



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS TÉCNICAS USADAS PARA CONFIRMAR LA PRESENCIA DE SANGRE HUMANA

TESINA
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA
EMMANUEL ACEVEDO PIÑA

DIRECTOR DE TESINA
Q.F.B. CARINA GUTIÉRREZ IGLESIAS





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.

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES, por estar a mi lado en todo momento, confiar en todos mis proyectos y apoyarme en todos ellos.

A MIS HERMANOS, que siempre me han alentado a seguir en el camino sin importar las dificultades que se presenten.

A MIS MAESTROS, por ser los profesionales que interviniera en mi formación, pero también amigos en quien confiar.

A ESA PERSONA ESPECIAL, que aun estando lejos sabía que la vida me recompensaría con encontrarte de nuevo.

Porque este paso tan importante no hubiera sido posible sin la intervención de ustedes, mis logros y recompensas también son de ustedes.

“La excelencia no es un acto, es un hábito”

Gracias

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
1. SANGRE EN QUÍMICA LEGAL.....	3
1.1 Antecedentes históricos	3
1.2 Composición, características y funciones	4
2. INDICIOS EN EL LUGAR DE LOS HECHOS.....	5
2.1. Importancia de la sangre en el lugar de los hechos	6
2.2. Tipos de manchas en el lugar de los hechos	8
2.3. Características de las manchas de sangre.....	12
2.4. Sensibilidad y especificidad.....	17
3. FIJACIÓN, RECOLECCIÓN, EMBALAJE, TRANSPORTE Y CADENA DE CUSTODIA	18
4. TÉCNICAS DE ORIENTACIÓN	22
4.1. Características particulares.....	22
4.2. Técnicas.....	22
4.3. Falsos positivos y falsos negativos	23
5. TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN	24
5.1. Características	24
5.2. Historia de las técnicas	32
6. NUEVAS TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN, KITS COMERCIALES.....	34
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	36
OBJETIVOS	36
MÉTODO.....	36
RESULTADOS.....	37
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
CONCLUSIÓN	41
REFERENCIAS CONSULTADAS.....	42

RESUMEN

El presente trabajo consiste en realizar un estudio retrospectivo, descriptivo y observacional de los métodos utilizados para confirmar la presencia de sangre humana, incluyendo sus fundamentos y la justificación de su uso.

Se incluirán también las ventajas y desventajas de los métodos, características generales y particulares de cada método, sustancias o casos donde se pueden presentar resultados falsos positivos o falsos negativos.

Se dará una perspectiva general de los indicios, enfocando el interés en las manchas específicamente sangre y algunas de las características a identificar según naturaleza de los hechos.

Se abordará la problemática general del porque son necesarios en la investigación en Química Forense para respaldar de manera científica la presencia de una mancha de sangre humana como un indicio en un proceso penal.

INTRODUCCIÓN

En toda investigación criminal, uno de los indicios de mayor interés médico-legal son las manchas y en especial las manchas de sangre ya que pueden tener características que contribuyan a la resolución de un ilícito, tal como el estudio de su distribución, que facilita la reconstrucción de los hechos y por otra parte, la investigación que se aplica sobre ellas en el laboratorio, puede aportar datos que posibilitan, en el mejor de los casos, la identificación de las personas de las que proceden.

López Gómez y Gisbert Calabuig definen la mancha como “toda modificación de color, toda suciedad, toda adición de una materia extraña, visible o no, en la superficie del cuerpo humano, sobre instrumentos o sobre un objeto cualquiera, determinadas por el depósito de un producto líquido, blando y algunas veces sólido, de cuyo estudio se pueden establecer relaciones de la intervención o participación de una persona o cosa en un hecho delictivo”.

Las manchas por su origen pueden ser biológicas o no biológicas, según procedan de seres vivos o no, clasificándolas por su naturaleza de procedencia humana, animal, vegetal, mineral o sintéticas.

Las manchas con las que se trabaja en criminalística presentan para el investigador problemas muy particulares, los principales obstáculos que serán necesarios superar se derivan de la dificultad para su localización e identificación, posible contaminación de la mancha, cantidad y concentración.

Una búsqueda minuciosa, en la que se emplee el tiempo necesario, que naturalmente, sea realizada con la intervención única de los expertos unida a la recogida adecuada de indicios, es fundamental para que, en el trabajo de laboratorio que le sigue, se consiga extraer la máxima información posible.

Entre las manchas que más interesan al perito, se encuentran las de sangre, semen, meconio, unto sebáceo, calostro, leche, líquido amniótico, orina y materia fecal. Deben describirse lo más completo y claro que sea posible, señalando situación, tamaño, aspecto, número, etc., de cada una de estas manchas.

Cuando las manchas son modificadas por las condiciones ambientales, es importante, estudiarlas lo más rápidamente posible o cuando menos protegerlas para su posterior examen.

Las manchas, sean o no de origen biológico, constituyen un indicio muy trascendente y la confirmación de sus características y del modo en que se asentaron será un elemento importante que permitirá continuar en el laboratorio la búsqueda a fin de orientar debidamente el análisis para llegar a conclusiones correctas sobre la formación y situación de las mismas.

En algunos presuntos hechos delictivos, se busca la presencia de sangre para lo cual es de importancia determinar si tiene relación con el hecho a investigar, así su estudio lleva a tomar diversas consideraciones tales como tamaño, forma, morfología, estado en que se presenta, cantidad, tipo de soporte, transporte, muestreo, conservación, estudio preliminar o

pruebas de orientación, pruebas de confirmación, determinación de grupo y posible origen corporal, etc.

Las pruebas de orientación son pruebas químicas muy sencillas que aportan datos acerca de la posible naturaleza de la mancha, consisten en desarrollar una reacción química que, en caso de ser positiva, señala la existencia en la muestra de un determinado compuesto que siempre forma parte de la composición del fluido biológico que se desea detectar. Es importante aclarar que la prueba puede dar positiva con otras muestras que no sean sangre, por tanto son sencillas en lo referente a la preparación como en el método de aplicación, muy sensibles, poco específicas pero capaces de detectar cantidades muy pequeñas.

En las pruebas de confirmación si el resultado de la prueba es positivo, se puede asegurar la naturaleza de la muestra, ya que estas pruebas se caracterizan por ser muy específicas aunque son poco sensibles sin embargo, un resultado negativo puede deberse a una concentración baja del analito a determinar en la muestra y no a su ausencia.

En la presente tesina se abordaran las características de la sangre, composición, funciones, así como su importancia en el ámbito forense, la metodología que implica el hallazgo de una mancha en el lugar de los hechos, la forma de actuar ante su presencia, preservación, muestreo, embalaje, y en cuanto se refiere al análisis se realizará tomado en cuenta su consistencia, tamaño y características, para lo cual se emplearan técnicas de orientación, de confirmación, para determinar el origen y grupo sanguíneo, se realizará un análisis comparativo de las técnicas de confirmación que permitirá proponer la más idónea a emplear en el trabajo forense.

MARCO TEÓRICO

1. SANGRE EN QUÍMICA LEGAL

1.1 Antecedentes históricos

En 1900, Paul Uhlenhuth perfeccionó el procedimiento del suero para distinguir la sangre humana de la de animal, en 1901, el hematólogo vienes Karl Landsteiner descubrió la existencia de tres grupos sanguíneos para el denominado sistema de histocompatibilidad mayor ABO, aunque se trataba de una identificación positiva, este análisis servía a menudo para descartar a los sospechosos que son inocentes, a partir de aquí las investigaciones químicas y legales, sufrieron un vuelco radical. Con posterioridad, este investigador y Weiner demostraron el concepto de la individualidad de la sangre humana.

A partir de 1939-1940, Levine y sus colaboradores, llegaron a la conclusión de que en la sangre humana existían diferentes sistemas antigénicos con herencia acoplada a las leyes de Mendel y expresión individual aún desde la etapa fetal.

El fin de la II Guerra Mundial y la necesidad de identificación de diferentes cadáveres, unido a los conocimientos de la época, motivaron el desarrollo acelerado de la Hematología Forense.

En términos legales, la posibilidad de identificación mediante el estudio de las características individuales de la sangre, atendiendo a sus propiedades inmunológicas, no se instaure definitivamente hasta la década de 1920.

En los primeros años del Siglo XX, seguidores del notable médico italiano César Lombroso, tratando de demostrar sus teorías sobre la existencia de un «delincuente nato», realizaron estudios con diez personas confesas por crímenes o detenidos *in fraganti*, haciendo énfasis en los elementos biológicos que, los diferenciaban de los no criminales. Pretendieron demostrar, mediante diferencias de viscosidad, fluidez y otras propiedades físicas de la sangre, la presencia de características individuales, que debían agruparse en un cierto número, para considerar válida la existencia de criminales de nacimiento.

Brown en 1976 expuso en un compendio sobre identificación de la sangre que ciertamente, era posible establecer diferenciación en una mezcla de este fluido, atendiendo al comportamiento de los elementos formes, planteando que en la mezcla, unos se *replegaban* y otros permanecían *libres*. A la luz actual, tales vivencias pudieran relacionarse con el fenómeno de isoaglutinación.

Desde la antigüedad se ha considerado a la sangre como la esencia de la vida y ha fascinado a la humanidad, en este sentido la importancia que se le atribuye sigue observándose en muchos aspectos, a los que no escapa el ámbito legal. Fue a partir del siglo XVII que se descubren los eritrocitos y posteriormente en el siglo XVIII los leucocitos y casi un siglo después las plaquetas. En el siglo XX ya se conocía el origen y morfología de las células sanguíneas.

1.2 Composición, características y funciones

La sangre es un tejido líquido que circula a través del cuerpo. Es la encargada de transportar oxígeno a todo el organismo y transportar bióxido de carbono, además que regula el volumen del organismo, se encarga de la defensa del mismo, transporte de proteínas, iones, nutrientes, hormonas, fármacos o drogas, encargada de la presión oncótica y osmótica, evitar la coagulación interna, regulación de temperatura, transporte de desechos. Como fluido, la sangre está compuesta por una parte líquida, el plasma y elementos formes: eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

Está formada por partículas sólidas que son:

- Eritrocitos o glóbulos rojos que presentan en su membrana los antígenos de los grupos sanguíneos también llamados aglutinógenos, tiene además fosfolípidos, enzimas, etc., aporta también un componente de especificidad. En su interior contienen la hemoglobina, así como sodio y potasio entre otras sustancias. Constituyen la forma celular más numerosa en la sangre de los vertebrados. En muchos mamíferos y en el hombre en particular, tienen forma de disco bicóncavo y son anucleados.
- Leucocitos o glóbulos blancos que están considerados como medios de defensa del organismo. Producen anticuerpos de varios tipos incluyendo anticuerpos de grupo sanguíneo.
- Las plaquetas que participan en la coagulación de la sangre.

Por último contiene varias enzimas (fosfoglucomutasa, fosfatasa ácida eritrocitaria, adenilatociclasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa) y proteínas (hemoglobina y haptoglobinas),

Características

La sangre es un tejido líquido que se encarga del transporte de oxígeno, bióxido de carbono, metabolitos, desechos, iones, constituye aproximadamente el 8% del peso corporal, formada por eritrocitos, leucocitos, plaquetas que constituyen la fracción sólida, la fracción líquida o plasma ocupa aproximadamente el 55% de su volumen, siendo esta fracción la que contiene numerosas proteínas y sales inorgánicas. Desde nuestro punto de vista es importante, ya que contiene, entre otras proteínas: precipitinas, fibrinógeno, albúmina y globulinas, dentro de las cuales están la IgG, la IgM, la IgD, IgE y la IgA. El suero es la fracción líquida que se obtiene después de la coagulación de la sangre extravasada y se encuentra por lo tanto desprovista de fibrinógeno. Actúa como regulador de la temperatura y en el balance de fluidos, como suministro de nutrientes a los tejidos. Transporta además varias enzimas y proteínas que se utilizan con fines forenses para tratar de individualizar una muestra de sangre por su frecuencia en la población.

2. INDICIOS EN EL LUGAR DE LOS HECHOS

INDICIOS

Para obtener resultados fructíferos desde el inicio de las investigaciones, conviene considerar y aplicar la máxima jurídica del Dr. Hanns Gross, “si la inspección ha de ser útil, es imprescindible que todos los objetos importantes o no que figuren en el lugar del crimen, permanezcan intactos, sin que por ninguna causa se les cambie de posición”.

El término indicio se deriva del latín *indicare*, que significa indicar, descubrir, denunciar. Puede definirse como indicio, evidencia física o material sensible significativo todo objeto, huella o elemento íntimamente relacionado con un presunto hecho delictuoso, cuyo estudio permite reconstruirlo, identificar a su autor o autores y establecer su participación.

