



UNIVERSIDAD
FASTA

FACULTAD DE CIENCIAS
JURÍDICAS Y SOCIALES

“DEGRADACION DE LA MANCHA HEMATICA POR ACCION DEL CALOR”

TRABAJO FINAL QUE PRESENTA:
ANABEL FELISA SIMONELLI

PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE
LICENCIADA EN CRIMINALISTICA

PROFESORES TUTORES:

En el área criminalística:

Lic. EUGENIA CARIAC

Lic. HERNAN GACIO

En el área metodológica:

Lic. AMELIA RAMIREZ

ABRIL 2013

DEDICATORIA

El lucro de llegar a este gran momento, es conmovedor, la felicidad de haber finalizado este trabajo amerita la dedicatoria a mis grandes amores. Su apoyo incondicional, acompañamiento, por sisarle el tiempo de la familia con mis estudios, gracias por ayudarme en este camino, que es un gran logro personal y profesional, tan esperado por mí. Es difícil caminar sin ustedes, los amo, este, mi fruto, es de ustedes, gracias Gustavo, Nina y Tomas.

A mi padre, que vive en mi corazón y en mis recuerdos más vivaces, quien estaría feliz de verme aquí, te extraño.

AGRADECIMIENTO

A la Sra. Jefa Comisario Mayor (Prof.) Ing. Química Cristina Raverta, Superintendencia de Policía Científica Directora encargada de la supervisión de los Laboratorios Químico de la Provincia de Buenos Aires, gracias por el apoyo, la oportunidad que me dio para poder estudiar, la insistencia de seguir adelante a pesar de todo, y el reconocimiento de mi función y profesionalismo, desde ya gracias, muchas gracias.

Al Sr. Jefe de la División Químico Legal de la Delegación Departamental de Policía Científica de la ciudad de Mar del Plata Sub Comisario Cisneros Gustavo Clemente Licenciado en Seguridad e Higiene, establecimiento donde cumple mi función en la faz policial y pericial, quien me ofreció sin dudarle las instalaciones del Laboratorio, como así también, insumos e medios para ejecutar los ensayos del presente trabajo. Ya que, sin su ayuda no podría haber efectuado los estudios químicos y mi carrera.

A mis Profesores del Centro de Altos Estudios en Especialidades Policiales La Plata (CAEEP), al Licenciado en Geología Guillermo Polickusk y al Dr. Bioquímico Rodolfo Nieto, gracias a ellos por inculcarme el amor por la química, la investigación pericial, el respeto a los colegas y primordialmente la aptitud y deontología profesional.

A la Licenciada en Ciencias Biológicas y Especialista en Docencia Universitaria Celia Iudica, quien cumple funciones en la Asociación de Genética Humana (AGHU) de esta ciudad, docente de la Cátedra de Biología Humana de la Facultad de Psicología de la UNMDP. Ha dictado cursos presenciales y charlas en el tema. Es directora de tesis de grado en Ciencias Biológicas y ha formado pasantes, en esta temática. Quien Cumplió funciones en el Laboratorio Químico Pericial de Genética de San Martín y ex compañera de trabajo. Gracias Celia, por tu acompañamiento, tu predisposición, la gentileza de tu atención, y especialmente tu humildad, gracias.

A mis tutores, Gracias.



**“DEGRADACION DE LA MANCHA
HEMATICA POR ACCION DEL CALOR”**

ANABEL FELISA SIMONELLI

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	12
1.- INTRODUCCION.....	13
1.1 Formulación del problema.....	15
1.2 Objetivos de la investigación.....	15
1.3 Fundamentación y propósitos.....	16
2.- MARCO TEORICO CONCEPTUAL.....	18
2.1 La Sangre	18
2.2 Volumen y composición de la Sangre.....	18
2.3 Viscosidad de la Sangre.....	19
2.4 Glóbulos Rojos.....	20
2.5 Glóbulos Blancos.....	23
2.6 Plaquetas.....	26
2.7 Coagulación.....	27
2.8 Factor RH.....	27
2.9 Grupo Sanguíneo.....	28
2.10 Hemoglobina.....	29
3.- ANTECEDENTES.....	36
3.1 Técnicas de identificación de la Sangre	36
3.2 Técnicas basadas en características químicas de la sangre.....	39
3.3 Fundamento Químico.....	41
3.3.1 Catalasas.....	41
3.3.2 Peroxidasas.....	41
3.4 Reacción Catalíticos.....	42

3.5 Técnicas orientativas menos utilizadas.....	49
3.6 Reacción de Falsos Positivos.....	51
3.7 Determinación y regeneración de Actividad Peroxidasa.....	54
4.- ANALISIS DE LA MUESTRA DE SANGRE.....	56
4.1 Observación de la muestra	56
4.2 Ensayos Preliminares.....	56
4.3 Reactivo usados para los Ensayos Preliminares.....	57
4.3.1 Interferencias Falsos Positivos.....	59
4.3.2 Parte Experimental – Reactivo y materiales.....	60
4.4. Técnica de Aminofenazona.....	63
5.- SCREENING DE CONFIRMACIÓN.....	66
5.1 Método de Microscopia.....	66
5.2 Método de Cristalografía.....	68
5.2.1 Método de Teichmann.....	69
5.2.2 Método de Takayama.....	70
5.3 Método de Cromatografía.....	71
5.4 Método de Microespectroscopia.....	72
6.- INVESTIGACION DE ESPECIE.....	75
6.1 Introducción.....	75
6.2 Ensayo de Precipitinas	76
6.3 Métodos.....	79
6.3.1 Método del Tubo.....	79
6.3.2. Método con capilares.....	79
6.3.3 Método Electroforético.....	81

7.- TIPIFICACION DE MANCHAS DE SANGRE.....	87
7.1 Sistema ABO	88
7.1.1 Antígenos y anticuerpos del Sistema ABO.....	90
7.1.7 Método de Absorción – Inhibición.....	106
7.1.8 Método de Absorción – Elución.....	110
7.2 Sistema MN.....	116
7.3 Sistema Rh.....	120
7.4 Técnicas Bioquímicas.....	132
7.5 Fosfoglucomutasa- PGM.....	137
7.6 Adenilato quinasa- AK.....	147
8.- HEMATOLOGIA FORENSE.....	152
8.1 Hematología Forense.....	152
8.1.1 Manchas Sanguíneas.....	152
8.2 Hematología Reconstructora.....	157
8.2.1 El Rastreo en la Hematología Forense.....	158
8.2.2 Rastreo en el Sitio de Suceso.....	158
8.2.3 Relación entre Sangre y Sitio de Suceso.....	159
8.2.4 Elementos para efectuar Rastreo Hematológico.....	160
9.- DISEÑO METODOLOGICO.....	161
9.1 Método de Investigación.....	161
9.2 Método Generales de Investigación.....	161
9.2.1 Muestra.....	161
9.2.2 Medidas de Bioseguridad para la extracción.....	162
9.2.3 Técnicas de Orientación.....	163
9.2. Técnica Especifica.....	163

9.3	Materiales.....	163
9.3.2	Material de Laboratorio.....	163
9.3.2	Material Biológico.....	164
9.3.3	Reactivos.....	165
9.4	Procedimiento.....	165
9.4.1	Aspecto Colorimétrico.....	165
9.4.2	Ensayo de Sensibilidad Orientativo.....	166
9.4.3	Test de Sensibilidad Especifico.....	168
9.4.4	Ensayo de Test Orientativo de las muestras Sanguíneas sometidas a diferentes temperatura y tiempo de estadía.....	169
9.4.5	Ensayo de Test Especifico de las muestras Sanguíneas sometidas a diferentes temperatura y tiempo de estadía.....	171
9.5	Análisis de las muestras resguardadas.....	172
9.5.1	Apertura y análisis del material resguardado.....	173
9.6	Contaminación.....	180
9.7	Degradación.....	181
10.-	CONCLUSIONES.....	183
11.-	ANEXO.....	188
11.1	Tabla Nro. 01.....	188
11.2	Tabla Nro. 02.....	189
11.3	Tabla Nro. 03.....	189
11.4	Tabla Nro. 04.....	190
11.5	Tabla Nro. 05.....	191
11.6	Tabla Nro. 06.....	192
11.7	Tabla Nro. 07.....	193
11.8	Tabla Nro. 08.....	194

11.9 Tabla Nro. 09.....	195
11.10 Tabla Nro. 10.....	196
11.11 Tabla Nro. 11.....	197
11.12 Tabla Nro. 12.....	198
11.13 Tabla Nro. 13.....	199
11.14 Tabla Nro. 14.....	200
11.15 Tabla Nro. 15.....	201
11.16 Tabla Nro. 16.....	202
11.17 Tabla Nro. 17.....	203
11.18 Tabla Nro. 18.....	204
11.19 Tabla Nro. 19.....	205
11.20 Tabla Nro. 20.....	206
11.21 Entrevista Lic. Ciencias Biológicas Celia Indica.....	207
11.27 Manual de Instrucciones HEM-CHECK.....	220
11.28 Instructivo para la Correcta toma de muestras y preservación de indicios para su análisis químico.....	223
12.- NOMENCLADOR.....	226
13.- BIBLIOGRAFIA.....	229

RESUMEN

El presente Trabajo final de investigación está destinado a estudios químicos forense relacionados a las manchas hemáticas, expuesta a un tiempo determinado a diferentes temperaturas, donde se analizará el factor Temperatura – Tiempo de manera que a través de ensayos prácticos y controlados en Laboratorio, se ejemplifique la degradación o alteración de la muestra. Asimismo se propone determinar los factores que pueden influenciar en la desnaturalización de la muestra de sangre.-

“La Criminalística es la ciencia del pequeño detalle¹.”

De Hans Gross

1.- INTRODUCCION

El análisis que se presenta tiene como punto de partida señalar la importancia que tiene la criminalística en los procesos penales, el grado de avance, que como ciencia ha alcanzado en su tarea fundamental de llevar a cabo la investigación científica del hecho criminal, las disciplinas que integran la criminalística.

La criminalística nace de la medicina forense, en el transcurso del siglo XVII, cuando los médicos empiezan a tomar parte en los procedimientos judiciales. Los datos que provienen de la historia, permiten establecer que otra disciplina precursora de la Criminalística fue la dactiloscopia².

Fácil es advertir que la Criminalística no podía en sus comienzos, basados en la intuición y la experiencia personal, alcanzar el rango de ciencia ni tener su propia autonomía. La Criminalística es ciencia y arte.

Se considera que es ciencia, utiliza métodos y técnicas con fundamentos científicos; y se considera que es arte, porque en infinidad de casos criminales, se encuentra la respuesta por la concurrencia de la atención, habilidad, experiencia y profesionalismo del investigador.

Como toda ciencia y disciplina científica, la criminalística evoluciona a medida que se suscitan nuevos avances científicos y tecnológicos, es por ello que en el presente siglo esta disciplina se ha nutrido de nuevos conocimientos, pero a la vez su campo de estudio se ha ampliado en todas sus ramas, dado que el objeto de estudio de la misma también se ve afectado por esta evolución científico-tecnológica, como una respuesta para combatir el delito, en donde los medios empleados para delinquir, se han actualizado.

La Criminalística a través del trabajo de los peritos, busca la prueba de una culpabilidad a partir de ciertos indicios y a su vez aplicando todos los métodos de investigación científica necesarios, que posibiliten descubrir el conjunto de rastros y

¹ Hans Gross (1847-1915) el padre de la Criminalística.

² Vucetich, Juan, **Dactiloscopia comparada**; La Plata, Establecimiento tipográfico Jacobo Peuser, 1904, p. 80.

huellas de un delito, a fin de reconstruir todas las fases del mismo, lograr descubrir y revelar a su autor.

En cualquier sistema judicial, este medio de prueba es un trabajo mixto, tanto de laboratorio como de terreno, en el cual la convicción debe servir de criterio final, la cual rige la decisión y ha de ser el resultado de un examen racional de los hechos y de una apreciación crítica de los elementos de la prueba, ya que de esta forma, pasa de la creencia subjetiva, al conocimiento verdadero, objetivo, imparcial, controlable y comunicable.

La prueba pericial científica requiere una infraestructura física y tecnológica, complementada con experiencia y formación de profesionales y técnicos, en este caso profesionales de las instituciones encargadas de la investigación y de la persecución penal, de diferentes disciplinas que coadyuven y sustenten los resultados de la investigación criminalística, logrando sin duda el fortalecimiento del sistema de justicia.

La evidencia física es cualquier cosa de naturaleza o carácter físico encontrado, ésta puede asociar a un criminal con la escena del delito, si la persona ha tocado algún elemento del lugar del crimen o si ha dejado algo olvidado, o ha tomado algo de la escena de dicho crimen.

La Química Forense es otra alternativa a los muchos caminos que puede seguir un químico en el ámbito de la investigación, además de ser una buena opción a la hora de hacer aportes significativos a la sociedad, donde su accionar, junto con su alto grado de conocimiento analítico y su capacidad de manejo instrumental, es de vital importancia para descifrar las evidencias y contribuir a la búsqueda de la verdad. Puesto que la química analítica se basa en la premisa de que cuando dos objetos entran en contacto, habrá un intercambio entre los dos. Es decir, “cada contacto deja un rastro”, frase que popularizó Edmund Locard³.-

Entender la evidencia requiere de herramientas provenientes de muchas disciplinas como la Química Analítica, la Biología, Ciencias de los Materiales y Genética. De hecho, el análisis de ADN está haciendo que el conocimiento en genética sea de mucha importancia.

³ (1877-1966) Francia. Conocido como el Padre de la Criminalística.

Con el paso del tiempo la Química Analítica ha adquirido una gran importancia en la investigación criminal, sobre todo a la hora de conocer la naturaleza intrínseca de cualquier sustancia o elemento y más aún, cuando sirve para auxiliar en la investigación científica de los delitos.

Por lo tanto los químicos forenses tienen tres tareas principales: primero, analizar las evidencias en el laboratorio, luego, se interpreta la información que se saca de ellas y por último, se puede llegar a defender lo encontrado, mediante la testificación del químico forense en un juicio.

1.1 PROBLEMA

Interpretación de los resultados (por parte de los investigadores) los cuales se desprenden de los ensayos químicos que son tendientes a establecer la naturaleza de las muestras de manchas que se sospechan de origen hemático.

En este marco, se generó el problema de esta investigación, esperando que aporte la información necesaria y adecuada, dentro del área del tratamiento de las manchas biológicas:

¿Qué efectos tiene la exposición a distintas temperatura y tiempo la mancha hemática?.

1.2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

Objetivo general:

Los factores temperatura y tiempo que influyen en la alteración de la naturaleza de las manchas de sangre, con el fin de que los encargados de interpretar los resultados contengan las herramientas necesarias.

Objetivos específicos:

- ✓ Analizar el factor Temperatura a diferentes graduación de manera que a través de ensayos prácticos y controlados en Laboratorio, se ejemplifique la degradación o alteración de la muestra.-
- ✓ Analizar el factor Temperatura a diferentes graduaciones en relación a diferentes Tiempos de exposición de las muestras.

1.3 FUNDAMENTOS Y PROPOSITOS

En la actualidad el sistema de investigación tradicional ha venido perfeccionándose en el análisis de diversos residuos biológicos, encontrándose entre ellos; semen, saliva, pelo, uña, piel, cabellos, células epiteliales, etc. Pero el fluido biológico que sigue siendo el recurso más importante es la “sangre”, debido a que es una prueba que indica una clara lesión corpórea y es la que con mayor frecuencia se presenta en estos casos.

Muchas son las ocasiones, en que se puede observar en el lugar del hecho una mancha, que presenta las morfologías típicas de un patrón hemático, es decir, tamaño, color, forma, distribución en relación al hecho acaecido, pudiéndose identificar así a prima facie, que se trata de una mancha de sangre, procediendo de esta forma el personal técnico encargado, a realizar las maniobras tendientes al levantamiento de la muestra, bajo las medidas implementadas para su conservación, traslado y custodia para su posterior estudio.

Una vez en el Laboratorio Químico Pericial, y luego de haber transcurrido unos diez días aproximadamente, comienza el tratamiento de la muestra posteriormente obtenida, siendo aquí donde se suscita la raíz de la problemática, dado que los ensayos químicos orientativos desarrollados sobre la muestra, dan resultado negativo para sangre, por ello, que se justifica el interés de realizar una investigación científica que apoye a los futuros procedimientos, que permita descartar las dudas que se originan en el momento de la interpretación de los resultados.

Es por esto, que en la búsqueda del esclarecimiento de los hechos delictivos de sangre, es necesario aportar a la investigación química, la naturaleza del presente ensayo, oportunidad en que se desprenderá la información correcta y necesaria en relación a la interpretación de los resultados orientativos negativos.-

Establecer su origen, aporta información útil para el proceso posterior de inclusión ó exclusión de sospechosos ó víctimas, e inclusive si se trata del lugar donde se desarrollaron los hechos.-

Asimismo, cabe destacar, que cuando una muestra se comprueba que efectivamente refiere a sangre, prosiguen los tratamientos químicos sobre el patrón, en procura de establecer la identificación de su origen, humano o no, y luego si la muestra lo amerita su tipificación y finalmente composición de ADN.-

“La similitud es, ante todo, de orden cualitativo y se halla en la base de la búsqueda o investigación esencial: si los efectos son parecidos cuando proceden de una misma causa, es preciso recurrir al juego de las comparaciones y los detalles significativos en los efectos para que esta similitud conduzca a la identificación de la causa común⁴.”

De Pierre Fernand Ceccaldi

2.- MARCO TEORICO CONCEPTUAL

2.1 LA SANGRE

La sangre es un líquido viscoso que circula por todo el cuerpo humano a través de vasos cerrados y contiene como pigmento respiratorio la hemoglobina.

La sangre está formada por:

El plasma, es líquido y está formado en el 90 por ciento de agua y en el 10 por ciento de otras sustancias como azúcares, proteínas, grasas y sales minerales; y por células que flotan en el plasma, comúnmente llamados elementos figurados de la sangre: Glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas.

En los adultos, los elementos figurados de la sangre se originan en la médula roja de los huesos largos, como húmero y fémur.

La médula ósea es uno de los órganos más activos y grandes del cuerpo y contiene células madres pluripotenciales (megacariocitos) que se diferencian en distintos precursores para distintos elementos figurados. El proceso de generación de células sanguíneas se llama hematopoyesis.

2.2. VOLUMEN Y COMPOSICION DE LA SANGRE

El volumen total de sangre en el cuerpo varía considerablemente con el tamaño del individuo y el nivel de entrenamiento alcanzado. Los grandes volúmenes de sangre están asociados con grandes tamaños corporales y altos niveles de entrenamiento de fondo. Los volúmenes de sangre de personas con un tamaño corporal medio y una actividad

⁴ “La Criminalística”, Ed. Oiko- Taus, Barcelona, 1971, p. 13, 14.

física normal (que no siguen entrenamientos aeróbicos) generalmente oscilan entre 5 y 6 litros en el caso de los hombres y entre 4 y 5 litros en el caso de las mujeres.

La sangre se compone de plasma (principalmente agua) y de células en suspensión. El plasma normalmente constituye entre el 55% y el 60% del volumen total de la sangre, pero puede reducirse un 10% o más con ejercicios intensos realizados en un ambiente caluroso o incrementarse un 10% o más con el entrenamiento de fondo o con la climatización al calor y a la humedad.

Aproximadamente, el 90% del volumen del plasma es agua, un 7% son proteínas plasmáticas y el restante 3% son nutrientes celulares, electrolitos, enzimas, hormonas, anticuerpos y productos de desecho.

La fracción corpuscular, que suele constituir aproximadamente entre el 40% y el 45% del volumen total de la sangre, son los glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas (trombocitos). Los glóbulos rojos constituyen más del 99% del volumen de la fracción corpuscular; los glóbulos blancos y las plaquetas juntos representan menos del 1%. El porcentaje del volumen total de la sangre compuesto por glóbulos rojos se denomina hematocrito.

2.3 VISCOSIDAD DE LA SANGRE⁵

La viscosidad se refiere al espesor de la sangre. Cuanto más espeso es un fluido, más resistencia opone a la circulación. La densidad de la sangre suele ser el doble de la del agua. La viscosidad de la sangre, y, por lo tanto, la resistencia a fluir, se incrementa con la elevación del hematocrito.

Debido al transporte de oxígeno por los glóbulos rojos, sería deseable un incremento en su número para optimizar el transporte de oxígeno. Pero si el aumento del número de glóbulos rojos no va acompañado de un incremento similar en el volumen del plasma, la viscosidad de la sangre aumentará, lo cual puede restringir el riego sanguíneo.

En general, esto no es un problema, a menos que el hematocrito llegue al 60% o más. A la inversa, la combinación de un hematocrito bajo con un alto volumen de plasma,

⁵ **Química Forense**, Luis Camilo Osorio Isaza Fiscal General de la Nación, Luis Alberto Santana Robayo Vice fiscal General de la Nación, Colombia, Marzo 2005, 50 p.

que reducirá la viscosidad de la sangre, parece ser algo beneficiosa para la función de transporte de la sangre porque ésta puede fluir más fácilmente.

Desgraciadamente, un hematocrito bajo es con frecuencia el resultado de un número reducido de glóbulos rojos, como en enfermedades tales como la anemia. Bajo estas circunstancias, la sangre puede fluir fácilmente, pero contiene menos transportadores, por lo que el transporte de oxígeno se ve dificultado. Para la actividad física, es deseable un bajo hematocrito con un número normal o ligeramente elevado de glóbulos rojos. Esta combinación debe facilitar el transporte de oxígeno. Muchos deportistas de deportes de resistencia alcanzan esta condición como parte de la adaptación normal de su sistema cardiovascular.

Los glóbulos blancos protegen el cuerpo de la invasión de organismos patógenos, y destruyen directamente a los agentes invasores mediante fagocitosis (ingestión) o formando anticuerpos para destruirlos. Los adultos tienen aproximadamente 7.000 glóbulos blancos por milímetro cúbico de sangre.

Las restantes células son las plaquetas. En realidad no son células en absoluto, sino más bien fragmentos de células. Estos pequeños discos son necesarios para la coagulación, que impide la pérdida excesiva de sangre. No obstante, lo que más nos interesa son los glóbulos rojos, por lo que nuestro análisis se centrará en ellos.

2.4 Glóbulos rojos: Conocidos también como eritrocitos o hematíes. Son el componente más abundante de la sangre, y actúan transportando el oxígeno. Como su nombre lo indica, son células de color rojo por su contenido de hemoglobina. Se fabrican en la médula roja de algunos huesos largos, y la disminución en el número normal de glóbulos rojos produce anemia.



Formación de los glóbulos rojos⁶

La formación continuada de eritrocitos o glóbulos rojos se denomina eritropoyesis. Esta constituye un sistema de renovación continua, es decir que sus elementos celulares poseen vida media limitada por lo cual deben ser reemplazados en forma periódica. A la misma categoría pertenecen las células de la piel, las del tracto gastrointestinal y las testiculares. Por el contrario, existen células que no son reemplazadas una vez que ha finalizado el crecimiento del órgano al que pertenecen (por ejemplo, las del sistema nervioso y de los músculos cardíaco y esquelético), o bien sólo lo son luego de alguna lesión (como sucede con las del tejido conectivo, del hígado o del riñón).

En condiciones normales la producción de eritrocitos constituye una magnitud constante: alrededor de 30 ml por kilogramo de peso corporal. Los eritrocitos viven, en el ser humano, 120 días. Este hecho determina la necesidad de un reemplazo inmediato para impedir que se modifique el volumen de eritrocitos circulantes. Alrededor de 20 ml de eritrocitos desaparecen por día de la circulación y, por tanto, idéntica cantidad debe ser producida por el organismo en el mismo lapso. El proceso de eritropoyesis en el ser humano demora entre 5 y 6 días, y ocurre en la médula ósea del esternón, de los huesos largos y de las costillas.

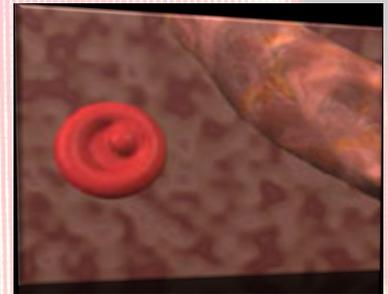
La pérdida accidental de eritrocitos -como es el caso de una hemorragia-, aumenta notablemente la magnitud de la eritropoyesis hasta restablecer el volumen globular perdido. Si, por el contrario, mediante transfusiones de sangre se aumenta el volumen de eritrocitos, la eritropoyesis cesa hasta que la muerte por senescencia posibilita el restablecimiento de los valores celulares normales. Todo ello prueba que la eritropoyesis es controlada por importantes y sensibles mecanismos que operan incrementando la producción cuando disminuye el número de eritrocitos o reduciendo la formación de éstos cuando dicho número aumenta.

La formación de eritrocitos es controlada por una hormona denominada eritropoyetina (Epo). La misma estimula la proliferación y diferenciación de células progenitoras, hecho que determina la aparición de eritrocitos circulantes. La principal

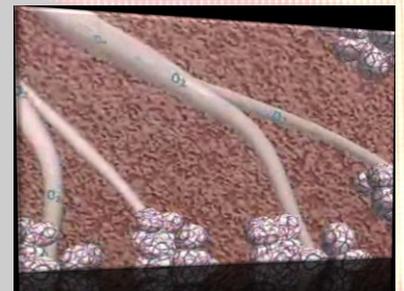
⁶ **Química Forense**, Luis Camilo Osorio Isaza, ob, cit..

función de los eritrocitos es el transporte de gases entre los pulmones y los tejidos, y por tanto la oxigenación tisular está íntimamente relacionada con la producción de eritrocitos a través de la síntesis de Epo. Mediante mecanismos no totalmente conocidos, la disminución de oxígeno tisular estimula la producción de Epo, mientras que el exceso de oferta inhibe la síntesis de la hormona.

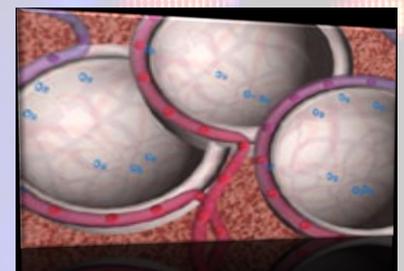
Los resultados mostraron, en seres humanos normales, un amplio rango de valores, con un promedio de 14.9 mU/ml (la unidad U es un patrón que mide la cantidad de hormona presente en una muestra). El radio inmuno ensayo permitió además confirmar que la mayoría de los pacientes con insuficiencia renal crónica poseen bajos niveles de Epo (anemia renal). Por otra parte, la metodología es eficaz para diferenciar distintas variedades de policitemias, es decir, el aumento del volumen de eritrocitos circulantes. Así, los pacientes afectados por la llamada policitemia (patología instalada por un descontrol en la proliferación de las células progenitoras eritrocíticas) mostraron niveles de Epo cercanos a 3 mU/ml, mientras que en otros casos (policitemias secundarias) los títulos plasmáticos de la hormona se revelaron mucho más elevados.



El nombre científico de los glóbulos rojos es eritrocitos. Se forman en la médula ósea y son creados por una célula madre. Los glóbulos rojos son los más numerosos de todas las células sanguíneas que hay en la sangre. En el cuerpo de un adulto se producen de 4 a 5 billones de glóbulos rojos por hora.



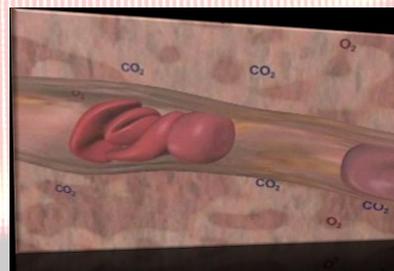
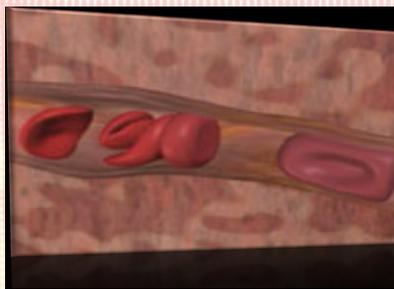
Cuando un glóbulo rojo madura, expulsa su núcleo antes de entrar al torrente sanguíneo. Se parece a un plato o una rosquilla pero sin el agujero del centro. Los glóbulos rojos sólo miden de 7 a 8 micrones de diámetro, pero son las partículas más pesadas de la sangre.



Los glóbulos rojos contienen hemoglobina, una proteína que transporta el oxígeno. El oxígeno también se conoce por O_2 . Cada vez que respiramos, inhalamos oxígeno con el aire.

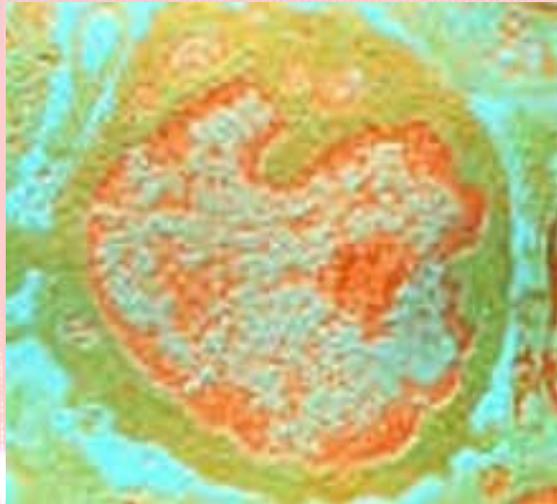
La función de los glóbulos rojos es absorber oxígeno de los pequeños alvéolos que se encuentran en los pulmones y llevarlo a todos los músculos, tejidos y órganos del cuerpo.

Para lograr esto, tienen que viajar por grandes arterias y pequeños capilares. A veces los capilares son tan pequeños que los glóbulos rojos deben comprimirse y estirarse e incluso plegarse para poder pasar y poder liberar su cargamento de oxígeno.



Pero eso es sólo la mitad del viaje. Luego de liberar el oxígeno, los glóbulos rojos recogen un producto de desecho de las células llamado dióxido de carbono, conocido también como CO_2 . En el viaje de vuelta, pasarán por las venas hasta llegar a los pulmones donde finalmente liberarán el CO_2 . El cuerpo elimina dióxido de carbono cada vez que exhalamos! Luego, los glóbulos rojos comienzan nuevamente el mismo viaje. A las células sanguíneas les lleva un promedio de 30 a 45 segundos recorrer el circuito completo del cuerpo. Los glóbulos rojos viven alrededor de 120 días, y cuando mueren, son sacados de la circulación por un órgano llamado bazo.

2.5 Glóbulos blancos o leucocitos: Son células que no tienen color, tienen un tamaño mayor que los glóbulos rojos. Cumplen la función de defender al cuerpo de los microorganismos infecciosos ya que tienen ciertas características que hacen posible esta acción.

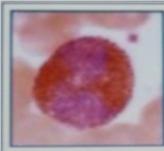
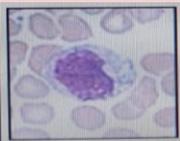


Los glóbulos blancos poseen la capacidad de responder frente a los órganos dañados; cuando captan la fuente infecciosa, pueden atravesar las paredes de los vasos sanguíneos y dirigirse al sitio de la infección. Esto lo hace deformando su "cuerpo" y desplazándose, y al llegar a la infección envuelven al agente patógeno (o lo comen) y de esta manera lo destruyen. Se fabrican en la médula ósea.

Los glóbulos blancos de la sangre son de dos tipos principales: los granulocitos, con núcleo multilobulado, y los no granulocitos, que tienen un núcleo redondeado.

Los leucocitos granulocitos o granulocitos son las células con núcleo más abundantes en la sangre. Estas células fagocitan (ingieren) los antígenos que penetran en el cuerpo, sobre todo si estos antígenos han sido recubiertos en la sangre por inmunoglobulinas o por proteínas del sistema del complemento del Sistema inmunológico. Una vez ingeridos, los antígenos suelen ser destruidos por las potentes enzimas de los granulocitos.

Las principales características de los diferentes tipos de leucocitos se pueden resumir en la siguiente tabla:

Micrografía	Nombre	% Normal	Características principales
	Neutrófilos	55-65	Poseen un núcleo multilobulado (3-5 lobulaciones), y gránulos azurofilos lisosomas, en su citoplasma que contiene enzimas hidrolíticas las cuales le permiten actuar en la fase aguda de la inflamación
	Eosinófilos	0.5-4	Tienen un núcleo bilobulado y poseen granulaciones acidofílicas que contiene enzimas hidrolíticas y peroxidasas que son liberadas en las vacuoladas fagocíticas. Aumentan en infecciones parasitarias y procesos alérgicos.
	Basófilos	0.5	Poseen un núcleo bilobulado y grandes gránulos esféricos basofílicos y metacromáticos dados por heparina e histamina. Liberan además aminas vasoactivas y sustancia de reacción lenta de la anafilaxia.
	Linfocitos	25-35	Son células pequeñas que contienen un núcleo circular oscuro y un escaso citoplasma azul claro. Existen dos tipos: Linfocitos T: Se diferencian en el timo y circulan en la sangre periférica, donde ellos son los principales artífices de la inmunidad celular. Poseen funciones como ayudadores (CD4) ó supresores (CD8), Modulando la respuesta a través de sus efectos sobre otras células. Linfocitos B: se diferencian en la médula ósea y son los principales encargados de la respuesta humoral a través de la producción de anticuerpos. Una vez se colocan en contacto con un antígeno se diferencian en células plasmáticas que sintetizan anticuerpos.
	Monocitos	4-8	Son las células circulantes de mayor tamaño. Poseen un núcleo excéntrico en forma de U ó en forma "arriñonada". Son los precursores del sistema mononuclear fagocítico, que incluye macrófagos (histiocitos), osteoclastos, macrófagos alveolares, células de Kupfer en el hígado y la microglía en el sistema nervioso central.

