



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA BIOQUIMICA
MENCION : MICROBIOLOGIA

VALORACIÓN DE DOS MÉTODOS COLORIMÉTRICOS PARA LA
DETECCIÓN DE SANGRE EN MANCHAS SECAS EN
DIFERENTES SOPORTES Y CONDICIONES AMBIENTALES
CON FINES FORENSES

REALIZADO POR:

NELLY COTERHUANCO APAZA

TESINA PARA OPTAR EL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

LA PAZ - BOLIVIA
2008



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA BIOQUIMICA
MENCION : MICROBIOLOGIA

VALORACIÓN DE DOS MÉTODOS COLORIMÉTRICOS PARA LA
DETECCIÓN DE SANGRE EN MANCHAS SECAS EN
DIFERENTES SOPORTES Y CONDICIONES AMBIENTALES
CON FINES FORENSES

REALIZADO POR:

NELLY COTERHUANCO APAZA

ASESORES :

DR. SERGIO QUISPE MAYTA
DRA. PATRICIA MERCADO FLORES

TESINA PARA OPTAR EL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

LA PAZ - BOLIVIA
2008



La conclusión es que sabemos muy poco y sin embargo es asombroso lo mucho que conocemos y mas asombroso todavía, que un conocimiento tan pequeño puede dar tanto poder

Bertran R.



Con gratitud este trabajo para las personas que hicieron posible realizarlo para mi familia por su apoyo y comprensión y para ese rayito de luz que ilumino mi vida, que Dios los bendiga.



AGRADECIMIENTOS

- ✚ Deseo agradecer especialmente a mi mamá Andrea a mis hermanos Freddy, Rosmery y al pequeño Joel por su cariño, apoyo y comprensión, también a mi papá que me ilumina desde lejos y siempre estuvo a mi lado.
- ✚ Agradecer con amor a Y. Adrián por su cariño incondicional y comprensión en las horas de trabajo.
- ✚ A mis asesores el Dr. Sergio Quispe y la Dra. Patricia Mercado por brindarme su apoyo y guía para realizar este trabajo.
- ✚ A la unidad de Inmunoserología del laboratorio del Hospital de Clínicas Universitario que hizo posible que se llevara a cabo la parte práctica del trabajo.
- ✚ A la facultad por acogerme y a los docentes por inculcarme muchos conocimientos para mi formación.
- ✚ A la Dra. Lili Salcedo por su colaboración y aliento al realizar el presente trabajo.
- ✚ A la Dra. Eliana a Edgar y al Sr. Víctor por su apoyo constante y colaboración.
- ✚ A mis amigos Ingrid, Erica, Vianca, Maritza, Teo, Franz, Andrea, Jorge y Nora por su ayuda, apoyo y aliento.
- ✚ A mis primos Roger, Víctor por su ayuda y aliento.
- ✚ A un gran amigo Alvaro B. por brindarme toda su colaboración y apoyo para realizar este trabajo.
- ✚ A Sergio por su confianza y concederme su tiempo y ayuda para que este trabajo se lleve a cabo ¡Gracias Sergio!
- ✚ Al Dr. Fernando Sosa y la Dra. Magali Paz por brindarme su enseñanza y comprensión para concluir con mi tesina.
- ✚ A Dios por bendecirme con un don tan maravilloso como es la vida.



INDICE DE FIGURAS	Pág.
FIG.1: Composición de la sangre	16
FIG.2: Componentes de la sangre	17
FIG.3: Organización de la membrana eritrocitaria. Red de proteínas de membrana asociadas con el Cito esqueleto.	19
FIG.4: Estructura de grupo HEM	21
FIG.5: Estructura tridimensional de la hemoglobina	22
FIG.6: Esquema de reacción de grupo sanguíneo	26
FIG. 7: Etapas de análisis de una muestra forense	34
FIG. 8: Revelado de Manchas de Sangre en el piso con el test de Luminol	43
FIG.9: Resultados positivos de los test de Teichmann lado derecho y Takayama lado izquierdo	44
FIG.10: Reacción del método Aminofenazona y aminoantipirina	49



