

Q.F.B. MARTHA FRANCO DE AMBRIZ

MIEMBRO FUNDADOR DE LA ACADEMIA MEXICANA DE CRIMINALÍSTICA, A. C.

PROFESORA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS PENALES.

HEMATOLOGÍA FORENSE

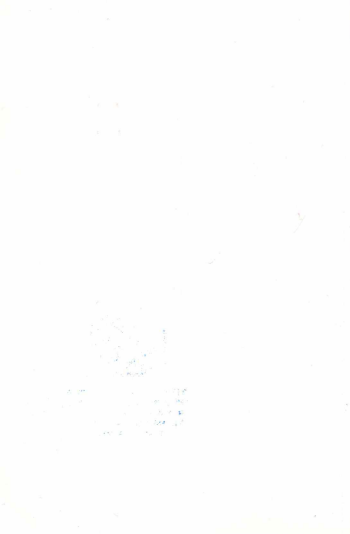
Tercera edición actualizada



EDITORIAL PORRÚA

AV. REPÚBLICA ARGENTINA 15

MÉXICO, 1999



HEMATOLOGÍA FORENSE



SUPREMO TRIBUNAL DE JUSTICIA
DEL ESTADO DE TAMAULIPAS
BIBLIOTECA
"LIC. ANICETO VILLANUEVA MIZ"
CD. VICTORIA, TAML.



BIBLIOTECA
DEL ESTADO DE TAMAULIPAS
SISTEMA FEDERAL DE BIBLIOTECAS
CALLE VICTORIA 100
C. P. 84000 TAMAULIPAS

Q.F.B. MARTHA FRANCO DE AMBRIZ

PROFESORA DE LA CÁTEDRA DE NEFROLOGÍA, HOSPITAL DE CLÍNICA, BUENOS AIRES

PROFESORA DE NEFROLOGÍA, HOSPITAL DE CLÍNICA, BUENOS AIRES

HEMATOLOGÍA HEMATOLOGÍA FORENSE FORENSE

Y OTRAS TÉCNICAS SEROLÓGICAS

Quinta edición actualizada



EDITORIAL PORRUA

CALLE BELLA VISTA ARGENTINA 12

BOGOTÁ, 1959

Q.F.B. MARTHA FRANCO DE AMBRIZ

MIEMBRO FUNDADOR DE LA ACADEMIA MEXICANA DE CRIMINALÍSTICA, A.C.
PROFESORA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS PENALES

HEMATOLOGÍA FORENSE

Y OTRAS TÉCNICAS SEROLÓGICAS

Tercera edición actualizada



EDITORIAL PORRÚA
AV. REPÚBLICA ARGENTINA 15
MÉXICO, 1999

Primera edición, 1984

Derechos reservados © 1999 por:

MARTHA FRANCO DE AMBRIZ
Prolongación Xicoténcatl 220,
C. P. 04000, México, D. F.

Las características de esta edición son propiedad de la
EDITORIAL PORRÚA, S. A. de C. V. 8
Av. República Argentina 15 altos, Col. Centro, 06020, México, D. F.

Queda hecho el depósito que marca la ley

ISBN 970-07-1750-X



IMPRESO EN MÉXICO
PRINTED IN MEXICO

ÍNDICE



PODER JUDICIAL
CENTRO DE ACTUALIZACIÓN
JUDICIAL
CD. VICTORIA TAM.

	<i>Págs.</i>
PRÓLOGO A ESTA EDICIÓN	XIII
PRÓLOGO	XV

PRIMERA PARTE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	3
3. ESTRUCTURA DEL TEJIDO SANGUÍNEO	9
4. RECOLECCIÓN Y EMBALAJE DE LAS MUESTRAS DE SANGRE	13
5. CONTROL DEL MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO EN HEMATOLOGÍA FORENSE	17
6. METODOLOGÍA GENERAL PARA LA INVESTIGACIÓN CRIMINALÍSTICA DE LAS MANCHAS DE SANGRE	19
a) Desde el punto de vista morfológico	19
b) Desde el punto de vista identificativo	23
7. TÉCNICAS DE ORIENTACIÓN PARA LA IDENTIFICA- CIÓN DE SANGRE	25
1. Técnica de la Bencidina o de Adler	25
2. Técnica de la Fenoltaleína o de Kastle-Mayer	27
3. Técnica de la Leuco malaquita verde	30
4. Técnicas Espectroscópicas	31
5. Técnica del Luminol	36
8. TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN	37
1. Cristales de Hemina o de Teichmann	37
2. Prueba de Takayama (Hemocromógeno)	38

9. TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL ORIGEN DE LA SANGRE	41
1. Introducción	41
2. Fundamento de la técnica	41
3. Factores que afectan la reacción de las Precipitinas	42
4. Técnica de Precipitinas en capilar	44
5. Recomendaciones	45
10. TÉCNICA DE INMUNOELECTROFORESIS CRUZADA PARA IDENTIFICAR SANGRE HUMANA	47
1. Fundamento	47
2. Material y equipo	47
3. Reactivos	48
4. Preparación de reactivos	48
5. Preparación de las placas	49
6. Procedimiento	50
7. Interpretación	51
11. PROCEDIMIENTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO EN SANGRE FRESCA Y EN MANCHAS DE SANGRE	53
1. Introducción	53
2. Antecedentes	53
12. DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO EN SANGRE FRESCA CON FINES FORENSES	57
1. Recolección y preparación de las muestras sujetas a estudio	57
2. Determinación del grupo sanguíneo	58
3. Determinación del grupo en tubo	58
4. Interpretación de los resultados	60
5. Determinación del grupo en placa	60

13. DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO EN MANCHAS DE SANGRE SECA.	63
1. Técnicas de absorción-elución para la determinación del grupo del sistema ABO en manchas de sangre seca	65
2. Técnica de absorción-elución para la determinación de grupo del sistema MN en manchas de sangre seca	70
3. Técnica de absorción-elución para la determinación de los factores Rh en manchas de sangre seca.	71
4. Técnica de absorción-inhibición para la determinación de grupo del sistema ABO en manchas de sangre	75
14. DETERMINACIÓN DEL GRUPO DEL SISTEMA ABH EN SEMEN Y SALIVA.	79
1. Fundamento	79
2. Preparación de los reactivos	79
3. Preparación de las células testigo	80
4. Preparación de las muestras	80
5. Aplicación de la técnica.	80
6. Interpretación.	81
15. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS Y PROTEÍNAS EN MANCHAS DE SANGRE	83
16. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADAS A LA IDENTIFICACIÓN FORENSE (ADN)	87
17. EXCLUSIÓN DE LA PATERNIDAD	95
BIBLIOGRAFÍA	99

SEGUNDA PARTE

ESTUDIO FORENSE DE MANCHAS
Y HUELLAS DE SEMEN

1. INTRODUCCIÓN	101
2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	103
3. ASPECTOS GENERALES	107
4. RECOLECCIÓN Y EMBALAJE DE LAS MUESTRAS DE SEMEN	109
5. TÉCNICAS DE ORIENTACIÓN	113
1. Fluorescencia a la luz ultravioleta	113
2. Técnica de la fosfatasa ácida	113
3. Técnica por inhibición de la fosfatasa ácida seminal y vaginal, con ácido L-tartárico	116
4. Determinación cuantitativa de la fosfatasa ácida prostática en huellas y manchas de semen ...	120
6. TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN	125
1. Descripción del espermatozoide	125
2. Técnicas de tinción	127
a) Técnica de Gram	127
b) Técnica con azul de metileno	129
c) Técnica de Christmas Tree	129
BIBLIOGRAFÍA	131

PRÓLOGO A ESTA EDICIÓN

El ejercicio de la Criminalística, impone la necesidad de un apoyo histórico o de antecedentes, de aquellos hechos que han lesionado sensiblemente al grupo social; por lo que el recuerdo de conductas delictivas, ocurridas en distintos tiempos, en el medio geopolítico que ahora conforma al país, no es ociosa o morbosa relación de delitos con características singulares o poco comunes. Con los datos consignados en este modesto trabajo, se pretende llamar la atención a los investigadores del crimen, para tratar de simplificar su investigación.

Asimismo, estos breves apuntes, son el resultado de la anotación cotidiana de datos de trabajo, en los laboratorios de criminalística de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal, a partir del renacimiento de esta ciencia en México, durante la década de los sesenta, y hasta la fecha, que día con día fueron acrecentando, optimizando y actualizando los procedimientos de investigación criminalística.

PRÓLOGO

La modesta pretensión del presente manual, es dar a conocer a los estudiosos en la materia, la problemática que encierra la serología forense y simultáneamente señalar la posibilidad de contar con una síntesis de la metodología actualizada y aplicable, en un solo volumen en español.

Se inicia con una breve historia de los estudios y descubrimientos que dieron origen a los actuales procedimientos para el análisis de la sangre en materia forense; continúa con una descripción de los elementos que en ella existen, permitiendo su identificación, y con el señalamiento del cuidadoso trato que debe darse al material utilizado, fijando después una guía para recolectar y tratar eficientemente las muestras que constituyen el problema cotidiano de la investigación criminalística.

A continuación se describe, la interpretación que debe darse a la morfología de las manchas sanguíneas, en el lugar de los hechos para poder reproducir el mecanismo de los mismos.

Asimismo se describen las técnicas existentes para la identificación preliminar de manchas de sangre; los procesos para la comprobación de su existencia, anotándose en cada uno de ellos el fundamento científico en el que apoyan su validez. Las técnicas capilar y electroforética de los sueros precipitantes para determinar la naturaleza humana de una mancha de sangre. Los procedimientos de

mayor confiabilidad para conocer el grupo sanguíneo: en sangre fresca, en la extraída a los cadáveres y en las manchas recolectadas del lugar en el que se investiga un hecho delictuoso. La determinación de las proteínas y enzimas sanguíneas, que acercan a la individualización de una mancha hemática y finalmente señala las posibilidades para afirmar la exclusión de la paternidad utilizando la moderna técnica del Acido Desoxirribonucleico (ADN).

La segunda parte se ocupa de la identificación de huellas y manchas de semen.

Se inicia también con un bosquejo histórico del problema, ocupándose en el siguiente capítulo de los aspectos químicos y estructurales del fluido seminal, señalando después una guía que marca la correcta recolección y embalaje de las muestras que van a ser objeto de estudio.

Se describen posteriormente las técnicas presuncionales de su existencia y el fundamento científico que las valida, finalizando con los procedimientos que confirman plenamente la presencia de semen "y su identificación personal".

PRIMERA PARTE

1. INTRODUCCIÓN

El primer indicio de orden criminalístico de que se tiene referencia en la historia de la humanidad es la muerte de Abel, que aparece consignado en el capítulo IV del Libro del Génesis y que a letra dice: "Caín dijo a Abel, su hermano: 'vamos al campo'. Y mientras estaban en el campo Caín se alzó contra Abel, su hermano, y le mató. Entonces dijo Yahvé a Caín: ¿Dónde está Abel tu hermano? Y contestó: No lo sé. ¿Soy yo acaso el guardián de mi hermano? Yahvé le dijo: ¡Qué has hecho! La voz de la sangre de tu hermano clama a mi desde la tierra."

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

Son cuatro los puntos cardinales que encierra la problemática de la hematología forense:

1. ¿Una mancha es o no de sangre?
2. En caso de serlo, ¿cuál es su origen: humano o animal?
3. ¿A qué grupo sanguíneo pertenece?
4. ¿De qué persona es?

2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En el siglo XII, el médico árabe Ibn-an-Na-fis, describe por primera vez la circulación menor de la sangre, en su obra *Comentarios sobre la anatomía del Canon*, de Avicena.

El aragonés Miguel Servet, cuyo verdadero nombre fue Miguel Serveto y Revés,² ha pasado a la historia por ser el autor del segundo relato y de la primera descripción impresa de la circulación menor de la sangre, que aparece publicada en 1546, en las páginas 168 a 173 del Libro V, de su *Cristianismi Restitutio*, hecho que unido a sus interpretaciones teológico-bíblicas contribuyó a que se le tildara de hereje; ocasionando a la postre que el fanatismo de Calvino lo condenara a la hoguera, en la que murió en Ginebra el 27 de octubre de 1553.

Posteriormente, en el año de 1628, nos encontramos con que Guillermo Harvey, nacido en el condado de Kent en 1578, modesto y prudente investigador, precursor de la aplicación del método experimental,³ expone su descubrimiento sobre la circulación general de la sangre en el hombre, en su obra *Exercitatio anatómica de motu cordis et sanguinis in animalibus*. Sin embargo, es hasta el año de 1818, 200 años más tarde, cuando James Blundell tiene el crédito de salvar vidas humanas por medio de transfusiones.

Los primeros estudios para la identificación de la sangre, surgen en el año de 1853, cuando el anatomista Lud-

wig Teichmann Stawlarsgy de Cracovia,²⁴ observa que la sangre tratada con ácido acético formaba cristales característicos a los que da el nombre de cristales hemínicos que más tarde son designados como de Teichmann; los que no se forman en presencia de metales oxidados o con sangre expuesta a más de 140°C.

En 1861 en Groninga, el holandés Van Deen,²⁴ observa que la hemoglobina no sólo daba color a la sangre sino que principalmente poseía la cualidad de asimilar oxígeno al circular por los pulmones y llevarla a todo el torrente sanguíneo; por lo tanto, la hemoglobina estaba en condiciones de absorber oxígeno, pero también de liberarlo; Van Deen, al realizar experiencias, nota que los extractos alcohólicos de plantas de Guayaco se teñían de azul al ponerlos en contacto con sangre y trementina. El tinte azul se debía al oxígeno y no se producía en ausencia de sangre, de donde infirió Van Deen que la hemoglobina de la sangre liberaba oxígeno de la trementina y lo pasaba al Guayaco.

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

El hecho de existir en la sangre corpúsculos rojos y blancos, dio la oportunidad de comprobar su presencia al microscopio. Desafortunadamente, esto no es posible en manchas de sangre seca y además muchos animales también los poseen; por ello desde 1859 este método se unió al análisis espectral descubierto por Kirchhoff y Bunsen, quienes desde 1861 utilizaron los espectros de absorción para detectar las bandas de absorción de la hemo-

globina. Roberto Magnanini, en 1898 señala que al tratar la sangre humana con hidróxido de potasio se formaba hematina, la que poseía un espectro diferente. El cambio se producía a diferentes velocidades según se tratara de sangre humana o de animal; con sangre humana lo obtenía en 2 minutos, con la sangre de perro en 6, con la de caballo en 3, etc. El método tenía el inconveniente de ser útil solamente con sangre fresca. José María Bastero Beguiristain publica su estudio *Nuevas aportaciones al estudio espectral de las manchas de sangre desde el punto de vista Médico Legal*, en julio de 1936.

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

En el año de 1907 Lecha Marzo efectúa también importantes investigaciones para identificación de la sangre.

Después de los estudios realizados por Teichmann, Takayama publica en 1912 su trabajo que consistía en un nuevo procedimiento para detectar sangre por medio de los cristales de piridina-hemocromógeno.

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

En 1900, Uhlenhuth ²⁴ descubre que inyectando sueros de diferentes animales o conejos, obtenía, del conejo así tratado, un suero que precipitaba, pero solamente con sangre del animal cuyo suero se había inyectado al conejo. De esta manera, si se inyectaba sangre humana a los conejos, al cabo de 4 semanas se obtenía un suero que precipitaba solamente con sangre humana. Uhlenhuth da a esta prueba el nombre de "Prueba de las Precipitinas",

constituyendo este descubrimiento, para la Medicina Forense y la Criminalística, el más grande y portentoso de los comienzos del siglo xx.

Casi paralelamente a este suceso, en el año de 1900, Karl Landsteiner, como producto de sus observaciones,²⁵ determina que cuando la sangre de un individuo es mezclada con la de otro, podía causar la formación de gránulos de forma irregular de células rojas y/o hemólisis y descubre la existencia de los grupos sanguíneos del sistema A, B, O, que son hasta la fecha los grupos antigénicos de sangre humana más importantes; actualmente ya no son solo estos tres grupos, el número ha crecido a casi 400 ¹⁰ tipos diferentes de antígenos presentes en las células rojas, los que han sido agrupados en numerosos sistemas.

El mismo Landsteiner, en colaboración con Miller, aporta el método clásico de absorción ²³ para la determinación del grupo sanguíneo del sistema A, B, O, en manchas de sangre seca en 1925, método que es descrito por Winer con el nombre de Técnica de Absorción-Inhibición y utilizado tanto para el sistema A, B, O, como para los Antígenos Eritrocitarios M, N, sistema este último descubierto junto con el P en el año de 1927 también por Landsteiner; un poco mas tarde, en 1939 en trabajos efectuados por Wiener ²⁶ se descubre el sistema Rhesus. (Rh). Ducos y Reffia en 1954 demuestran la presencia de ese sistema en sangre seca.

