de la serología Rh, utilizando sueros policlonales y el proceso

de absorción con eritrocitos humanos, se pudieron preparar antisueros específicos para cada uno de los antígenos del sistema (D, C, E, c y e). La radioactividad de cada uno de estos antisueros con los eritrocitos, de las personas de una población caucásica permitió establecer que, en promedio, el 80-85% de los individuos portan el antígeno D (esto es, son Rh+) mientras que el 15-20% restante carece de este antígeno y son, por lo tanto (Rh-), la búsqueda del antígeno D en los eritrocitos de las personas actualmente se hace utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra ese antígeno <sup>[16]</sup>.

Desde que Landsteiner identificó por primera vez los grupos sanguíneos ABO en 1900, se han descubierto muchos sistemas de ellos que dan otros tipos de características a la sangre. Los que tienen aplicación forense son Rhesus (Rh), M y N, Kelly, Duffy y Lewis, recientemente se ha aumentado la individualidad de la sangre por medio de proteínas complejas como los sistemas Gm y Ge, haptoglobinas y enzimas sanguíneas como la PGM (fosfoglucomutasa). Para que sean útiles, deben seguir las leyes de la herencia y permanecer fijas a lo largo de toda la vida posnatal de cualquier individuo (algunos grupos no se establecen en forma permanente hasta la etapa del lactante) <sup>[12]</sup>.

Para conocer el grupo sanguíneo, en el sentido amplio de la palabra, son necesarias otras técnicas como las enzimas de los eritrocitos, haptoglobinas, etcétera, que se usan para:

- a) Demostrar si la mancha de sangre en el arma, ropa, o en algún sitio proviene – o no de un sospechoso o víctima en particular, con base, por supuesto, en que los dos individuos no tienen características sanguíneas idénticas, entre más números de sistemas se prueben hay más oportunidades de discriminar.
- b) Ayudar a reunir los restos humanos fragmentados por desastres aéreos o de otro tipo, o por crímenes mutilantes múltiples.
- c) Ayudar a resolver disputas sobre paternidad y herencia, excluyendo el parentesco.
- d) Resolver confusiones de identidad en maternidades donde hay conflictos sobre a cual madre pertenece un recién nacido <sup>[4]</sup>.

En los últimos años, el uso del perfil de DNA ha desplazado algunas de estas pruebas, pero es todavía costosa y no se encuentra disponible en muchas partes del mundo <sup>[4]</sup>.

A continuación se enlistan los grupos sanguíneos que en la actualidad se pueden identificar en sangre fresca y en manchas secas, incluyendo en esta tabla los porcentajes que han reportado diversos investigadores referentes a la población de los E.U.A.<sup>[12]</sup>.

**Cuadro 6: Grupos sanguíneos encontrados en muestras de sangre. (12)**

<b>SISTEMA</b>	<b>GRUPOS</b>	<b>% DE INCIDENCIA</b>
<b>A B O</b>	A	40
	B	11
	O	15
	A B	4
<b>Rh</b>	Rh <sub>0</sub>	2
	Rh <sub>1</sub> rh	34
	Rh <sub>1</sub> Rh <sub>1</sub>	18
	Rh <sub>2</sub> rh	12
	Rh <sub>2</sub> Rh <sub>2</sub>	3
	Rh <sub>1</sub> Rh <sub>2</sub>	13
	Rh	14
	raros	4
<b>MNs</b>	MS	6
	MSs	14
	Ms	9
	MNS	3
	MNs	24
	MNs	24
	NS	1
	NSs	5
<b>Kell</b>	Ns	14
	KK	<1
	Kk	9
<b>Duffy</b>	Kk	91
	Fy(a+b-)	17
	Fy(a+a+)	51
	Fy(a-b+)	32
<b>Kidd</b>	Fy(a-b-)	No localizado en raza blanca
	Jk(a+b-)	27
	Jk(a+b+)	21

La sangre de todos los individuos entra en uno de los cuatro grupos primarios O, A, B o AB. Lattes dijo, "El hecho de pertenecer a un grupo sanguíneo definido, es una característica fija de cada ser humano, y no se altera con el paso del tiempo, ni con enfermedades intercurrentes", así la sangre, como las huellas digitales, son caracteres primarios inalterables <sup>[32]</sup>.

Los anticuerpos para todos los grupos ABO tienen que prepararse, ya que no se encuentran en forma natural, el reconocimiento de los componentes proteínicos específicos de la sangre se logra por separación electroforética. Otro descubrimiento útil, es que alrededor del 80% de la población, secreta grupos de sustancias solubles en agua, idénticos a subgrupos sanguíneos, en sudor, saliva, semen, líquidos gástricos y otros, si las técnicas son lo suficientemente sensibles para captar al grupo de estas sustancias, estas "secreciones" pueden identificarse a partir de manchas seminales y también de saliva, en caso de mordidas <sup>[8]</sup>.

**Herencia de los grupos sanguíneos.-** Bernstein, al elaborar los principios mendelianos de la herencia, formuló dos "reglas" principales que dependen de las características hereditarias de un gen de cada padre:

1. Un gen de grupo sanguíneo no puede presentarse en un niño a menos que esté presente en uno, otro o ambos padres.
2. Si el individuo es homocigoto (por ejemplo AA) para el gen del grupo sanguíneo, éste debe aparecer en todos sus hijos (hijas) <sup>[4]</sup>.

Hay otros principios: cada grupo aglutinógeno (fenotipo) tiene genes pares, uno proveniente de cada progenitor, el grupo A puede ser homocigoto (genotipo AA) o heterocigoto (AO), lo mismo sucede con el grupo B, el único apareamiento que puede producir los cuatro genotipos AB, AO y OO es un heterocigoto A x B (por ejemplo AO x BO) <sup>[4]</sup>.

El fenotipo A puede tener una estructura genotípica AA o AO, y en forma similar el B puede distinguirse desde el punto de vista genético como BB o BO. Cada individuo hereda un gen de cada padre, por lo que se puede elaborar su estructura genotípica simple comparativa como se observa en el cuadro 5 <sup>[12]</sup>.

Cuadro 7. Grupos sanguíneos posibles e imposibles. [22]

Padres	Grupos posibles de hijos	Grupos imposibles
O x O	O	A, B, AB
O x A	O, A	B, AB
O x B	O, B	A, AB
A x A	O, A	B, AB
A x B	O, A, B, AB	-
B x B	O, B	A, AB

La ley 2 resulta en más posibilidades

O x AB	A, B	O, AB
A x AB	A, B, AB	O
B x AB	A, B, AB	O
AB x AB	A, B, AB	O

El apareamiento de O con O no produce eritrocitos con A, B o AB, pero el de A con B tiene las combinaciones posibles siguientes:

1. AA x BB debe producir niños AB
2. AA x BO puede producir niños AB y AO
3. AO x BB puede producir niños AB y BO
4. AO x BO puede producir niños AB, AO, BO u OO
5. AO x AB puede producir niños AA, AB, AO, BO pero no OO

El grupo A es diferente ya que presenta varios subgrupos <sup>[22]</sup>.

### 3.8.2 TIPIFICACIÓN POR ISOENZIMAS Y PROTEÍNAS.

Las pruebas de grupo (aparte del ADN) nunca establecen la paternidad, pero si pueden excluirla. Usando la escala completa de grupos sanguíneos y otros factores, ahora es posible absolver cerca del 93% de varones acusados en forma equivocada. Gran parte del incremento de este poder discriminatorio se debe al uso de Gm Gc, habtoglobinas, y el sistema enzimático eritrocitario. (Cuadro 8) <sup>[12]</sup>.

<b>Cuadro 8. Porcentaje de exclusión por sistemas individuales.</b>	
<b>ANTÍGENOS DE ERITROCITOS</b>	<b>%</b>
MNSs	<b>32.1</b>
Rh	<b>28.0</b>
ABO	<b>17.6</b>
Duffy	<b>4.6</b>
Kidd	<b>4.5</b>
Kell	<b>3.3</b>
Luterano	<b>3.3</b>
<b>PROTEÍNAS SERICAS</b>	
Haptoglobina (Hp)	<b>17.5</b>
Gc	<b>14.5</b>
C3	<b>14.2</b>
Gm	<b>6.5</b>
<b>ENZIMAS DE ERITROCITOS</b>	
Fosfatasa ácida eritrocitaria (FAE)	<b>21.0</b>
Transaminasa glutamicopirúvica (TGP)	<b>19.0</b>
Glucoxalasa (Glu)	<b>18.4</b>
<u>Fosfoglucomutasa (FGM)</u>	<b>14.5</b>
Estearasa D (EsD)	<b>9.0</b>
Adenilatocinasa (AC)	<b>4.5</b>
Adenosin deaminasa	<b>4.5</b>
6-Fosfogluconatodeshidrogenasa (6-FGD)	<b>2.5</b>
Porcentaje total utilizando todos los sistemas	<b>93.0</b>



Introducido por primera vez en las aplicaciones forenses en la década de 1970, la tipificación por variantes de isoenzimas y proteínas llevó la potencia del agrupamiento ABO un paso más allá. La tipificación de proteínas y enzimas en la evidencia biológica ofrecía un mayor poder de discriminación, con algunos tipos presentes en menos del 1% de la población. Las pruebas de isoenzimas animaron a los científicos forenses a realizar más trabajo con menos cantidad de muestra, permitiendo que una muestra pudiera ser probada en busca de múltiples tipos de enzimas <sup>[12]</sup>.

Las enzimas son proteínas que tienen una importante función en la regulación de muchas reacciones químicas del organismo, en la serología forense son particularmente interesantes las enzimas polimórficas, es decir que tienen diferentes formas, estas enzimas pueden actuar por separado dentro de componentes de proteínas denominadas isoenzimas. Se presenta en seguida un cuadro ilustrativo sobre las enzimas de eritrocitos que son posibles de detectarse en sangre seca, sus tipos y su incidencia reportada por diversos autores especializados:

SISTEMA	TIPOS	%DE INCIDENCIA EN LA POBLACIÓN BLANCA DE E.U.A
FOSFOGLUCOMUTASA	1	59
	2 - 1	35
	2	6
ADENILATOCINASA	1	93
	2 - 1	7
	2	<1
FOSFATA ACIDA	A	12
	BA	42
	B	40
	CA	2
GLIOXILASA	CB	4
	1	18
	2 - 1	52
ESTERASA D	2	30
	1	79
	2 - 1	20
ADENOSIN DESAMINASA	2	1
	1	90
	2 - 1	10
6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA	2	<1
	A	96
	AC	4
	C	<1

**Cuadro 9: Enzimas de eritrocitos que se pueden detectar en sangre seca. [19]**

Una de las enzimas de mayor importancia en la hematología forense es la FGM (Fosfoglucomutasa) la cual puede ser separada por electroforesis. Lo interesante acerca de esta separación, es, la observación de que no todas las personas tienen las isoenzimas de FGM. Actualmente son tres las variantes más comunes de la FGM los tipos son: FGM 1, FGM 2-1 y FGM 2. Estas variaciones son distribuidas desigualmente en toda la población: la FGM 1 esta presente en aproximadamente el 58% de la población; la FGM 2-1 se encuentra presente en el 36% de la población; y la FGM 2 esta presente en el 6% <sup>[19]</sup>.

### **3.8.3 EXCLUSIÓN E INCLUSIÓN.**

Algunos términos en uso están definidos. Así "X" representa la probabilidad de que tanto el padre biológico como el alegado tengan fenotipos iguales, por consiguiente si a X se le asignará el valor el mismo podría estar entre 0 y 100%; por su parte "Y" relaciona los fenotipos posibles en una población y también tiene valores entre 0 y 100%; a su vez "V" es la probabilidad de paternidad y el valor máximo o certeza es de 100%; debe tenerse presente las posibilidades en juego como errores, la exclusión del padre biológico y la inclusión del padre falsamente alegado <sup>[18]</sup>.

Exclusión es la conclusión pericial cuando rechaza vínculos parentales o filiales, las escalas que se acuerdan para los métodos biológicos tienen como cifras y denominaciones las siguientes:

Mayor de 99,74%	=	"Paternidad prácticamente probada"
99,01 a 99,73	=	"Paternidad altamente probable"
95,01 a 99%	=	"Paternidad muy probable"
90,01 a 95%	=	"Paternidad probable"
80,01 a 90%	=	"Indicación positiva de paternidad"
50,01 a 80%	=	"zona de indiferencia"
10,01 a 50%	=	"Paternidad dudosa"

5,01 a 10%	=	“Paternidad improbable”
1,01 a 5%	=	“Paternidad muy improbable”
0,27 a 1%	=	“Paternidad altamente improbable”
Menos de 0,27%	=	“Paternidad prácticamente excluida” <sup>[22]</sup>

Como se observa se utiliza el término “probable” en distintas variables que entendemos le quitan valor, debe llevarse al juez el real porcentaje de exclusión o de inclusión del método, dejando para el juez la terminología que tendrá que tener el resto de la prueba. Cuando aún el método le es imposible negar el vínculo se habla de “no exclusión”, concepto al que le damos su total valor, ya que da certeza en la exclusión y gran probabilidad en la inclusión<sup>[18]</sup>.

