

# “Técnicas utilizadas en Hematología Forense”

Elaboró: Leticia Carreño Rios

## OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

- Reafirmar la importancia del estudio laboratorial de las manchas hemáticas con fines forenses.
- Conocer el fundamento químico de las técnicas forenses de laboratorio.
- Difundir la importancia de la identificación humana mediante la sangre.
- Ampliar nuestros conocimientos respecto al estudio sexológico de muestras biológicas con fines forenses

## JUSTIFICACIÓN

El objetivo prioritario de la ciencia Criminalística consiste en la identificación de los sujetos activo y pasivo del delito, de ahí que durante el progreso de esta ciencia han surgido variedad de procedimientos y técnicas que con su aplicación se han ido perfeccionando y en otros casos descartando.

Para efectuar la individualización de personas se emplean métodos diversos. Todos son importantes, y no obstante unos sean más efectivos que otros, al aportar datos más infalibles, ninguno debe descartarse, pues en ocasiones el resultado de una identificación plena obedece al uso vinculado de varios de estos métodos.

Procedimientos directos de identificación policial y medicolegal<sup>1</sup> tales como la fotografía, el retrato hablado, la papiloscopía y la antropometría, sumados a métodos indirectos como la serología y hematología, hacen posible el propósito anteriormente mencionado.

---

<sup>1</sup> SILVEYRA, Jorge O. “Sistemas de Identificación Humana” 1ª edición. Ed. La Rocca, Buenos Aires 2006. p. 241.

## INTRODUCCIÓN

En la identificación de delincuentes, enfermos mentales con amnesia, menores sin documentos, víctimas de homicidio, etc., resultan de utilidad los diferentes métodos de identificación hematológica que se mencionarán en la presente investigación.

Hay diversos tipos de técnicas forenses de laboratorio, en especial las que se refieren al tejido hemático. Se trata de métodos bioquímicos<sup>2</sup> que evalúan los antígenos eritrocitarios (grupo sanguíneo), antígenos de histocompatibilidad (HLA), proteínas plasmáticas y enzimas eritrocitarias, las cuales no son útiles en la identificación de cadáveres, ya que se alteran rápidamente luego de la muerte. Estas características son de gran utilidad ya que son marcadores que se transmiten obedeciendo a las leyes mendelianas de la herencia. Otro factor sumamente importante es el ADN.



A continuación enlistaremos las técnicas citadas para consecutivamente explicarlas en los temas posteriores: Determinación de grupo sanguíneo en sangre fresca y en manchas de sangre; técnicas de orientación y de confirmación, como el diagnóstico genérico (¿de qué es la mancha?), diagnóstico individual (¿es humana o animal?) y diagnóstico específico (¿a quién pertenece?) de presuntas manchas de sangre encontradas en el lugar de la investigación criminal.

Asimismo, profundizaremos en las técnicas laboratoriales aplicadas a muestras biológicas tales como saliva, semen, orina, entre otras, las cuales nos serán de utilidad al conocer su diagnóstico genérico, específico e individual.

Finalmente, mencionamos que las propiedades de la sangre referidas en los párrafos anteriores, pueden ser determinadas a través de diversas técnicas utilizadas en hematología forense. Dichas propiedades y los métodos que se utilizarán (que ya se han señalado) serán explicadas en el desarrollo de este trabajo. Veamos.

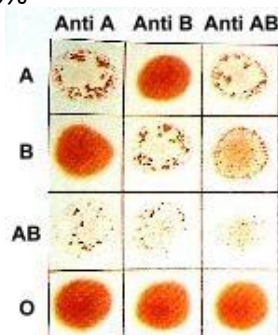
---

<sup>2</sup> SILVEYRA, Jorge O. *Open cit*

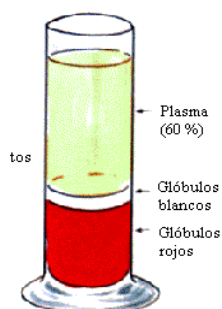
## FUNDAMENTOS

Las técnicas laboratoriales motivo de la presente investigación están basadas en las propiedades de la sangre, gracias a las cuales se trata de un tejido que proporciona individualidad al ser humano, dicha singularidad hace posible la identificación del sujeto donador de una muestra. Las propiedades más importantes son las siguientes:

- a) *Grupos sanguíneos*. Sus antígenos se hallan en la superficie de los glóbulos rojos, y sus correspondientes anticuerpos forman parte de las inmunoglobulinas del plasma. Los anticuerpos del sistema ABO se hallan también en otras células y en fluidos corporales (saliva, orina, semen, leche) en individuos secretores. A este sistema se fueron agregando posteriormente otros, como el Rh, MNSs, Duffy, Lewis, Kidd, Lutheran, etc. En conjunto presentan un rango de probabilidad de exclusión de alrededor del 75%



- b) *Proteínas plasmáticas*. Las más frecuentemente utilizadas como marcadores en las pruebas de filiación son la haptoglobina, alfa-1-antitripsina, transferrina, proteínas grupo específicas Gc, orosomucoide, factor B del sistema properdina, fracción c3 del complemento, alotipos Gm y Km, de cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas. Su rango de probabilidad de exclusión es de alrededor del 71%



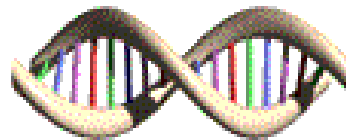
- c) *Enzimas eritrocitarias*. Las que se presentan mayor polimorfismo son la fosfatasa ácida eritrocitaria (EAP), adenilato kinasa (AK), transaminasa glutámico-pirúvica (GPT), fosfoglucomutasa (PGM), esterasa D (EsD), adenosín deaminasa (ADA), fosfogluconato dehidrogenasa (PGD) y glioxalasa (GLO). El rango de probabilidad de exclusión se encuentra en el 61%



- d) *Antígenos de histocompatibilidad (HLA)*. Son un conjunto de proteínas del sistema inmune. Son determinantes de compatibilidad entre dador y receptor de un trasplante de órganos y están presentes en todas las células nucleadas del organismo, aunque algunos subtipos se distribuyen en forma más limitada: sobre linfocitos B, macrófagos, espermatozoides, etc. Presentan en su conjunto un rango de probabilidad de exclusión de aproximadamente 95%.



- e) *El ADN*. Químicamente está constituido por un encadenamiento de elementos básicos que se podrían comparar con otras letras de un alfabeto. Estos elementos básicos serían equivalentes a letras químicas que se combinan y forman genes, que en conjunto constituyen el genoma del individuo.

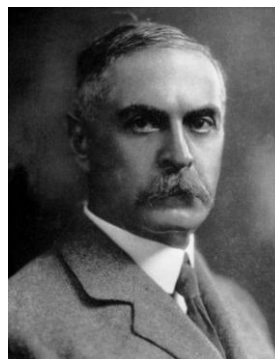


## Técnicas utilizadas en Hematología Forense

### TÉCNICAS

El rastreo hemático en la práctica forense en muchas ocasiones aporta a los tribunales elementos de prueba muy importantes tanto para señalar si una mancha de sangre recogida del lugar de los hechos puede provenir de la víctima o del victimario, o indicar con mayor certeza que no hay similitud entre la sangre hallada y la de la víctima o su asesor.

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



No se trata solamente del grupo sanguíneo de una persona o de sus posibles patologías, para poder diferenciar plenamente a un individuo de los demás es necesario el trabajo de laboratorio con una muestra encontrada durante el rastreo hemático. Los procesos que se pueden seguir son:

#### 1) Determinación del grupo sanguíneo en sangre fresca

##### 1.1 Recolección y preparación de las muestras sujetas a estudio.

###### 1.1.1 En personas vivas.

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

###### 1.1.2 En cadáveres.

- Tomar 5 ml de sangre de una arteria o vaso grueso, o bien de la cavidad cardiaca teniendo cuidado de que no se contamine con tejido adiposo
- Separar el paquete globular por centrifugación
- Lavar el paquete globular<sup>3</sup> tres veces con solución salina fría, fresca y estéril
- Hacer una suspensión de esos glóbulos al 2% en solución salina para determinaciones en tubo y al 5% cuando se utilice placa

<sup>3</sup> Esto significa: depositar una pequeña cantidad de eritrocitos en el fondo del tubo; llenarlo con solución salina; mezclar invirtiendo el tubo suavemente varias veces, centrifugar y desechar el sobrenadante.