En 1960, Kind introduce el método de Absorción-Elución que viene a abolir el tradicional de Absorción-Inhibición para determinaciones de los grupos A, B, O; Nichols y Pereira en 1962, reportan su uso tanto para el sistema A, B, O, como para el M, N, y en 1968 Lincoln y Dodd efectúan experiencias con técnicas de elución para la detección de los antígenos del sistema Rh.

Los estudios para la individualización de la sangre, desde el punto de vista genético, aplicado a fines forenses por medio de técnicas electroforéticas, fueron hechos por B. J. Culliford⁴ de 1963 a 1967 y Benjamín W. Grunbaum⁵ de la Universidad de California, desde 1964 continúa con esos estudios en la Asociación Californiana de Criminalística.

"En el año de 1985, Alec Jeffreys, en Inglaterra, aplica por primera vez, la técnica de Biología Molecular, para identificar a un presunto responsable, relacionado con un doble homicidio y violación, comprobando su culpabilidad, por medio de Fragmentos Polimórficos de Longitud Variable, llamados VNTR, a través de la técnica denominada RFLP, que se encuentran distribuidos en el ADN humano y que son capaces de individualizar a una persona, incluso hermanos, exceptuando gemelos univitelinos".

3. ESTRUCTURA DEL TEJIDO SANGUÍNEO

La sangre es un tejido líquido que circula al través del cuerpo. Es la encargada de transportar el oxígeno a todo el organismo y de recoger el bióxido de carbono producido por los tejidos, para transportarlo al pulmón y ahí cambiarlo nuevamente por oxígeno. Constituye aproximadamente el 8% del peso corporal.

Está formada por:

- I. Partículas sólidas aproximadamente en un 50% (para el Valle de México). Éstas partículas sólidas son:

- a) Eritrocitos, células sin núcleo que se presentan en cantidad de 4.5 a 5 millones por milímetro cúbico. En su membrana o estroma, se encuentran los antígenos de los grupos sanguíneos, fosfolípidos, enzimas, etc., y en su interior contienen la hemoglobina así como sodio y potasio entre otras sustancias.

Es importante señalar que en la membrana del eritrocito ²⁰ encontramos los antígenos de los grupos sanguíneos también llamados aglutinógenos. En los eritrocitos, el grupo antigénico más inmunogénico es el del sistema ABO y le sigue el del sistema Rh^oD.



Como se observa en la ilustración, los antígenos de los grupos sanguíneos forman parte de la membrana o estroma.

- b) Los leucocitos o glóbulos blancos, en proporción de 5 a 10 mil por milímetro cúbico, están considerados como medios de defensa del organismo. Producen anticuerpos de varios tipos incluyendo anticuerpos de grupo sanguíneo.
- c) Las plaquetas o trombocitos, en cantidad de 200 a 400 mil por milímetro cúbico, participan en la coagulación de la sangre.

II. Por una fracción líquida o plasma que ocupa el 55% de su volumen. Esta fracción contiene numerosas proteínas y sales inorgánicas. Desde nuestro punto de vista es importante, ya que contiene, entre las proteínas: precipitinas, fibrinógeno, albúminas y globulinas, dentro de las cuales están la IgG, la IgM, la IgD, la 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.

Los elementos descritos en la sangre, nos permiten identificarla y efectuar la determinación del grupo sanguíneo eritrocitario.

- III. Varias enzimas ²² (fosfoglucomatasa, fosfatasa ácida eritrocitaria, adenyl kinasa y 6-fosfogluconato dehidrogenasa) y proteínas (hemoglobina y haptoglobinas), se utilizan también con fines forenses para tratar de individualizar una muestra de sangre por su frecuencia en la población.

The observed decrease in the mean sea level pressure (MSLP) over the last century is about 1 hPa, which is consistent with the observed warming of the atmosphere.

3.1. The observed decrease in the mean sea level pressure (MSLP)

The observed decrease in the mean sea level pressure (MSLP) over the last century is about 1 hPa, which is consistent with the observed warming of the atmosphere. The decrease in MSLP is about 1 hPa per century, which is consistent with the observed warming of the atmosphere. The decrease in MSLP is about 1 hPa per century, which is consistent with the observed warming of the atmosphere.

The decrease in MSLP is about 1 hPa per century, which is consistent with the observed warming of the atmosphere. The decrease in MSLP is about 1 hPa per century, which is consistent with the observed warming of the atmosphere. The decrease in MSLP is about 1 hPa per century, which is consistent with the observed warming of the atmosphere.

The decrease in MSLP is about 1 hPa per century, which is consistent with the observed warming of the atmosphere. The decrease in MSLP is about 1 hPa per century, which is consistent with the observed warming of the atmosphere. The decrease in MSLP is about 1 hPa per century, which is consistent with the observed warming of the atmosphere.

3.2. The observed increase in the mean sea level pressure (MSLP)

The observed increase in the mean sea level pressure (MSLP) over the last century is about 1 hPa, which is consistent with the observed warming of the atmosphere. The increase in MSLP is about 1 hPa per century, which is consistent with the observed warming of the atmosphere. The increase in MSLP is about 1 hPa per century, which is consistent with the observed warming of the atmosphere.

The increase in MSLP is about 1 hPa per century, which is consistent with the observed warming of the atmosphere. The increase in MSLP is about 1 hPa per century, which is consistent with the observed warming of the atmosphere. The increase in MSLP is about 1 hPa per century, which is consistent with the observed warming of the atmosphere.

4. RECOLECCIÓN Y EMBALAJE DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

“La imprescindible protección y conservación del lugar de los hechos, debe entenderse como la piedra fundamental de la investigación criminalística” nos dice el eminente criminalista Dr. L. Rafael Moreno González,¹⁴ y más adelante añade: “Para satisfacer tales exigencias es necesario que se haya respetado el lugar, y que la evidencia se haya fijado, levantado y embalado adecuadamente”.

Habiendo comprendido ampliamente el contenido de tan sabias sentencias, a continuación se hará un relato detallado de la manera correcta de tomar las muestras de sangre en el lugar de los hechos, después de que han sido adecuadamente fijadas mediante la descripción escrita, la planimetría y la fotografía.

1. En el caso de encontrar sangre líquida en el lugar de los hechos, deberá tomarse con ayuda de una pipeta Pasteur o de un gotero y depositarla en un tubo de ensayo limpio y seco, al que deberá añadirse 1 ml. de solución salina estéril por cada 5 ml. de sangre.

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

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

4. Cuando las manchas se encuentran sobre cualquier tipo de tela, se recortarán porciones representativas de la muestra, así como un trozo de la misma tela problema que no se encuentre maculado con sangre.

5. Si se trata de manchas sobre vegetales, estos se recortarán y se colocarán en el interior de un sobre. Una porción no manchada del vegetal será también recogida en otro sobre.

6. La sangre que se encuentre sobre tierra o arena deberá recolectarse tomando un trozo completo del soporte, el que se depositará cuidadosamente en una bolsa de plástico que será colocada en una caja de cartón. También se tomará una muestra de tierra sin sangre y se empaquetará por separado.

7. Si la muestra problema se encontrara impregnada en cabellos, éstos se tomarán con pinzas y se trasladarán al laboratorio dentro de pequeñas bolsas de plástico.

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

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

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

5. CONTROL DEL MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO EN HEMATOLOGÍA FORENSE

Los tubos de ensayo y pipetas a emplear deberán estar especialmente limpios; para garantizar su limpieza deberán lavarse en principio con agua fría ya que si se usa caliente, ésta puede coagular las proteínas y dejarlas adheridas al vidrio; después serán lavados con Extran u otro detergente especial para material de laboratorio. Ahora sí podrán no solo lavarse con agua caliente, sino de preferencia dejarlos por unos minutos en agua a ebullición y finalmente enjuagarlos con agua destilada a la que se añadirá fenoltaleína y se comprobará que el agua no se colorea.

La centrífuga deberá calibrarse periódicamente a 3,400 r.p.m.

La temperatura del refrigerador, de las estufas y de los baños deberá controlarse con termómetro externo, que en el interior del instrumento deberá estar sumergido en glicerina.

El laboratorio no deberá tener una temperatura superior a los 22°c.

6. METODOLOGÍA GENERAL PARA LA INVESTIGACIÓN CRIMINALÍSTICA DE LAS MANCHAS DE SANGRE

El estudio forense de manchas de sangre plantea dos problemas igualmente importantes: uno desde el punto de vista de la Criminalística de campo, con fines reconstructivos de un hecho delictuoso; el segundo, identificativo, que resuelve la inmunohematología Forense.

a) Para resolver el primero, se atiende a la morfología de las manchas en el sitio del ilícito, indicándonos los movimientos de la víctima y/o del victimario.

Al llegar al lugar de los hechos, que deberá preservarse para conservar su originalidad, se fijará, siguiendo la metodología criminalística rutinaria, para poder, después de la observación, efectuar una interpretación correcta de la dinámica del hecho; fijación que deberá seguir los siguientes pasos:

1. Tomar las fotografías necesarias, desde diferentes ángulos.
2. Describir la escena con claridad y sencillez, tomando medidas que se relacionarán con las paredes o puertas, nunca con objetos móviles.

Dibujar un croquis sencillo.

Como se podrá observar en las ilustraciones siguientes, las manchas circulares con bordes nítidos, son producidas por un cuerpo estático y a poca altura; a medi-

da que ésta aumenta, la mancha no pierde su redondez, pero si empieza a presentar bordes estrellados, con la formación de líneas radiales, que a mayor distancia comienzan a alejarse de la periferia, produciéndose la proyección de las mismas.

Las maculaciones en forma de gota alargada, corresponden a un cuerpo en movimiento y el vértice o ángulo de la gota, indica la dirección en que caminaba la víctima.

Las manchas grandes y de forma irregular, generalmente con un espacio interior en blanco, indican el sitio final en que estuvo el cuerpo del cual manaba; por esto es importante marcar con gis el contorno del cuerpo, antes de proceder al levantamiento del cadáver.

Las maculaciones por arrastramiento, aparecen irregulares y dejando una cauda.

Las manchas por proyección, se observan con numerosas salpicaduras, generalmente producidas por sangre arterial y a veces seguidas de escurrimiento.

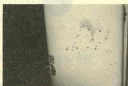
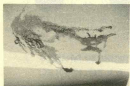
En las manchas por contacto y/o apoyo, generalmente irregulares, a veces se suelen encontrar fragmentos de huellas dactilares; o bien de manos o pies.

La presencia o ausencia de sangre sobre las manos o pies de la víctima debe valorarse para determinar si huellas de esa naturaleza proceden del victimario.

Las manchas lavadas muestran generalmente forma irregular; si el lugar es factible de obscurecerse, se recomienda utilizar un rociado con luminol para hacerlas visibles y poderlas fotografiar.



MANCHAS POR APOYO SEGUIDAS POR ARRASTRAMIENTO



MANCHAS POR PROYECCIÓN



MANCHAS POR CONTACTO

(en este caso reproducen la forma de una mano y de unos dedos)

MANCHAS POR GOTEO ESTÁTICO



a)



b)



c)

a) a 2 cm de altura

b) a 5 cm de altura

c) a 10 cm de altura



d)



e)



f)

d) a 20 cm de altura

e) a 50 cm de altura

f) a 1 m de altura



g)



h)



i)

g) a 2 m de altura

h) a 2.5 m de altura

i) a 3 m de altura

MANCHAS PRODUCIDAS POR GOTEO DINÁMICO



El vértice de las manchas, indica la dirección que seguía la víctima.

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

1. TÉCNICAS DE ORIENTACIÓN

- a)* Reacción de la bencidina.
- b)* Reacción de la fenoltaleína reducida.
- c)* Reacción de la leuco malaquita verde.
- d)* Técnicas espectroscópicas.
- e)* Técnica del Luminol, para detectar manchas lavadas y/o decoloradas.

2. TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN

- a)* Cristales de hemina.
- b)* Cristales de hemocromógeno.

3. TÉCNICAS PARA DETERMINAR EL ORIGEN DE LA SANGRE

- a)* Reacción de las precipitinas en capilar.
- b)* Inmunoelectroforesis cruzadas.

4. DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO

- a)* En sangre fresca.
- b)* En manchas de sangre seca.

5. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS Y PROTEÍNAS

6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADAS A LA IDENTIFICACIÓN FORENSE. (ADN).

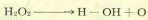
La oxidación de la bencidina es responsable de la propiedad para la identificación de sangre. La bencidina es un compuesto químico que se encuentra en la sangre. La oxidación de la bencidina produce un compuesto azul que se utiliza para la identificación de sangre.

7. TÉCNICAS DE ORIENTACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SANGRE

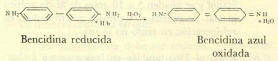
1. TÉCNICA DE LA BENCIDINA O DE ADLER

1.1. FUNDAMENTO QUÍMICO

Las peroxidasas sanguíneas son catalasas que, como su nombre indica, poseen actividad catalítica (enzimática) en las reacciones de oxidación, ya que tienen la propiedad de descomponer el peróxido de hidrógeno u otros peróxidos orgánicos, produciendo liberación de radicales oxhidrilo según la siguiente reacción:



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



La oxidación de la bencidina es utilizada como prueba presuntiva para la identificación de sangre. La técnica tiene una sensibilidad de 1,300,000 a 500,000.

Un resultado negativo excluye la presencia de sangre; si la reacción es positiva requiere, como toda técnica de orientación, del empleo de reacciones de confirmación ya que se pueden obtener falsas reacciones positivas con otras sustancias que tengan actividad semejante a la de las peroxididasas o bien con otros materiales oxidantes:

<i>Plantas</i>	<i>Productos biológicos</i>	<i>Otras sustancias</i>
Manzanas	Médula ósea	Herrumbre
Albaricoque	Leucocitos	Formol
Espárragos	Tejido cerebral	Estiércol
Frijol	Líquido espinal	Sulfato de cobre
Acelgas	Intestino	Dicromatos
Remolacha	Hígado	Permanganato de
Zarzamora	Pulmón	potasio
Alcachofa	Saliva	Algunos blanquea-
Papa	Moco	dores
Nabo	Pus	

1.2. PREPARACIÓN DEL REACTIVO:

a) Solución de bencidina:

0.25 g. de bencidina se disuelven en 175 ml. de etanol y se añaden 5 a 10 gotas de ácido acético glacial. Se guarda en un frasco gotero ámbar, en refrigeración en tanto no se usa.

b) H_2O_2 al 3%; también en frasco gotero ámbar.

1.3. PROCEDIMIENTO:

Humedecer un hisopo con H_2O destilada y frotarlo sobre la mancha problema.

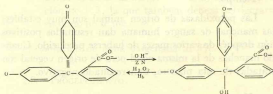
Añadir al hisopo 1 ó 2 gotas de solución de benidina, después de unos momentos de observar que no dé coloración con ésta, poner la misma cantidad de H_2O_2 sobre el hisopo.

En caso positivo aparecerá rápidamente una coloración azul.

2. TÉCNICA DE LA FENOLFTALEINA o de KASTLE-MAYER

2.1. FUNDAMENTO QUÍMICO

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



Fenolftaleina oxidada
(rosa)

Fenolftaleina reducida
(incolora)

La diferencia estriba en que:

- La fenolftaleina debe ser reducida previamente a fonolftaleina incolora y este reactivo, por su la-

bilidad, debe ser guardado en refrigeración en frascos ámbar.

- b) Se trabaja en medio alcalino en vez de en medio ácido.
- c) Se efectuará un calentamiento previo a 100°C. durante un minuto.

Se apuntará a continuación el comportamiento de las peroxidasas vegetales, que explicará el porqué de las modificaciones apuntadas:

Termolabilidad.

Se ha confirmado que todas las peroxidasas vegetales se inactivan por calentamiento a 100°C. A la misma temperatura las peroxidasas de origen animal son estables. Un periodo corto de calentamiento (un minuto a 100°C.) servirá para diferenciar una de otra.

Tiempo.

Las peroxidasas de origen animal son muy estables; las manchas de sangre humana dan resultados positivos aún después de varios meses de haberse producido. Cuando manchas de la misma edad pero de origen vegetal son tratadas de esta manera, dan resultado negativo.

pH.

Las peroxidasas de las plantas reaccionan en medio ácido, pero no en medio alcalino. Por esta razón, la técnica de Kastle-Mayer es más confiable. A pesar de esto deben efectuarse pruebas testigo sin añadir agua oxigenada a muestras previamente calentadas a 100°C.; aún así, sigue siendo solamente una técnica presuntiva.

Esta técnica de la fenolftaleína reducida es mas sensible que la de la bencidina, siendo esta sensibilidad de 1:1,000,000 a 10,000,000.

2.2. PREPARACIÓN DEL REACTIVO:

a) Solución de fenolftaleína:

Fenolftaleína	2 g.
Hidróxido de potasio	20 g.
Agua destilada	100 ml.
Polvo de zinc	20 g.