### 3.8.4 PRUEBAS DE LABORATORIO PARA DETERMINAR LA PATERNIDAD.

**3.8.4.1 Examen del ADN.** La exclusión de la paternidad es una prueba que encaja perfectamente en las aplicaciones del análisis del ADN ya que en algunas de sus metodologías encontramos los mismos fundamentos de los grupos sanguíneos, es decir que los dos códigos genéticos tipificados en un niño, forzosamente uno de ellos estará en el padre y otro en la madre<sup>[19]</sup>.

**3.8.4.2 Prueba de grupo sanguíneo.** El uso más importante de los grupos sanguíneos es la prueba de paternidad, usada extensivamente en algunos países para apoyar o negar las demandas de mujeres en relación a que sus hijos son de un hombre en particular, casi siempre solicitan ayuda financiera de un grupo puntativo; la Corte extiende una orden para practicar pruebas de sangre a la madre, al niño y al padre supuesto, ya se apara liberar al varón de la paternidad o reforzar el caso contra él. Además de las pruebas de ADN, el grupo sanguíneo permite excluir a un hombre, pero nunca confirmar en forma absoluta que es el padre, a menos que se presente la rara casualidad de que dentro de un gran número de varones que “tuvieron acceso” a la mujer en etapa de ovulación, sea su grupo sanguíneo el que más corresponda<sup>[21]</sup>.

### 3.9 ENFERMEDADES VENÉREAS.

Las investigaciones médicas y de laboratorio para la detección de enfermedades venéreas son a menudo solicitadas ya que frecuentemente se encuentran relacionadas con la comisión de algunos delitos como violación, abuso de menores y transmisión de enfermedades por motivos de lesiones; antiguamente la sífilis era una enfermedad muy difundida, su detección se basa en una reacción de un antígeno con el anticuerpo que produce la enfermedad llamada "reagina", la prueba denominada RPR, es una prueba diseñada para detectar reagina en el suero de manera rápida, no requiere inactivación por calor. La muestra se mezcla con una suspensión que posee cardiolipina, lecitina y colesterol en partículas de carbón. Si la muestra es positiva se observa pequeños grumos negros (floculación). El resultado se reporta como reactivo o no reactivo; todos aquellos reactivos deben ser diluidos seriadamente para realizar la titulación, y se reporta la dilución más alta que exhibe reacción. Se han desarrollado variantes de esta prueba en las que la muestra puede ser plasma sin que se pierda su sensibilidad y especificidad. Otras pruebas para el diagnóstico de la sífilis se comentan en el anexo <sup>[12]</sup>.

HIV: El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es causada cuando menos por dos virus llamados colectivamente HIV, es transmitida por contacto sexual, exposición a la sangre o derivados o por la madre infectada al feto, su demostración de laboratorio se lleva a cabo mediante la dilución de la sangre o suero para provocar luego una reacción antígeno-anticuerpo por medio de una inmunoglobulina antihumana extraída de la cabra y por PCR <sup>[12]</sup>.

### 3.10 ESTUDIOS ESPECIALES.

Esta sección especial se refiere a la investigación de todo tipo de contaminantes en las manchas sanguíneas, ácidos, bases, metales, tierra, grasa, fármacos y cualquier otra sustancia que tenga que ser investigada. En el anexo se presenta un ejemplo para la búsqueda de algún tóxico <sup>[12]</sup>.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el estudio de manchas de sangre en la práctica forense, los datos con los que contribuye, son utilizados como un sistema de identificación confiable; ayuda entre otras cosas a determinar los grupos y subgrupos sanguíneos; asimismo el estudio de manchas sanguíneas debe de ser llevado a cabo con gran responsabilidad, por lo tanto, debe ser realizado por personal altamente calificado y equipo moderno, con conocimientos del procedimiento de toma o recolección, embalaje, transportación, entrega y recepción de este tipo de indicios para evitar que un mal método invalide posteriores resultados, también el personal encargado debe conocer las métodos más comúnmente empleados y las precauciones adoptadas a la recolección.

La hematología forense de tipo identificadora se apoya de distintos tipos de técnicas: químicas, microscópicas e inmunológicas, además de una disciplina moderna que es la genética; con la finalidad de obtener resultados en algunos de sus valores de investigación, siendo estos: la certeza, individualización, género, origen, antigüedad, sexo, etc.

Entre las técnicas de tipo químico figuran las reacciones para conocer un punto importante y tal vez el primero de valor investigativo en la hematología forense; que es el de la certeza, debido a que se pueden encontrar cualquier tipo de manchas y no necesariamente pueden ser de sangre, pero una vez identificada, se proceden a realizar los exámenes pertinentes a la investigación. Entre las técnicas químicas figuran: la reacción de bencidina, reacción de fenolftaleína, prueba de la catalasa, cristales de Teichman, etc., como se describió con anterioridad tales técnicas deben de ir incorporándose primero como orientación y por último como certeza.

El siguiente valor de investigación es el género, una vez obtenida la certeza de que esa muestra es de sangre, se debe conocer si esa muestra es humana o animal, para poder conocer este punto, se utilizan técnicas inmunológicas como son: la técnica de las

precipitinas, reacción sueroprecipitante de Uhlenhut y la reacción anafiláctica, así como la técnica aunque no inmunológica si importante como es la microscópica.

El siguiente de los valores de investigación y de igual forma significativo por los datos aportados, es el de la individualización, para su estudio se apoya de técnicas inmunológicas como son: la determinación de antígenos leucocitarios (HLA) y la identificación del grupo sanguíneo así como de técnicas genéticas como PCR, prueba de Southern blot y secuenciación de ADN mitocondrial, siendo estas muy confiables y modernas, que utilizan principalmente el código genético humano para: confirmar la paternidad de un sujeto, identificar cadáveres e identificar delincuentes que cometen otros tipos de delitos como son los de tipo sexual, cabe aclarar que por lo tanto la genética no se limita a muestras de sangre sino de otros fluidos y que en estos métodos de identificación, debe existir material de confronta, ya que de lo contrario no tiene ninguna utilidad. Sin embargo el inconveniente de estas pruebas es su alto costo y el tiempo de estudio, que suele ser prolongado antes de obtener resultados definitivos.

Las bases de las pruebas modernas de ADN se originaron en la aplicación de métodos de tipificación convencional de marcadores genéticos, ahora estas técnicas son aplicadas con base a una tecnología más avanzada, como es el caso de la prueba de PCR, la cual permite una adecuada individualización dado que dicho procedimiento multiplica el ADN hasta lograr cantidades suficientes. Además, gracias a la alta especificidad del ADN, se puede establecer que el ADN es particular en cada individuo, por lo que ha sido llamado la **huella genética**, ya que la probabilidad de que dos personas sin parentesco tengan la misma secuencia es de una en un billón, con esta técnica se deja de depender de los sistemas clásicos de grupos sanguíneos ABO, pues el PCR resulta más contundente, aunque la combinación de ambos sistemas, además de las pruebas de HLA nos dan un porcentaje de probabilidad en la identificación del 100%, incluida la comprobación de una paternidad; por lo que respecta al uso de marcadores de ADN mitocondrial para fines forenses ha tenido uso recientemente pero la principal importancia radica en su aplicación sobre materiales con alto daño, el inconveniente de este método es que es muy susceptible de contaminación y al igual que la PCR se necesita material de confronta.

Para conocer el origen de una muestra encontrada se debe recurrir a la microscopía, siendo este método uno de los principales apoyos.

Otro de los puntos de investigación, es el sexo al que pertenece la muestra, para esto nos ayudamos de técnicas inmunológicas y microscópicas como: radioinmunoensayos y la prueba de la cromatina sexual respectivamente, así mismo la observación microscópica de cromosomas posee la misma utilidad, el principal inconveniente de estos métodos, es que se necesitan muestras que se encuentren en ciertas condiciones de humedad ya que en estado de sequedad no es posible realizar.

Las técnicas aquí mencionadas son de gran relevancia en el área de hematología forense, para aportar elementos lo suficientemente científicos en la investigación, pero hay que comprender, que estas técnicas deben ser direccionadas y adecuadas conforme a la muestra obtenida y al estudio criminalístico y según los criterios para que un test forense sea admitido como prueba, a de cumplir una serie de condiciones: 1) la teoría científica en cuestión tiene que ser considerada válida; 2) debe reconocerse la fiabilidad de la técnica y 3) debe demostrarse que se aplicó adecuadamente en el caso concreto.

## CONCLUSIONES

La sangre es un fluido biológico de gran interés en las tareas forenses, su importancia legal surge porque aparece en muertes violentas, robos con agresión y otras situaciones, su hallazgo en tales situaciones permite dar una idea de los hechos ocurridos cuando no hay testigos que es lo más común en esta clase de actos.

El estudio de manchas sanguíneas debe de ser llevado a cabo con gran responsabilidad, por personal altamente calificado, con conocimientos del procedimiento de toma o recolección, embalaje, transportación, entrega y recepción de este tipo de indicios para evitar que un mal procedimiento invalide posteriores resultados, también el personal encargado debe conocer las métodos más comúnmente empleados.

El personal calificado realiza un análisis morfológico basándose en numerosas características del indicio hallado, que van desde el tamaño de la mancha, forma, soporte en donde se localiza, entre otras.

En esta investigación se llevo a cabo una recopilación de los métodos inmunológicos y genéticos que son utilizados en el laboratorio para analizar muestras forenses y otras más que tienen un valor legal:

- Técnicas para identificación de género como las precipitinas, reacción sueroprecipitante de Uhlenhut y la reacción anafiláctica.
- Las empleadas para determinar la individualidad de la sangre: determinación de antígenos leucocitarios (HLA), prueba de grupo sanguíneo, análisis de isoenzimas, técnica de PCR, análisis de Southern blot y ADN mitocondrial.



Finalmente, a pesar de los avances significativos en dichas técnicas y que han proporcionado resultados favorables para coadyuvar con la criminalística de forma importante a esclarecer varios delitos y que sin estas no podrían ser aclarados, queda mucho por avanzar y sabiendo que el crimen se ha convertido en un grave problema, a su combate, se tienen que aportar pruebas científicas que provean los elementos necesarios para la impartición de justicia y así como se han desarrollado estos procedimientos, más adelante llegaran otros o se perfeccionaran los mismos para el uso adecuado en la práctica forense y con esto obtener el resultado final y satisfactorio de una investigación el cual es “conocer la verdad”.

## REFERENCIAS.

1. Gutiérrez Á. Manual de ciencias forenses y criminalística. México: Trillas; 1994: 28-58
2. Diccionario Terminológico de ciencias médicas. 11ª edición. México: Salvat; 1979.
3. Gutiérrez Á. Diccionario terminológico de ciencias forenses. México: Trillas; 1998.
4. Tello F. Medicina Forense. México: Harla; 1991: 200-202.
5. Trujillo G. Medicina Forense. México: El manual moderno; 2002: 235-240.
6. García D. Manchas de sangre. 2008; [en línea]. Disponible en: <[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S113576062003000400003&ln\\_g=es&nrm=iso](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113576062003000400003&ln_g=es&nrm=iso)> Consultado Mayo 14, 2009
7. Hematología forense. 2006; [3 pantallas]. Disponible en: <http://forenses.mforos.com/996527/6429821-HEMATOLOGÍA-forense/#53187718>. Consultado Mayo 14, 2009]
8. Knight B. Medicina Forense de Simpson. 10ª edición. México: El manual moderno; 1999: 61-70
9. García D. Diplomado en investigación en esencia del crimen: Manchas de sangre. 2008 [14 páginas]. Disponible en: [http://www.teleley.com/articulos/art\\_garcía.pdf](http://www.teleley.com/articulos/art_garcía.pdf). Consultado Agosto 3, 2009
10. Vargas F. Medicina Legal. México: Trillas; 2008: 53-56
11. Martínez S, Saldivar L Medicina Legal. 16ª edición. México: Méndez editores. 2000: 241-247.