### **1.1.3 En coágulos**

- a) Exprimir cuidadosamente el coágulo contra las paredes de un tubo de ensayo de 13 X 100, apoyándonos con un aplicador de madera
- b) Lavar lo extraído tres veces con solución salina
- c) Por último, hacer suspensiones al igual que los casos anteriores

## **1.2 Metodología**

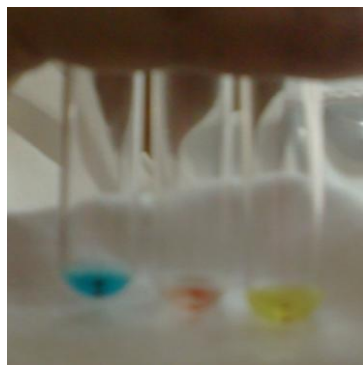
El mayor grado de confiabilidad se obtendrá si se realiza la prueba en tubo, pero es prudente emplear las dos técnicas. Para caracterizar de una forma más completa una sangre, se requiere en ocasiones de la determinación de los grupos antigénicos M y N. en ese caso se procede de forma idéntica que en los procedimientos siguientes, sólo que usando reactivos correspondientes a ese grupo sanguíneo.

### **1.2.1 Material empleado**

- a) Centrifuga calibrada a 3400 rpm
- b) Tubos de ensayo de 12 X 75
- c) Laminillas portaobjetos o placas hemoclasificadoras
- d) Pipetas pasteur
- e) Bulbos de goma
- f) Aplicadores de madera
- g) Sueros hemoclasificadores para el sistema ABO

### **1.2.2 Determinación del grupo en tubo**

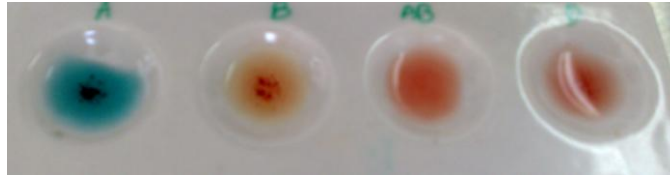
- a) Preparar suspensiones de glóbulos rojos al 2% en solución salina
- b) Colocar una gota de cada antisuero en un tubo cada uno, previamente rotulado
- c) Añadir a cada tubo una gota de la suspensión de eritrocitos preparada en a)
- d) Mezclar y centrifugar el contenido de los tubos durante 15 segundos, excepto del marcado como Rh, el cual se centrifugará 90 segundos
- e) Agitar suavemente para desprender el botón globular y observar la presencia o ausencia de aglutinación



### **1.2.3 Determinación del grupo en placa**

- a) Preparar suspensiones de eritrocitos al 5% en solución salina
- b) Colocar una gota de antisueros en cada pocito de la placa previamente rotulada
- c) Añadir sin mezclar y a un lado de las gotas de antisueros, una gota de la suspensión elaborada en a)
- d) Mezclar la suspensión de eritrocitos y el antisuero con ayuda de un aplicador

e) Observar macro y microscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación a los 30 segundos



### 1.3 Interpretación de los resultados

Si se observa aglutinación en el tubo o pocito A, la sangre corresponderá a ese grupo. De aglutinar en el tubo o pocito B, la sangre será grupo B. La presencia de aglutinación en el tubo o pocito D indicará que el factor Rh es positivo, y de lo contrario (no hay aglutinación) será rh negativo. Cuando no aglutina ni el tubo o pocito A ni el B, el tipo de sangre es O.

## 2) Determinación del grupo sanguíneo en manchas de sangre seca

En muestras de sangre fresca, el problema es más simple ya que se reduce a evidenciar la presencia de los antígenos de los eritrocitos mediante reacciones de aglutinación con antisueros específicos.

En manchas de sangre seca, las células se han roto y por lo tanto las pruebas de aglutinación directa no son viables; sin embargo, los antígenos del sistema ABO no se desnaturalizan tan rápidamente debido a la sequedad y sobreviven por algún tiempo, conservando la capacidad de aglutinación antes mencionada. La formación de la reacción antígeno-anticuerpo es la base de todos los métodos empleados en la detección de antígenos en el estroma de las células rojas de las manchas de sangre seca.

El método tradicional de absorción-inhibición fue utilizado durante varios años con ese fin, pero es menos confiable comparado con otras técnicas modernas, como la de absorción-elución.

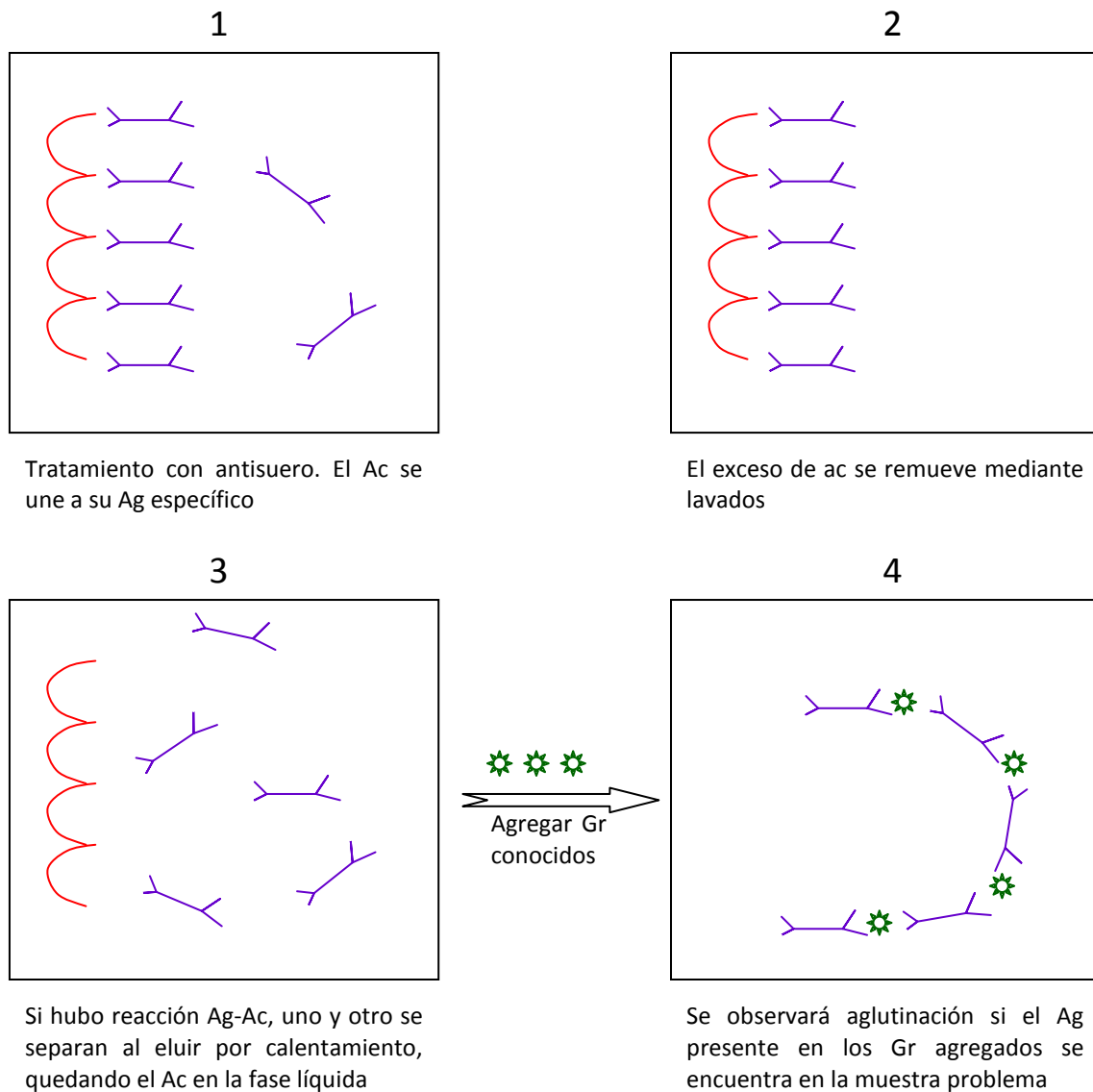
Cuando las muestras de sangre seca se retienen sobre un soporte adecuado (ejemplo: fibras textiles), las partículas que se adhirieron, conservan de forma eficiente el material antigénico.

Ésta última técnica está fundamentada en un primer proceso de absorción específica entre la mancha problema y su anticuerpo correspondiente; una vez completada la absorción, el anticuerpo sobrante se elimina lavando con solución salina fría. La reacción antígeno-anticuerpo se disocia calentando a 56 °C; el anticuerpo eluido se pone en contacto con glóbulos rojos lavados de propiedades antigénicas conocidas, finalmente la aglutinación indica la presencia de un antígeno de la misma especificidad que el de las células usadas como testigo conocido.