2.6 Plaquetas o trombocitos: Las plaquetas o trombocitos son fragmentos celulares pequeños (2-3 μm de diámetro), ovales y sin núcleo (anucleados). De hecho, son las cuasi células más pequeñas de la sangre.

Se producen en la médula ósea a partir de la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos (células de gran tamaño presentes en la médula ósea) quedando libres en la circulación sanguínea. Las plaquetas sirven para taponar las lesiones que pudieran afectar a los vasos sanguíneos. En el proceso de Coagulación (hemostasia), las plaquetas contribuyen a la formación de los coágulos (trombos), así son las responsables del cierre de las heridas vasculares.



Cuando se rompe un vaso circulatorio ellas vienen y rodean la herida para disminuir el tamaño para evitar el sangrado. La formación de un tapón impide que la sangre salga de un vaso cuando la pared de éste se ha roto, de manera que se mantenga constante el volumen sanguíneo. Esta situación de equilibrio se llama hemostasis.

Una persona adulta tiene un promedio de cinco litros de sangre, con una temperatura cercana a los 37 grados Celsius. Una gota de sangre contiene alrededor de 250.000 plaquetas. La labor de las plaquetas, formar el tapón para impedir la salida de la sangre por alguna herida, es complementada por el fibrinógeno (proteína sintetizada en el hígado) que se transforma en unos hilos pegajosos y con las plaquetas constituyen una

red para atrapar los glóbulos rojos que se coagulan y forma una costra para evitar la hemorragia.

2.7 Coagulación: Una de las propiedades más notable de la sangre es su capacidad para formar coágulos o coagular cuando se extrae del cuerpo. Dentro del organismo un coágulo se forma en respuesta a una lesión tisular, como un desgarro muscular, un corte o un traumatismo penetrante.

En los vasos sanguíneos la sangre se encuentra en estado líquido, poco después de ser extraída adquiere un aspecto viscoso y más tarde se convierte en una masa gelatinosa firme. Después esta masa se separa en dos partes: un coágulo rojo firme que flota libre en un líquido transparente rosado que se denomina suero.

Un coágulo está formado casi en su totalidad por eritrocitos encerrados en una red de finas fibrillas o filamentos constituidos por una sustancia llamada fibrina. Esta sustancia no existe como tal en la sangre pero se crea durante el proceso de la coagulación, por la acción de la trombina, enzima que estimula la conversión de una de las proteínas plasmáticas, el fibrinógeno, en fibrina.

La trombina no está presente en la sangre circulante. Esta se forma a partir de la protrombina, otra proteína plasmática, en un proceso complejo que implica a las plaquetas ciertas sales de calcio, sustancias producidas por los tejidos lesionados y el contacto con las superficies accidentadas.

Si existe algún déficit de estos factores la formación del coágulo es defectuosa. La adición de citrato de sodio elimina los iones de calcio de la sangre y por consiguiente previene la formación de coágulos.

La carencia de vitamina K hace imposible el mantenimiento de cantidades adecuadas de protrombina en la sangre. Ciertas enfermedades pueden reducir la concentración sanguínea de varias proteínas de la coagulación o de las plaquetas.

2.8 Factor Rh

Término que se aplica a cualquiera de las más de treinta sustancias que reciben el nombre de aglutinógenos y que se encuentran en la superficie de los eritrocitos

sanguíneos. Son diferentes de los principales tipos de grupo sanguíneo, pero se desconoce su composición.

Los factores Rh se descubrieron en la sangre del mono Rhesus en 1937. Este primer aglutinógeno Rh, que correspondía a lo que se denomina en la actualidad Rh O, está presente en la sangre de casi el 85% de los seres humanos.

La presencia de factores Rh en la sangre está controlada por las leyes de la herencia. Un individuo que posea un gen que codifique la existencia de factor Rh expresará dicho factor en los glóbulos rojos.

Los hijos de una mujer con dos genes recesivos para el factor Rh O, es decir, que sea Rh negativo, y un hombre que tenga uno o dos genes que expresen el factor Rh positivo, expresarán el factor Rh O. Cuando esta madre esté embarazada y el feto sea Rh positivo, la madre producirá anticuerpos contra el factor Rh O en el 5% de los casos.

Por lo general, estos anticuerpos serán demasiado débiles para causar daños al primer hijo, pero destruirán los glóbulos rojos de la sangre de cualquier hijo posterior que sea Rh positivo. Esta reacción origina la *eritroblastosis fetal* o enfermedad del Rh, que produce ictericia, anemia, daño cerebral y con frecuencia la muerte antes o poco después del nacimiento del bebé.

2.9 Grupo Sanguíneo

Es la clasificación de los glóbulos rojos o eritrocitos de la sangre según la naturaleza de ciertos componentes de su superficie. La tipificación de grupo es un requisito necesario para las transfusiones de sangre.

Los cuatro grupos sanguíneos son: A, B, AB y O. Las células sanguíneas del grupo A tienen la sustancia A en su superficie. Además, la sangre de este grupo contiene anticuerpos contra la sustancia B presente en las células rojas de la sangre del grupo B. La sangre de este último grupo tiene la composición inversa al grupo A.

En el suero del grupo AB no existe ninguno de los dos anticuerpos previos, pero los glóbulos rojos contienen la sustancia A y la sustancia B. El grupo O carece de estas sustancias en las células rojas, pero este suero es capaz de producir anticuerpos contra las células rojas que las contengan.

Si se transfunde sangre del grupo A, a una persona del grupo B, los anticuerpos anti-A del receptor destruirán las células rojas de la sangre transfundida. Como los

eritrocitos de la sangre del grupo O no contienen ninguna sustancia en su superficie, la sangre de este grupo puede ser empleada con éxito en cualquier receptor. Las personas del grupo AB no producen anticuerpos y pueden recibir transfusiones de cualquiera de los cuatro grupos.

Así, los grupos O y AB se denominan donante universal y receptor universal respectivamente.

2.10 Hemoglobina⁷

La sangre es un líquido viscoso que circula por todo el cuerpo humano a través de vasos cerrados y contiene, como pigmento respiratorio, la hemoglobina.

La hemoglobina, es un pigmento de color rojo presente en los glóbulos rojos de la sangre, es una proteína de transporte de oxígeno y que está compuesta por la globina y cuatro grupos Heme. Cuando la hemoglobina se une al oxígeno se denomina oxihemoglobina o hemoglobina oxigenada, dando el aspecto rojo o escarlata intenso característico de la sangre arterial. Cuando pierde el oxígeno, se denomina hemoglobina reducida, y presenta el color rojo oscuro de la sangre venosa (se manifiesta clínicamente por cianosis).

Los glóbulos rojos, conocidos también como eritrocitos o hematíes, son el componente más abundante de la sangre, y actúan (por su componente de hemoglobina) transportando el oxígeno. Como su nombre lo indica, son células de color rojo (por el color de la hemoglobina). Se fabrican en la médula roja de algunos huesos largos, y la disminución en el número normal de glóbulos rojos produce anemia.

2.10.1 Transporte del oxígeno y del dióxido de carbono (CO₂)

El sistema circulatorio transporta el oxígeno desde los pulmones a los capilares y el anhídrido carbónico desde estos últimos a los pulmones.

⁷ **Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología;** Instituto Nacional de la Salud, Lima, Perú, Marzo 2005, 87 p.

Además de transportar el oxígeno, los eritrocitos también contribuyen, mediante dos mecanismos, a la eliminación del CO_2 producido en las células:

- La hemoglobina tiene capacidad para fijar el CO_2 y transportarlo a los pulmones donde lo libera.
- Los eritrocitos disponen de una enzima, la anhidrasa carbónica, que hace reaccionar el CO_2 con el agua produciendo el bicarbonato, un importante anión en la regulación del equilibrio ácido-base.



2.10.2 Combinación del oxígeno con la hemoglobina

Prácticamente todo el oxígeno transportado en la sangre arterial lo hace unido a la hemoglobina. Solo una pequeña porción del oxígeno se disuelve en el plasma sanguíneo. En un adulto normal, la sangre contiene unos 150 gr de hemoglobina por litro. Cada gramo de hemoglobina puede combinarse con 1,34 ml. de oxígeno, con lo que 1 litro de sangre combina aproximadamente 200 ml. de O_2 (100% de saturación de hemoglobina).

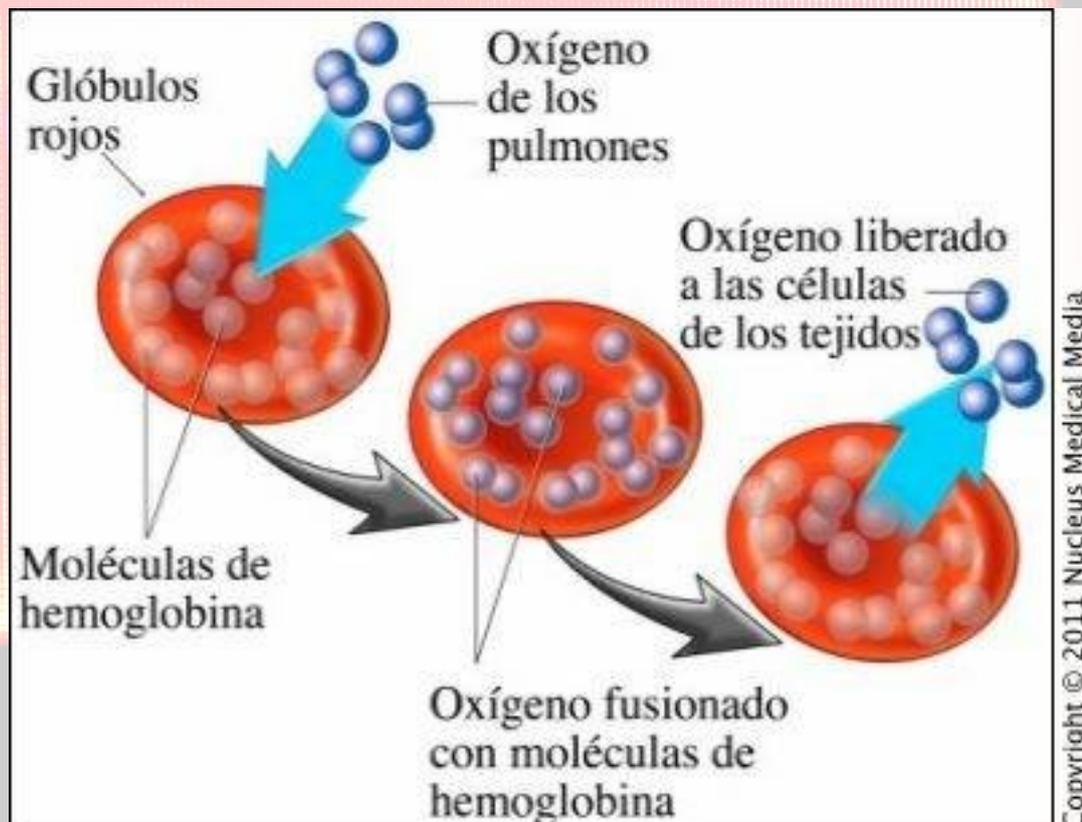
2.10.3 Equilibrio Oxígeno-Hemoglobina

La unión del oxígeno a la hemoglobina depende de la presión parcial de oxígeno (PO_2) existente en ese momento. La relación existente entre unión del O_2 a la hemoglobina y su presión parcial se llama curva de equilibrio hemoglobina-oxígeno y se determina experimentalmente.

La unión del oxígeno a la hemoglobina está relacionada con varios factores fisiológicos:

La unión con el oxígeno es reversible: hemoglobina \leftrightarrow oxihemoglobina \leftrightarrow hemoglobina.

La reacción del oxígeno con la hemoglobina es muy rápida (del orden de milisegundos).



2.10.4 Contenido de oxígeno en la sangre

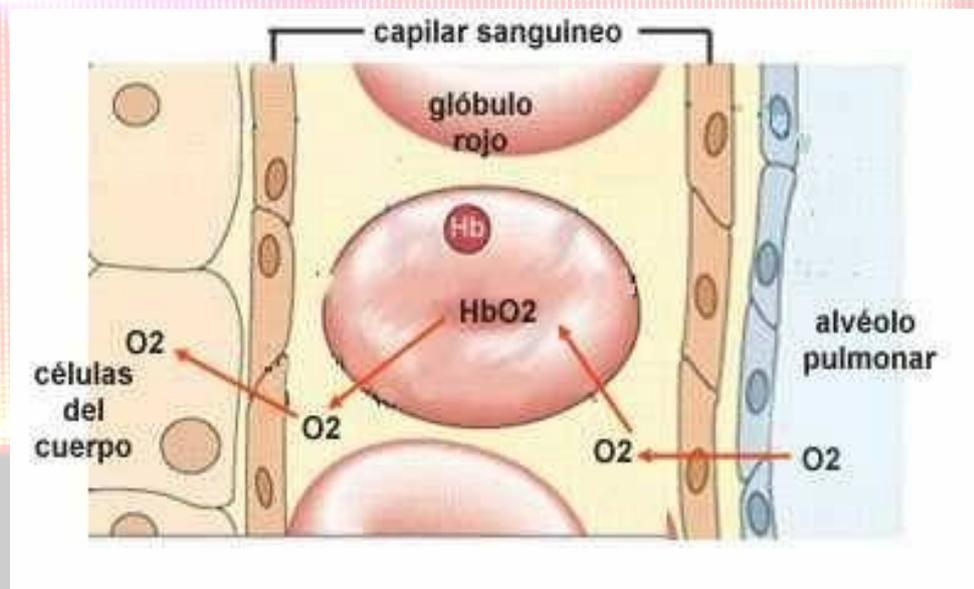
El color de la sangre varía, dependiendo de la saturación del oxígeno que se encuentre, debido a las propiedades ópticas del grupo hemo de la molécula de hemoglobina. Cuando la molécula de hemoglobina libera oxígeno pierde su color rosado, adquiriendo un tono más azulado y deja pasar menos la luz roja.

La concentración de O_2 en sangre, deriva, del O_2 disuelto y el transportado por la hemoglobina, que, a su vez, depende de la cantidad de hemoglobina y el porcentaje de saturación (S) de la hemoglobina. Para calcular los valores de contenido de O_2 en la

sangre, se deben conocer las condiciones de pH, temperatura, presión de CO_2 (PCO_2) y presión de O_2 (PO_2).

2.10.5 Transporte de oxígeno combinado con la hemoglobina

La hemoglobina actúa como un vehículo que se carga de oxígeno en los capilares pulmonares y lo transporta a los tejidos. Al entregar O_2 a los tejidos la hemoglobina oxigenada (oxihemoglobina) se transforma en hemoglobina reducida, que por ser un ácido débil puede atraer iones de H^+ (mayor acidez). Con ello aumenta la capacidad de transporte de CO_2 (efecto Haldane).



De este modo, la entrega de O_2 y la captación de CO_2 que tienen lugar en los capilares sistémicos son dos procesos que se favorecen mutuamente: un aumento de la presión de CO_2 en la sangre capilar, con la consiguiente disminución del pH, que facilita la entrega de O_2 (efecto Bohr⁸), a la par que el aumento de hemoglobina reducida facilita la captación de CO_2 (efecto Haldane⁹).

⁸ *Efecto Bohr* la propiedad de la Hemoglobina descrita por primera vez en 1904 por el fisiólogo danés Christian Bohr

que establece que a un Ph menor (más ácido), la hemoglobina se unirá al Oxígeno.

⁹ *Efecto Haldane* La desoxigenación de la sangre incrementa la habilidad de la hemoglobina para portar dióxido de carbono.

Aunque el CO_2 es un residuo del metabolismo que el organismo debe eliminar, en su camino hacia la atmósfera es un determinante crucial del control de la ventilación y del equilibrio ácido-base.

2.10.6 Saturación de la hemoglobina

Cada molécula de hemoglobina puede transportar cuatro moléculas de oxígeno. Ya dijimos que cuando el oxígeno se combina con la hemoglobina forma oxihemoglobina; como contrapartida, la hemoglobina que no se combina con el oxígeno recibe el nombre de desoxihemoglobina.

Son muchos los factores que pueden influir en la saturación de la hemoglobina. Los tres más característicos son:

a) La presión parcial del oxígeno en el plasma: La combinación del oxígeno con la hemoglobina depende de la presión parcial del oxígeno (PO_2) de la sangre y de la fuerza del enlace o afinidad entre la hemoglobina y el oxígeno.

Una elevada presión parcial del oxígeno (PO_2) en la sangre produce una casi completa saturación de la hemoglobina, que indica la cantidad máxima de oxígeno que se combina. Pero cuando la PO_2 se reduce, también lo hace la saturación de hemoglobina.

b) El pH de la sangre: Si, por ejemplo, la sangre se vuelve más ácida, quiere decir que la hemoglobina está descargando más oxígeno a nivel de los tejidos.

El pH en los pulmones suele ser alto, por lo que la hemoglobina que pasa a través de los pulmones tiene una fuerte afinidad con el oxígeno, lo que favorece una elevada saturación. No obstante, a nivel de los tejidos, el pH es más bajo, lo que provoca que el oxígeno se disocie de la hemoglobina y suministre así este oxígeno a los tejidos.

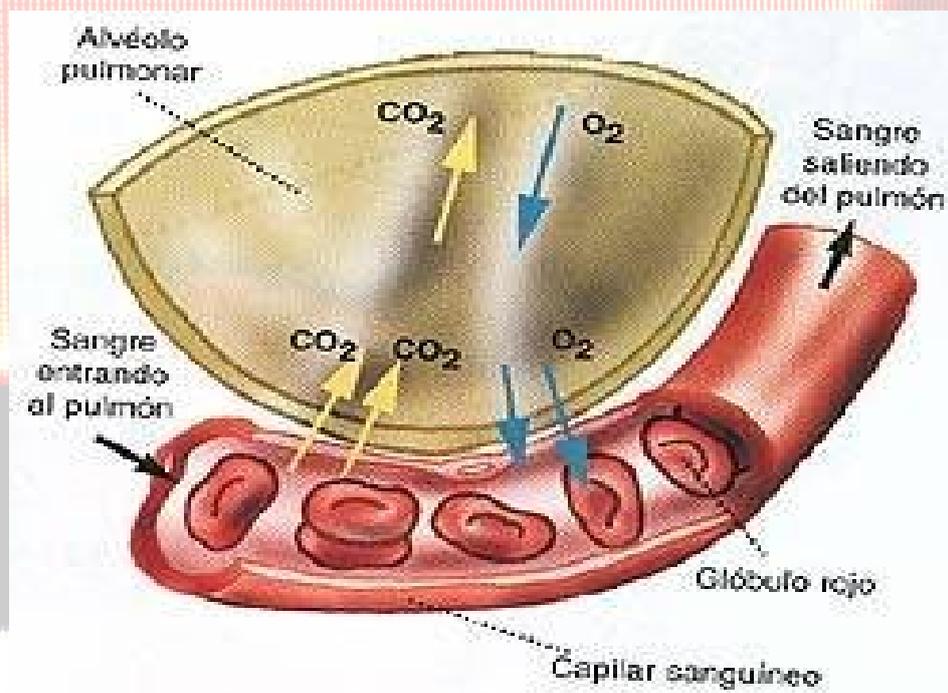
c) La temperatura de la sangre: La temperatura de la sangre también afecta a la disociación del oxígeno. El aumento de la temperatura en la sangre permite la descarga más eficaz del oxígeno. Por ello, la hemoglobina descargará más oxígeno cuando la sangre circule a través de los músculos activos calentados metabólicamente.

En los pulmones, donde la sangre es más fría, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno aumenta, esto favorece la combinación con el oxígeno.

2.10.7 Capacidad de la sangre para trasportar oxígeno

La capacidad de la sangre para transportar oxígeno, es la cantidad máxima de oxígeno que la sangre puede transportar. Depende principalmente del contenido de hemoglobina de la sangre.

Cada 100 ml de sangre contienen un promedio de 14 a 18 g de hemoglobina en los hombres y de 12 a 16 g en las mujeres. Cada g de hemoglobina puede combinarse con alrededor de 1,34 ml de oxígeno, por lo que la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre es de 16 a 24 ml por cada 100 ml cuando la sangre está totalmente saturada de oxígeno.



Cuando la sangre pasa a través de los pulmones está en contacto con el aire alveolar unos 0,75 de s. Tiempo suficiente para que la hemoglobina se combine con casi todo el oxígeno que pueda retener, produciendo una saturación del 98 por ciento.

Con intensidades altas de ejercicio, el tiempo de contacto disminuye en gran medida, lo cual reduce los enlaces de la hemoglobina con el oxígeno y disminuye la saturación.

2.10.8 Transporte de dióxido de carbono

El dióxido de carbono (CO₂) también depende de la sangre para su transporte. Una vez que el dióxido de carbono es liberado de las células, es transportado en la sangre principalmente de tres maneras:

- Una pequeña cantidad (entre 7 y 10 por ciento), disuelto en el plasma.
- La mayor parte (entre 60 y 70 por ciento), como iones de bicarbonato resultantes de la disociación del ácido carbónico, que también ha liberado iones de hidrógeno (H⁺) (acidez).
- Combinado con la hemoglobina.

La formación de iones de bicarbonato favorece la descarga de oxígeno.

“No se debe tocar, cambiar o alterar cosa alguna hasta que esté debidamente identificada, medida y fotografiada. Recordar que cuando algo se ha removido, no podrá ser restituido en su posición original.”

De Le Moyne Snyder

3.- ANTECEDENTES¹⁰

3.1 Técnicas de Identificación de Sangre

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

Unos años más tarde, LUDWIG TEICHMANN-STAWLARSKY, describió el método conocido como prueba de TEICHMANN y que consiste en disolver la mancha de sangre seca, colocar unas gotas en un cristal junto con una pequeña cantidad de sal común y ácido acético cristalizado y calentar hasta la ebullición de la mezcla.

Aparecen unos cristales característicos de la sangre que llamó cristales hemínicos y que se forman a partir de la Hemoglobina. El método es aplicable cuando la mancha de sangre se encuentra sobre metales oxidados o cuando se ha sometido a altas temperaturas; se admite desde entonces que si se observa la formación de los cristales, la mancha es, con toda seguridad, de sangre, existiendo dudas si la prueba resulta negativa.

En 1861, VAN DEEN, propuso un método que consistía en demostrar la existencia de peroxidasa en la muestra a analizar, provocando la oxidación de la tintura de guayaco por el oxígeno.

¹⁰ **Revista de Higiene y Sanidad Pecuarias**, Fundador F. Gordon Ordas, España, Madrid, tomo XXIV, Agosto – Septiembre 1934, 166 p.

En 1863, SCHÖNBEIN describió un método que está basado en comprobar si la muestra contenía o no catalasas añadiendo peróxido de hidrógeno. Esta prueba, junto con la ya mencionada de VAN DEEN, están incluidas en el grupo de técnicas dirigidas a realizar las pruebas de orientación, por lo que las describiremos con detalle más adelante.

El año 1859, marcó el inicio del desarrollo de otro grupo importante de técnicas basadas en el análisis espectral de la sangre. Ya entonces se conocía que cuando la luz atravesaba un prisma y se dirigía sobre una pantalla, se obtenía una banda semejante al arco iris y se observaban los siete colores del rojo al violeta.

BUNSEN y KIRCHHOFF, descubrieron que cualquier compuesto capaz de irradiar luz, tenía su espectro característico. Comprobaron que los sólidos, líquidos o gases que se sometían al calor o a descargas eléctricas, emitían radiaciones específicas para cada sustancia, dando lugar a un espectro distinto para cada una de ellas y que permite su identificación. En el caso de sustancias que no emiten luz propia se pueden obtener los espectros de absorción. Para esto, se proyecta una luz sobre la sustancia que vamos a estudiar. Parte de esta luz la absorbe la sustancia que se está analizando y el espectro que se obtiene también es característico de esa sustancia.

Posteriormente se descubrió la existencia de rayos ultravioleta e infrarrojos, que producen espectros que son visibles a través de la fotografía y que son de gran ayuda para conseguir identificar sustancias desconocidas.

La hemoglobina tiene un espectro de absorción característico que permite su identificación.

Si se trata de sangre fresca, se puede obtener tratándola sólo con sal común; si se analiza sangre seca, se disuelve la mancha con ácido acético, ácido sulfúrico o alcohol. Las pequeñas alteraciones que se provocan en la hemoglobina por la acción de los disolventes, no impiden su identificación.

Aplicando las técnicas de análisis espectral, MAGNANINI, en 1898, propuso un método para distinguir la sangre humana de la animal, basado en la diferente velocidad con que se forma hematina cuando la sangre se trata con potasa. Así, cuando la sangre

era humana, se formaba más rápidamente que cuando se trataba de animales. Este método sólo se podía aplicar a sangre fresca y no a las manchas.

En 1901, PAUL UHLENHUT, publicó un estudio llamado "Método para diferenciar diversos tipos de sangre, y, en especial, para comprobar, mediante un diagnóstico diferencial, la existencia de sangre humana", y que fue considerado la innovación más importante de la Medicina Forense durante el siglo XIX.

También en 1901, LANDSTEINER, descubre la presencia de diferentes grupos sanguíneos en humanos. Fue lo que llamó el sistema ABO. En 1902, RICHTER, intentó aplicar este sistema a la identificación de sangre seca, pero esto no fue posible hasta 1916, mediante una técnica desarrollada por LEONE LATTES.

KASTLE y SCHEEDE en 1903 y, posteriormente, MEYER, propusieron el método basado en la oxidación de la Taleina de Fenol, que describiremos detalladamente más adelante, ya que este método está incluido en el conjunto de técnicas que se utilizan en las pruebas de orientación para el diagnóstico genérico de las manchas.

En 1904, ADLER, describió un método para identificar manchas de sangre utilizando bencidina (ver anexo) y, más adelante, en 1911, VON FURTH, propuso la utilización de la leuco malaquita verde en sustitución de la bencidina.

El método de VON FURTH, fue modificado en 1912 por MICHEL, y unos años después, en 1931 por MEDINGER. También en 1912, RUTTAN y HARDISTY, utilizaron la O-Tolidina, sustituyendo a la bencidina en la prueba de ADLER. Transcurrido más de un cuarto de siglo, en 1939, GERSHENFELD, propuso sustituir la bencidina por O-Toluidina.

Fue en 1937, cuando WALTER SPECHT, describió su método basado en la identificación de la sangre por luminiscencia.

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

Aunque no van a ser motivo de nuestro estudio, señalaremos como muy importantes, la posibilidad de detectar los antígenos de la sangre en otros fluidos

corporales como saliva y semen, descrita por LANDSTEINER y LEVINE y, simultáneamente, por YAMAKAMI. Destacaremos también el descubrimiento en 1940, de LANDSTEINER y WEINER de la existencia del factor RH en la sangre y, en 1945, la descripción del Test de COOMBS, propuesto por COOMBS, MOURANT y RACE, para la detección de anticuerpos anti-Rh.

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

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

Las técnicas espectroscópicas adquirieron un gran desarrollo entre los años 1970 y 1980. Un paso definitivo, que en este momento se encuentra en plena expansión, se dio en 1987 cuando JEFFREYS propuso el proceso basado en la obtención de lo que se llamó la "huella genética".

Por las características de nuestro trabajo, debemos centrarnos ya en los métodos empleados en las pruebas de orientación de las manchas de sangre, y para ello, haremos una revisión de los más conocidos y discutiremos su fiabilidad. Las primeras pruebas que se propusieron eran poco sensibles.

3.2 Técnicas basadas en características químicas de la sangre¹¹

3.2.1 Comportamiento al contacto con agua destilada: La sangre desecada se diluye en agua destilada dándole un tinte rojizo y formando unas estrías características cuando asciende por un tubo capilar.

3.2.2. Comportamiento al contacto con potasa: Si se añade potasa a un recipiente con sangre diluida en agua, aparece un tinte dicrómico rojo al trasluz y verde con luz reflejada. Esta propiedad de la sangre se debe a la transformación de la hemoglobina en hematina alcalina.

¹¹ **Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología**, ob, cit..

3.2.3. Comportamiento al contacto con amoníaco: El amoníaco no cambia el color de la sangre, pero sí el de otros compuestos que pueden confundirse con ella.

3.2.4. Comportamiento al contacto con Acido Hipocloroso: Al añadirlo a la sangre, produce un oscurecimiento de la misma, mientras que si se trata de otra sustancia orgánica, la aclara. En el caso de que la mancha de sangre esté muy extendida, podría aclararse pero muy lentamente. Este método es muy poco fiable, puesto que además hay otras sustancias que se comportan como la sangre.

3.2.5. Búsqueda de Albumina y Fibrina: Si se calienta una solución de sangre muy lentamente, adquiere un color grisáceo, debido a la coagulación de la albúmina. Aparece también un coágulo muy lábil, que se puede desestructurar con potasa, dando lugar al tinte dicrómico que se describió anteriormente.

3.2.6. Búsqueda de Nitrógeno: Al calentar trozos de sangre desecados, se desprenden vapores amoniacales que se pueden identificar por el olor, o también, observando el viraje del papel tornasol a color azul. El nitrógeno es el único gas capaz de producir este cambio.

3.2.7. Reacción con el Hipobromito de Sodio: Esta prueba fue ideada por FLORENCE. Consiste en poner sobre un portaobjetos una gota de solución sanguínea o unos filamentos de tejido manchados con sangre y que, a continuación, se tapan con el cubreobjetos. En los bordes del cubre, se añaden unas gotas de hipobromito de sodio que penetra por capilaridad. Si la muestra es sangre, se observa la formación de burbujas de gas.

3.2.8 Reacción con Sulfato de Hidracida: Se trata de obtener hemocromógeno o hematina alcalina.

La coloración se pierde al agitar porque el hemocromógeno se oxida. El reactivo se prepara a partir de un litro de solución de potasa al que se le añaden 100 ml de alcohol de 95 y 5 g de sulfato de hidracida. A continuación se filtra. El método consiste en añadir a un ml de la solución problema, 10 ml de reactivo. Si la muestra contiene sangre, se observa la aparición de un color rosa. Esta técnica es muy poco específica. Además es una reacción muy poco estable, por lo que en ocasiones resulta difícil valorar si el resultado ha sido positivo o negativo.

3.3. Fundamento químico

La presencia en la sangre de enzimas que catalizan la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno.

Estos enzimas forman parte del sistema de defensa que los organismos han ido desarrollando, con el fin de protegerse de la acción tóxica de los productos intermedios que se pueden producir durante el proceso de reducción del oxígeno.

Existen dos tipos diferentes de enzimas capaces de catalizar la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno: las catalasas y las peroxidasas.

3.3.1 CATALASAS

Las catalasas son enzimas que se encuentran en la sangre, la médula ósea, la mucosa, el riñón y el hígado.

Estos catalizadores utilizan dos moléculas de peróxido de hidrógeno, una de ellas actúa como sustrato dador de electrones y la otra como oxidante o receptor de electrones. La reacción que se produce se puede escribir de la siguiente forma:



Durante el proceso se libera oxígeno, de forma que, si a una muestra que contiene catalasas le añadimos peróxido de hidrógeno, se observa la formación de burbujas como consecuencia del oxígeno que se desprende en la reacción.

En 1863, SCHÖNBEIN¹², propuso una técnica para identificación de manchas de sangre que se basaba en la existencia de catalasas en la muestra. El método es el siguiente:

3.3.2 PEROXIDASAS

Las peroxidasas son enzimas típicos de los vegetales, aunque también se encuentran en la leche y en la sangre, específicamente, en los glóbulos rojos y blancos.

¹² (1799-1868) Químico Germano –suizo, creador de la nitrocelulosa.

En los eritrocitos, la enzima glutatión peroxidasa cataliza la reacción implicada en la destrucción del peróxido de hidrógeno mediante la reducción del glutatión, lo que protege a los lípidos de la membrana y a la hemoglobina contra la oxidación.

A diferencia de las catalasas, las peroxidasas, para descomponer el peróxido de hidrógeno, necesitan la presencia de otro sustrato en el medio de reacción, que a su vez es oxidado durante el proceso. Es por esto que son enzimas ambivalentes, ya que actúan descomponiendo el peróxido y obteniendo a la vez un metabolito, como resultado de la oxidación del sustrato. Podemos escribir la reacción de la siguiente forma:



El grupo de pruebas que vamos a describir a continuación tienen todas ellas el mismo fundamento que, según la bibliografía revisada, es el siguiente: las peroxidasas presentes en las muestras que se van a identificar, actúan catalizando la descomposición del peróxido de hidrógeno, produciéndose una liberación de oxígeno. Para hacer fácilmente evidente la reacción, se deben preparar reactivos que, al ser oxidados, cambien de color.

Las técnicas consisten en mezclar el reactivo con la muestra que se quiere identificar, y añadir a continuación, peróxido de hidrógeno. Las peroxidasas presentes en la muestra catalizan la descomposición del peróxido, liberándose oxígeno, que a su vez oxida al reactivo, provocando un cambio de color en la disolución.

3.4. REACCION CATALITICOS

3.4.1. TINTURA DE GUAYACO: Fue descrita en 1861 por VAN DEEN, pero fue TAYLOR el que la aplicó a la determinación de manchas de sangre, en 1871.

Si en presencia de tintura de guayaco se añade a la solución de sangre un compuesto capaz de actuar como donante de oxígeno, como la esencia ozonizada de trementina, se observa la aparición de un color azul. Esto se debe a que las oxidasas de la sangre provocan la liberación de oxígeno por parte de la trementina alcanzándose la oxidación de la resina de guayaco. Esta reacción es fácilmente detectable ya que la forma oxidada de la resina de guayaco es de color azul.