12. Rivas M. Medicina Forense. México: Cuellar; 1999: 311-325.
13. Rojas N. Medicina Legal. 12ª edición. Argentina : El ateneo. 1992: 238-243.
14. Franco M. Hematología forense. México: Porrúa; 2002.
15. Alva M. Compendio de medicina forense. 3ª edición. México: Méndez Editores; 2005. 157-166.
16. Rojas E. Inmunología de memoria. México: Panamericana; 2001: 275-87.
17. Passarge E. Genética (Texto y atlas). México: Panamericana; 2001: 38-67.
18. Achaval A. Manual de medicina legal (práctica forense). Argentina: Abeledo Penot; 1963: 601-16.
19. Saferstein R. Criminalistics An Introduction to forensic science. USA: Prentice Hall; 1998: 361-89, 402-431.
20. Thomas V. El Cadáver (De la biología a la Antropología). México: Fondo de cultura Económica; 1998: 7-26.
21. McKusick A. Medelian Inheritance in Man: Catalogue of Autosomal Dominant Autosomal Recessive, and X-Linked Phenotypes. USA: Prentice Hall; 1998: 178-194.
22. Zunmalt, E. Application of Molecular Biology to Forensic Pathology; Human Pathology. USA: McGraw Hill; 1999: 303-307.
23. Martínez B. La prueba del ADN en medicina forense: la genética al servicio de la ley en el análisis de indicios criminales y en la investigación biológica de la paternidad: España: Masson; 1999: 347-398
24. Basla A, Waisman D. Medicina Legal, Argentina: El ateneo; 1991: 135-138
25. Principios de ADN forense para funcionarios del tribunal [16 páginas]. Disponible en: <http://projects.nfstc.org/otc/espa%CC%81ol/module/html>. Consultado Agosto 27, 2009
26. Replicaci3n de DNA [en l%CC%81nea]. 2010; [18 pantallas]. Disponible en: [http://es.wikipeida.org/wiki/Replica%CC%83n\\_de\\_ADN](http://es.wikipeida.org/wiki/Replica%CC%83n_de_ADN). [consultado agosto 27, 2009]

27. Métodos diagnósticos en Medicina [en línea]. [4 pantallas]. Disponible en:  
[http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec\\_68.asp?cuaderno=68](http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_68.asp?cuaderno=68)  
Consultado Agosto 27; 2009
28. Martínez S. Medicina legal. México: Librería de medicina; 1950: 59-64
29. Teke A. Medicina Legal. 2ª edición. Chile: El Mediterráneo; 2001:398-401
30. Fisher B. Techniques of Crime Scene Investigation. 5ª edición. Nueva York: Elsevier; 1992: 147-63
31. Rajamnar K. Determination of the age of bloodstains using immunoelectrophoresis. USA: J. Forensic Sci; 1971.
32. Huang C., Lui P., Cheng J., Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. Semin Hematology
33. Castellanos I. La sangre en policiología. La Habana: 1940.
34. Brown T. Genomes. Oxford: Bios Scientific; 1999: 98-102
35. Rosental N. Fine structure of agene DNA sequencing. New England: J Med.; 1995: 66-92.
36. Housman D. Human DNA polimorphism. New England: J Med; 1995: 82-96.
37. Bonnet E. Medicina legal. Buenos Aires: Libreros; 1980: 116-121.
38. Código Penal para el Distrito Federal. México: Porrúa. 1995.
39. Zonderman J. Laboratorio de criminalística. México: Limusa. 1993: 72-84.
40. Moreno A. Manual de introducción a la criminalística. 6ª edición. México: Porrúa; 1990: 27-32
41. Quiroz A. Medicina forense. 5ª edición. México: Porrúa; 1986:133-147
42. Butler JM. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. USA: J Forensic Sci. 2006; 51 (2): 253-265.

43. Cox M. study of the sensivity and specificity of four presumptive test for blood. J Forensic Sci 1991;36: 1503-1511
44. Castello A, Alvarez M, Miguel M, Verdú F. Revelado de manchas latentes: efectividad de luminol y evaluación de su efecto sobre el estudio del DNA. Cuadernos de Medicina Forense 2002; N°28 abril: 33-36
45. James SH, Eckert WG. Interpretation of bloodsatins evidence at crime scenes. 2° ed. New York: CRC Press; 1999
46. Corrales H. Reacciones serológicas para la sífilis. [Seriada en línea] 1992;30(1): [4 páginas]. Disponible en:
47. Buttler J., Levin B. Forensic application of mitochondrial. USA: Tibtech: 1998; 158-162.
48. Corpúsculo de Barr. [En línea]. (1 pantalla). Disponible en: [http:// www2.yah.es /genética\\_juangonzalez/GeneticaHumana/Temario/Tema4/Imágenes-4/Corpusculo%20de% Barr.jpg](http://www2.yah.es/genética_juangonzalez/GeneticaHumana/Temario/Tema4/Imágenes-4/Corpusculo%20de%20Barr.jpg)
49. Cromosomas [En línea]. 2007. [1 pantalla]. Disponible en: [http://blog.educastur.es/biologiageologiafiles/2008102/cromosomas\\_humanos.jpg](http://blog.educastur.es/biologiageologiafiles/2008102/cromosomas_humanos.jpg). (Consultado: Febrero 17, 2010).
50. Pachon Pavón FJ. Nuevas técnicas en inmunohematología forense [Trabajo para obtener el grado de doctor]. 1988. Universidad complutense de Madrid, Departamento de toxicología y legislación sanitaria.
51. Hortola Gómez P. Morfología de eritrocitos de mamífero en manchas de sangre: estudios sobre materiales líticos de interés tecnoprehistórico [trabajo para obtener el grado de doctor]. 2008. Universitat Rovira I Virgili.
52. Munker R., Hiller E., Glass J. Modern Hematology, 2° ed. New Jersey: Humana Press; 2007: 2 - 40
53. Salamanca F. Citogenética humana (Fundamentos y aplicaciones). México: Médica Panamericana; 1993: 107-115, 343-351.

54. Buquet A. Manual de criminalística moderna: la ciencia y la investigación de la prueba. Argentina: siglo XXI; 2006.

## ANEXOS

### ANEXO 1. ELECTROFORESIS.

La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa <sup>[16]</sup>.

Fue empleado por primera vez por en el año 1937, pero su importancia vino a incrementarse cuando en los años cincuenta E. L. Durrum y Arne W.K. Tiselius, impulsaron la electroforesis de zona, nombre que se asignó a la separación de materiales en un campo eléctrico en presencia de algún tipo de soporte; aunque este término se limitó originalmente al análisis de coloides y partículas submicroscópicas, se ha convertido en estos últimos años en una metodología aplicada a sustancias de bajo peso molecular <sup>[16]</sup>.

*Fundamento.-* Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo) <sup>[16]</sup>.

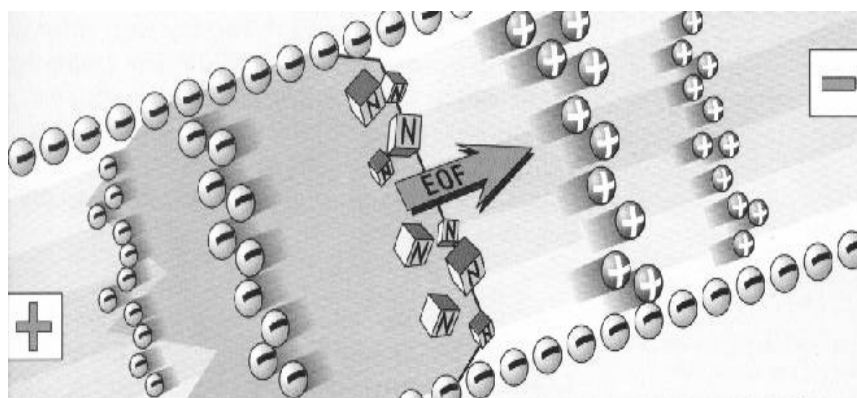


Figura 9. Frente formado por movimiento de los iones. <sup>[2]</sup>

El movimiento de las moléculas está gobernado también por dos fuerzas adicionales; inicialmente la fricción con el solvente dificultará este movimiento originando una fuerza que se opone, por otro lado las moléculas tienen que moverse en forma aleatoria o movimiento browniano debido a que poseen energía cinética propia denominado difusión. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión [16].

La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas son colocadas en un cierto lugar de solución, los iones comenzarán a moverse formando un frente cuya anchura aumentará con el tiempo. Para reducir la anchura de este frente podemos reducir el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga más resistencia a dicho movimiento. Una forma común de hacer esto es formar un gel. El gel consiste de un polímero soluble de muy alto peso molecular que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz que dificulta el movimiento de los solutos, consecuentemente, la migración electroforética de las moléculas será más lenta, pero el ensanchamiento del frente se verá reducido también (Figura 6) [16].



Figura 10. Migración de las moléculas con electroforesis, ensanchamiento del frente formado por los iones [2].

**Métodos electroforéticos zonales.-** Son los más comunes, dada su alta aplicabilidad en diferentes campos. Son útiles para lograr la separación de mezclas complejas. Se aplican pequeñas cantidades de la disolución de proteínas a un soporte sólido, que se impregna con una solución tampón. Los soportes son en general polímeros y forman un gel poroso que restringe el movimiento de las moléculas a través del medio durante electroforesis y disminuyen los flujos de convección [16].



Como soporte han sido utilizados papel (celulosa), almidón, poliacrilamida, agarosa y acetato de celulosa, entre otros. Este método tiene gran poder resolutivo por que se aplica una cantidad pequeña de proteína a una zona estrecha, mientras que la longitud del trayecto es mucho mayor que la zona de aplicación. El equipamiento requerido es simple, fuente de poder, cubeta vertical u horizontal donde se colocan el soporte y dos electrodos. Los más utilizados son:

**Electroforesis en gel de poliacrilamida.-** Los geles de poliacrilamida se forman por polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible, forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante un tiempo prolongado, además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada en el tamaño del poro, lamentablemente cada vez se emplea menos en diagnostico debido a su neurotoxicidad. (Figura 11) <sup>[16]</sup>.

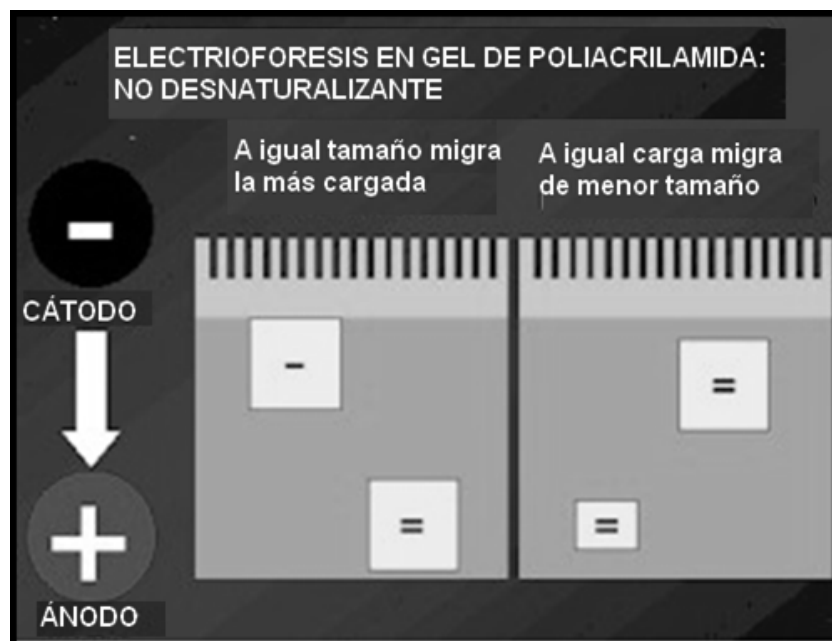


Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida <sup>[16]</sup>

**Electroforesis en geles de gradientes.-** El uso de geles de poliacrilamida que tienen un gradiente creciente de concentración de acrilamida + bisacrilamida, y en consecuencia un gradiente decreciente en el tamaño del poro, pueden tener ventajas sobre los geles de

concentraciones uniformes de acrilamida. En un gel en gradiente la proteína migra hasta alcanzar una zona donde el tamaño de poro impida cualquier avance. Una vez se alcanza el límite del poro no se produce una migración apreciable aunque no se detiene completamente. Una de las ventajas de este tipo de geles es que resuelve mejor las bandas pues las concentra en regiones más estrechas, además de incrementar el rango de pesos moleculares que se pueden resolver en un mismo gel comparado con los de una concentración fija. (Figura 12) <sup>[16]</sup>.

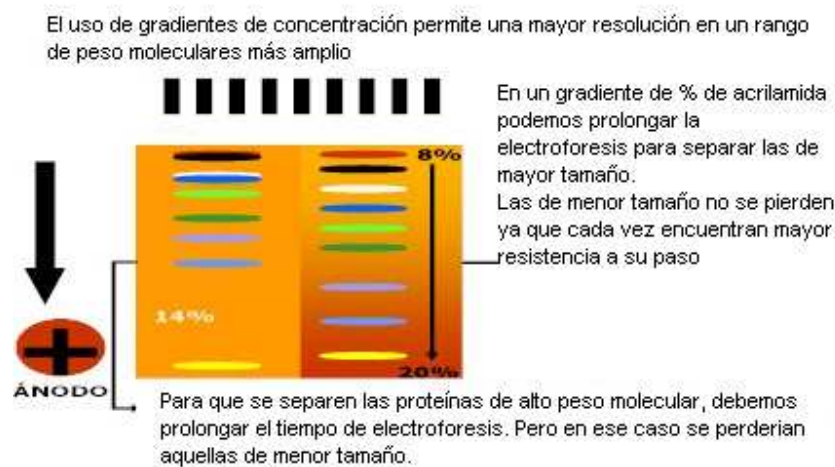


Figura 12. Gel de poliacrilamida que tiene gradiente creciente de concentración <sup>[16]</sup>.