La técnica de absorción elusión es actualmente la más satisfactoria para la determinación del grupo del sistema ABO en manchas de sangre seca y también se sabe que puede usarse para los sistemas MN y Rh, aun cuando en el primero sus antígenos son más difícilmente detectables por la inespecificidad y mala calidad de los antisueros disponibles. Y en el caso del Rh se requiere mayor cantidad de muestra por tener que estudiarse el Rh propiamente dicho y los otros grupos del sistema.

La técnica de absorción-inhibición debe ser empleada de todas maneras simultáneamente a la anterior para la determinación de grupo en manchas de sangre, y por otra parte es importante señalar que es el procedimiento de elección en la

determinación de grupo en saliva y semen, fluidos orgánicos en los que el antígeno se encuentra en forma soluble.



## 2.1 Técnica de absorción-elución para la determinación del grupo sanguíneo en el sistema ABO

La determinación de grupo sanguíneo en una muestra de sangre seca impregnada en ropas u otras superficies similares es un caso que se presenta frecuentemente en los laboratorios periciales. Para llevar a cabo tal estudio, la técnica más conveniente es la de absorción-elución.

### 2.1.1 Material empleado

- Sueros hemoclasificadores para el sistema ABO
- Metanol
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- $\text{NaCl}$



- f) Tubos de ensayo de 13 X 10
- g) Pipetas pasteur
- h) Bulbos de goma
- i) Tijeras
- j) Aplicadores de madera
- k) Guantes desechables
- l) Tela estéril y sin apresto, de algodón
- m) Gradillas para tubos de ensayo de 13 X 100
- n) Refrigerador
- o) Centrífuga
- p) Baño maría a temperatura constante
- q) Horno



### 2.1.2 Reactivos

- a) Búfer salino (solución estándar)
  - Solución 1/15 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (9.47 gr/ℓ) (Solución 1)
  - Solución 1/15 M de  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  (9.08 gr/ℓ) (Solución 2)
- b) Búfer final.
  - 72 ml de solución 1 + 50 ml de solución 2 + 8.5 g de NaCl.
  - Aforar a 1000 ml en matraz volumétrico (pH= 7.2)
- c) Preparación de los antisueros
  - Los sueros anti A y anti B se combinan por separado con 10 ml de buffer final por cada 1 ml de antisuero.
  - Los sueros anti AB y anti D se utilizan sin diluir

### 2.1.3 Metodología

- a) Cortar cuatro pedazos de tela impregnada con sangre problema<sup>4</sup> de 3 mm<sup>2</sup> y colocar cada fragmento en un tubo de ensayo
- b) Los tubos se acomodan en la misma columna de una gradilla (columna problema)
- c) De igual forma se coloca otra serie de tubos a los cuales se les introduce fragmentos de telas impregnados con sangre de grupo conocido (columna testigo)
- d) Se colocará en la gradilla una última columna de tubos conteniendo pedazos de tela limpios de sangre, dicha columna se conocerá como control
- e) Fijaremos las manchas de sangre empapándolas con metanol durante al menos 15 minutos. Transcurrido tal lapso eliminarlo totalmente
- f) Agregar a la hilera anti A dos gotas de suero anti A, y así sucesivamente con todos los antídotos y filas
- g) Refrigerar a 4 °C durante toda la noche
- h) Lavar 6 veces con solución salina o hasta que se obtenga una solución clara e incolora
- i) Añadir a cada tubo dos gotas de solución salina a temperatura ambiente
- j) Colocar la gradilla a 56 °C en el baño maría de 10 a 15 minutos
- k) Sacar cada trozo de tela auxiliándose de un aplicador de madera distinto para cada tubo

<sup>4</sup> Si la mancha no se encuentra sobre tela, absorberla con solución salina en pequeños trozos de tela esterilizada de algodón blanco sin apresto.

- l) Agregar una gota de glóbulos lavados al 2% (del grupo A a los tubos de la hilera anti A, y así sucesivamente)
- m) Centrifugar durante 30 segundos a 3400 rpm
- n) Observar la presencia o ausencia de aglutinación

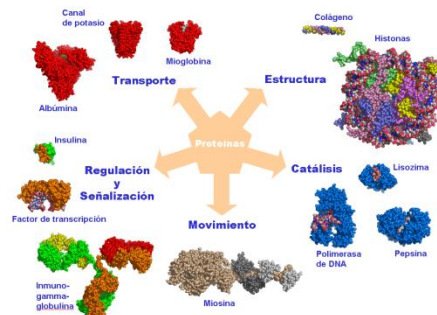
## 2.2 Interpretación de los resultados

Si se observa aglutinación en el tubo de anti A y anti AB, la sangre corresponderá al grupo A. De aglutinar en el tubo de anti B, y anti AB, la sangre corresponderá al grupo B. De aglutinar en el tubo de anti A, anti B, y anti AB, la sangre corresponderá al grupo AB. La presencia de aglutinación en el tubo anti D indicará que el factor Rh es positivo, y de lo contrario (no hay aglutinación) será rh negativo. Cuando no aglutina ni el tubo anti A, anti B ni el anti AB, el tipo de sangre es O.

## 3) Determinación de enzimas y proteínas en manchas de sangre

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

Estas sustancias son las enzimas, algunas de ellas con un gran polimorfismo interesante desde el punto de vista forense<sup>5</sup>, cuando son separadas en los componentes proteínicos llamados isoenzimas, de las cuales son particularmente importantes: la Fosfoglucomutasa (PGM), adenilatokinasa (AK), fosfatasa ácida eritrocítica (EAP), etearasa (D EsD), y entre las proteínas cobra particular interés la haptoglobina (Hp), fundamentalmente porque sobrevive determinado tiempo (no muy corto) en manchas de sangre seca.



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

Ahora bien, uniendo los resultados inmunológicos a la combinación de estas proteínas (llamadas también marcadores genéticos), se obtienen las tablas de distribución en la población que dan pie para aumentar las probabilidades de exclusión o márgenes de error.

El pionero de la aplicación de del método de separación de enzimas en hematología forense fue Culliford, del laboratorio de la Policía Metropolitana de Londres, quien determinó que pueden ser satisfactoriamente detectadas en manchas

<sup>5</sup> BALTHAZARD, Víctor. "Manual de Medicina Legal", Editorial Salvat. 6ª edición, Barcelona, España, 1945

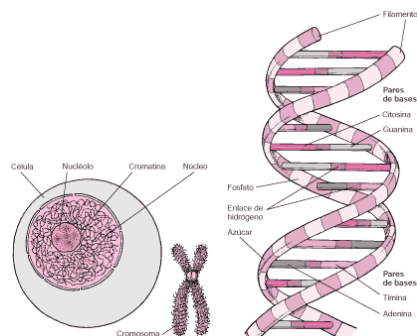
de sangre mediante procedimientos electroforéticos sobre capas de gel de almidón, siempre y cuando se cuente con cantidad suficiente de muestra problema en buen estado de conservación, ya que la posibilidad de encontrarlas va decreciendo con la desecación en el siguiente orden: Sistema ABO, Rh, Hp y PGM, esto es, que los antígenos del primer sistema pueden durar años en condiciones de se evidenciados<sup>6</sup>, los del sistema Rh algunos meses; las Hp semanas, y por último las PGM tan sólo después de unos días.

Posteriormente a los estudios de Culliford<sup>7</sup> y sus colaboradores sobre el gel de almidón, es Grunbaum<sup>8</sup> de la Universidad de Berkeley en California, quien se preocupa por la investigación de marcas genéticas y a él se deben las técnicas de electroforesis en Microzona y sobre tiras de acetato de celulosa, que requieren de un tiempo menor en su resolución.

#### 4) Pruebas de ADN

Las pruebas de ADN para determinar la paternidad se realizan comparando la secuencia de ADN del padre, del niño/niña y de la madre. La combinación de las secuencias de ADN del padre y de la madre debe dar como resultado la secuencia del niño/niña; solo de esta manera se tendrá una seguridad, generalmente de más del 99%, sobre la paternidad del menor de edad.

Los márgenes de error dependerán del tipo de muestra. Las muestras no estándar no siempre garantizan la obtención de un perfil de ADN.



En algunos casos lo que se busca determinar es la línea genética materna, en este caso se recurre al ADN mitocondrial que la madre transmite al hijo/hija y que a su vez es transmitido por los mismos a sus descendientes. Este tipo de pruebas sirve para determinar linajes en varias generaciones y fue utilizado para conocer como ha evolucionado el genoma humano desde la aparición del Homo sapiens, a través de la Eva mitocondrial, la primera madre que dio origen a la humanidad moderna. De ahí que, en cierto nivel generacional, grandes poblaciones humanas comparten una misma ancestría y ADN mitocondrial.