Antaño, la policía se afanaba por descubrir instintivamente al delincuente. Por esta razón en el escenario del crimen, no se detenía a descubrir huellas e interpretar rastros, sino que iba al presunto culpable por el olfato y la intuición. Después la policía actúa con un criterio técnico, con el uso de las ciencias naturales, sucede entonces la intuición empírica y la percepción sensible de los lugares y de las personas peligrosas o criminales así como el uso del conocimiento científico y la comprobación experimental de los fenómenos del crimen.

El maestro mexicano Rafael Moreno González define la criminalística como: “La disciplina que aplica fundamentalmente los conocimientos, métodos y técnicas de investigación de las ciencias naturales en el examen del material sensible significativo relacionado con un presunto hecho delictuoso, con el fin de determinar, en auxilio de los órganos encargados de administrar justicia, su existencia, o bien reconstruirlo, o bien señalar y precisar la intervención de uno o varios sujetos en el mismo”.

La hipótesis base de la criminalística es que el criminal, por inteligente que este sea, siempre deja en el lugar del delito algo que, de algún modo, revela su presencia allí. El encontrar ese “algo” es el objetivo de la criminalística.

La criminalística emplea el método científico deductivo. De este modo, a partir de una verdad general se llega al conocimiento de una verdad particular. Para ello, se basa en los cuatro principios siguientes:

- Principio de intercambio: “No hay malhechor que no deje atrás de él alguna huella aprovechable”.
- Principio de correspondencia de características: “Por ejemplo, dos impresiones dactilares que corresponden a la misma persona, o dos proyectiles que fueron disparados por la misma arma”.
- Principio de reconstrucción de fenómenos o hechos.
- Principio de probabilidad: “Permite deducir la probabilidad o imposibilidad de un fenómeno con base en el número de características verificadas durante el cotejo”.

La naturaleza de los indicios es muy variada, lo que exige en rigor la concurrencia de especialistas muy diversos: policías, médicos, químicos, físicos, expertos en balística, expertos en huellas, etc.

El problema central de la investigación criminal es establecer la identidad, lo que generalmente se hace por medios indirectos.

En la investigación pericial de un hecho delictuoso para la búsqueda de indicios se deben considerar los siguientes puntos: observación, fijación, levantamiento, embalaje, cadena de custodia, análisis e interpretación de los resultados, elaboración del informe pericial y defensa ante los tribunales.

Debe conocerse que el valor de la prueba indiciaria es relativo, pues los indicios estudiados pueden ser falsos, bien por intención del criminal o bien por adición o alteración inducidas por los que manipularon previamente o realizaron las primeras diligencias en el lugar de los hechos. Incluso en el envío y transporte al laboratorio pueden alterarse las pruebas indiciarias.

2.1. Importancia de la sangre en el lugar de los hechos

Los mecanismos de coagulación y fibrinólisis, que en los seres vivos interactúan para mantener el equilibrio hemostático al cesar las funciones vitales, sufren un importante desequilibrio, que se manifiesta en el predominio de la actividad fibrinolítica y en una transformación gradual de los componentes del flujo sanguíneo. Esto se conoce como descoagulación postmortem.

Cuando el transporte de sangre se detiene a consecuencia de la interrupción de la actividad cardíaca (muerte), éste comienza a acomodarse en las cavidades inferiores los declives donde aparecerán las livideces cadavéricas. Este tipo de manchas permite que la investigación obtenga respuestas sobre la posición del cuerpo luego de transcurridas dos o tres horas de la muerte, cuando comienza a manifestarse una tinción marcada de la piel y los órganos en los declives del cuerpo; estas marcas se hacen manifiestas a partir de las seis horas de la muerte y persisten hasta la descomposición cadavérica

La sangre arterial es de color rojo claro y una vez lesionada una arteria se proyecta con fuerza, la sangre venosa es de color oscuro y su fuerza de proyección es mucho menor que la arterial.

Los sistemas de antígeno que se identifican en las manchas de sangre son: ABO, MNS, Rh, Kell, Lutheran y HLA.

Las huellas producidas por la sangre son las que más frecuentemente se encuentran en delitos contra las personas y constituyen el indicio más constante en el crimen, debiendo observar lo siguiente:

- a) Ofrecen posibilidades de reconstrucción del mecanismo de los hechos.
- b) Una vez manchado determinado soporte, la sangre permanece durante un tiempo prolongado y se encuentra con más facilidad en aquellos lugares que le ofrecen mejor superficie para su adherencia (piel, ropas, cortinas, alfombras).
- c) Difícilmente permanecen en superficies poco adherentes (metales, cristales, porcelana).

Se debe observar que la sangre antemortem se coagula entre 5 y 8 minutos después de expuesta fuera del cuerpo humano, y no así la de postmortem que expuesta al exterior no origina el proceso de coagulación. Lo anterior ha merecido varias explicaciones, se ha atribuido a la acción de enzimas proteolíticas y a modificaciones en el calcio sanguíneo, las cuales al disolver la fibrina, impiden la coagulación o licuan los coágulos formados.

Es de tener en cuenta que todas las manchas de sangre son importantes; a veces ello ocurre con las más pequeñas, que son las que permiten establecer detalles de cómo ocurrió el hecho, y no con los grandes charcos de sangre, que simplemente indican la hemorragia que sufrió la víctima.

La sangre, como las huellas digitales, son caracteres primarios inalterables.

Otro descubrimiento útil, es que alrededor del 80% de la población, secreta grupos de sustancia solubles en agua, idénticos a subgrupos sanguíneos, en sudor, saliva, semen, líquidos gástricos y otros. Si las técnicas son lo suficientemente sensibles para captar el grupo de estas sustancias, estas “secreciones” pueden identificarse a partir de manchas seminales y también de saliva, en caso de mordidas.

La sangre es el indicio biológico más habitual en la escena del crimen, en la misma el ADN se extrae de los leucocitos o glóbulos blancos (que son las células con núcleo). Para el análisis de ADN debe obtenerse en jeringas o tubos de extracción que contengan EDTA como anticoagulante.

Los principales obstáculos que será necesario superar se derivan de:

- I. La dificultad para su localización e identificación. El color y el tipo de material donde se encuentre, la antigüedad de la misma, su tamaño, los posibles intentos por hacerla desaparecer pueden llevar a confusión e incluso impedir su localización. Así se deduce la importancia de los métodos de búsqueda y orientación que aseguren el éxito de los posteriores análisis.
- II. La posible contaminación de la mancha. Puede ser debida al soporte, a la manipulación (intentos de lavado por ejemplo), o, en el caso de manchas antiguas, a la degradación de sus componentes. Se puede hablar de contaminación química

cuando se produce por la mezcla de la muestra con agentes químicos no biológicos, por ejemplo pinturas, productos de limpieza. Por contaminación biológica se entenderá la producida por la mezcla en la muestra de distintos fluidos biológicos (saliva, semen, etc.), procedentes o no del mismo individuo.

- III. Cantidad y concentración. En la mayoría de los casos se dispone de muy poca cantidad de muestra y además, su concentración puede ser baja. Estos dos factores van a influir negativamente en la sensibilidad de los métodos empleados en el análisis.

2.2. Tipos de manchas en el lugar de los hechos

Manchas de sangre

Por mancha se entiende toda modificación de color, toda suciedad o toda adición de una materia extraña, visible o no, en la superficie del cuerpo humano, sobre instrumentos o sobre un objeto cualquiera, determinadas por el depósito de un producto líquido, blando y algunas veces sólido, de cuyo estudio se pueden establecer relaciones de intervención o participación de una persona o cosa en un hecho delictivo.¹

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. A veces la búsqueda debe hacerse más intensa, por ejemplo, cuando se presume que el lugar o los elementos han sido lavados. En armas blancas, se debe investigar la presencia de sangre en la unión de la hoja con el mango; en el suelo, en las uniones de los mosaicos; en los muebles, en la parte inferior de la cubierta de mesas y escritorios y en los cajones; en las armas de fuego pueden encontrarse en la boquilla del cañón. En las personas, se debe buscar sangre desecada debajo de las uñas, en los surcos periungueales y en el pelo.

En las ropas de víctima y victimario se pesquisan en los forros, en los bolsillos, parte inferior de la manga; en los zapatos, en el surco entre la suela y la parte que recubre el pie.

Según Simonin, se pueden distinguir los siguientes mecanismos:

- 1) Proyección: cuando la sangre sale proyectada con cierta fuerza, bien describiendo una curva parabólica o en caída libre. Su origen puede ser múltiple, se debe considerar el ángulo de impacto de la sangre, la textura de la superficie (dureza y porosidad). El análisis de la morfología de estas manchas tiene un claro interés reconstructivo, aunque está sujeto a influencias diversas, que exigen mucha cautela en su valoración. Cuando la mancha cae perpendicularmente sobre una superficie, produce una mancha redondeada, cuyo aspecto dependerá de la cantidad de sangre que forma la gota, de la altura de la caída y de la superficie sobre la que cae. Si la gota es proyectada oblicuamente, incide sobre el plano en un ángulo agudo, con lo que la mancha se alarga en el sentido de la dirección.

- 2) Escurrimiento: la sangre, por determinada concentración, forma regueros o charcos, al ir cayendo por la acción de la gravedad. Su mayor interés radica en que permiten reconstruir los cambios de posición que haya experimentado el cadáver. El reguero sigue siempre en su dirección la influencia de la gravedad, regueros opuestos, por tanto, indicarán cambios de posición. Igualmente el reguero puede reconstruir la sobrevivencia de la víctima, señalando el recorrido que hiciera después de la agresión.
- 3) Contacto: cualquier objeto ensangrentado deja una impresión al contactar con un receptor. Si el sustrato es absorbente la sangre lo empapará y se difundirá dando lugar a manchas uniformes y de bordes limpios. En los casos de mayor concentración se le denomina impregnación. Tienen extraordinario interés cuando dibujan huellas de manos o pies, las huellas que dejan las suelas de zapatos y zapatillas, así como cuando han sido producidas al enjugar un arma para limpiarla, etc. la existencia de coágulos de sangre en la mancha indica sobrevivencia de la víctima.
- 4) Limpiadura: es un mecanismo mixto de contacto e impregnación

Las manchas de sangre tienen aspecto y tamaño según cuatro factores fundamentales: 1) la cantidad de sangre que mana de la herida y su forma; 2) la altura de su caída; 3) la dirección de su caída con relación al soporte que la recibe, y 4) la naturaleza de dicho soporte.

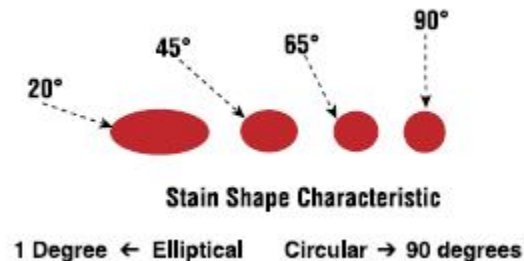


Figura 1. Mancha de sangre de acuerdo al ángulo.

Cuando una mancha cae perpendicularmente sobre una superficie, la mácula redondeada que se produce depende de: la cantidad de sangre que forma la gota, la altura de la caída y la superficie sobre la cual cae.

Altura: si es pequeña, la mancha tiene forma de un disco redondeado, al aumentar el diámetro es mayor y los contornos más irregulares, apareciendo pequeñas gotas satélites.
Naturaleza del soporte: en superficies no absorbentes se forman gotas más circulares, en superficies rugosas o interrumpidas, las máculas son irregulares y con numerosos satélites, en substratos porosos o absorbentes, predomina el mecanismo de impregnación y no hay satélites.

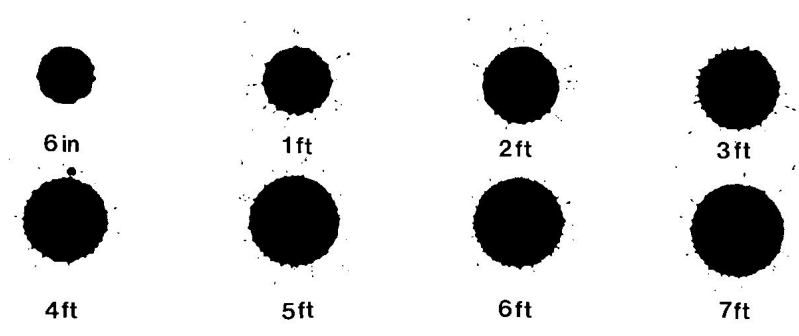


Figura 2. Manchas en función de la altura.

Si por el contrario la caída es oblicua, la mácula se alarga en el sentido de la dirección del movimiento, llegando a formarse gotas alargadas con satélites en punta, cual signo de admiración que indica el sentido de la inclinación.