**Electroforesis en geles de agarosa.-** La agarosa es un polisacárido (originalmente obtenido de algas, como el agar-agar, pero de composición homogénea), cuyas disoluciones (típicamente de 0.5 a 2 %) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50 °C y formar un gel, semisólido al enfriarse, este gel está constituido por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas embebida en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas, se usa usualmente para separar moléculas grandes de alrededor 20 000 nucleótidos. La electroforesis en gel es muy utilizada en la detección, control de pureza, caracterización, cuantificación (por comparación con controles) así como preparación y purificación (por extracción de bandas desde el gel) de moléculas y fragmentos de DNA y RNA <sup>[16]</sup>.

**Electroforesis capilar.-** La electroforesis capilar se basa en los mismos principios de las técnicas electroforéticas convencionales, pero utiliza condiciones y tecnología distinta que nos permiten obtener una serie de ventajas al respecto, esta separación de péptidos realizada sobre un capilar de silica fundida a potenciales elevados 20 a 30 Kv en un campo de 400 a 500 v/cm refrigerados por aire. La corriente electroosmótica (FEO) generada por los grupos silanol de la superficie interna del capilar da como resultado una corriente plana del frente del líquido que contrasta con el frente parabólico de la cromatografía líquida de alta resolución <sup>[16]</sup>.

La ventaja de esta técnica es que el capilar de silica fundida que generalmente se cubre con una capa de polimina para darle mayor rigidez y resistencia, tiene una ventaja a través de ella que permite el pasaje de la luz UV de tal manera que la visualización es on-line. Con esta técnica descrita es posible separar cationes, aniones, proteínas, macromoléculas y sustancias no cargadas en forma simultánea, su utilización se encuentra en la separación de proteínas y péptidos. <sup>[16]</sup>.

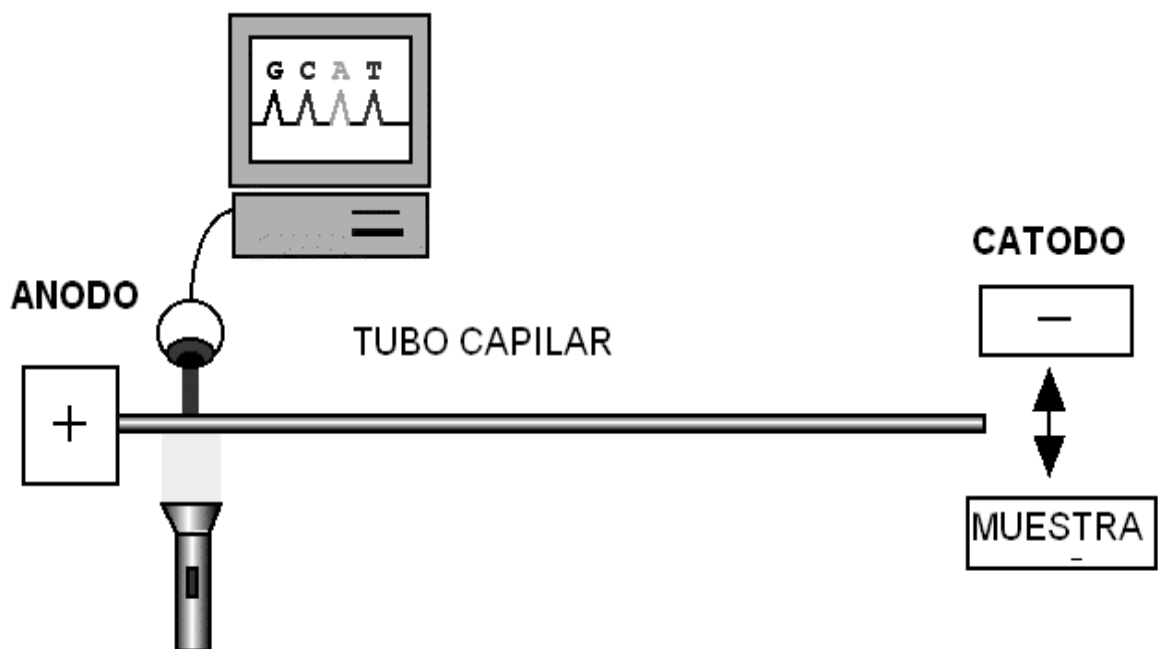


Figura 13: Esquema del sistema de electroforesis capilar. Las muestras entran en el tubo a la derecha y hacia la izquierda el sistema de detección que registra la salida de cromatograma en una computadora.

**Isoelectroenfoque.-** Esta técnica, habitualmente denominada electroenfoque se basa en el desplazamiento de las moléculas en un gradiente de pH. Las moléculas anfotéricas, como los aminoácidos, se separan en un medio en el que existe una diferencia de potencial y un gradiente de pH. La región del ánodo es ácida y la del cátodo es alcalina. Entre ambos se establece un gradiente de pH tal que las moléculas que se han de separar tenga su punto isoeléctrico dentro del rango. Las sustancias que inicialmente se encuentran en regiones de pH inferior a su punto isoeléctrico estarán cargadas positivamente y migraran hacia el cátodo, mientras aquellas que se encuentran en medios con pH más bajos que su punto isoeléctrico tendrán carga negativa y migraran hacia el ánodo. La migración les conducirá a una región dónde el pH coincidirá con su punto isoeléctrico, tendrán una carga neta nula y se detendrán, de esta forma las moléculas anfotéricas se sitúan en estrechas bandas donde coincide su punto isoeléctrico con el pH <sup>[16]</sup>.

La diferencia de los puntos isoeléctricos de las proteínas se aprovecha para separarlas por este método, el isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida es una técnica separativa, con un elevado poder de separación, puede separar sustancias con una diferencia en pH de 0.1.

## ANEXO 2. ADN

Para comprender más acerca de las pruebas como la PCR se debe de conocer la molécula de ADN.

Primero la doble hélice es el rasgo estructural característico del ADN. Las dos cadenas de polinucleótidos están enrolladas, una alrededor de la otra, a lo largo de un eje común. Los pares de bases nitrogenadas, ya sean A-T o G-C, se encuentran dentro de ella, debido a la relación espacial fija de las bases nitrogenadas dentro de la doble hélice y enfrentada entre sí, las dos cadenas de la doble hélice son exactamente complementarias. El ADN es un largo polímero formado por unidades repetitivas, los nucleótidos. Una doble cadena de ADN mide de 22 a 26 angstroms (2,2 a 2,6 nanómetros) de ancho, y una unidad (un nucleótido) mide 3,3 Å (0,33 nm) de largo. Aunque cada unidad individual que se repite es muy pequeña, los polímeros de ADN pueden ser moléculas enormes que contienen millones de nucleótidos; por ejemplo, el cromosoma humano más largo, el cromosoma número 1, tiene aproximadamente 220 millones de pares de bases. <sup>[17]</sup>.

En los organismos vivos, el ADN no suele existir como una molécula individual, sino como una pareja de moléculas estrechamente asociadas, las dos cadenas de ADN se enroscan sobre sí mismas formando una especie de escalera de caracol, denominada doble hélice, el modelo de estructura en doble hélice fue propuesto en 1953 por James Watson y Francis Crick (el artículo *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid* fue publicado el 25 de abril de 1953 en *Nature*), el éxito de éste modelo radicaba en su consistencia con las propiedades físicas y químicas del ADN <sup>[17]</sup>.

El estudio mostraba además que la complementariedad de bases podía ser relevante en su replicación, y también la importancia de la secuencia de bases como portador de información genética, cada unidad que se repite, el nucleótido, contiene un segmento de la estructura de soporte (azúcar + fosfato), que mantiene la cadena unida, y una base, que interacciona con la otra cadena de ADN en la hélice (Figura 14). En general, una base ligada a un azúcar se denomina nucleósido y una base ligada a un azúcar y a uno o más grupos fosfatos recibe el nombre de nucleótido cuando muchos nucleótidos se encuentran unidos, como ocurre en el ADN, el polímero resultante se denomina polinucleótido <sup>[23]</sup>.

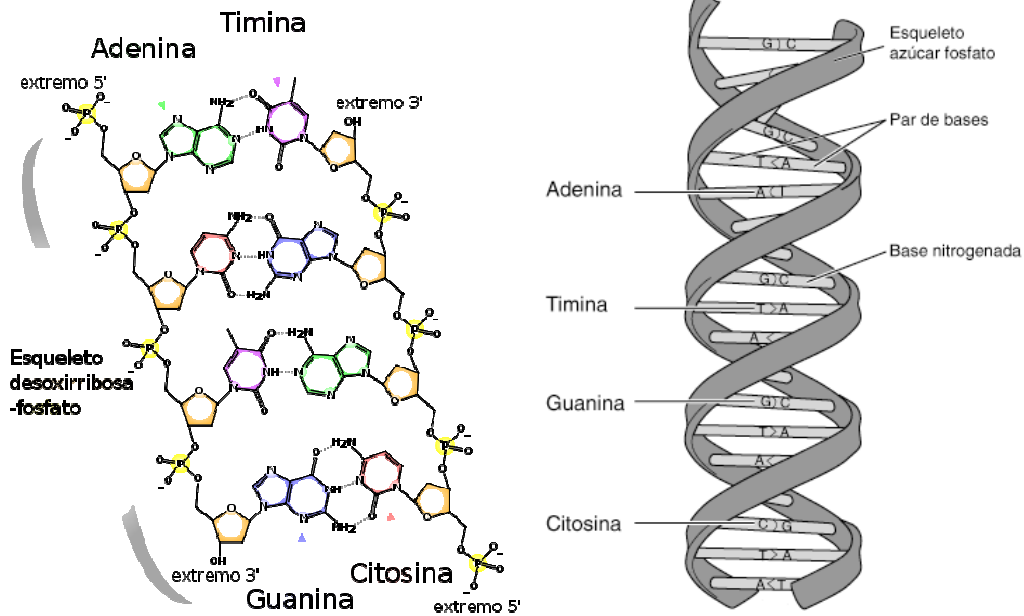


Figura 14. Estructura química del ADN: dos cadenas de nucleótidos conectadas mediante puentes de hidrógeno, que aparecen como líneas punteadas [29].

**Replicación.-** Debido a que las cadenas nucleotídicas enfrentadas entre sí por dentro de la doble hélice son estrictamente complementarias, cada una puede servir como un patrón (molde) para la formación (replicación) de una nueva cadena cuando la hélice se abre. La replicación del ADN es “semiconservativa”, o sea que se formara una cadena complementaria nueva mientras que la otra se conservará <sup>[17]</sup>.

**Replicación del ADN.-** La síntesis del ADN involucra la acción altamente coordinada de muchas proteínas. Se requiere precisión y velocidad. Las proteínas enzimáticas principales son las polimerasas, las cuales llevan a cabo la síntesis dirigida a partir de un molde; las helicasas, que separan las dos cadenas para generar la horquilla de replicación; las primasas, que inician la síntesis de la cadena en sitios preferenciales; las proteínas de iniciación, que reconocen el punto de origen de la replicación, y las proteínas que remodelan la doble hélice. El complejo completo se denomina “replisoma”. Durante la replicación cada cadena de ADN sirve como molde para la formación de una nueva (replicación semiconservativa) <sup>[17]</sup>.

La síntesis del ADN tiene lugar en la fase S, la cual llevaría mucho tiempo si hubiera un solo punto de iniciación. Sin embargo, la replicación en el ADN eucarionte comienza en varios sitios (replicones) <sup>[17]</sup>.

**Desnaturalización y renaturalización.** Los puentes de hidrógeno (enlaces no covalentes) entre los pares de bases nitrogenadas son débiles, sin embargo, el ADN, es estable a las temperaturas fisiológicas debido a que es una molécula muy larga. Las dos cadenas complementarias se pueden separar (desnaturalización) por acción de reactivos relativamente suaves (por ejemplo: álcalis, formamida o urea) o por un calentamiento cuidadoso.

Las moléculas de cadenas simples resultantes son relativamente estables. Cuando se las enfría, las cadenas simples complementarias pueden reunirse para formar moléculas de cadena doble (renaturalización). Las cadenas simples no complementarias no se unen, éstas son las bases de un método importante para identificar ácidos nucleicos: con una cadena simple de un origen definido es posible determinar con qué otra cadena simple se unirá (hibridará). La hibridación de segmentos complementarios de ADN es un principio importante en el análisis de los genes <sup>[17]</sup>.

**Transmisión de la información genética.-** La información genética se encuentra en la secuencia de los pares de bases nitrogenadas (A-T o G-C). Una secuencia de tres pares de bases representa una palabra codificadora (codón) para un aminoácido; una secuencia de codones determina una secuencia correspondiente de aminoácidos, estos forman un polipéptido (producto génico). La secuencia de bases nitrogenadas primero es transferida (transcripción) desde una cadena de ADN hacia una molécula que transporta la información (mRNA, RNA mensajero). Luego la secuencia de las bases nitrogenadas del mRNA sirve como molde para una secuencia de aminoácidos que se corresponde con el orden de los codones (traducción) <sup>[17]</sup>.