Disolver estas sustancias y colocarlas a reflujo con el polvo de zinc hasta completa decoloración. Esta solución madre deberá guardarse en un frasco ámbar en refrigeración y deberá añadirsele polvo de zinc.

b) Solución de trabajo:

Diluir la solución madre en etanol en la proporción de 1:5; la que también deberá refrigerarse en tanto no se use.

c) Solución de agua oxigenada al 3%.

2.3. PROCEDIMIENTO:

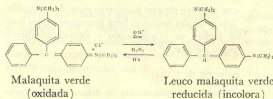
Humedecer un hisopo con solución salina, frotar la muestra problema y pasarlo a un tubo de ensayo con 2 ml. de la misma solución, calentar un minuto a 100°C., añadir unas gotas de reactivo, esperar unos segundos y agregar agua oxigenada. En caso positivo se obtendrá una coloración rosa brillante.

3. TÉCNICA DE LA LEUCO MALAQUITA VERDE

3.1. FUNDAMENTO QUÍMICO

Se basa, al igual que las anteriores, en una reacción de oxidación y reducción.

La estructura química de esta sustancia recuerda a la de la fenoltaleína. El prefijo "leuco" se refiere a la forma reducida incolora; la forma leuco puede ser preparada por reducción de la malaquita verde.



Como en el caso de la fenoltaleína, la forma leuco puede ser oxidada por la acción de las peroxidasas para dar la forma oxidada verde. Esta técnica fue reportada por Hunt, quien señala que la encontró más confiable para sangre, aunque menos sensible que la de la bencidina.

3.2. PREPARACIÓN DEL REACTIVO:

- a) Se prepara una mezcla sólida que contenga: 0.32 gr. de perborato de sodio y 0.10 gr. de malaquita verde; se mezclan perfectamente y se guardan en frasco ámbar. Esta mezcla dura un año sin perder su estabilidad.

- b) El solvente se prepara diluyendo 6.6 ml. de ácido acético glacial en 3.3 ml. de agua destilada.
- c) Preparar el reactivo de trabajo, inmediatamente antes de usarlo, disolviendo la mezcla sólida a) en la solución b). Si en el reactivo recién preparado llegara a observarse la más leve coloración verde, no deberá ser usado.

3.3. PROCEDIMIENTO:

La mancha sospechosa, se levanta con un hisopo humedecido en agua destilada y se le agregan unas gotas del reactivo recientemente preparado.

En caso positivo se observará una coloración verde.

4. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

Estas técnicas permiten poner de manifiesto, mediante espectros de absorción, la presencia de hemoglobina y/o de alguno de sus derivados, en manchas de sangre.

La hemoglobina, diluida en agua (oxihemoglobina) tiene dos bandas de absorción en la zona del espectro visible cuyos máximos se encuentran a 575 y 540 nm. respectivamente; así como la banda de Soret,¹³ típica de los derivados porfirínicos, próxima a la región del ultravioleta, que para la hemoglobina se encuentra a 412 nm., siendo esta banda mucho más ancha que las dos primeras.

En la investigación criminalística, no es suficiente con obtener el espectro de la oxihemoglobina, sino que es ne-

nesario someter la muestra a una marcha espectral. Algunos autores (J. A. Gisbert Calabuig) señalan la siguiente:

Se extrae la mancha de sangre con agua destilada, se filtra y se lleva a un espectrofotómetro ultravioleta visible de doble haz, que permita realizar un barrido espectral con registro gráfico; la hemoglobina así estudiada registra bandas de absorción a 575, 540 y 412 nm.

La muestra anterior se alcaliniza con hidróxido de potasio y se le añaden unas gotas de piridina; la solución toma un color verde que corresponde a la hematina alcalina. En el espectro se observará que desaparecen las bandas anteriores y se obtendrá en cambio una banda a 600 nm.

Posteriormente, y a ese mismo tubo, se añaden unas gotas de un reductor como el sulfhidrato de amonio recientemente preparado, formándose así el hemocromógeno, con el que se registran bandas de absorción con máximos a 559 y 530 nm.

En la práctica forense cotidiana en el laboratorio de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal, se ha comprobado que una mancha es de sangre con una metodología espectroscópica mucho más simple y rápida, procediendo como sigue:

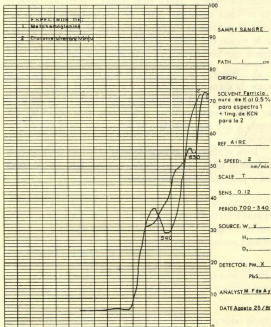
1. Impergnar un pequeño trozo de 5×5 mm. de tela limpia, sin apresto, de color blanco con la muestra problema.
2. Colocar la muestra así obtenida en un tubo de ensayo y añadirle 5 ml. de agua destilada, dejándola reposar durante 10 minutos para lograr una eficiente extracción; pasado este tiempo, filtrar.
3. Efectuar el barrido espectral en la zona del espectro visible; se obtendrán tres bandas de absorción: dos

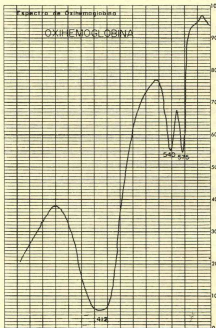
finas a 575 y 540 nm. y una banda ancha a 412. Éste es pectro corresponde a la oxihemoglobina.

4. Efectuar nuevamente la extracción de la muestra problema como se indica en el punto 2, pero utilizando en vez de agua destilada, 5 ml. de una solución de ferricianuro de potasio al 0.5%. Al realizar el barrido espectral en la región del visible, se obtendrá una banda a 630 nm., banda que corresponderá a la metahemoglobina.

5. Sobre la misma celda de muestra, añadir unos gránulos de cianuro de potasio; al efectuar el registro espectroscópico, deberá desaparecer la banda de la longitud de onda correspondiente a 630 nm. y se obtendrá una banda a 540 nm. debida a la formación de cianometahemoglobina.

Para realizar estas experiencias se utilizó un Espectrofotómetro ultra violeta-visible, modelo DK-2A de doble haz y provisto de monocromador.





SAMPLE SANGRE

PATH 1 cm

ORIGIN

SOVENT AGUA

REF AIRE

SPEED 2
nm/min

SCALE I

SENS 0.12

PERIOD 700-340

SOURCE W X

H₁

D₁

DETECTOR PM X

PbS

ANALYST M.F.deA

DATE Sept. 81

5. TÉCNICA DEL LUMINOL.*

El luminol es el 3 amino-ftalhidracina y el reactivo se prepara de la siguiente manera, en el momento de utilizarse:

Solución A.	Luminol	0.1 gr
	Carbonato de sodio	1 gr
	Agua destilada c.b.p.	100 ml
Solución B.	Hidracina hidratada al 95%	0.1 gr
	Agua destilada	100 partes

Al ml de la solución A, se añade una gota de agua oxigenada e inmediatamente después, 2 gotas de la solución B; se espera un minuto y la mezcla se asperje sobre la zona sospechosa. En caso positivo, las manchas de sangre producen luminiscencia.

Como reactivo, no altera la mancha, se puede continuar con la metodología normal.

* Técnica implantada, como rutina en el Laboratorio de Criminalística, por el Biólogo Carlos Carriedo Rico.

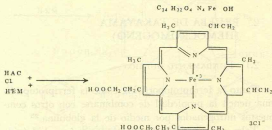
8. TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN

1. CRISTALES DE HEMINA O DE TEICHMANN

1.1 FUNDAMENTO QUÍMICO

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

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



Cloruro de ferriprotoporfirina (hemina)

1.2 PREPARACIÓN DEL REACTIVO:

Cloruro de sodio	0.1 gr.
Bromuro de potasio	0.1 gr.
Ioduro de potasio	0.1 gr.
Ácido acético c.b.p.	100 ml.

1.3 PROCEDIMIENTO:

1. Colocar la muestra problema en el centro de una laminilla de vidrio y poner encima de ella un cubreobjetos.
2. Deslizar entre lámina y laminilla, por capilaridad, unas gotas del reactivo de Teichmann.
3. Calentar lentamente y a baja temperatura la laminilla hasta evaporación.
4. Dejar enfriar y observar al microscopio.

En caso positivo se observarán cristales romboidales de color café oscuro.

2. PRUEBA DE TAKAYAMA (HEMOCROMÓGENO)

2.1 FUNDAMENTO QUÍMICO

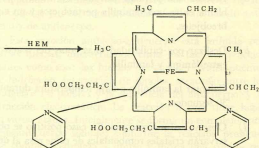
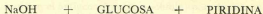
Tanto la ferroprotoporfirina como la ferriprotoporfirina tienen la propiedad de combinarse con otros compuestos nitrogenados por medio de la globulina.²²

Tales compuestos incluyen otras proteínas, hidróxido de amonio, cianuro, nicotina y piridina y los productos

resultantes se llaman hemocromógenos. Los cristales pueden formarse tanto en medio ácido como alcalino; sin embargo, el reactivo de Takayama es de naturaleza alcalina.

2.2 MECANISMO DE LA RECCIÓN

El hidróxido de sodio efectúa una hidrólisis alcalina, liberando el grupo prostético de la globina; el hierro del hem en este momento se encuentra como ión férrico (+3) debido a la formación de la metahemoglobina en el proceso de desecación de la mancha de sangre. La carga (+3) del hierro se neutraliza por el ión OH. Calentando la glucosa (a azúcar reducida), se reduce el ión férrico a ferroso (+2) y la piridina se combina con éste para formar un producto cristalino insoluble: el hemocromógeno o piridinferroprotoporfirina.



Piridinferroprotoporfirina
Hemocromógeno

La prueba es más sensible y sencilla que la de los cristales de hemina y no se dan casos de falsas reacciones positivas.

2.3 PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE TAKAYAMA

Mezclar:

Una parte de solución saturada de glucosa.

Una parte de solución de hidróxido de sodio al 10 %.

Una parte de piridina. (PM: 79.1 D = 048).

Dos partes de agua destilada.

Una vez preparada la mezcla se guarda en frasco ámbar. La solución deberá ser preparada inmediatamente antes de utilizarse.²²

2.4 PROCEDIMIENTO:

- a) Colocar una pequeña cantidad de muestra problema entre una laminilla portaobjetos y un cubreobjetos.
- b) Deslizar por capilaridad unas gotas del reactivo entre lámina y laminilla.
- c) Calentar la laminilla a baja temperatura durante 30 segundos.
- d) Observar al microscopio. En caso positivo se observarán cristales romboidales de color rosa al alrededor de la muestra.

pidamente formando partículas del tamaño suficiente como para ser insolubles y formar un precipitado visible.

Debe tenerse en mente que para que la reacción se lleve a cabo se requiere que la concentración del antígeno y del anticuerpo sean equivalentes; un exceso de alguno de los dos producirá un resultado negativo.

La reacción puede efectuarse observando la interfase entre los dos líquidos en un tubo de ensayo o en un capilar; también puede hacerse sobre gel por medio del fenómeno de difusión entre las partes reaccionantes, o bien por el método de electroforesis.

La técnica deberá ser elegida por el investigador según sus necesidades y posibilidades.

La técnica de precipitinas en tubo o en capilar, tiene la ventaja de ser rápida y sencilla pero es necesario tener una muestra clara. En ella debe efectuarse una cuidadosa estratificación en donde la capa de la solución del antígeno se encuentra sobre la preparación del anticuerpo.

La precipitación sobre gel tiene la ventaja de poder realizarse con el extracto de una mancha de sangre aunque éste sea turbio, y requiere de muy pequeña cantidad de muestra, pero tiene como desventaja el emplear varias horas para que se efectúe la difusión.

La técnica electroforética, tiene la ventaja de acelerar la difusión sobre el gel y por lo tanto disminuye el tiempo de reacción además de ser más sensible que las otras técnicas, pero requiere de un equipo más costoso.

3. FACTORES QUE AFECTAN LA REACCIÓN DE LAS PRECIPITINAS

Son varios los factores que pueden afectarla: la edad de la muestra; su exposición al aire, a la luz solar, a la

humedad y a las altas temperaturas; el grado de putrefacción y la contaminación con compuestos químicos, tales como detergentes.

Además, la reacción debe efectuarse en condiciones óptimas de temperatura, de pH, de solubilidad de la muestra y de dilución del extracto obtenido de ella.

Especialmente la edad y la putrefacción causan degradación de las proteínas de la sangre; la exposición al aire, a la luz solar y a la humedad a menudo producen cambios por oxidación.

Un efecto observado a menudo en las manchas de sangre, es que cuando han sido calentadas, se requiere una gran cantidad de tiempo para disolverlas, la precipitación es escasa y el tiempo de reacción se alarga; ello es debido a lo vulnerable que son las precipitinas al calor, el cual las desnaturaliza.

El lavado de manchas de sangre con agua que contenga jabón o detergente interfiere las reacciones positivas.

Algunos investigadores ²³ han observado falsas reacciones positivas debidas a la presencia de sales de sodio o sulfonatos que contienen los polvos para lavado. Otra posible influencia química que permite observar falsas reacciones positivas es la presencia del ácido tánico (frecuentemente presente en la corteza de los árboles), que por su pH ácido puede precipitar las proteínas del antisuero.

Es importante señalar que las proteínas séricas de una mancha de sangre seca son las responsables de las reacciones positivas de la prueba de las precipitinas y que algunos otros productos biológicos de origen humano también dan este resultado.

El extracto de la mancha de sangre debe tener un pH casi neutro y la prueba debe llevarse a cabo a la temperatura del laboratorio (aproximadamente 22°C.).

Los extractos deben prepararse en el menor volúmen posible, procedimiento que para algunas muestras requiere de 24 horas en refrigeración. El tiempo adecuado dependerá de las condiciones de la muestra y el título de la dilución deberá ser de 1 a 1,000.

4. TÉCNICA DE PRECIPITINAS EN CAPILAR

4.1. REACTIVOS.

1. Antisuero humano precipitante.
2. Solución salina fisiológica.

4.2. PROCEDIMIENTO:

Cortar un pequeño fragmento de la mancha y extraer en un tubo de ensayo de 12×75 cm. con unas gotas de solución salina fisiológica; el tiempo requerido dependerá de la naturaleza de la mancha; normalmente se requieren de 1 a 2 minutos. Si la solución está turbia es conveniente centrifugar y utilizar el sobrenadante.

Dos gotas del extracto diluido se colocan en un tubo capilar (de tal forma que el líquido humedezca la pared del tubo por lo cual es preferible hacer esto con el capilar inclinado). Una cantidad igual de antisuero se absorbe en el mismo capilar de manera que quede abajo del extracto de la muestra. El tubo se fija perpendicularmente sobre un soporte. La observación se hace con luz indirecta y sobre fondo oscuro, la aparición de un anillo de precipitación en la interfase de los dos líquidos indica reacción positiva.

El resultado se considerará positivo si la precipitación aparece antes de 20 minutos, después de ese tiempo el resultado deja de ser confiable.

5. RECOMENDACIONES

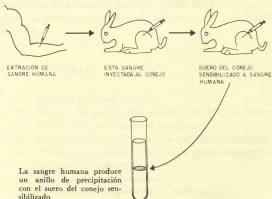
Es conveniente una vez hecha la extracción, determinar el pH con papel indicador; si la reacción no es neutra, neutralizar: NaOH al 0.1% si la reacción es ácida hasta lograr un pH neutro, o con ácido clorhídrico al 0.1% si es alcalina.

Si existen partículas en suspensión o turbidez, la muestra deberá centrifugarse hasta obtener un líquido transparente.

La dilución de la muestra problema deberá tener una concentración de 1 a 1000 misma que se controlará con un testigo a la misma dilución.

No se recomienda hacer la extracción en medio tibio o caliente.

En cuanto al antisuero precipitante aun cuando puede ser preparado en el laboratorio, es preferible obtener productos comerciales y determinar su potencia, efectuando diluciones con muestras de sangre testigo.



10. TÉCNICA DE INMUNOELECTROFORESIS CRUZADA PARA IDENTIFICAR SANGRE HUMANA

1. FUNDAMENTO

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

2. MATERIAL Y EQUIPO

1. Cámara de electroforesis.
2. Fuente de poder con control de voltaje hasta 500 v., 20 ma. y control de tiempo.
3. Puentes de papel filtro u otro material absorbente.
4. Perforador y extractor de gel de aproximadamente 2 mm. de diámetro.
5. Micropipetas graduadas.
6. Portaobjetos desgrasados y pulidos.

3. REACTIVOS

1. Suero antihumano completo.
2. Agar.
3. Ácido dietilbarbitúrico.
4. Barbital sódico.
5. Lactato de calcio.

4. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. Buffer para la cámara de electroforesis (pH 8.6).

Ácido dietilbarbitúrico	1.38 gr.
Barbital sódico	8.76 gr.
Lactato de calcio	0.384 gr.
Agua deionizada c.b.p.	1000 ml.

2. Buffer para el gel (pH 8.6).

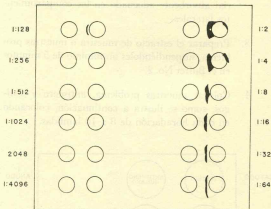
Ácido dietilbarbitúrico	1.1 gr
Barbital sódico	7.0 gr.
Lactato de calcio	1.0 gr.
Agua deionizada c.b.p.	1000 ml.