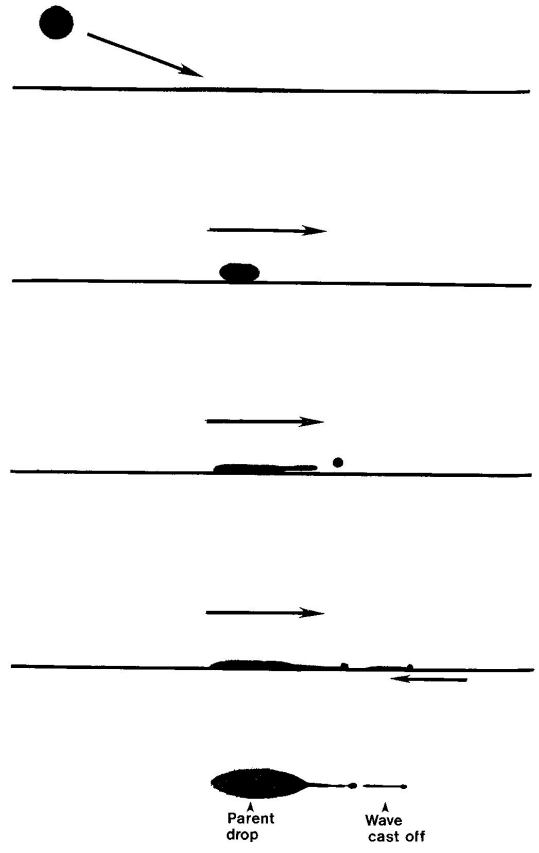


Figura 3. Caída oblicua.

Manchas invisibles y dudosas

En ocasiones no se observan manchas a simple vista o las que se ven, plantean dudas sobre su naturaleza sanguínea. De forma accidental o por un intento de hacer desaparecer un indicio, pueden quedar ocultas. Sin embargo mediante un reactivo denominado Luminol, se pueden poner de manifiesto.

Fundamento del método. Algunas proteínas poseen un componente no proteico llamado grupo prostético que es el responsable de que se desarrolle la función biológica de la proteína. En la hemoglobina, el grupo prostético es el grupo hemo que está implicado en el transporte de oxígeno. Este grupo contiene hierro en estado de oxidación II, y el hierro cataliza la reacción de oxidación del luminol. Es decir, la hemoglobina, en el desarrollo de su función biológica, contiene Fe (II). Sin embargo, en la mancha, se produce progresivamente la oxidación del Fe (II) a Fe (III), formándose la metahemoglobina.

El Luminol (3-aminophtalhidrazida) es un compuesto quimioluminiscente. Es decir capaz de emitir luz en el transcurso de una reacción química. Cuando se hace reaccionar Luminol con sangre en medio básico y en presencia de un oxidante, se observa la formación de una luminiscencia brillante que indica la posible presencia de sangre. El reactivo es capaz de detectar manchas recientes y muy antiguas. Sin embargo, funciona con menor efectividad con sangre muy fresca.

Se ha comprobado que el Luminol no interfiere en el desarrollo de otras pruebas de orientación, en las de certeza, ni tampoco en las técnicas de absorción-elución para identificación de especie. Recientemente se ha demostrado la no interferencia de ADN mediante PCR.

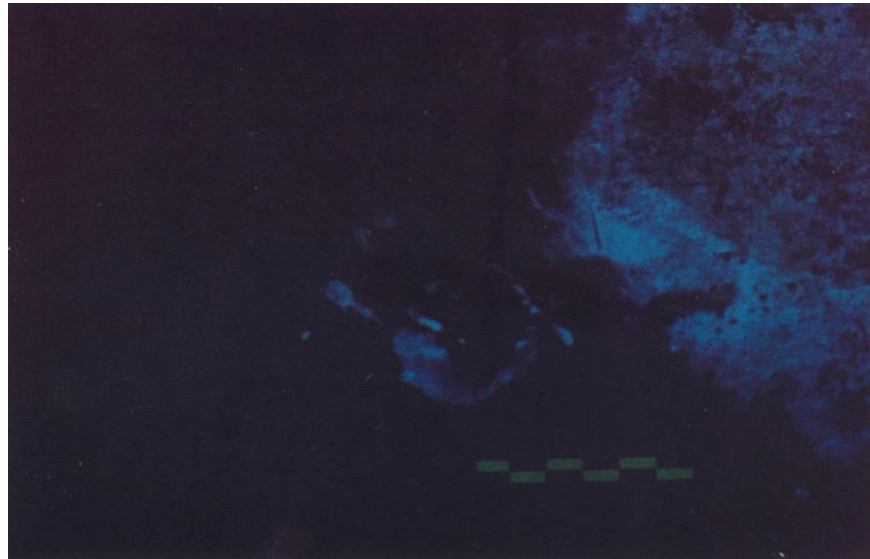


Figura 4. Uso de luminol.

2.3. Características de las manchas de sangre

Estudio de las manchas de sangre

La interpretación de las manchas de sangre es un campo de estudio que recae en el hecho de que la sangre, como fluido, sigue ciertas leyes físicas y como tal formará patrones reproducibles bajo conjuntos separados en circunstancias similares.

Por su forma, las manchas de sangre pueden clasificarse en manchas de proyección, escurrimiento, por contacto, por impregnación, de limpieza.

Cuando por evaporación se desecan y oscurecen, es posible confundirlas con las de herrumbre, carmín, tinturas, jugos de frutas, manchas de vino tinto, etc.

Contando con pocos datos, podemos sacar provecho al recordar los elementos figurados de la sangre fresca, para después hacer comparaciones con los elementos figurados de otras sangres (animales). Una primera diferenciación, que aunque elemental puede servirnos, es tener en cuenta los diámetros de los elementos figurados de estas sangres. Así con la comparación de los diámetros y sus formas, podemos decir si es o no humana la sangre de que se trate.

El objetivo de estudiar los patrones de manchas de sangre con respecto al tamaño, figura, cantidad, distribución, ubicación y el ángulo de impacto sobre la superficie en la que se encuentra la mancha, nos proporciona un panorama valioso de los hechos que se investigan.

El estudio de los aspectos físicos, químicos y serológicos de las manchas puede llevar a conseguir demostrar uno o más de los siguientes aspectos: la participación de personas y objetos en una acción criminal, aproximarnos a la forma en que se llevó a cabo un determinado suceso, identificar un cuerpo desconocido, determinar, por análisis toxicológico, la causa de una muerte, finalmente con la reunión de estos y otros datos, llegar a saber si se trata de una muerte por homicidio, suicidio, accidente o por causas naturales.

Simonin nos dice que la situación y la forma de las manchas de sangre se condicionan por la naturaleza y localización de la herida, posición de la víctima, movimientos, desplazamientos, gestos del criminal, etc. Estos diferentes actores hacen variar la cantidad de sangre esparcida y el ángulo de caída, de donde resulta la configuración de las manchas.²

La forma, dirección y estado de las huellas de sangre pueden indicar si la víctima efectuó movimientos o desplazamientos después de haber sufrido las lesiones; también si existió lucha y forcejeo; si fue desplazada la víctima de un lugar a otro ya sin vida; si la posición del cadáver corresponde a la original después de la muerte.

En relación a diversos factores podemos diferenciar las manchas por su origen (procedente de arteria o vena), por el soporte donde asienta la mancha: a) sobre cuerpo permeable, b) sobre base impermeable y c) por su mecanismo, en atención al ángulo de incidencia en caída perpendicular al suelo o caída oblicua al suelo.

Muchas veces el hallar gotas múltiples, diminutas y aisladas, pueden indicar la existencia de un mecanismo de acción muy violento.

El aspecto de las manchas varía con la antigüedad y el soporte sobre el que recaen. En los tejidos absorbentes y claros las manchas presentan un color rojo oscuro, que con el tiempo tiende a ennegrecerse más. Si las manchas han sido lavadas con agua, el color se hace rosa y el pigmento difunde al tejido, si bien de un modo irregular, con lugares más densos que otros. El aspecto de la mancha como de haber sido lavada debe poner en guardia al perito, porque las lejías y los ácidos modifican las características estructurales de los componentes de la mancha, dando lugar a causas de error en la investigación.

El examen de los indicios originados por la sangre, pueden ser útiles para determina lo siguiente:

- a) Identificar instrumentos utilizados en el hecho.
- b) Localizar lugares de hechos, donde se cometieron delitos.
- c) Conocer las circunstancias de la comisión de un hecho contra las personas.
- d) Se eliminan sospechosos.
- e) Comprobar o verificar coartadas o versiones sospechosas.

Es prudente mencionar, por su importancia y diferencia, que la composición de la sangre menstrual y la de desfloración, son completamente diferentes.

La sangre menstrual contiene placas epiteliales que se desprenden de la mucosa uterina esparcida en los glóbulos sanguíneos, y al microscopio coloreadas con azul de metileno, se aprecian en forma de laminillas planas con núcleo pequeño y redondo, pueden encontrarse protozoarios, hongos y bacterias; en general este tipo de manchas se encuentran en pantaletas y pantalones femeninos.

La sangre de desfloración manifiesta celdillas epiteliales que proceden de la mucosa vulvar, cuyas placas contienen un núcleo distinto a las placas de la mucosa uterina, en dicha sangre se observa una mezcla de semen y pelos de pubis producto de la consumación de la cópula. Las huellas de sangre de este tipo se aprecian en sábanas, toallas, papel kleenex, papel sanitario y pantaletas, y en ocasiones en las braguetas de los pantalones masculinos.

En otras oportunidades se puede establecer que la sangre proviene de una hemorragia nasal o epistaxis (tiene mucus, células epiteliales ciliadas y vibrátiles); si es del aparato respiratorio (presenta células prismáticas con cilios vibrátiles, células elásticas, cristales de Charcot-Leyden, piocitos y gérmenes); o del aparato digestivo, vomitada por la boca o hematemesis (hay restos de alimentos ingeridos, células epiteliales y hematina ácida); del aparato digestivo, evacuada por el ano o conocida como melena (se encuentra en ella hematina ácida, materia fecal y a veces parásitos intestinales o sus larvas); y sangre procedente de un parto, aborto o la interrupción de embarazo (presenta restos placentarios y fetales, corpúsculos de meconio, pelos de lanugo y unto sebáceo).

Con raras excepciones de identificación, como el eritrocito oval del camello o los nucleados de aves y reptiles, los exámenes previos no pueden distinguir la sangre humana de la animal. Se requiere de un laboratorio con posibilidad de realizar estudios inmunológicos. Antisueros específicos pueden obtenerse al inmunizar conejos e inyectándoles sangre de diversos animales para que desarrollen los anticuerpos específicos.

Si bien la sangre emanada recientemente tiene un color rojo más o menos vivo, en algunas horas toma un tinte particular; primero, de color marrón y luego de un color negro, que por lo general se conserva por muchos años si las condiciones atmosféricas son buenas. Oscurece rápidamente con la luz y sus transformaciones son mayores en verano y en lugares húmedos.

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

- a) Demostrar si la mancha de sangre en el arma, ropa o en algún otro 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 número de sistemas se pruebe 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.

La sangre de todos los individuos entra en uno de los cuatro grupos primarios O, A, B o AB, lo cual depende de si sus eritrocitos contienen ninguno, uno o ambos aglutinógenos.

Diagnóstico específico

La sangre es una suspensión de células en un medio líquido. En ambos componentes se pueden encontrar caracteres que permiten la identificación de la especie.

Los hematíes pueden suministrar datos para el diagnóstico específico atendiendo a su forma, presencia o ausencia de núcleo y tamaño. Los hematíes son redondos en los mamíferos, a excepción de los camélidos, y elípticos en las aves, reptiles y batracios. Por lo que respecta al núcleo, los mamíferos tienen hematíes anucleados, mientras que aves, reptiles y batracios los tienen nucleados.

Los leucocitos han sido poco estudiados a este respecto. El profesor Álvarez de Toledo fue el primero que publicó un trabajo sobre la identificación de la especie sobre la base de estos elementos. Muchos años después, Undritz y Hegg han confirmado los resultados del autor español. Los leucocitos presentan sobre los hematíes la ventaja de su mejor conservación en la mancha, en especial el núcleo que se mantiene intacto generalmente, aun cuando se haya destruido el protoplasma. La serie eosinófila es la que proporciona más datos al variar considerablemente las características de las granulaciones de unas especies a otras.

El estudio de la hemoglobina se ha abordado mediante técnicas diversas; estudios cristalográficos en los que se analizan las diferencias específicas de los cristales de hemoglobina; diferencias espectrográficas y diferencias estructurales. Así, en la especie humana se han individualizado más de 15 tipos de hemoglobinas y un estudio completo de la estructura de la hemoglobina puede establecer: especificidad de especie y de edad (Hb fetal), y características patológicas (anemia drepanocítica y talasemia), con lo que eventualmente se llegaría a la identificación individual y racial (anemia de Cooley).