**Esquema de replicación.-** El ADN nuevo se sintetiza en la dirección 5' a 3' y no en la dirección 3' a 5'. Un nucleótido nuevo no puede unirse al extremo 5'-OH de la nueva cadena nucleotídica. Solo se pueden enlazar nuevos nucleótidos de manera continua en el extremo 3'. El ADN nuevo en el extremo 5' se replica en pequeños segmentos <sup>[17]</sup>.

**Horquilla de replicación.-** En la horquilla de replicación cada una de las dos cadenas de ADN sirve como molde para la síntesis de nuevo ADN. Primero, la doble hélice en la

región de la horquilla de replicación es desenrollada por un sistema enzimático (topoisomerasas).

Debido a que las cadenas parenterales son antiparalelas, la replicación del ADN puede ser continúa sólo en una de las cadenas del ADN (dirección 5' a 3') cadena líder. A lo largo de la cadena 3' a 5' (cadena atrasada), el nuevo ADN es sintetizado en segmentos pequeños (fragmentos de Okasaki), en esta cadena se requiere una pieza corta de RNA como cebador (primer) para comenzar la replicación, éste es formado por la RNA polimerasa (primasa), el cebador de RNA luego es removido; el ADN es insertado en el espacio remanente por la polimerasa I y, finalmente, los fragmentos de ADN son ligados por la ADN ligasa. La enzima responsable de la síntesis del ADN (ADN polimerasa III) es compleja y está formada por varias subunidades (Figura 15).

En eucariontes existen diferentes enzimas para la cadena líder y la cadena atrasada, durante la replicación los errores son eliminados por un mecanismo complejo de prueba de lectura (proof-reading), que elimina cada una de las bases incorporadas en forma incorrecta y las reemplaza por las correctas <sup>[17]</sup>.

El flujo de la información genética es unidireccional y está constituido por dos pasos principales: transcripción y traducción, en primer lugar, la información de la secuencia codificante de un gen es transcrita a una molécula intermediaria de RNA, cuya secuencia es sintetizada de forma estrictamente complementaria a la cadena codificante del ADN (transcripción). Durante el segundo paso principal la secuencia de la información en la molécula de RNA mensajero (mRNA) es traducida a una secuencia de aminoácidos correspondiente (traducción), el largo y la secuencia de la cadena de aminoácidos especificada por un gen da como resultado un polipéptido con una función biológica (producto génico) <sup>[17]</sup>.



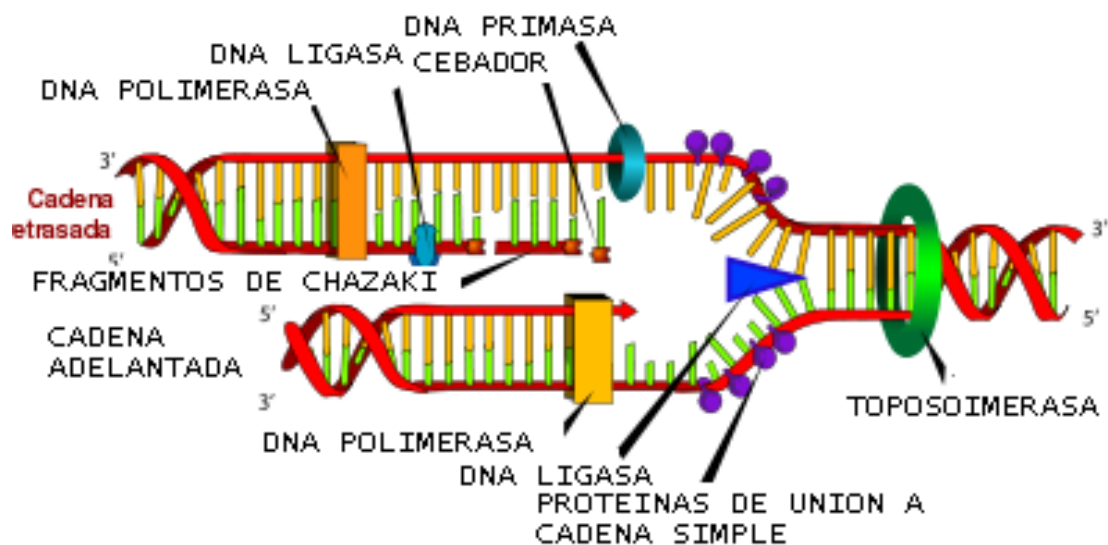


Figura 15. Esquema de replicación del ADN. [28]

**Transcripción.-** En primer lugar la secuencia de nucleótidos de una cadena es transcrita por una molécula complementaria de RNA (RNA mensajero, mRNA). La hélice de ADN es abierta por un juego completo de proteínas. La cadena de ADN en dirección 3' a 5' (cadena codificante), sirve como molde para la transcripción del RNA, el cual se sintetiza en dirección 5' a 3'. Esta es denominada cadena de "RNA sentido", el RNA transcrito en condiciones experimentales a partir de la cadena de ADN opuesta se denomina RNA antisentido <sup>[17]</sup>.

**Traducción.-** Durante la traducción la secuencia de codones constituida por bases nitrogenadas en el mRNA se convierte en una secuencia correspondiente de aminoácidos, la traducción se lleva a cabo en un marco de lectura que es definida al comienzo de la traducción (codón de iniciación). Los aminoácidos son enlazados, en la secuencia determinada por las bases nitrogenadas del mRNA, mediante otra clase de RNA de transferencia (tRNA). Cada aminoácido posee su propio tRNA, el cual posee una región complementaria a su codón del mRNA (anticodón). Los codones 1, 2, 3 y 4 del mRNA son traducidos al aminoácido metionina (Met), glicina (Gly), serina (Ser) e isoleucina (Ile), etc., el codón 1 siempre es AUG (codón de iniciación) <sup>[17]</sup>.

**Estadios de la traducción.-** La traducción (síntesis proteica) en eucariontes se lleva a cabo fuera del núcleo celular, en los ribosomas presentes en el citoplasma. Los ribosomas están constituidos por subunidades de numerosas proteínas asociadas y moléculas de RNA (RNA ribosómico rRNA). La traducción comienza con la iniciación (1): se forma un complejo de iniciación que comprende el mRNA, un ribosoma y un tRNA. Esto requiere el número de factores de iniciación (IF1, IF2, IF3, etc.). Luego continúa la elongación (2), con el acoplamiento de otro aminoácido determinado por el codón siguiente. Un ciclo de elongación de tres fases se desarrolla con el reconocimiento del codón, la unión del péptido al siguiente aminoácido residual y el traslado (traslocación) del ribosoma de tres nucleótidos más en dirección 3' del mRNA.. La traducción concluye con la terminación (3), cuando se alcanza uno de los tres codones de terminación (UAA, UAG o UGA). La cadena polipéptica formada abandona el ribosoma, tras lo cual este se disocia en subunidades <sup>[17]</sup>.

Estructura del RNA de transferencia (tRNA). El RNA de transferencia posee una estructura característica, similar aun trébol, Éste posee tres regiones de bucles (loops) de cadenas simples y cuatro regiones <sup>[17]</sup>.

**Mutaciones del ADN.-** El ADN codificante y su correspondiente polipéptido son colineales, una alteración (mutación) de la secuencia de bases del ADN puede dar lugar a un codón diferente, la posición del cambio resultante en la secuencia de aminoácidos corresponde a la posición de la mutación, existen tres tipos de mutaciones diferentes que involucran un solo nucleótido (mutaciones puntuales): sustitución (intercambio), delección (pérdida) e inserción (adición). Con una sustitución, las consecuencias dependen de cómo se haya alterado el codón, se distinguen dos tipos de sustituciones: transición (intercambio de una purina por otra o de una pirimidina por otra) y transversión (intercambio de una purina por una pirimidina o viceversa). Una sustitución puede alterar un codón de modo que se presente un aminoácido incorrecto en ese sitio pero sin que se produzcan cambios en el marco de lectura (mutación con cambio de sentido o missense mutation), mientras que una delección o una inserción causan un corrimiento en el marco de lectura (mutación con cambio de encuadre o frameshift mutation); luego, las secuencias que siguen a continuación ya no codifican para un producto génico funcional (mutación sin sentido o nonsense mutation) <sup>[17]</sup>.

**Gen.-** Un gen puede definirse como una sección del ADN responsable de la formación de un polipéptido (un gen, un polipéptido). Uno o más polipéptidos forman una proteína. Por lo tanto, en la formación de una proteína pueden participar varios genes <sup>[17]</sup>.

**Código genético.-** El código genético es el juego de reglas biológicas mediante el cual las secuencias de pares de bases nitrogenadas del ADN son traducidas en sus secuencias de aminoácidos correspondientes, los genes no codifican directamente para proteínas sino que lo hacen a través de una molécula mensajera (RNA mensajero o mRNA). Una secuencia codificante (codón) para un aminoácido consiste en una sucesión de tres pares de bases nitrogenadas (codón o triplete de nucleótidos), el código genético también incluye secuencias para el comienzo (codón de iniciación) y para la finalización (codón de terminación) de la región codificante <sup>[17]</sup>.

Cada codón codifica para un solo aminoácido, pero un aminoácido puede ser codificado por diferentes codones (redundancia del código genético), el código genético fue descifrado en 1966 analizando como los tripletes transmitían la información desde los genes hacia las proteínas, debido a que el código genético es redundante, es posible que diferentes secuencias de nucleótidos codifiquen para la misma secuencia de aminoácidos. Sin embargo, las diferencias están limitadas a una (o a lo sumo dos) posiciones de un determinado triplete <sup>[17]</sup>.

**Estructura de los genes (exones e intrones).-** Los genes eucariontes están formados por segmentos de ADN codificantes y no codificantes, llamados exones e intrones respectivamente. El ADN de un gen eucarionte es más largo que su correspondiente mRNA. El motivo es que ciertas secciones del transcrito primario del RNA son eliminadas antes de que se lleve a cabo la traducción. Cuando el mRNA y su ADN complementario de cadena simple son hibridados, este último forma bucles debido a que el mRNA se hibrida únicamente con ciertas secciones del DNA de cadena simple. Un segmento que hibrida se denomina exón. Una sección de ADN que inicialmente se transcribe y que luego es eliminado del transcrito primario se llama intrón <sup>[17]</sup>.

**Secuenciación del ADN.-** El conocimiento de la secuencia nucleotídica de un gen provee información importante acerca de su estructura, función y relación evolutiva con otros genes similares, en el mismo u otros organismos, existen dos métodos básicos de secuenciación del ADN: un método de desdoblamiento químico y un método enzimático <sup>[17]</sup>.

**Secuenciación por degradación química.-** Este método utiliza el desdoblamiento específico del ADN por medio de ciertas sustancias químicas, se utilizan cuatro químicos diferentes en cuatro reacciones, una para cada base, cada reacción produce un juego de fragmentos de ADN de longitudes diferentes <sup>[17]</sup>.

**Secuenciación por terminación de la cadena.-** Este método, se basa en el principio de que la síntesis del ADN se termina cuando en el lugar de un desoxinucleótido normal (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), se utiliza un desoxinucleótido ddNTP normal que difiere por la ausencia de un grupo hidroxilo en la posición del carbono 3'. Cuando un desoxinucleótido es incorporado durante la síntesis de ADN, no es posible la unión entre su posición 3', y el nucleótido siguiente, porque el ddNTP carece del grupo hidroxilo 3'. Entonces la síntesis de la cadena nueva se termina en ese sitio <sup>[17]</sup>.

**Secuenciación automatizada de ADN.-** La secuenciación del ADN a gran escala requiere procedimientos automatizados, basados en la marcación del ADN con fluorescencia y sistemas de detección adecuados, en general, una marca fluorescente se puede utilizar tanto directa como indirectamente, las marcas fluorescentes directas, como las utilizadas en la secuenciación automatizada, son fluoróforos. Éstos son moléculas que emiten un color fluorescente distintivo cuando se exponen a la luz UV de una longitud de onda específica, son ejemplos la rodamina y el ácido aminometilcumarínico, otro enfoque es la utilización de productos de amplificación por PCR (secuenciación por termociclación) <sup>[17]</sup>.

La secuenciación automatizada del ADN incluye cuatro fluoróforos, uno para cada una de las bases nitrogenadas, la señal de la fluorescencia resultante se toma como punto fijo cuando el ADN pasa a través de un capilar que contiene un gel de electroforesis. Las marcas fluorescentes específicas de cada base se unen a los desoxinucleótidos trifosfato adecuados. Las reacciones de secuenciación basadas en este tipo de terminación de las cadenas con un nucleótido marcado se llevan a cabo en forma automática en capilares de secuenciación. La migración electroforética de las cadenas marcadas con ddNTP en el gel de los capilares pasa enfrente de un rayo láser enfocado en una posición fija. El láser induce una señal fluorescente dependiente de la marca específica, que representa uno de los cuatro nucleótidos. La secuencia es leída y registrada en forma electrónica y visualizada como picos alternantes de uno de los cuatro colores, lo cual representa la alternancia de los nucleótidos en su posición secuencial <sup>[17]</sup>.