3. Gel.

Pesar 2 gr. de Gel (Difco Agar Especial) y añadir 100 ml. de agua destilada, mezclar y agregar 100 ml. de Buffer 2.

5. PREPARACIÓN DE LAS PLACAS

Sobre una superficie uniforme y perfectamente nivelada, colocar los portaobjetos y con la solución de gel, lo suficientemente caliente para facilitar su aplicación, dejar caer con una pipeta y partiendo del centro de la placa 2. 5 ml. de gel, teniendo cuidado de que su distribución en la placa sea uniforme. Una vez solidificado el gel, acomodar las placas en una caja de plástico en cuya base se ha colocado una gasa húmeda para evitar la desecación del gel; conservarlas en refrigeración un mínimo de una hora hasta el momento de su uso, las placas pueden almacenarse en estas condiciones aproximadamente durante un mes. También se pueden almacenar en el re-

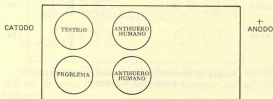


TECNICA DE PRECIPITINAS EN INMUNOELECTROFORESIS
A DIFERENTES DILUCIONES

frigerador tubos de ensayo conteniendo 7 ml. de gel (3), para ser utilizados en el momento en que se requieran, licuándolos por calentamiento y aplicando el gel sobre las laminillas portaobjetos como se indica al principio de este apartado.

6. PROCEDIMIENTO:

1. Colocar en uno de los comportamientos laterales de la cámara de electroforesis 100 ml. de Buffer No. 1.
2. Colocar los puentes de papel filtro u otro material absorbente adecuado en los compartimientos laterales.
3. Preparar el extracto de muestra o muestras problema, suspendiéndoles un mínimo de 5 minutos en el Buffer No. 2.
4. Colocar muestras problema, antisuero y testigos, como se ilustra a continuación, colocando en cada horadación de 8 a 10 lambdas.



5. Una vez aplicadas las muestras contra su anti-suero específico, se coloca la placa en la cámara de electroforesis, poniendo especial atención en que la polaridad sea la correcta.
6. Trabajar a 150 v. durante 45 minutos.

7. INTERPRETACIÓN:

Una vez terminado el periodo de corrimiento programado, observar y en caso positivo las bandas de precipitación se harán visibles en la zona comprendida entre el antígeno y el anticuerpo.

11. PROCEDIMIENTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO EN SANGRE FRESCA Y EN MANCHAS DE SANGRE

1. INTRODUCCIÓN

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

2. ANTECEDENTES

En 1901, Landsteiner descubrió la existencia del sistema ABO, al observar que la sangre humana tenía características individuales ¹⁷ que se manifestaban por reacciones de aglutinación, pues encontró que los eritrocitos o glóbulos rojos de unas personas eran aglutinados o agrupados por el suero sanguíneo de solamente algunos otros individuos. Este descubrimiento dio origen al hallazgo de otros grupos como el MN, el P, el sistema Rh y muchos más.

El grupo sanguíneo ABO sigue siendo el más importante en la actualidad. La presencia o ausencia en los eritrocitos de los antígenos de grupo sanguíneo A y B, determina los 4 grupos del sistema, por lo tanto podemos encontrar a individuos pertenecientes a los siguientes grupos: A, B, AB, y O; clasificación en la que el O denota la ausencia de A y de B.

Un hecho sobresaliente de este sistema es la presencia regular de anticuerpos anti-A ó (α) y anti-B ó (β) en el suero de individuos cuyos eritrocitos no tienen el correspondiente antígeno o aglutinógeno. El aglutinógeno de los eritrocitos y los anticuerpos contenidos en el suero son los siguientes: ²⁰

Grupo	Subgrupo	Antígenos en eritrocitos	Anti-cuerpos en suero
O	—	Ninguno	Anti-A ₁ Anti-A Anti-B
A	A ₁ A ₂	A ₁ + A A	Anti-B Anti-A ₂
B	—	B	Anti-A Anti-A ₂
AB	A ₁ B A ₂ B	A ₁ + A + B A + B	No Anti-A ₁

MEXICO						ESTADOS UNIDOS					
	Valle de México			Monterrey	INDIGENAS			Blancos (b)	Negros (b)	Asiáticos (b)	Total (f)
	(a)	(b)	(c)	Tarascos	Mixtecos	Nahuas	Mayas				
				(d)	(d)	(d)	(e)				
A ₁ A A ₂	26.5	19.7 22.9 3.2	26.01	15.32	4.65	8.14	8.87	31.51 40.59 9.08	20.62 25.81 5.19	32.94 33.24 0.90	40
B	9.0	9.32	8.98	5.64	3.10	4.07	3.45	9.30	19.21	21.39	10
A ₁ B AB A ₂ B	1.5	1.2 1.6 0.4	1.4	0.81	0.00	1.16	0.31	3.94 13.24 1.09	2.81 4.65 1.82	9.31 9.08 0.67	5
O	63.0	66.1	63.56	78.23	92.25	86.63	87.33	45.08	50.35	35.39	45
Rh +	92.0	96.53	92.45	100.00	100.00	99.27	99.50	80.43	89.76	99.33	85
MM MN		49.9 39.7		91.0	92.25	90.70		32.09 47.54	29.86 41.41	32.34 47.39	28 50
NN		10.4						19.57	28.73	19.90	22

12. DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO EN SANGRE FRESCA CON FINES FORENSES

1. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS SUJETAS A ESTUDIO:

1.1. EN PERSONAS VIVAS:

- a) Tomar 5 ml. de sangre venosa con una jeringa estéril y seca.
- b) Separar el suero por centrifugación.
- c) Hacer una suspensión del paquete globular al 2% en el propio suero de la muestra tomada, para efectuar determinaciones en tubo de ensayo y al 5% para determinaciones en placa.

1.2. EN CADÁVERES:

- a) Tomar 5 ml. de sangre de una arteria o vaso grueso o bien de la cavidad cardíaca teniendo cuidado de que no se contamine con tejido adiposo del propio cadáver.
- b) Separar el paquete globular por centrifugación.
- c) Lavar el paquete globular tres veces con solución salina fría, fresca y estéril (por lavar

glóbulos rojos se entiende: depositar una pequeña cantidad de glóbulos rojos en el fondo del tubo; llenarlo con solución salina; mezclar invirtiendo el tubo suavemente varias veces, centrifugar y desechar el sobrenadante).

- d) Hacer una suspensión de esos glóbulos al 2% en solución salina para determinaciones en tubo y al 5% para determinaciones en placa.

1.3. EN COÁGULOS:

- a) Exprimir cuidadosamente el coágulo contra las paredes de un tubo de ensayo de 13×100 , con el auxilio de un aplicador de madera.
- b) Lavar lo extraído durante tres ocasiones con solución salina.
- c) Con los glóbulos lavados, hacer suspensiones al 2% y al 5% igual que en los casos precedentes.

2. DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO

2.1. MATERIAL EMPLEADO

Centrífuga calibrada a 3,400 R.P.M.

Tubos de ensayo de 12×75 mm.

Laminillas portaobjetos o placas hemoclasificadoras.

Pipetas pasteur (con punta uniforme).

Bulbos de goma.

Aplicadores de madera.

Solución salina fresca y estéril (8.5 gr. de cloruro de sodio disueltos en 1,000 ml. de agua destilada).

Suero humano hemoclasificador

Anti-A

Anti-B

Lectina Anti-H

Anti-A₁

Anti-Rh⁰D

Anti-M

Anti-N

3. DETERMINACIÓN DEL GRUPO EN TUBO

1. Preparar suspensiones de glóbulos rojos al 2% en solución salina.

2. Colocar una gota de suero Anti-A en un tubo de ensayo marcado como A.

Una gota de suero Anti-B en un segundo tubo signado como B.

Una gota de Lectina Anti-H en un tercer tubo marcado como O.

Una gota de Anti-A₁ en el tubo 4 que se marcará como A₁.

Una gota de suero Anti-Rh⁰D en un 5º tubo al que se anotará Rh.

3. Añadir a cada tubo una gota de la suspensión de eritrocitos preparada en "1".

4. Mezclar y centrifugar 15 segundos a 3,400 R.P.M. para los primeros cuatro tubos y 90 segundos para el correspondiente al Rh.

5. Agitar suavemente para desprender el botón globular y observar microscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación.

4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Si se observa aglutinación en el tubo A; la sangre corresponderá al grupo A.

Si se observa en el tubo B, la sangre será grupo B.

Si se observa aglutinación en los tubos A y B el grupo será AB.

Si no se observa aglutinación ni en A ni en B; el grupo será O y se observará además que aglutina el tubo marcado como O.

Si aglutina el tubo A y el A₁; el grupo será A₁.

Si aglutina el tubo A y el O, el grupo será A₁.

Si se observa aglutinación en el tubo 5, la sangre será Rh positiva: si no la hay, la muestra será Rh negativa.

5. DETERMINACIÓN DEL GRUPO EN PLACA

1. Preparar suspensiones de eritrocitos al 5% en solución salina.
2. Dibujar sobre la parte superior de la placa las siguientes anotaciones: A; B; AB; O; A₁; Rh.
3. Colocar una gota de Anti-A; Anti-B; Anti-AB; Lectina Anti-H; Anti-A₁ y Anti-Rh^oD, en el mismo orden indicado para hacer las anotaciones.
4. Añadir sin mezclar y a un lado de las gotas de antisueros, una gota de suspensión de eritrocitos al 5%.

5. Mezclar la suspensión de eritrocitos con la ayuda de un aplicador de madera, con cada uno de los antisueros previamente colocados.
6. Observar macro y microscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación a los 30 segundos.
7. La interpretación será igual que en el caso anterior.

El mayor grado de confiabilidad se obtendrá si se realiza la prueba en tubo,²⁰ pero será preferible emplear las dos técnicas.

DETERMINACION DE GRUPOS SANGUINEOS

PLACA A	Estudio en glóbulos rojos			Estudio en suero	PLACA
	anti A	anti AB	anti B	Gr. A1 Gr. A2 Gr. B Gr. O control suero	
				A	
				B	
				O	
				AB	

Para caracterizar de una forma más completa una sangre, se requiere en ocasiones de la determinación de los grupos antigénicos M y N. En ese caso se procede de igual manera a la descrita en los párrafos precedentes.

13. DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO EN MANCHAS DE SANGRE SECA

El propósito de este capítulo es el de orientar al experto en hematología forense sobre la problemática especial que reviste este capítulo de la criminalística.

En muestras de sangre fresca, el problema es más simple ya que se reduce a poner en evidencia la presencia de los antígenos presentes en los glóbulos rojos mediante reacciones de aglutinación con antisueros específicos.

En manchas de sangre seca, las células se han roto y por lo tanto las pruebas de aglutinación directa no son factibles; sin embargo los antígenos del sistema ABO no se desnaturalizan tan rápidamente por la sequedad y en este sistema sobreviven durante algún tiempo y conservan la capacidad de combinarse con anticuerpos específicos. La formación de estos complejos antígeno-anticuerpo es la base de todos los métodos empleados en la detección de antígenos en el estroma de las células rojas en manchas de sangre seca.

El método tradicional de absorción-inhibición, fue utilizado para tal fin durante varios años;²² este método es menos confiable si se le compara con otras técnicas más recientes como lo es la de absorción-elución.¹³

Cuando las muestras de sangre seca se retienen sobre un buen soporte, como son fibras textiles, las partículas allí adheridas conservan eficientemente el material antigénico.

La técnica de absorción-elución²³ tiene como fundamento un primer proceso de absorción específica entre la mancha problema y su anticuerpo homólogo; después de que la absorción es completa, el excedente de anticuerpo se elimina por medio de lavados con solución salina fría. El complejo antígeno anticuerpo se disocia por calentamiento, generalmente a 56°C; el anticuerpo eluido se pone en contacto con eritrocitos lavados de propiedades antigénicas conocidas; finalmente la aglutinación indica la presencia de un antígeno de la misma especificidad que el de las células usadas como testigo conocido.



1
TRATAMIENTO CON ANTICUERPO
EL ANTICUERPO SE UNE A SU
ANTIGENO ESPECIFICO



2
EL EXCESO DE ANTICUERPO
SE REMUEVE MEDIANTE
LAVADOS



3
SI HUBO REACCIÓN Ag- Ac, UNO
Y OTRO SE SEPARAN AL ELUIR POR
CALENTAMIENTO, QUEDANDO EL Ac.
EN LA FASE LIQUIDA.



4
SE OBSERVARA AGLUTINACION SI
EL Ag PRESENTE EN LOS Gr
AGREGADOS. SE ENCUENTRA
EN LA MUESTRA PROBLEMA

Gr = Globulos rojos

Ag = Antigeno

Ac = Anticuerpo

La técnica de absorción-elución es actualmente la más satisfactoria para la determinación de grupo del sistema ABO en manchas de sangre seca y también se reporta que puede usarse para el sistema MN y para el sistema Rh, aun cuando se tiene el inconveniente, en el caso del MN, de que sus antígenos son más difícilmente detectables por la inespecificidad y mala calidad de los antisueños disponibles y en el caso del sistema Rh, se requiere de mayores cantidades de muestra por tener que estudiarse el Rh^oD, otros grupos del sistema y sus cinco subgrupos.

La técnica de absorción-inhibición debe ser empleada de todas maneras paralelamente a la anterior para la determinación del grupo en manchas de sangre, y por otra parte cabe señalar que es el procedimiento de elección en las determinaciones de grupo en saliva y líquido seminal, fluidos orgánicos en los que el antígeno se encuentra en forma soluble.

1. TÉCNICA DE ABSORCIÓN-ELUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRUPO DEL SISTEMA ABO EN MANCHAS DE SANGRE SECA

1.1. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas que con frecuencia se presentan en los laboratorios de criminalística, es el de determinar el grupo sanguíneo en sangre seca que se encuentra impregnando prendas de vestir o sobre la superficie de objetos relacionados con algún hecho de sangre.

Revisadas las técnicas que para este efecto existen hasta la fecha, se pensó que la más fácil de realizar y la más conveniente desde el punto de vista inmunológico es la de absorción-elución.

1.2. MATERIAL EMPLEADO

1. Sueros hemoclasificadores anti-A, anti-B, anti-AB y lectina anti-H.
2. Metanol.
3. Na_2HPO_4 .
4. KH_2PO_4 .
5. NaCl .
6. Tubos de ensayo de 13×10 .
7. Pipetas Pasteur.
8. Bulbos de goma.
9. Tijeras.
10. Aplicadores de madera.
11. Guantes desechables.
12. Tela estéril y sin apresto, de algodón.
13. Gradillas para tubos de ensayo de 13×100 .
14. Refrigerador.
15. Centrifuga.
16. Baño maría a temperatura constante.
17. Horno.

1.3. REACTIVOS

1. Buffer salino (solución standard).
 - a) Solución 1/15 M de Na_2HPO_4 (9.47 gr/lit).
 - b) Solución 1/15 M de KH_2PO_4 (9.08 gr/lit).

2. Buffer final:

A 72 ml. de la solución *a*), añadir 50 ml. de la solución *b*) y 8.5 gr. de cloruro de sodio Q.P. Aforar a 1,000 ml. en matraz volumétrico (pH = 7.2).

3. Preparación de los antisueños:

Los sueros anti-A y anti-B, se diluyen de la siguiente manera: a 1.0 ml. de antisuero, se añaden 10 ml. de solución buffer final.

Los sueros anti-AB y anti-H, se utilizan sin diluir.

1.4. PROCEDIMIENTO

1. Cortar cuatro fragmentos de tela impregnada con sangre problema, que medirán 3 mm. cuadrados (cuando la mancha problema no se encuentre sobre tela, absorberla con solución salina en pequeños trozos de tela de algodón de color blanco, sin apresto y esterilizada, que en caso necesario puede secarse en la estufa) y colocar cada recorte en los tubos necesarios.
2. Los tubos se colocan en una misma columna de una gradilla (como se ilustra en 4.5.), columna que se marcará como *Problema*.
3. En la forma antes descrita se prepara otra serie de tubos en cuyo interior se colocarán fragmentos de tela manchados con sangre de grupo conocido: A; B; AB y O, marcándose tal columna *Testigo*.

4. Igualmente se colocará otra serie de tubos que contengan fragmentos de una parte de tela en estudio, que no se encuentre maculada con sangre y se pondrán en una tercera columna signada como *Control*.
5. Obsérvese en el diagrama siguiente como las hileras horizontales de la gradilla se marcarán: anti-A; anti-B; anti-AB y anti-H; en cada una de ellas y en la columna correspondiente al *Testigo*, se encontrará al respectivo tubo conteniendo muestras de grupo conocido, requisito sin el cual la técnica carece de validez.