##### 4.1 Procedimiento

a) *Revisión de la muestra.* Las muestras que llegan al laboratorio de genética son revisadas por un técnico que aparta la muestra que ocupará y guarda el resto.

<sup>6</sup> ADAMS, Elizabeth, et. al., "Phosphatases in body fluids: The differentiation of semen and vaginal secretion"; Metropolitan Forensic Laboratory. London Forensic Science 3, 1974, pp. 57-62.

<sup>7</sup> ADAMS, Elizabeth, *open cit.*

<sup>8</sup> ERIC; S., "DNA fingerprints on trial lander in nature", Vo. 339, no. 6225, junio 15, 1989, pp. 501-505

b) *Extracción de ADN.* A través de proceso químico y mediante la utilización de reactivos se extrae el ADN de todas las células. Después de extraer y purificar, el ADN es entonces combinado con 16 diferentes primers de ADN dirigidos a ubicaciones específicas (loci) en la molécula de ADN para su amplificación. Los segmentos de ADN en estos loci se denominan marcadores, porque sirven como marcas identificatorias de los individuos.

c) *Amplificación.* La mezcla del primer de ADN pasa a través de ciclos de calor y frío para amplificar los marcadores en un proceso de replicación parecido al de una copia xerox, esto en una máquina conocida como PCR (reacción en cadena de la polimerasa, traducción de polymerase chain reaction) se multiplica o aumenta cada muestra de ADN extraída. También se amplifica varios millones de veces y analiza sofisticadamente mediante la técnica STR (traducido del inglés “short tandem repetitions” es: repeticiones cortas en tándem). La metodología usada permite un poder de determinación de paternidad de 99.99% mientras que el poder de exclusión es de 100%.

d) *Detección.* Una vez que los marcadores han sido amplificados, son detectados por instrumentos de alta sensibilidad, que determinan el tamaño de los marcadores en cada uno de los locus de ADN sometido a prueba.

Cada locus de ADN es comprimido por dos alelos, o copias del marcador uno heredado de la madre y otro heredado del padre. Por ello, el informe de perfil de ADN, también llamado informe de tipificación de ADN, listará típicamente dos tamaños de marcadores para cada locus. La combinación de tamaños de los 16 marcadores representa un perfil de ADN que es único para ese individuo.

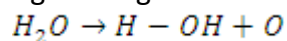
e) *Comparación y estadística.* Se colocan todas las muestras de ADN en máquinas especiales para determinar a que persona pertenecen. La comparación es para establecer diferencias y se proyectan estadísticas en las que se refleja la posibilidad de que el ADN encontrado pertenece a la persona estudiada.

## Técnicas de orientación para la identificación de la sangre

### **5) Técnica de Bencidina o Adler**

#### **5.1 Fundamento químico**

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



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

Esta técnica tiene una sensibilidad de 1,300,000 a 500,000. Un resultado negativo excluye la presencia de sangre; si la reacción es positiva requiere, como toda técnica de orientación, del empleo de reacciones de confirmación ya que se pueden obtener falsas reacciones positivas con otras sustancias que tengan actividad semejante a las peroxidasas o bien con otros materiales oxidantes como las manzanas, espárragos, frijol, zarzamora, entre otros.

## 5.2 Preparación del reactivo

### a) Solución de bencidina

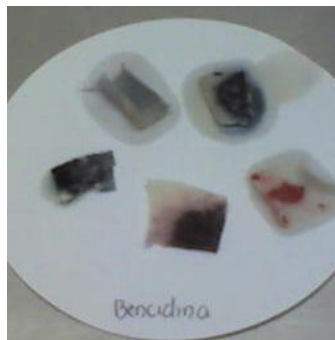
0.25 g. de bencidina se disuelven en 175 ml de etanol y se añaden 5 a 10 gotas de ácido acético glacial. Se guarda en un frasco gotero ámbar, en refrigeración.

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



## 5.3 Procedimiento:

- Humedecer un hisopo con agua destilada y frotarlo sobre la mancha problema.
- Añadir al hisopo 1 ó 2 gotas de solución bencidina, después de unos momentos de observar que no de coloración con ésta.
- Poner la misma cantidad de  $H_2O_2$  sobre el hisopo.
- En caso positivo aparecerá rápidamente una coloración azul.



## 6) Técnica de la fenolftaleína o de Kastle-Mayer

### 6.1 Fundamento químico

Esencialmente la rige el mismo principio que se mencionó en la reacción de Adler. La diferencia estriba:

- La fenolftaleína debe ser reducida previamente a fonolftaleína incolora y este reactivo, por su labilidad, debe ser guardado en refrigeración en frasco ámbar.
- Se trabaja en medio alcalino en vez de un medio ácido.
- Se efectuará un calentamiento previo a 100 °C durante un minuto.

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

- Termolabilidad:** Se ha confirmado que las peroxidasas vegetales se inactivan por calentamiento a 100 °C . A la misma temperatura las peroxidasas de origen animal son estables. Un período de un minuto a 100 °C servirá para diferenciar una de otra.
- Tiempo:** Las peroxidasas de origen animal son muy estables, las manchas de sangre humana dan resultados positivos aún después de varios meses de haberse producido.

Cuando manchas de la misma edad pero de origen vegetal son tratadas de esta manera, dan resultado negativo.

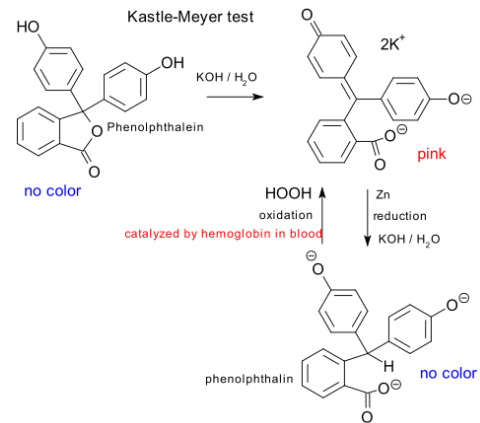
c) *pH*: las peroxidasas de las plantas reaccionan en medio ácido, pero no en medio alcalino. Por esta razón, ésta técnica. A pesar de esto debe efectuarse pruebas testigo sin añadir agua oxigenada a muestras previamente calentadas.

Esta técnica es mucho más sensible que la de la bencidina, siendo esta sensibilidad de 1: 1,000,000 a 10,000,000.

## 6.2 Preparación del reactivo

a) Solución de fenolftaleína:

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



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

b) Solución de trabajo:

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

c) Solución de agua oxigenada al 3%

## 6.3 Procedimiento

a) Humedecer un hisopo con solución salina, frotar la muestra problema y pasarlo a un tubo de ensaye con 2 ml de la misma solución.

b) Calentar un minuto a 100 °C

c) Añadir unas gotas del reactivo, esperar unos segundos y

d) Agregar agua oxigenada.

e) En caso positivo se obtendrá una coloración rosa brillante.



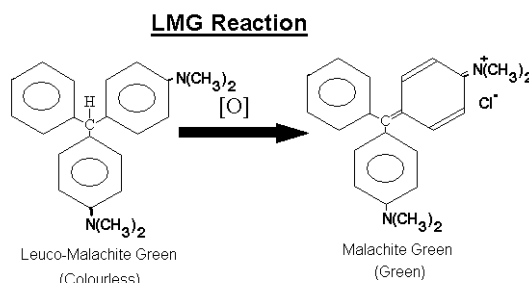
## 7) Técnica de leuco malaquita verde

### 7.1 Fundamento químico

Se basa, al igual que las anteriores en una reacción de oxidación y reducción. La estructura química de esta sustancia recuerda a la de la fenolftaleína. El prefijo leuco

se refiere a la forma reducida incolora; la forma leuco puede ser preparada por reducción de la malaquita verde.

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



### 7.2 Preparación del reactivo

- a) Se prepara una mezcla sólida que contenga: 0.32 g de perborato de sodio y 0.10 gr. De malaquita verde; se mezclan perfectamente y se guardan en frasco ámbar. Esta mezcla dura un año sin perder su estabilidad.
- b) El solvente se prepara diluyendo 6.6 ml de ácido acético glacial en 3.3 ml de agua destilada.
- c) Preparar el reactivo de trabajo, inmediatamente antes de usarlo, disolviendo la mezcla sólida a) en la solución b); si en el reactivo recién preparado llegara a observarse la más leve coloración verde, no deberá usarse.