En el suero, y concretamente en las proteínas que lo constituyen, se encuentran los elementos para establecer el diagnóstico específico. Un antígeno se define como una sustancia que, ingresada en el organismo de un animal de otra especie, le estimula a la producción de otra proteína que tiene la facultad de reaccionar específicamente con ella llamada anticuerpo. El antígeno está contenido en la mancha de sangre. Se emplean comúnmente dos tipos de anticuerpo: polivalentes (frente a un suero humano total) y monovalentes (frente a una sola fracción antigénica). La reacción antígeno-anticuerpo se puede realizar in vivo o in vitro. La primera está representada por la reacción anafiláctica de *Pfeiffer*. En cuanto a la reacción in vitro, la de precipitación es la más usada. Revela la unión del antígeno con el anticuerpo por la formación de un complejo que precipita, que se puede llevar a cabo en medio gelificado que tiene dos grandes tipos: reacción de doble difusión, test de Ouchterlony e inmunoelectroforesis. En la inmunoelectroforesis se tienen ventajas incuestionables: no se dan las reacciones cruzadas, con lo que la especificidad alcanza su máximo; se puede conocer con mayor precisión el antígeno presente en la

mancha, todo lo cual puede compensar las mayores dificultades técnicas que tiene su realización.

Diagnóstico individual

De los múltiples métodos propuestos para este diagnóstico podemos resaltar los siguientes:

- 1) Métodos basados en la investigación de aglutinógenos.
- 2) Métodos basados en la investigación de los grupos plasmáticos.
- 3) Grupos enzimáticos eritrocitarios.
- 4) Grupos leucocitarios.
- 5) Polimorfismos de ADN.

Actualmente el diagnóstico del sexo se aborda a partir del análisis de ADN para lo que se han descrito diferentes métodos:

- Estudio del gen de la amelogenina. Este gen se encuentra localizado en los cromosomas sexuales, y presenta la peculiaridad de que es de diferente tamaño en los cromosomas X y en los Y, lo que va a hacer distinguir entre sexo masculino y femenino.
- Amplificación de STRs (secuencias cortas en tándem) correspondientes al cromosoma Y. Si se consigue la amplificación y estudiar los alelos es evidente que se trata de una muestra de procedencia masculina.
- Análisis del gen SRY. Este gen, que se encuentra también en el cromosoma Y, ha demostrado a partir de diferentes investigaciones, su utilidad para determinar el sexo en muestras forenses.

Data de una mancha de sangre. La antigüedad de una mancha de sangre sólo puede establecerse con grandes márgenes de error. Una técnica, ya antigua, es la de valorar la velocidad de elución de la mancha en un líquido diluyente, otra es el estudio de la degradación de las fracciones proteicas. Gisbert e Iborra estudiaron el test de difusión de cloruros.

La edad de una mancha de sangre ha sido establecida por Rajamannar mediante inmunoelectroforesis:

De 10 a 15 días. Presencia de gammaglobulina β_2 M, β_2 B, β_2 C y β_1 , y ausencia de otras proteínas séricas.

De 30 a 45 días. β_2 M, y ausencia de globulina.

De 60 días. Sólo hay gammaglobulina, β_2 y β_1 globulina.

De 150 días. Sólo hay gammaglobulina y β_1 globulina.

Por último y recurriendo de nuevo a la PCR, también se ha propuesto como posibilidad utilizar la relación entre el mRNA y el rRNA para calcular la data puesto que se ha demostrado que la relación entre ambos tipos de RNA varía de forma lineal con la edad de la mancha. La ventaja de este método consiste en que puede ser aplicado sobre muestra muy pequeñas y además de que puede abordarse a la vez que el análisis de ADN.

2.4. Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad se calcula en paneles de muestras positivas preclasificadas y representan el porcentaje de muestras que verdaderamente resultaron positivas. El valor diagnóstico de un procedimiento es la capacidad de diferenciar entre dos situaciones clínicas como enfermedad y salud o entre dos o más enfermedades. También se define la sensibilidad como la capacidad de un método diagnóstico para detectar como negativas aquellas muestras que realmente no poseen el analito en estudio.

La especificidad analítica es la capacidad que tiene un procedimiento de medición de producir una señal que sólo se relaciona con la presencia de la cantidad del analito que se investiga, independiente de la composición de la matriz. Debe calcularse en paneles de muestras negativas o de personas sanas preclasificadas. Representa el porcentaje de muestras verdaderamente con resultados negativos o con ausencia del analito. La especificidad se puede estudiar agregando a la muestra algunas sustancias que se sospecha que reaccionan de la misma manera que el componente estudiado y comparar estadísticamente los resultados analíticos con o sin agregado. La especificidad es la capacidad de un método diagnóstico para detectar como positivas aquellas muestras que realmente poseen el analito en estudio.

3. FIJACIÓN, RECOLECCIÓN, EMBALAJE, TRANSPORTE Y CADENA DE CUSTODIA

Deben describirse lo más completo y claro que sea posible, señalando situación, tamaño, aspecto, número, etc., de cada una de estas manchas. Es una regla de oro de la investigación criminal que el esquema y la fotografía deben preceder a cualquier actuación.

En la colección de indicio y tratándose de muestras de sangre, al recogerla del lugar de los hechos, de la víctima o del victimario, se debe observar lo siguiente:

- a) Si las manchas o huellas de sangre se encuentran en ropas o telas, deben transportarse cuidadosamente embaladas al laboratorio, evitando su contaminación.
- b) Cuando las manchas o huellas de sangre, proceden de fuentes diferentes, pero del mismo escenario del hecho, deben ser embaladas por separado y etiquetarlas señalando el lugar preciso de donde fueron recogidas.
- c) Las manchas frescas existentes en ropas, telas o tejidos, antes de embalarlas deben ser puestas a secar o de lo contrario entrarán en proceso de putrefacción.
- d) Para secar las manchas de sangre frescas, las ropas de que se habla, deben ser puestas a secar en una atmósfera ventilada que no esté expuesta al sol o calor.

Las manchas de sangre que presenta el cadáver también deben ser ubicadas, catalogadas y detalladas en sus formas y tamaño, fijar a través de fotografías en el mismo lugar del hecho, antes de mover el cuerpo.

En general, cuando el soporte lo permite, se procede al raspado con un cuchillo o elemento similar. Sobre madera muy dura se efectuará el mismo procedimiento, pero si ésta fuera blanda es preferible efectuar un corte en ella por la parte inferior, retirando la porción que se encuentra maculada.

Si estuviera sobre tierra o elemento similar se levantará una porción de ese material maculado, tratando de que sea lo suficientemente amplio (mas no excesivo) como para mantener la mancha.

Sobre tejidos tales como alfombras, tapices, etc. se hará el corte del lugar correspondiente y cuando ello fuere posible se colocará debajo del mismo un papel secante blanco químicamente puro o papel filtro; luego por medio de un gotero se deja caer solución salina fisiológica, hasta que traspase al elemento cuestionado y el secante o papel colocado en su parte inferior absorba buena cantidad del material a analizar. Después se dejará secar, previo a su embalaje y remisión.

Las ropas ensangrentadas deben ser secadas al aire, en lugar cubierto y donde no haya corrientes, nunca deben emplearse ventiladores o calor artificial. Luego de esto serán envueltas en papel limpio o dispuestas en cajas de cartón, cuidando de no mezclar las ropas de la víctima con las del imputado, y de ser posible embalarlas todas separadamente. Se tratará de evitar los plegados excesivos en dichas ropas con el objeto de no provocar el resquebrajamiento de las zonas maculadas y así producir la pérdida de partículas de sangre seca.

Los demás elementos como hachas, cuchillos, armas de fuego, machetes, barretas, etc., deberán ser puestos en cajones de madera o de cartón duro y fuerte.

La sangre recogida aún líquida con jeringa estéril o pipeta limpia, como se ha dicho, debe ser colocada en tubos de ensayo o frascos de vidrio herméticamente cerrados, sin adosárseles ninguna sustancia, algunos autores sugieren colocar la muestra con solución salina (0.85% de NaCl en agua destilada), tapar el tubo de ensayo e invertir dos o tres veces con el propósito de mezclar la sangre con la solución. También se pueden utilizar para su recogida algún material absorbente como pequeños fragmentos de 2 X 2 cm de tala blanca y limpia sin apresto, humedecidas con solución salina (0.85%) colocada en un tubo de ensayo y en otro tubo otro fragmento de tela, preparado de la misma forma, que servirá de control de una zona del soporte no manchada con sangre, igual se pueden usar gasas o hisopos estériles, dejándolos secar a temperatura ambiente antes de almacenar.

Las raspaduras o residuos de sangre seca también serán envasados en tubos de ensayo o frascos de vidrio. Nunca serán puestos en sobres o envueltos en papel, ya que puede originarse la pérdida de partículas, sea por las esquinas del sobre o bien por los pliegues del papel. Se pueden recolectar con un pedazo de tela de algodón humedecida en agua destilada y sostenida con una pinza. Después de la recolección, la muestra se coloca dentro de un tubo de ensayo seco y sin tapar, con el fin de que la mancha se seque al aire.

Es de hacer constar que todos estos elementos deben estar rotulados con indicación de la causa, del perito encargado de la recolección, orden de averiguación, de quién, según el caso, es la víctima y el imputado, la fecha de recolección.

Con respecto a la sangre enviada se puede, en general, solicitar lo siguiente:

- 1) Si se trata de sangre.
- 2) Diagnóstico específico: especie animal a la que corresponde la sangre.
- 3) Diagnóstico individual: demostrando que la sangre es humana, determinar a qué individuo pertenece
- 4) Grupo sanguíneo al que pertenece.

- 5) Diagnóstico del sexo del individuo de quien procede la sangre y de la región anatómica en que se produjo la hemorragia.
- 6) Si se encuentran mezclados con ella otros elementos. En caso afirmativo, de cuáles se trata.
- 7) Data de una mancha de sangre
- 8) Método empleado en cada estudio.

La metodología más idónea para llevar a cabo el trabajo pericial en el lugar de los hechos es la siguiente:

- 1) Interpretación in situ antes de manipular nada. Una correcta valoración de la prueba indiciaria exige su estudio dentro del contexto del lugar en que se ha desarrollado el delito. La observación debe ser minuciosa y objetiva, para lo que constituye un auxiliar valioso la realización de esquemas y, sobre todo, de fotografías o videos, tomados desde diversos ángulos para fijar la posición de los vestigios. Las distancias entre los diversos objetos deben medirse para evitar las distorsiones que crean las fotografías, lo que se logra usando testigos métricos. En esta observación se centrará la atención sobre los objetos que aparezcan desplazados o situados en lugares anómalos. Si hay manchas de sangre, pintura, etc., se anotará su distribución, dirección y caracteres.
- 2) Recogida. Nunca se insistirá bastante sobre la importancia de esta etapa, cuya correcta realización acredita al buen perito. La diferente naturaleza de los indicios que pueden encontrarse hace que deba emplearse una metodología variada, distinta para cada caso. Como decía Simonin, el perito tiene en este punto oportunidad para poner a prueba su sagacidad, experiencia e imaginación. Con relación a los lugares, los posibles indicios varían sensiblemente, por ejemplo en los vehículos hay que buscar manchas orgánicas, inorgánicas, fragmentos de vidrio, muestras de pintura, etc. Si el sospechoso es sometido a examen, se realizará un meticuloso estudio criminalístico. Además de los datos de identidad, se examinarán los pelos de la cabeza y las uñas. Se tomarán muestras de todos los elementos orgánicos que pueden ser material de comparación o control. Sangre, pelos de la cabeza y pelos del pubis, si está implicado en un atentado al pudor.

Si las características del crimen sugieren la presencia de manchas de sangre y éstas no son visibles, se afinará al máximo su búsqueda en la oscuridad con la luz ultravioleta, que visualiza las manchas en color negro, salvo que estuviesen alteradas por ácidos fuertes, casos en que dan fluorescencia roja por transformación en derivados porfirínicos.

Todos los indicios recogidos deben ser cuidadosamente envasados y etiquetados. Las manchas de sangre que asienten sobre una superficie absorbente deben enviarse completas; si no es posible, se realizará una prueba in situ. Si la mancha asienta sobre un sustrato no absorbente y forma costra, se raspará ésta con sumo cuidado y se envasará en un recipiente adecuado.