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

6. Fijar las manchas de sangre impregnadas en la tela, cubriéndolas con metanol cuando menos durante 15 minutos. Después de ese tiempo eliminarlo totalmente.
7. Agregar a cada tubo de la hilera anti-A, dos gotas de suero anti-A; a los de la hilera B, suero anti-B; a los de la hilera AB, suero anti-AB y a los de la hilera anti-H, lectina anti-H.
8. Dejar en refrigeración durante toda la noche a 4°C.
9. Lavar con solución salina fría 6 veces o hasta obtener una solución clara e incolora.

10. Añadir a cada tubo dos gotas de solución salina a temperatura ambiente.
11. Colocar la gradilla en el baño maría a 56°C. durante 10 ó 15 minutos.
12. Sacar cuidadosamente los trozos de tela con un aplicador de madera, diferente para cada tubo.
13. Agregar una gota de glóbulos lavados al 2%:

Del grupo A a los tubos de la hilera A
del grupo B a los tubos de la hilera B
del grupo AB a los tubos de la hilera AB
del grupo O a los tubos de la hilera H

(problemas, control, testigo)

14. Centrifugar durante treinta segundos a 3,400 revoluciones por minuto.
15. Observar si existe, o no, aglutinación.

1.5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

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

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

2. TÉCNICA DE ABSORCIÓN-ELUCIÓN PARA DETERMINACIÓN DE GRUPO DEL SISTEMA MN EN MANCHAS DE SANGRE SECA

Esta técnica, que debe ser realizada por un experto en la materia debido a las dificultades ya anotadas en páginas anteriores, se efectúa como sigue:

	<i>Problema</i>	<i>Testigo</i>	<i>Control</i>
anti-M		M	
anti-N		N	

1. Colocar pequeños fragmentos de tela maculada de 1.5 milímetros cuadrados: los del problema en la columna respectiva; otros maculados con sangre de propiedades antigénicas conocidas, del grupo M en la primera hilera y del grupo N en la segunda. En la columna control fragmentos de tela de las mismas dimensiones, calidad y caracte-

rísticas pero sin mácula en la columna de control.
NO FIJAR CON METANOL, como en el caso del sistema ABO.

2. Colocar una gota de anti-M sin diluir a la hilera de anti-M, y una gota también sin diluir a la hilera de tubos signada como anti-N, asegurándose de que el antisuero cubra a la muestra.
3. Dejar en refrigeración toda la noche a 4°C.
4. Aspirar y lavar con solución salina cinco veces.
5. Agregar 3 gotas de células conocidas de M a la hilera uno y de N, a la hilera dos.
6. Eluir a 56°C. durante 15 minutos.
7. Agitar mecánicamente durante 15 minutos.
8. Leer aglutinación.
9. Interpretación:

Si aglutina la hilera de anti-M, el grupo será M.
Si aglutina en la hilera de anti-N, el grupo será N.
Si aglutina en ambas hileras el grupo buscado será MN.

3. TÉCNICA DE ABSORCIÓN-ELUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES Rh EN MANCHAS DE SANGRE SECA

Para efectuar estas determinaciones es indispensable contar con una muestra de sangre fresca del grupo O que contenga los cinco antígenos del sistema Rh (R.R.),²³

3.1. PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS TESTIGO:

Estas células deberán prepararse inmediatamente antes de ser utilizadas, a partir de una muestra de sangre con las características anotadas en el párrafo anterior, lavándolas tres veces con solución salina y tratándolas posteriormente con bromelina comercial diluida 1:10 con una solución buffer pH-5.7, que se prepara como sigue:

Buffer de fosfatos pH 5.7:

14 volúmenes de Na_2HPO_4 0.2 molar.

14 volúmenes de NaH_2PO_4 0.2 molar.

15 volúmenes de agua destilada.

1. Colocar dos gotas de glóbulos lavados R_1R_2 en un tubo de 12×75 .
2. Agregar a un segundo tubo 0.1 ml. de solución de bromelina y 0.9 ml. de la solución buffer, quedando así la enzima diluida 1 a 10. Mezclar perfectamente.
3. Colocar cada tubo en la incubadora durante 5 a 6 minutos.
4. Añadir cuatro gotas de buffer con bromelina a las dos gotas del paquete globular R_1R_2 . Mezclar.
5. Colocar este tubo en la incubadora a 37 grados centígrados, exactamente durante diez minutos.
6. Sacar el tubo de la incubadora y llenarlo con solución salina estéril y fresca; centrifugar inmediatamente; de esta manera lavar con solución salina tres veces más, usando pipeta Pasteur para eliminar el sobrenadante, dejando al fondo el paquete globular y

agitando al agregar la solución salina en cada lavado.

7. Con los glóbulos lavados hacer una suspensión al 3.5%, aproximadamente.

3.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

1. Manera de efectuar las diluciones de los sueros:

- a) Diluir los sueros anti-D y anti-c, usando una gota de suero y 9 gotas de solución salina con lo que quedarán diluidos 1:10.

- b) Los sueros anti-C, anti-E y anti-e se diluirán en la proporción de 1:2, es decir, una gota de suero y una gota de solución salina.

- c) La albúmina bovina se diluirá al 1.5% con solución salina.

2. Cortar fragmentos de tela manchada tanto con sangre problema como con sangre testigo, de 3×3 mm. para los grupos c y D y de 4×4 para los grupos C, E y e.

3.3. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA

1. Colocar los fragmentos de tela en sus respectivos tubos.
2. Añadir una gota del antisuero específico en cada uno de los tubos correspondientes, a la dilución arriba indicada.

	C	<u>c</u>	D	E	<u>e</u>
Testigo Positivo					
PROBLEMA					
Testigo Negativo					

3. Tapar bien los tubos y colocar la gradilla en la que se encuentran, dentro de la incubadora a 37°C., durante toda la noche.
4. A la mañana siguiente lavar con solución salina durante dos horas, cambiando seis veces esa solución con intervalos de veinte minutos.
5. Quitar la última solución salina y agregar 3 gotas de albúmina diluida como se indica en *c*) a cada tubo, para la elución.
6. Incubar durante 40 minutos el baño de agua a 60°C., sin tapar.
7. Sacar la gradilla con los tubos del baño y rápidamente retirar las piezas de tela, con la ayuda de aplicadores de madera.
8. Agregar células testigo H-R₂ tratadas con bromelina y tapar los tubos.
9. Incubar a 37 grados centígrados durante hora y media.
10. Centrifugar durante un minuto.
11. Leer macroscópicamente y después de anotar los resultados, pasar el contenido de cada

tubo a una laminilla que contenga una gota de solución salina, mezclar y leer al microscopio, cuidando de haber anotado previamente en cada laminilla la letra correspondiente.

4. TÉCNICA DE ABSORCIÓN-INHIBICIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPO DEL SISTEMA ABO EN MANCHAS DE SANGRE

El material antígeno se coloca en contacto con su anticuerpo homólogo a fin de efectuar su absorción específica.²³ El anticuerpo en el sobrenadante, se observa con eritrocitos de propiedades antigénicas conocidas; huelga señalar la conveniencia de trabajar con testigos de grupo conocido.

4.1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN BUFFER

Solución *a*). Preparar una solución de fosfato ácido de sodio Na_2HPO_4 1/15 molar (9.47 gramos por litro).

Solución *b*). KH_2PO_4 1/15 molar (9.08 gramos por litro).

1. *Buffer final*: En un matraz volumétrico de 1,000 ml. de capacidad, colocar 72 ml. de la solución *a*); 28 ml. de la solución *b*) y aforar a 1,000 con solución salina (8.5 gr. de NaCl en 1,000 ml. de agua destilada); el pH final deberá ser de 7.2.

4.2. PREPARACIÓN DE LOS SUEROS

Anti-A: Se diluyen 3.5 ml. del suero con 450 ml. del buffer pH 7.2.

Anti-B: Diluir 1.0 ml. del suero con 450 ml. del buffer arriba señalado.

Anti-H: Se utiliza sin diluir.

Nota: En este procedimiento, el antisuero debe ser preparado titulando el antígeno ya que se prueba el anticuerpo residual, siendo por lo tanto de suma importancia la concentración inicial.

4.3. PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS CONOCIDAS

Lavar tres veces con el buffer salino pH 7.2 y hacer una suspensión al 2% con eritrocitos conocidos de los grupos O, A₂ y B.

4.4. PROCEDIMIENTO

1. Cortar fragmentos de tela impregnada de muestra problema (3 mm.²) y en hileras de tubos: anti-A, anti-B y anti-H.
2. Poner tres gotas de cada uno de los sueros en sus respectivas hileras.

	Problema	Test.	Control
Anti-A	☐	☐	☐
Anti-B	☐	☐	☐
Anti-H	☐	☐	☐

4.5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Si se observa aglutinación con Anti-A y con Anti-B, pero no con Anti-H, el grupo buscado será O.
2. Si hay aglutinación en los tubos con Anti-B y con Anti-H, pero no en el de Anti-A, el grupo será A.
3. Si no existe aglutinación con Anti-A ni con Anti-B, pero sí con Anti-H, el grupo es AB.
4. Si se obtiene aglutinación con Anti-B, pero no la hay con Anti-A ni con Anti-H, el grupo corresponderá al A.
5. Si hay aglutinación con anti-A y con anti-H, pero no con anti-B, el grupo será B.

Ejemplo:

	Testigo Negativo	O	A ₁	B	AB	A ₂
Anti-A						
Anti-B						
Anti-H						

14. DETERMINACIÓN DEL GRUPO DEL SISTEMA ABH EN SEMEN Y SALIVA

1. FUNDAMENTO

Las sustancias del grupo ABO solubles en agua, están presentes en el líquido seminal y en la saliva de los individuos secretores de tales sustancias (aproximadamente el 85% de la población en México) y pueden determinarse por el método de absorción-inhibición, ya que se encuentran en grandes concentraciones en esos individuos.

2. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Suero anti-A. Diluir 3.5 ml. de antisuero con 450 ml. de buffer salino, se deben utilizar sueros selectos.
2. Suero anti-B. Diluir 1.0 ml. del suero con 450 ml. de buffer salino.
3. Anti-H lectina. Se utiliza como viene el producto comercial.
4. Buffer salino:
 - a) Na_2HPO_4 anhidro 1/15 molar (4.47 gramos por litro).
 - b) KH_2PO_4 anhidro 1/15 molar (9.09 gramos por litro).

5. Solución final:

72 ml. de la solución *a*), más 28 ml. de la solución *b*), más 8.5 gramos de NaCl disueltos en 1,000 ml. de agua destilada. En esta forma se obtendrá un pH de 7.2.

3. PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS TESTIGO

Hacer suspensiones al 2% de eritrocitos de grupos conocidos O, A₁ y B₁ en buffer salino.

4. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Fragmentos de tela de 1×1 mm., se impregnan con la muestra problema y con los testigos. Cada uno de los fragmentos se coloca en los tubos respectivos.

	Problema	Control	Testigos
Anti-A			
Anti-B			
Anti-H			

5. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA

1. Colocar tres gotas de anti-A a la hilera de anti-A; tres gotas de anti-B en su hilera y tres gotas de anti-H en la hilera de anti-H.

2. Agitar vigorosamente.
3. Dejar que se efectúe la absorción durante toda la noche en refrigeración a 4 grados centígrados.
4. Centrifugar.
5. Remover el sobrenadante y colocarlo en una lámina hemoclasificadora.
6. Agregar una gota de suspensión de eritrocitos al 2% de A₁ en cada uno de los tubos de la hilera de anti-A; una gota de células B en la hilera de anti-B y del grupo O en la hilera de anti-H.
7. Agitar mecánicamente durante 10 a 12 minutos y esperar 9 minutos más.
8. Leer los resultados al microscopio.

6. INTERPRETACIÓN

1. Si se observa aglutinación con anti-A y con anti-B, pero no con anti-H, el grupo será O.
2. Si hay aglutinación en los tubos con anti-B y con anti-H, pero no en el de anti-A, el grupo es A.
3. Si hay aglutinación con anti-A y con anti-H, pero no con anti-B, el grupo será B.
4. Si no existe aglutinación con anti-A ni con anti-B, pero sí con anti-H, el grupo es AB.

15. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS Y PROTEÍNAS EN MANCHAS DE SANGRE

En los eritrocitos de la sangre existen una serie de sustancias que en Criminalística tienen gran importancia, debido a que su determinación incrementa el grado de probabilidad en la individualización de las manchas de sangre.

Estas sustancias son las enzimas, algunas de ellas, con un gran polimorfismo interesante desde el punto de vista forense,² cuando son separadas en los componentes proteínicos llamados isoenzimas, de las cuales son particularmente importantes: la fosfoglucomutasa PGM; la adenilatokinasa AK; la fosfatasa ácida eritrocítica EAP; la ecterasa D EsD y entre las proteínas cobra particular interés la haptoglobina Hp, especialmente porque sobrevive por un tiempo razonable en manchas de sangre seca.

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

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

En el siguiente ejemplo de una población mexicana, la probabilidad de exclusión sería del $0.776 = 77.6\%$.

Cuando sólo se determina el sistema ABO, la probabilidad es de $0.176 = 17.6\%$.

Cuando además se determina el Rh^0D , la probabilidad será del $0.456 = 45.6\%$.

Si además se efectúan las determinaciones de la PGM será de $0.601 = 60.1\%$.

Y si se afectan las separaciones de Hp, la probabilidad aumentará al 0.776 que se anota arriba.

En el párrafo anterior se han señalado porcentajes de marcadores genéticos en la población mexicana, esto quiere decir que es importante conocer las diferencias genéticas de los distintos grupos étnicos. Obsérvese el cuadro de la página 82.

El pionero de la aplicación del método de separación de enzimas en hematología forense, fue Culliford del Laboratorio de la Policía Metropolitana de Londres, quien determinó que pueden ser satisfactoriamente detectadas en manchas de sangre, por procedimientos electroforéticos sobre capas del gel de almidón; siempre y cuando se cuente con cantidad suficiente de muestra problema en buen estado de conservación, ya que la posibilidad de encontrarlas va decreciendo con la desecación en el siguiente orden: sistema ABO; sistema Rh; Hp y PGM; ésto es, que los antígenos del primer sistema pueden durar

años en condiciones de ser evidenciados; ⁴ los del sistema Rh, algunos meses; las Hp semanas y finalmente las PGM solamente después de algunos días.

Posteriormente a los estudios de Culliford ⁴ y sus colaboradores sobre gel de almidón, es Grunbaum ⁶ de la Universidad de Berkeley en California, quien se preocupa por la investigación de marcas genéticas y a él se deben las técnicas de electroforesis en Microzona y sobre tiras de acetato de celulosa, que requieren de un tiempo menor en su resolución.

TABLA DE FRECUENCIAS DEL GRUPO SANGUÍ-
NEO DEL SISTEMA ABO, RH^oD (Rh-Hr), PGM y
Hp EN CUATRO GRUPOS RACIALES

FENOTIPO

<i>Sist. ABO</i>	<i>BLANCOS</i>	<i>NEGROS</i>	<i>ASIATICOS</i>	<i>MEXICANOS</i>
O	45.7	50.34	35.39	66.09
A ₁	31.5	20.61	32.93	19.72
A ₂	9.08	5.18	0.298	3.22
B	9.29	19.22	21.38	9.32
AB	5.02	4.62	9.98	1.65

Rh^oD Rh-Hr

Rh ^o D neg.	19.58	10.23	0.67	3.46
Rh ^o D pos.	80.42	89.77	99.33	96.54

PGM

PGM 1-1	58.55	66.08	56.33	59.28
PGM 1-2	36.76	29.67	37.13	34.73
PGM 2-2	4.49	3.36	5.13	5.37
RAROC	0.187	0.87	1.0	0.62

Hp

Hp 1-1	17.90	29.15	13.39	28.13
Hp 1-2	48.60	50.97	40.18	50.71
Hp 2-2	33.48	19.22	46.33	21.03
RAROC	0.00	0.64	0.09	0.12

Ref. Grunbaum et Al. *Journal of Forensic Sciences*, Vol. 25,2
abril 1980, pp. 428-444; Rodríguez H. y col.: *Rev. Invest. Clín.*
México, 14:319.

16. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADAS A LA IDENTIFICACIÓN FORENSE (ADN)

Debido al principio de la individualidad genética, que está definida por un conjunto de marcadores genéticos que el individuo hereda de sus padres, podemos obtener lo que justificadamente se ha llamado "huella digital del ADN".

El material genético está contenido en los 46 cromosomas del núcleo celular y en el ADN mitocondrial. Este solo es heredado al hijo por la madre, ya que durante la fecundación, no pasa al óvulo, en virtud de que a él sólo entra la cabeza del espermatozoide y el ADN mitocondrial, se encuentra en el cuello de la célula espermática.

Todas las células que forman un ser humano, proceden de una sola célula, el cigoto, la cual se origina en la fertilización al unirse las células sexuales: el óvulo y el espermatozoide, que contienen cada uno de ellos, en su núcleo, 23 pares de cromosomas homólogos; 22 de ellos son autosomas y un par de cromosomas sexuales o gonosomas: XX en la mujer y XY en el hombre. Los cromosomas son los portadores de los genes, constituyéndose en estructuras celulares de gran importancia en la transmisión del material genético durante la reproducción. Se da el nombre de locus (lugar), a la ubicación exacta de un gen, en un cromosoma.