### 7.3 Procedimiento

- a) La mancha sospechosa, se levanta con un hisopo humedecido en agua destilada
- b) Se le agregan unas gotas del reactivo recientemente preparado.
- c) En caso positivo se observará una coloración verde.

## 8) Técnicas espectroscópicas

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

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



En la investigación criminalística, no es suficiente con obtener el espectro de la oxihemoglobina, sino que es necesario someter la muestra en una marcha espectral. Algunos autores (Gisbert Calabuig) señalan lo siguiente:

- a) Se extrae la mancha de sangre con agua destilada
- b) Se filtra
- c) Se lleva al espectrofotómetro ultravioleta visible de doble haz, que permita realizar un barrido espectral con registro gráfico; la hemoglobina así estudiada registra bandas de absorción a 575, 540 y 412 nm
- d) Posteriormente, y a ese mismo tubo, se añaden unas gotas de reductor como el sulfhidrato de amonio recientemente preparado, formándose así el hemocromógeno, con el que se registran bandas de absorción con máximos a 559 y 530 nm

En la práctica forense cotidiana en el laboratorio de la PGJDF se ha comprobado que una mancha es de sangre con una metodología mucho más simple y rápida:

- a) Impregnar un pequeño trozo de 5x5 mm de tela limpia, sin apresto, de color blanco con la muestra problema.
- b) Colocar la muestra así obtenida en un tubo de ensaye y añadirle 5 ml de agua destilada, dejándola reposar durante 10 minutos para lograr una eficiente extracción; pasado este tiempo filtrar.
- c) Efectuar el barrido espectral en la zona de espectro visible; se obtendrán tres bandas de absorción; dos finas a 575 y 540 nm y una banda ancha a 412. Este espectro corresponde a la oxihemoglobina.
- d) Efectuar nuevamente la extracción de la muestra como se indica en el punto 2, pero utilizando en vez de agua destilada, 5 ml de una solución de ferricianuro de potasio al 0.5 %. Al realizar el barrido espectral en la región del visible, se obtendrá una banda a 630 nm banda que corresponderá a la metahemoglobina.
- e) Sobre la misma celda de muestra, añadir unos gránulos de cianuro de potasio; al efectuar el registro espectroscópico, deberá desaparecer la banda de la longitud de onda correspondiente a 630 nm y se obtendrá una banda a 540 nm debida a la formación de cianometahemoglobina.

Para realizar estas experiencias se utilizó un espectrofotómetro ultra violeta-visible, modelo DH-2<sup>a</sup> de doble haz y provisto de monocromador.

### 9) Técnica de luminol

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

- Solución A. Luminol 0.1 gr.  
Carbonato de sodio 1 gr.  
Agua destilada c.b.p. 100 ml.
- Solución B. Hidracina hidratada al 95% 01 gr.  
Agua destilada 100 partes



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

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



## Técnicas de confirmación

### **10) Cristales de hemina o de Teichman**

#### **10.1** Fundamento químico

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

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

#### **10.2** Preparación del reactivo

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

#### **10.3** Procedimiento

- a) Colocar la muestra problema en el centro de una laminilla de vidrio y poner encima de ella un cubreobjetos.
- b) Deslizar entre lámina y laminilla por capilaridad, unas gotas del reactivo de Teichman.
- c) Calentar lentamente y a baja temperatura la laminilla hasta evaporación.
- d) Dejar enfriar y observar al microscopio.
- e) En caso positivo se observarán cristales romboidales de color café oscuro.

### **11) Prueba de Takayama (hemocromógeno)**

#### **11.1** Fundamento químico

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

Tales compuestos incluyen otras proteínas, hidróxido de amonio, cianuro, nicotina y piridina y los productos resultados se llaman hemocromógenos. Los cristales pueden formarse tanto en medio ácido como alcalino; sin embargo, el reactivo de Takayama es de naturaleza alcalina.

##### **11.1.1** *Mecanismo de reacción:*

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

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

#### **11.2** Preparación del reactivo de Takayama

Mezclar:

- a) Una parte de solución saturada de glucosa.
- b) Una parte de solución de hidróxido de sodio al 10%

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

d) Dos partes de agua destilada

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

### 11.3 Procedimiento

a) Colocar una pequeña cantidad de muestra problema entre una laminilla portaobjetos y un cubreobjetos.

b) Deslizar por capilaridad unas gotas del reactivo entre lámina y laminilla.

c) Calentar la laminilla a baja temperatura durante 30 seg.

d) Observar al microscopio. En caso positivo se observarán cristales romboidales de color rosa alrededor de la muestra.

## 12) Técnicas de determinación del origen de la sangre

La técnica de elección para determinar si una mancha de sangre es de origen humano, es la reacción de las precipitinas descubierta en 1900 por Uhlenhuth.

### 12.1 Fundamento de la técnica

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

Esta reacción atígeno-anticuerpo está influida por varias fuerzas, interactuando entre los factores reaccionantes como lo son: las fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacción de dipolos, atracción entre los antígenos no polares y la superficie del anticuerpo, y la atracción electrostática. La reacción misma tiene lugar en varias etapas. Inicialmente se forma un complejo antígeno- anticuerpo soluble; conforme la reacción prosigue, ese complejo empieza a unirse y forma una tupida red compuesta de moléculas de anticuerpo bivalente y moléculas de antígeno polivalente. Esta Formación crece rápidamente formando partículas del tamaño suficiente como para ser insolubles y formar un precipitado visible. Debe tenerse en mente que para que la reacción se lleve a cabo se requiere que la concentración del antígeno y del anticuerpo sean equivalentes.

La técnica de precipitinas en tubo o en capilar, tiene la ventaja de ser rápida y sencilla pero es necesario tener una muestra clara. En ella debe efectuarse una cuidadosa estratificación en donde la capa de la solución del antígeno se encuentra sobre la preparación del anticuerpo. La precipitación sobre gel tiene una ventaja de poder realizarse con el extracto de una mancha de sangre aunque éste sea turbio, y requiere de muy pequeña cantidad de muestra, pero tiene como desventaja el emplear varias horas para que se efectúe la difusión.

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

#### 12.1.1 Factores que afectan la reacción de las precipitinas.

Son varios: la edad de la muestra; su exposición al aire, a la luz solar, a la humedad y a las altas temperaturas; el grado de putrefacción y la contaminación con compuestos químicos, tales como detergentes.

Además la reacción debe efectuarse en condiciones óptimas de temperatura, de pH, de solubilidad de la muestra y de dilución del extracto obtenido de ella. Especialmente la edad y la putrefacción causan degradación de las proteínas de la sangre; la exposición al aire, a la luz solar y a la humedad a menudo producen cambios por oxidación.

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

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

### **13) Técnica de precipitinas en capilar**

#### **13.1 Reactivos**

- a) Antisuero humano precipitante
- b) Solución salina fisiológica

#### **13.2 Procedimiento**

- a) Cortar un pequeño fragmento de la mancha y extraer en un tubo de ensaye de 12 x 75 cm. con unas gotas de solución salina fisiológica; el tiempo requerido dependerá de la naturaleza de la mancha; normalmente se requieren de 1 a 2 minutos. Si la solución está turbia es conveniente centrifugar y utilizar el sobrenadante.
- b) Dos gotas del extracto diluido se colocan en un tubo capilar (de tal forma que el líquido humedezca la pared del tubo por el cual es preferible hacer esto con el capilar inclinado). Una cantidad igual de antisuero se absorbe en el mismo capilar de una manera que quede abajo del extracto de la muestra. El tubo se fija perpendicularmente sobre un soporte.
- c) La observación se hace con luz indirecta y sobre fondo oscuro, la aparición de un anillo de precipitación en la interfase de los dos líquidos indica reacción positiva.
- d) El resultado es considerado positivo si la precipitación aparece antes de 20 minutos, después de ese tiempo el resultado deja de ser confiable.

Es conveniente una vez hecha la extracción, determinar el pH con papel indicador; si la reacción no es neutra, neutralizar: NaOH al 0.1% si la reacción es ácida hasta lograr un pH neutro, o con ácido clorhídrico al 0.1 % si es alcalina. Si existen partículas en suspensión o turbidez, la muestra deberá centrifugarse hasta obtener un líquido transparente.

La dilución de la muestra problema deberá tener una concentración de 1 a 1000 misma que se controlará con un testigo a la misma dilución. No se recomienda hacer la extracción en medio tibio o caliente.