INDICE DE TABLAS	Pág.
TABLA 1: Tabla de resultados de control negativo (reactivos),positivo (reactivos mas sangre) y sustrato (reactivos mas peroxido de hidrogeno)	64
TABLA 2: Tabla de resultados de control de soportes para pruebas de sensibilidad	64
TABLA 3: Tabla de resultados del test de aminofenazona y aminoantipirina en sustancias empleadas como contaminantes	65
TABLA 4: Tabla de resultados de sensibilidad del test de aminofenazona y aminoantipirina directo	66
TABLA 5: Tabla de resultados de sensibilidad del test de aminofenazona y aminoantipirina en diferentes soportes	67
TABLA 6 : Resultados del test de Aminofenazona en manchas de sangre sometidas a diferentes condiciones de ambiente durante periodos de tiempo variables	68
TABLA 7 : Resultados del test de Aminoantipirina en manchas de sangre sometidas a diferentes condiciones de ambiente por periodos de tiempo variables	69
TABLA 8: Resultados del test de aminofenazona y aminoantipirina en manchas sometidas a lavados	70
TABLA 9: Resultados del test de aminofenazona y aminoantipirina sobre muestras preparadas con sangre y contaminantes expuestas durante 24 horas	71
TABLA 10: Resultados del test de aminofenazona y aminoantipirina en manchas de muestras preparadas con sangre y contaminantes expuestas durante 1 semana	72
TABLA 11:Resultados del test de aminofenazona y aminoantipirina en manchas de muestras preparadas con sangre y contaminantes sometidas durante un mes	73



TABLA DE CONTENIDO	Pág.
I. Introducción	1
II. Planteamiento del problema.....	3
A. Pregunta de investigación.....	3
III. Justificación	4
IV. Objetivos.....	6
A. Objetivo general.....	6
B. Objetivos específicos.....	6
INDICE DE FOTOGRAFIAS	
V. Diseño teórico.....	7
FOTOGRAFIA 1: Evidencia de Manchas de Sangre.....	7
A. Marco referencial.....	7
FOTOGRAFIA 2: Evidencias Sobre Superficies Absorbentes.....	9
1. Descripción del ambiente de estudio.....	10
FOTOGRAFIA 3: Descripción del ambiente Sobre Superficies no Absorbentes.....	10
4. Antecedentes generales del problema en estudio.....	10
FOTOGRAFIA 4: Marco Evidencias Sobre Superficies no Absorbentes.....	14
B. Marco referencial.....	14
1. Historia.....	14



2. Sangre.....	15
3. Composición de la sangre.....	16
4. Plasma.....	18
5. Los glóbulos rojos	18
a. Organización de la membrana eritrocitaria	18
6 La hemoglobina... ..	20
a. Estructura de la hemoglobina.....	20
b. Oxidación y reducción de la hemoglobina.....	22
7. Peroxidasas.....	24
8. Grupos sanguíneos... ..	25
a. Sistema ABO.....	25
b. Factor Rh.....	27
9. Serología forense.....	28
10. La Sangre en la escena del Crimen.....	29
11. Recogida de las muestras de sangre en el campo forense.....	30
a. sangre líquida.....	30
b. manchas de sangre sobre superficies absorbentes.....	31
c. manchas de sangre sobre superficies no absorbente.....	32
12. Etapas de análisis de una muestra forense.....	34
13. Manchas de sangre... ..	36
a. Diagnostico genérico.....	36
b. Diagnostico específico.....	37
c. Diagnostico individual.....	37
14. Contaminación de muestra Forense.....	37
a. Contaminación Biológica de Origen Humano.....	38
b. Contaminantes Físicos y/o Químicos.....	39
c. Transferencias de Indicios Biológicos.....	39
15. Métodos para la determinación de sangre.....	40
a. Test del luminol.....	41
b. Pruebas de cristalización.....	43
c. Prueba de kastle-meyer.....	44
d. Métodos instrumentales.....	46
16. Test aminofenazona aminoantipirina... ..	46
a. Fundamento del método	47
C. Marco conceptual.....	51
VI. Hipótesis.....	52
A. Hipótesis general.....	52
B. Hipótesis específica.....	52
VII. Operacionalización de las variables.....	53
VIII. Diseño metodológico.....	54
A. Método de investigación.....	54
1. Tipo de investigación.....	54
B. Métodos generales de investigación.....	54