El método experimental fue descrito por FLORENCE y TAYLOR, y es el siguiente: preparar extemporáneamente la tintura de guayaco, para lo que se disuelven 5 g de resina de guayaco en 100 ml de alcohol de 95 y se filtra. Se obtiene un líquido de color ambarino que es la tintura de guayaco.

Simultáneamente, se deja durante varios días un frasco de esencia de trementina abierto para que capte oxígeno. Se comprueba que la preparación es buena cuando es capaz de decolorar una solución de índigo.

La técnica consiste en mezclar en un recipiente no metálico, una gota de solución sanguínea con dos gotas de tintura de guayaco. Se añade la esencia de trementina y observamos el cambio de color de ámbar a azul.

Algunos autores como DAY, recomiendan el empleo de eter ozonizado o eter sulfúrico metilado, así como esencias de eucalipto, limón o espliego. Sin embargo, la utilización de estos compuestos no mejora el método.

La técnica se puede aplicar también en aquellos casos en los que la mancha se encuentra sobre un objeto que no puede deteriorarse, aplicando sobre la mancha un papel de filtro previamente humedecido con agua destilada, es decir obteniendo una huella de Taylor.

Esta reacción es muy sensible; según la bibliografía consultada daría positivo en soluciones al 1/25000. No se puede utilizar en el caso de que tengamos sangre antigua, putrefacta o carbonizada. Es una técnica muy poco específica, ya que da reacción positiva con casi todos los derivados metálicos, peróxidos de metales, goma arábiga, gluten, leche, cuero, etc.

Sin embargo, en estos casos, se observa el viraje de la tintura de guayaco antes de añadir la esencia de trementina, lo que no ocurre nunca cuando se trata de sangre. Hay que tener en cuenta además, que para considerar que la reacción es positiva, el cambio de color debe producirse en pocos segundos, ya que, con el tiempo, se produciría igualmente, aun en ausencia de peroxidasas.

3.4.2. TINTURA DE ALOINE: Es la misma técnica descrita anteriormente, pero sustituyendo el guayaco por aloine. La tintura de aloine, que tiene un color rosado, vira primero a naranja y luego a rojo cereza. Es una técnica menos sensible que la anterior.

3.4.3 BENCIDINA: La bencidina fue utilizada por ADLER desde 1904 en la clínica y posteriormente se aplicó en Medicina Legal.

Es el método más utilizado de los aquí descritos y desde que fue propuesto, ha estado sometido a diferentes modificaciones que afectan tanto a los reactivos empleados como a la técnica que se utiliza en su aplicación.

En el caso de la prueba de Adler, el reactivo se obtiene a partir de la bencidina. Se han descrito diferentes formas de prepararlo. En un principio se utilizaba una disolución de bencidina en alcohol.

Posteriormente se propuso un procedimiento alternativo, que consiste en disolver a saturación la bencidina en ácido acético glacial. También se ha utilizado como reactivo una disolución de bencidina en ácido hidrocórico, aunque, según la bibliografía consultada, este reactivo presenta más inconvenientes que el preparado con ácido acético glacial.

Como donante de oxígeno lo más habitual es utilizar el agua oxigenada. Algunos autores proponen la aplicación de otros compuestos como la trementina ozonizada y el perborato de sodio.

Este último se ha estudiado como sustituto del peróxido de hidrógeno. Es bien sabido que el agua oxigenada es un compuesto bastante inestable, lo que podría traducirse en posibles variaciones en la efectividad del método. Para evitar este problema se experimentó con un reactivo compuesto por 0,2 g de perborato de sodio y 0,1 g de bencidina disueltos en 10 ml de ácido acético glacial.

La prueba puede realizarse con muestra en disolución, y también sobre manchas secas directamente, o obteniendo antes la huella de Taylor.

La técnica consiste en añadir 1 ó 2 gotas del reactivo y esperar unos segundos para ver si hay un cambio de color en la disolución como consecuencia del viraje del reactivo. Si éste se produce, la oxidación de la bencidina es inespecífica y la prueba no tiene valor.

Si no ha habido viraje, se añaden 1 ó 2 gotas de agua oxigenada concentrada. Cuando la muestra contiene peroxidasas, se observa inmediatamente el viraje del reactivo y la solución adquiere un color azul intenso. Para considerar el resultado del test como positivo, el viraje se debe observar en menos de 10 segundos.

Esta prueba es muy sensible. Sin embargo a la hora de dar un valor orientativo del grado de sensibilidad de la reacción, nos encontramos con bastantes discrepancias entre los distintos autores; así hemos encontrado que según algunos investigadores, se considera que la prueba de la bencidina es efectiva para concentraciones de sangre de 1/200000, otros, entre los que se encuentra FERREIRA, proponen que es sensible para disoluciones 1/300000, y, posteriormente se ha admitido sensibilidad entre 1/300000 y 1/500000.

En la revisión de distintos trabajos que consultamos con el fin de conocer, hasta qué concentraciones de sangre es sensible la prueba de la bencidina, encontramos que, en general, al indicar un valor, se omite las condiciones en las que se ha determinado el valor propuesto.

Así pues, si la determinación se ha realizado a partir de muestras líquidas, los resultados, en principio no pueden ser comparables a los que se obtienen a partir de manchas secas.

Esto se debe a que al añadir el reactivo a la muestra, éste sufre a su vez el efecto de la dilución, y por lo tanto no es tan efectivo como en los casos en los que se añade a manchas secas. Por esta razón, la prueba puede dar negativa para una disolución de sangre de una concentración determinada, y, sin embargo, si se realiza la misma prueba obteniendo previamente una mancha de esa disolución, puede obtenerse un resultado positivo.

Sin embargo, es poco específica ya que da positiva con algunos compuestos químicos, como los sulfocianuros, derivados del hierro, el formol, la piedra pómez, el talco, la albúmina, la arena, y ciertos líquidos coloidales. Según BORDAS, también el pus, el zumo de ciertas frutas ácidas y algunas plantas como las espinacas, las acederas y las zanahorias dan positivo la prueba de Adler. En definitiva, cualquier sustancia que

contenga peroxidasas dará positiva la reacción. Por esta razón, sólo se debe valorar el resultado negativo de la prueba.

Actualmente, se sabe que la bencidina puede ser peligrosa debido a su poder cancerígeno, es por esto que algunos autores recomiendan que se sustituya por la O-Tolidina, que es un derivado de la bencidina, pero menos cancerígeno.

3.4.4. O-TOLIDINA: Se ha utilizado como una alternativa a la reacción con bencidina. El reactivo se prepara a partir de 1,6 g de O-Tolidina y 40 ml de etanol. Se añaden 30 ml de ácido acético glacial y 30 ml de agua destilada.

Esta solución se puede guardar en el frigorífico. También se debe preparar una solución de peróxido de hidrógeno al 3%.

La técnica consiste en añadir 1 ó 2 gotas del reactivo a la muestra a analizar, y a continuación 1 ó 2 gotas de la disolución de peróxido de hidrógeno. Si el resultado es positivo, se verá inmediatamente un color azul. Como en el caso de la prueba de la bencidina, para poder considerar la reacción positiva, el viraje debe tener lugar en menos de 10 segundos. La sensibilidad del método es similar a la de la bencidina.

3.4.5. LEUCOMALAQUITA VERDE: También se le llama reacción de MEDINGER. El reactivo se puede preparar de dos formas:

La primera consiste en mezclar 0,32 g de perborato de sodio con 0,1 g de leuco malaquita verde. Este reactivo se puede guardar a temperatura ambiente. Se prepara una disolución con 8 ml de ácido acético glacial en 4 ml de agua destilada, que se añadirá al reactivo obtenido anteriormente, en el momento de realizar la prueba, con la proporción siguiente: 0,14 g de reactivo leuco malaquita/perborato en 4 ml de solución de ácido acético.

Otra forma de obtener el reactivo consiste en mezclar 10 mg de leuco malaquita verde en 8 ml de una disolución que se prepara a partir de 8 ml de ácido acético glacial y 4 ml de agua destilada. También es necesario disponer de una disolución de peróxido de hidrógeno al 3%.

La técnica, si se utiliza el primer reactivo, consiste en añadir 1 ó 2 gotas del mismo a la muestra. Si se utiliza el segundo, se añaden 1 ó 2 gotas del reactivo y a continuación

1 ó 2 gotas de la solución de peróxido de hidrógeno. Para que la reacción sea considerada como positiva se debe observar en menos de 10 segundos un color azul-verdoso. La sensibilidad del método es de 1/100000.

3.4.6. PARAFENILDIAMINA: En este caso, el compuesto que será oxidado es la parafenildiamina.

La técnica consiste en preparar una solución 1/200 de clorhidrato de parafenildiamina en agua destilada. A la muestra se le añaden 4 ó 5 gotas del reactivo y 2 ó 3 gotas de agua oxigenada. Si hay peroxidasa aparece, tras agitar, un color verde que cambia a violeta y más tarde a violeta oscuro.

También se puede aplicar sobre una huella de Taylor. Es una técnica poco sensible y que no se puede utilizar con sangre antigua o putrefacta.

3.4.7 FENOLFTALEINA: Esta reacción fue descrita por KASTLE y SCHEEDE y posteriormente por MEYER, por lo que también se le conoce con el nombre de reacción de KASTLE-MEYER. Fue introducida en el campo de la Medicina Legal por BALTHAZARD y LAMBERT. En esta reacción, el reactivo se obtiene a partir de la fenolftaleína y como dador de oxígeno se utiliza el peróxido de hidrógeno.

El reactivo de KASTLE-MEYER, se prepara a partir de 2 g de Taleina de fenol, 30 g de potasa anhidra, 100 g de agua destilada y 20 g de polvo de zinc. A continuación se hierve la mezcla, que en este momento es de color rojo, hasta que se decolora totalmente.

Esto ocurre porque la Taleina de fenol se reduce a fenolftaleína. Después se filtra en caliente y la solución obtenida, se conserva en frascos oscuros y cerrados herméticamente. El reactivo es muy inestable, y se oxida con mucha facilidad. Poco a poco va retomando un color rosado hasta que vira totalmente. Esta oxidación se puede retrasar, si, como aconsejan DELARDE y BENOIT, se pone una pequeña cantidad de polvo de zinc dentro del frasco.

También se puede colocar una capa de vaselina por encima del reactivo para disminuir el contacto con el aire.

La técnica consiste en, una vez obtenido el reactivo, añadir 2 ml del mismo a otros 2 ml de la solución problema. Al adicionar unas gotas de agua oxigenada, si la muestra contiene peroxidasa, se observa el cambio de color a rosa oscuro. En este proceso debemos tener ciertas precauciones:

- La temperatura debe ser menor de 30°C, porque a temperaturas superiores, el reactivo se oxida aunque no haya sangre.
- Debemos controlar también el pH de la muestra, y solamente debemos considerar el resultado de la prueba como positivo, si el viraje se produce inmediatamente.

Se han propuesto algunas modificaciones al método:

- SARDA propone añadir 2 ml de alcohol y de ácido acético cristalizante para mejorar la hemólisis. Esto es útil en las determinaciones de sangre en orina.
- BALTHAZARD y LAMBERT aconsejan disolver la mancha a estudiar, someterla a ebullición lenta y repartir el líquido en dos alícuotas. A una de ellas se le aplica la prueba de Adler, y a la otra la de la fenoltaleína, de esta forma el reactivo de ADLER actúa como testigo del buen estado del reactivo que hemos preparado.

Esta reacción es la más sensible de todas. DELARDÉ y BENOIT obtuvieron resultados positivos en diluciones 1/1000000, y LAMBERT comprobó que se producía la reacción incluso en diluciones de 1/10000000.

Otros autores han indicado que la sensibilidad es de 1/5000000. Por otra parte, se ha demostrado que la reacción es válida para la identificación de sangre antigua y también sangre hervida, y algunos autores indican que también da positiva las muestras que han sido sometidas a la acción de ácidos o álcalis.

3.4.8 FLUORESCINA: Es una derivación del método anterior propuesta por FLEIG. Consiste en sustituir la fenoltaleína por fluoresceína reducida por hidrogenación en medio alcalina.

La técnica es igual a la descrita anteriormente y, si la muestra contiene oxidasas, se observa la aparición en el tubo de ensayo de una fluorescencia cuya intensidad depende de la concentración de oxidasas en la muestra.

3.5. Técnicas orientativas menos utilizadas

3.5.1. THEVENON Y ROLAND: El reactivo se prepara a partir del piramidón. Y la coloración obtenida es violeta.

3.5.2 KOHN-O'KELLY: Utiliza la 0-Toloudina que vira a verde azul. En todas estas pruebas se debe dudar de la presencia de sangre si se observa que la reacción tiene poco color, o si tarda en desarrollarse más de 10 segundos. También si se observa que el color se concentra en un punto de la muestra y no está difundido por toda ella o cuando la coloración no es del tono correcto.

3.5.3. PRUEBA DEL LUMINOL (3-ANIMOFTALHIDRACIDA): El luminol es un compuesto químico luminiscente y, por ello, el método consiste en provocar la producción de luz por parte de las peroxidasas presentes en la muestra.

El reactivo se prepara mezclando 0,5 g de luminol con 25 de carbonato de sodio. Esta mezcla es estable y se puede guardar. Cuando se vaya a hacer la prueba se prepara una disolución con 3,5 g de perborato de sodio en 50 ml de agua destilada y se añade a la mezcla anterior.

La técnica consiste en aplicar el reactivo, con un pulverizador, sobre los objetos o zonas donde se encuentren las manchas que queremos investigar.

Si el test es positivo, se ve una luminiscencia blanco-azulada, que debe ser observada en la oscuridad. Esta prueba es muy útil cuando las manchas son difíciles de ver, cuando se encuentran en superficies oscuras, en grietas o hendiduras o zonas que han sido lavadas. El luminol no destruye la mancha y no interfiere en el caso de que se realicen después otras pruebas de confirmación o serológicas.

La sensibilidad es de 1/5000000 y es más efectivo con sangre antigua que con sangre fresca. Se puede aumentar la efectividad rociando previamente la mancha con ácido hidroclicórico al 2% para descomponer la hemoglobina.

Todos los métodos revisados hasta el momento tienen dos características en común:

- Son muy sensibles, capaces de detectar trazas de sangre.
- Son poco específicos, es decir, pueden dar un resultado positivo para gran cantidad de sustancias además de la sangre; por ello, sólo se puede valorar un resultado negativo de la prueba.

Los falsos positivos obtenidos en la aplicación de las pruebas de orientación han sido motivo de estudio por diferentes autores, que han intentado encontrar métodos para poder identificar los compuestos capaces de interferir en la reacción que se aplica y la forma de evitar la interferencia de los mismos.

Así, PINKER realizó un estudio sobre las sustancias que son capaces de interferir en la prueba de Adler, la reacción de la leuco malaquita verde, y el reactivo de KASTLE-MEYER.

Para esto, eligió 95 productos químicos, capaces de interferir en las pruebas que hemos mencionado, y realizó las tres pruebas con cada uno de ellos. El resultado de la experiencia fue que sólo uno de los compuestos analizados daba positivo en las tres pruebas.

Posteriormente, realizó la misma investigación a partir de 50 manchas obtenidas a partir de frutas, tintes, productos fisiológicos, etc. Comprobó que ninguna de las muestras daba positivo en todos los test. Según estos resultados, se puede concluir que una forma de detectar los falsos positivos, es realizar más de un test sobre la muestra a analizar.

Centrándonos en la prueba de la bencidina, también se han estudiado con detenimiento las posibles causas de falsos positivos.

Así, se ha comprobado que la oxidación de la bencidina por el peróxido de hidrógeno, no se produce si no existen peroxidasas, pero sí se ve afectada por la presencia en la muestra de agentes oxidantes químicos en solución ácida y por distintos catalizadores.

3.6. REACCION DE FALSOS POSITIVOS

a) Por contaminación causada por agentes ajenos a la muestra: La sensibilidad de la prueba es muy alta, por lo que se deben realizar pruebas de control para asegurarse de que se obtiene un positivo verdadero, comprobando que no se debe a ningún contaminante que se encuentre en el soporte de la mancha, al mal estado de los reactivos o a haber seguido un procedimiento no correcto al realizar la prueba.

De forma que si inesperadamente, se encuentra un resultado positivo en un caso en el que debe obtenerse un negativo, se debe intentar encontrar el motivo antes de realizar la prueba sobre la muestra.

b) Presencia de oxidantes químicos y catalizadores: Aunque los oxidantes químicos pueden dar lugar a un resultado positivo de la prueba de la bencidina, su comportamiento es distinto al de la sangre. Se pueden distinguir porque el color obtenido generalmente es intenso, pero distinto al que se observa si la muestra contiene sangre. Sin embargo, el color desarrollado por el contaminante, puede impedir la correcta valoración del resultado del test.

Debemos señalar que cuando se realiza la prueba de Adler, en una muestra que contiene oxidantes químicos, al añadir el reactivo se observa una decoloración de la misma, lo que no ocurre cuando se aplica sobre una muestra que sólo contiene sangre.

Si se produce la decoloración, se debe sospechar que existen contaminantes en la mancha a estudiar y se debe tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos. Además, es importante detectar la existencia de estas interferencias, para intentar eliminarlas antes de someter a la muestra a otras pruebas de identificación.

Los catalizadores químicos dan una reacción positiva en la prueba de Adler. Los más estudiados como posibles interferencias en la reacción de la bencidina, han sido las sales de cobre y níquel. Sin embargo, también en este caso la reacción se desarrolla de forma distinta que cuando se realiza con sangre. Al añadir el reactivo a una muestra que contiene catalizadores, aparece una débil coloración.

Si a continuación se agrega el peróxido de hidrógeno, esta coloración desaparece inmediatamente y después, muy lentamente, se va observando el desarrollo de la coloración azul característica de la prueba de la bencidina. Si la técnica se aplica sobre la huella de Taylor de la mancha, la coloración azul comienza formando un anillo alrededor

del área humedecida del papel de filtro y se va extendiendo gradualmente. La reacción no se completa hasta que han transcurrido por lo menos 15 minutos.

Con este tipo de contaminantes también se ha comprobado que los catalizadores, cuando se someten a la prueba de Adler utilizando muestras secas, no dan un resultado positivo. En el caso de oxidantes químicos, si se realiza la reacción sobre cristales del producto contaminante, se obtiene un resultado negativo.

Además, debido a su alta sensibilidad, la reacción de la bencidina permite detectar trazas de sangre no visible. Esto no ocurre en el caso de los agentes químicos oxidantes, ni cuando se trata de determinar trazas de catalizadores.

c) **Presencia de peroxidasas vegetales:** Es el grupo más importante de compuestos que pueden interferir en la prueba de Adler. Se ha comprobado que muchos tejidos vegetales dan una reacción intensa con la bencidina que induce a error. Sin embargo se debe tener en cuenta diversos factores; en primer lugar, se debe observar el color de la mancha que se va a identificar.

El color blanco y el verde son los que, generalmente, están asociados a productos vegetales. Por otra parte, hay que señalar que las peroxidasas vegetales se encuentran en las células de los tejidos, por lo que el jugo que procede del vegetal da una reacción negativa o muy tenue. CULLIFORD y NICKOLS señalan, en un estudio que analiza las posibles interferencias en la reacción de la bencidina, que según afirma NICKOLS, para obtener una reacción intensa, sería necesaria la presencia de tejidos o fragmentos de tejidos.

Estos fragmentos serían fácilmente identificables examinando la mancha con un microscopio. Los trabajos experimentales que estudian el resultado de la reacción de la bencidina cuando se aplica a peroxidasas vegetales, se han diseñado obteniendo una huella del tejido vegetal que se va a analizar sobre papel de filtro, o, en otros casos, se ha realizado la prueba directamente sobre el vegetal fresco.

Para evitar confundir las manchas que son de sangre, con las que proceden de vegetales, se ha estudiado las diferencias que existen entre las peroxidasas vegetales y las animales. Las conclusiones son las siguientes:

- **Efecto del calor:** Las peroxidasas de origen vegetal se inactivan con el calor. A una temperatura de 100°C, todas ellas se inhiben rápidamente. A esa misma temperatura, las peroxidasas animales son relativamente estables, de forma que se ha propuesto que calentando la muestra que se va a identificar, durante un periodo corto (5 minutos), a una temperatura de 100°C, se consigue eliminar la interferencia por la posible presencia de peroxidasas vegetales.
- **Efecto del tiempo:** Las peroxidasas de origen animal son muy estables al paso del tiempo. Las manchas de sangre antiguas dan una reacción positiva en la prueba de la bencidina. En el caso de las peroxidasas vegetales, se comprueba que la antigüedad de la muestra influye en el resultado de la prueba. En experiencias realizadas a partir de huellas de las manchas obtenidas en papel de filtro, extractos acuosos de las manchas, o haciendo el estudio directamente sobre el soporte en que se encuentran, se observa que, a partir de los 5 días de antigüedad, ninguna prueba da un resultado positivo, excepto las realizadas directamente sobre las manchas, en las que es posible ver una reacción positiva muy débil, y sólo en los casos en los que ésta es muy intensa.
- **Efecto del pH:** La actividad de las peroxidasas vegetales se potencia en medio fuertemente ácido, sin embargo a pH básicos, no son reactivas. Es por esta razón por la que se ha apuntado que la reacción de la fenolftaleína es más específica que la prueba de Adler. Sin embargo también se debe tener en cuenta que en el caso de la reacción de la fenolftaleína, el reactivo es más complicado de preparar, conservar y usar. Como podemos comprobar, el estudio de los falsos positivos en la prueba de la bencidina, ha sido considerado fundamental, y todas las investigaciones se dirigen a intentar conocer los compuestos capaces de actuar como interferencias en la reacción y la forma de evitarlas. De esta forma se conseguiría aumentar la especificidad del test. Actualmente, según la bibliografía revisada, todos los autores coinciden en afirmar que un resultado positivo en la prueba de Adler, en general, no se puede considerar concluyente y no es posible, a partir de ese resultado, asegurar que la mancha que se está estudiando es de sangre.

Sin embargo, hasta el momento, lo que se acepta es que si se obtiene un resultado negativo, la mancha no es de sangre.

3.7. DETERMINACIÓN y REGENRACION DE ACTIVIDAD DE PEROXIDASA

a) La peroxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de ciertos compuestos dadores de hidrógeno, como enoles (guayacol, pirogalol) y aminas aromáticas (o-fenilendiamina) por medio de peróxidos (H_2O_2). El sustrato oxidable más usado es el guayacol, que es oxidado a un complejo coloreado de tetra guayacol en presencia de peroxidasa:

La velocidad de formación del color rojo ladrillo puede ser utilizada como medida de la actividad enzimática por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias en relación con el tiempo.

La peroxidasa presenta como grupo prostético un grupo Hem, cuyo átomo central de hierro forma complejos con diferentes compuestos, como los cianuros y la hidroxilamina, inhibiéndose su actividad enzimática.

La actividad enzimática depende del vegetal (los rábanos picantes son especialmente activos), del sustrato oxidable que se emplea como reactivo y del pH y temperatura a que se trabaja.

Como la mayoría de las enzimas, la peroxidasa puede ser inactivada por el calor, siendo una de las que precisa mayor temperatura y más tiempo para su inactivación. Posee, además, la propiedad peculiar de la *regeneración enzimática*. Este fenómeno consiste en que al inactivarla por medio del calor recupera parcialmente su actividad después de un cierto tiempo. Esto ha sido explicado, aduciendo que la fracción proteica de la enzima sufre una desnaturalización sólo parcial, con pérdida de su estructura terciaria, si el calor se aplica un tiempo muy corto, produciéndose luego una reversión de la proteína a su estado normal por recombinación de sus grupos hidrógenos o sulfhidrúlicos.

Este efecto del calor sobre la actividad peroxidásica es muy, importante en la industria de alimentos y la regeneración enzimática de la peroxidasa puede causar serios

problemas en los caracteres organolépticos. Se ha demostrado en el laboratorio que esta actividad enzimática puede detenerse totalmente, si el calentamiento es suficientemente largo, de manera que sobre 30" la regeneración es muy débil generalmente.

La investigación de la peroxidasa ha sido usada para evaluar la eficiencia del escaldado o blanqueo de verduras y también en el control de pasteurización de la leche. Así, a la temperatura de pasteurización, la lacto peroxidasa se inactiva, pero se regenera; en cambio, si la leche es sobrecalentada (más de 80-85°C) la peroxidasa pierde su actividad en forma definitiva.

b) Procedimiento: Colocar 0,1 ml de guayacol líquido junto con 0,2 ml de H_2O_2 al 0,9% y 4,7 ml de agua en un tubo de ensayo (a). Dentro de un tubo del espectrofotómetro colocar 1 ml de jugo de expresión de nabo, filtrado y diluido (1 + 199) y 4 ml de agua (b). Agregar la mezcla de guayacol y agua oxigenada (a) al tubo del espectrofotómetro y tomar el tiempo con cronómetro. Vaciar rápidamente la mezcla al tubo vacío y luego nuevamente al tubo del espectrofotómetro. Colocar el tubo en el espectrofotómetro, previamente estandarizado con agua a 470 nm. Anotar las lecturas de absorbancia a 470 nm cada 20 segundos hasta obtener 4 ó 5 puntos. Graficar las lecturas de absorbancia contra los tiempos para obtener así la graduación de la reacción.

c) Regeneración: Colocar alrededor de 4 ml del jugo diluido (1 + 199) en tres diferentes tubos de ensayo. Colocarlos en un baño hirviente (o calentado al vapor) y sacar el primer tubo después, de 30 segundos, el 2º después de 1 minuto y el 3º después de 2 minutos. Enfriarlos rápidamente en un baño de agua y determinar de inmediato la actividad peroxidásica, como se ha descrito anteriormente. Después de 1 hora repetir la determinación de la actividad en los tres tubos calentados.

“La criminalística es la ciencia que estudia los indicios dejados en el lugar del delito, gracias a los cuales puede establecer, en los casos más favorables, la identidad criminal y las circunstancias que concurrieron en el hecho delictivo.”

J. A. Gisbert Galabuig

4.- ANALISIS DE LA MUESTRA DE SANGRE

La investigación completa de machas de sangre, en lo que respecta a la tarea a realizar en el laboratorio, puede considerarse escalonada en cinco etapas sucesivas:

- Observación de las muestras.
- Ensayos preliminares.
- Ensayos confirmatorios.

4.1 Observación de las muestras

El material recibido será cuidadosamente retirado de su envoltorio y esparcido sobre una amplia superficie, utilizando los elementos de bioseguridad correspondientes.

4.2 Ensayos preliminares¹³

Tienen valor como ensayos de orientación, pero no aseguran la presencia de sangre en la mancha en estudio.

Se realizan solamente cuando hay suficiente cantidad de muestra para no dificultar, por falta de la misma, las reacciones posteriores de certificación de la existencia de sangre, de investigación de la especie y de su tipificación.

Los ensayos preliminares son pruebas rápidas basadas en la actividad de peroxidasa que posee el grupo Hemo de la hemoglobina de la sangre y que, en presencia de agua oxigenada y de ciertos reactivos orgánicos, dan lugar a la aparición de coloraciones o luminiscencia que orientan sobre la posible existencia de sangre en las muestras analizadas.

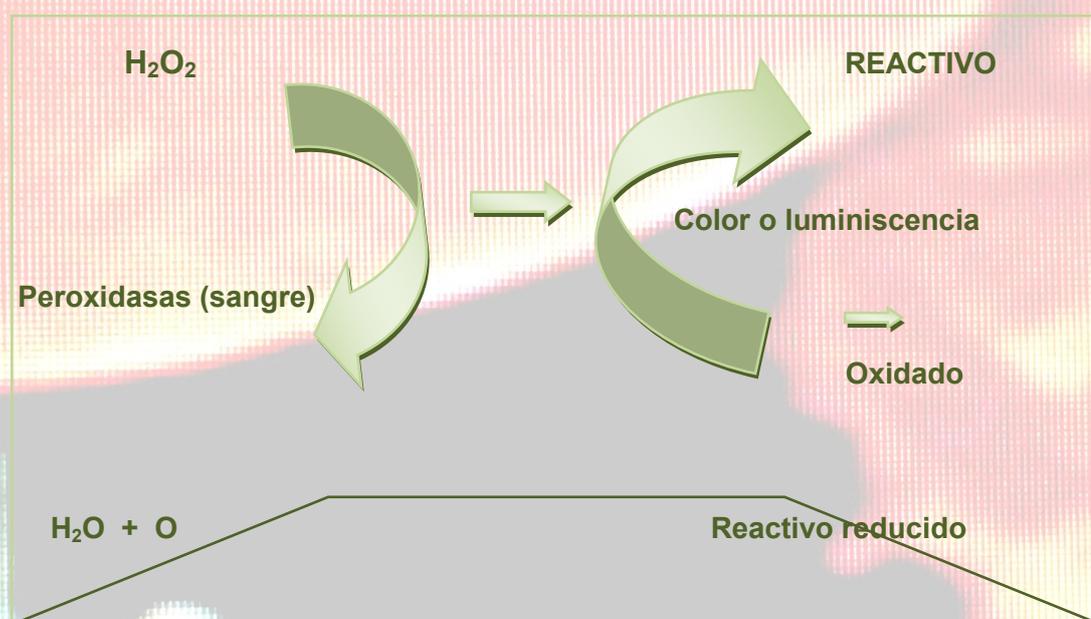
La peroxidasa descompone el agua oxigenada, produciéndose agua y oxígeno. Es este oxígeno el que actúa sobre el reactivo orgánico reducido, transformándolo en su forma oxidada, de color característico o luminiscente.

¹³ Tratado de Criminalística Tomo II La Química Analítica en la Investigación del Delito, p. 198.

Dada la gran sensibilidad de los ensayos preliminares, además de ser utilizados en el laboratorio, se emplean también en el escenario del delito, como un medio para resguardar aquellas manchas sospechosas de contener sangre.

Si el resultado de los ensayos preliminares son negativos, la mancha no contiene sangre en cantidades detectables como para permitir su posterior análisis. Si el resultado es positivo, se requiere continuar con los ensayos para conformar su presencia.

Todos los ensayos preliminares que se detallaran sufren en mayor o menor grado, la interferencia de las peroxidasa de secreciones biológicas y peroxidasa vegetales. También interfieren agentes fuertemente oxidantes, algunos metales y sales metálicas.



4.3 Reactivos usados para los Ensayos Preliminares

El primero en emplearse fue el **reactivo de Van Deen** (1861), que consiste en resina de guayaco disuelta en alcohol etílico. En presencia de sangre y agua oxigenada, desarrolla color azul.

Su empleo no satisfizo plenamente, por lo que se buscaron otras sustancias. En la actualidad, prácticamente, no se usa y solo tiene valor histórico.

En 1904, el empleo del **reactivo de Adler** ofreció grandes ventajas, principalmente por su gran sensibilidad. Consiste en bencidina disuelta en ácido acético glacial o en mezclas de alcohol etílico y ácido acético, da un color azul verdoso, en presencia de sangre y agua oxigenada.

La sensibilidad de la reacción Adler ha hecho de la bencidina el reactivo predilecto de gran número de expertos, sin embargo, en la actualidad, no se recomienda su uso debido a sus propiedades carcinogénicas.

Otro **reactivo** utilizado es el de **Medeinger**: leucobase del Verde de Malaquita disuelta en solución de ácido acético; se observa color verde en presencia de sangre y agua oxigenada.

Mayor confiabilidad en los resultados ofrecen los reactivos que actúan en medio alcalino pues disminuye la posibilidad de falsos positivos.

Entre estos reactivos se encuentra el que emplea fenolftaleína reducida en medio alcalina, reactivo **de Kaster Meyer** y el que utiliza 3-aminofthalhidrazida (luminol).

La alta sensibilidad en medio líquido de la reacción con fenolftaleína reducida (1 en 1.000.000) se pone de manifiesto en la localización de sangre en soluciones muy diluidas, como son las muestras recogidas en lavados, cañerías, etc.

Al agregar gotas del reactivo y de agua oxigenada, se desarrolla, en presencia de vestigios de sangre, una coloración rosada intensa.

La **reacción con Luminol** es sumamente sensible (1 a 5.000.000). Esta prueba de orientación, resulta ideal para aplicar a grandes superficies, como pisos o escaleras que hayan sido lavadas con el objeto de remover la sangre.

El inconveniente de este método es que la reacción positiva se manifiesta por la aparición de luminiscencia, por lo que se debe observar en la oscuridad.

Algunos autores han expresado que las manchas viejas de sangre reaccionan mejor que las recientes, con luminol y agua oxigenada, y que la sensibilidad de la reacción con sangre fresca se mejoraba si se rocía primero con ácido clorhídrico al 2 % la

superficie a ensayar. Posteriores experiencias han demostrado que este tratamiento previo es innecesario.

Las superficies porosas y las que no fueron limpiadas inmediatamente, retienen una cantidad relativamente apreciable de sangre y dan reacciones bastante intensas con luminol.

Lamentablemente el luminol no posee especificidad absoluta para sangre, pues reacciona aunque débilmente con peroxidasas de origen vegetal y algunos metales, tales como cobre y aleaciones de cobre. No se encontraron interferencias de fluidos humanos, como por ejemplo; saliva, semen, sudor y orina.