ETIQUETADO

Todos los contenedores de muestras deben tener una etiqueta firmemente adherida con los siguientes datos:

1. Número de averiguación o expediente.
2. Fecha y hora en que se recolecto la muestra.
3. Sitio de donde se tomo la muestra.
4. Naturaleza presunta del indicio.
5. Nombre del investigador que hizo el levantamiento y el embalaje, se deberá anotar en una bitácora los datos de las diferentes etiquetas para que se tome firma y sello del agente del ministerio público que recibe.



Figura 5. Ejemplo de etiquetado.

CADENA DE CUSTODIA

Significa que se debe tener la certeza, de manera documentada, de los momentos, lugares y tiempos en que permanece el indicio y de las personas que tuvieron contacto con el, incluyendo desde la toma de muestra, embalaje, transporte, análisis y posterior resguardo.

4. TÉCNICAS DE ORIENTACIÓN

4.1. Características particulares

Estas reacciones son:

- Muy sencillas tanto en lo referente a la preparación de reactivos como en el método de aplicación.
- Muy sensibles, capaces de detectar concentraciones extremadamente bajas. Son también muy efectivas en muestras antiguas y deterioradas.
- Poco específicas: como ya se ha dicho, la reacción será positiva para cualquier muestra en la que se encuentre el compuesto.

A pesar de los problemas de especificidad que presentan, estas pruebas siguen siendo imprescindibles para la localización de indicios no visibles y en el primer análisis de las muestras remitidas al laboratorio, ya que es necesario diseñar los pasos siguientes en la investigación a partir del conocimiento de la naturaleza de la muestra a estudiar.

Ponce en 1999 estudio el efecto de agentes reductores en pruebas presuntivas, usando un agente reductor representativo (ácido ascórbico) para contaminar manchas de sangre en pruebas con O-toluidina, fenolftaleína, leucomalaquita verde y tetrametilbencidina. El demostró que el ácido ascórbico produce resultados falsos negativos, aunque el grado en que las pruebas individuales son afectadas es variable.

4.2. Técnicas

Las pruebas de orientación son extremadamente sensibles, por lo que permiten demostrar trazas de sangre a diluciones del 1:200,000. Carecen, en cambio, de especificidad.

Se basan en la presencia en la sangre de peroxidasas que son capaces de descomponer un peróxido (agua oxigenada, peróxido de bario) desprendiendo oxígeno naciente que oxida a una leucobase, la leucobase oxidada cambia de color.

Entre los reactivos que se usan para preparar soluciones ácidas son: bencidina (carcinógeno), leuco-malaquita verde, tetrametilbencidina, y cristal violeta, los reactivos en soluciones básicas son: fenolftaleína, Kastle-Scheede-Meyer. Otras pruebas de orientación son las de Pierre Médinger, Théveron-Rolland.

Las pruebas de orientación más comunes son las pruebas de leucobases y se fundamentan en la presencia de peroxidasas, que son capaces de desdoblar el peróxido de hidrogeno en agua liberando oxígeno, el cual oxida a la leucobase cambiando o generando un color.

Las peroxidasas vegetales no se encuentran en el jugo, sino en las fibras del vegetal, por lo que la observación por microscopio de la muestra, podría permitir detectar la presencia de fibras extrañas y sospechar sobre la naturaleza de aquellas.

Las peroxidasas vegetales son más sensibles que las peroxidasas animales y además, se destruyen fácilmente por efecto del calor, por tal motivo para diferenciar a que tipo de peroxidasas corresponden se debe colocar el hisopo a baño María durante un minuto y posteriormente agregar las leucobases.

Reacción de Meyer. Su base es la fenolftaleína, reactivo muy alterable por lo que hay que prepararlo cuando se va a realizar la prueba, si hay sangre aparece un color rojo.

Reacción de Adler. El reactivo es una solución saturada de bencidina en alcohol o ácido acético, recientemente preparada. Si hay sangre se produce un color verde y luego una coloración azul de Prusia intenso y persistente. Se complementa con la reacción de Meyer. La bencidina sin embargo, fue reconocida como un carcinógeno por la oficina de seguridad y administración de la salud en 1974 y hoy es raramente usada en laboratorios forenses.

Reacción de Van Deen. El reactivo consiste en una solución de resma de guayaco en la siguiente proporción: 5g de resma por 100mL de alcohol al 95%. Si hay sangre se produce a los pocos segundos un color verde pálido que vira al azul claro y después al azul oscuro.

Reactivo de Thevenon y Roland: piramidon → violeta

Reactivo de Kohn-O'Kelly: ortotoluidina → verde azul. Holland en 1974 reportó que la o-toluidina fue carcinogénica en ratas.

Reactivo de Medinger: leucoverde de malaquita → verde

4.3. Falsos positivos y falsos negativos

Un resultado falso positivo se produce con muestras o manchas de leche, jugos de frutas por sales cúpricas o indicios de la presencia de cobre (para la prueba de fenolftaleína).

En la reacción de Adler son causas de error la herrumbre, las sales de hierro, las oxidasas de los cereales.

Diversas manchas vegetales (jugos de frutas, patatas, etc.) y orgánicas (heces, semen, pus, etc.) dan resultados positivos por contener catalasas o peroxidasas. Castello ha puesto de manifiesto que ciertas sustancias reductoras (vitamina C) presentes en ciertos jugos vegetales, cuando están a la concentración adecuada, podrían negativizar la reacción dando falsos negativos.

5. TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN

5.1. Características

Pruebas de confirmación o certeza

Las pruebas de certeza tradicionales son muy específicas y de poca sensibilidad. Se basan en comprobar la presencia en la muestra de alguno de los elementos formes de la sangre o bien de la hemoglobina. Con estas pruebas no se puede determinar si la sangre analizada es o no humana.

Se caracterizan por ser:

- Muy específicas. El resultado positivo de la prueba demuestra sin lugar a dudas la naturaleza de la muestra.
- Poco sensibles. Un resultado negativo puede deberse a una concentración baja del fluido a determinar en la muestra y no a su ausencia.

Entre las pruebas de certeza están las microscópicas, microquímicas, espectroscópicas, metahemoglobina, hematoporfirina, hemocromógeno, oxihemoglobina, técnica de Teichmann, la modificación de Gabriel Bertrand, la modificación de Nippe, la técnica propuesta por A. A. Bruno y P. A. Ross, las técnicas de Takayama, de Nina Asvadurova, de Gisbert Calabuig. Todos los ensayos genéricos de certeza identifican el grupo prostético de la hemoglobina, es decir, el hemo.

Técnicas microquímicas o cristalográficas se basan en la existencia de ciertos derivados de la hemoglobina que tienen tendencia a cristalizar. Estas técnicas involucran el grupo hemo de la hemoglobina, el oxígeno que transportan los eritrocitos. La estructura del grupo hemo contiene un átomo de hierro hexavalente. Cuatro de las posiciones de coordinación del hierro están unidas por átomos de nitrógeno dentro de la estructura del anillo y una posición está unida al nitrógeno de la histidina en la proteína globina. En la hemoglobina, la coordinación restante está normalmente ocupada por la unión al oxígeno. En manchas secas, estas dos últimas posiciones son usadas para la formación de los cristales que sirven como una base para confirmar la presencia de sangre. Los más importantes son las sales halogenadas de la hematina y el hemocromógeno.

En las técnicas de confirmación tal como Cristales de Teichmann o de Mina y Cristales de Takayama o hemocromógeno se somete la mancha a la acción de distintos reactivos, para obtener determinados derivados de la hemoglobina. Estos derivados forman cristales de colores y formas característicos, que pueden ser identificados por observación con un microscopio y permiten asegurar la naturaleza sanguínea de la muestra que se está analizando.

TÉCNICA DE TEICHMANN

El fundamento de la técnica de Teichmann, como las dirigidas a obtener los otros halógenos, consiste en tratar la hemoglobina en caliente con un ácido orgánico; la hemoglobina se desdobra en hem y globina, a la vez que se oxida el hierro del hem. En presencia de una sal halogenada de Cl, Br o I, se forman cristales de clorhidrato, bromhidrato o yodhidrato de hematina, respectivamente.

Cristales de Teichmann. Se aprovecha la presencia de cloruro de sodio en la sangre para la obtención del derivado halogenado de la hematina. Es necesario partir de una costra de sangre. Si la mancha asienta sobre un tejido, se macera en agua hasta conseguir una solución coloreada al máximo. Después se procede a fabricar una costra depositando la solución gota a gota sobre un cubreobjetos colocado en una platina calentada a 60 °C, en este proceso hay que evitar un calentamiento excesivo que puede coagular las proteínas, impidiendo la reacción posterior. Una vez obtenida la costra, se cubre con un portaobjetos y se le adicionan por capilaridad unas gotas de ácido acético glacial. La preparación se calienta a la flama, hasta que se inicie la ebullición del ácido acético; en este momento se retira, se deja enfriar y se añade otra gota de ácido acético, repitiendo la maniobra. Normalmente con tres ebulliciones aparecen cristales; si tras 4 o 5 ebulliciones no aparecen cristales y se ha actuado con corrección técnica, se puede dar la prueba por negativa.

La observación microscópica de la preparación nos muestra unos cristales de forma prismática alargada, de color pardo oscuro o marrón castaño, de extremidades oblicuas. Sus características cristalográficas son: estructura cristalina triclinica con ángulo de extinción de 45° y anisótopos, que dan lugar al fenómeno de pleocromismo. La prueba debe interpretarse como positiva cuando encontramos estos cristales. Si no aparecen, puede deberse a que la muestra no es sangre, a defectos técnicos en la realización (calentamiento excesivo o demasiado brusco) o a que la sangre esté alterada por tratamiento con ácidos o álcalis.

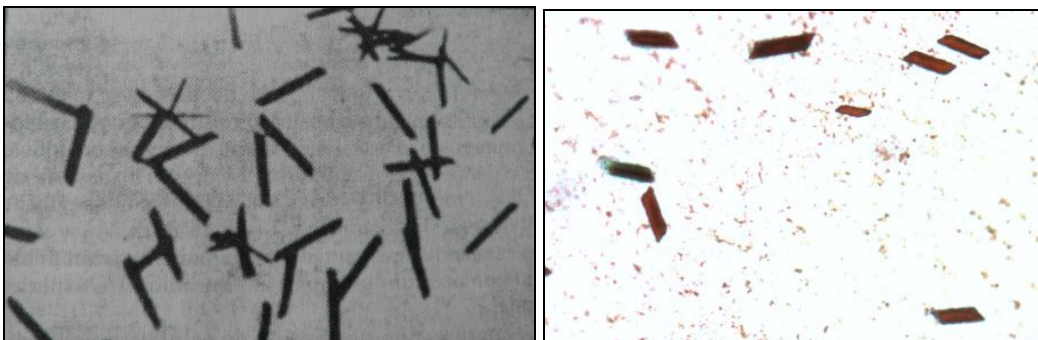


Figura 6. Cristales de Teichmann.

Modificación de Gabriel Bertrand

En 1931 este autor propuso el reactivo que se indica:

Cloruro de magnesio cristalizado	1g
Agua destilada	1mL
Glicerol a 30°	5g
Ácido acético glacial	20mL

Técnica: preparar un residuo coloreado tal como se ha señalado para la técnica de Teichmann; tratar en frío con una gota del reactivo de Bertrand y cubrir. Colocar el preparado sobre una pequeña llama calentando con cuidado durante algunos segundos en el lugar donde se encuentra el residuo, con la precaución de imprimir a la lámina un movimiento circular. Pasar por la llama la preparación varias veces en movimientos rápidos (en forma similar a la fijación de extendidos) hasta que se caliente en forma tal que no pueda sostenerse con los dedos; dejar enfriar y observar en el microscopio. Los cristales de hemina aparecen nítidamente, en elevado número, aunque en dimensiones menores a los obtenidos por las técnicas clásicas.

Modificación de Nippe

Este reactivo se prepara de acuerdo a la fórmula siguiente:

Cloruro de potasio	0.1g
Bromuro de potasio	0.1g
Ioduro de potasio	0.1g
Ácido acético	100mL

Disolver por agitación repetida, cada uno de los componentes en el orden indicado.

Técnica: al residuo sanguíneo obtenido según se ha indicado agregar una gota del reactivo y cubrir, calentar suavemente sobre micromechero hasta que aparezcan burbujas pero sin desecar; repetir el tratamiento varias veces con nuevas incorporaciones de reactivo en caso de que la preparación se deseque, dejar enfriar. La observación microscópica permite revelar los cristales característicos de los halogenuros de hemina, que suelen aparecer de mayor tamaño que los obtenidos con la técnica de Teichmann.