Un cromosoma está constituido por una gran mo-

lécula de ADN (Ácido Desoxirribonucleico), unidad de proteínas y contiene alrededor de 100,000 genes en promedio.

El ADN, está formado por dos cadenas en forma de hélice y contienen 4 diferentes nucleótidos: la adenina, A; la citosina, C; la guanina, G y la timina, T; las que se repiten una y otra vez, en secuencias variables a lo largo de las cadenas. Estas dos cadenas de nucleótidos que forman la hélice, están unidas entre sí, por puentes de hidrógeno.

Los genes, son fragmentos de ADN, de los cromosomas que codifican a las proteínas, las cuales intervienen integralmente en la funciones y estructuras, del conjunto de las células del cuerpo humano.

El ADN humano contiene aproximadamente entre 50 y 100 mil genes diferentes; los genes están localizados en locus particulares de los cromosomas y muchos de ellos pueden existir en formas variables llamadas alelos, que difieren en la secuencia de nucleótidos del ADN. Para el gen X, puede existir en la población, variantes en sus alelos: X1, X2, X3, X4 y cada individuo puede tener solo dos de esos alelos; uno en cada cromosoma, de un par homólogo. Si un individuo, posee dos copias idénticas, de un alelo en particular, es homocigoto, en ese locus, y si los tiene diferentes, es heterocigoto.

La identificación, por técnica que nos ocupa, se basa en la caracterización de las regiones variables o polimórficas del material genético de los individuos.

Un locus es polimórfico, si existen muchas variedades de ese gen, en la población estudiada. El 1% de las células, codifica para proteínas, o constituye genes. El 30% del genoma humano que no codifica, es porque son secuencias repetidas de ADN, llamadas minisatélites, que constan de repeticiones en tandem (conjunto de

fragmentos iguales), de una secuencia de ADN, de tamaño variable y son muy polimórficas.

Los marcadores genéticos que pueden ser útiles en la huella digital de ADN, deben ser muy polimórficos; tener una frecuencia alélica y genotípica muy baja y un gran poder de discriminación o capacidad de distinguir a dos individuos.

Los sistemas mas comúnmente usados en genética forense, hasta la fecha son: el HLA DQ alfa, el Polymarker, que tiene 5 marcadores, y el minisatélite D1S80, en total 7 marcadores, que dan un porcentaje de exclusión de 99.972%.

La herencia de los alelos de los diferentes sistemas, se da de acuerdo con las Leyes de Mendel, de la genética clásica; por lo tanto los patrones o haplotipos, pueden ser establecidos estadísticamente, de acuerdo con la frecuencia alélica y genotípica de una población dada. De ahí la importancia de contar con un eficiente banco de datos que abarque a toda la población, incluyendo las comunidades que por razones raciales o religiosas, se aíslan.

Para lograr lo hasta aquí anotado debe seguirse la siguiente metodología.

1. Extraer el material genético de las muestras problema (sangre, semen, saliva, tejido blando, tejido óseo, manchas o de células epiteliales) impregnadas en algún soporte. En virtud de que el ADN no se encuentra totalmente solo en el núcleo de las células, se aplica una lisis diferencial de tipo iónico, al adicionarle un detergente, con la finalidad de ir lisando pared celular y diferencial de centrifugación; esta operación llamada "lavado", se va repitiendo para seguir degradando de manera diferencial iónica y centrifugación, hasta llegar al núcleo y después ir degradando a las pro-

teínas provenientes del núcleo, hasta obtener el ADN de alto peso molecular y pureza, para no afectar el proceso de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Para asegurarse de la pureza del ADN se efectúa un lavado con una solución de cloroformo impregnado con fenol, para eliminar algún resto de proteínas, se mezcla perfectamente en un mezclador tipo vortex y se separa la fase acuosa, de la orgánica por medio de centrifugación. Se adiciona un volumen igual al de la fase acuosa, (que es la útil pues es donde va disuelto el ADN) de etanol absoluto frío el cual precipita al ADN. El etanol lo desplaza, ya que éste es mas soluble en agua que el ADN.

2. Una vez extraído el material genético, se cualifica y cuantifica a través de electrofóresis horizontal, que consiste en preparar una gelatina de un grosor de 0.6 cm y con una superficie de 14 cm., de largo por 11 cm., de ancho. Esta gelatina se prepara con agarosa grado proteínas, con una concentración que va del 0.8 al 1.0%, concentración que permite desplazar el ADN, a través de los sitios activos de la agarosa. Se deja desplazar únicamente 1.5 cm., a partir del origen, pues si se deja correr mas, no se puede cualificar si es o no de alto peso molecular, puesto que se lleva a cabo un barrido en el que no se observa una sola banda. Una banda bien definida a esa distancia, aseguran un ADN, de alto peso molecular.

Para cuantificar el ADN en la muestra, se puede proceder de dos formas: una de ellas se efectúa, preparando un gel de agarosa, en donde se colocan estándares de peso molecular conocido, de 50, 100, 250 y 300 ng (nanogramos por cada 10

microlitros μL) y de acuerdo a la intensidad de la banda, se extrapolan con las bandas obtenidas de las muestras problema, determinando así la concentración del material genético.

Otra forma de cuantificar el ADN, se efectúa por espectroscopía de luz ultravioleta. Las absorbancias que lo caracterizan son de 260 y 280 obviamente en la región del ultravioleta, para determinar la pureza y la concentración del material genético.

3. Después de cuantificar, se toman en promedio de 2 a 8 nanogramos de ADN para llevar a cabo la Reacción en cadena de la polimerasa. La PCR es un tipo de clonación, puesto que se trata de generar copias exactas de un fragmento específico, de algún oligonucleótido del genoma humano y de naturaleza polimórfica, esto es que tiene un alto índice de variabilidad y puede diferenciar a individuos muy parecidos.

LA PCR, consta de 30 ciclos en promedio y cada ciclo se obtiene a diferente temperatura. Las temperaturas dependen de los "primers" o cebadores; éstos se refieren a una secuencia de oligonucleótidos específica, que son, el o los moldes, que generan el fragmento que se quiere amplificar. La primera temperatura utilizada es de 90°C , donde la doble hélice de ADN, se separa en dos hebras de ADN; rompiéndose los enlaces de hidrógeno generando dos cadenas de ADN. Después se somete a una temperatura de 60°C , momento en que los "primers" o cebadores, se pegan a cada fragmento de ADN y la última temperatura, se eleva a 70°C , en donde la enzima Taq polimerasa, comienza a colocar, de acuerdo a la secuencia de los "primers", cada base púrica y piridímica,

(se encuentran en la solución, como d ATP, dCTP, dTTP y dGTP), generando a partir de una doble hélice, 2 hélices de ADN; de dos se obtienen 4 y así sucesivamente hasta completar en promedio, 30 ciclos, los que generan millones de secuencias en cuestión.

4. Al final de los ciclos programados, el producto amplificado es sometido a una temperatura final de 72°C, por un período de tiempo de 7 minutos, con la finalidad, de asegurar la unión de las cadenas de ADN formadas. Los factores que pueden afectar la amplificación son: la pureza del ADN, la concentración del mismo y la temperatura de amplificación.

5. Al FINAL DE LA Reacción en Cadena de la Polimerasa, se elabora un gel de agarosa grado PCR al 4% dependiendo de la muestra y para verificar la presencia de la misma, deberá aplicarse al gel, la llamada "escalera de peso molecular" para determinar con precisión los productos de PCR.

Una vez hecho lo anterior se determinará el genotipo de cada muestra, lo que puede lograrse utilizando cualesquiera de los siguientes procedimientos: uno de ellos es por medio de tiras Dot-Blot, que utiliza unas tiras de nylon en donde se encuentran fijadas covalentemente los oligonucleótidos específicos, en forma de cadena simple polimórfica; posteriormente se les adiciona el complemento, mismo que se distinguirá en color, cuando se unan, formándose así la doble hélice, que se identificará en forma de un color, generando un punto, que representa un alelo, 2 alelos forman un genotipo.

El otro procedimiento, consiste en efectuar una

electroforesis vertical, en gel de acrylamida. Esta técnica es mas sensible que la anterior. Los genotipos son de naturaleza alfanumérica, lo que significa que los podemos leer, unos en forma de números y otros en forma de letras. Para tal propósito, pero únicamente para la técnica de reverso de Dot-Blot, el ADN amplificado, se somete a una temperatura de 95°C, durante 8 al 15 minutos, con la finalidad de separar la doble hélice amplificada, inmediatamente se toma un volumen de 20 microlitros de este material, precalentado, mismo que se colocará en tiras. La unión entre el oligonucleótido y el ADN problema, se llevará a cabo formando un complejo, que se formará de acuerdo a las características astringentes, pH y temperatura, de las soluciones, durante todos los pasos que se llevan a cabo al efectuar la técnica del reverso del Dot-Blot. En este caso, los alelos obtenidos, se correlacionan con los obtenidos de las muestras tanto del lugar de los hechos, como los del presunto responsable, alelos que deberán ser idénticos, si se trata de la misma persona.

En los casos de paternidad, se den buscar todos los alelos que la madre y el padre heredan al hijo, ya que éste contiene una mezcla de alelos y genotipos, que al azar, ha heredado de sus padres biológicos. El menor por lo tanto, debe tener un alelo del padre y otro de la madre.

Para determinar genotipos, por medio de la electroforesis vertical, obsérvese que ésta en la parte superior presenta pozos, en los que se aplica muestra equivalente al tamaño del pozo y se aplica también un marcador de referencia, que señale los alelos presentes en la muestras. De esta manera se obtiene un patrón de bandas, que debe ser igual al de la persona que se trata de iden-

tificar; si se obtiene algún alelo diferente se puede hacer la exclusión de una manera absoluta.

Los marcadores genéticos se emplean de acuerdo a su naturaleza polimórfica, utilizando los modelos matemáticos que indican, si el valor de heterocigocidad, es mayor que el de homocigocidad. De aquí, la enorme importancia de conocer la distribución de alelos y genotipos de la población en la que se investiga y de acuerdo a la genética poblacional de un banco de datos representativo, calcular la fiabilidad de la técnica.*

* Técnica instrumentada y aplicada por el Q.F.B. M en C. Alonso Luna Vázquez, fundador del laboratorio de Genética Forense de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal, colaborando con el Ing. Miguel Oscar Aguilar Ruiz, quien promovió y obtuvo los medios de realización de dicho laboratorio.

17. EXCLUSIÓN DE LA PATERNIDAD

Con cierta frecuencia, a los laboratorios forenses se plantean problemas como:

- a) Determinar si un infante es o no hijo de X pareja.
- b) Si el padre o la madre que se le atribuye, lo es realmente
- c) Si en un hospital, por descuido, se ha cambiado a un niño por otro.

Utilizando la moderna técnica polimórfica del Acido Desoxirribonucleico (ADN), descrita en el capítulo 16, se obtendrá el máximo porcentaje de exclusión, que es del 99.972%.

Poco después del descubrimiento de Landsteiner, quedó establecida la naturaleza hereditaria de los grupos sanguíneos.²⁵ Los primeros estudios sobre consanguinidad fueron hechos por Epstein y Ottenberg en 1908 y en 1910 von Dungern y Hirszfeld sugieren que los cuatro grupos del sistema A B O, se heredan por medio de dos pares de genes alélicos independientes. En 1924, el matemático Félix Bernstein demostró que esta teoría es incorrecta.

De acuerdo con la teoría de Bernstein,²⁵ hay tres genes alélicos, los cuales han sido designados A, B y O. Hay seis genotipos que corresponden a los cuatro grupos sanguíneos:

grupo O	grupo A	grupo B	grupo AB
genotipo:	genotipos:	genotipos:	genotipo:
O/O	A/A o A/O	B/B o B/O	A/B

Lansteiner y Levine demostraron que los subgrupos de los grupos AB son hereditarios, y Thomsen, Friedreich y Worsaae modificaron la teoría de Bernstein explicando la inclusión de los subgrupos, para lo cual incluyeron cuatro genes alélicos, a saber: A_1 , A_2 , B y O. Posteriormente, para explicar la presencia del aglutinógeno raro A_2 , se tuvo que pensar en otro alelo, el A_3 y así se han tenido que hacer otras ampliaciones para explicar descubrimientos más recientes como los sistemas MN, Rh-Hr, etc.

Desde luego, el inmunohematólogo forense encargado de resolver estos problemas, debe tener un conocimiento profundo en las Leyes de la Herencia Mendeliana, ya que los antígenos de grupo sanguíneo se heredan de acuerdo con estas leyes.

Así, los resultados de *Exclusión de Paternidad*, son ciertos cuando cumplen el siguiente postulado:²

"Un gen de grupo *no* puede aparecer en un niño, a menos que esté presente en el padre, en la madre o en ambos progenitores." Ejemplo:

padres	padres	padres
O/O O/O	A/O O/O	B/O O/O
A	B	A
padres	padres	padres
A/B A/O	A/B A/B	O/O O/O
O	O	B

ninguno de estos "padres" podrían tener un hijo con el grupo señalado abajo. A esta regla se le denomina "Exclusión de primer orden".

Otra regla importante señala que: "Si uno u otro de los padres es homocigoto a un gen particular de grupo sanguíneo, su producto deberá aparecer en la sangre del hijo."

Un padre CC , no podrá tener un hijo cc ; necesariamente deberá tener un antígeno C proveniente de su progenitor. Sin embargo, la aplicación de esta regla no es tan confiable como la anterior, en virtud de que la homocigotencia es difícil de determinar por existir la posibilidad de la presencia de alelos raros que el niño puede poseer; por esta razón el perito en esta disciplina debe ser muy cauto en la aplicación de este segundo postulado.

Los sistemas de grupos sanguíneos utilizados en problemas de paternidad incluyen los sistemas:

ABO con determinación de los antígenos A_1 y A_2 .

M N,

S s,

Rh (D, C, Cw, E, e y c),

y si el caso lo amerita se podrán determinar también:

Fy^a,

K,

Lu^a,

JK^a

lo que dará la oportunidad de obtener cerca de un 60% de probabilidades de exclusión de la paternidad, pero si además se tiene la posibilidad de recurrir al estudio inmunoelectroforético de las proteínas séricas: Hp (haptoglobinas), Gc (componente de grupo específico) y de las

enzimas de las células rojas: EAP (fosfatasa ácida eritrocítica), PGM (fosfoglucomutasa), ESD 9 (estearasa D), AK (adelinato kinasa), ADA (adenosin deaminasa) y 6PGD (6 fosfogluconato dehidrogenasa), las posibilidades de exclusión ascenderán al 90%.

Si además de estas determinaciones se tiene la posibilidad de detectar los antígenos del Sistema HLA, el porcentaje de exclusión ascenderá al 98.62%.

Indudablemente en México, en un futuro muy próximo, la técnica de elección para determinar la paternidad con un 100% de certeza, será la aplicación de las zonas polimórficas o hipervariables del ADN (ácido desoxirribonucleico).

De cualquier manera el estudio de la investigación de la paternidad debe efectuarse con diferentes sistemas polimórficos, para garantizar la fiabilidad de los resultados.

Desde luego, el hematólogo forense deberá contar con suficiente cantidad de sangre fresca y preservada de cualquier posible contaminación, así como con todos los antisueros necesarios de la mejor calidad y con alto grado de potencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Balthazard W. *Manual de Medicina Legal*. Ed. Salvat, pp. 608-625.
2. Boorman, Kathleen E. and Dodd Barbara, P. J. Lincoln. *Blood group Serology*. 5ª Ed. Churchill Livingstone, Londres 1977, pp. 393-418.
3. Barón Fernández, José. *Historia de la circulación de la sangre*. Espasa Calpe, Austria, 1873, pp. 68-88 y 119.
4. Culliford B. J. Metropolitan Police. *The Examination and Typing of Bloodstains in the crime laboratory*. Londres, 1971.
5. Duarte L. y Col. *Gaceta Médica*. México, 115,7: 319. 1979.
6. Garza Chapa R. y Col. *Archivo Investigación Médica*. México, 9, 4, 341. 1978.
7. Gradwohl's. *Legal Medicine*. Tercera Ed. Chicago-Londres, 1976, pp. 154-162.
8. Grunbaum B. W. y Col. *J. Forensic Sci.*, 25, 2:428. 1980.
9. Harper, Rodwell y Mayes. *Review of physiological chemistry*. 16ª Edición. Lange Medical Publications, 1977, pp. 229.
- 9-88. Jeffreys A., MacLeod A. Tamaki K. Minisatellite Repetead Coding as a Digital Approach to DNA Typing. *Revista Nature Inglaterra* 1991 354): pp204-209. Recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics Relating to the Use of PCR-Based polymorphisms. *Forensic Science International* 1992 (55): 1-3.
10. Kirk Paul L. Phd. *Crime Investigation*. Interscience Publishers, Inc. New York, 1953, pp. 649-666.
11. Krishnan, S. S. Phd. *An Introduction to Modern Criminal Investigation*. U.S.A., 1971, pp. 151.
12. Locard Edmond. *Técnicas Periciales*. José Montesó. Edit. Barcelona 1954, p. 146.
13. López L. *Técnicas Médica Legal. Criminalística I*. Editorial Salvat. Valencia, 1953, pp. 23-145.
14. Moreno González, L. R. *Constantes Periciales*. México, 1977, p. 31.
15. Moreno González, L. R. *Introducción a la Criminalística*. Editorial Porrúa, México, 2ª Edición, 1979, pp. 67-74.
16. Morrison Blaswell, P. L. *The blood transfusion in clinical medicine*. Cientific Publication 6ª. Edición, p. 478.
17. Ortho Pharmaceutical Corp. *ABO Ortho Diagsat-antiserum*. Raritan New Jersey.
18. Outteridge, FRA in A. S. Carry (Editor). *Methods in Forensic Science*. Vol. 2. Interscience Publishers.