4.3.1 Interferencias Falsos positivos

Las reacciones preliminares que se han visto pueden dar falsos positivos, es decir, resultados positivos producidos por sustancias diferentes de la sangre, como las que a continuación se informa;

- ✓ **Oxidantes químicos**: Se ponen en manifiesto esta interferencia, pues in el agregado de agua oxigenada ya se observa cambio de color.
- ✓ **Sales de cobre y Níquel**: Interfieren solamente en solución concentrada, pero reaccionan de forma diferente a la sangre. Una coloración débil aparece antes del agregado de agua oxigenada y se intensifica lentamente después del mismo. La reacción es todavía incompleta a los 15- 20 minutos.
- ✓ **Otras sustancias (de origen animal)**: Son aquellas que por contener trazas de sangre dan reacción positiva: por ejemplo; pus, secreción nasal, etc., La observación microscópica de estas sustancias permite su reconocimiento.
- ✓ **Peroxidasas vegetales**: Son las de mayor incidencia en la producción de falsos positivos. El color de la mancha debe observarse antes de los ensayos, generalmente su color difiere de las manchas de sangre, ya que el verde y el blanco son los colores asociados con el material proveniente de plantas.

Por otra parte, el comportamiento de las peroxidases vegetales difiere del observado de las provenientes de animales por su:

A) Inestabilidad térmica: Todas se vuelven inactivas cuando se calientan a 100°C. A esta temperatura las peroxidases de la sangre son estables. <un corto período de calentamiento (5 minutos) a 100°C, servirá para diferenciar entre ellas.

B) Su reducida persistencia: Las peroxidases que se encuentran en manchas de sangre, darán fuertes reacciones durante meses. En cambio, las de origen vegetal prácticamente no reaccionan después de unos pocos días.

C) Efecto del pH: Las peroxidases vegetales reaccionan bien con sustratos ácidos y no reaccionan o lo hacen débilmente en un medio fuertemente alcalino. Por esta razón, los reactivos en medio alcalino, como Kastle-Meyer y luminol son más específicos que los que utilizan medio ácido. Si cuando emplean estos dos reactivos, las reacciones netamente positivas aparecen rápidamente, el profesional con experiencia, guiándose además por el aspecto, color y forma de la mancha puede llegar a obtener conclusiones bastante precisas.

4.3.2. Parte experimental - Reactivos y materiales

- **Reactivo de Van Deen**: tintura de resina de ensayo de guayaco. Se disuelven 0,05 g de resina de guayaco en 10 ml de alcohol de 80 °. Debe prepararse en el momento de su uso.

- **Reactivo de Adler**: solución acética de bencidina. Se disuelven 0,01-0,05 g de bencidina en 10 ml de ácido acético glacial. No se recomienda si empleo por sus propiedades carcinogénicas.

- **Reactivo de Medeinger**: solución acética de la leucobase del verde de malaquita (tetrametilnitrotrifenilmetano). Se disuelven 0,05 g de la leucobase de verde malaquita en 2,5 ml de ácido acético y luego se agregan 7,5 ml de agua oxigenada. Debe prepararse en el momento de uso.

- **Reactivo de Kastler-Meyer:** fenolftaleína reducida con cinc en medio alcalino. En un matraz se disuelven 20 g de hidróxido de potasio en 100 ml de agua destilada. Se agregan 2 g de fenolftaleína y unos 10-30 de polvo de cinc.

Se coloca un refrigerante a reflujo y se calienta a ebullición hasta decoloración de la mezcla. Una vez fría la misma, se decanta u se incorporan 20 ml de alcohol etílico absoluto.

Es conveniente guardar el reactivo con granallas de cinc para mantener el ambiente reductor.

- **Reactivo luminol:** (3-amino-ftalhidrazida) disuelta en medio alcalino. En el momento de uso se disuelven en 10 ml de agua destilada, 0,5 g de carbonato de sodio y 0,01 g de luminol.

- Etanol.
- Agua oxigenada de 20 volúmenes. Pulverizador de vidrio o plástico-

TECNICAS- Difieren según el tipo de muestras analizada

Telas blancas con supuestas manchas de sangre: Se corta una mínima porción de cada mancha (previamente numerada), y se macera con unas gotas de solución fisiológica en un pequeño tubo de ensayo ROTULADO. Se ayuda a la disolución de la mancha con una varilla de vidrio.

Se hacen toques con la solución obtenida, sobre papel de filtro. En cada uno de ellos se agrega primero una gota de los reactivos que se desean ensayar. Se espera unos segundos, por si hubiera oxidantes presentes, y si no hay reacción, se agrega una gota de agua oxigenada. La aparición del color característico de los reactivos ensayados, indica la posible presencia de sangre. En el caso de la reacción de Kastle- Meyer se recomienda agregar una gota de etanol antes de la gota de reactivo, con el objeto de aumentar la sensibilidad de la reacción.

Si el material manchado es muy extenso y las manchas pocas nítidas, como por ejemplo una sábana sometida a lavado, se pueden efectuar los ensayos directamente sobre porciones de las mismas.

Telas de color con supuestas manchas de sangre: Se pueden efectuar los ensayos de varias manera;

- a) Como en el caso de las telas blancas, se macera una pequeña porción de la muestra con solución fisiológica. Se hacen toques sobre papel filtro y se procede a efectuar los ensayos sobre los mismos.
- b) Se raspa la mancha suavemente con el vértice de un cuadrado de papel de filtro doblado en cuatro. Se despliega el papel y en el centro del mismo, donde quedó parte del material de la mancha, se agrega una gota de etanol. A continuación se incorpora una gota del reactivo de Kastle-Meyer. Luego de unos segundos, si no hay desarrollo de color, se añade una gota de agua oxigenada. Una coloración inmediata rosada intensa, indica resultado positivo.
- c) Se humedece un trozo de papel de filtro con solución fisiológica y se oprime fuertemente sobre la mancha. Se hacen luego los ensayos preliminares sobre el papel. Esta variante se hará en una pequeña zona de la mancha y siempre que la muestra sea extraña.
- d) Si todos los ensayos anteriores dieron resultado negativo, se corta una pequeña hebra de hilo de la mancha y se coloca en el centro de un papel de filtro. Se aplica el reactivo de Kastle- Meyer sobre la hebra; se espera unos segundos y se agrega una gota de agua oxigenada. Observar el cambio de color. Este es el método más sensible pudiendo detectarse manchas de sangre muy diluidas. La misma técnica puede repetirse con los otros reactivos, registrando los resultados obtenidos.

Aguas de lavado, vertederos, cañerías, etc.: Si se sospecha que el agua puede estar contaminada con muy pequeña cantidad de sangre, se colocan 5-10 ml de la misma en un tubo de ensayo y se agrega una gota del reactivo de Kastle-Meyer; se espera unos segundos y se adiciona una gota de agua oxigenada. Al agitar la solución suavemente, la aparición inmediata de color rosado indicará resultado positivo.

Objetos varios (maderas, baldosas, hojas de cuchillos, etc.): Con supuestas manchas de sangre. Se raspan con cuidado pequeños fragmentos de cada una de las manchas sobre vidrios de reloj rotulados. Se agregan sobre los trocitos reunidos en la

concauidad del vidrio, 2-3 gotas de solución fisiológica y con una varilla se ayuda a la disolución de los fragmentos. Con la solución obtenida se hacen toques sobre papel de filtro. Se agrega sobre los mismos una gota de los reactivos elegidos; se espera unos segundos y si no hay aparición de color, se agrega en cada caso una gota de agua oxigenada.

Superficies amplias como pisos, escaleras, etc.: Se pulveriza la superficie a investigar con la solución de luminol y carbonato de sodio. Se espera unos instantes y se rocía con agua oxigenada. La aparición de luminiscencia azul, nos orientará sobre la posibilidad de la existencia de sangre en la muestra. Esta reacción debe efectuarse en la oscuridad. Si los ensayos preliminares resultan positivos, la mancha en estudio puede ser de sangre.

4.4 Técnica de Aminofenazona

Amidopirina es un polvo cristalino, de color blanco, inodoro que en solución es incoloro, soluble en alcohol y cloroformo utilizada para pruebas colorimétricas con una sensibilidad de 50 mg/l cuya estructura química es $C_4H_{12}N_3O_2$.

4.4.1 Fundamento del método

El método de Aminofenazona tiene como fundamento químico una reacción de oxidación – reducción por lo que se definirá el concepto de ambos, como la oxidación que es la combinación de un elemento con el oxígeno, es decir, a la introducción de átomos de oxígeno en la molécula.

De la misma forma, por reducción se entiende el proceso contrario, es decir, es una reacción por la cual un compuesto pierde átomos de oxígeno. Por lo tanto, se considera que una reacción redox, es aquella en la que varía el número de oxidación de dos o más elementos de los reactivos.

Según esta definición, una oxidación es una pérdida de electrones y una reducción una ganancia, por lo que a este tipo de reacciones se les llama también reacciones de transferencia de electrones.

Un agente oxidante es, por lo tanto, una especie química capaz de captar electrones, reduciéndose y un agente reductor es, pues, una especie química capaz de

cederlos, oxidándose. Un par redox es el conjunto formado por la forma oxidada y la reducida de una sustancia.

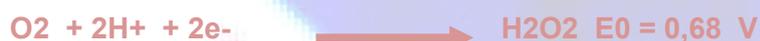
Por lo tanto, este método de orientación se basa en la presencia en la sangre de hemoglobina que es una metaloproteína cuyo grupo prostético es el grupo Hem. Su estructura consta de una cadena polipeptídica (apoproteína), y un grupo Hem (grupo prostético) formado a su vez por su isómero de la porfirina, la protoporfirina IX, unida a un ion metálico, que es el Fe (III), a diferencia de la hemoglobina que contiene Fe(II).

El átomo de Fe puede formar seis enlaces, cuatro de ellos los forma con los nitrógenos de la protoporfirina. La quinta y sexta posiciones de coordinación la emplea en un enlace de nitrógeno de un aminoácido histidina y con una molécula de agua respectivamente.

Ejerce una acción catalítica por el grupo Hem que actúa como una enzima la peroxidasa gracias a que el Ion férrico tiene propiedades antagonistas por el peróxido de hidrogeno y le da la propiedad de esta enzima que cataliza reacciones de descomposición del peróxido hidrógeno en agua y oxígeno, este oxígeno actúa como oxidante de un sustrato que es la aminofenazona promoviendo la formación de color, evidenciando al perito que la muestra puede contener sangre.

Cuando se produce el contacto, el peróxido de hidrógeno se une a la proteína a través del hierro, desplazando a la molécula de agua implica la formación de especies intermedias de la proteína que es un peroxocomplejo de Fe (+3) y, durante el proceso, no existe un contacto directo entre el agua oxigenada y el sustrato que será oxidado. Solamente a grados de pH altos el agua oxigenada (por ser un ácido débil), existe como OOH⁻ y permite la formación del peroxocomplejo intermedio.

La química redox del perhidrol en solución acuosa, se puede resumir mediante los siguientes potenciales:



Como se observa el peróxido de hidrógeno, es un agente oxidante fuerte en disolución ácida que le da el ácido acético empleado. Sólo se comporta como reductor frente a oxidantes muy fuertes como el permanganato potásico.

Habitualmente, las reacciones de oxidación con el peróxido de hidrógeno, se producen rápidamente en medio básico y de forma muy lentas si el pH es ácido.

Por lo cual en este método el sustrato que interviene es la aminofenazona. Este compuesto es una mina aromática del tipo leucobase que, cuando pasa a su forma oxidada por el oxígeno liberado por el peróxido de hidrogeno cambia de color.

Por otra parte la sangre posee enzimas peroxidadas que también son detectadas cuya reducción se basa en que se da una lisis celular en medio acido, liberando las catalasas y peroxidadas presentes en la célula esto se aprovecha para poder comprobar la presencia de peroxidadas en una muestra, puesto que la reacción no se produciría si no existe catalizador.

El medio acido además es requerida para garantizar la máxima estabilidad de los productos formados en la reacción (pH 4.5 aproximadamente) contribuyendo con el tiempo de desarrollo del color del sustrato. Al adicionar perhidrol o peróxido de hidrogeno (H_2O_2) como sustrato oxidante, por descomposición se genera agua y O_2 como producto de la reacción enzimático transformado la aminofenazona de incolora a violeta.

Por lo tanto, el cambio de color indica la posibilidad de que la mancha estudiada se sangre.

“La verdad no está solo detrás del experimento, sino también detrás de la simple y de la fecundada observación.”

De Gregorio Marañón

5.- SCREENING DE CONFIRMACIÓN¹⁴

Son ensayos específicos que certifican la existencia de sangre en la mancha investigada:

- I- Métodos microscópicos
- II- Métodos microcristalográficos
- III- Métodos cromatográficas
- IV- Métodos microespectroscopicos

5.1 Métodos Microscópicos

Observación de los elementos figurados de la sangre: La observación de glóbulos rojos (eritrocitos) y glóbulos blancos (leucocitos) en sangre fresca no ofrece problemas, pero pueden presentarse en manchas de sangre sea.

Este método no es de aplicación corriente en los laboratorios forenses, pese a que existen publicaciones sobre el tema, aunque no recientes. Esta observación puede verse afectada por diferentes circunstancias la naturaleza del sustrato sobre el cual se encuentra la mancha, la antigüedad de la misma, el daño originado por el manipuleo y la putrefacción que causará la destrucción de los elementos figurados.

Cuando la sangre se deposita sobre un objeto en una fina capa y se deseca rápidamente, es cuando mejor se conservan, tanto los glóbulos blancos como los rojos.

I-I- Observación de leucocitos (glóbulos blancos): la técnica a emplear dependerá de si la mancha se encuentra sobre un material absorbente: una tela, o un soporte no absorbente: una hoja metálica.

- a) **Mancha sobre un soporte absorbente (tela);** Parte experimental

¹⁴ Tratado de Criminalística Tomo II La Química Analítica en la Investigación del Delito, Ob, cit..

Reactivos y material

- Alcohol absoluto
- Colorante Giemsa, diluido 1 en 10
- Agujas de disección
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Microscopio

Técnica: se coloca un pequeño trozo de la tela manchada sobre un portaobjeto, se agregan unas gotas de alcohol absoluto y se deja en reposo durante 20 minutos. Este procedimiento asegura la adhesión de la sangre a la trama del género, de lo contrario, se disolvieron en las operaciones sucesivas. A continuación se colorea con solución Giemsa, diluida 1 en 10, por espacio de 30 minutos, se enjuaga con agua destilada y se deja secar al aire.

Se coloca el portaobjetos en la platina, particularmente de los polimorfonucleados. Si la tela es suficientemente traslúcida, pueden verse los mismos sin desintegrar el tejido. Si se trata de una tela oscura o gruesa, puede requerir luego del teñido, el deshilachado de dicho material sobre el portaobjetos, mediante el empelo de agujas empleadas.

b) Mancha sobre un soporte no absorbente; Parte experimental

Reactivos y material

- **Albumina de Mayer:** Partes iguales de albuminas de huevo y glicerina.
- Colodión disuelto en alcohol- éter en partes iguales.
- Metanol- formol 9:1.
- Colorante Giemsa diluido 1 en 10.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Microscopio.

Técnica: Se deposita sobre un portaobjeto una capa de albumina de Mayer. A continuación se raspa una parte de la mancha y el polvo obtenido se deja caer en forma de lluvia fina sobre la capa de albúmina. Se fija el preparado con solución de metanol-formol 9:1 por espacio de 3 minutos. Se lava con agua destilada y se colorea con el

colorante Giemsa, diluido adecuadamente. Se lava el preparado, se seca y se observa al microscopio.

En ocasiones pueden verse muy bien los elementos figurados en sus formas características. Puede también intentarse la técnica de De Dominicis, que consiste en extender sobre la mancha y mediante un pincel, una solución de colodión en alcohol-éter.

Una vez evaporado el solvente se forma una película que, al desprenderla, puede arrastrar consigo una cantidad variable de elementos figurados. Se tiñe la película con el colorante de Giemsa o con hematoxilina-eosina y luego se observa al microscopio.

I-II- Observación de eritrocitos (glóbulos rojos):

Manchas sobre soportes opacos no absorbentes: Las manchas de sangre sobre hojas metálicas (armas blancas u otros objetos no absorbentes), pueden ser examinadas directamente al microscopio por el método denominado epimicroscopia.

La epimicroscopia realiza las observaciones iluminando con luz incidente, mientras que la microscopia convencional utiliza luz por transparencia. Exámenes realizados sobre hojas de cuchillos, han permitido localizar los glóbulos rojos y, en algunos casos, efectuar el reconocimiento de la especie por sus características morfológicas.

Los mejores resultados con el presente método se han logrado cuando la capa de sangre que se asienta sobre la hoja metálica es muy delgada. Al secarse rápidamente la mancha, es probable que la sangre no sufra alteraciones y entonces los glóbulos rojos se distinguirán bien, al presencia de los mismos en suficiente para caracterizar la mancha. Cuando la capa de sangre es gruesa, la observación es más difícil y, en ocasiones, imposible, pues los eritrocitos decantan por su mayor peso específico, formándose por encima de los mismos una costra de albúmina, Por otra parte, si la mancha es gruesa, el secado es más lento y se incrementa el riesgo de putrefacción de la sangre.

5.2 Método Cristalográfico

Consisten en la preparación y observación de cristales obtenidos por acción de ciertos reactivos sobre la hemoglobina de la sangre. Se consideran métodos específicos para el reconocimiento de la misma.

Los dos métodos más utilizados son el de Teichmann y el de Takayama.

5.2.1 Método de Teichmann

Propuesto por Teichmann¹⁵ en el año 1853, ha sido empleado desde entonces. Consistente en la cristalización característica del clorhidrato de hematina (hemina), bajo la forma de cristales romboédricos de color café, utilizando ácido acético glacial con vestigios de cloruro de sodio.

La prueba de Teichmann da buenos resultados aun con manchas antiguas y con muy pequeñas cantidad de sangre.

5.2.1.1. Parte Experimental - Reactivos y materiales

- **Reactivos de Teichmann:** Acido acético glacial con 0,1 % de cloruro de sodio.

- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Micropipetas.
- Baño de María.
- Microscopio.

Técnica: Se prepara un extracto de la mancha. Si se encuentra impregnado un tejido, se macera un trocito del material manchado, en la menor cantidad de agua posible. Si el soporte no es absolutamente el extracto se prepara por disolución en agua de unas escamitas de la mancha.

Para evitar interferencias, es recomendable siempre preparar un blanco, aplicando el mismo procedimiento sobre una zona no manchada del objeto. Se calienta luego un portaobjetos durante un minuto sobre la tapa de un baño de agua a 60°C.

Con una micropipeta se coloca una gota de extracto en el centro del portaobjetos y obtener una mancha visible de color pardo.

Se coloca sobre la mancha un cubreobjetos, interponiendo entre el portaobjetos y el cubreobjetos, un pequeño rectangulito de papel filtro con el objeto de dejar una hendidura

¹⁵ En Polonia desarrollo el primer ensayo cristalográfico para Hemoglobina con el uso de cristales de hemina o hematina.

suficiente para el paso de una gota de reactivo de Teichmann. Una vez agregado el reactivo, se apoya el portaobjeto sobre la placa del baño de agua y se deja hasta la evaporación total del ácido acético. Se vuelve a agrega una gota de reactivo y se evapora de nuevo.

Se repite el procedimiento una tercera y cuarta vez se deja enfriar el portaobjeto y se observa al microscopio. La aparición de los cristales característicos de Teichmann, indicarán un resultado positivo.

5.2.2. Método de Takayama

Es más reciente que el anterior, más simple en su realización y lo ha reemplazado en muchos laboratorios, aunque es aconsejable el empleo de ambos métodos. Es específico y está basado en la obtención de los cristales de piridina-hemocromógeno como consecuencia de la acción del reactivo sobre la hemoglobina de la sangre, presente en la muestra.

El reactivo consiste en una mezcla de piridina, solución saturada de glucosa y solución de hidróxido de sodio. Los cristales obtenidos son de color rosado intenso.

5.2.2.1 Parte experimental - Reactivos y materiales

- **Reactivo de Takayama**; se mezclan 3 ml de solución de hidróxido de sodio al 10% (p/v), 3 ml de solución saturada de glucosa, 3 ml de piridina y 7 ml de agua. Esta solución debe guardarse en la heladera y renovarse periódicamente.

- Portaobjetos.
- Micropipetas.
- Baño de María.
- Microscopio.

Técnica: Se coloca en el centro de un portaobjeto una gota de extracto de mancha preparado como se indico en la técnica de obtención de los cristales de Teichmann. Se evapora con calentamiento suave, sobre la tapa de un baño de María; se agrega sobre el depósito obtenido una gota del reactivo de Takayama. Se coloca un cubreobjetos y se vuelve a evaporar hasta la sequedad.

Se deja enfriar y se observa al microscopio. El resultado positivo consiste en la obtención de los cristales de piridina-hemocromógeno de color rosado intenso y de aspecto de red o similar a helecchos.

5.3 Método Cromatográfico

Se basa en la obtención del mismo Rf característico para un extracto de la muestra y un testigo de sangre, ambos sembrados sobre papel para uso Cromatográfico o sobre placa delgada. Esta técnica ha desplazado a la primera por sus ventajas.

5.3.1 Parte experimental -Reactivos y materiales

- Placa delgada de sílica-gel G (uso Cromatográfico).
- **Solvente**: metanol-ácido acético- agua 90:3:7.
- Sangre testigo diluida 1:1000 en solución fisiológica.
- **Reactivo revelador**: solución de verde malaquita ; disolver inmediatamente antes de su uso, 0,1 g de leucobase del verde de malaquita en 10 ml de etanol, adicionado de 2-3 gotas de ácido acético.
- Solución de agua oxigenada al 6 % (20 volúmenes).
- Cuba cromatográfica.
- Pulverizadores.

Técnica: Se disuelven las manchas con solución fisiológica. Se hace una prueba preliminar, sembrando sobre placa delgadas diferentes cantidades del extracto de muestra o sea 1, 2 ó 5 microgotas; luego se pulveriza con el reactivo leucobase del verde de malaquita y agua oxigenada.

Para el desarrollo Cromatográfico se elige la cantidad que de una reacción neta, pero no demasiado intensa, y se siembre en la línea de partida. A continuación se siembran 5 microgotas de sangre testigo diluida 1:1000. Luego con el solvente mencionad, se desarrolla el cromatograma hasta que la altura del solvente en la placa supere los 10 cm.

Se retira la placa de la cuba y se seca en una estufa a 100°C durante 5 minutos, para evitar la interferencia de las peroxidases de origen vegetal. A continuación se rocía

con el reactivo verde de malaquita y luego de uno o dos minutos, si no aparece coloración, con el agua oxigenada. En caso de resultado positivo (existencia de sangre) aparecerá una mancha verde más o menos intensa con un Rf de 0,7 a 0,8.

5.4 Método Microespectroscópico

Constituyó durante años uno de los métodos utilizados para la investigación de manchas de sangre, en lo que respecta al reconocimiento de la misma. Actualmente su uso ha sido desplazado, principalmente por los métodos cristalográficos.

Consiste en observar el espectro de absorción de la oxihemoglobina, con un microscopio provisto de un ocular Microespectroscópico en lugar del ocular corriente.

El espectro de absorción de la oxihemoglobina está caracterizado por dos bandas de absorción cuyas longitudes de onda correspondientes son 576-578 nm y 540-542nm, situadas entre las líneas D y E del espectro visible.

Cuando la muestra de sangre es fresca, el método no ofrece problemas, siempre que se disponga de la cantidad suficiente; pero, si la mancha es antigua, la hemoglobina se habrá transformado parcialmente en metahemoglobina, hematina y hemocromógeno. Cada una de estas sustancias da un espectro de absorción característico, dificultando la observación.

La carboxihemoglobina da un espectro similar al de la oxihemoglobina, pero con un ligero desplazamiento de las bandas hacia el violeta. Si se agrega un agente reductor, la oxihemoglobina se transforma en hemoglobina reducida, cuyo espectro presenta una única banda ubicada entre las dos correspondientes a la oxihemoglobina y que se denomina banda de Stokes.

La carboxihemoglobina, en cambio, mantiene la doble banda aun luego del agregado de un reductor. Los reductores empleados son el ditionito de sodio o el reactivo de Stokes.

Descripción del ocular Microespectroscópico de Leitz, consta de dos partes superpuestas que se pueden plegar o desplegar mediante una bisagra.

La inferior es el ocular propiamente dicho que lleva dos colimadores y un prisma de reflexión total. Este último se puede colocar o retirar a voluntad, por medio de una palanca externa, y sirve para reflejar en su totalidad, hacia el prisma espectral colocado en el tubo superior, el haz de luz que atraviesa un tubo que se coloca lateralmente. Este está destinado a contener la solución testigo desangre, la que suministra el espectro de absorción que se comparará con el de la muestra colocada en la platina del microscopio.

La parte superior del ocular Microespectroscopico contiene el prisma espectral de visión directa de Amici y, por encima de éste, una lente en cuyo plano focal se forma la imagen del espectro. A un costado del tubo superior hay otro, horizontal, de menor diámetro, provisto de un espejo y una lente. Ambos están destinados a proyectar por medio de un haz de luz conveniente, la imagen real de una escala que refleja en la cara superior del prisma y llega al ojo del observador, superpuesta a la imagen del espectro.

Dicha escala, previo calibrado con la línea de absorción del sodio 589, sirve para asignar a las líneas de los espectros de absorción la longitud de onda que le corresponde.

5.4.1. Parte Experimental - Reactivos y materiales

- Solución testigo de sangre 0,5 %.
- **Solución de ditionito de sodio**: se disuelven aproximadamente 30 mg de ditionito de sodio de 5 ml de agua destilada alcalinizada con unas gotas de NaOH al 40 %.
- **Reactivo de Stokes**: se disuelven 300 mg de FeCO_4 y 200mg de ácido tartárico en 10 ml de agua. En el momento de uso se agregan gotas de amoníaco hasta la disolución del precipitado formado.
- **Microtubo**: consiste de 3 mm de diámetro y 5 cm de altura, adherido por uno de sus extremos a un portaobjetos, por medio de bálsamo de Canadá. El tubo está pintado, exteriormente con pintura negra.
- Microespectroscopio.
- Microscopio.

Técnica: Si se dispone de muy pequeña cantidad de muestra, se utiliza el Microtubo que hemos descrito. Este se llena con dos o tres gotas del extracto de mancha. La concentración más adecuada es al 0,5 por ciento de sangre. Si se dispone de mayor cantidad de muestra puede utilizarse un pequeño vasito, que se coloca directamente sobre un portaobjeto.

La concentración de muestra es la misma que para el Microtubo. Se coloca el portaobjetos con la muestra, sobre la platina del microscopio. A continuación se retira el ocular del microscopio y en su lugar se coloca el Microespectroscopio, fijándolo con el tronillo correspondiente, al tubo del microscopio. Se pliega la parte superior que contiene el prisma y se observa por el ocular del tubo inferior. Se enfoca el tubo de modo tal que el haz de luz atraviesa netamente a la muestra.

Por intermedio de los dos tornillos de los colimadores se regula adecuadamente el ancho y el largo de la ventanita que permite ver la solución que está en la platina. Se coloca el tubo superior que contiene el prisma espectral de Amici, sobre el inferior y se examina el espectro. Si la mancha es de sangre reciente, se observará en la zona entre las líneas D y E, la doble banda de absorción característica de la oxihemoglobina, a las longitudes de onda correspondientes.

La especificidad se incrementa si se agrega al tubo que contiene la muestra, una gotita de solución reductora (solución de ditionito de sodio o reactivo de Stokes). Se agita a continuación con una varilla de vidrio. Se observará que la solución toma un color violáceo. Se vuelve a observar nuevamente el espectro. La aparición de una única banda situada entre las dos observadas anteriormente, confirma el resultado.

“Todo avance Científico puede aprovecharse para el descubrimiento del Crimen.”

De Hans Gross

6.- INVESTIGACIÓN DE ESPECIE

6.1 Introducción

Una vez realizados los ensayos confirmativos de sangre, y previo a su tipificación, debe efectuarse la investigación del origen - humano o de otra especie-, al cual pertenece la muestras.

Esta investigación es una tarea de rutina en todo laboratorio químico forense, reviste particular importancia en el esclarecimiento de casos de homicidios, robo de ganado, accidentes automovilísticos causados por animales, etc.

El químico especializado sabe que varios factores pueden afectar la posibilidad de asegurar el origen de la sangre.

Los más importantes de estos factores son: antigüedad de la mancha, acción del sol, humedad, putrefacción, desarrollo de hongos, altas temperaturas, lavado y la naturaleza de la superficie sobre la cual se encuentra la sangre.

Generalidades

La determinación de la especie se realiza en la actualidad casi, exclusivamente, por el método de las precipitinas el cual desplazo la observación de los elementos figurados de la sangre.

En algunos casos, la presencia de los glóbulos rojos en una muestra ha sido de valor, dado que el tamaño y la morfología de los mismos difieren entre ciertas especies.

Los glóbulos rojos del hombre, como los de casi todos los mamíferos, son circulares y sin núcleo, a excepción de los del camello y otros relacionados, como los de la llama, que son ovales, pero también sin núcleo.

Las aves, réptiles y peces, poseen glóbulos rojos nucleados y de mayor tamaño que el de los humanos.

Mediante estos datos es posible constatar que la sangre en cuestión no puede pertenecer a determinadas especies, quedando las mismas excluidas.

Este método es poco usual en los análisis de rutina, puede recurrirse a las técnicas mencionadas anteriormente, referida a la observación de elementos figurados (glóbulos rojos), como método de certificación de la existencia de sangre en una mancha.

6.2 Ensayo de Precipitinas

Una vez preparado el extracto de la mancha y del blanco, se realizará los análisis que conducen a la determinación de la especie a la cual pertenece la mancha de sangre.

Estos análisis consisten en una reacción antígeno-anticuerpo, y como la misma se visualiza con la obtención de un precipitado, se conoce con el nombre de ensayo de precipitinas.

Desde el principio de esta centuria, se sabe que es posible distinguir la sangre de diferentes animales por medio de antisueros precipitantes específicos.

Un animal contiene y puede tolerar solo su tipo de proteína. Si se le inyectan proteínas de otras especies, se pone en acción un mecanismo de respuesta inmunológica, el animal genera anticuerpos específicos (precipitinas) que precipitarán las proteínas extrañas.

En la práctica, con el objeto de obtener los antisueros que permitirán investigar el origen de la sangre, se inyecta en un animal, usualmente un conejo, suero humano o de cualquier otra especie, empleando técnicas apropiadas de inmunización.

Cuando el conejo haya formado suficiente cantidad de anticuerpos contra las proteínas inyectadas, se procederá a su sangrado. Se separará el suero, convertido en antisuero contra la especie particular cuyo suero sanguíneo se utilizó para la inyección.

6.2.1 Condiciones que deben cumplir los antisueros

Los antisueros son, generalmente, adquiridos en el comercio. Se denominan antisuero humano o suero precipitante anti- humano, anti-perro, etc.

Deben cumplir una serie de exigencias para asegurar la eficiencia de su empleo. Estas son:

1. **Esterilidad**: Se logra por los medios serológicos usuales.

2. **Libre de turbiedad**: Cualquier opalescencia vuelve inútil al antisuero. Es conveniente sangrar al animal productor de anticuerpos luego de ayuno de 24 horas.

Se recomienda adquirir los antisueros liofilizados, pues se conservan mejor. Una vez solubilizados, deben guardarse en frascos bien cerrados, y en la heladera (entre 0° y 4°C). Si se conservan antisueros líquidos en ampollas abiertas, luego de un primer uso, pueden enturbiarse rápidamente y volverse inútiles.

3. **Título adecuado**: Es recomendable un título de 10.000. Para titular el antisuero se diluye en solución fisiológica, suero de la especie que se utilizó como agente inmunizante. Por ejemplo, suero humano, en el caso que se titule un antisuero humano.

Luego, en una serie de microtubos rotulados, de 40 mm por 3 mm de diámetro, se colocan 0,05 ml del antisuero humano a titular. Cuidadosamente se agrega a cada tubo, por las paredes de mismo y por medio de una micropipeta (utilizando una nueva pipeta cada vez) 0,1 ml de las distintas diluciones de suero humano preparadas, evitando que ambas soluciones de mezclen.

La aparición, antes de 20 minutos, de un anillo en la interfase en el tubo donde la dilución es de 1 en 10.000 o próxima a la misma, indica que el antisuero adquirido tiene el título correcto. Se entiende por título del antisuero a la inversa de la última dilución que da resultado positivo.

4. **Especificidad**: El antisuero a emplear debe ser específico respecto de la especie contra la cual fue preparado. Se sabe que un antisuero contra proteínas del suero de un animal, también contiene anticuerpos contra proteínas de especies muy relacionadas; por ejemplo; anti-oveja, contra proteínas de la cabra. Esto se explica por la existencia de antígenos comunes que han sido estudiados por la inmuno-hematología. Se controla la especificidad con muestras de sangre pertenecientes a diferentes especies.

Pueden conservarse en forma de gotas secas sobre papel y se diluyen en solución fisiológica, cuando se necesitan.

Con el antígeno específico, el antisuero dará una reacción positiva a mayor dilución y en menor tiempo que con el antígeno relacionado (perteneciente a una especie próxima).

6.2.2 Toma de muestra

Para solubilizar la sangre es recomendable utilizar solución fisiológica. El tiempo requerido para la extracción dependerá de la antigüedad de la mancha. Este no debe ser demasiado corto, con el fin de disolver no sólo la hemoglobina, sino también las proteínas del suero. En general, si la mancha no es reciente, se efectúa la extracción durante 24 horas en heladera; se evita así el desarrollo de bacterias y se obtienen resultados satisfactorios.