Técnica propuesta por A. A. Bruno y P. A. Ross

Colocar, sobre el residuo sanguíneo preparado de la manera usual, una gota de fluoruro de sodio 75M en ácido acético glacial (en 100mL de ácido acético glacial disolver 0.056g de fluoruro de sodio); calentar cuidadosamente con una llama pequeña hasta obtener una ebullición suave y homogénea; suspender el calentamiento y agregar, entre el portaobjetos y el cubreobjetos, otra gota de solución de reactivo. Dejar enfriar y observar en el microscopio; aparecen cristales prismáticos, sueltos o agrupados, de color verde amarillento claro. En general el color es similar al obtenido con los otros reactivos aunque mucho más debilitado. Las formas cristalinas son de mayores dimensiones que las obtenidas por las técnicas precedentes.

TÉCNICA DE TAKAYAMA

El hemocromógeno, a su vez, es un compuesto nitrogenado de la hematina, tras reducción. Sangres que dan reacciones negativas con el reactivo de Teichmann producen cristalizaciones positivas de hemocromógeno. La técnica es análoga a la anterior. El reactivo de cristalización se compone de una base nitrogenada, generalmente la piridina, de un agente hematinizante, la sosa (hidróxido de sodio) y de un agente reductor. Éste ha sido modificado según los diversos autores (Nina Asvadurova, Ferreira, Takayama, Gisbert Calabuig), que emplean sacarosa, glucosa o ácido ascórbico respectivamente.

El reactivo debe prepararse de la manera que sigue (Kirk):

Solución de glucosa al 10%	5mL
Solución de hidróxido de sodio al 10%	10mL
Piridina	20mL
Agua destilada, c. s. p.	100mL

La reacción del hemocromógeno no necesita calentamiento, aunque, si se sigue la técnica de Teichmann, se consiguen mejores cristalizaciones. La cristalización está en función del envejecimiento; en sangres muy viejas los cristales sólo aparecen después de horas.

Los cristales de hemocromógeno vistos al microscopio son de color naranja, tienen formas absorbentes como las hojas de pino o tabletas rómbicas, forma de roseta, haces, helechos, espinas, agujas asociadas en forma de pinceles, a veces agrupadas en estrellas y suelen entrelazarse. Si al ocular del microscopio se acopla un microespectroscopio, se verán las dos bandas de absorción de este derivado.

Según los resultados obtenidos de algunos autores, no se observan cristales en diluciones mayores a 1/1000. Un resultado negativo se puede deber a la ausencia de sangre en la muestra pero también a que su concentración es baja, a que está deteriorada o incluso, a una mala aplicación del método. Es decir, el resultado negativo no permite descartar la naturaleza sanguínea de la muestra.

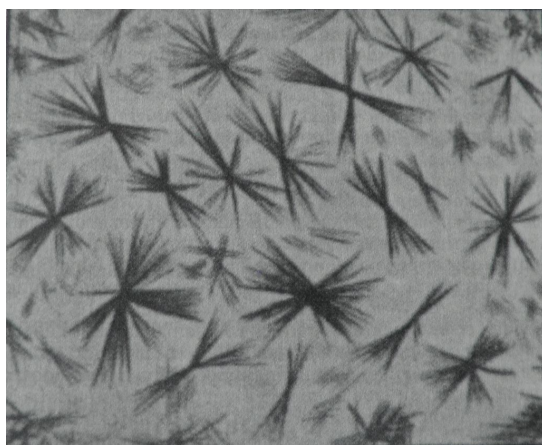


Figura 7. Cristales de Hemocromógeno.

Técnica de Nina Asvadurova

Esta fórmula presenta como variante el cambio de reductor y la concentración de sus componentes.

Reactivo:

Sulfato de hidracina	0.2g
Piridina pura	2.5g
Solución de hidróxido de sodio al 5%	10mL

Muchos especialistas sostienen que se conserva mejor que el reactivo de Takayama y la técnica operatoria es similar, obteniéndose una cristalización más regular, en tabletas rómbicas.

Técnica de Gisbert Calabuig

Este reactivo contiene ácido acético; provoca la separación cristalina del hemocromógeno en medio ácido.

Reactivo:

Ácido acético glacial	0.5mL
Piridina	1.5mL
Ácido ascórbico al 2%	1mL

TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

Las técnicas espectroscópicas permiten poner de manifiesto mediante espectros de absorción la presencia de hemoglobina y de alguno de sus derivados, como prueba de la naturaleza sanguínea de la mancha, la manera de extraer la hemoglobina de los eritrocitos ya sean frescos o secos es con agua destilada, este extracto se somete a un barrido de espectrofotometría de luz infrarroja obteniéndose dos bandas de absorbancia, cuyos máximos son de 540 y 575 nm, también se observa la banda de Soret típica de los derivados porfirínicos, próxima a la región ultravioleta teniendo valor de 412 nm. Para poder confirmar si estas bandas corresponden a la oxihemoglobina se hace reaccionar este extracto con hidróxido de sodio y como la hemoglobina es muy inestable con estos reactivos las bandas anteriores desaparecerán localizándose solo una con un máximo de absorbancia de 600 nm.

El empleo de un espectrofotómetro tipo Beckman ofrece una metodología simple y rápidos registros en relación con otras técnicas basadas en la absorbancia de la hemoglobina y sus derivados.

Diluciones de sangre hemolizada al 1:1000 observadas bajo un espesor de 10mm muestran altos valores de absorbancia en la zona correspondiente a la denominada banda de Soret.

En el diagnóstico de las manchas de sangre no basta con establecer el espectro de la hemoglobina u otro derivado; se exige que la muestra siga la marcha espectral siguiente: hemoglobina-hematina alcalina-hemocromógeno, comprobando en cada paso el espectro del correspondiente derivado.

Técnica. Se prepara una solución de la mancha en agua destilada, se filtra para que quede transparente y se somete a examen el espectro de absorción. Mejor que con los espectroscopios de visión directa es hacer el examen con un espectrofotómetro de doble haz, que permite realizar un barrido espectral con registro gráfico. La hemoglobina dará dos bandas negras en el amarillo y verde, o dos máximos de absorción en 575 y 540 nm.

Se alcaliniza a continuación la muestra con potasas y se le añaden unas gotas de piridina; la solución toma un color verde que corresponde a la hematina alcalina. Con el espectroscopio de visión directa se aprecia que las dos bandas anteriores han desaparecido y la región del amarillo está como borrosa; el registro gráfico demuestra una ancha banda de absorción a 600 nm.

A continuación se adicionan unas gotas de reductor (sulfhidrato amónico reciente), que produce un viraje del verde al color naranja por la formación de hemocromógeno. Al espectro visible aparecen dos bandas de absorción, y el registro gráfico da dos máximos de 559.5 y 530 nm.

Una sustancia que dé esta secuencia de espectro se puede identificar, sin causa de error, como sangre.

Esta prueba se considera extremadamente segura y se distingue la metahemoglobina, oxihemoglobina, carboxihemoglobina y sulfahemoglobina y da resultados con manchas viejas que al usar técnicas microcristalinas darían negativas.

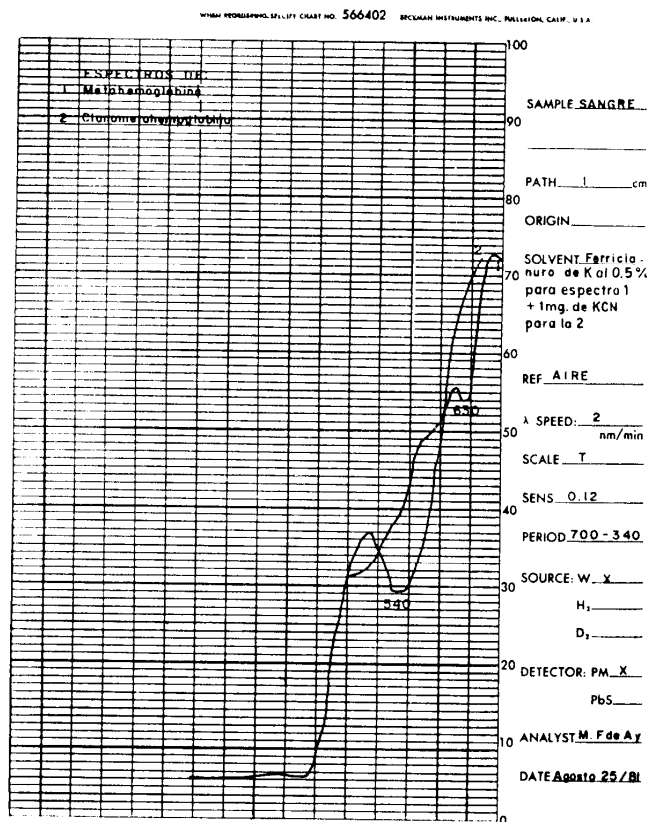


Figura 8. Espectro de metahemoglobina y cianometahemoglobina.

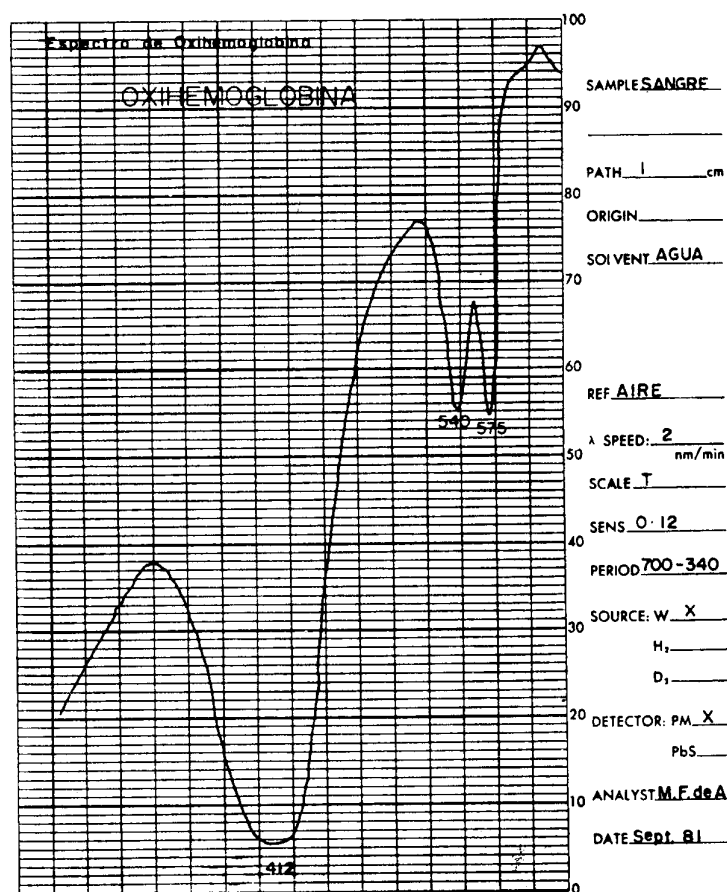


Figura 9. Espectro de oxihemoglobina.

TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

Otras pruebas de certeza son las microscópicas, que se pueden realizar por examen directo de la muestra o por examen sometida previamente a un proceso de aislamiento y tinción de los hematíes y leucocitos. Tienen como fundamento el poner de manifiesto los elementos formes de la sangre, cuya presencia demuestra sin lugar a dudas la naturaleza sanguínea de la mancha. Tienen dos grandes ventajas: si el examen de la muestra es directo, no modifica la prueba de convicción en absoluto, y cuando es diagnóstico es positivo, puede adelantar datos referentes a la especie.

La investigación directa se realiza con un microscopio especial en el que la iluminación del objeto se hace por reflexión, lo que permite la visualización de cuerpos opacos. Los hematíes aparecen en la observación microscópica como pilas de monedas. La prueba solo tiene valor si es positiva.

A menudo los elementos formes sanguíneos se rompen en la mancha y se hace imposible la investigación directa. No obstante, se han propuesto muchas técnicas para aislar y teñir los hematíes y los leucocitos en las manchas. Para el aislamiento dan los mejores resultados las

técnicas de regeneración de la mancha, mediante maceración con líquidos isotónicos o con suero sanguíneo de una sangre perteneciente al grupo AB. Regenerando los hematíes y leucocitos pueden estudiarse: bien directamente, aislando unos hilos del tejido y tiñendo, o bien centrifugando suavemente y preparando una extensión con el sedimento.

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

En las técnicas cromatográficas, se identifica la muestra de sangre mediante cromatografía en papel o sobre una capa de gel de sílice con solventes como metanol, ácido acético y agua, revelando con bencidina o sus derivados.

Esta técnica ha permitido revelar 0.7 microgramos de hemoglobina en cinco o seis microgramos de sangre.

El autor A Fiori. Considera que esta técnica es la más específica, práctica y sensible para el diagnóstico de certeza, ya que ciertos compuestos interferentes como citocromo, herrumbre, oxidantes directos y diversas sales metálicas, utilizados como reveladores en la técnica cromatográfica, no manifiestan acción alguna. Las peroxidasas vegetales son destruidas mediante tratamiento térmico previo (estufa a 100 °C durante diez a quince minutos).