19. O'Hara Osterbur. *An Introduction to Criminalistics*. The Mac Millan Company; New York, 1926, pp. 399-424.
20. Rodríguez Moyado, H. y Quintanar E. *Comunicación personal*, 1980.
21. Rodríguez Moyado, H. y Col. *Revista de Investigación Clínica*. México, 14: 319, 1962.
22. Saferstein Richard. *An Introduction to Forensic Science*. Criminalistics. New Jersey, 1977, pp. 247-262.
23. Spalding, R. P. y Cronin, W. F. *Technical and Legal Aspects of Forensic Serology. A laboratory manual*. Washington, D.C. F.B.I. Laboratory, 1976.
24. Thorwald Jürgen. *El Siglo de la Investigación Criminal*. Edit. Labor, 1966, pp. 206 a 226.
25. Wiener A. S. *Herencia de los Grupos Sanguíneos*. La Prensa Médica Mexicana, 1961, pp. 123-128 y 136.

SEGUNDA PARTE

ESTUDIO FORENSE DE MANCHAS Y HUELLAS DE SEMEN

1. INTRODUCCIÓN

Desafortunadamente, cada día es mayor el número de delitos contra el pudor cometidos en las grandes urbes; tal situación ha dado origen en la ciudad de México—catalogada como la más grande y poblada del mundo—, a la creación de una oficina especial que atienda este tipo de ilícitos.

Consecuentemente, es de primordial interés contar con una metodología rápida, eficiente y de fácil realización, que resuelva estos casos de suyo tan penosos, como factor determinante en la indagación judicial.

El deseo de cooperar a que lo apuntado se cumpla, me ha llevado a complementar el manual de *Hematología Forense*, con las técnicas actualizadas aplicables a la identificación de huellas y manchas de esperma y así, el problema de su individualización mediante la novedosa técnica del "DNA", será resuelto, indudablemente, por los jóvenes investigadores que cuentan con el tiempo suficiente para ello.

2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El primer reporte que se tiene de la existencia de las células espermáticas, data del siglo xvii: un estudiante de Danzig llamado Luis de Hamm, en el año de 1667, tuvo la idea de colocar en el microscopio una gota de semen humano y fue quien disfrutó de la primicia del asombroso espectáculo que da, la multitud de espermatozoides que en él pululan; apresuróse a comunicar su descubrimiento al ilustre holandés Anton Van Leeuwenhok, que se encontraba ampliando las observaciones de Malpighi sobre los capilares sanguíneos y después presentaría la primera descripción completa de los glóbulos rojos—, quien tuvo el mérito de darse cuenta de su alcance y dedicándose a buscar las células espermáticas en las simientes de los animales (perro, conejo, gallo), los describió minuciosamente comprendiendo que intervenían de una manera decisiva en la generación.

Probablemente los espermatozoides ya habían sido vistos anteriormente por Nicolás Hartsoeker, pero su descubrimiento no fue hecho público. Así pues en 1667 el espermatozoide fue visto, identificado y descrito.¹

El francés Albert Florence, nacido en 1851, descubrió una de las primeras técnicas para reconocer huellas de líquido seminal; se basaba en el hecho de que, al tratar una muestra de este espécimen con una solución concentrada de iodo alcalino, se producían cristales rómbicos de color rojo parduzco, formados por la colina libre.

Al ser descubiertos los rayos ultravioleta por Kirchhoff y Bunsen (1859), se observó que las manchas de semen adquirirían bajo esa radiación una fluorescencia azulada.

Barberio, médico italiano, trató las manchas seminales con solución de ácido pícrico y obtuvo cristales amarillos de picrato de espermina.

Sin embargo Balthazard,² observó que las reacciones de Florence y Barberio aun cuando útiles en algunos casos, no son fiables. Sus resultados no son concluyentes ni característicos: positivos no permiten afirmar la presencia de esperma; negativos no autorizan a concluir su ausencia.

Fishman y Lerner en 1953 dan a conocer su método para estimar fosfatasa ácida de origen prostático.

El alemán S. Berg⁷ en 1954 describe el empleo del alfa naftil fosfato de calcio que reacciona con el esperma, dejando libre alfa naftol, que a su vez reacciona con dianizil tetrasonio formando un colorante azoico violeta.

Kind,³ reporta una técnica para determinar fosfatasa ácida seminal en 1964 en la *Revista Forensic Science*.

G. M. Willot en 1972, incluye en la misma revista un procedimiento por el cual el ácido L-tartárico inhibe las fosfatasas seminal y vaginales.

Dos años más tarde, Adams y Brian⁴ de la Policía Metropolitana de Londres, dan a conocer una técnica electroforética, por medio de la cual, cuando se hayan encontrado resultados positivos por el procedimiento de Willot, es posible diferenciar las fosfatasas de origen prostático y la presente en secreciones vaginales, así como la procedente de vegetales.

El año de 1978, Sensabaugh⁵ aísla una proteína específica del semen humano: la proteína p-30 y en 1983,⁶ describe un procedimiento para su detección por inmuoen ensayo.

Indudablemente, el paso decisivo en la Serología Forense en las postrimerías de este siglo xx es (como lo fue en sus inicios el de Uhlenhut con su técnica para conocer el origen de la sangre) el descubrimiento del "DNA" celular, 1989 ⁸⁻¹⁵ técnica mediante la cual, una vez identificada una muestra de liquido seminal, es posible individualizarla a través de su patrón genético.

3. ASPECTOS GENERALES

El plasma seminal constituye el medio líquido y la fuente nutritiva de los espermatozoides.

En el hombre,⁹ es una mezcla de secreciones del epidídimo, los vasos deferentes, la próstata, las vesículas seminales y las glándulas de Cowper; probablemente recibe una pequeña contribución de las glándulas uretrales.

Las fuentes primarias son las vesículas seminales y la próstata. El semen total es un líquido muy viscoso y opalescente, de color blanco grisáceo, con una densidad de 1028. Su pH varía entre 7.35 y 7.8 aun cuando pueden encontrarse, especímenes con pH superior a 8; sus amortiguadores, fosfato y bicarbonato, contribuyen a proteger los espermatozoides contra el pH vaginal. El volumen promedio normal por eyaculación es de 2.5 a 3.5 ml, disminuyendo notablemente después de varias eyaculaciones. Se coagula poco después de ser espelido, pero se licúa en unos minutos, alcanzando entonces las células espermáticas su máxima movilidad.

El sustrato para la coagulación está constituido por material proteinoide secretado por las vesículas seminales; en tanto que las enzimas licuantes (fibrinolisisina y fibrinogenasa), sólo hacen contacto con el sustrato durante la eyaculación, pues son elaboradas en un lugar distante de las vesículas seminales y la próstata.

Contiene hormonas, fructuosa, fosfatasa ácida y al-

calina, espermina, colina, ergotioneína, ácido cítrico, lípidos, proteínas, hilauronidasa, prostglandina, ribosa, inositol, sorbitol, flavinas, aminas, albúmina, alfa y beta globulinas así como una gamma globulina, lecitina, ácidos grasos, fosforilcolina, zinc, calcio y antígeno soluble de grupo sanguíneo.

Como elemento celular característico del semen se encuentran los espermatozoides; sin embargo el cuadro celular es mucho más complejo: presenta células gigantes, células epiteliales, leucocitos, células prostáticas, cilindros testiculares y bacterias. Usualmente contiene de 70 a 150 millones de espermatozoides por mililitro.

4. RECOLECCIÓN Y EMBALAJE DE LAS MUESTRAS DE SEMEN

Para la recolección de estas muestras, es necesario que el observador de campo lleve en su maletín de trabajo:

- Tubos de ensaye de 15 cm de largo por 1 cm de ancho, que contendrán en su interior dos hisopos hechos en aplicadores de madera de 15 cm de longitud y que habrán sido esterilizados.
- Laminillas porta objetos.
- Ampolletas de solución salina estéril.

En los casos en que la persona ofendida esté viva y en consideración a su estado anímico, la toma de la muestra deberá efectuarse únicamente mediante la intervención de profesionistas altamente calificados y del mismo sexo que la persona agredida, a fin de garantizar absoluta seriedad, discreción y respetabilidad.

El procedimiento consiste en tomar las muestras de la cavidad vaginal y/o anal, por medio de los hisopos contenidos en los tubos precitados, tomando éstas a la mayor profundidad posible.

Deberán tomarse tres muestras como mínimo:

- a) Al extraer el hisopo de la cavidad estudiada, se hará de inmediato un frotis sobre una laminilla porta

objetos, teniendo especial cuidado de no pasar más de una vez el algodón del hisopo, sobre la misma superficie:



a continuación se fijará el frotis aplicando la flama de un encendedor por debajo de la laminilla, si se está en el lugar de los hechos o en la Agencia Investigadora, y la flama del mechero, si el investigador se encuentra en el laboratorio; a continuación se introducirá ese mismo aplicador en su tubo y se añadirán aproximadamente dos ml de solución salina estéril, tapando el tubo de inmediato. Esta muestra será muy útil para su observación microscópica en fresco.

La adecuada toma y fijación del frotis en un tiempo lo más próximo posible al momento de ocurridos los hechos, nos brindará la oportunidad de visualizar al microscopio los espermatozoides y por lo tanto de identificar el semen sin lugar a dudas y por otra parte podremos almacenarlo como prueba de lo afirmado.

b) Se tomará una segunda muestra con el hisopo humedecido con unas gotas de solución salina, mismo que se trasladará al tubo signado como "2", que se destinará para la búsqueda de fosfatasa ácida y su cuantificación, si ésta es posible.

c) La tercera muestra tomada en idénticas condiciones, se destinará para futuras aclaraciones o confrontas.

En los cadáveres se tomarán las muestras en iguales condiciones, *siempre* lo más rápidamente posible para evitar la acción de la putrefacción sobre las muestras.

De preferencia deberá tomarse una muestra más durante la necropsia a fin de obtener el espécimen a estudiar, del interior del cuerpo con menos riesgo de contaminación.

Las prendas de ropa interior, sábanas, pañuelos desechables, o cualquier otro objeto que se considere relacionado con el hecho, se embalará en bolsas de plástico cancelándolas con una etiqueta, en donde además de los datos usuales se anotará el lugar de donde se recolectó, previa fijación por medio de la fotografía y fe ministerial.

Todas las muestras tomadas deberán llevar etiquetas firmemente adheridas en las que se anotarán los siguientes datos:

1. Número de averiguación previa o expediente.
2. Fecha y hora en que se recolectó la evidencia.
3. Nombre de la persona a quien se le tomó.
4. Nombre del investigador que realizó la toma.

La hemoglobina (Hb) es el pigmento rojo que se encuentra en los glóbulos rojos y es el responsable de la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre. Su nivel puede estar elevado o disminuido en algunas enfermedades.

Por lo que se refiere a los niveles corporales normales, se ha demostrado que en el líquido cefalorraquídeo (LCR) los niveles de Hb son más altos que en la sangre periférica, por lo tanto la presencia de Hb en el LCR puede ser un indicador de daño cerebral por el hallazgo de elevados niveles de Hb en el LCR.

Así pues, es extraordinariamente importante ajustar los reactivos utilizados para su detección, de manera que solamente se obtenga reacción positiva cuando la enzima precipitada se encuentre en cantidades mayores a 20 unidades.

Su detección se basa en una reacción cromática de la enzima fosfatasa ácida, muy abundante en la secreción genital masculina.

La fosfatasa ácida del espermatozoide reacciona con el reactivo 1-naftilfosfato de calcio y queda libre alfa naftol; éste reacciona con sulfato de dianisiltetrazonio y forma un colorante azoico violeta intenso.

No obstante que está aceptado que sólo en el líquido seminal existen altas concentraciones de fosfatasa ácida, es importante señalar que una prueba positiva no es concluyente⁹ para afirmar que una mancha es de semen, ya que puede encontrarse en otros tejidos y plantas.

Kind, Hauck y Leithoff han apuntado la siguiente lista de productos y especímenes que también la contienen:

Bacterias	Glóbulos rojos	Veneno de víbora
Leche humana	Cereal de arroz	Almendras dulces
Hígado humano	Coliflor	Coles de Bruselas
Orina humana	Trébol	Caracoles
Riñón humano	Semillas de alfalfa	Moho de hongos
Exudado vaginal		

De la observación de la lista anterior, se infiere el por qué la técnica de detección de fosfatasa ácida está catalogada como una reacción de orientación y por lo tanto la presencia de semen deberá confirmarse con el hallazgo de los espermatozoides.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Solución 1 (Buffer)

Cloruro de sodio	23.0	gr
Acetato de sodio 3 H ₂ O	2.0	gr
Ácido acético glacial	0.5	ml
Agua destilada	90.0	ml

Solución 2

1-naftil fosfato de calcio	50.0	gr
Sulfato de dianisil tetrasonio	30.0	gr
Solución acuosa al 10% de lauril sulfato de sodio	1.0	ml

Reunir las soluciones 1) y 2); filtrar y envasar en frasco ámbar que se guarda en refrigeración a 4° C. Esta solución se conserva activa durante un año.

En virtud de que actualmente ya no se fabrica el sulfato de dianiziltetrasonio, se ha sustituido por el siguiente reactivo:

Solución 1

Orto Dianisidina tetrazotizada	1	gr
Acetato de sodio	20	gr
Acido acético	10	ml
Agua destilada	100	ml

Solución 2

Alfa naftil fosfato de sodio	0.8	gr
Agua destilada	10	ml

Mezclar 10 ml. de Solución 1; 89 ml. de agua destilada y 1.0 ml. de la Solución 2. Guardar en frasco ámbar y en refrigeración.

PROCEDIMIENTO

La mancha problema o el hisopo con el cual se tomó la muestra, se colocan entre dos hojas de papel filtro; lo mismo se hace con material igual no manchado para prueba en blanco y con otro que esté maculado con semen, como testigo positivo.

Se colocan sobre una lámina de vidrio en la que previamente se habrá anotado: Testigo negativo; Muestra problema y Testigo positivo; inmediatamente después se agregan aproximadamente 10 gotas de reactivo a cada una de las muestras, con una pipeta Pasteur.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

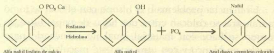
La aparición de una coloración violeta intensa en la muestra problema, dentro de un tiempo no mayor a 5 minutos, indicará la presencia de fosfatasa ácida en cantidades mayores a 20 U.K.A. y por lo tanto la muy probable presencia de semen; en el testigo positivo siempre deberá observarse la intensidad de color arriba señalado, tonalidad que no deberá aparecer en el testigo negativo.

3. TÉCNICA POR INHIBICIÓN DE LA FOSFATASA ÁCIDA SIMINAL Y VAGINAL, CON ÁCIDO L-TARTÁRICO

Este procedimiento reportado por Willot¹⁰ y revisado por Stone,¹¹ señala que tanto las fosfatasas seminales como las vaginales son inhibidas por el ácido L-tartárico.¹²

La formación de un precipitado violeta intenso con tamaño de partícula grande, procedente de la fosfatasa ácida seminal, es diferente al precipitado café rojizo con menor tamaño de partícula, de origen NO prostático.

El principio es similar al señalado por la técnica anterior; la fosfatasa ácida puede hidrolizar ciertos fosfatos orgánicos en medio ligeramente ácido de acuerdo a lo concluido por Kind.⁸ El sustrato en este procedimiento es el alfa naftil fosfato de calcio:



El alfa naftil se incuba con la muestra problema y con un testigo de semen, ambos a un pH de 4.9; la enzima fosfatasa en caso de estar presente, rompe el radical fosfato liberando el grupo alfa naftol, el cual reacciona con el azul diazo formando un complejo de color violeta. A otro lote igual de muestras, se les añade el sustrato de alfa naftil fosfato, pero ahora adicionado de L-tartárico: si la fosfatasa ácida es de origen prostático, el L-tartrato inhibe la reacción de copulación.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Solución 1 (Buffer de acetatos)

Cloruro de sodio	23.0 gr
Acetato de sodio	2.0 gr
Ácido acético glacial	0.5 ml
Agua desionizada	90.0 ml

Disolver perfectamente los reactivos en agua; ajustar el pH a 4.9 y el volumen final a 100 ml con agua desionizada. Envasar en frasco ámbar y guardar en refrigeración.