En algunos casos se ha recomendado utilizar soluciones alcalinas para facilitar la dilución. Este recurso debe ser la excepción, siendo preferible, de ser necesario, aumentar el tiempo de extracción.

Cualquiera sea el material sujeto a este análisis, debe someterse al mismo tratamiento una zona no manchada cercana a la mancha. Los ensayos en blanco no deben omitirse.

6.2.3 Condiciones que deben cumplir los extractos de sangre

Deben ser límpidos, neutros y de la dilución conveniente. En el caso que los extractos obtenidos sean turbios, se recurrirá a la filtración o, mejor aun, a la centrifugación.

El extracto debe tener un pH próximo a 7 para evitar precipitaciones anómalas de las proteínas del antisuero. La dilución 1: 1.000, lleva prácticamente al punto neutro. Por otra parte, ésta es la dilución conveniente para evitar falsos positivos. La sangre testigo se diluye también 1: 1.000, con solución fisiológica.

La muestra bajo examen debe ser utilizada debe ser diluida hasta una coloración débilmente rosada o amarillo paja (aproximadamente 1: 1.000), con la cantidad necesaria de solución fisiológica. El color depende de la antigüedad de la mancha.

Otra manera de estimar si se está próximo a la dilución buscada, es colocar unos mililitros de la solución en un tubo de ensayo y agregar 1 ó 2 gotas de ácido nítrico al 25 %. Se calienta a ebullición. Una pálida turbiedad indicará que la dilución es próxima a 1: 1.000. Si se forma un intenso precipitado, el extracto requiere una mayor dilución.

Por otra parte, si se agita un tubo de ensayo que contenga la solución en la dilución 1: 1.000, debe formarse una espuma que persiste poco tiempo.

6.3 Métodos empleados para el ensayo de las precipitinas

Para la realización de este ensayo pueden utilizarse varios métodos; en tubo, en capilar y electroforesis.

6.3.1 Método del Tubo

En un tubo se coloca primeramente el antisuero; luego se agrega el extracto de la mancha, diluido aproximadamente 1: 1.000, con una micropipeta, manteniendo el tubo inclinado y dejando escurrir la solución por las paredes del tubo, de modo que esta solución quede sobre el antisuero, sin mezclarse.

Se debe evitar la formación de burbujas de aire que dificultarían el contacto entre las soluciones. En caso de resultado positivo, se debe formar un anillo neto en la interfase.

El tamaño de los tubos no es de gran importancia y dependerá de la cantidad de antisuero que dispone el investigador. Pueden utilizarse los microtubos que se emplearon en la titulación del antisuero (40 mm x 3 mm).

6.3.2 Métodos con capilares

Resulta adecuado para economizar antisuero o cuando se dispone de muy poca cantidad de muestra. Se utilizan tubos capilares de pocos cm de longitud. Se sumerge el extremo del tubo en el antisuero y luego en el extracto de la mancha.

El capilar se coloca verticalmente sobre una base de plastilina. El precipitado se desarrolla en la interfase, de la misma manera que con la técnica del tubo.

Controles para los dos métodos mencionados

Hay que considerar la posibilidad de reacciones falsas positivas, deben realizarse una serie de ensayos de control que establezcan claramente que el antisuero empleado es correcto, tanto en título como en especificidad y que ninguna contaminación accidental o reacción positiva no específica, causada por otras sustancias, son responsables del precipitado formado en el tubo conteniendo el extracto de la mancha cuestionada y el antisuero.

Por ejemplo, si se sospecha de la existencia de sangre humana en la mancha, se incluyen los siguientes controles;

a) **Blanco**: El extracto del material sin mancha, preparado como se detalló oportunamente, puesto en contacto con el antisuero, no debe dar reacción. De esta manera se descarta la existencia de sustancias propias del sustrato, capaces de formar precipitado en presencia del antisuero.

Se evidencia la importancia de este ensayo de control en el caso de manchas sobre madera o cuero. En estos soportes, la presencia de taninos que actúan como precipitaciones de proteínas, pueden dar lugar a reacciones positivas no específicas.

b) **Solución fisiológica empleada para solubilizar la muestra**: no debe producir precipitado al reaccionar con el antisuero.

c) **Sangre de animales de especies diferentes a la humana, diluida 1:1.000**: no deben producir reacción con el antisuero humano.

d) **Suero humano conocido diluido 1:1.000**: Este control sirva para demostrar que el antisuero reaccionara con sangre humana y que posee un título adecuado. Además puede usarse para comparar otras reacciones positivas.

e) **Suero normal de conejo**: Se pone en contacto con el extracto de la mancha. La reacción debe ser negativa, comprobándose que el suero del animal no inmunizado no contiene precipitinas humanas.

6.3.3 Método electroforético¹⁶

La técnica electroforética brinda la posibilidad de efectuar el ensayo en un lapso corto. El método consiste en una electroforesis en medio soporte constituido por gel de agar. El agar es una sustancia con carácter ácido debido a los radicales sulfatos que posee y que le confieren una carga total negativa.

El líquido contenido en el gel de agar se carga positivamente con respecto a éste. Al aplicar la corriente eléctrica, se tendría que producir el desplazamiento del agar hacia el polo positivo (ánodo) y del líquido hacia el negativo (cátodo). Como el agar está adherido a la placa de vidrio, no se desplaza.

En cambio, el líquido se mueve hacia el cátodo y genera la corriente electroendosmótica, en sentido contrario al de la migración de la corriente. Esta corriente electroendosmótica es de suma importancia en el presente método.

Consiste en practicar sobre el gel de agar, dos concavidades próximas entre sí, ubicadas a lo largo de la línea de movimiento electroforético. En la concavidad cercana al cátodo, se coloca el extracto de sangre y, en la próxima al ánodo, el antisuero.

En el extracto de sangre, las proteínas séricas; albúmina, alfa y beta globulina, constituyen los antígenos, mientras que los anticuerpos del antisuero son gammaglobulinas.

La electroforesis se lleva a cabo a pH = 8,6. Si bien a este pH todas las proteínas séricas se encuentran cargadas negativamente, su densidad de carga eléctrica decrece en el siguiente orden; albúmina, alfa-globulina, beta-globulina y gamma-globulina.

Al aplicar las diferencias de potencial, las tres primeras fracciones migran hacia el ánodo, mientras que las gamma-globulina, de muy baja densidad de carga negativa, son arrastradas por la corriente electroendosmótica hacia el cátodo. De manera, la reacción antígeno- anticuerpo se produce en el área comprendida entre las concavidades y se observa la formación de bandas de precipitación, cuando la reacción es positiva.

¹⁶ Tratado de Criminalística Tomo II, La Química Analítica en la Investigación del Delito, Ob, cit..

6.3.4 Parte Experimental -Reactivos y materiales

- Agar grado electroforético con baja electroendosmosis (agar purificado para Inmuno-electroforesis OXOID).

- Solución de agar al 0,2% en agua.
- Solución de agar al 2 % en agua.
- **Buffer gel (pH = 8,6) constituido por:**

- Barbiturato de sodio 7,00 g.,
- Acido dietil barbitúrico (veronal) 1,10 g.
- Lactato de calcio 1,00 g.
- Agua destilada 1 litro.
- Conservar en la heladera.

- Gel de agar: esta preparación se realiza mezclando volúmenes iguales de agar al 2 % y buffer gel.

- **Buffer para la cuba (pH = 8,6) constituido por:**

- Barbiturato de sodio 8,76 g.
- Acido dietil barbitúrico (veronal) 1,38 g.
- Lactato de calcio 0,38 g.
- Agua destilada 1 litro.
- Conservar en la heladera.

- Solución de cloruro de sodio 1 M.

- **Colorante: está constituido por:**

- Negro amido 10 B 0,10 g.
- Metanol 40 ml.
- Acido acético glacial 10 ml.

- Agua destilada 50 ml.

- **Solución de lavado: Está constituido por:**

- 4 partes de metanol.

- 5 partes de agua destilada.
- 1 parte de ácido acético glacial.
- **Cuba electroforética de cuatro compartimientos**; dos para el electrodo negativo y dos para el positivo, ambos de platino. También pueden utilizarse electrodos de acero inoxidable de 0,5 mm de diámetro.
- Portaobjetos de 7,5 cm de largo por 2,5 cm de ancho.
- Pipeta Pasteur de 1,8 mm de diámetro o microsacabocado.
- Papel o material absorbente para los puentes.
- Cámara húmeda.

6.3.5 Técnica -Preparación de las placas de gel

Se utilizan los portaobjetos descritos, previamente desengrasados, limpios y secos. Se colocan sobre una superficie plana y nivelada. Se vierten primeramente de 2 a 2,5 ml de una solución de agar de concentración de 0,2 % previamente calentada y fundida a baño María.

Esta primera capa se deja reposar de 30 a 40 minutos a temperatura ambiente y luego se seca en estufa a 65°C durante 1 ½ h.

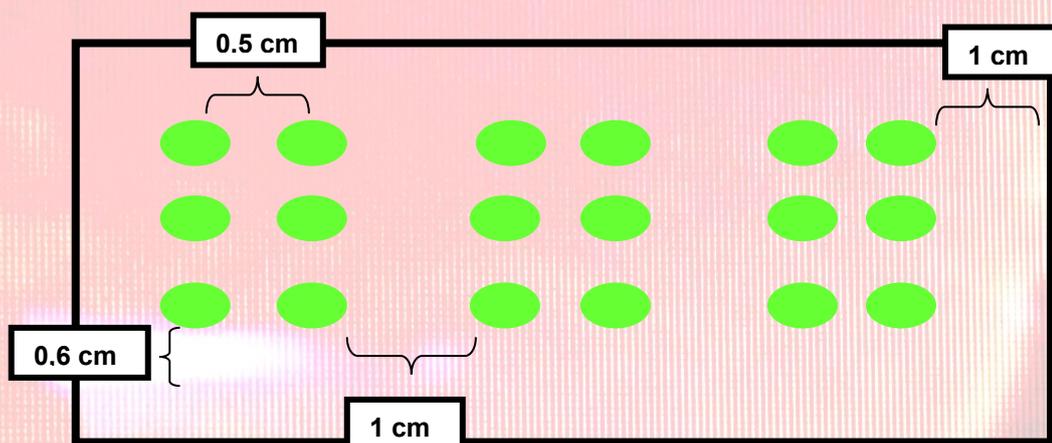
Luego, sobre esta primera capa, se vierten de 4 a 4,5 ml de gel de agar previamente calentado y fundido a baño María.

Dejar en reposo de 20 a 25 minutos hasta su solidificación, siendo esta capa final de 2 mm de espesor. Su conservación debe realizarse en cámara húmeda.

6.3.6 Perforación de las placas de gel

Se utiliza para ello un sacabocado o una pipeta Pasteur que posea en su extremo superior una goma con boquilla. Se apoya la punta de la pipeta Pasteur sobre el gel y se aspira por la boquilla, lográndose así orificios de 1,8 mm de diámetro.

El aspecto de la placa perforada y la distancia entre los orificios es el indicado en la siguiente figura:



6.3.7 Soluciones de siembra

a) **Sangre humana testigo:** Se prepara una dilución uno en mil de sangre fresca humana en buffer del diluido al medio con agua destilada.

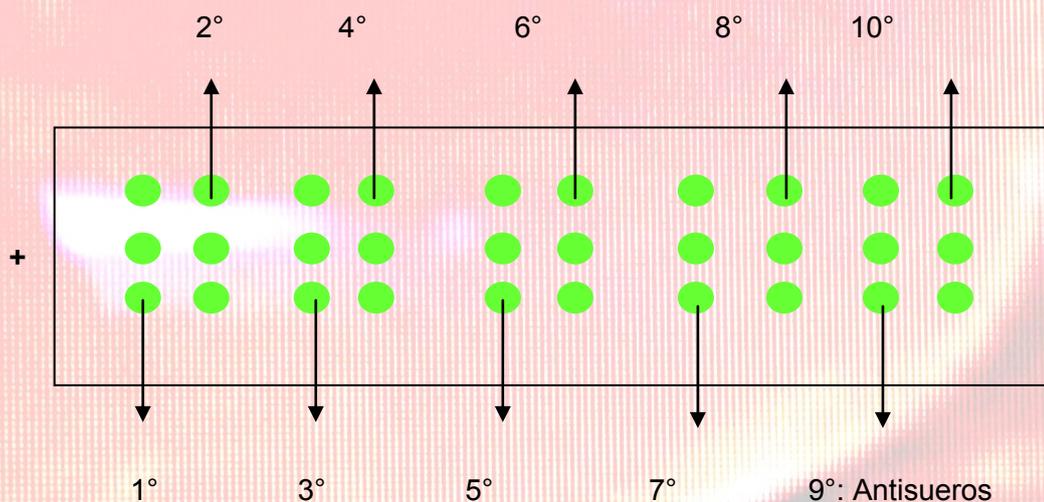
b) **Sangre testigo de otras especies:** Se procede de igual forma que en la preparación de sangre humana testigo, supliendo la sangre humana por un volumen igual de sangre fresca de la especie a ensayar.

c) **Extracto de mancha seca:** Se coloca un trozo de material manchado (aproximadamente 0,25 cm²) dentro de un tubo de ensayo, se agrega posteriormente gota a gota una mezcla de partes iguales de buffer gel y agua destilada hasta obtener, luego de macerar, una coloración amarillo paja o rosa pálido. Esta coloración es similar a la obtenida con la dilución uno en mil de sangre fresca en un tubo de ensayo de igual diámetro.

d) **Blanco:** Se procede de igual forma que con la mancha, pero empleando un trozo de material no manchado.

6.3.8 Corrida Electroforética

Sobre la placa de gel se sembrará el antisuero en los orificios de la 1°, 3°, 5° y 7° columnas y los testigos, muestras y blancos, en 1°, 2°, 4°, 6° y 8° columnas numeradas de izquierda a derecha¹⁷. **Columnas:** sangre testigo, muestra o blancos



Los volúmenes a sembrar serán los necesarios para llenar al ras los correspondientes orificios. Deberán usarse para tal fin las pipetas capilares desgrasadas y secas.

A continuación se vierte el buffer correspondiente en la cuba electroforética de tal forma que ambos compartimentos posean igual volumen y que cubra totalmente los electrodos.

Se realizan los puentes con dos tiras de materia absorbente cuyo ancho coincida con el portaobjetos y cuyo largo dependerá de las dimensiones de la cuba. En su centro se coloca el portaobjetos, de tal forma que las columnas conteniendo antisuero queden del lado del ánodo y, las que contiene sangre testigo, muestras y blancos, del lado del cátodo, como se indicia en la figura anterior.

Cada tira de material absorbente se dispondrá con uno de sus extremos sumergidos en el buffer de la cuba, del comportamiento anódico o catódico y, el otro, apoyado sobre el borde de la placa de gel correspondiente.

¹⁷ Tratado de Criminalística Tomo II La Química Analítica en la Investigación del Delito, ob, cit..

La electroforesis se llevara a cabo a un voltaje de 150 V y durante un lapso de 20 a 20 minutos. Una vez finalizada la corrida, se verificará la reacción positiva por formación de un precipitado blanco entre dos orificios.

6.3.9 Revelado

Luego de registrar los resultados, el portaobjetos se sumergirá durante una noche en una solución de CINA 1 M; posteriormente se lava con agua y se deja secar. Para mejorar la visualización, se expone la placa de gel a la acción de la solución colorante durante 4 a 5 minutos.

Finalmente se retira del método electroforético se cita a continuación:

Se comete un homicidio con un arma blanca y el principal sospechoso resulta ser un carnicero quien niega toda participación en el hecho.

Se secuestran en su comercio varios cuchillos ensangrentados. Una vez remitidas las muestras al laboratorio, se realiza la electroforesis para determinar la especie a la cual pertenecen las manchas encontradas, utilizando sueros anti-humano, anti-vaca y anti-cerdo.

Se comprueba que en uno de los cuchillos la sangre es humana. Esta evidencia sirvió para lograr la confesión de culpabilidad del sospechoso.

Antisueros		extractos de la mancha de sangre	
Suero anti-vaca	●	no precipitado	●
+ Suero anti-cerdo	●	no precipitado	●
Suero anti-humano	●	precipitado	●

	Gamma-globulinas		albúmina, alfa y beta globulinas	
(+)	→		←	(-)
	(Anticuerpos)		(Antígenos)	

“El trabajo de Laboratorio consiste, en efecto, es desmontar, hacer coincidir, explicar esos indicios con el fin de volver a ajustarlos a los otros elementos de la investigación propiamente dicha, constituyendo, finalmente, ese conjunto la prueba de los hechos, con los cuales se relaciona cada uno de esos elementos, aparentemente aislados, incluso disperso, volviéndolos a estructurar científicamente en la coherencia y la homogeneidad de un conjunto.”

De P.F. Ceccaldi

7.- TIPIFICACION DE MANCHAS DE SANGRE HUMANA

Si en la investigación de una mancha se comprueba que es sangre y que pertenece a la especie humana, la etapa final de su análisis consiste en la tipificación de la misma.

Tipificar una mancha de sangre, es encontrar su tipo o grupo dentro de la mayor cantidad posible de sistemas y es fundamental para llegar a la individualización.

Se ha mencionado que es muy probable que queden en la escena del delito manchas de sangre. Si se comprueba que las mismas no pertenecen a la víctima, su estudio es muy importante para localizar al criminal.

Por otra parte, si en ropas u objetos pertenecientes a un sospechoso, se encuentran manchas de sangre diferente a la suya y coincidente con la de la víctima, sería una prueba más de culpabilidad.

No podrán sacarse conclusiones valederas si hay semejanzas entre los grupos sanguíneos de sospechosos y víctima, pudiendo alegar el primero que las manchas encontradas en sus pertenencias, se deben a su propia sangre.

Esta posibilidad de coincidencia entre los grupos sanguíneos de dos individuos se hace cada vez más remota, al ser mayor el número de sistemas utilizados en la tipificación de la sangre.

Los avances producidos en este campo de la ciencia han incrementado la probabilidad de asignar a un individuo en particular, una mancha de sangre. Para la tipificación de las mismas se utilizan las técnicas inmunológicas y bioquímicas. Estas últimas se basan en la investigación de proteínas polimórficas e isoenzimas.

Técnicas Inmunológicas

Introducción

Las técnicas inmunológicas serán aplicadas al estudio de los sistemas ABO, MN y Rh.

Se basan en la existencia sobre la superficie de los glóbulos rojos de sangre, de ciertas estructuras químicas llamadas antígenos. Son estos antígenos los que confieren a la sangre, el tipo dentro de cada sistema sanguíneo.

En sangre fresca, la presencia o ausencia de un antígeno, se determina por la aglutinación o no de los glóbulos rojos puestos en contacto con un antisuero específico, en determinadas condiciones.

En manchas de sangre seca, los glóbulos rojos están generalmente destruidos y, por lo tanto, las técnicas de aglutinación directa no son aplicables.

Sin embargo, los antígenos no se desnaturalizan inmediatamente y retienen la capacidad de combinarse con anticuerpos específicos.

En primer grupo sanguíneo conocido y aplicado a la investigación de manchas secas de sangre, fue el sistema ABO.

7.1 Sistema ABO¹⁸

Generalidades

A partir de los estudios de Harvey sobre la circulación de la sangre, publicados en 1628, se hicieron tentativas de curar a enfermos inyectándolos sangre de animales.

Denys¹⁹, en 1667, detalla las graves consecuencias de estas transfusiones.

Landois, en 1875, publica dos estadísticas, una de ellas, referente a transfusiones de sangre de animales a seres humanos y, la otra, referida al empleo de sangre humana.

¹⁸ Manual de Criminalística, Albarracín Roberto, Buenos Aires, Policía Federal, Argentina Editorial Policial, 1971, Segunda Edición.

¹⁹ Matemático el cual realizó la primera transfusión sanguínea a un Humano.

Si bien con sangre animal los resultados eran lamentablemente, utilizando sangre humana, los mismos fueron muy diversos. En algunos casos resultaban exitosos, en otros, se producían graves consecuencias.

Las reacciones adversas que habían observado Denys y Landois, eran debidas a la presencia de poderosos anticuerpos naturales. Pero aún debían transcurrir 25 años más, para el gran descubrimiento que explicara los dramáticos fracasos.

Fue durante ese tiempo que los investigadores echaron los cimientos de la inmunología.

En el año 1900. Landsteiner señala que el suero humano normal no sólo aglutina los glóbulos rojos de animales, sino que, en algunos casos, los provenientes de otros individuos.

Posteriormente, Landsteiner²⁰ extrajo sangre a los integrantes del personal de su laboratorio y separó el suero de los glóbulos rojos.

Al poner en contacto cada uno de los sueros con cada una de las muestras de glóbulos rojos, comprobó que en algunos de los casos, se habían aglutinado los glóbulos, mientras que en otros no se observaba aglutinación.

Llegó a la conclusión que existen dos factores en los glóbulos rojos, que designó como aglutinógenos **A** y **B**, también conocidos como antígenos, y que el suero contenía anticuerpos normales o aglutininas.

Landsteiner postuló que cada persona podía poseer en los glóbulos rojos uno de los dos antígenos, ambos o ninguno.

Cuando uno de estos aglutinógenos está ausente en los glóbulos rojos de una persona, su correspondiente aglutinina está presente en el suero.

Por otra parte, cualquiera sea el antígeno que una persona tenga en la superficie de sus glóbulos rojos, los correspondientes anticuerpos faltan en su suero. Es obvio que así

²⁰ En el año 1930 le fue concedido el Premio Nobel de Medicina y Fisiología por el descubrimiento de los grupos sanguíneos en la especie humana.

sea, porque si una persona pudiera tener por ejemplo, antígeno **A** en sus glóbulos y aglutinina **anti A** en su suero, aglutinaría sus propios glóbulos.

7.1.1 Antígenos y anticuerpos en el sistema ABO ²¹

	Grupo O	Grupo A	Grupo B	Grupo AB
Antígenos presentes	H	A	B	A y B
Anticuerpos en el suero	Anti A Anti B	Anti B	Anti A	-----
Su suero aglutina los glóbulos rojos de los grupos	A B A y B	B AB	A AB	-----
Sus glóbulos rojos son aglutinados por el suero de los grupos	-----	B O	A O	A B O

²¹ Tratado de Criminalística Tomo II La Química Analítica en la Investigación del Delito, Ob, cit..

Un individuo del grupo **A** tiene el antígeno **A** en sus glóbulos rojos y el anticuerpo **anti B** en su suero, y un individuo del grupo **B** posee el antígeno **B** en los glóbulos rojos y el anticuerpo **anti A** en su suero. Los individuos del grupo **AB** tienen los dos antígenos **A** y **B** en sus glóbulos y su suero carece de los anticuerpos correspondientes y los individuos del grupo **O** no tienen los antígenos **A** y **B** en la superficie de sus glóbulos pero poseen ambos anticuerpos, **anti A** y **anti B** en el suero.

Para obtener aglutinación, es necesario combinar un aglutinógeno (antígeno) con su correspondiente anticuerpo.

Así, glóbulos rojos que poseen el antígeno **A** serán aglutinados por suero de sangre del grupo **B** o del grupo **O**, por que ambos contienen el anticuerpo **anti A**.

Similarmente, glóbulos que poseen el antígeno **B**, serán aglutinados por sueros provenientes de grupo **A** o del grupo **O** porque en ambos casos se encuentra el anticuerpo **anti B**. Los glóbulos rojos del grupo **AB** pueden ser aglutinados por el suero de cualquiera de los otros tres grupos que contienen uno o los dos anticuerpos correspondientes (**anti A** y/o **anti B**).

Las frecuencias con que los grupos de este sistema se presentan en la población de la ciudad de Buenos Aires son:

GRUPO O = 47,2%

GRUPO A = 39,6%

GRUPO B = 9,6%

GRUPO AB = 3,6%

(ESTADISTICA EFECTUADA SOBRE 1000 MUESTRAS)

Los grupos **A** y **AB** son subdivididos: el primero, en los subgrupos **A1** y **A2** y, el segundo, en los subgrupos **A1B** y **A2B**.

La sangre que posee el antígeno **A2**, reacciona en forma más débil con el suero **anti A**, que la que posee el antígeno **A1**.

En los individuos **A** el antígeno **A1**, es muchos más frecuentes que el **A2**.

Para distinguir entre **A1** y **A2**, puede utilizar una aglutinina **anti A**, de origen vegetal (lectina), que se extrae de las semillas del *Dolichos biflorus*.

Esta lectina aglutina fuertemente los glóbulos **A1** y **A1B**, aún en diluciones elevadas, reacciona débilmente con los glóbulos **A2** y no reacciona con los **A2B**.

Los glóbulos rojos de grupo **O**, contienen el antígeno **H**. Estos glóbulos no son aglutinados por el suero **anti A** ni **anti B**, pero sí por el **anti H**, que es un aglutinina vegetal (lectina) extraída de las semillas del *Ulex europeus*.

Su empleo en la investigación del grupo sanguíneo ABO en manchas secas de sangre, se verá con posterioridad en una de las técnicas recomendadas: absorción – elución.

7.1.2 Aplicación del sistema ABO en la tipificación de manchas de sangre

Generalmente no se presentan problemas en la investigación del grupo sanguíneo ABO en sangre fresca. En cambio, pueden presentarse inconvenientes en el agrupamiento de sangre en casos de manchas secas.

Para tal fin se requieren técnicas especiales, y no siempre es posible llegar a resultado deseado: reconstruir el grupo ABO de la mancha en estudio; es decir, encontrar los aglutinógenos y aglutininas presentes en la misma.

7.1.3 Factores que pueden afectar los resultados

Los factores que van a influir en la posibilidad de obtener un resultado incorrecto son; la antigüedad de la mancha, la naturaleza del sustrato sobre el cual se encuentra, las condiciones a la que estuvo expuesta, cantidad de muestra, etc.

La antigüedad de la mancha es de fundamental importancia en lo que respecta a la investigación de aglutininas. Estas son muy poco estables, por lo que debe encararse su búsqueda en el laboratorio, lo más rápido posible.

Los aglutinógenos en manchas de sangre secas y bien conservadas son, en cambio, muy persistentes.

Son varias las técnicas que se han publicado para la investigación, tanto de aglutininas como de aglutinógenos. Debe enfatizarse que es fundamental para el buen resultado de estos análisis, seguir las instrucciones recomendadas para la recolección y traslado de las muestras al laboratorio.

Con el objeto de desechar interferencias del sustrato sobre el cual se encuentra la mancha, debe realizarse los blancos y ensayos de control pertinentes.

No se deben manipular las muestras con las manos sin guantes, ya que los antígenos del sistema ABO se encuentran, además, en las secreciones: sudor, semen, saliva, lágrimas, etc., en la mayoría de los individuos. Estos son los llamados secretores. Solo un 20% aproximadamente no manifiesta esta propiedad; son los individuos no secretores.

Otro factor importante que puede afectar los resultados, es la contaminación bacteriana de la muestra.

Como se verá, las estructuras químicas de los antígenos **A**, **B** y **H**, no difieren mayormente. Los tres son glicolípidos.

La diferencia se presenta en el hidrato de carbono terminal de la cadena, que es el que confiere la especificidad **A**, **B** y **H**.

La acetilgalactosamina otorga la especificidad **A**, la galactosa, la especificidad **B** y la fucosa, la especificidad **H**.

Una contaminación bacteriana que por acción enzimática altere el hidrato de carbono terminal de estas sustancias, puede traer como consecuencia, resultados erróneos, dado que entre los tres antígenos existe una diferencia estructural pequeña.

7.1.4 Investigación de aglutininas (anticuerpos anti A y anti B), en manchas secas de sangre

Existen dos técnicas que pueden ser empleados para examinar en una mancha de sangre la presencia de aglutininas alfa y beta, o sea anticuerpos **anti A** y **anti B**.

Si se cuenta con una costra delgada de sangre, es recomendable utilizar la técnica de Lattes.

Tales costras están usualmente disponibles cuando la sangre está concentrada en un área y sobre un material no absorbente. De lo contrario se emplea el método extractivo a tubo.

7.1.5 Técnica de Lattes

Consiste en colocar una costra muy pequeña de sangre sobre un portaobjetos y ponerla en contacto con una suspensión de glóbulos rojos conocidos (A, B o O), en solución fisiológica.

Se cubre la preparación con un cubreobjetos, y luego de un tiempo, se examina al microscopio la presencia o ausencia de aglutinación.

La costra a utilizar debe tener un grosor tal que no levante demasiado el cubreobjetos, produciendo en algunas zonas una acumulación de glóbulos que pueda causar una falsa apariencia de aglutinación.

Si la costra es demasiado delgada, la aglutinación puede ser ínfima (dos o tres glóbulos aglutinados), dificultando una lectura fidedigna.

7.1.5.1 Parte Experimental - Reactivos y materiales

- **Solución fisiológica**: 0,85% de cloruro de sodio en agua destilada.
 - **Suspensión de glóbulos rojos A, B y O al 0,25% en solución fisiológica**; glóbulos rojos provenientes de sangre fresca heparinizada, se lavan 3 veces con solución fisiológica. Luego de cada lavado se centrifuga a 1500-1800 rpm durante 2 minutos; se desecha el sobrenadante.
 - Finalmente se suspenden los glóbulos rojos lavados en solución fisiológica, a una concentración del 0,25%.
 - **Cámara húmeda**: caja de plástico transparente que contiene un papel de filtro humedecido con agua, que puede colocarse en el fondo o en la contratapa de la misma.
- Portaobjetos.
 - Cubreobjetos.
 - Microscopio.

Técnica

Se colocan unas escamitas delgadas de sangre en los límites opuestos de un portaobjetos y se marca con un trazo de lápiz de color, el lado izquierdo del mismo.

Sobre las escamas ubicadas en esa posición, se investigará la presencia de aglutininas alfa (**anti A**), agregando para ello una gota de suspensión de glóbulos rojos **A** al 0,25%.

Sobre el lado derecho, con el objeto de investigar aglutininas beta (**anti B**), se agregará una gota de suspensión de glóbulos rojos **B** al 0,25%.

Se coloca luego un cubreobjetos sobre cada una de dichas preparaciones, tratando de evitar la formación de burbujas de aire que puedan dificultar el contacto entre la escama y la suspensión de glóbulos.

En el centro de un segundo portaobjetos, se ubican otras costras de sangre y sobre ellas se adiciona una gota de suspensión de glóbulos O. se coloca un cubreobjetos.

Se dejan las preparaciones en cámara húmeda. Después de unos minutos, se examinan bajo un microscopio (100x).

Si hay aglutininas presentes, éstas difundirán al medio y aglutinarán los glóbulos rojos agregados que contengan el antígeno correspondiente (**anti A** aglutinará glóbulos rojos **A** y **anti B**, glóbulos rojos **B**).

Los resultados que pueden obtenerse en la investigación de aglutininas, que se observan a continuación;

Glóbulos rojos agregados			
O	A	B	Interpretación
Negativo	Negativo	Negativo	Grupo AB (provisorio)
Negativo	Aglutinación	Negativo	Grupo B (o O con beta deteriorada)
Negativo	Negativo	Aglutinación	Grupo A (o O con alfa deteriorada)
Negativo	Aglutinación	Aglutinación	Grupo O (absoluto)

La aglutinación²² es imposible con glóbulos O. Un resultado positivo con los mismos, indicará que tuvo lugar una reacción no específica.

²² Las aglutininas son globulinas de tipo gamma (gammaglobulinas), producidas por las mismas células que producen los anticuerpos frente a antígenos extraños.

Si no se obtienen resultados positivos a los pocos minutos, las observaciones se repiten de tiempo en tiempo, durante 30 minutos, para evitar pasar por alto aglutinaciones débiles.

Es importante tener en cuenta que mientras se examinan las preparaciones al microscopio, los cubreobjetos deben someterse a una débil presión, con una aguja de disección, para hacer desaparecer posibles formaciones de pseudo aglutinación.

Método extractivo a tubo

Se aplica cuando no se dispone de costras de sangre. Si la mancha se encuentra, por ejemplo, sobre madera, la sangre se extrae colocando unas gotas de solución fisiológica sobre la misma, Normalmente la sangre se disolverá en unos minutos. La solución resultante se recoge con una pipeta.

Si la mancha se encuentra sobre un tejido, se corta un trozo y se coloca en un tubo de ensayo. Se agregan unas gotas de solución fisiológica y se ayuda a la disolución, utilizando una varilla de vidrio.

El extracto obtenido en dichos casos se somete luego a una centrifugación breve. El sobrenadante se separa en tres pequeños tubos de ensayos. Al primer tubo se agrega una gota de suspensión de glóbulos **A**; al segundo, una de glóbulos rojos **B** y, al tercero, una gota de glóbulos rojos **O**.

Se colocan los tubos en la heladera por espacio de 10 minutos, aproximadamente. Luego se centrifugan a 1000-1500 rpm durante 2 minutos.

Se extrae el líquido sobrenadante y sobre los glóbulos rojos sedimentados, se agrega una gota de solución fisiológica. Se agitan ligeramente los tubos y se observa si hay aglutinación.

Si los glóbulos rojos se resuspenden, la prueba es negativa. En cambio, si los glóbulos se han aglutinado, la prueba es positiva.

La interpretación de resultados con esta técnica es similar a la efectuada con el método de la costra.

7.1.6 Investigación de aglutinógenos del sistema ABO en manchas secas de sangre

Una vez finalizada la investigación de anticuerpos anti A y anti B (aglutininas alfa y beta) en una mancha de sangre, debe encararse la determinación de aglutinógenos **A** y **B** en la misma.