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

### **14) Técnica de inmunolectroforesis cruzada para identificar sangre humana**

#### **14.1 Fundamento**

Esta técnica inmunoquímica se basa en las reacciones que se efectúan entre un antígeno que emigra anódicamente y un anticuerpo que emigra hacia el cátodo

durante una electroforesis. Sobre una placa de agarosa, se hacen horadaciones en pares; el antígeno (seroalbúminas y alfa y beta globulinas) se coloca en una de ellas y el anticuerpo (gamma globulinas) en la otra; una vez terminada la electroforesis aparecen bandas visibles de precipitación entre las perforaciones pares de los materiales proteínicos específicos.

#### **14.2 Material y equipo**

- a) Cámara de electroforesis
- b) Fuente de poder con control de voltaje hasta 500 v, 20 ma y control de tiempo.
- c) Puentes de papel filtro u otro material absorbente.
- d) Perforador y extractor de gel aproximadamente 2 mm de diámetro.
- e) Micropipetas graduadas
- f) Portaobjetos desgrasados y pulidos.

#### **14.3 Reactivos:**

- a) Suero antihumano completo
- b) Agar
- c) Ácido dietilbarbitúrico
- d) Barbital sódico
- e) Lactato de calcio

#### **14.4 Preparación de reactivos:**

- a) Buffer para la cámara de electroforesis (pH 8.6).
  - Ácido dietilbarbitúrico 1.38 g
  - Barbital sódico 8.76 g
  - Lactato de calcio 0.384 g
  - Agua deionizada c.b.p. 1000 ml
- b) Buffer para el gel (pH 8.6)
  - Ácido dietilbarbitúrico 1.1 g
  - Barbital sódico 7.0 g
  - Lactato de calcio 1.0 g
  - Agua desionizada c.b.p. 1000 ml

#### **c) Gel**

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

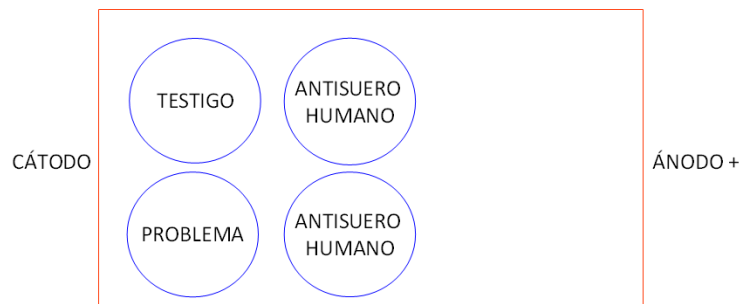
#### **14.5 Preparación de las placas**

Sobre una superficie y perfectamente nivelada, colocar los portaobjetos y con la solución de gel, lo suficientemente caliente para facilitar su aplicación, dejar caer con una pipeta y partiendo del centro de la placa 2.5 ml de gel, teniendo cuidado de que su distribución en placa sea uniforme. Una vez solidificado el gel, acomodar las placas en una caja de plástico en cuya base se ha colocado una gasa húmeda para evitar la desecación de gel; conservarlas en refrigeración un mínimo de una hora hasta el momento de su uso, las placas pueden almacenarse en estas condiciones aproximadamente durante un mes. También se pueden almacenar en el refrigerador tubos de ensayo conteniendo 7 ml de gel (c), para ser utilizados en el momento en que

se requieran, licuándolos por calentamiento y aplicando el gel sobre las laminillas portaobjetos como se indica al principio de este apartado.

#### 14.6 Procedimiento:

- a) Colocar en uno de los compartimientos laterales de la cámara de electroforesis 100 ml de Buffer a)
- b) Colocar los puentes de papel filtro u otro material absorbente adecuado en los compartimientos laterales.
- c) Preparar el extracto de muestra o muestras problema, suspendiéndolas un mínimo de 5 minutos en el buffer b)
- d) Colocar muestras problema, antisuero y testigo, como se ilustra a continuación, colocando en cada horadación de 8 a 10 lambdas.



- e) Una vez aplicadas las muestras contra su antisuero específico, se coloca la placa en la cámara de electroforesis, poniendo especial atención en que la polaridad sea la correcta.
- f) Trabajar a 150 V. durante 45 minutos.
- g) *Interpretación:* Una vez terminado el periodo de corrimiento programado, observar y en caso positivo las bandas de precipitación se harán visibles en la zona comprendida entre el antígeno y el anticuerpo.

### OTRAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

#### SEMEN

El sustrato para la coagulación del semen está constituido por material proteinoide secretado por las vesículas seminales; en tanto que las enzimas licuantes (fibrolisina y fibrogenasa) solo hacen contacto con el sustrato durante la eyaculación.

Contiene hormonas, fructosa, fosfatasa ácida y alcalina, espermita, colina, ergotioneína, ácido cítrico, lípidos, proteínas, hilauronidasa, prostglandina, ribosa, inositol, sorbitol, flavinas, aminas, albúmina, alfa, gamma y beta globulinas, lecitina, ácidos grasos, fosforilcolina, zinc, calcio y antígeno soluble de grupo sanguíneo.

Las sustancias del grupo ABO solubles en agua, está presente de los individuos excretores (aproximadamente el 85% de la población en México) y pueden determinarse por el método de absorción inhibición, ya que se encuentran en grandes concentraciones en esos individuos.

## 15) Determinación del grupo del sistema ABO en semen

### 15.1 Preparación de los reactivos

- Suero anti A. Diluir 3.5 ml de antisuero con 450 ml de buffer salino, se deben utilizar sueros selectos
- Suero anti B. Diluir 1 ml del suero con 450 ml de buffer salino
- Anti H lectina. Se usa como viene el producto comercial
- Buffer salino:
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1/15 anhidro molar (4.47 g/ ℓ)
  - $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  1/15 anhidro molar (9.09 g/ ℓ)
- Solución final. 72 ml de a) + 28 ml de b) + 8.5 g de NaCl disueltos en 1 ℓ de agua destilada, para obtener un pH de 7.2

### 15.2 Preparación de las células testigo

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

### 15.3 Procedimiento

- Fragmentos de tela de 1X1 mm se impregnan con la muestra problema y con los testigos. Cada uno de los fragmentos se coloca en los tubos respectivos.
- Colocar tres gotas de anti A en su hilera respectiva, tres gotas de anti B en su hilera, y así sucesivamente
- Agitar vigorosamente
- Dejar toda la noche en refrigeración a 4° C para la absorción
- Centrifugar
- Remover el sobrenadante y colocarlo en una lámina hemoclasificadora
- Agregar una gota de suspensión de eritrocitos al 2% de A en cada tubo de la hilera anti A, y así con cada uno
- Agitar mecánicamente durante 10–12 minutos y esperar 9 minutos más
- Leer microscópicamente los resultados

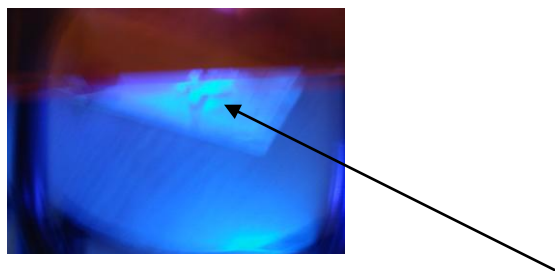
### 15.4 Interpretación

- Si aglutina en anti A y anti B pero no en anti H el resultado es O
- Si aglutina en todos menos en anti A, el grupo es A
- Si aglutina en todos menos en anti B, el grupo es B
- Si solo aglutina en anti H, el grupo es AB

## Técnicas de orientación para la determinación de semen

### 16) Fluorescencia a la luz UV

El líquido espermático contiene flavinas en alta concentración y son las responsables de adquirir fluorescencia blanco verdosa cuando las manchas seminales son observadas a luz UV, por ello este método es útil para la localización de huellas en el lugar de la investigación y en prendas. En últimas fechas se le da el mismo uso al rayo láser.



## 17) Técnica de la fosfatasa ácida

### 17.1 Fundamento químico

La fosfatasa ácida está presente tanto en vegetales como animales, hidrolizando esteroides alifáticos y aromáticos del ácido ortosfórico.

Se encuentra en el semen en concentraciones de 20 a 400 veces mayores que en otros fluidos, por ello, se sospecha de una sustancia al detectarse cantidades elevadas de dicha sustancia.

Por lo anterior, es necesario ajustar los reactivos para que sólo detecten concentraciones mayores a 20 unidades. Su detección se basa en una reacción cromática de la multicitada enzima, la cual reacciona con el reactivo 1-naftilfosfato de calcio y queda libre de alfa naftol; este reacciona con sulfato de dianisiltetrazonio y forma un colorante azoico violeta intenso.