**Secuenciación por termociclación.-** El ADN a secuenciar está contenido en un vector de ADN; el cebador (primer), un oligonucleótido corto con una secuencia complementaria al sitio de pegado en el ADN de cadena simple, es utilizado como punto de partida; para secuenciar tramos cortos de ADN es suficiente un cebador universal, este es un oligonucleótido que se une al ADN de un vector adyacente al ADN a secuenciar; sin embargo, si este último es más largo que 750 pares de bases, sólo una parte de él será secuenciada, por ello se necesitan cebadores internos adicionales, que hibridan en diferentes sitios y amplifican el ADN, dando lugar a una serie de cadenas continuas y solapadas que son resultados de experimentos de terminación de las cadenas, aquí cada cebador determina que región del molde de ADN será secuenciada, una ventaja de la secuenciación por termociclación es que puede utilizarse como material de partida el ADN de cadena doble <sup>[17]</sup>.

**Clonado de ADN.-** Para obtener suficiente cantidad de una secuencia específica de ADN para estudiar, éste debe ser amplificado en forma selectiva, esto se logra mediante el clonado de ADN, técnica que permite obtener una población homogénea de fragmentos de ADN, a partir de una mezcla de moléculas de ADN muy diferentes o de todo el ADN del genoma, separarlo de los otros y multiplicarlo (clonarlo) en forma selectiva, para identificar el fragmento correcto de ADN se utiliza la hibridación específica del ADN complementario de cadena simple (hibridación molecular), un segmento corto de ADN de cadena simple, una sonda (probe), originada a partir de la secuencia en estudio, hibridará sus secuencias complementarias luego de que se desnaturalicen (se conviertan en cadenas simples: análisis de Southern blot, una vez que la secuencia hibridada se separó de otros ADN, se la puede clonar, las secuencias seleccionadas se pueden amplificar de dos modos básicos: en células (clonado dependiente de células) o por clonado libre de células (PCR) <sup>[17]</sup>.

**Clonado de ADN dependiente de células.-** Tiene cuatro pasos iniciales:

1. Una colección de diferentes fragmentos de ADN, se obtienen a partir del ADN deseado, para lo cual se lo corta con una enzima de restricción, debido a que los fragmentos resultantes del corte con enzimas de restricción poseen un extremo corto de cadena simple de una secuencia específica en ambos extremos, se pueden ligar a otros fragmentos de ADN cortados con la misma enzima; los fragmentos producidos se unen a fragmentos de ADN que contienen el origen de replicación (OR) de un replicón, el cual les permite replicar.

2. Un fragmento se puede unir a un marcador de selección, por ejemplo una secuencia de ADN que contiene un gen de resistencia a un antibiótico, las moléculas de ADN recombinante se transfieren a una célula huésped (células de bacterias o de levaduras); aquí las moléculas de ADN recombinante se pueden replicar en forma independiente del genoma de la célula huésped.

3. Por lo general la célula huésped capta una sola (aunque a veces más de una) molécula extraña de DNA, las células huésped transformadas con el ADN recombinante extraño crecen en cultivo y se multiplican.

4. El crecimiento selectivo de uno de los clones celulares permite abrir un tipo de molécula de ADN recombinante, luego de una propagación posterior se obtiene una población homogénea de moléculas de ADN, una colección de diferentes fragmentos de ADN clonado se denomina biblioteca. En el clonado dependiente de células las moléculas de ADN que contienen el replicón se llaman moléculas vectores <sup>[17]</sup>.

**Vector plasmídico.-** Existen muchos sistemas diferentes de vectores para el clonado de fragmentos de ADN de diferentes tamaños; los vectores plasmídicos se utilizan para clonar fragmentos pequeños, el clonado dependiente de células, para fragmentos de ADN de diferentes tamaños, es facilitado por una amplia variedad de sistemas de vectores, como ejemplo los vectores plasmídicos se utilizan para clonar fragmentos pequeños de ADN en bacterias <sup>[17]</sup>.

**Mapa de restricción.-** Las endonucleasas de restricción (enzimas de restricción) son enzimas que cortan el ADN. Se obtiene de las bacterias, las cuales las producen como protección contra ADN extraño. Una enzima determinada reconoce una secuencia específica de 4-8 nucleótidos (un sitio de restricción) por donde está corta el DNA. El tamaño de los fragmentos de ADN producidos depende de la distribución de los sitios de restricción. Se han aislado más de 400 tipos diferentes de enzimas de restricción <sup>[17]</sup>.

**Bibliotecas de ADN.-** Una biblioteca de ADN es una colección de fragmentos que en conjunto representan el genoma, o sea, un gen particular que se está buscando y todo el ADN restante, es el punto de partida para el clonado de un gen de localización cromosómica desconocida. Para producir una biblioteca, el ADN total se digiere con una enzima de restricción y los fragmentos resultantes se incorporan a vectores y se replican en bacterias.

Un número suficiente de clones debe estar presente para que cada segmento éste representado al menos una vez. Este es un problema que depende del tamaño del genoma a investigar y del tamaño de los fragmentos. Se utilizan como vectores los plásmidos y los fagos<sup>[17]</sup>.

**Biblioteca de ADN genómico.-** Los clones de ADN genómico son copias de fragmentos de ADN de todos los cromosomas, y contienen secuencias codificantes y no codificantes. Para contar el ADN genómico en muchos fragmentos se utilizan enzimas de restricción. La colección completa de moléculas de ADN recombinante, que contienen todas las secuencias de ADN de una especie o individuo, se denomina biblioteca genómica. Para encontrar un gen en particular se requiere un proceso de examen<sup>[17]</sup>.

**Polimorfismos.-** La versión de dos o más alelos de una secuencia de DNA en una localización particular se conoce como polimorfismo. Cuando los alelos son tan comunes que se encuentran en más del 1% de la población constituyen un polimorfismo genético, mientras que los alelos con frecuencias menores al 1% se conocen como variantes raras.

Dadas las características de los polimorfismos estos se pueden dividir en:

- RFLPs o fragmentos de restricción de longitud polimórfica.- las enzimas de restricción reconocen secuencias de ADN específicos, cualquier cambio en la secuencia del ADN crea o elimina sitios de restricción particulares alterando el tamaño de uno o más fragmentos de ADN (Southern blot), la población no tiene los mismos sitios de restricción.
- VNTRs o repetidos en tandem en número variable. Tienen muchos alelos y una alta heterocigidad, solamente los gemelos idénticos presentan un patrón indistinguible, a la detección simultánea de VNTRs se le conoce como huella digital de ADN (DNA finger-printing)
- STRs o repetidos cortos en tandem: Son más polimórficos que los VNTRs; unidades de repetición de dos, tres o cuatro nucleótidos, tienen tres características: 1) el locus de microsatélite tiene muchos alelos, 2) sólo requiere de PCR para generar segmentos que difieren en longitud dependiendo del número de repetidos y 3) se han identificado cientos de miles de microsatélites.

- SNPs o polimorfismos de un solo nucleótido: son la generación de marcadores más nueva y son más frecuentes de los VNTRs o STRs.

El proceso usado para examinar los VNTR a partir de una muestra forense se llama polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP). La técnica aprovecha el hecho de que el fragmento de ADN que contiene las 25 copias es más largo que el otro cromosoma que contiene las 18 copias, los análisis de las longitudes de los fragmentos revelan que al buscar varios VNTR dentro de individuos y entre ellos, no hay dos personas que tengan el mismo surtido de longitudes. Esta técnica fue conocida por el público como "huella digital de ADN" debido a su potente capacidad de discriminar entre personas no relacionadas entre sí<sup>[17]</sup>.

**Polimorfismo de longitudes de fragmentos de restricción (RFLP).**- Cada 100 pares de bases de un segmento de ADN en forma aproximada, la secuencia nucleotídica difiere entre algunos individuos (polimorfismo del ADN), como resultado, la secuencia del reconocimiento de una enzima de restricción puede estar presente en un cromosoma pero no en otro, en este caso los tamaños de los fragmentos de restricción difieren en sitio (polimorfismo de longitudes de fragmentos de restricción, PLFR o RFLP en inglés), es importante comprender que el PLFR en sí mismo no está relacionado con la mutación. Éste simplemente distingue fragmentos de ADN de diferentes tamaños de una misma región, estos pueden utilizarse como marcadores para distinguir alelos en un análisis de segregación. Además de los PLFR pueden detectarse otros tipos de polimorfismos del ADN, mediante la hibridación de Southern blot, aunque hoy se utiliza con más frecuencia el análisis de microsatélites basado en la reacción en cadena de la polimerasa<sup>[17]</sup>.

Por último el valor informativo de las secuencias de DNA que se emplean en la genética forense se basan en el grado de polimorfismo y en la frecuencia de los alelos en la población. Las ventajas del uso del DNA en la medicina legal son entre otras, que bastan unos indicios mínimos ya que se utiliza PCR para amplificar la muestra, la calidad de la muestra no se ve especialmente comprometida ya que pueden emplearse los STR's cuando se trata de tejidos en putrefacción o muestras milenarias y el DNA está presente en la mayoría de los indicios que pueden recogerse de la escena de un crimen como el pelo, la piel, el semen, sangre, etc.<sup>[17]</sup>



### ANEXO 3. ADN MITOCONDRIAL

El ADN mitocondrial se encuentra en una pequeña estructura celular llamada mitocondria, que produce energía para la célula. Hay cientos de miles de mitocondrias en cada célula, y cada mitocondria contiene entre 1 y 10 moléculas de ADN mitocondrial, el gran número de copias de las moléculas de ADN mitocondrial es uno de los motivos por los cuales se puede recuperar de cabellos y restos esqueléticos antiguos <sup>[23]</sup>.

**Patrón de herencia materna.-** Una característica singular del ADN mitocondrial es que se transmite de la madre a sus hijos, de un hombre es heredado de su madre, pero no se lo transmite a sus hijos, este patrón de herencia materna tiene dos implicaciones importantes en las pruebas forenses <sup>[23]</sup>. La segunda implicación es una desventaja: el ADN mitocondrial no es un identificador único, dado que los parientes maternos comparten el mismo tipo de ADN mitocondrial, la fuente de una muestra biológica nunca puede identificarse de modo concluyente <sup>[23]</sup>.

**Regiones hipervariables.-** El papel de los nucleótidos en el ADN mitocondrial es codificar los genes implicados en la producción de energía, no obstante, hay dos pequeñas regiones hipervariables no codificantes que contienen información de ADN empleada en pruebas forenses. El tipo de ADN mitocondrial de una muestra biológica está determinado por el orden preciso, o secuencia, de los nucleótidos de ADN en estas regiones <sup>[23]</sup>. En la década de 1980, los científicos descubrieron que la probabilidad de seleccionar al azar a dos personas con el mismo tipo de ADN mitocondrial era muy baja porque hay miles de tipos de ADN mitocondrial entre los humanos, por ejemplo: de los 700 nucleótidos de las regiones hipervariables, dos personas sin parentesco materno tienen unas 10 diferencias de nucleótidos <sup>[23]</sup>.

**Consideraciones sobre el ADN mitocondrial.-** La *Heteroplasmia* se define como la presencia de más de un tipo de ADN mitocondrial en una sola persona, originalmente se creía que era infrecuente entre las personas sanas, pero los científicos actualmente creen que todas las personas tienen algunos tipos de ADN mitocondrial ligeramente distinto de baja frecuencia mezclado con su tipo dominante heredado, esos tipos de baja frecuencia surgen de mutaciones de ADNmt dentro de las células al crecer y dividirse. Los dos tipos de heteroplasmia son la heteroplasmia de longitud y la heteroplasmia de secuencia (o de sitio)<sup>[23]</sup>.

## ANEXO 4. OTRAS PRUEBAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA SÍFILIS

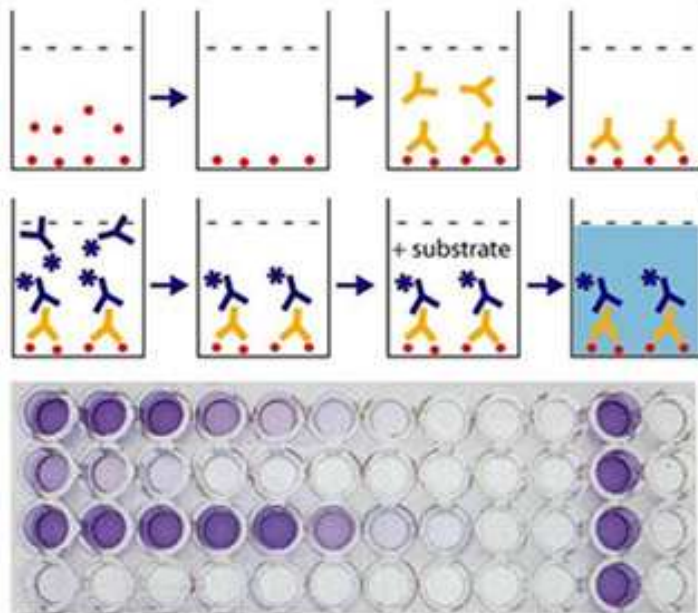
**ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay).** Durante la infección por *Treponema pallidum* se producen anticuerpos inespecíficos, contra antígenos comunes a todas las espiroquetas y anticuerpos específicos contra *Treponema pallidum* [29].