Esta es una tarea mucho más compleja que en sangre fresca, donde disponiendo de los antisueros **anti A** y **anti B**, puede encontrarse fácilmente el grupo ABO de la muestra. Dado que en la mayoría de las veces en manchas secas, los glóbulos se habrán deteriorado o destruido, perdiendo la capacidad de aglutinación, debe recurrirse a pruebas indirectas para la búsqueda de los antígenos. No obstante la alteración de los glóbulos, los aglutinógenos **A** y **B** retienen durante mucho tiempo, su capacidad de absorber o fijar los correspondientes anticuerpos **anti A** y **anti B**.

El reactivo utilizado en la actualidad pertenece a la marca HEMOCLASIFICADOR REACLON de laboratorio Wiener 2000 Rosario Argentina;

Reactivos para la determinación de grupos sanguíneo ABO

Significación Clínica

A comienzo del siglo pasado, Landsteiner descubrió que los individuos podrían ser agrupados en A, B, AB, u O de acuerdo a la presencia (grupos A, B, o AB) o ausencia (grupo O) de antígenos fuertemente inmunogénicos en la superficie de los grupos rojos. También demostró la existencia de anticuerpos (aglutininas) dirigidos contra los antígenos A y B y que el suero de un individuo no contiene anticuerpos para el antígeno presente en sus propios glóbulos rojos pero sí contra los que no posee. Actualmente se han identificado subgrupos de los grupos A y B.

Todas estas observaciones revelaron la importancia de la compatibilidad ABO en la práctica transfusional.

7.1.6.1 FUNDAMENTO DEL METODO

La determinación de grupos sanguíneos del sistema ABO se efectúa enfrentando los glóbulos rojos del paciente con anticuerpos monoclonales Anti- A, Anti- B o Anti AB. La aglutinación o no de los hematíes ensayados frente a cada uno de los reactivos indica la presencia o ausencia de los correspondientes antígenos.

REACTIVOS PROVISTOS

Anti-A, Anti-B o Anti-AB monoclonal: reactivos preparados a partir de anticuerpos monoclonales de clase IgM secretados por líneas celulares de hibridoma de ratón en una solución tamponada conteniendo 1 g/l de azida sódica como conservante. Los clones involucrados y la colaboración de cada producto se detallan en la siguiente tabla:

NOMBRE DEL PRODUCTO	LINEA (S) CELULAR (S)	COLOR
Anti-A	BIRMA-1	AZUL
Anti-B	LB-2	AMARILLO
Anti-AB	BIRMA-1/ES-4/ES-15	INCOLORO

Estos antisueros se caracterizan por su alta potencia, avidéz y especificidad. Al no ser de origine humano, no existen riesgos de infección por HIV, HBV O HCV.

REACTIVOS NO PROVISTOS

De acuerdo a la técnica empleada puede requerirse adicionalmente:

- Solución fisiológica.
- Solución fisiológica tamponada con buffer fosfatos (PBS) pH 7,0 +/-0,2.
- Solución fisiológica de baja fuerza iónica (LISS).

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Los reactivos se proveen listos para usar. No deben diluirse.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Los reactivos provistos son estables en refrigerados (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar. Períodos prolongados de almacenamiento a temperaturas fuera de ese rango pueden acelerar la pérdida de la actividad de los reactivos.

Evitar los cambios térmicos repetidos y limitar a lo estrictamente necesario la exposición de los reactivos a temperatura ambiente.

En estas condiciones de uso y conservación, los reactivos, después de su apertura, son estables hasta la fecha de expiración indicada en la caja.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Desechar los reactivos cuando se observe contaminación de los mismos. Si bien la azida de sodio se adiciona como bacteriostático, se recomienda inspeccionar los reactivos visualmente antes de usarlos. No deben utilizarse si presentan turbidez. Los reactivos no deben utilizarse si presentan precipitados o partículas.

MUESTRA - Glóbulos rojos o sangre entera:

a) **Recolección:** la sangre debe ser obtenida asépticamente, con o sin anticoagulante.

Puede analizarse sangre obtenida por punción digital para la técnica en placa. Para evitar la coagulación de la sangre al utilizarse esta técnica, se la debe mezclar rápidamente con el reactivo a ensayar.

Para los ensayos con sangre de cordón, los glóbulos rojos deberán lavarse previamente con solución fisiológica.

b) Aditivos: pueden emplearse como anticoagulantes: EDTA, heparina, ACD (ácido cítrico, dextrosa), CPD (citrato fosfato, dextrosa) o CPDA-1 (citrato fosfato, dextrosa, adenina). Puede utilizarse Anticoagulante W de Wiener Lab.

c) Sustancias interferentes conocidas: las muestras que presentan hemólisis o contaminación o contaminación microbiana no deben ser analizadas.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: una vez obtenidos, las muestras deben ser analizadas lo antes posible. Si el análisis no se realiza inmediatamente, conservar las mismas entre 2-10°C. Si se utilizó heparina o EDTA, la tipificación debe llevarse a cabo dentro de las 48 horas de extraídas. Las muestras recogidas con ACD, CPD o CPDA-1 pueden ser ensayadas hasta los 35 días a partir de su extracción. Si se emplean coágulos deberá efectuarse la tipificación dentro de los 7 de obtenida la muestra. La sangre de donantes pueden ser analizada hasta su fecha de vencimiento.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Centrífuga.
- Tubos de hemólisis.
- Placas.
- Palillos mezcladores descartables.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro" y está estrictamente reservado para uso profesional por personal calificado con comprobada competencia en inmunohematología. No utilizar los reactivos fuera de la fecha de vencimiento. La azida

puede reaccionar con las cañerías de plomo o cobre generando compuestos explosivos. Al eliminar el reactivo, se debe dejar correr grandes cantidades de agua.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica. Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

PROCEDIMIENTO: Estos reactivos han sido estandarizados según los procedimientos detallados a continuación; su desempeño en el uso mediante otras técnicas no puede ser garantizado. La suspensión de glóbulos rojos a ensayar debe ser preparada con solución fisiológica, PBS o LISS.

I) TECNICA EN PLACA: Preparar una suspensión de glóbulos rojos al 10%. Como alternativa puede emplearse una suspensión al 35-45 % en plasma del mismo paciente o sangre entera.

1) Colocar en una placa limpia y rotulada, una gota de Reactivo Anti-A, Anti-B o Anti- AB monoclonal y agregar al lado 1 gota de suspensión de glóbulos rojos.

El gotero provisto dispensa un volumen de 50+/-5 ul. Es importante que se mantenga la relación reactivo: células en todos los sistemas de ensayo.

2) Mezclar el Reactivo y los glóbulos con un palillo descartable cubriendo un área circular de 2 cm de diámetro y balancear la placa continuamente durante 2 minutos. Observar aglutinación visible macroscópicamente hasta los 2 minutos. La observación puede facilitarse si se emplea una fuente de luz difusa. No debe emplearse microscopio.

La prueba debe ser interpretada dentro de los 2 minutos para evitar que el reactivo se seque por evaporación. Cuando se observa aglutinación débil debe repetirse la prueba utilizando la técnica en tubo (por centrifugación). Pueden agregarse 2 volúmenes de reactivo a 1 volumen de muestra para resaltar la aglutinación, sin riesgos de falsos positivos.

II) TECNICA EN TUBO (por centrifugación):

1) A una gota de Reactivo Anti-A, Anti-B o Anti- AB monoclonal colocado en un tubo de hemólisis rotulado, agregar 1 gota de suspensión de glóbulos rojos al 3-5%.

2) Mezclar y centrifugar 20 segundos a 1000 g.

3) Agitar el tubo para despegar las células y examinar macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación. La observación puede facilitarse si se emplea una fuente de luz difusa.

III) TÉCNICA EN TUBO (por sedimentación):

1) A una gota de Reactivo Anti-A, Anti-B o Anti-AB monoclonal colocada en un tubo de hemólisis rotulado, agregar 1 gota de suspensión de glóbulos rojos al 3-5%.

2) Mezclar e incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente.

3) Agitar el tubo para resuspender las células y examinar macroscópicamente la aglutinación. La observación puede facilitarse si se emplea una fuente de luz difusa. Las reacciones en tubo deben ser leídas inmediatamente e interpretar los resultados sin demora.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

• Técnica en placa

Reacción Positiva: los hematíes aglutinan en segundos y permanecen aglutinados al balancear la palca. Indica la presencia del antígeno eritrocitario correspondiente.

Reacción Negativa: no se observa aglutinación a los 2 minutos, indicando ausencia del antígeno correspondiente.

• Técnica en Tubo

Lectura: golpear suavemente el tubo para desprender el sedimento y examinar macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación.

Reacción Negativa: no se observa aglutinación a los 2 minutos, indicando ausencia del antígeno correspondiente. La resuspensión de los glóbulos rojos es homogénea.

Reacción Positiva: los hematíes aglutinan en segundos y permanecen aglutinados una vez resuspendidos. Indica la presencia del antígeno eritrocitario correspondiente.

En casos dudosos se recomienda esperar 2 minutos. Todos los resultados obtenidos en las pruebas de glóbulos rojos (directas), excepto las realizadas sobre las muestras de sangre de infantes, deben ser confirmadas por una prueba sobre suero (inversa), usando eritrocitos tipificados A₁, A₂, B y O. En la siguiente tabla se muestran los perfiles esperados:

PRUEBA DIRECTA (GLOBULOS SROJOS)			PRUEBA INVERSA (SUERO)				GRUPO
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Cél.A1	Cél.A2	Cél.B	Cél.O	
-	-	-	+	+	+	-	O
+	-	+	-	-	+	-	A
-	+	+	+	+	-	-	B
+	+	+	-	-	-	-	AB

Cualquier discrepancia entre las pruebas directa e inversa debe ser investigada y resuelta antes de informar el grupo sanguíneo.

METODO DE CONTROL CALIDAD²³

El control de calidad puede efectuarse ensayando glóbulos rojos tipificados. Debe realizarse un control de los reactivos al comienzo de cada jornada de trabajo con glóbulos rojos A₁, A₂, B y O.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Pueden obtenerse resultados erróneos debido a:

- Contaminación de los materiales empleados en la prueba.
- Temperatura incorrecto de incubación.
- Reducción del tiempo de incubación recomendado.
- Neonatos: los antígenos A y B no se encuentran totalmente expresados en el recién nacido. Por esta razón deben extremarse los cuidados, sobre todo en los prematuros.
- La reactividad Anti-A y Anti-B puede verse reducida y eventualmente estar ausente del suero o plasma de pacientes muy jóvenes, adultos mayores o inmunosuprimidos.
- Leucemias u otros desórdenes malignos.
- Pacientes recientemente transfundidos con cantidades sustanciales de sangre de grupo o idéntico, pueden mostrar una reacción serológica de campo mixto.
- Reacciones falsas positivas: se han observado problemas ocasionados en la tipificación de los grupos sanguíneos ABO debido a anticuerpos que reaccionan con drogas, colorantes, compuestos químicos o con partículas de sílica coloidal liberadas de vidrios de mala calidad.
- Aglutininas frías: en presencia de aglutininas frías, el lavado de los glóbulos rojos 4-6 veces con solución fisiológica, resulta generalmente suficiente para obtener células

²³ **Trabajo de Método de Determinación de Antígenos de Grupos en Manchas Secas**, Boletín Informativo Nro. 1, Superintendencia de Policía Científica La Plata, 09 de Mayo de 2006, 17 p

aptas para la tipificación. En muy raras ocasiones se requiere un calentamiento a 37°C durante 10 minutos antes de los lavados mencionados. Como control, se coloca una gota de estas células con 2 gotas de solución fisiológica. No debe producirse aglutinación.

- Las pruebas lámina no están recomendadas para la determinación de subgrupos débiles.

- Si se emplea la técnica en tubo, una agitación excesiva puede disgregar las aglutinaciones débiles y producir resultados falso -negativo.

- Es importante emplear la fuerza g recomendada durante la centrifugación, ya que una excesiva centrifugación puede conducir a dificultades para resuspender el botón celular, mientras que una centrifugación suficiente puede resultar en aglutinaciones que se disgregan con demasiada facilidad.

- La expresión de algunos antígenos eritrocitarios puede disminuir en intensidad durante el almacenamiento; especialmente en aquellas muestras coaguladas o extraídas con EDTA. Los mejores resultados se obtienen con muestras frescas.

Los métodos que se emplean para la investigación de los nombrados aglutinógenos son: el método de **absorción-inhibición** que es el más antiguo y, el más reciente, de **absorción-elución**.

Este último es de mayor sensibilidad, requiriendo menor cantidad de muestra. Basta un trozo de hilo de 5 mm de longitud, manchado con sangre, para investigar cada uno de los aglutinógenos.

7.1.7 MÉTODO DE ABSORCIÓN- INHIBICIÓN²⁴

Este método que se emplea para la investigación de aglutinógenos en mancha secas de sangre, puede aplicarse en forma similar para detectar los antígenos en estudio, en otras manchas biológicas. Se obtienen buenos resultados en manchas de semen, saliva (colillas de cigarrillos), sudor, etc., de individuos secretores.

²⁴ Tratado de Criminalística Tomo II La Química analítica en la Investigación del Delito, Ob, cit..

Si un antisuero de título conocido, se agrega a una mancha de sangre y luego de un tiempo determinado se titula nuevamente, podremos observar si su título disminuyó o se mantuvo.

En el primer caso, la disminución del título indicará la presencia en la mancha de sangre del aglutinógeno respectivo. Si el título del anti A disminuyó netamente, se comprobará la existencia del antígeno A en la muestra. Análogamente, si disminuyó el título del anti B, se encuentra presente el antígeno B.

Si por otra parte el título de los antisueros se mantuvo, no existen en la mancha los antígenos respectivos (ni A ni B).

Holzer fue uno de los pioneros en la determinación de aglutinógenos del sistema ABO en manchas. Su técnica ha sido utilizada durante años y, posteriormente, perfeccionada por diversos autores.

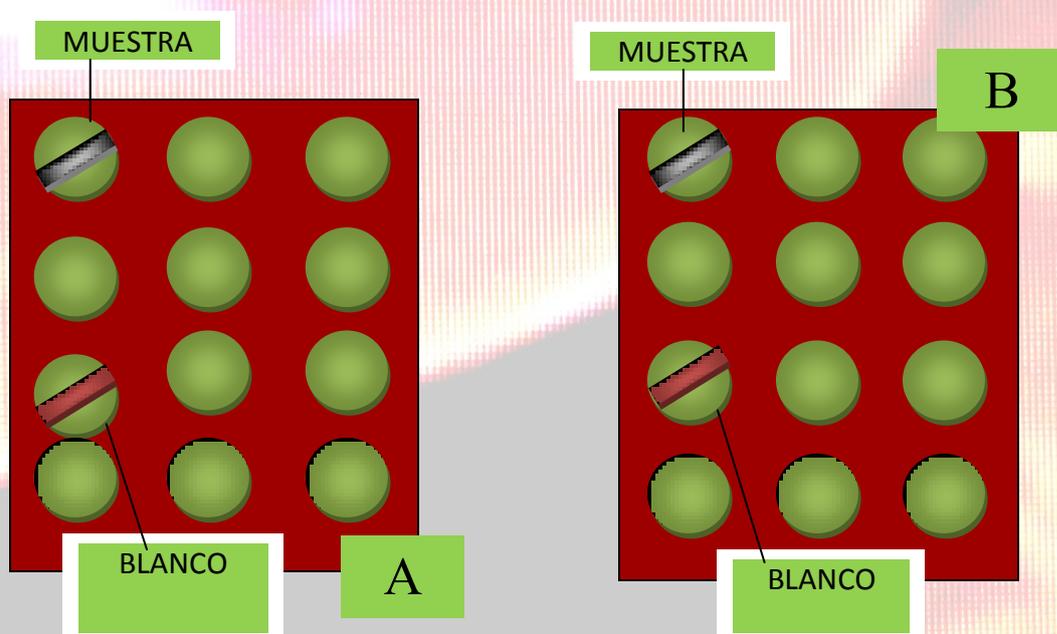
La investigación de aglutinógenos A y B puede efectuarse aproximadamente en dos horas, si se dispone de un mancha de sangre sobre tela o diversos objetos, en cantidad equivalente a una pequeña gota de sangre fresca.

7.1.7.1 Parte Experimental - Reactivos y materiales

- Antisueros anti A y anti B.
- Solución fisiológica (0,85% p/v de cloruro de sodio).
- Dos poliquetas de Kline (con doce concavidades cada una). Agujas de disección para trizar el material.
- Suspensión de glóbulos rojos A y B al 1,5% en solución fisiológica, provenientes de sangre fresca heparinizada y previamente lavados (tres veces), con solución fisiológica.
- Micropipetas.
- Cámara húmeda (ya descripta previamente).
- Lupa binocular o microscopio (con bajo aumento).

Técnica

- a) Se corta un centímetro cuadrado de la tela manchada a investigar y se divide en dos porciones iguales.
- b) Se corta un trozo de 1 cm² de la zona no manchada de la tela, para usar como blanco y se divide en dos trozos como antes.
- c) Se coloca cada trozo de muestra y blanco en la placa de Kline, según la disposición que se detalla en el esquema.



Las policubetas se marcan "A" y "B", con lápiz dermatográfico, para saber con que antisueros se debe tratar cada muestra y el blanco, en ambas placas. Para evitar mezclas entre las excavaciones al agitar, es conveniente haber pasado un pincel con parafina fundida entre las mismas.

- d) Se preparan soluciones de trabajo de los antisueros A y B de título 1/32, diluyendo convenientemente el antisuero original.
- e) Se colocan dos gotas de antisuero A, preparado anteriormente sobre cada trozo de tela (muestra y blanco) en la policubeta "A". Lo mismo se hace en la policubeta marcada como "B", con el antisuero B.

f) Se trizan los géneros con la agujas de disección para asegurar un buen contacto fibra-antisuero: se hace en ambas placas, cambiando siempre las agujas y empezando por la tela blanco.

g) Se colocan las placas de cámara húmeda y se mantienen una hora a temperatura ambiente.

h) Una vez transcurrido ese tiempo, se retitula al antisuero resultante del contacto tela- antisuero, procediendo así:

Se agrega una gota de solución fisiológica en cada una de las diez concavidades restantes de cada policubeta.

Se toma una gota de la solución antisuero que estuvo en contacto con la muestra se agrega a la concavidad de la derecha. Se mezcla por succión y descarga cuatro o cinco veces.

Se toma una gota de esta mezcla y se agrega a la concavidad de la derecha, se mezcla, se toma una gota de esta última y se agrega a la concavidad siguiente, procediendo de la misma forma en adelante hasta la sexta concavidad (dilución 1/32). Se descarta una gota de la última concavidad.

Se lava la micropipeta con solución fisiológica y se repite el proceso anterior con el antisuero resultante del contacto de tela blanco- antisuero. Se procede de igual manera con la policubeta "B".

i) Se agrega a la palca "A" una gota de suspensión de glóbulos rojos A al 1,5%. Se le hace lo mismo con la placa "B", utilizando en este caso glóbulos B. La suspensión de glóbulos se agrega a todas las concavidades, con excepción de las que contienen tela.

j) Se colocan las policubetas en cámara húmeda y se dejan a temperatura ambiente durante 30 minutos, previa agitación 1 a 2 minutos, observando cada 10 minutos, si se ha producido aglutinación.

k) La ausencia de aglutinación en el caso de la muestra o una disminución en el título del antisuero de por lo menos tres lugares con respecto al blanco, indicará la

presencia e la mancha problema del aglutinógeno correspondiente. La observación de la aglutinación se hará mediante lupa binocular o microscopio de bajo aumento.

Las diferencias de tan solo un lugar carecen de significado.

Observaciones

El material a usar debe estar perfectamente limpio y seco; si es posible, esterilizado.

Las manchas y los blancos deben ser tratados con la cantidad exacta de dilución de antisuero; pues si es mucho, no se observará disminución del título por exceso de antisuero y, si es poco, no se puede recuperar de la tela húmeda la cantidad necesaria.

Al hacer la dilución del antisuero, después de la absorción, se debe tener especial cuidado, dado que pequeños errores al comienzo se magnifican al final.

El método debe tener concordancia con el de aglutininas, que se supone ya realizado, como para poder dar un resultado con intachable valor real.

7.1.8 MÉTODO DE ABSORCIÓN-ELUCIÓN²⁵

Se utiliza ampliamente para la tipificación de manchas secas de sangre, en el sistema ABO, MN y Rh.

Se aplicará en primer lugar, para investigar los aglutinógenos del sistema ABO²⁶.

El método de absorción-elución es altamente sensible y confiable aun en manchas antiguas. Por esta técnica, pequeñas muestras del material manchado con sangre, se ponen en contacto con antisueros específicos (anti a, anti B y anti H), durante un tiempo suficiente para que se forme el complejo antígeno-anticuerpo.

En una segunda etapa, el material manchado se lava cuidadosamente con solución fisiológica, para eliminar todos los anticuerpos no fijados a la mancha.

²⁵ Tratado de Criminalística Tomo II La Química analítica en la Investigación del Delito, Ob, cit..

²⁶ Manual de Química Forense, Patricia Caro, Editorial Rocca, 2007.

Luego se realiza la disociación del complejo antígeno-anticuerpo, por calentamiento de 50°C, durante 15 minutos. En este proceso, conocido como elución, se rompe el complejo formado inicialmente y se liberan los anticuerpos.

Por último, se agregan glóbulos rojos de grupo conocido. Si se produjo elución de anti a, se aglutinarán los glóbulos rojos A. De la misma manera, se aglutinarán los glóbulos rojos B o glóbulos rojos O si se eluyeron anti B o anti H, respectivamente.

Si los anticuerpos se eluyeron, es evidente que los respectivos antígenos existían originalmente en la mancha.

Todos los anticuerpos no fijados por la muestra se habrán eliminado en la etapa de lavado.

7.1.8.1 Parte experimental -Reactivos y materiales

- **Sueros anti A y Anti B:** Normalmente empleados para la determinación del grupo sanguíneo ABO en sangre fresca, deben titularse antes de su empleo. Título sanguíneo: 1/32.

- **Anti H:** Preparación del mismo;

a) Se muelen 10 gramos de semillas de *Ulex europeus* (adquiridas en determinados comercios), en un molinillo.

b) Se mezclan con 100 ml de solución fisiológica y se deja a 4°C durante 3 ó 4 días.

c) Se pasa el extracto a través de un filtro de tela para eliminar las partículas gruesas y luego se centrifuga (1500 rpm durante 5 minutos).

d) Se toma el sobranante y se flocula por calentamiento en baño de agua a 60°C durante 30 minutos se enfría y se centrifuga a 2.00 rpm durante 10 minutos. Debe quedar una solución límpida.

e) Se ensaya el sobrenadante con glóbulos A, B y O. Debe obtenerse una reacción negativa con glóbulos A y B y fuertemente positiva con glóbulos rojos O. Con estos últimos se prueba el título. Para poder utilizarlo en la tipificación de manchas secas,

se requiere un título de por lo menos 1/32. Usualmente es posible obtener títulos de 1/64 ó 1/128.

- Manchas control A y B, AB y O.

- Solución fisiológica.

- **Albúmina bovina**: preparar una solución al 0,3%, en solución fisiológica.

- **Glóbulos rojos indicadores A, B y O**: Glóbulos rojos A, B y O provenientes de sangre fresca heparinizada; se lavan tres veces con solución fisiológica. Se prepara, a partir de los mismos, suspensiones de color rosado pálido (aproximadamente 0,1%), en albúmina bovina al 0,3% en solución fisiológica.

- **Adhesivo de acetato de celulosa**: se disuelve acetato de celulosa en la cantidad necesaria de acetona, como para obtener una solución de viscosidad adecuada. Debe ser lo suficientemente viscosa como para no ser absorbida por el hilo de muestra y lo suficientemente fluida como para evitar dificultades en la manipulación.

- **Hojas de policarbonato**: son hojas plásticas de 10 cm x 15 cm y de 1 mm aproximadamente de espesor.

- Papel de filtro.

- Micropipetas con tetina de goma.

- Agitador.

- Cámara húmeda de 12 cm x 19 cm (ya descrita).

- Estufa a 50°C.

- Microscopio.

Técnicas

Técnica a aplicar para manchas sobre superficies absorbentes (por ejemplo, un tejido).

a) Con lápiz de color se marcan en la hoja de policarbonato cuadrados de aproximadamente 1,5 cm. de lado. Se rotula la hoja como se indica en la figura.

b) Se practican en la zona manchada, 2 cortes paralelos a una distancia entre sí de 5 a 8 mm, y un corte transversal entre los primeros para tomar los hilos que se usarán como muestra (M).

c) Casi en el centro de cada cuadrado, ligeramente desplazado hacia el ángulo inferior izquierdo se coloca una gota del adhesivo acetato de celulosa.

Mediante una pinza se toman los trozos de hilo (blanco o muestra) y se insertan por un extremo, dentro de la gota adhesivo, en el cuadrado correspondiente de la hoja de policarbonato.

La longitud óptima del hilo emergente debe ser entre 2 y 5 mm, tanto mayor cuanto más delgado es el hilo esté más débilmente manchado.

d) Se deja la hoja al aire hasta que el adhesivo se endurezca (10-15 minutos): luego se adiciona una gota del antisuero apropiado, sobre el hilo asegurándose que éste quede sumergido.

En la columna rotulada anti A, se agrega sobre cada hilo una gota de suero anti A para investigar la presencia del antígeno A, en la columna anti B, una gota del anti H para la investigación del antígeno H.

e) Se coloca la hoja plástica en la cámara húmeda y se deja a 4°C, por lo menos durante tres horas. Si es posible, es preferible dejar en contacto con los antisueros durante toda la noche.

f) Se lava la hoja cuidadosamente mediante una piseta, con solución fisiológica a 4°C, para eliminar el excedente del antisuero agregado. Se seca la hoja con papel de filtro y luego se sumerge en una cuba plástica que contiene solución fisiológica a 4°C, durante 30 minutos. Se agita la solución durante este lapso.

	ANTI A	ANTI B	ANTI H		ANTI A	ANTI B	ANTI H
M1				CONTROL A			
B1				CONTROL B			
M2				CONTROL AB			
B2				CONTROL O			

Lo mismo se efectúa en la tela sin mancha, para utilizar como blanco (B). Von los controles se procede de manera similar.

g) Se retira la hoja de cuba con solución fisiológica, se seca con papel de filtro y se coloca nuevamente en la cámara húmeda. -

Se agrega sobre cada trozo de hilo una gota de la suspensión de glóbulos rojos apropiados: glóbulos AA a los hilos tratados con anti A; glóbulos rojos B a los tratados con anti B y glóbulos rojos O a aquellos tratados con anti H.

h) Se tapa la cámara húmeda y se coloca en una estufa a 50°C durante 15 minutos. En este período se produce la elución del anticuerpo, si éste fue previamente fijado.

i) Se retira la cámara de la estufa y se agita en un agitador a baja velocidad, a temperatura ambiente, durante 30 minutos, tiempo durante el cual tendrá lugar la aglutinación.

j) Se observan si se produjo aglutinación empleando el microscopio.

Técnica para manchas sobre superficie no absorbente

- Se corta un trozo de hilo de 1 a 1,5 cm de largo, de una tela de algodón blanca y limpia y se humedece con agua destilada.

- Se toma el hilo con una pinza y se pasa sobre la mancha de sangre para su absorción.

- Se toma un control de la zona no manchada próxima a la mancha, utilizando un trozo de hilo de longitud similar.

- Se colocan los hilos en tubos rotulados o cajas de Petri abiertas y se dejan en estufa a 50°C, por lo menos durante 30 minutos.

- Se retiran de la estufa y se fijan sobre la hoja de policarbonato. Se procede como en el caso de una mancha sobre un tejido.

Controles a realizar en cada determinación

Es adecuado verificar el buen comportamiento de los antiseros empleados. Se recomienda ensayar los sueros anti A, anti B y la lectina anti H, utilizando sangre conocida A, B, AB y O.

Estos controles pueden realizarse en la misma hoja de policarbonato donde se procesan las muestras, como se indica en la figura detallada. Si la cantidad de muestras es elevada, puede utilizarse para los controles otra hoja de policarbonato, procesando las dos hojas simultáneamente.

Los resultados correctos de las muestras control se muestran en la figura a continuación:

MUESTRA	ANTI A (A)	ANTI B (B)	ANTI H (O)
A			
B			
AB			
O			

7.2. Sistema MN²⁷

Generalidades

Realizada la investigación del sistema ABO, se continúa con la identificación de otros antígenos de los glóbulos rojos.

Los antígenos del sistema MN y los del sistema Rh han recibido en los últimos años, especial atención de los laboratorios forenses.

Los primeros fueron puestos de manifiesto en el año 1927 por Landsteiner y Levine. En este sistema se distinguen tres grupos sanguíneos. Los mismos son el MN, el M y el

²⁷ Tratado de Criminalística Tomo II La Química Analítica en la Investigación del Delito, Ob, cit..

N. Su frecuencia en la población blanca europea es de alrededor del 50% para el MN, del 30% para el M y 20% para el N.

Este sistema es independiente del ABO y del Rh. La presencia de los antígenos correspondientes al sistema ABO.

En general los antígenos M y N no son detectables después de 4 a 6 semanas de antigüedad de la mancha. El N es el menos estable.

En la práctica es esencial seleccionar cuidadosamente los antisueros adecuados. En ensayos realizados con sueros anti M, en un 50% dieron resultados correctos. En cambio, de los sueros anti N ensayados solo resultaron eficaces un 10%.

Los riesgos son mucho más serios al tratar de detectar el antígeno N en una mancha MN. Dada la mayor efectividad como antisuero del anti M con respecto al anti N, en una mancha, podría ocurrir que se detectase M pero no N.

Además se presenta problemas de reacciones cruzadas y es posible encontrar en individuos pertenecientes al grupo M, una cierta actividad residual N.

Al seleccionar el suero, es también necesario determinar el tiempo óptimo para la absorción, como así también la temperatura óptima.

Algunos requieren absorción durante toda la noche. Otros, un máximo de por ejemplo, tres horas.

Algunos sueros son más específicos cuando se absorben a temperatura ambiente y otros requieren 4°C.

Es necesario incluir controles con manchas de los tres grupos. Los resultados obtenidos con manchas desconocidos pueden considerarse seguros, si las reacciones realizadas con manchas control son completamente satisfactorias.

En ciertas ocasiones, aun cuando el grupo de la mancha no pueda ser establecido en forma definitiva, se puede excluir la posibilidad de que provenga de un cierto individuo.

Por ejemplo, si una mancha da una neta reacción positiva para M y débil para N, podría provenir de un individuo M o MN, en la cual quizá por su antigüedad, N reacciona

muy débilmente. Pero puede descartarse que la persona de la cual proviene la sangre de la mancha, pertenezca al grupo N, con lo cual se excluye 1/5 de la población.

En vista de lo expuesto, la interpretación de los resultados requiere considerable experiencia y debe hacerse con cautela. Las manchas diluidas no serán adecuadas para la tipificación y tampoco aquellas que estén contaminadas con semen, saliva, etc.

El método empleado para determinar el grupo dentro del sistema MN, es el de absorción-elución, similar en sus diferentes etapas al utilizado para investigar los antígenos del sistema ABO. También es semejante la cantidad de muestra requerida.

7.2.1 Método de absorción-elución para investigar los aglutinógenos del sistema MN

Parte Experimental- Reactivos y materiales

- Sueros anti M y anti N, especialmente seleccionados.
- **Glóbulos rojos indicadores M y N**: se preparan a partir de sangre fresca M y N, respectivamente. Se procede de manera similar a la indicada para la preparación de glóbulos rojos indicadores del sistema ABO (método de absorción-elución).
 - Manchas control M, N y MN.
 - Cámara húmeda.
 - Hojas de policarbonato.
 - Adhesivo acetato de celulosa.
 - Agitador.
 - Estufa a 50°C.
 - Microscopio.

Técnica para manchas sobre superficies absorbentes

a) Se dibujan en la hoja de policarbonato, cuadrados de 1,5 cm de lado, con lápiz de color. Se designan a las columnas segunda y tercera, anti M y anti N respectivamente.

En las mismas se investigaran los antígenos M y N tanto en las muestras como en los controles.

b) Se toman dos hilos de 5 a 8 mm de largo a partir de la mancha y dos hilos de la zona próxima no manchada que se usará como blanco. Se insertan sobre la hoja plástica como en el método ABO.

c) Se toman hilos de la mancha de sangre control de los tipos M, N y MN. Se adhieren a la hoja de policarbonato de la misma manera que se hizo con la muestra. El esquema de la hoja se observa en la siguiente figura.

	ANTI N	ANTI M		ANTI N	ANTI M
M1			CONTROL M		
B1			CONTROL N		
M2			CONTROL MN		
B2					

d) Se deja que el adhesivo se endurezca (alrededor de 10 minutos) y se agrega suero anti M en las columnas M, y suero anti N en las columnas N.

e) Se coloca la hoja en la cámara húmeda y se deja a la temperatura óptima seleccionada para los antisueros, durante toda la noche, generalmente, a temperatura ambiente.

f) Se lava para eliminar todo el antisuero no absorbido, como en el método ABO.

g) Se retira la hoja de la solución fisiológica fría, se seca, etc., de la misma manera que en el método para ABO.

h) Se agrega una gota de suspensión de glóbulos rojos M a cada hilo originalmente expuesto al anti M y una gota de suspensión de glóbulos rojos N a cada hilo expuesto al anti N.

i) Se realiza la elución como en el caso ABO.

j) Se coloca la cámara húmeda sobre un agitador durante 30 minutos, como para el agrupamiento ABO.

k) Se observa si se produjo aglutinación, lo que evidencia la presencia del aglutinógeno M y/o N en las muestras respectivas.