Estas técnicas aprovechan la propiedad fisicoquímica de la hemoglobina, que le confiere una movilidad cromatográfica concreta cuando se desarrolla en un solvente adecuado.

Técnica. Se emplea una hoja de papel Whatman número 1, de 10X20 cm. Con un lápiz se marca la línea de partida a 4 cm de uno de los bordes. Sobre la línea de partida se colocan las siguientes muestras: mancha problema (10 μ L), hemoglobina solución al 1% (10 μ L) y hematina solución al 1% (10 μ L).

La hoja se desarrolla en una cuba de cromatografía, en metanol-ácido acético-agua (90:3:7), hasta conseguir que el solvente alcance casi el borde superior.

Una vez desarrollada, se saca de la cuba y se seca en estufa a 90 °C durante 5 minutos o a 100 o 110 °C con el fin de desactivar las peroxidasas vegetales. Se observa a la luz ultravioleta una fluorescencia roja que puede deberse a la hematorporfirina; la oxihemoglobina no tiene fluorescencia.

Se pulveriza el papel con una solución acética de bencidina y se esperan unos minutos, durante los cuales no debe aparecer ninguna coloración. Se vuelve a pulverizar con una solución al 3% de agua oxigenada, recientemente preparada. La hemoglobina y la hematina aparecen como manchas de color azul.

Si la mancha problema contenía hemoglobina o derivados, dará una mancha azul, situada al mismo nivel que los testigos. La Rf de la hemoglobina en estas condiciones es de 0.70 aproximadamente.

La cromatografía en papel puede sustituirse por cromatografía en placa fina, empleando gel de sílice, con el mismo disolvente y el mismo revelador. Tiene la ventaja de ser más rápida. Una modificación a esta técnica utiliza como líquido resolutivo una mezcla de metanol-ácido acético en relación 99:1, y como reactivo revelador: mezclar, en el momento de su

uso, volúmenes iguales de solución alcohólica o acética saturada de bencidina y agua oxigenada al 3%.

5.2. Historia de las técnicas

El primer método que se encuentra descrito, fue propuesto en 1829 por Barruel. Este investigador ideó un método que, según él, permitía distinguir la sangre humana de la animal. Consistía en hervir la sangre que se quería identificar en ácido sulfúrico. Propuso que el olor que se desprendía cuando la sangre era humana, era distinto que el que se podía percibir cuando la sangre procedía de animales; incluso, señalaba, por el olor desprendido, era posible deducir si la sangre era de hombre o de mujer. Este método, pese a su falta de rigor, fue considerado importante durante bastante tiempo.

Unos años más tarde en Cracovia Polonia en 1853, Ludwig Teichmann-Stawlsky, describió un método más riguroso, conocido como prueba de Teichmann y que se fundamentaba en la obtención de cristales característicos de derivados de la hemoglobina.

En 1861, Van Deen, propuso un método que consistía en demostrar la existencia de peroxidasa en la muestra a analizar, provocando la oxidación de la tintura de guayaco por el oxígeno y en 1863, Schönbein describió otro basado en comprobar si la muestra contenía o no catalasas añadiendo peróxido de hidrógeno.

Paralelamente, el año 1859, marcó el inicio del desarrollo de otro grupo importante de técnicas basadas en el análisis del espectro de absorción de la sangre.

Fue en 1901 cuando Paul Uhlenhuth, publicó un estudio llamado “método para diferenciar diversos tipos de sangre, y en especial, para comprobar, mediante un diagnóstico diferencial, la existencia de sangre humana”, y que fue considerado la innovación más importante de la Medicina Forense durante el siglo XIX.

En este mismo año, Landsteiner, descubre la presencia de diferentes grupos sanguíneos en humanos. Fue lo que llamó el sistema ABO. En 1902. Richter, intentó aplicar este sistema a la identificación de sangre seca, pero esto no fue posible hasta 1916, mediante una técnica desarrollada por Leone Lattes.

Kastle y Scheede en 1903 y, posteriormente, Meyer, propusieron el método basado en la oxidación de la Taleína de Fenol.

En 1904, Adler describió una técnica de identificación de sangre utilizando bencidina y, más adelante, en 1911, Von Furth, sustituyó la bencidina por leucomalaquita verde. En 1912 Ruttan y Hardisty, proponen utilizar la O-toluidina por ser un compuesto menos peligroso.

La obtención del hemocromógeno o prueba de Takayama (Masao Takayama), mediante el empleo de piridina fue realizada en 1912, y se consideró entonces como el mejor método para la identificación de la sangre. Los estudios efectuados en 1926 por Kerr y Mason

señalaron que la técnica de Takayama resultaba mucho más sensible y fácil de ejecutar que el clásico método de Teichmann.

Por otro lado, a partir de 1927, se suceden importantes descubrimientos que llevan a desarrollar métodos que permitirán el diagnóstico de especie de las manchas de sangre.

Se debe señalar como muy importante, la posibilidad de detectar los antígenos de la sangre en otros fluidos corporales como saliva y semen, descrita por Landsteiner y Levine, y simultáneamente por Yamakami.

Otro método basado en la identificación de la sangre esta vez por luminiscencia, fue descrito en 1937 por Walter Specht.

Destaca también el descubrimiento en 1940, de Landsteiner y Weiner de la existencia del factor Rh en la sangre y, en 1945, la descripción del Test de Coombs, propuesto por Coombs, Mourant y Race, para la detección de anticuerpos antiRh.

En 1949, Ouchterlony, propuso una técnica basada en la reacción antígeno-anticuerpo y en 1960, Stuart Kind utilizó un nuevo procedimiento basado en la técnica de absorción-dilución, que se podía aplicar a sangre seca.

La identificación de las manchas de sangre por resolución cromatográfica sobre papel fue propuesta por A. Fiori en 1957.

A partir de 1962, se introdujeron técnicas basadas en la luminiscencia.

Las técnicas espectroscópicas adquirieron un gran desarrollo entre los años 1970 y 1980.

En 1984, Kary Mullis describe la técnica denominada Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa), que supone un gran avance en la aplicación del estudio del ADN a la criminalística.

Un paso definitivo, que en este momento se encuentra en plena expansión, se dio en 1987 cuando Jeffreys propuso el proceso basado en la obtención de lo que se llamó la huella genética. Las investigaciones más recientes se centran en el análisis de SNPs (single nucleotid polimosfism) incluido en los genes que codifican los grupos sanguíneos.

6. NUEVAS TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN, KITS COMERCIALES

Las pruebas que tradicionalmente se utilizaban para establecer la certeza de la naturaleza sanguínea de la muestra, son cada vez menos utilizadas y están siendo sustituidas por kits comerciales que pueden detectar la hemoglobina humana. Estos kits son de uso habitual en clínica para la detección de sangre en heces, pero desde hace ya algún tiempo, se está ensayando también su uso en criminalística ya que es un método sencillo y rápido. Sin embargo y como siempre ocurre cuando se trata de muestras forenses, es necesario estudiar a fondo su eficacia en estos casos por sus particulares características.³

Estos Kits han sido diseñados, en principio, para la detección de sangre en heces. Se utilizan en clínica y por lo tanto sobre muestras controladas. Para que se puedan utilizar con muestras forenses es necesario un estudio previo de validación para conocer si son adecuados o no para este tipo de muestras de características tan particulares. Se debe tener en cuenta que los datos que presentan los fabricantes sobre sensibilidad y especificidad del kit, están referidos a su uso en muestras clínicas y no son muy extrapolables a vestigios forenses.

El uso de estos kits es muy sencillo y similar en todos ellos. Generalmente la muestra se mezcla con un líquido que actúa como transporte y unas gotas de esta mezcla se pasan al kit. La hemoglobina reacciona con compuesto conjugado formado por partículas coloreadas unidas a un anticuerpo monoclonal anti-hemoglobina humana y forma un inmunocomplejo que migra hasta encontrar un segundo anticuerpo antihemoglobina humana que captura a la hemoglobina formándose una línea coloreada que indica el resultado positivo. El conjugado continúa migrando hasta llegar a una segunda zona en la que se encuentra una línea de anticuerpos anticonjugado que lo inmovilizan formándose una segunda línea coloreada que indica que el kit ha funcionado correctamente. Es lo que se llama línea de control.

La aplicación de los kits sobre muestras forenses ha sido el objeto de estudio de los investigadores y ya se han obtenido algunas conclusiones. Por ejemplo, Hochmeister y colaboradores publicaron en 1991 un trabajo en el que se evaluaba la efectividad de algunos de los test comerciales (concretamente el OneStep ABACard, HemaTrace) en la identificación forense de sangre humana. En sus conclusiones indicaban que aunque en general son válidos para el análisis de muestras forenses, pueden haber casos en los que por las malas condiciones de la muestra (por ejemplo cuando está muy contaminada por suciedad) o por tratamientos que se le pueden haber aplicado (concretamente por secado en secadora) no se tienen buenos resultados.

Otros investigadores han descrito la posibilidad de obtener falsos positivos con semen y saliva. Para uno de los kits más utilizados, el HemaTrace, se ha comprobado que da resultados positivos para saliva y semen hasta una concentración 1/100. Para muestras más diluidas no se observa este resultado.

La conclusión que se extrae de todos estos datos es que, como es habitual con las muestras forenses, la efectividad de la prueba dependerá del estado de la muestra, su antigüedad y grado de contaminación, etc. Pero en cualquier caso el uso de los kits es una alternativa sencilla y bastante efectiva para determinar la presencia de hemoglobina humana. Como siempre se debe tener en cuenta que un resultado negativo no debe ser excluyente puesto que puede atribuirse a las malas condiciones de la muestra.

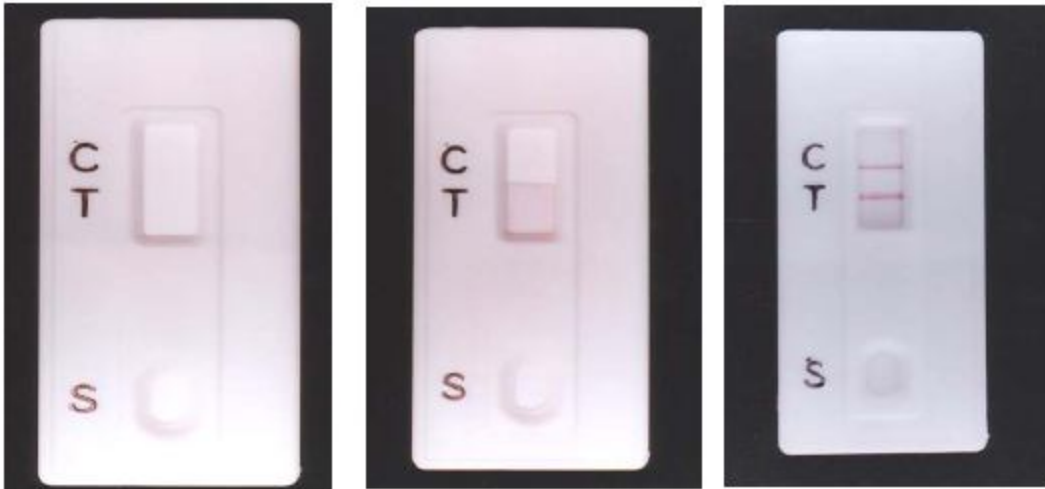


Figura 10. Ejemplo de HemaTrace.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Al presentarse en el lugar de los hechos manchas presuntamente de sangre es necesario contar con métodos que nos permitan identificar si se trata en primer lugar de manchas de sangre, de qué tipo, si es de humano o no. Siendo de humano es indispensable contar con métodos confirmatorios de identificación, por lo cual, es importante en el ámbito químico forense contar con los criterios adecuados para determinar si de acuerdo a las características de estos métodos son apropiados para tomarlos como confirmatorios.

Actualmente son pocas las técnicas empleadas como confirmatorias en manchas de sangre humana y de estas es importante revisar todas las características que justifican su uso, para que por medio de un estudio comparativo sea posible establecer y proponer cual es la más idónea a emplear en el trabajo diario, considerando para esto los reactivos, estabilidad, especificidad, analizar el proceso técnico y el tiempo en realizar la técnica.

OBJETIVOS

1. Realizar una investigación bibliográfica de las diferentes técnicas usadas en la confirmación de manchas de sangre.
2. Comparar en una tabla las características de cada una de las técnicas para lograr proponer el uso de la más idónea.
3. Establecer la importancia y características de la técnica de Teichmann.
4. Establecer la importancia y características de la técnica de Takayama o hemocromógeno.

MÉTODO

El presente estudio se realizará en la FES Zaragoza, mediante el siguiente procedimiento.