### 17.2 Preparación del reactivo

*Solución 1* → 23 g de NaCl + 2 g de Acetato de Na H<sub>2</sub>O + 0.5 ml de ácido acético glacial + 90 ml de agua destilada

*Solución 2* → 50 g de 1-naftil fosfato de calcio + 30 g de sulfato de dianisil tetrazonio + 1 ml de solución acuosa al 10% de laurel sulfato de sodio

Mezclar ambas soluciones, filtrar y envasar en frasco ámbar refrigerado a 4° C. esta solución se conserva durante un año.

Debido a que actualmente ya no se fabrica el sulfato de dianisiltetrazonio, se ha sustituido por:

*Solución 1* → 1 g de orto dianilsidina tetrazotizada + 20 g de acetato de sodio + 10 ml de ácido acético + 100 ml de agua destilada

*Solución 2* → 0.8 g de alfa naftil fosfato de sodio + 10 ml de agua destilada

Mezclar 10 ml de solución 1, 89 ml de agua destilada y 1 ml de solución 2. Refrigerar en frasco ámbar.

### 17.3 Procedimiento

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

b) Se colocan sobre una lámina de vidrio en la que previamente se habrá anotado: mancha problema, blanco y control; inmediatamente, con una pipeta Pasteur, se agregan 10 gotas de reactivo a cada una de las muestras.



#### 17.4 Interpretación de los resultados

La aparición de un color violeta intenso en la muestra problema dentro de un tiempo no mayor a 5 minutos, indicará la presencia de fosfatasa ácida en cantidades mayores a 20 U.K.A., y por lo tanto, la muy probable presencia de semen; en el control siempre aparecerá el color señalado, tonalidad que no debe aparecer en el blanco.



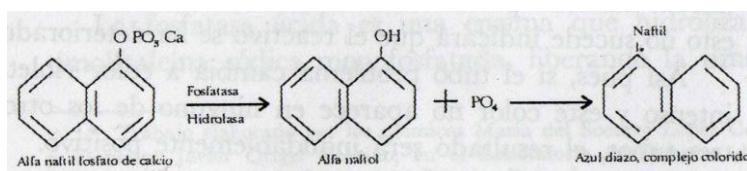
### 18) Técnica por inhibición de la fosfatasa ácida seminal y vaginal con ácido l-tartárico

#### 18.1 Fundamento

Este procedimiento reportado por Willot y revisado por Stone, señala que ambas fosfatasas son inhibidas por el ácido l-tartárico.

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

El principio es similar al anterior, el sustrato en este procedimiento es el alfa naftil fosfato de calcio:



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

#### 18.2 Preparación de los reactivos

**Solución 1.** Buffer de acetatos → 23 g de NaCl + 2 g de acetato de sodio + 0.5 ml de ácido acético glacial + 90 ml de agua desionizada

Disolver perfectamente los reactivos en agua, ajustar el pH a 4.9 y el volumen final a 100 ml con agua desionizada. Refrigerar en frasco ámbar.

**Solución 2.** Sustrato → 0.30 g de alfa naftil fosfato, sal de calcio

Colocar los 0.30 g del reactivo anterior en un frasco gotero color ámbar de 30 ml de capacidad; añadir 20 ml del buffer de acetatos, agitar hasta disolución y almacenar en refrigeración. Su duración es de un mes.

**Solución 3.** Colorida → 0.30 g de naftil diazo azul B + 20 ml de solución salina estéril



Envasar en frasco gotero ámbar y almacenar en refrigeración. Su duración es de dos meses.

*Solución 4.* Inhibidor → 3 g de ácido l-tartárico + 35 ml de NaOH 1 N + 200 ml de agua desionizada

Disolver el ácido l-tartárico en un poco de agua y agregar los 35 ml de NaOH 1 N; agitar hasta disolución. Ajustar el pH a 4.9, agregando NaOH 1 N si el pH es demasiado bajo y ácido l-tartárico si está alto; añadir agua desionizada hasta aforar el volumen a 200 ml. Almacenar en frasco gotero ámbar y refrigerar. Renovarse cada dos meses.

### 18.3 Procedimiento

a) Cortar un trozo de 1X1 cm del material que contenga la mancha problema; colocarla en un tubo de ensaye con tapón de rosca de 15 ml de capacidad y agregar 3 ml de agua desionizada. Marcar el tubo con la letra P

b) Cortar un trozo de 1X1 cm para el control, colocarla en un tubo de ensaye con tapón de rosca de 15 ml de capacidad y agregar 3 ml de agua desionizada. Marcar el tubo con la letra C

c) Después de 15 minutos preparar 4 tubos de 7 ml así:

P (problema) → 3 gotas de sustrato

Pi (problema inhibidor) → 3 gotas de sustrato + 3 gotas de inhibidor

C (control) → 3 gotas de sustrato

Ci (control inhibidor) → 3 gotas de sustrato + 3 gotas de inhibidor

Agitar cada tubo mezclando bien.

d) Poner 0.3 ml del tubo P a los tubos P y Pi. Mezclar

e) Pasar 0.3 ml del tubo C a los tubos C y Ci. Mezclar

f) Agregar 3 gotas de la solución naftil diazo azul B a cada uno de los 4 tubos

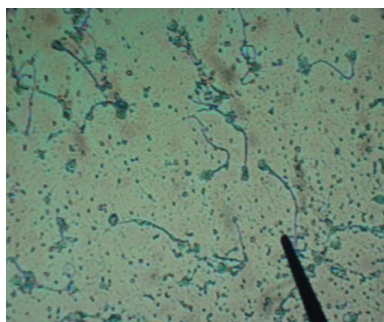
### 18.4 Interpretación

Si el tubo marcado como P cambia de color café marrón a violeta intenso en 30 segundos o menos, mientras que Pi e el mismo tiempo toma un color amarillo pálido, el resultado es positivo. Los tubos C y Ci deben también permanecer de color amarillo claro, de lo contrario, el reactivo se ha deteriorado.

Si el tubo problema cambia a color violeta intenso, no así los otros tres tubos, el resultado será positivo.

### Técnicas de confirmación

La certeza de que una muestra corresponde a semen se da sin lugar a dudas con el hallazgo de espermatozoides en el espécimen analizado. Para su mejor visualización al microscopio, se presentan a continuación dos de sus técnicas de tinción.



## 19) Tinción de Gram

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

### 19.1 Preparación de los reactivos

a) Colorante de Cristal violeta

*Solución A* → 2 g de cristal violeta + 20 ml de alcohol etílico absoluto

*Solución B* → 0.8 g de oxalato de amonio + 80 ml de agua destilada

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

b) Solución iodo iodurada (lugol) → 1 g de iodo metálico + 2 g de ioduro de potasio + 300 ml de agua destilada

Diluir 1:15 en agua destilada antes de usarla

c) Decolorante → Alcohol etílico absoluto 95%

d) Colorante de safranina → 10 ml de safranina (2.5% en alcohol etílico) + 100 ml de agua destilada

### 19.2 Procedimiento

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



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

b) Lavar con agua destilada

c) Cubrir nuevamente el portaobjetos con la solución b) durante un minuto, tirar el exceso de lugol y decolorar con agitación usando el reactivo c) durante 30 segundos

d) Secar con papel filtro y cubrir la preparación con el reactivo d), dejarlo actuar de 10 a 30 segundos

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

### 19.3 Interpretación

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

## 20) Tinción con azul de metileno

### 20.1 Colorante azul de metileno

1 g de azul de metileno + 30 ml de alcohol etílico absoluto (95%) + 100 ml de agua destilada + 5 ml de ácido acético glacial

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

### 20.2 Procedimiento

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

a) Cubrir la preparación con el colorante azul de metileno



b) Dejarlo actuar durante un minuto

c) Retirar el colorante y lavar con agua



d) Observar al microscopio con aceite de inmersión, e igual objetivo

### 20.3 Interpretación

Los espermatozoides se observarán coloreados de azul.

## 21) Tinción de christmas tree

### 21.1 Preparación de colorantes

*Colorante rojo rápido nuclear* → 50 mg de colorante rojo rápido nuclear + 2.5 g de sulfato de aluminio + 100 ml de agua destilada

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

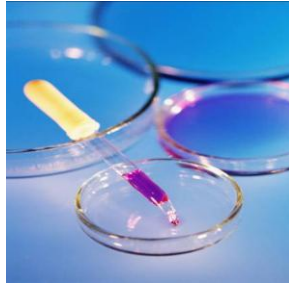
Enfriar y almacenar en papel watham #1. Almacenar en frasco gotero ámbar a una temperatura entre 2 y 8° C

*Colorante de índigo carmín* → 1.3 g de ácido pícrico + 0.23 g de índigo carmín + 100 ml de agua destilada

Disolver el ácido pícrico en los 100 ml de agua, añadir el índigo carmín, mezclar perfectamente con agitador mecánico. Guardar en frasco gotero ámbar.