Solución 2 (Sustrato)

Alfa naftil fosfato, sal de calcio	0.30 gr.
--	----------

Colocar los 0.30 gr del reactivo anterior en un frasco gotero color ámbar de 30 ml de capacidad; añadir 20 ml de la solución I (Buffer de acetatos), agitar hasta disolución y almacenar en refrigeración. Esta solución debe prepararse cada mes, por lo que es conveniente anotar en la etiqueta del frasco la fecha de preparación.

Solución 3 (colorida)

Naftil - diazo azul B	0.30 gr
Solución salina estéril	20 ml

Envasar en frasco gotero ámbar. Conservarla en refrigeración y anotar en su etiqueta la fecha de preparación, ya que debe renovarse cada dos meses.

Solución 4 (inhibidor)

Ácido L-tartárico	3.0 gr
Hidróxido de sodio 1N	35 ml
Agua desionizada	200 ml

Disolver el ácido L-tartárico en un poco de agua y agregar los 35 ml de hidróxido de sodio 1N; agitar hasta disolución. Ajustar el pH a 4.9, agregando hidróxido de sodio 1N si el pH es demasiado bajo y ácido L-tartárico si está alto; añadir agua desionizada hasta aforar el volumen a 200 ml. Almacenar en frasco ámbar en refrigeración, anotando en la etiqueta la fecha de preparación. Esta solución deberá renovarse cada dos meses.

PROCEDIMIENTO

1. Cortar un trozo de 1×1 cm del material que contenga la mancha seminal sospechosa; colocarla en un tubo de ensaye con tapón de rosca, de 15 ml de capacidad y añadir 3.0 ml de agua desionizada. Marcar el tubo con la letra "P" para el problema.
2. Cortar un trozo de 1×1 cm de un área que no presente manchas, colocarlo en un tubo igual al de la

muestra problema con 3.0 ml de agua. Marcar el tubo "C" para control.

- Después de 15 minutos preparar 4 tubos de 7 ml como sigue:

"P" de problema	con 3 gotas de sustrato
"Pi" problema inhibidor	con 3 gotas de sustrato y 3 gotas de inhibidor
"C" de control	con 3 gotas de sustrato
"Ci" control inhibidor	con 3 gotas de sustrato y 3 gotas de inhibidor

Agitar cada tubo mezclando bien.

- Poner 0.3 ml (aproximadamente 10 gotas) del tubo P (problema a cada uno de los tubos P y P₁. Mezclar.
- Pasar 0.3 ml del tubo C a los tubos marcados: C y C₁. Mezclar.
- Agregar tres gotas de la solución de naftil diazo azul B, a cada uno de los cuatro tubos.

INTERPRETACIÓN

Si el tubo marcador como P cambia de color café marrón, a violeta intenso en 30 segundos o menos, mientras que el P₁ en el mismo tiempo, toma un color amarillo pálido el resultado es positivo. Los tubos C y C₁, deben también permanecer de color amarillo claro; si esto no sucede indicará que el reactivo se ha deteriorado.

Así pues, si el tubo problema cambia a color violeta intenso y este color no aparece en ninguno de los otros tres tubos, el resultado será indudablemente positivo.

taleína. La adición de un álcali termina la reacción enzimática y desarrolla simultáneamente una coloración azul; esta coloración azul es proporcional a la cantidad de enzima prostática y se mide en un espectrofotómetro para inmunoensayo enzimático a 590 nm: la lectura se compara con una curva de calibración previamente elaborada para ese efecto.

INSTRUMENTO UTILIZADO

Espectrofotómetro ultravioleta visible para inmunoensayo enzimático; en este caso se utilizó el de la marca "Civa-Emit".

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra obtenida de la toma del exudado vaginal y/o anal o la tela manchada, se suspenden en un mililitro de solución salina estéril y se conservan en refrigeración entre dos y ocho grados centígrados hasta su procesamiento, que debe ser inmediato.

REACTIVOS

1. Reactivo concentrado de fosfatasa ácida (2.6 milimoles de monofosfato timoltaleína sódica, con buffer y estabilizador).
2. Diluyente de fosfatasa ácida (50 milimoles de ácido acético).
3. Desarrollador de color (100 milimoles de hidróxido de sodio, más 100 milimoles de carbonato de sodio).

4. Calibrador de fosfatasa ácida (0.3 milimoles de timolftaleína con estabilizador igual a 10 unidades por litro de actividad enzimática).
5. Preservativo específico para fosfatasa ácida (5.0 milimoles de buffer de acetato pH = 5).

En virtud de que se desarrolló este procedimiento con la técnica propuesta para fosfatasa ácida en suero por "Eagle Diagnostics", los reactivos que quedaron descritos fueron adquiridos ya preparados para su uso por los Laboratorios Eagle.

PROCEDIMIENTO

1. Colocar 0.5 ml del reactivo concentrado de fosfatasa ácida, dentro de tubos rotulados: Blanco, calibrador, control y muestra.
2. Añadir 0.5 ml de fosfatasa ácida diluida a cada tubo y mezclar bien.
3. Incubar los tubos a 37 grados centígrados aproximadamente 5 minutos.
4. Adicionar 0.1 ml de: Blanco, calibrador, control y muestra a sus respectivos tubos simultáneamente o bien a intervalos —controlados con cronómetro— de un minuto (la incubación en el siguiente paso debe ser exactamente de 30 minutos para todos y cada uno de los tubos); mezclar suavemente. Usar agua desionizada para el blanco.
5. Incubar exactamente durante 30 minutos a 37° C.
6. Siguiendo la misma secuencia del paso 4, añadir 1.0 ml del desarrollador de color y mezclar bien.
7. Ajustar el instrumento al cero de absorbancia y longitud de onda de 590 nm usando para ello el tubo signado como blanco.

8. Leer los valores de absorvancia para el calibrador, control y muestra o muestras problema.
9. Interpolar con la curva de calibración.

CURVA DE CALIBRACIÓN

Se efectúa con el calibrador de fosfatasa ácida, del equipo de reactivos, que contiene 300 micromoles de timoltaleína por litro y que se traduce en 10 unidades por litro de fosfatasa ácida al incubar durante 30 minutos a 37° C. La linearidad del instrumento en estas condiciones se extiende hasta 100 unidades por litro; si la lectura excede la linearidad de la curva, efectuar diluciones de la muestra para que se cumpla la Ley de Beer y de Lambert.

Si no se tiene la curva utilizar la siguiente ecuación:

$$\text{Unid./litro} = \frac{\text{Abs. Muestra P}}{\text{Abs. Calibrador}} \times \text{Conc. Cal U/L}$$

en donde:

Abs. Muestra P = Lectura en absorbancia de la muestra problema.

Abs. Calibrador = Lectura en absorbancia del calibrador.

Cal. Conc. = Concentración del calibrador en unidades por litro.

6. TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN

La certeza de que una muestra corresponde a semen, se da sin lugar a duda con el hallazgo de los espermatozoides en el espécimen analizado. A continuación se describen estas células de la reproducción, así como las técnicas de tinción para su mejor visualización al microscopio.

1. DESCRIPCIÓN DEL ESPERMATOZOIDE

El líquido espermático contiene usualmente de 70 a 150 millones por mililitro.

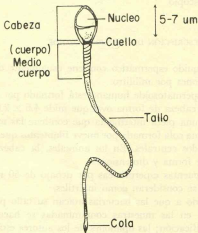
El espermatozoide humano está formado por:

Una cabeza de forma oval que mide $4.6 \times 2.6 \times 1.5$ micras; una pieza intermedia que contiene las mitocondrias y una cola formada por nueve filamentos que rodean a otros dos centrales. En los animales, la cabeza tiene diferente forma y dimensiones.

Las cuentas espermáticas por debajo de 50 millones por ml, se consideran como infértiles.

Debido a que las bacterias atacan su tallo primeramente,¹⁴ en las muestras contaminadas se hace difícil su identificación; las opiniones de los autores están divididas en cuanto a la vida media del espermatozoide: la mayoría señala márgenes muy amplios que van desde los 30 minutos hasta las 12 horas, otros dicen haberlos

encontrado hasta 15 días después de eyaculados, en el útero y trompas de Falopio. Mondragón refiere que el promedio de vida es de 4 a 6 días; las referencias de supervivencia en la cavidad anal no sobrepasa a las 12 horas dependiendo de las características de dicho canal como son: grado de humedad, la presencia de parásitos y bacterias, pH, materia fecal o sangre. En cadáveres no existen referencias bibliográficas en cuanto al tiempo posible de encontrarlos vivos, pero hay que considerar qué tanto puede afectarles la putrefacción; de ahí la conveniencia de hacer el frotis en un tiempo lo más próximo posible a la evacuación del semen fuera del organismo.



Elaboró el dibujo el señor Regino Maldonado, experto en dibujo forense.

2. TÉCNICAS DE TINCIÓN

a) Técnicas de Gram

Por este procedimiento, la cabeza se tiñe de color rosa y el cuerpo medio y el tallo se observan de color azul.

Preparación de los reactivos:

1. Colorante de crystal violeta

Solución A

Crystal violeta	2 gr
Alcohol etílico absoluto	20 ml

Solución B

Oxalato de amonio	0.8 gr
Agua destilada	80 ml

Mezclar las soluciones A y B. Envasar en frasco gotero color ámbar.

2. Solución iodo iodurada (Lugol)

Iodo metálico	1 gr
Ioduro de potasio	2 gr
Agua destilada	300 ml

Diluir 1:15 en agua destilada antes de usarla.

3. Decolorante

Alcohol etílico absoluto (95%)

4. Colorante de safranina

Safranina (2.5% en alcohol etílico) ... 10 ml

Agua destilada 100 ml

PROCEDIMIENTO

El frotis o una gota de suspensión problema, se secan ligeramente al calor del mechero o bien se fijan con metanol.

a) Añadir el reactivo de cristal violeta hasta cubrir la muestra y dejarlo actuar durante 1 minuto;

b) Lavar con agua destilada.

c) Cubrir nuevamente el portaobjetos con la solución 2 durante 1 minuto; tirar el exceso de lugol y decolorar con agitación utilizando el reactivo número 3 durante 30 segundos.

d) Secar con papel filtro y cubrir la preparación con el reactivo signado con el número 4; dejarlo actuar de 10 a 30 segundos.

e) Lavar con agua destilada y observar al microscopio con aceite de inmersión y el objetivo correspondiente.

INTERPRETACIÓN

Las células espermáticas aparecerán teñidas: la cabeza de color rosa y el resto del cuerpo y cola azules.

b) Técnica con azul de metileno

Colorante de azul de metileno:

Azul de metileno	1	gr
Alcohol etílico absoluto (95%)	30	ml
Agua destilada	100	ml
Acético glacial	5	ml

Disolver el azul de metileno en el etanol, añadir el ácido acético y el agua destilada.

PROCEDIMIENTO

Fijar el frotis que contiene la muestra problema por medio de calor como en el caso anterior:

- Cubrir la preparación con el colorante de azul de metileno.
- Dejarlo actuar durante un minuto.
- Retirar el colorante y lavar con agua.
- Observar al microscopio con aceite de inmersión, e igual objetivo.

INTERPRETACIÓN

Los espermatozoides se observarán coloreados tanto la cabeza como cuerpo y cola de color azul.

c) Técnica de Christmas Tree

Colorante Rojo rápido nuclear:

Rojo rápido nuclear	50	mg
Sulfato de Aluminio	2.5	gr
Agua destilada	100	ml

Calentar a ebullición, los 100 ml., de agua destilada y disolver en ellos el sulfato de aluminio; adicionar el colorante rojo rápido nuclear; mezclar con agitador mecánico, hasta disolución completa.

Enfriar y filtrar en papel Wathman No. 1

Almacenar en frasco gotero ámbar a una temperatura entre 2 y 8°C.

Colorante de Índigo Carmín:

Acido pícrico.....	1.3 gr
Índigo Carmín.....	0.23 gr
Agua destilada.....	100 ml

Disolver el ácido pícrico en los 100 ml. de agua; añadir los 0.23 gramos de índigo carmín; mezclar perfectamente con agitador mecánico.

Guardar en frasco gotero ámbar.

PROCEDIMIENTO

Una vez fijado el frotis, añadir dos gotos de rojo rápido nuclear y dejarlo reposar en cámara húmeda durante 15 minutos (puede utilizarse una caja de Petri, colocando en la base y el interior de la tapa, un papel filtro húmedo).

Lavar con agua desionizada, durante 5 segundos, añadir una gota de el colorante número 2 y dejarlo reposar durante 15 a 30 segundos.

Lavar con etanol absoluto para decolorar, secar por 5 minutos.

INTERPRETACIÓN

Al observar al microscopio, el núcleo del espermatozoide, aparecerá en color rojo. El acrosoma y la cola, de color verde.

Finalmente, los modernos investigadores en Genética Forense, ya se encuentran en posibilidad de identificar a un violador, comparando la muestra obtenida de la cavidad vaginal, anal o bucal de la víctima, con el sémen del presunto responsable del hecho. Para resolver este problema, remítase a la técnica descrita en el Capítulo 16.

BIBLIOGRAFÍA

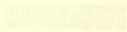
(Por orden de aparición)

1. Rostand, Jean, *Introducción a la Historia de la Biología*. Edit. Artemisa, S. A. de C. V., México, 1986, pp. 15 y 16.
2. Balthazard, V., *Manual de Medicina Legal*. Editorial Salvat. Sexta edición. Barcelona, 1945.
3. Kind, S. S., *Methods in Forensic Science*. Vol. 3. Interscience Publishers, New York, 1964.
4. Elizabeth, G., Adams and Brian C. Wrasall, *Phosphatases in Body Fluids: The differentiation of semen and vaginal secretion*. Metropolitan Police Forensic Laboratory. London Forensic Science 3, 1974, pp. 57-62.
5. Sensabaugh, G. F., *Isolation and Characterization of Semen Specific Protein from Human Seminal Plasma: A potencial new marker for semen identification*. Journal of Forensic Science. Vol. 23, N° 1, enero 1978, pp. 106-115.
6. Sensabaugh, G. F., Graves and Bashinski, *Development of an Elisa for Human Seminal P 30*. Journal of Forensic Science Society. Vol. 23, N° 1, enero 1983, p. 82.
7. S. Berg, Deut, Z. Ges Gerichtl. Med. 1954/42: 605.
8. Eric, S., *DNA Finger Print on trial lauder in nature*. Vol. 339, N° 6225, junio 15, 1989, pp. 501-505.
9. *Gradwohl's Legal Medicine*. Ed. Francis E. Camps. Baltimore, 1968.
10. Willot, G. M., *L. tartrate Inhibitable Acid Phosphatase in semen and vaginal secretion*. J. Forensic Science. Soc. 12, 363, 1972.
11. Stone, I. C., *Detection of Acid Phosphatase by Enzymatic Reaction with alpha naphthyl phosphate*. Southwestern Institute of Forensic Science. Criminal Investigation Laboratory. Dallas, Texas, marzo, 1976.
12. Roy A. V., M. E. Brower and J. E. Hayden, *A new phosphatase substrate with greater specificity for the prostatic enzyme*, 1971.
13. Gómez, R. R., C. D. Wunsh, J. H. Davis and Hicks, *Qualitative and Quantitative Determinations of Acid Phosphatase Activity in vaginal washings*. Am. J. Clin. Path. 64, pp. 423-432, 1975.
14. *Atlas del Cuerpo Humano*. Edit. Jover. Serie J, N° 1, 1973.
15. *The Examination of Serological Evidence in the FBI Laboratory*. Forensic Science Research and Training Center. FBI Academy Quantico, Virginia 22135, 1989, pp. 12 y 18-22.

Esta obra se acabó de imprimir
El día 9 de julio de 1999, en los talleres de



OFFSET UNIVERSAL, S. A.
Calle 2, 113-3, Granjas San Antonio,
09070, México, D. F.



REVISIÓN DE LA ACTUALIZACIÓN



GOBIERNO DEL ESTADO DE MEXICO
SECRETARÍA DE ECONOMÍA
DIRECCIÓN GENERAL DE REGISTRO Y FISCALÍA
CÓDIGO DE COMERCIO



SUPREMO TRIBUNAL DE JUSTICIA
DEL ESTADO DE TAMAULIPAS
BIBLIOTECA
"C. ANICETO VILLANUEVA RIZ"
CD. VICTORIA, TAM.

C-3



HEMATOLOGIA FORENSE 3A ACTUALIZADA



LIBRERÍA PORRÚA
1900-1999

JUSTO SIERRA Y ARGENTINA
CIUDAD DE MÉXICO



9 789700 717500