En la enfermedad temprana los anticuerpos son IgM, luego rápidamente aparecen anticuerpos IgG que son los predominantes durante el tiempo [29].

La técnica de ELISA es un método de cuantificación inmunológica que evalúa la reacción antígeno- anticuerpo mediante una reacción enzimática, de acuerdo al diseño de la prueba se puede detectar una o más inmunoglobulinas o se puede detectar antígenos específicos- para lo cual se utiliza un conjugado, formado por un anticuerpo o un antígeno, el cual se ha marcado con una enzima (peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, etc.).

El antígeno o anticuerpo que se utiliza, es inmovilizada sobre un soporte sólido, que es generalmente una placa de poliestireno, por lo que la reacción antígeno-anticuerpo que se produce también queda inmovilizada en el soporte sólido. A esto se le adiciona un sustrato (enzima) marcado con un cromógeno que se produce una reacción de color, que es directamente proporcional al analito (antígeno o anticuerpo a ser detectado) y que es cuantificado con un lector de ELISA que es un espectrofotómetro modificado [29].

Los ELISA para sífilis que se introdujeron en la década de los ochenta, usaban extracto treponémico como antígeno, y no estaban aprobadas para el diagnóstico de sífilis, en los noventa se introdujeron pruebas que utilizaban antígenos recombinantes de las proteínas de membrana del *Treponema pallidum* y otras que utilizaban anticuerpos monoclonales, las cuales detectan tanto IgM como IgG o ambas con una sensibilidad del 99-100% y con una especificidad de 94-99% [29].



**Figura 16:** En la técnica denominada **ELISA** se deja interactuar el suero del paciente (representado por puntos rojos) con un anticuerpo específico (en amarillo). Luego se agrega una inmunoglobulina unida con una enzima (en azul) que se une al anticuerpo humano. Finalmente se agrega un sustrato para la enzima. La enzima ligada al complejo actúa sobre el sustrato, produciendo cambio de color, que puede cuantificarse. El color que se produce es proporcional a la cantidad de anticuerpo específico que se fija al antígeno. En conclusión, la presencia de color indica la presencia del antígeno <sup>[29]</sup>.

**Western blot.-** El Western Blot, también denominado inmunoblot, es una técnica que detecta anticuerpos para epítopes específicos en antígenos, previamente separados por electroforesis de alta resolución. La electroforesis separa los componentes antigénicos por sus diferentes pesos moleculares, luego estos son transferidos a una membrana de nitrocelulosa reteniendo su posición electroforética y reaccionan con el suero del paciente, si los anticuerpos específicos estuviesen presentes, estos son revelados usando un anti-anticuerpo conjugado con una enzima a la que se le agrega un sustrato cromogénico, dando como resultado bandas coloreadas en la tira de nitrocelulosa, esta técnica se utiliza para confirmar los anticuerpos detectados previamente por alguna otra prueba serológica de despistaje <sup>[29]</sup>.

Recientemente se ha secuenciado el genoma del *Treponema pallidum*, también se ha identificado mediante electroforesis de alta resolución que sus factores de virulencia radican en un grupo de 12 proteínas de la membrana externa de diferentes pesos moleculares. En el

Western Blot para *Treponema pallidum*, los antígenos pueden reaccionar con IgG, IgM o IgA presentes en el suero de pacientes con sífilis, la IgG reacciona fuertemente con una proteína de membrana, pero es menos sensible y específica que la prueba de FTA-ABS. En cambio cuando la prueba detecta IgM, es de gran utilidad en el diagnóstico de la sífilis secundaria y congénita, con una sensibilidad del 83% [29].

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**- La prueba de PCR que detecta ADN de *Treponema pallidum* tiene 785 de sensibilidad y 100% de especificidad, es de gran utilidad en el diagnóstico de aquella sífilis congénita, la sífilis tardía y en detectar infección persistente en individuos que han recibido tratamiento ineficaz. La ventaja del PCR es que al amplificar ADN específico de *Treponema pallidum*, se elimina la posibilidad de detectar falsos positivos, además que puede realizarse en gestación temprana [29].

## ANEXO 5. BÚSQUEDA DE TÓXICOS EN SANGRE.

Por ejemplo en la búsqueda de algún compuesto tóxico, es importante mencionar que la química forense tiene una amplia participación. La química forense se define como: el conjunto de conocimientos químicos y biológicos que auxilia a la resolución de problemas legales apoyados en gran parte por estudios en el laboratorio, un área extensa de participación conjunta entre el médico y el químico es en los casos relacionados con el campo de la toxicología que se aplica al cadáver, al sujeto vivo, sobre la actividad laboral y del medio ambiente <sup>[12]</sup>.

En el laboratorio químico aplican técnicas analíticas y deben considerarse las siguientes:

**Determinaciones cualitativas:** Técnicas que permiten localizar al agente o sustancia mediante diferentes métodos como pueden ser:

- Las reacciones de color que en algunos casos carecen de especificidad y debe cuidar la cantidad y el orden de los reactivos para evitar falsas lecturas, aunque no son selectivas ayudan al tamizaje de productos que deben descartarse <sup>[12]</sup>.

- También se utilizan aparatos como espectrofotómetros principalmente el infrarrojo, el de masas y el aparato de resonancia magnética nuclear, que proporciona información más precisa sobre la identificación de las sustancias, pero requiere en algunos casos el pretratamiento de la muestra <sup>[12]</sup>.

- La cromatografía es útil para la separación e identificación de los productos en una muestra y puede servir para continuar con un posterior estudio cuantitativo una vez fraccionada y localizada la sustancia involucrada <sup>[12]</sup>.

**Determinaciones cuantitativas:** son aquellas de las cuales podemos obtener el dato de la concentración y en una gran mayoría se requiere de aparatos analíticos de gran sensibilidad y calibrados para determinar el producto y cuantificarlos, comparándolo con estándares certificados para una medición confiable, llevando como requisito indispensable una purificación y separación del agente químico, de estos aparatos podemos mencionar los siguientes:

- El espectrofotómetro de luz ultravioleta y visible que se basa en la respuesta específica de cada sustancia a una determinada longitud de onda, que se mide por la capacidad de absorber luz (Absorbancia o densidad óptica) y es proporcional a la concentración <sup>[12]</sup>.

- Espectrofotometría de absorción atómica <sup>[12]</sup>.

- Cromatografía de gases y líquidos de alta resolución en la que el líquido eluyente es impulsado a través de una columna a presiones elevadas, en toda cromatografía se distingue:

➤ Fase estacionaria que puede ser líquida o sólida <sup>[12]</sup>.

➤ Fase móvil que puede ser un líquido (un disolvente y una mezcla de disolventes) o gas <sup>[12]</sup>.

➤ Técnicas inmunoquímicas todas ellas se basan en el principio analítico de la reacción antígeno-anticuerpo, en forma de complejo y el antígeno es el tóxico marcado, los métodos más importantes son:

- Radioinmunoanálisis

- Enzimoimmunoanálisis

- Inhibición de la hemaglutinación <sup>[12]</sup>.

Para poder dirigir la búsqueda de tóxicos en el organismo se requiere información proveniente de familiares, compañeros de trabajo o testigos del suceso, además de los datos recabados por el médico que proporcionen datos o signos característicos que orienten los estudios clínicos para el tratamiento del paciente o los análisis quimicotóxicológicos para establecer la posible causa de intoxicación, deberán realizarse mediante una determinación discriminatoria por medio de un tamizaje en la muestra, según el tipo de tóxico <sup>[12]</sup>.

**Tóxicos volátiles y gaseosos:** Pueden analizarse por cromatografía de gases con la técnica de “espacio de cabeza”, para solventes en sangre como tetracloruro de carbono, cloroformo, diclorometano tolueno y tricloroetileno se utiliza soluciones stock en agua de 1mg/mL de cada uno de los anteriores además de soluciones patrón de sangre adicionada de cada uno de los compuestos a concentraciones de 2.5 y 10mg/L (preparación inmediata) <sup>[12]</sup>.

**Tóxicos inorgánicos:** La técnica más adecuada es la de espectrofotometría de absorción atómica seleccionando las características instrumentales para cada uno de los metales de interés como Arsénico y Mercurio (generador de hidruros y lámpara de descarga sin electrodo; cobre y cinc (llama aire acetileno y lámpara de cátodo hueco); plomo y cromo (horno de grafito con lámpara de cátodo hueco); cadmio (horno de grafito, lámpara de descarga sin electrodo) <sup>[12]</sup>.

**Tóxicos orgánicos:** Este grupo tiene una gran variedad de tóxicos con propiedades fisicoquímicas diversas que hace más difícil el tamizaje de las sustancias a detectar, siendo la técnica recomendada la cromatografía de capa fina (separación y o identificación) requiere de la utilización de patrones y estándares así como la extracción y su sensibilidad no siempre permite obtener la detección por lo que puede apoyarse en espectrofotometría ultravioleta (cuantificación) e infrarrojo (identificación) o en técnicas inmunológicas como la EMIT (enzimoinmunoanálisis) y la IH (inhibición de la hemaglutinación); cuando la muestra se encuentra en concentraciones mayores de 1mg, es posible utilizar los kits comerciales para la identificación de algunos compuestos como medicamentos o drogas de abuso (barbitúricos, antidepresivos tricíclicos, marihuana, opio y cocaína) <sup>[12]</sup>.

La prueba **EMIT** se basa en la utilización de tóxicos marcados con lisozima; el tóxico libre presente en la muestra problema desplaza el tóxico marcado, con lo cual se produce un incremento de la actividad enzimática que se manifiesta por cambios en la densidad óptica de la solución <sup>[12]</sup>.

**La prueba de inhibición de la hemaglutinación** consiste en la utilización de eritrocitos sensibilizados con el tóxico y estabilizados por tratamiento con formol como marcadores y en ausencia del tóxico los eritrocitos se aglutinarán por reaccionar con los anticuerpos específicos: en presencia del tóxico éste reacciona con el anticuerpo presente impidiendo la aglutinación de los eritrocitos por desplazamiento competitivo, sedimentando y formando un anillo característico <sup>[12]</sup>.

## ANEXO 6. ARTÍCULO 253 DEL CÓDIGO CIVIL.

“En las acciones de filiación se admitirán toda clase de pruebas, incluso las biológicas, las que podrán ser decretadas de oficio o a petición de parte”.

La petición puede corresponder a los padres que la afirman o la impugnan en sí o en otros y a los hijos que la impugnan o la pretenden. En la actualidad los planteos son: derechos económico – alimenticios, sucesiones, tenencia y devolución de descendientes ilegalmente habidos en raptos forzados, muerte o desaparición de perseguidos políticos, sean cónyuges o pareja, cobros de seguros, petición de “nacionalidad de sangre” de padres oriundos de países mejores en lo laboral o social, cambios de niños en nursery, gestas en violación y que podrán identificar a un violador, inseminación heteróloga, atribución de paternidad, en el adulterio al cónyuge legítimo, etc. Se plantea también la certificación oficial o no de factores genéticos con el fin de evitar reclamos sucesorios de quienes pretenden ser descendientes.

La modificación del artículo 253 citado deja abierta a la pericia y a los progresos científico-técnicos la validez científica teniendo presente que en general, se trabaja con individuos o grupos de individuos y no con poblaciones, lo cual puede configurar al resultado pericial en la categoría de lo indubitable. Sin embargo debe tenerse presente la expresión amplia “se admitirán toda clase de pruebas”.



## GLOSARIO

**AGLUTINACIÓN.** Fenómeno natural referente a los glóbulos rojos, pero igualmente a los glóbulos blancos y a las plaquetas, que se produce cuando los anticuerpos presentes en el plasma se unen a antígenos transportados por estas células sanguíneas (la aglutinación puede también producirse con bacterias sometidas a la acción de anticuerpos). Se trata de un proceso a la vez inmunológico: reacción antígeno-anticuerpo y físico: modificación del medio. Se puede observar generalmente a simple vista cuando se trata de la aglutinación de glóbulos rojos, bajo la acción de los anticuerpos se van aparecer pilas de hematíes en diferente número y tamaño que se denominan aglutinados. En el laboratorio de los centros de transfusión la reacción de aglutinación se utiliza diariamente para determinar los grupos sanguíneos en los sistemas ABO y Rh. Las máquinas automáticas las utilizan igualmente. La aglutinación de los glóbulos rojos fue usada por Karl Landsteiner en 1900 permitiéndole descubrir los tres primeros grupos del sistema ABO (A, B y O). La aglutinación de glóbulos blancos permitió a Jen Dausset descubrir en 1958 el primer antígeno HLA, que recibió la denominación Hu 1.