Técnicas para manchas sobre superficies no absorbentes

Debe realizarse de la misma manera que para el agrupamiento en el sistema ABO.

7.3. Sistema Rh

Generalidades

En el año 1939, Levine, uno de los discípulos de Landsteiner, publicó su hallazgo respecto al comportamiento del suero de una paciente del grupo O; que recibió una transfusión de sangre de su esposo, también del grupo O.

La mujer acababa de llevar a término su embarazo, dando a luz un feto muerto. Como requería una transfusión, pareció lógico que recibiera sangre de su esposo, compatible desde el punto de vista de sistema ABO. Sin embargo, se produjo una seria reacción de rechazo.

Cuando Levine y sus colaboradores examinaron el suero de la paciente, comprobaron que a 37°C, no sólo aglutinaba los glóbulos rojos del esposo, sino también un 85% de muestras de sangre provenientes del grupo O, elegidas al azar.

Era evidente que en el suero de la mujer se había producido un anticuerpo específico contra un antígeno presente en los glóbulos rojos de su esposo.

Los investigadores se preguntaron como había ocurrido la inmunización de la mujer. Llegaron a la conclusión de que el antígeno presente en los glóbulos rojos del esposo había sido transmitido genéticamente al hijo, y que los glóbulos rojos fetales, portadores de dicho antígeno, al introducirse en la circulación materna, fueron los causantes de la formación del anticuerpo específico.

Esta teoría será confirmada mas tarde, con el descubrimiento del factor Rh. La mujer era Rh negativa y su esposo Rh positivo. El niño que nació muerto era Rh positivo y su antígeno Rh provocó la inmunización de la madre que elaboró anticuerpos anti Rh.

Cuando se transfundió a la paciente la sangre de su esposo, el anticuerpo anti Rh se fijó sobre los glóbulos rojos y su destrucción provocó los graves síntomas observados en la mujer.

En la misma época en que se produjo el caso recién comentado. Landsteiner y Wiener estaban estudiando los anticuerpos producidos en conejos inmunizados con glóbulos rojos de monos *Macaccus Rhesus*.

En 1940, informaron que el suero de los conejos aglutinaba no sólo los glóbulos del mono Rhesus, sino también, los glóbulos rojos de aproximadamente el 85% de los seres humanos de raza blanca.

En el mismo año, Wiener y Peters pusieron de relieve una similitud ente la especificidad del anticuerpo animal y el anticuerpo hallado en el suero de tres pacientes

que habían experimentado reacciones transfusionales, los anticuerpos de procedencia animal y humana reaccionaron con los mismos glóbulos rojos.

Como consecuencia de esa similitud, se llamo Rh al antígeno correspondiente presente en la superficie de los glóbulos rojos de la mayoría de los seres humanos y anti Rh al anticuerpo, siendo Rh el símbolo formado con las dos primeras letras del Rhesus.

Los individuos que tiene el antígeno Rh se denominan Rh positivos y los que no lo tienen Rh negativos.

A medida que se avanzaba en la búsqueda de métodos para detectar anti-Rh (posteriormente también anti D), fueron hallados otros anticuerpos que daban reacciones similares pero no iguales a anti D. En 1945 habían sido descritos 5 anticuerpos relacionados: anti D, anti C, anti E, anti c y anti e.}

Los antígenos respectivos D, C, E, c y e, constituyen el sistema sanguíneo Rh. Estos antígenos se hallan también como en el caso de los sistemas ABO y MN, sobre la superficie de los glóbulos rojos, siendo todos ellos hereditarios.

Genética

En los núcleos de las células de los individuos existen dos series de cromosomas. Una serie es de origen paterno y la otra, materna.

Para Fisher y Race, los antígenos del sistema Rh están determinados por tres pares de genes alelomorficos C-c, D-d, E-e, encontrándose en cada serie cromosómica uno solo de cada par.

En un par de cromosomas homólogos estos genes pueden ser iguales o tratarse de un gen y su forma alternativa denominada alelo C es alelo de c, D de d y E de e.

Si en el par de cromosomas homólogos, los dos alelos son iguales, por ejemplo c y c o C y C, el individuo es homocigota con respecto a ese gen. Si en cambio, uno de los alelos es c y el otro es C, el individuo es heterocigota.

Según la concepción de Fisher y Race, los tres genes del sistema Rh se hallan muy juntos en el cromosoma respectivo, tanto en el de origen materno como en el origen

paterno. No se agregan independientemente uno de otro. Para Wiener, se hallan tan cerca que se confunden en uno.

La combinación de los genes recibidos del padre y los recibidos de la madre, constituyen el genotipo.

Los genes de este sistema determinan la aparición de los respectivos aglutinógenos sobre la superficie de los glóbulos rojos.

La presencia de cada uno de los antígenos en los glóbulos rojos, excepción hecha del d, puede ser reconocida utilizando antisueros específicos. El anti d todavía no se conoce.

Debido a las concepciones diferentes de Fisher- Race y Wiener, se emplean dos nomenclaturas para la expresión de los resultados.

Para Fisher- Race, existen ocho conjuntos de tres genes, cada uno y, para Wiener, ocho genes alelomorfos complejos.

A continuación se dan las equivalencias entre ambas expresiones²⁸.

Rh POSITIVO		Rh NEGATIVO	
Fisher- Race Genes	Wiener Genes	Fisher- Race Genes	Wiener Genes
cDe	Ro	cde	r
CDe	R1	Cde	r1
cDE	R2	cdE	r2
CDE	Rz	CdE	ry

Aplicación del sistema Rh a la tipificación de manchas de sangre seca.

En el caso de sangre fresca, si se dispone de los antisueros respectivos, la determinación del grupo dentro del sistema Rh no ofrece problemas.

²⁸ Manual de Química Forense, Ob, cit..

En cambio, en el caso de sangre seca, el análisis es mucho más complicado. Se requiere disponer de suficiente cantidad de sangre, y es fundamental que la antigüedad de la muestra no exceda de un mes.

Cuanto más reciente es la mancha y mejor conservada se encuentre, es más probable que se pueda hallar el fenotipo de la misma dentro del sistema Rh. En este sistema son cinco los aglutinógenos que se ponen en evidencia, empleando antisueros específicos.

Mediante estudios de herencia llevados a cabo sobre gran número de familias, se comprobó que de las múltiples combinaciones posibles de estos antígenos para constituir el genotipo, sólo nueve de ellas se presentan con frecuencias significativas;

Las mismas son: CDe/cde, CDe/CDe, cde/cde, CDe/cDE, cDE/cde, cDE/cDE, cDe/cDe, cdE/cde, Cde/cde. Sus frecuencias se encuentran en el cuadro siguiente:

Genotipo Fisher-Race	Orden	C	c	D	E	e	%	Genotipo Wiener
Cde/cDE	4	+	-	+	+	-	13,34	R1R2
Cde/cde	1	+	-	+	-	-	4,89	R1r
Cde/Cde	2	+	-	+	-	-	18,50	R1R1
Cde/cde	9	+	-	-	-	-	0,76	R ^{rr}
cDE/cde	5	-	-	+	+	-	11,75	R2r
cDE/cDE	6	-	-	+	+	-	2,33	R2R2
cDe/cDe	7	-	-	+	-	-	2,06	Ro
cdE/cde	8	-	-	-	+	-	0,92	R ^{rr}
Cde/cde	3	-	-	-	-	-	15,10	rr

El hecho que una mancha pueda corresponder a una de las nueve combinaciones aumenta la probabilidad de discriminación. Es decir, dos manchas de diferente procedencia, cuyos grupos coinciden dentro del sistema ABO y quizá también dentro del sistema MN, es menos probable que coincidan dentro del sistema Rh, dadas las nueve combinaciones diferentes del mismo.

La determinación de los antígenos del sistema Rh en manchas secas puede realizarse con el mismo método de absorción-elución, que se utiliza para el sistema ABO y MN, pero con algunas variantes.

La cantidad de muestra de sangre requerida es mayor, dada la menor concentración de sitios antigénicos en la membrana de los glóbulos. La temperatura óptima para la absorción del antisuero es 37°C.

Por otra parte, el lavado para eliminar el antisuero no absorbido, debe ser aun más cuidadoso y exhaustivo.

La elución debe hacerse en ausencia de los glóbulos rojos, porque requiere una temperatura alta durante un tiempo prolongado. En esta exposición a 60°C, los glóbulos rojos pierden su capacidad de aglutinación frente a antisueros específicos.

Como se utilizan anticuerpos incompletos, que nos capaces de aglutinar directamente los glóbulos rojos correspondientes en solución salina, es necesario un tratamiento enzimático previo de los mismos con papaína. Esta modifica la superficie de los glóbulos rojos y contribuye a disminuir su carga eléctrica, favoreciendo la aglutinación.

Por otra parte, factores tales como el calor, luz solar directa, humedad, e malaje inadecuado y la antigüedad de la mancha que, como ya se indicó, no debe superar el mes, pueden disminuir la posibilidad de llegar a un resultado correcto en la investigación de este sistema.

7.3.1. Parte experimental - Reactivos y materiales

- Sueros anti C, anti c, anti E y anti e.
- Solución fisiológica.
- **Albúmina bovina**: se prepara al 1,5% en solución fisiológica.

- Papaína.
- Buffer para la papainización de los glóbulos rojos indicadores (pH=7,3):
 - KH₂PO₄ 2,27 g.
 - Na₂HPO₄·12H₂O 12,682 g
 - Agua destilada 1 litro

- Glóbulos rojos indicadores R1R2 (Cde/cDE) al 1-2%, en solución fisiologica, previamente papainizados:

- a) Se lavan los glóbulos R1R2 tres veces con solución fisiologica.
 - b) Se prepara una solución de papaína con:
 - 1,8 ml de buffer pH 7,3
 - 0,2 ml de solución fisiologica
 - 2,0 mg de papaína
 - c) A un volumen de glóbulos rojos recién lavados se adicionan dos volúmenes de la solución de papaína.
 - d) Se incuba a 37°C durante 10 minutos.
 - e) Se lavan los glóbulos tres veces en solución fisiologica fría y se prepara con ellos una suspensión al 1-2% en solución fisiologica.
- Muestras controles R1R2, R1R1, R2R2 y rr.
 - Hojas de policarbonato.
 - Adhesivo acetato de celulosa.
 - Cámara húmeda.
 - Papel de filtro.
 - Papel adhesivo.
 - Tubos de vidrio (10 mm interno x 7,5 mm de largo).
 - Gradillas adecuadas para los tubos empleados.

- Tapones de corcho.
- Micropipetas con tetinas de goma.
- Estufa a 37°C.
- Baño termostático con agitación a 60°C.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Microscopio.

Técnicas a aplicar para manchas sobre superficies absorbentes (tejidos)

a) Con lápiz de color indeleble se marca la hoja plástica dibujando cuadrados de 1,5 cm de lado, como en el método ABO. Se designa a una columna C, a la siguiente c, luego D, E y, finalmente, e.

b) Se toman cinco hilos de 1 cm de longitud cada uno, de la zona manchada y cinco de la zona no manchada, para utilizar como blanco. Con los controles se procede de manera similar. Se aseguran los hilos en la hoja plástica como en el método ABO.

c) Se espera que el adhesivo se endurezca y se incorporan los antisueros, convenientemente diluidos con solución fisiológica. El grado de dilución depende del antisuero. Como orientación para anti C, anti E y anti e, se utiliza una dilución al 1/2; para anti D y anti c; la dilución adecuada es 1/10. Se agregan dos gotas del antisuero diluido en los cuadraditos correspondientes, sobre el hilo.

d) Se coloca la hoja plástica en una cámara húmeda y se sella el cierre de la tapa con papel adhesivo para evitar la evaporación durante el período de absorción del antisuero.

e) Se deja toda la noche en una estufa a 37°C.

f) Se lava con solución salina a 4°C, durante 30 minutos, como en el método ABO, para eliminar el antisuero no absorbido.

g) Se seca cada hilo lo mejor posible con papel de filtro.

h) Se cortan los hilos de la hoja plástica y se transfieren a los tubos, previamente rotulados.

i) Se agregan dos gotas de solución de albúmina bovina al 1,5% a cada tubo, asegurándose que los hilos queden sumergidos.

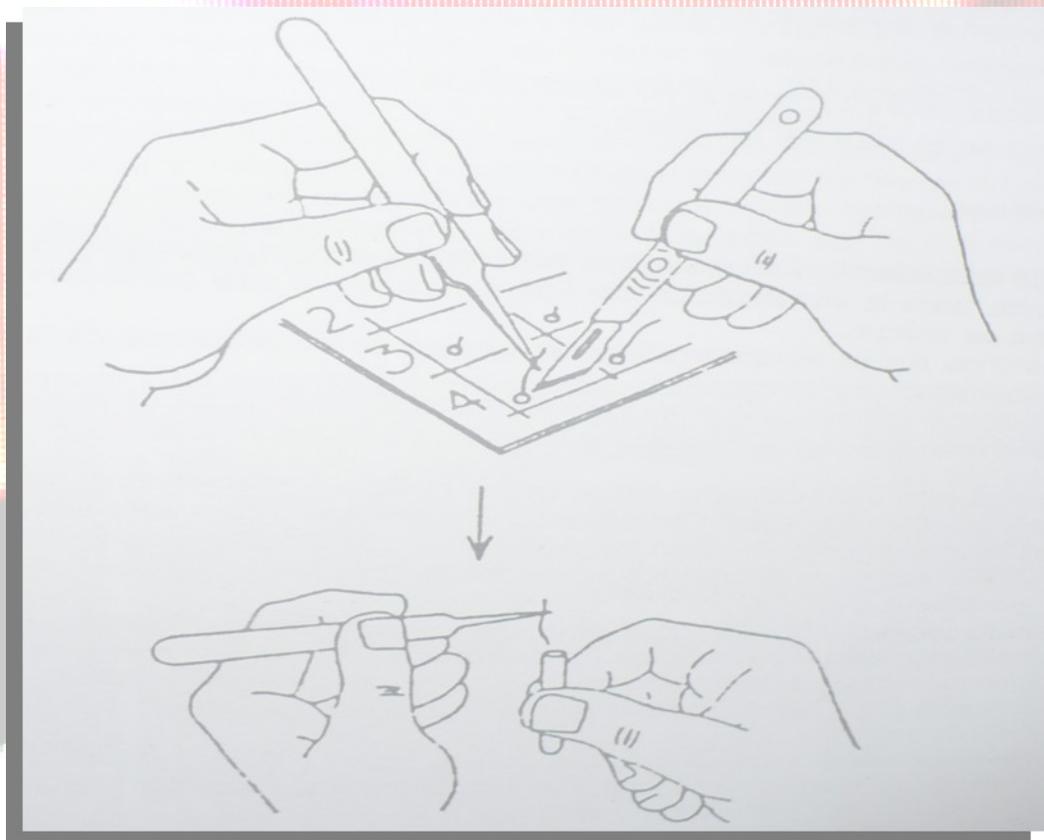
	C	D	E	c	e
M					
B					
Control R1R2					
Control R1R1					
Control R2R2					
Control rr					

j) Se retiran los tubos del baño e inmediatamente se agrega una gota glóbulos rojos R1R2 papainizados, al 1-2% en solución fisiológica, a cada tubo.

k) Se tapan los tubos y se dejan en estufa a 37°C durante dos horas.

l) Se sacan los tubos de la estufa y se centrifugan a 1000-2000 rpm durante un minuto. Se descarta el indica resultado positivo.

m) La presencia de aglutinación pseudo aglutinaciones se dispersan al presionar suavemente el cubreobjetos con una aguja o varillita.



Técnica para manchas sobre superficies no absorbentes

Se procede como en el caso del sistema ABO.

7.4 Técnicas Bioquímicas

Introducción

En cada uno de los sistemas inmunológicos estudiados, se han descrito las técnicas empleadas para la investigación del tipo o fenotipo al cual pertenece una dada mancha de sangre.

En los últimos años fue un verdadero logro el empleo de las proteínas de la sangre para la tipificación de la misma.

Para tal fin se aplica el hecho de que muchas proteínas, entre ellas diversas enzimas, existen múltiples formas moleculares dentro de una misma especie.

Generalidades

La estructura de una proteína está genéticamente predeterminada. Puede tener lugar mutaciones en los genes, que dan origen a diversos alelos, lo que determina una diferente versión de dicha proteína. Cuando una forma variante común ocurre con una frecuencia, mayor del 2%, dicha proteína o enzima se denomina polimórfica.

Las mutaciones genéticas que han ocurrido en ciertos individuos, pueden haber causado la sustitución de un aminoácido de la proteína original por otro, originando las distintas forma de una misma proteína. Al ser ésta una propiedad hereditaria, da como resultado una población dividida en dos, tres o más grupos con referencia a tal proteína.

Un caso particular son las enzimas, proteínas que cumplen importantes funciones en la regulación de las reacciones químicas del cuerpo. Las diferentes formas de una misma enzima se denominan isoenzimas.

Catalizan la misma reacción pero difieren en su estructura y, en consecuencias, en algunas de sus propiedades físico-químicas.

Si las múltiples formas de una proteína presente en la sangre pueden ser detectadas, no se deterioran al secarse la mancha de sangre y persisten durante un cierto tiempo, el polimorfismo puede utilizarse como sistema de agrupamiento o tipificación de sangre.

Hasta, hace pocos años, fueron cuatro los sistemas enzimáticos de mayor aplicación en la caracterización de la sangre. Estos fueron: el de la fosfoglucomutasa (PGM), el de la adenilatoquinasa (AK), el de la esterasa D (esD) y el de la fosfatasa ácida de eritrocitos (EAP), que serán descriptos detalladamente.

Investigaciones posteriores han permitido agregar nuevos sistemas que se han ido adaptando para los análisis de manchas de sangre seca.

Método electroforético para la aplicación del polimorfismo en la tipificación de manchas de sangre

La separación de proteínas polimórficas se fundamenta en el hecho de que las mismas presentan diferente carga eléctrica a un pH determinado. Esta característica permite diferenciarlas por electroforesis.

La electroforesis es el movimiento de partículas cargadas en una solución, bajo la influencia de un campo eléctrico. Cuando se realiza en un medio soporte se denomina electroforesis de zona.

7.4.1. Consideraciones generales sobre la parte experimental

Reactivos, materiales y técnica

- **Soluciones buffers**: Cada enzima o proteína polimórfica necesita soluciones buffers de composición adecuada. La elección de un buffer depende del Ph y fuerza iónica requeridas.

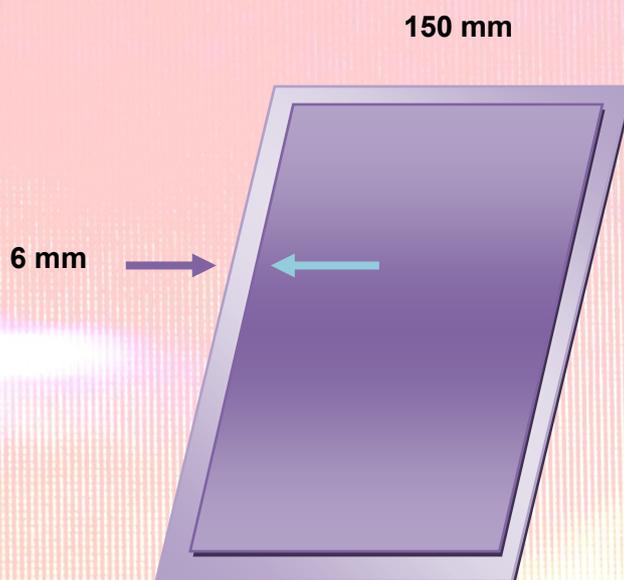
Deben conservarse en la heladera.

- **Medio soporte**: La electroforesis puede realizarse sobre diferentes medios soportes.

El gel de almidón es el adecuado para los cuatro sistemas que se describirán. Se emplea almidón hidrolizado para electroforesis, marcas Connaught o Merck.

- **Placas para el desarrollo electroforético**: Las placas son de vidrio de 220 mm x 150 mm. Llevan un marco realizado con varillas de vidrio de y6 mm de ancho por 1

ó 2 mm de altura, según se empleen para preparar el gel en capa fin o el gel en capa gruesa, como se verá más adelante. Las varillas se fijan al vidrio con Araidite.



- **Alisador de plástico**: se utiliza para extender el gel de almidón.
- **Preparación de la placa de gel de almidón**: Se prepara una suspensión aproximadamente al 9% en el buffer para el gel correspondiente y se coloca en un frasco erlenmeyer de 250 ml.

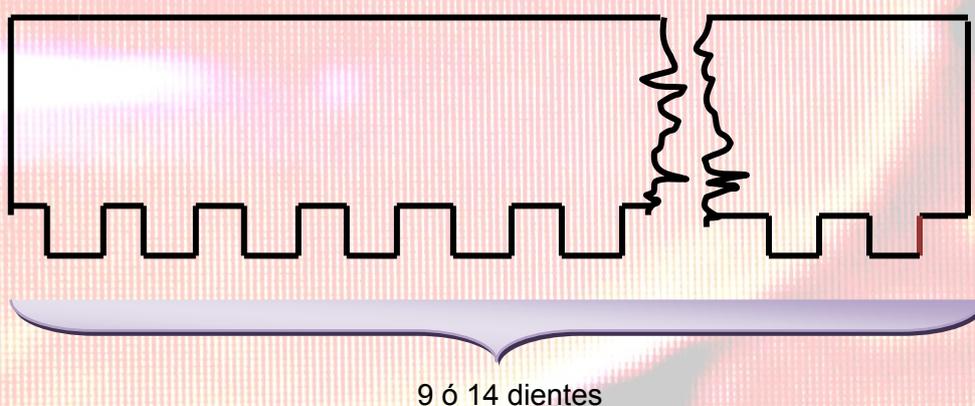
Se calienta sobre la llama de un mechero con continua y vigorosa agitación (usar guantes de amiento). La suspensión se aclara y se vuelve fluida. Se continúa calentando hasta ebullición. Se hiere unos pocos segundos. Se retira el recipiente de la llama; se continúa agitando y se degasifica conectando adecuadamente el frasco erlenmeyer a una bomba de vacío.

El líquido claro y libre de burbujas se vierte rápidamente dentro de la placa colocada sobre una superficie perfectamente nivelada. Se extiende con el alisador y se deja enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos aproximadamente.

La placa se guarda en una cámara húmeda hasta el momento de su uso, por lo menos durante dos horas.

Para preparar el gel en capa fina se emplean 3,6 g de almidón hidrolizado en 40 ml de solución buffer y, para gel en capa gruesa 7,2 g en 80 ml de solución buffer.

- **“Peines” para hacer los canales en el gel:** Los peines son de hija de policarbonato de 0,5 mm de espesor, según la enzima se emplea un peine de nueve o de catorce dientes de 10 mm de ancho cada diente.



- **Preparación de glóbulos rojos control;** Según la enzima que se trata, se emplearán como controles PGM_{2-1} , ESD_{2-1} , AK_{2-1} , EAP_{AB} y EAP_{CB} .

La sangre control a la que previamente se agregó un anticoagulante, por ejemplo heparina, se centrifuga y se separa el plasma. Los glóbulos rojos se lavan tres veces.

Los controles PGM_{2-1} y AK_{2-1} se siembran sin diluir. En cambio, los hemolizados ESD_{2-1} , EAP_{BA} y EAP_{CB} se diluyen convenientemente con el reactivo de Cleland.

- **Cuba Electroforética:** La cuba de electroforesis es de acrílico transparente (cristal) y sus dimensiones, son: 266 mm de largo, 254 mm de ancho y 80 mm de alto.

Consta de una separación longitudinal de 25 mm de alto, en el mismo material, que la divide en dos compartimientos presenta otra separación intermedia paralela a la anterior y de la misma altura, con orificios para la comunicación de las soluciones buffers. De esta manera la cuba queda dividida en cuatro secciones: dos para el compartimiento anódico y dos para el catódico.

En las dos secciones centrales se colocan los electrodos, construidos con alambre de acero inoxidable de 0,5 mm de diámetro. Estos recorren los compartimientos en toda su longitud a 5 mm del fondo de la cuba.

Sobre el frente de la cuba se encuentran dos orificios para la entrada y salida de los tubos que transportan el líquido refrigerante y los bornes de los electrodos. Por último se completa la cuba con una tapa de acrílico transparente.

La cuba electroforética cumple las especificaciones que figuran en el Manual Biological Methods, Metropolitan Police Forensic Science Laboratory.

- **Placa enfriadora**: La placa enfriadora es como una caja construida en acrílico y con tapa de aluminio, cuyas dimensiones son de (220 x 190 x 20) mm. Lleva conectados dos tubos que posibilitan uno la entrada y el otro la salida de la mezcla refrigerante, que permite mantener la temperatura deseada de 4°C durante toda la corrida electroforética.

- **Bomba**: Pequeña bomba centrífuga de bajo caudal para hacer circular la mezcla refrigerante.

- **Puentes para realizar el contacto electroforético**: el material de los puentes depende de la enzima que se está analizando. Se emplean dos tipos: de material esponjoso o de papel de filtro Whatman 3 mm, de dimensiones apropiadas.

Técnica

a) Aplicación de las muestras sobre la placa de gel de almidón. Si el material manchado fuera una tela de algodón, se cortan varios hilos de aproximadamente 0,8 cm de largo.

Los hilos se humedecen durante 10 a 15 minutos en una mínima cantidad de buffer para el gel correspondiente o de reactivo de Cleland 0,05 M, según la enzima que se esté investigado.

Si la mancha se encuentra sobre el material no absorbente, se frota la misma con un trozo de hilo de algodón blanco de 0,8 cm de largo, humedecido con la misma solución, tratando de absorber la mayor cantidad posible de sangre.

Los hilos se colocan, mediante una pinza, en pequeñas hendiduras practicadas en el gel de almidón, con el peine, previamente descripto.

Se siembra un hilo de algodón embebido en el lisado de glóbulos rojos control y alrededor de 3 hilos de la muestra. El número de hilos de la muestra depende de la intensidad de la mancha y del tipo de tela. Si la mancha está sobre nylon o lana, se colocan más hilos que si se encontrara sobre tela de algodón.

b) Condiciones de corrida: El voltaje que se deberá aplicar y el tiempo de desarrollo de la electroforesis dependen del sistema enzimático que se esté estudiando. Estas variables se indicarán para cada enzima en particular.

c) Localización de las bandas con actividad enzimática: Una vez realizada la corrida electroforesis, es necesario localizar en la placa de gel de almidón, las bandas que poseen la actividad enzimática de interés, cuyo revelado se explicará detalladamente para cada sistema en estudio.

7.5. Fosfoglucomutasa – PGM

Generalidades

La fosfoglucomutasa convierte la glucosa- 1- fosfato en glucosa-6-fosfato en los primeros pasos del camino glicolítico. Requiere glucosa -1,6-difosfato y Mg^{2+} , como cofactor.

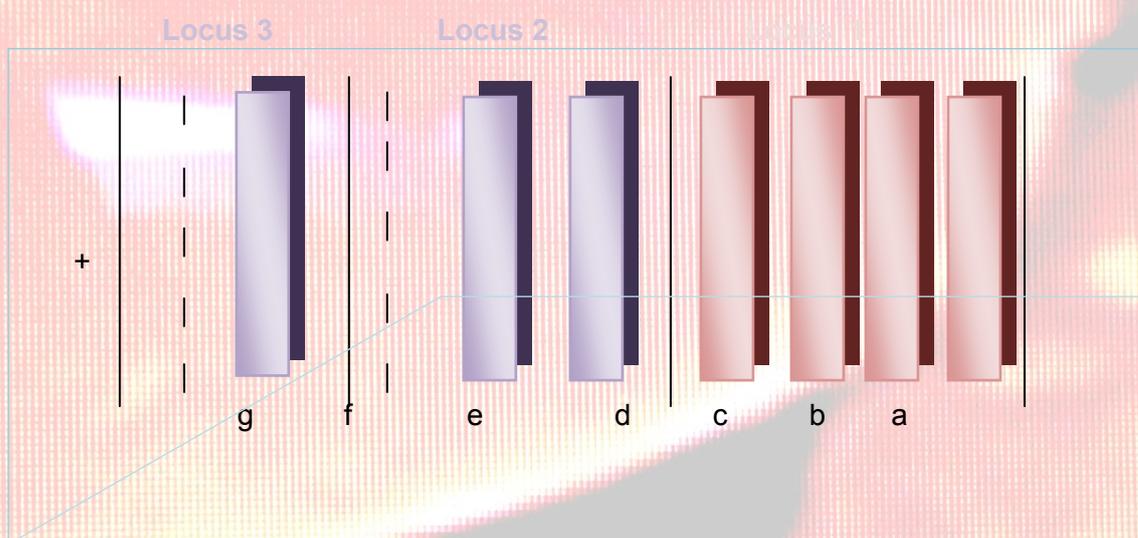
Esta enzima está presente en la mayoría de los tejidos y fluidos biológicos incluyendo glóbulos rojos, semen y secreción vaginal.

Genética

La síntesis de fosfoglucomutasa está regida por tres loci génicos: 1, 2 y 3. Las bandas de locus 3 son las más rápidas, le siguen las del locus 2 y, las más lentas, pertenecen al locus.

El locus 1 es el que tiene valor en ciencia forense, debido a que muestra el mayor grado de polimorfismo. En este locus pueden ubicarse dos alelos; PGM^1 y PGM^2 . Son posibles tres genotipos; dos homocigotas (PGM_{1-1} y PGM_{2-2}) y un heterocigota (PGM_{2-1}).

Cada alelo del locus 1 determina dos de las bandas que aparecen en la placa electroforética. Al alelo PGM_1 se deben las bandas a y c y, al alelo PGM_2 las bandas b y d. Estas bandas se registran en sangre, semen y secreción vaginal.



Las bandas del locus 2 son de menor importancia, porque es raro que presenten variaciones. Estas bandas se observan en sangre, algunas veces en secreción vaginal, pero raramente en semen.

Las bandas los locus 3 no se detectan normalmente en sangre, semen y secreción vaginal.

En cuerpos parciales descompuesta, cuando la actividad de la sangre es nula, el tipo de PGM puede detectarse en tejidos como médula ósea o músculos profundos.

7.5.1. Parte Experimental

Reactivos y materiales para la corrida electroforética

- Buffer para la cuba:

Tris (trihidroximetilaminometano) 12,11 g

Acido maleico	11,62 g
EDTA ²⁹ (ácido etilendiamino-tetracético)	2,92 g
MgCl ₂	2,03 g
Agua destilada	1 litro

Se ajusta a pH 7,4 con solución de NaOH 40% p/v

- Buffer para el gel. Es una dilución 1:15 del buffer para la cuba.

- Placa de gel de almidón en capa fina.

- Glóbulos rojos control PGM₂₋₁.

Reactivos y materiales para la localización de las bandas

- Buffer 0,06 M tris/HCl pH 8

Tris	3,64 g
Agua destilada	500 ml

Se ajusta a pH 0.8 con HCl diluido

- Solución de Meldola blue

Meldola blue (SIGMA N° D-8142)	5 g
Agua destilada	10 ml

- Mezcla de reacción

Glucosa-1-fosfato

(conteniendo 1% de glucosa-1,6-difosfato) 30 mg

MgCl ₂	20 mg
-------------------	-------

²⁹ Anticoagulante Agente químico utilizado para evitar la coagulación de la sangre. Inhibidor de la agregación plaquetaria.

Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa	2 ui por corrida
MTT tetrazolium	2,5 mg
NADP	1,5 mg
Metasulfato de fenazina	2,5 mg
Solución Meldola Blue	0,2 ml
Buffer tris/HCl pH 8	10 ml

Se prepara en el momento de usar

- Gel de agar al 2% en agua destilada

Se emplea agar purificado Oxoid (code K 28). Se pesan 2 g del mismo y se colocan en un erlenmeyer de 250 ml junto con 100 ml de agua destilada. Se calienta en baño de agua de ebullición, hasta disolución total de agar. Se enfría hasta 55-60°C y se vuelca en una cámara húmeda (caja de plástico con papel absorbente húmedo en la tapa). Se conservan en heladera a 4°C.

- Macro de acrílico

Las dimensiones son: 105x135 mm de lados internos y 3 mm de espesor.

Técnica

Aplicación de las muestras: Luego de macerar las muestras en el buffer para el gel, se siembran 8 muestras y un control PGM₂₋₁ a lo ancho de la placa aproximadamente a 6 cm del extremo.

Se ubica la placa en la cuba de electroforesis, de tal manera que la zona sembrada quede en el compartimiento catódico.

Se colocan los puentes de material esponjoso y sobre ellos una placa de vidrio. Finalmente, se tapa la cuba y se realizan las conexiones adecuadas.

a) Condiciones de corrida: Se aplican 4,6 voltios/cm durante 16-17 hs. en un ambiente a 4°C (heladera).

b) Localización de las bandas de PGM: Se pesan 10 g de gel de agar al 2% en un erlenmeyer y se agregan 3 ml de agua destilada: se funde en baño de agua a ebullición.

Se coloca el marco de acrílico sobre el gel de almidón, a 5 mm de la línea de siembre, hacia el ánodo.

La mezcla de reacción para el revelado se lleva a 37°C, en estufa, y luego se vuelca en el erlenmeyer que contiene el agar enfriado a 50-55°C. Se mezcla bien e inmediatamente se vierte dentro del marco esparciéndolo sobre toda la superficie.

Se cubre en un vidrio y se incuba en estufa a 37° en la oscuridad, durante dos horas.