Se realizará una búsqueda bibliográfica en libros, revistas especializadas y en páginas web principalmente en el acervo de la institución, al igual que en la base de datos de la UNAM y de las dependencias que lo permitan para obtener la información que sirva a nuestro propósito, que abarque el estudio al respecto de manchas de sangre más actual, sin excluir aquella bibliografía clásica de la que no existan ediciones actuales, al igual se realizara el estudio de manera longitudinal.

La información será enfocada con prioridad a establecer las características de los métodos usados como confirmatorios, las condiciones que influyan a sus resultados, la técnica en función de reactivos y tiempo, para que con esta comparación se logre proponer si existe alguna técnica con mayor peso y mejores condiciones para emplearse como prioritaria en el trabajo rutinario del laboratorio forense.

RESULTADOS

Cuadro comparativo de las Técnicas de confirmación

TÉCNICA	CARACTERÍSTICAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS	RESULTADO
MICROSCÓPICAS	Uso de microscopio con iluminación por reflexión	Examen directo o con muestras teñidas El examen directo no modifica su posterior uso Se puede regenerar la mancha con líquidos isotónicos	Experiencia para distinguir los elementos formes de la sangre Microscopio con iluminación por reflexión Ruptura de los elementos formes	Se observan los elementos formes de la sangre Eritrocitos se observan como pilas de monedas
ESPECTROSCÓPICAS	Uso de agua destilada con la muestra Filtración	Se obtiene el espectro de la hemoglobina y sus derivados La marcha espectral asegura, sin error, la muestra como sangre Da resultados con manchas viejas que se observan negativas con técnicas microcristalinas	Equipo más sofisticado Tiempo y manejo de la técnica Tratamiento de la muestra (filtración)	Dos máximos de absorción a 575 y 540nm, banda de Soret a 412nm

CROMATOGRÁFICAS	<p>Uso de gel de sílice</p> <p>Uso de papel Whatman #1</p>	<p>Cromatografía en papel o en capa fina</p> <p>Sensibilidad permite revelar 0.7 μg de hemoglobina en 5 o 6 μg de sangre</p> <p>No se ve afectada por citocromos, herrumbre, oxidantes, sales metálicas</p> <p>Peroxidasas vegetales destruidas por tratamiento térmico previo</p>	<p>Uso de solventes</p> <p>Tiempo de la técnica</p> <p>revelado</p>	<p>Rf de la hemoglobina es aproximadamente de 0.7</p>
TEICHMANN	<p>Fijar la muestra en portaobjetos</p> <p>Se obtienen derivados de la hemoglobina</p>	<p>Uso de sales halogenadas (Cl, Br, I)</p> <p>Gotas de reactivo</p>	<p>Conservación del reactivo</p> <p>Calentamiento en llama o en placa de calentamiento</p> <p>muestra alterada con ácido o álcalis</p>	<p>Cristales prismáticos de forma alargada, color pardo oscuro o marrón castaño, de extremidades oblicuas</p>
MODIFICACIÓN DE GRABRIEL BERTRAND	<p>Fijar la muestra en portaobjetos</p> <p>Uso de glicerol y cloruro de magnesio</p>	<p>Se observa mayor cantidad de cristales</p>	<p>Calentamiento en llama</p> <p>Cristales con menor dimensión</p>	<p>Cristales prismáticos</p>

MODIFICACIÓN DE NIPPE	Uso de cloruro de potasio, bromuro de potasio e ioduro de potasio	Cristales de mayor tamaño	Calentamiento en llama hasta que aparezcan burbujas pero sin desecar	Cristales prismáticos
MODIFICACIÓN DE A.A.BRUNOY P.A. ROSS	Uso de fluoruro de sodio en ácido acético	Cristales de mayor tamaño	Calentamiento en llama	Cristales prismáticos sueltos o agrupados de color verde amarillento claro
TAKAYAMA	Se obtienen derivados de la hemoglobina El reactivo se compone de una base nitrogenada, agente hematinizante, sosa, agente reductor	Muestras que dan negativas con técnica de Teichmann dan positivas con esta técnica No necesita calentamiento	Con muestras muy antiguas los cristales aparecen en horas Según algunos autores no se observan cristales con diluciones mayores de 1/1000 Un resultado negativo puede deberse a concentraciones bajas o a muestras deterioradas	Cristales color naranja con formas absorbentes como las hojas de pino, forma de rosetas, haces, helechos, espinas o agujas asociadas en forma de pinceles, a veces agrupadas en forma de estrellas y suelen entrelazarse, tabletas rómbicas
MODIFICACIÓN DE NINA ASVADUROVA	Cambio de agente reductor y concentración de los componentes	Se conserva mejor Cristales más regulares		Cristales en forma de tabletas rómbicas
MODIFICACIÓN DE GISBERT CALABUIG	Separación del hemocromógeno en medio ácido			

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se llevo a cabo una investigación bibliográfica de las técnicas que se han usado como técnicas de confirmación.

En la técnica de Teichmann se hace referencia a la ventaja que tiene de poder emplear diversas sales halogenadas con formación de cristales característicos, el uso de pequeñas cantidades para realizar la fijación de la muestra y el uso de gotas de reactivo para realizar el procesamiento.

En la técnica de Takayama se han observado mejores resultados que con la técnica de Teichmann, uso de pequeñas cantidades para fijar la muestra y de gotas de reactivo para realizar el procesamiento, se puede omitir el calentamiento.

Se presentan en la tabla las diferentes características, ventajas, desventajas y resultado de las técnicas usadas como confirmatorias, y haciendo un análisis comparativo se observan en un principio condiciones que quizá nos orillen a pensar en emplear una técnica en particular, pero a la par de esto y pensando en las condiciones operacionales y reales en las que se usan estas técnicas, se elige proponer el uso de la técnica de Takayama porque en un inicio se puede omitir el factor de calentamiento, y si se decide calentar se obtienen mejores resultados, los equipos necesarios son una placa de calentamiento o mechero y un microscopio, la apariencia de los cristales permite una mejor identificación.

En cuanto a las demás técnicas se menciona que para las microscópicas se requiere habilidad para distinguir los elementos formes de la sangre, lo que no siempre es posible, con las técnicas espectroscópicas nos permitiríamos obtener resultados que de ser positivos efectivamente estaríamos frente a una muestra de sangre sin errores pero los tiempos, el equipo y la experiencia del personal para el análisis harían en algunos casos difícil su realización, con las técnicas cromatográficas se tiene el inconveniente del tiempo del análisis y la experiencia del personal, con la técnica de Teichmann y de acuerdo a las referencias consultadas se puede tener como técnica alternativa de análisis por el uso de diversas sales halogenadas, el uso de poca cantidad de muestra y reactivo, así como el empleo solo de un microscopio y un mechero o parrilla de calentamiento.

El empleo de los kits comerciales presenta el inconveniente de que los datos de los fabricantes sobre sensibilidad y especificidad, están referidos a su uso en muestras clínicas y no son muy extrapolables a muestras forenses. Aunque por el contrario, si se realizaran mayores análisis empleando muestras forenses se podría estandarizar y serviría mucho el poco tiempo en obtener un resultado y el análisis a la par de un control.

CONCLUSIÓN

Se realizó una investigación bibliográfica en diferentes fuentes sobre técnicas de confirmación en manchas de sangre.

Se elaboró un cuadro comparativo que sintetiza las condiciones para el análisis y los factores que influyen en el mismo.

La técnica más idónea a emplear en el laboratorio forense es la de Takayama, por todas las condiciones que implica su uso.

REFERENCIAS CONSULTADAS

1. Villanueva CE. Medicina legal y toxicología. 6 ed. España: Masson; 2004. p. 1255-70.
2. Anton BF. Manual de técnica policial. Valencia: Tirant lo Blanch; 1998. p. 127-134.
3. Verdú PF, Álvarez SM, Castello PA, Miquel FM. Del indicio a la evidencia técnicas de criminalística. Granada: Comares; 2006. p. 63-93.
4. Gaspar G. Nociones de criminalística e investigación criminal. Buenos Aires: Universidad; 2000. p. 81-90.
5. Buquet A. Manual de criminalística moderna. 2 ed. Siglo veintiuno editores; 2006. p. 74,75, 216-19.
6. Knight B. Medicina forense de Simpson. México: Manual moderno; 1994. p. 61-70.
7. Vargas AE. Medicina legal. México: Trillas; 1996. p. 40-41.
8. Stuart HJ, Jon JN. Forensic science an introduction to scientific and investigative techniques. USA: CRC Press; 2003. p. 181-198.
9. Vargas AE. Medicina forense y deontología médica ciencias forenses para médicos y abogados. México: Trillas; 1991. p. 95-97.
10. Saferstein R. Forensic science handbook. 2 ed. Vol I. Prentice hall; 2002. p. 531-535, 546-554.
11. Anita YW. Blood dynamics. Barcelona: Academic press; 2001. p. 10-14.
12. Moreno GR. Antología de la investigación criminalística. México: INACIPE; 2003. p. 47-52, 237-241.
13. Matthew EJ. Química e investigación criminal una perspectiva de la ciencia forense. España: Reverte; 2008. p. 136, 176, 177, 187, 343, 344, 351, 352, 394-400, 415.
14. Keith I, Norah R. Principles and practice of criminalistics the profession of forensic science. USA: CRC Press; 2001. p. 29-35, 214, 215, 255-257, 282-285.
15. Izaguirre AR, Michelli A. Evolución del conocimiento sobre la sangre y su movimiento parte II. Revista de Investigación clínica 2005 Ene-Feb; 57(1):85-97.
16. Lorente AJ, Lorente AM. El ADN y la identificación en la investigación criminal y en la paternidad biológica. COMARES; 1995. p. 150, 151, 166, 167.
17. Shirllyn BM. Hematología clínica. 2 ed. México: el manual moderno; 2000.
18. Franco de AM. Hematología forense y otras técnicas serológicas. 4 ed. México: Porrúa; 2002. p. 13-15, 19-40.
19. Terrence FK. Forensic evidence: science and the criminal law. USA: CRC; 2001. p. 249-267
20. Martínez MS. Medicina legal. 18 ed. México: Méndez editores; 2009. p. 347-355.
21. Maza AJ, Hernández LT, Tablada PR, Alvisa PA, Pérez BO, Currenti SH, et al. Manual de biología criminalística. Cuba: SI-MAR; 2003. p. 15-36.
22. Montiel SJ. Criminalística tomo I. México: Noriega editores; 1993. p. 85-99.
23. Nieto CR. Principios universales de hematología. México: Chromolab; 2004. p. 12-20, 67-73.

24. Hoffbrand AV, Pettit JE. Hematología básica. México: Noriega editores; 1991. p. 13-30, 95-99, 101-109.
25. Sax NI, Lewis RJ. Diccionario de química y productos químicos. España: Omega; 1993. p. 10, 11, 525, 528, 780, 825, 909.
26. Clark GL, Hawley GG. Enciclopedia de química. España: Omega; 1961. p. 1247-1252.
27. Ruiz AG. Fundamentos de hematología. México: Médica panamericana; 2003. p. 45-60, 132-152.
28. Eckert WG. Introduction to forensic sciences. 2 ed. U.S.A.: CRC Press; 1997.
29. Rohrig B. The forensics of blood. Chemmatters Feb 2008; 26(1): 4-7.
30. Pex JO. The identification and significance of hemospheres in crime scene investigation. I.A.B.P.A. Mar 2009: 8-18.
31. Adair TW, Shimamoto S, Tewes R, Gabel R. Detecting blood patterns in soil with luminol two years after deposition. I.A.B.P.A. Mar 2007: 14-19.
32. Tobe SS, Watson N, Nic N. Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA. J Forensic Sci 2007; 52 (1): 102-8.
33. Muñoz N, Castello PA, Gil PP, Verdú PF. ¿manchas de sangre?: seguridad en pruebas de orientación. Cuad Med Forense 2003; 34: 29-34.
34. Villegas MR, Acevedo ML, Miranda J, Pinto EA. Validación de técnicas para detección de sangre, sangre humana y grupo sanguíneo ABO en diferentes soportes y condiciones con fines forenses. Cuad Med Forense 2005; 11(42): 267-274.
35. Espina F, Mazziotta D. Gestión de la calidad en el laboratorio clínico. España: médica panamericana; 2005. p. 527-531.
36. Bevel T, Gardner RM. Bloodstain Pattern Analysis: With an Introduction to Crime Scene Reconstruction. 3 ed. U.S.A.: CRC Press; 2008. p. 275-296.
37. Rajamannar K. Determination of the Age of Bloodstains Using Immunoelectrophoresis J Forensic Sci Jan. 1977; 22(1): 159-164.
38. Kiely TF. Forensic evidence: science and the criminal law. U.S.A.: CRC Press; 2001. p. 249-267.