**ANTICOAGULANTE.** Sustancia que impide la coagulación del plasma humano. Se conocen distintos anticoagulantes que se definen según su modo de acción. Entre los productos más eficaces es necesario citar a la heparina, de acción inmediata. La heparina es sin embargo, poco utilizada en transfusión por que carece de cualidades para la conservación de los hematíes. Para hacer incoagulable la sangre se extrae actualmente sobre citrato de sodio al que se le añade dextrosa (glucosa) la cual permite nutrir los glóbulos rojos durante el tiempo de su conservación a +4°C (21 días).

**ANTICUERPO.** Un anticuerpo es una inmunoglobulina, es decir una proteína plasmática que sirve para defender al cuerpo de la entrada de una sustancia o elemento extraño (antígeno), con el que reacciona (reacción antígeno-anticuerpo) para anularlo. Los anticuerpos que circulan por la sangre en forma libre o como inmunocomplejos, se originan en los linfocitos B y en las células plasmáticas y muestran una gran especificidad. Constituyen unos de los factores básicos de la inmunidad y su ausencia hace que el organismo caiga con facilidad frente a la invasión de agentes normalmente inofensivos, pero que entonces se convierten en patógenos, un anticuerpo monoclonal es el obtenido por clonación y que solo reacciona ante un tipo concreto de antígenos, mientras que los anticuerpos fluorescentes se tienen en una técnica de localización de antígenos mediante la tinción con un anticuerpo específico que va acompañado de un colorante fluorescen.

**ANTÍGENO.** Sustancia que, introducida en un organismo provoca la formación de anticuerpos. Los antígenos son proteínas extrañas o del propio cuerpo pero consideradas extrañas por el organismo, que tienen la capacidad de desencadenar una respuesta inmunológica. Pueden tener o no actividad inmunogénica y su acción se debe a la presencia de determinados grupos de bajo peso molecular.

**ANTROPOLOGÍA FORENSE.** Se define como la ciencia que estudia las características somáticas osteológicas y antropométricas que permiten identificar a individuos en casos legales.

**BALÍSTICA.** La balística es la ciencia que estudia las armas de fuego, el alcance y dirección de los proyectiles que disparan y los efectos que proceden.

**CRENOCITO.** Eritrocito con espículas cortas en toda la superficie y distribuidas regularmente.

**DACTILOSCOPIA.** Aunque la gran mayoría de las impresiones dactilares pueden hallarse en el lugar del hecho, en otros casos es necesario que los objetos que posiblemente tengan huellas latentes sean trasladadas a los laboratorios para su reactivación utilizando polvos, vapores de yodo,  $\alpha$ -ciano acrilato de sodio o por medio de rayo láser.

**DOCUMENTOSCOPIA.** La química forense puede aplicarse en el estudio de un documento para el análisis del papel y de la tinta, para determinar cuando se elaboró.

**ELIPTOCITO U OVALOCITO.** Eritrocito de forma elíptica.

**EPISTAXIS.** La presencia de células con cilios vibrátiles nos indica sangrado nasal.

**EVIDENCIA.** Es la certeza clara, manifiesta y tan perceptible de una cosa, que nadie puede racionalmente dudar de ella.

**FENOTIPO.** Cuando se define biológicamente a un individuo, el fenotipo en términos generales es lo que se observa de él. En el laboratorio se habla de fenotipos eritrocitarios, leucocitarios y plaquetarios, después de que se haya determinado el número máximo de antígenos con la máxima precisión en las distintas células sanguíneas. Determinar la pertenencia de una persona a los grupos ABO y Rh es establecer su fenotipo con respecto a los antígenos de esos 2 sistemas.

**FITHEMAGLUTININA.** Sustancia obtenida de un extracto de *Phaseolus vulgaris* (frijol), desde el punto de vista químico de dos componentes una proteína y una mucoproteína, estimula la proliferación clonal, principalmente de linfocitos T y su modo de acción sobre estos es inducir la transformación de linfocitos a linfoblastos, estimulando la síntesis de RNA y de DNA.

**GENÉTICA FORENSE.** Es la parte de la genética aplicada a la medicina legal y al derecho. El estudio de material biológico, como la saliva, semen, sangre, pelo y otros tejidos, permite tipificar el ácido desoxirribonucleico (ADN), método identificador moderno y que por su gran precisión se ha denominado huella genética. En el Derecho Penal: Investigación Criminal y en el Derecho Civil: Investigación de la paternidad.

**GENOMA.** Es la serie completa de los genes.

**GENOTIPO.** El genotipo de un individuo es su constitución genética, en general con referencia a un locus único.

**HEMAGLUTINACIÓN.** Se define como la agrupación reversible en condiciones fisiológicas in Vitro producido por una reacción antígeno-anticuerpo. Tradicionalmente se conoce la aglutinación mediada por anticuerpos como descriptiva en dos fases, una fase inicial primaria llamada de sensibilización y una fase secundaria o de aglutinación propiamente dicha. Se sabe que producida la fase de sensibilización aunque este pegado el anticuerpo a la membrana del glóbulo rojo no observamos aglutinación, solamente va a ser visualizada al cabo de la segunda etapa, es decir la de aglutinación.

**HEMATEMESIS.** Cuando hay sangre en los vómitos pueden encontrarse residuos de alimentos, drogas, venenos y células del tracto digestivo

**HEMATÍE.** Se dio el término al glóbulo rojo por la presencia de hierro (grupo hem) en las moléculas de hemoglobina.

**HEMATOLOGÍA.** Disciplina que enseña los conocimientos sobre la naturaleza, el origen, las funciones y las anomalías de la sangre. Por extensión, especialidad médica cuyo objetivo es estudiar, diagnosticar y tratar enfermedades de la sangre.

**HOMICIDIO.** Significa privación de vida de un ser humano por la acción de otro, su origen etimológico "Homicidium" proviene de las voces latinas homini caedes u homo caedere, que significa hombre-matar.

**INDICIO.** Es todo objeto o material, sin importar que tan grande o pequeño sea, que se encuentra relacionado con un presunto hecho delictivo, y cuyo estudio nos permitirá establecer si existió éste, así como la identidad de la víctima y/o victimario.

**INMUNOELECTROFORESIS.** Método desarrollado en 1953 por P. Grabar y C.A. Williams para analizar las proteínas plasmáticas combinando electroforesis e inmunodifusión sobre una placa de agar-agar.

**LECTINA.** Las lectinas son proteínas unidas a azúcares o glicoproteínas de origen no inmunológico que aglutinan células o precipitan glicoconjugados. Actúan precipitando complejos que contienen carbohidratos y reconocen a los glucorreceptores específicos de los criptoantígenos. Son extractos salinos de semillas y constituyen reactivos de tipificación útiles y son específicos a las diluciones adecuadas. Son fáciles de preparar y utilizar pero pueden ser difíciles de obtener.

**LUGAR DEL HECHO.** Es el sitio o espacio en donde se ha cometido un acto ilícito, y en donde se encuentran los indicios y evidencias. También se le conoce como el lugar del delito, la escena del crimen, o el escenario del delito, el propósito fundamental de su estudio es el de lograr tanto la reconstrucción del hecho como su verdad histórica.

**MINISATÉLITES.** Descrita por Jeffreys y Colaboradores en 1985. Es un sistema de pequeñas secuencias de bases que se repiten una y otra vez.

**MITOGENOS.** Sustancias que mimetizan la exposición in vivo de antígenos que inducen a los linfocitos a sintetizar DNA y dividirse por mitosis, por esta razón los cultivos de sangre

completa son, en general, cultivos de linfocitos ya que son células que responden fácilmente a estímulos mitogénicos. Ejemplo de mitógenos son: fitohemaglutinina (PHA), germen de trigo, concavalamina A y otras lectinas, tuberculina, estreptolisina O, toxoide tetánico, etc.

**MUTACIÓN.** En términos generales, la mutación consiste en cualquier modificación súbita de la herencia en el DNA. Esta definición es lo bastante amplia para comprender las alteraciones de la estructura de cromosomas enteros, pero en la práctica el término se ciñe a menudo a mutaciones puntuales. Una mutación puntual consiste en la mutación de una base por otra en el seno de un triplete. Si esta sustitución altera el codón, de modo que este codifique un aminoácido distintivo, la mutación provoca la síntesis de una cadena polipeptídica alterada, con una sustitución de aminoácido en una posición colineal con el punto de mutación del codón de DNA correspondiente.

**PCR.** (Reacción en cadena de la polimerasa). Kary B Mullis y colaboradores la descubrieron en 1987. Consta de 3 reacciones simples: desnaturalización, agregación de los primers y polimerización. Se emplea cuando se dispone de poco DNA (momias, restos óseos de 1000 – 50000 años, etc.).

**POLIACRILAMIDA.** Se utiliza para diferenciar regiones genómicas que difieren en una proporción muy pequeña.

**PRECIPITACIÓN.** Reacción que puede producirse en un medio líquido o sólido tras el encuentro de un antígeno con su anticuerpo correspondiente formando un complejo visible al que se denomina precipitado.

**PRINCIPIO DE INTERCAMBIO DE LOCARD.** En este principio se afirma que cuando dos objetos entran en contacto siempre hay una transferencia de material desde cada objeto hacia el otro.

**QUÍMICA FORENSE.** En esta importante especialidad se aplican todos los conocimientos y técnicas químicas con objeto de conocer la naturaleza de cualquier sustancia o elemento. Su participación en la investigación es multi e interdisciplinaria con otras ciencias forenses.

**REAGINA.** Inmunoglobulina especializada, anticuerpo inducido por alérgenos que se fija a los mastocitos.

**RFLPs.** (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción). Este sistema mantiene ventaja sobre los serotipos de proteínas, ya que no necesita expresión como proteína madura.

**SANGRE.** Es un líquido viscoso de color rojo que circula en los vasos a través de todo el organismo, en el que desempeña papeles esenciales y múltiples (nutritivo, respiratorio, depurador, regulador de defensa, etc.). La sangre es un tejido que contiene células: los glóbulos rojos (hematíes o eritrocitos), los glóbulos blancos (linfocitos, monocitos, polimorfonucleares) y las plaquetas (trombocitos); estas células están en suspensión en el plasma, que es la parte líquida de la sangre y que está compuesta principalmente por agua y

proteínas. Las propiedades de los distintos constituyentes de la sangre explican la multiplicidad de sus funciones.

**SIDA.** El síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida, es una enfermedad causada por el virus llamado de la Inmuno Deficiencia Humana (VIH), el cual afecta al sistema inmunológico a nivel de los linfocitos T4 los cuales son destruidos; disminuyendo las defensas del organismo y haciéndolo vulnerable a la aparición de enfermedades de tipo infeccioso. Existen dos tipos de VIH, el VIH1 y el VIH2.

**SÍFILIS.** Enfermedad venérea debida a un germen: el *Treponema pallidum*. Evoluciona en varias etapas a partir del chancro inicial y, si no se trata, conduce en algunos años a una degradación definitiva del sistema nervioso (la denominada "parálisis general").

**SISTEMA HLA.** Abarca un grupo de antígenos glucoproteicos que se encuentran en las membranas superficiales de todas las células nucleadas del cuerpo, desde tejido sólido hasta la mayoría de las células que circulan en la sangre, principalmente linfocitos, granulocitos, monocitos y plaquetas.

**TOXICOLOGÍA FORENSE.** Puede ser aplicada en sujetos vivos o muertos. En personas vivas se toman muestras de orina y de sangre. En la orina puede determinarse, principalmente, la presencia de medicamentos y drogas de adicción: en la sangre puede hallarse alcohol etílico. En personas muertas y en el momento de practicar la necropsia, las muestras biológicas que se recomiendan son: sangre, orina, contenido gástrico, vísceras como hígado, riñón y cerebro. En caso de que se sospeche de intoxicación con arsénico, plomo, berilio, talio, estroncio, uranio o flúor, deberán tomarse muestras de uñas, cabellos o huesos.

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A	Adenosina
Ab	Antígeno
AC	Adenilatocinasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
°C	grados centígrados
C	Citosina
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
dL	Decilitros
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del ingl. Enzyme-linked immunoabsorbent assay)
EMIT	Inmunoensayo enzimático multiplicado( del ingl. Enzyme multiple immunoassay screen)
EsD	Estearasa D
FAD	Fosfatasa ácida eritrocitaria
FGM	Fosfoglucomutasa
fL	Femtolitros (litros 10 <sup>-15</sup> )
6-FGD	6-Fosfogluconatodeshidrogenasa
g	Gramos
HLA	Antígenos leucocitarios (del ingl. Human Leucocyte Antigen)
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno (agua oxigenada)
Ig	Inmunoglobulinas

ISFG	International Society for Forensic Genetics
kg	Kilogramos
mg	Miligramos
mm <sup>3</sup>	milímetros cúbicos
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros (metros 10 <sup>9</sup> )
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del ingl. polimerasa chain reaction)
Pg	picogramos
PLFR	Polimorfismo de longitudes de fragmentos de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida
STR	Repeticiones cortas en tándem
TGP	Transaminasa glutamicopiruvica
UV	Ultra violeta
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VNTR	Repetidos en tándem en número variable
µm	Micrómetros (metros 10 <sup>6</sup> )