Los reactivos usados para poner en evidencia la actividad de fosfoglucomutasa están incluidos en una película de agar, porque el pH del revelado es distinto al pH empleado para efectuar el fraccionamiento electroforético.

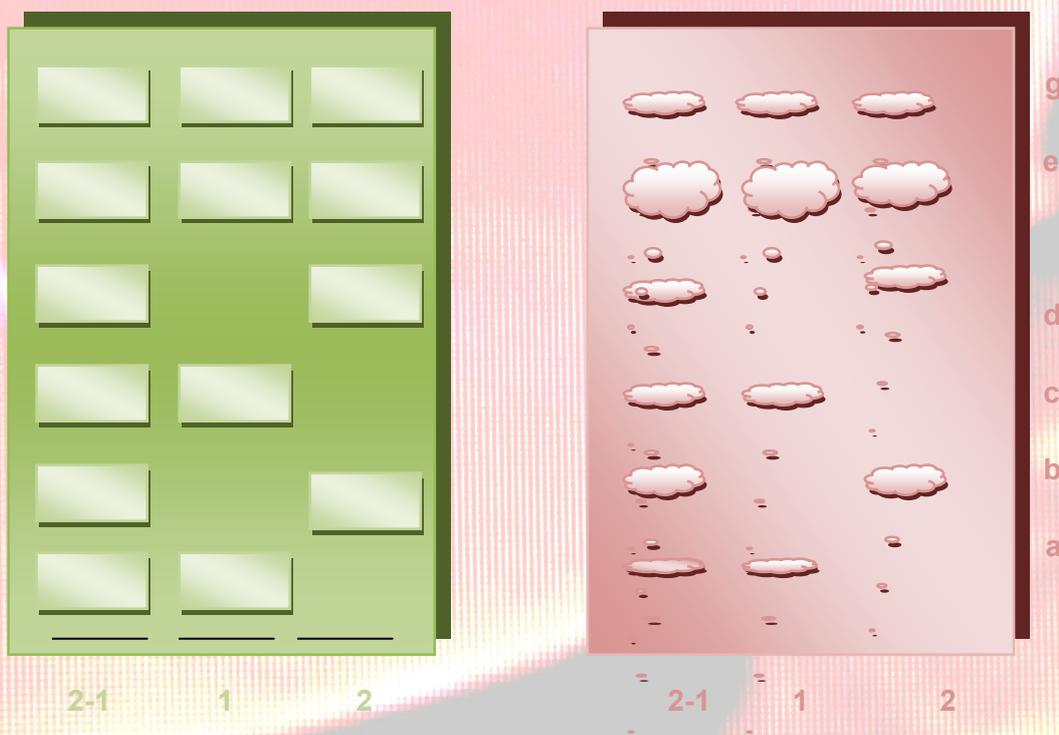
Mecanismo de reacción

La glucosa-6-fosfato, producida por la fosfoglucomutasa, es el sustrato de la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa. Esta enzima requiere NADP como coenzima que se reduce a NADPH. Empleando como agente de transferencia de electrones Metasulfato de fenazina o Meldola Blue, el MTT tetrazolium se reduce a MTT formazán de color azul y el NADPH se oxida a NADP.

Las bandas con actividad de fosfoglucomutasa se observan azules sobre un fondo amarillo.

Interpretación de los resultados

Los tipos más comunes de fosfoglucomutasa, son: PGM₁, PGM₂ y PGM₂₋₁.



La PGM₁ presenta las bandas a y c, siendo la banda a más intensa que la c. En la PGM₂ también se observan dos bandas, b y d, teniendo b mayor intensidad que d. Finalmente la PGM₂₋₁ incluye las 4 bandas; a, b, c y d, siendo la segunda más intensa.

Antigüedad

Es posible tipificar manchas de sangre de hasta un mes de antigüedad. Frecuencia de los fenotipos más comunes de PGM.

Se calcularon sobre 500 muestras tomadas de la población de la ciudad de Buenos Aires.

PGM ₁	57,0 %
PGM ₂₋₁	35,7 %
PGM ₂	7,3 %

Esterasa D:EsD

Generalidades

Existen un número considerable de esterasas. Están muy distribuidas en la naturaleza y probablemente no existan organismos sin algunas de ellas. Son enzimas que catalizan reversiblemente la hidrólisis de las uniones éster.



En eritrocitos humanos se han hallado diferentes esterasas mediante la electroforesis en gel de almidón.

Utilizando técnicas de localización que emplean colorantes azoicos se encontraron tres grupos de esterasas que se denominan A, B y C. Prácticamente éstas no se emplean para la tipificación de manchas de sangre secas.



La esterasa D, que no se detecta con los colorantes anteriores, se descubrió mediante el empleo de su sustrato fluorogénico, el acetato de 4-metil umbelifenio.

La enzima cataliza la separación del grupo acetato obteniéndose la 4- metil umbeliferona, de intensa fluorescencia.

La esterasa D es una esterasa no específica cuyo sustrato fisiológico no se conoce; sin embargo, se observó que su actividad es mayor con ésteres de ácidos grasos de bajo peso molecular, como por ejemplo, acetatos y butiratos.

Genética

Es un sistema de alelos múltiples pertenecientes a un mismo locus. Los alelos más comunes son EsD¹ y EsD², los fenotipos correspondientes son EsD₁, EsD₂₋₁ y EsD₂. También se hallaron los alelos EsD³ y EsD⁴.

Los fenotipos más frecuentes se reconocieron en hemolizados de sangre humana y en extractos acuosos de la mayoría de los tejidos. En semen y secreción vaginal no se encontró actividad de esterasa D por este método.

Parte experimental

Reactivos y materiales para la corrida electroforética

- Buffer para la cuba; ácido bórico/ hidróxido de litio pH 7,2

Acido Bórico	27,21 g
Hidróxido de litio	1,68 g
Agua destilada	1 litro

- Buffer para el gel: Tris / ácido cítrico / ácido bórico

Tris	0,818 g
Acido cítrico	0,378 g
Acido bórico	0,136 g
Agua destilada	500 ml

Se emplea diluido al medio

- Placa de gel de almidón en capa fina

- Reactivo de Cleland (solución 0,05 M)

DL-Dithiothreito (SIGMA N° D-0632) 4 mg

Buffer para el gel 0,5 ml

Se prepara en el momento de usar

- Glóbulos rojos control EsD2-1

El lisado de glóbulos rojos control EsD2-1 se diluye 1:1 con el reactivo de Cleland 0,05 M, y se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Reactivos y materiales para la localización de las bandas

- Buffer para la localización de las bandas, acetato de sodio 0,005 M pH 6,9

Acetato de sodio 0,041 g

Agua destilada 10 ml

Se prepara en el momento de usar

- Acetato de 4-metilumbeliferilo (SIGMA N° M-0883)

- Acetona p.a. Merck

La técnica que se describe a continuación fue modificada con respecto a la original en nuestro laboratorio.

Técnica

a) Aplicación de las muestras: Se maceran tres muestras con la mínima cantidad de reactivo de Cleland 0,05 M, durante 10-15 minutos. Se siembran las mismas junto con un control EsD₂₋₁, a los largo de la placa a 4,5 cm del borde.

Para la corrida electroforética, la placa se coloca en el interior de la cuba, sobre el dispositivo enfriador por el que circula agua a 4°C. La zona sembrada se ubica en el compartimiento catódico. Se emplean puentes de material esponjoso.

b) Condiciones de corrida: se emplean 17 voltios/cm (230 volts en total), durante 45 minutos.

c) Localización de las bandas de EsD: Se prepara la mezcla para la localización de las bandas, disolviendo 4 mg de acetato e 4-metilumbeliferilo, en unas pocas gotas de acetona y mezclando inmediatamente con 10 ml de buffer acetato de sodio 0,05.

La mencionada mezcla se absorbe en un rectángulo de papel de filtro Whatman 3 MM de 80x200 mm. A continuación se apoya el papel sobre la placa de gel, a partir de la línea de siembre hacia el ánodo.

La placa se coloca luego bajo la acción de una lámpara de luz ultravioleta de longitud de onda larga.

Después de 5-10 minutos de exposición, se pueden ver las bandas azuladas fluorescentes en la zona de actividad de la esterasa D.

Se retira el papel y se observan nítidamente las bandas típicas correspondientes a los tres fenotipos EsD₁, EsD₂₋₁ y EsD₂.

Interpretación de los resultados

El fenotipo EsD₁ presenta tres bandas, siendo más intensa la de menor movilidad electroforética (la primera, más cercana de cátodo).

En el fenotipo EsD₂ también se observan tres bandas, pero de corrimiento electroforético más rápido (se acercan más al ánodo).

La EsD₂₋₁ se caracteriza por presentar cinco bandas, siendo la segunda, numerada a partir del cátodo, la de mayor intensidad.

Han sido descritas en la literatura tres variantes raras de EsD: EsD₃₋₁, EsD₄₋₁ y EsD₄₋₂.

Antigüedad

Se pueden tipificar adecuadamente manchas de sangre de hasta doce días, cuando la antigüedad es mayor, se crea la posibilidad de confundir la EsD₁ con la EsD₂₋₁. Esto ocurre porque con el transcurso del tiempo, las bandas de corrimiento más rápido de la EsD₂₋₁ son difíciles de visualizar y es notorio una pérdida de intensidad de la primer banda que caracteriza la EsD₁ y de la segunda banda de la EsD₂₋₁.

Frecuencia de los fenotipos más comunes

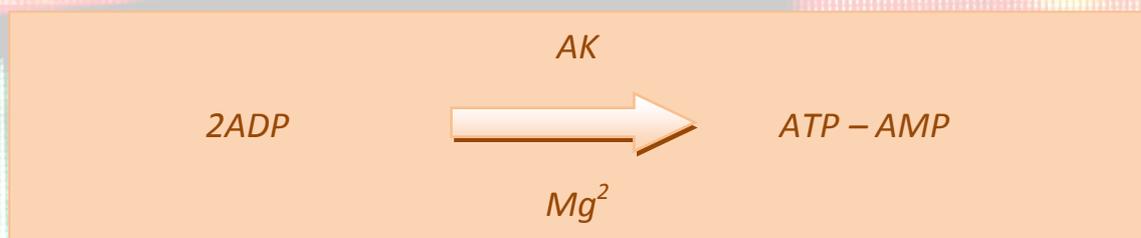
Se calculo con 500 muestras de sangre seca procedente de habitantes de la ciudad de Buenos Aires.

EsD ₁	76,4%
EsD ₂₋₁	22,3%
EsD ₂	1,3%

7.6. Adenilato quinasa- AK

Generalidades

La Adenilato quinasa catalizada la transferencia de un grupo fosfato de alta energía, entre dos moléculas de adenosina difosfato (ADP), para producir una molécula de adenosina trifosfato (ATP) y una de adenosina monofosfato (AMP).



El equilibrio de la reacción depende de la concentración de iones Mg^2 , y el valor de la constante de equilibrio aumenta con el incremento de la concentración Mg^2 .

Esta enzima está presente en los glóbulos rojos y en muchos otros tejidos, sobre todo en aquellos que tienen un alto requerimiento de energía, como por ejemplo, el musculo.

Si a partir de un cadáver no se obtiene sangre en buenas condiciones para la determinación del tipo de Adenilato quinasa, se puede usar el tejido muscular. La

actividad de semen y secreción vaginal es baja, como para detectarla por la técnica de tinción que se describirá más adelante.

Genética

Es un sistema de alelos múltiples que pertenecen a un mismo locus.

Los alelos que se presentan con mayor frecuencia son AK¹ y AK², siendo los fenotipos más comunes AK₁ y AK₂₋₁. El homocigota AK₂ es raro, y menos frecuentes aun, son las formas AK₃₋₁ y AK₄₋₁.

7.6.1 Parte Experimental

Reactivos y materiales para electroforesis

- **Buffer para la cuba**: ácido cítrico/hidróxido de sodio pH 4,9

Acido cítrico	28,72 g
Hidróxido de sodio	10,67 g
Agua destilada	1 litro

- **Buffer para el gel**: ácido succínico/tris pH 5

Acido succínico	0,945 g
Tris	1,113 g
Agua destilada	500 ml

- Placa de gel de almidón en capa fina.

- Glóbulos rojos control AK2-1.

Reactivos y materiales para la localización de las bandas

- **Buffer**: Tris/HCl pH8

Tris	3,03 g
Agua destilada	250 ml

Ajustar a pH 8 con HCl

- **Solución de Meldola Blue**; es la misma que la empleada para fosfoglucomutasa.

- Mezcla de reacción

Glucosa	18 mg
Cloruro de magnesio	40 mg
Adenosina difosfato	4,9 mg
NADP	3,1 mg
Metasulfato de fenazina	2,5 mg
Solución de Meldola Blue	0,2 ml
MTT tetrazolium	2,5 mg
Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa	0,4 ul/placa
Hexoquinasa	1ul/placa
Buffer Tris/HCl pH 8	10 ml

Se preparan en el momento de usar.

- Gel de agar al 2 en agua destilada. Es el mismo que el empleado para fosfoglucomutasa.

- Marco acrílico. Las dimensiones son: 190 x 60 mm de lados internos, y 3 mm de espesor.

Técnica

a) **Aplicación de las muestras**: Luego de macerar las muestras en el buffer para el gel, se siembran 13 muestras y un control AK₂₋₁ a lo largo de la palca, aproximadamente a 6 cm del extremo.

Las bandas de Adenilato quinasa resultan nítidas, sembrando menor cantidad de muestra un solo hilo), comparando con las dos enzimas anteriormente estudiadas.

Se ubica la placa en la cuba de electroforesis, de tal manera que la zona sembrada quede en el compartimiento anódico.

Se colocan los puentes de material esponjoso y sobre ellos una placa de vidrio.

b) Condiciones de corrida: Se aplican 10 voltios/cm durante 4 horas en un ambiente a 4°C (heladera).

Durante la corrida se seca dos veces la tapa de vidrio que cubre el gel de almidón (a la hora y media y a las tres horas).

c) Localización de las bandas: se procede de la misma manera que para fosfoglucomutasa, empleando la mezcla de reacción correspondiente a la Adenilato quinasa.

El marco de acrílico se coloca sobre el gel de almidón 5 mm de la línea de siembra hacia el cátodo. Se vuelca dentro de él la mezcla de reacción y se alisa.

Se cubre con un vidrio y se incuba en la oscuridad a 37°C durante media a una hora. Si permanece más tiempo, las bandas se difunden.

Mecanismo de reacción

El ATP, formado por la Adenilato quinasa a partir de ADP, fosforila la glucosa y produce glucosa-6-fosfato. Esta se oxida por acción de la glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa y del NADP que se reduce a NADPH. Luego éste es oxidado a NADP, con la consecuente reducción del MTT tetrazolium a formazán, empleando como agente de transferencia de electrones, Metasulfato de fenazina o Meldola Blue.

Las bandas con actividad de AK se ven azules sobre un fondo amarillo, como las de PGM.

Interpretación de los resultados

Los tipos más comunes son: AK₁, AK₂₋₁ y AK₂.

Tanto el fenotipo Ak_1 como el Ak_2 , muestran una única banda. La diferencia entre ambos es que la banda de tipo Ak_2 se encuentra más desplazada hacia el cátodo; es decir, más alejada de la zona de siembra que la del tipo Ak_1 .

El fenotipo Ak_{2-1} presenta las bandas correspondientes a la Ak_1 y a la Ak_2 .⁷

“Observar sin pensar es tan peligro como pensar sin observar”

De Cajal Roberto

8.- HEMATOLOGIA FORENSE

Es el estudio de la sangre aplicado a la Criminalística, conformada por dos ramas la Hematología Reconstructora y la Hematología identificadora.

8.1. HEMATOLOGIA RECONSTRUCTORA³⁰:

La reconstructora se ocupa de la determinación e interpretación del mecanismo de producción de las imágenes. Cada mecanismo tiene imágenes sanguíneas propias que se ven alteradas cualquiera sea el factor que las produce por las características propias del soporte.

A través del estudio de las imágenes sanguíneas se podrá obtener una información precisa de la forma en que se han producido los hechos. Se podrá determinar posición de la víctima y del agresor, los movimientos realizados en el sitio de suceso, características del traumatismo y violencia empleada, intensidad del traumatismo, arma empleada, movimientos ejecutados con ella, incluso señalar aproximadamente o descartar al autor del delito.

Las etapas fundamentales de la investigación se aplican a los rastreos hemáticos tanto en recintos cerrados como abiertos. En recintos cerrados se inspeccionará cuidadosamente las entradas, salidas, forados, techos, muebles, instrumentos del delito, sospechosos, cadáveres, servicios higiénicos, etc. En recintos abiertos se puede encontrar manchas de sangre en arbustos, piedras, pastos, hojas, en la tierra, etc.

8.1.1 MANCHAS SANGUINEAS

Las manchas sanguíneas constituyen la base del estudio de la hematología forense reconstructora. Estudia su mecanismo de producción, su forma, extensión, situación, cantidad y orientación, tamaño, color, aspecto³¹.

La clasificación de manchas sanguíneas se basa en su mecanismo de producción.

³⁰ **Lecciones de Medicina Legal**, Bonnet Emilio Federico Pablo, Buenos Aires, López Libreros Editores, 1984, Cuarta Edición.

³¹ Tratado de Criminalística Tomo II La Química Analítica en la Investigación, Ob, cit..

Manchas de sangre por contacto: Se producen por el contacto directo y/o indirecto de la fuente productora y el soporte. El contacto puede ser simple, por ej.: las manchas de sangre de las ropas que están en contacto directo con la herida. Las manchas de sangre por arrastre se producen cuando la víctima se arrastra o es arrastrada.



Contacto de palmar en el marco de la puerta



Contacto con arrastre

Manchas de sangre por Limpiado: El contacto puede ser por limpiamiento, ej.: al proceder a la limpieza de manos, armas, etc., las manchas aparecen en los objetos utilizados para ello (papeles, paños, géneros, etc.).



Toalla con abundantes maculas producto de la relación con un objeto embebido en sangre

Manchas de sangre por escurrimiento: La sangre se desliza por el soporte impermeable, desde la fuente productora (herida). Cuando el desplazamiento se hace sobre un soporte inclinado se forma el reguero; cuando el soporte es horizontal o presenta depresiones la sangre forma charcos. El soporte puede estar constituido por el cuerpo, suelo o piso, murallas, ropas, etc.

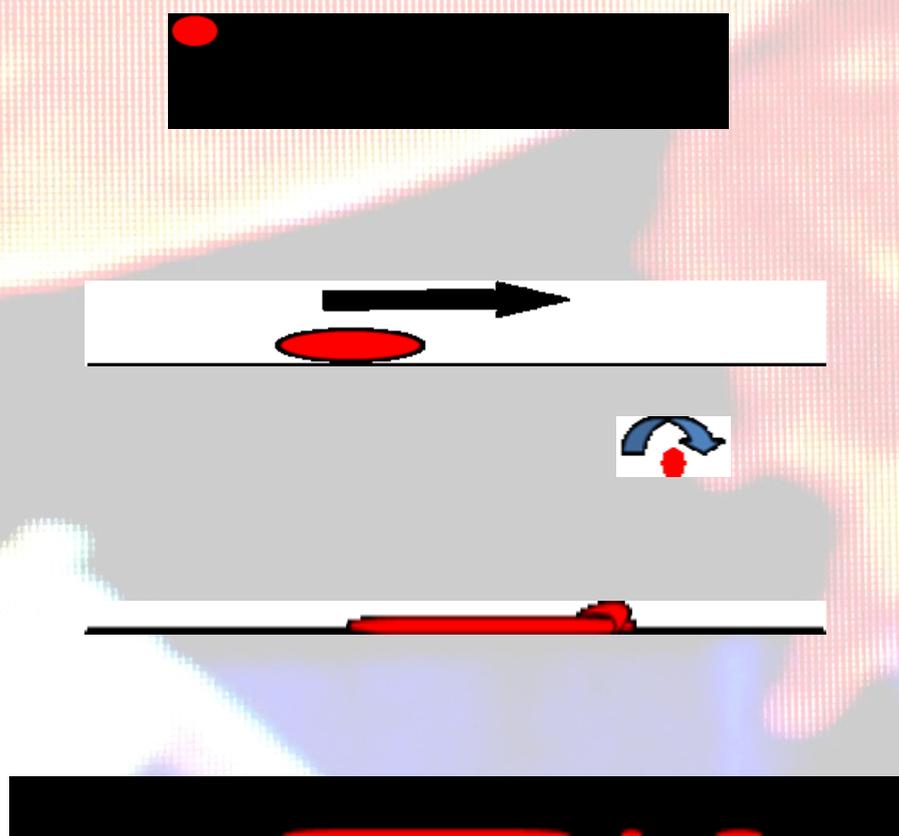


Manchas de sangre por proyección: Se producen cuando la sangre es proyectada en forma más o menos violenta sobre el soporte. Si la mancha de sangre proyectada al soporte se presenta en forma de imágenes aisladas y de disposición irregular, constituyen las salpicaduras, distinguiéndose en ellas salpicaduras gruesas y finas. En general, las salpicaduras gruesas corresponden a la contusión repetida sobre una superficie sangrante. Las salpicaduras finas se observan generalmente en la mano del suicida que se dispara sobre la sien. La rociadura se produce

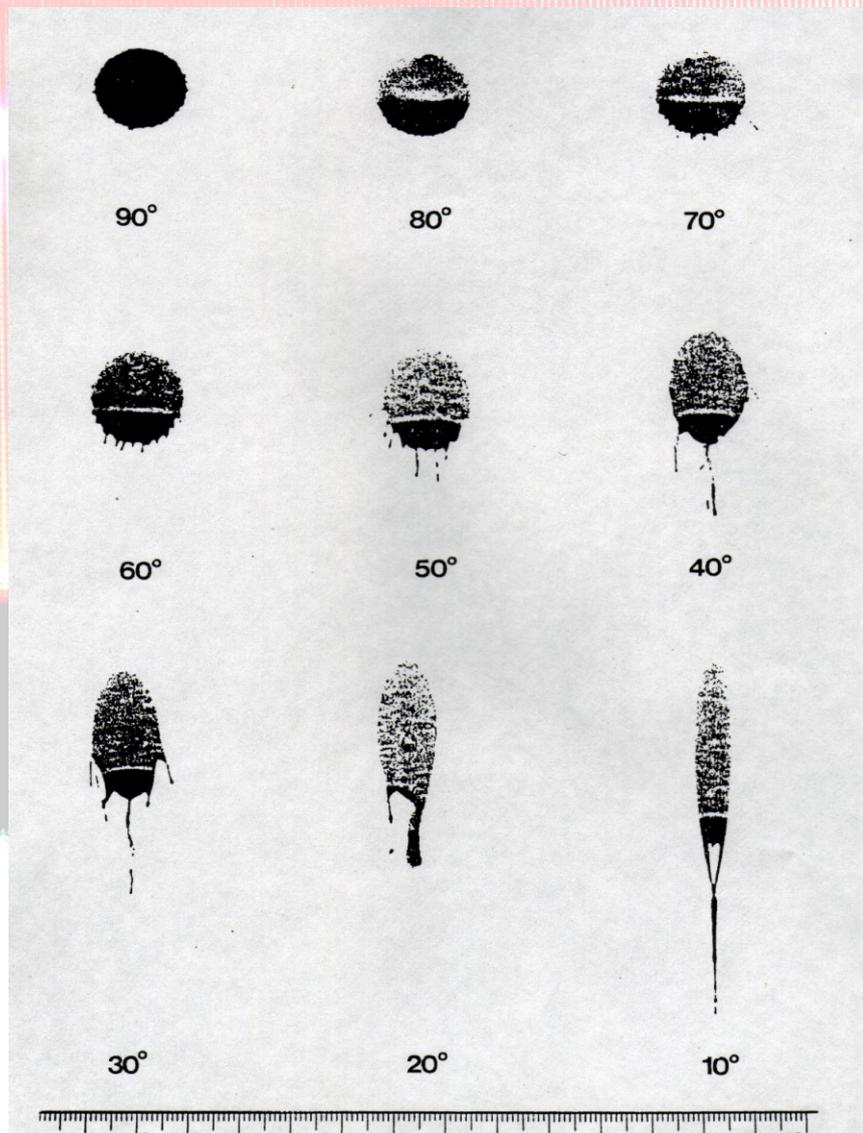


cuando la fuente productora se desplaza linealmente frente al soporte, ej.: herida arterial y movilización de segmentos corporales o armas ensangrentadas.

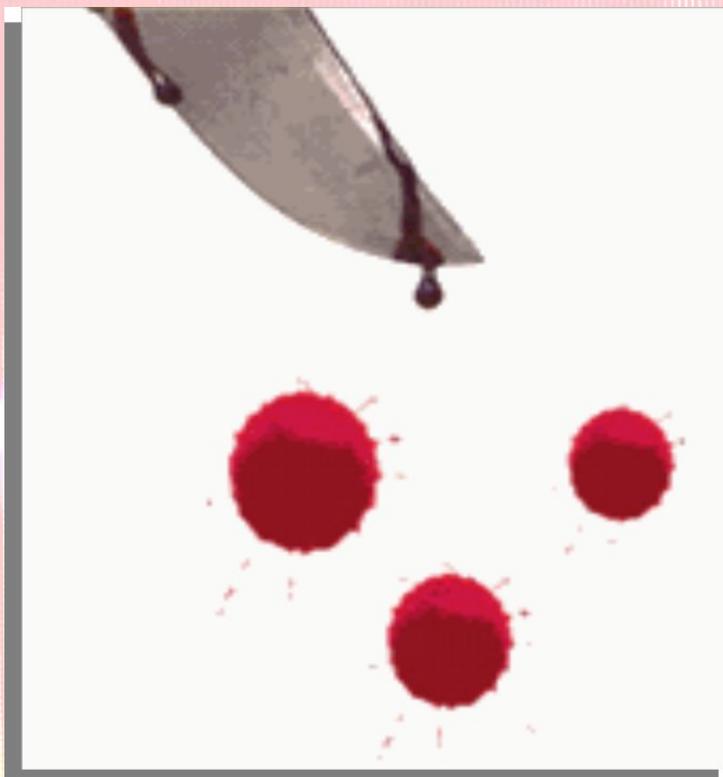
Manchas de sangre por goteo de altura: Se produce al caer la gota de sangre desde la fuente productora hasta el soporte, impulsada por la fuerza de gravedad. La imagen producida tomará caracteres especiales de acuerdo a la altura, al desplazamiento y detenciones del herido y a la inclinación del soporte. A medida que la fuente productora se va alejando del soporte, la forma de la gota sufre variaciones progresivas en su contorno; de muy poca altura el contorno es regular; a medida que se aleja, el contorno se va haciendo irregular, luego presenta salientes en forma de rayos y, posteriormente, se aprecia rodeada de gotas secundarias. El desplazamiento del herido produce un contorno especial que se acentúa con la velocidad: la gota aparece de forma ovalada y con digitaciones que se acentúan transformándose en proyección.



Estas digitaciones o proyecciones indican la dirección del desplazamiento (la punta más fina y alargada de la gota muestra el lugar hacia donde se dirige el herido) La detención del herido queda indicada por la confluencia de las gotas que pueden llegar a formar charcos o regueros. La inclinación de soporte se manifiesta también por la forma ovalada de la gota, que es directamente proporcional a la inclinación del soporte (a mayor inclinación, mayor alargamiento).



En el caso de soporte vertical, por lo general la gota será de contorno con radiaciones regulares, pudiéndose observar un escurrimiento vertical desde la gota.



ESTUDIO DEL SOPORTE³²

Soporte: Es toda superficie de recibir manchas de sangre (cuerpo, ropas, suelo, murallas, vidrios, etc.) En el desarrollo de la clasificación se puede apreciar la importancia del soporte en la determinación de las características de las manchas de sangre.

Las manchas de sangre por contacto tendrán particularidades especiales atendiendo a la permeabilidad o impermeabilidad del soporte. Si éste es permeable y permite la imbibición (absorber un cuerpo sólido a otro líquido) sanguínea, se observarán las manchas de sangre.

8.2. HEMATOLOGIA IDENTIFICADORA³³

Es la rama de la hematología forense que se ocupa de identificar sangre. Los procedimientos empleados están destinados a investigar si es sangre, a qué especie

³² Manual de Criminalística, Ob, cit..

³³ **Lecciones de Medicina Legal**, Ob, citt.

pertenece y en lo posible su individualidad. El trabajo policial se ve frecuentemente solicitado a determinar en los delitos contra las personas, manchas sospechosas de sangre.

Su aspecto macroscópico induce frecuentemente a error, siendo necesario recurrir a las pruebas de laboratorio para obtener el resultado verdadero. La muestra sospechosa de sangre, puede ser fresca o antigua, sólida o líquida, pura o mezclada o aparecer en diferentes soportes.

Circunstancias tan variadas exigen del laboratorio especializado el empleo de técnicas adecuadas condicionadas a la naturaleza, cantidad, antigüedad, etc., de la muestra a dubitar.

El auxiliar de justicia debe conocer cómo, cuándo y qué debe pedir al enviar la muestra y al mismo tiempo saber la forma en que debe recoger, envasar y transportarla al laboratorio. Con la muestra sospechosa se procede en el laboratorio a verificar, mediante pruebas de orientación y de certeza, si es sangre.

8.2.1 EL RASTREO EN LA HEMATOLOGIA FORENSE

El rastreo de sangre en el sitio del suceso tiene por objeto detectar, mediante una búsqueda metódica, toda clase de vestigios de sangre, tanto en el sitio de suceso mismo, como en el cadáver, vestimentas y también en el sospechoso. Una vez detectada la Imagen sanguínea se aplica el procedimiento criminalístico normal:

PROTEGER el vestigio para evitar que sea alterado o borrado;

FIJAR, mediante la fotografía, planimetría y descripción escrita;

TRANSPORTAR el vestigio al Laboratorio de Criminalista (cuando sea procedente);
la imagen sanguínea, es decir, reconstruir su origen y mecanismo.

8.2.2 RASTREO EN EL SITIO DE SUCESO

Se puede efectuar en forma radiada, a partir del punto en que se encuentra el cadáver, si hubiere, ya que el rastreo no implica el hallazgo o ubicación de un cuerpo, sino el lugar donde se produjo el suceso. En el caso que los hechos acaecidos fuese en un lugar cerrado se deberá examinar las vías de entrada y salida, como por ejemplo: puertas, ventanas, pasillos, etc. Se deberá tener especial cuidado, en aquellos sectores

de tránsito diario, los cuales pueden pasar desapercibidos, tales como un pasamanos de escalera, un picaporte, entre otros.

También se realizará la búsqueda de sangre en paredes, techo (sangre por proyección); mesa, sillas, y el apoyo de las mismas en contacto del piso. Los territorios lavados, posterior al suceso de los hechos delictivos, deberán ser observados en las uniones de las mismas es decir, entre baldosas, cerámicos, y estos con la pared, lugar donde se podrá buscar sangre, ya que dicho zona es de difícil acceso al lavado.

Otro lugar característico y motivo primordial para la búsqueda, es el baño, del cual se examinara el tacho de basura, si hubiere o otro residuo de descarte de papel. El lavamanos o bacha esta de gran relevancia en una escena delictual, debido a que quien comete un hecho delictivo podrá usar con confianza la misma para su higienización, y posteriormente procederá al lavado del mismo, para no dejar rastro a simple vista.

De dicho elemento se desprende el sifón, el cual deberá ser retirado y consecuentemente, su estudio con elemento óptico y luz artificial, de igual manera se provendrá con la pequeña rejilla que contiene la bacha, la toalla, como cualquier otro elemento de limpieza y secado, serán de uso por el agresor.

En los sitios de sucesos abiertos, se procederá al rastreo en arbustos, pastos, piedras, arbolada, de acuerdo al sector que comprenda el sitio abierto. En relación a calles de tierra, se tomara las precauciones del caso debido a que al ingresar con rodado u otro medio de transporte al lugar se realizara el levantamiento en forma natural de polvo o tierra, lo que ocasionara la contaminación y la pérdida del material genético.

8.2.3 RELACION ENTRE SANGRE Y SITIO DE SUCESO

El investigador policial siendo en esta oportunidad el médico forense debe establecer si existe realmente una relación entre la cantidad de sangre que se encuentra en el sitio de suceso y en el cadáver y el carácter de las lesiones, es decir, si el cadáver presenta lesiones, que necesariamente producen o produjeron ese tipo de manchas halladas en el lugar, ya que se puede presumir que hubo otras personas heridas en el lugar.

8.2.4 ELEMENTOS PARA EFECTUAR RASTREO HEMATOLOGICO

El investigador criminalístico debe poseer de elementos adecuados para la tarea pericial concerniente al levantamiento de evidencias, que finalmente serán motivo de prueba. El profesional deberá contener un maletín, de amplio espectro que contendrá los elementos básicos, para la correcta toma de muestra hemáticas siendo los siguientes³⁴;

- Gasa estéril.
- Hisopo estéril.
- Solución fisiológica.
- Sobre, papel, de color blanco y/o de color marrón.
- Tijera.
- Pinza.
- Bisturí.
- Alcohol.
- Cinta pego transparente.
- Lapicera.
- Lápiz grafito.
- Hojas A4.
- Referencia métrica.
- Cámara Digital.
- Banda de evidencias.
- Cadena de custodia.
- Papel de filtro.

³⁴ **Trabajo de Método de Determinación de Antígenos de Grupos en Manchas Secas**, Boletín Informativo Nro. 1, Superintendencia de Policía Científica La Plata, 09 de Mayo de 2006, 17 p.