### 21.2 Procedimiento

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



Lavar con agua desionizada durante 5 segundos, añadir una gota del colorante b) y dejarlo reposar durante 15 a 30 segundos.

Lavar con etanol absoluto para decolorar. Secar por 5 minutos.

### 21.3 Interpretación

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

### SALIVA

Es un líquido transparente de la cavidad bucal cuya viscosidad es variable. Se produce en las glándulas parótida, sublingual y submandibular, en el conducto parotiroideo y glándulas menores.



Puede encontrarse como mancha en el lugar de los hechos en boquillas de cigarrillos, puros, pipas, instrumentos de viento, pañuelos, tazas, vasos, tazones, estampillas, chicles, telas. En soportes claros la mancha será blanquecina o grisácea y en oscuros se verá de color amarillento.

Está compuesta de agua en un 95% y lo restante corresponde a sales minerales. Debido a sus propiedades, pueden hacerse distintos tipos de estudios en ella, a saber.

### 22) Diagnóstico genérico

Se puede efectuar mediante exposición a luz ultravioleta (UV) debido a su alto contenido de mucina, que le da fluorescencia al exponerla a dicha luz negra.

Asimismo, se puede hacer un estudio cualitativo de amilasa, moco, albúmina, sulfocianatos, tiocianatos, nitritos y células pavimentosas de la boca y faringe.

### 23) Diagnóstico específico

Puede efectuarse en la muestra la técnica de precipitinas, inmunocromatografía, inmunoelectroforesis (ocherlony).

Las células pavimentosas se pueden teñir con la técnica de baar para determinar sexo, encontrando las células "x" en mujeres y las "y" en hombres.

### 24) Diagnóstico individual

Gracias a su contenido de albuginógenos del sistema ABO se podrá determinar en la saliva el grupo sanguíneo del propietarios; asimismo las técnicas de absorción-inhibición y absorción-elución.

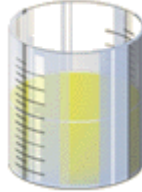
Con las citadas células pavimentosas se podrá obtener el perfil genético.

## ORINA

Líquido transparente y amarillento, olor sui géneris proporcionado por su contenido de amonio, secretado por los riñones y eliminado por el sistema urinario.

Formado por un filtrado del suero de la sangre, contiene 95% de agua, 2.5% de urea y 2.5% de sustancias sólidas (creatinina, ácido úrico, fosfatos, cloruros, metabolitos y el Ion amonio).

En el lugar de la investigación se encuentran como mancha y como líquido, signos de espera y vigilancia.



### 25) Diagnóstico genérico

Presenta luminiscencia a la luz UV. Asimismo pueden analizarse su contenido de urea y creatinina.

### 26) Diagnóstico específico

No es factible, ya que la orina humana y animal presenta las mismas propiedades y características. En teoría puede realizársele una determinación de grupo sanguíneo por su contenido de algutinógenos.

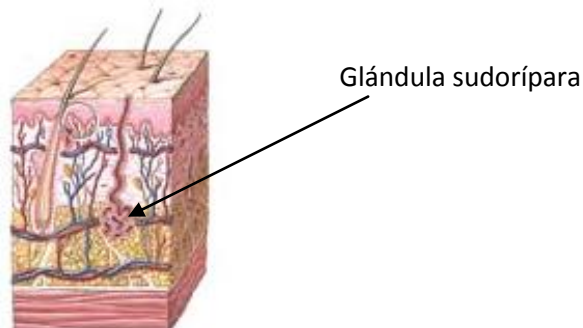
### 27) Diagnóstico individual

En caso de tratarse, por ejemplo, de la orina de una mujer menstruando o de una persona con cálculos en el riñón, puede realizársele una técnica de absorción-inhibición para determinar el grupo sanguíneo.

Asimismo, si presenta contenido de leucocitos (cabe resaltar que una persona sana no elimina dichas células en la orina) es factible la realización de un perfil genético.

## SUDOR

Líquido eliminado a través de las glándulas sudoríparas localizadas en la dermis. Sus funciones son refrigerar la piel y eliminar toxinas. Las bacterias le dan el olor característico, ya que por sí mismo el sudor es inodoro.



Las prendas de vestir se manchan al sudar abundantemente en axilas, cuello e ingles, en su caso. El interés criminalístico de las manchas de sudor es descartar otra mancha que no sea importante o no sea la que estemos buscando.

### **25) Diagnóstico genérico**

Es positivo en presencia del ácido láctico y los cloruros. Ambos componentes son analitos en técnicas presuntivas o de orientación.

### **26) Diagnóstico específico**

No existe debido a la obviedad de la presencia en prendas de vestir en relación al sudor de animales.

### **27) Diagnóstico individual**

En teoría es posible realizar la determinación del grupo sanguíneo. Cuando encontramos en una prenda las células por descamación, estas nos posibilitan la elaboración del perfil genético, puesto que al limpiarnos el sudor, se desprenden dichas células.

### **MOCO**

Es producido por células de mucosas esofágicas, bronquiales e intestinales. Presentan contenido de inmunoglobulinas y glóbulos blancos, específicamente, macrófagos.

Formados por 95% de agua, 5% de glicoproteínas, sales y minerales, y una alta concentración de cloruros. El color dependerá de la zona que lo excrete y de la presencia de una infección, puede ir desde transparente hasta café o negro.

Se encuentra como mancha en pañuelos o telas, que al secarse, apergaminan el soporte. Hay diversos tipos de moco: de la zona nasal, esofágico, bronquial, cérvico y vaginal, entre otros.

### **MANCHAS OBSTÉTRICAS**

Pueden ser méconeos o líquido amniótico. Estas manchas se presentan en caso de abortos clandestinos u óbitos.

Se trata de líquidos pastosos, color verde amarillento o café claro, que al contacto con una tela la apergaminan en formas irregulares, encontrándolas en gasas, vendas o productos que se ocupan en un parto.

Se identifican al encontrarse junto con onto sebáceo, vello fetal, corpúsculos blancos (células descamativas de origen amniótico), las cuales presentan luminiscencia color amarillo en los contornos y rojo o violeta en el centro al ser expuestas a luz UV.

### **EXCREMENTO**

Consideradas manchas de espera en el lugar de los hechos, pues la tensión provoca que los del sujeto esfínteres se relajen. Son frecuentes en los techos de los inmuebles en caso de robos.

Su diagnóstico genérico se da a partir de su olor, color café proporcionado por su contenido de estercobilinógeno, viscosidad y estudio microscópico para encontrar fibras vegetales o residuos proteicos. El diagnóstico específico no se realiza a menos que presente sangre.

### **CALOSTRO**

Es la secreción de las glándulas mamarias femeninas entre el 8º y 9º mes de gestación. Puede darse en caso de óbitos o abortos clandestinos.

Es de color no blanquecino con alta cantidad de glóbulos blancos y minerales. Su producción aumenta con la succión del bebé.

Como mancha en telas las almidona y proporciona bordes geométricos. Presenta reacción a la luz UV.

#### **BOLO ALIMENTICIO**

Se da en caso de envenenamientos o intoxicaciones. Se encuentra regularmente en cocinas o botes de basura.

Se presenta como una mezcla de alimentos, líquido y veneno en conjunto (contenido gástrico o vómito).

En caso de intoxicación o envenenamiento por alimentos preparados, se lleva a laboratorio una muestra de dichos alimentos o los ingredientes con que se preparó.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- ADAMS, Elizabeth, et. al., "Phosphatases in body fluids: The differentiation of semen and vaginal secretion"; Metropolitan Forensic Laboratory. London Forensic Science 3, 1974.
- BALTHAZARD, Víctor. "Manual de Medicina Legal", Editorial Salvat. 6ª edición, Barcelona, España, 1945.
- Enciclopedia Microsoft® Encarta® 2000. © 1993-1999 Microsoft Corporation
- ERIC; S., "DNA fingerprints on trial lander in nature", Vo. 339, no. 6225, junio 15, 1989.
- FRANCO, de Ambriz, Martha. "Hematología forense y otras técnicas serológicas" Editorial Porrúa, 4ª ed, México D.F. 2002.
- SILVEYRA, Jorge O. "Sistemas de Identificación Humana" 1ª edición. Ed. La Rocca, Buenos Aires 2006.