1. Muestras.....	54
2. Técnica.....	54
3. Materiales.....	55
4. Procedimiento.....	57
C. Procesamiento de la información.....	62
1. Recolección	62
2. Elaboración.....	62
3. Análisis Estadístico.....	63
IX. Resultados.....	64
X. Discusión.....	74
XI. Conclusiones.....	84
XII. Recomendaciones.....	86
XIII. Bibliografía.....	87
Anexos.....	90



I. INTRODUCCION

La Ciencia Forense comprende una amplia diversidad de disciplinas científicas que trabajan de manera especializada para asistir al proceso de justicia mediante la evaluación de la evidencia aplicando la ciencia, de la ingeniería el arte y la medicina en especial en laboratorio, sobre todo en la resolución de aspectos relacionados con la ley. De acuerdo con la definición del mismo De Forest y Col. (1983). La ciencia forense involucra el reconocimiento, identificación, individualización y evaluación del medio de prueba material o evidencia física empleando métodos científicos. Dentro del cual incluye todas las áreas dedicadas al análisis de la evidencia, traza o soporte de transferencia como el suelo, vidrio, fibras, cabello, sangre y fluidos biológicos se refiere al análisis comparativo de restos de materiales en diferentes áreas en caso de la biología forense mediante el análisis de fluidos, tejidos y estructuras biológicas con el fin de determinar el origen de un resto en un escenario del suceso particular.

La biología forense involucra la identificación y comparación de seres vivos mediante el análisis de fluidos, tejidos y estructuras biológicas. La biología forense incluye entre otras áreas la identificación de individuos y determinación de paternidad a partir de marcadores genéticos poblacionales, o con el fin de determinar el origen de un resto en un escenario del suceso particular, la determinación del tiempo de muerte y ubicación geográfica de restos humanos mediante el análisis y detección de fluidos biológicos (sangre, semen, saliva etc.). Mediante técnicas inmunológicas y químico clínicas.¹

La sangre es un líquido compuesto de agua, células, enzimas, proteínas, y sustancias inorgánicas que circulan a través del sistema vascular. Mientras los médicos están interesados en los glóbulos blancos los científicos forenses están más interesados en células rojas y en segundo lugar en el suero con el cual el analista puede determinar la frescura de una muestra de sangre debido a que coagula por exposición al aire. De los glóbulos rojos, el analista busca sustancias más pequeñas como los componentes celulares para determinar si es sangre y los componentes que residen



en sus superficies, tales como anticuerpos los cuales se basan sobre todo en los antígenos y anticuerpos, pero ése es el dominio de la inmunología forense.

La investigación de manchas de sangre sigue ocupando un lugar preferente en criminalística por lo cual se realiza un sistema de investigación que incluye los siguientes pasos diagnósticos:

- Orientación.
- Certeza, especie.
- Individual (grupo, genética).
- Otros (antigüedad, lugar de procedencia, etc.).²

La determinación de las características de la muestra, para luego determinar si es sangre y posterior grupo sanguíneo son pruebas de investigación de la mancha de sangre, y de la preparación del testimonio son las funciones principales de trabajo de una serología forense, que también analiza el semen, saliva y otros fluidos corporales.

La detección de sangre es un análisis de comparación de la sangre de la víctima y la sangre del sospechoso que se encontró en la escena del crimen, la sangre es la evidencia más común, conocida y quizás de la mayoría lo más importante del mundo de la justicia criminal. Según Henrio C. un experto forense, la evidencia se encuentra a menudo en la sangre esto en situaciones como: crímenes de violencia tales como homicidio, asalto y agresión sexual. Puede estar bajo la forma de líquido fresco, coagulado, secado, o como una gota o mancha pequeña en vestimentas de los autores del crimen, de las víctimas, etc. y cada forma implica un diverso método de preservación y de colección para determinar si es sangre, especie sanguínea y grupo ABO. Por lo tanto puede ser usada para confirmar y excluir presunciones en relación a los hechos y a la secuencia de los mismos por lo cual la detección de estas es importante en dichos hechos.³



II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- ¿Es posible detectar la presencia de sangre mediante métodos enzimático-colorimétricos como ser los test de aminofenazona y aminoantipirina encontrando el límite de sensibilidad aplicable en muestras de interés forense, que se pueden encontrar afectados por factores como ambiente (abierto, cerrado y enterrado), temperatura de exposición, sustancias interferentes y el soporte donde se encuentran para determinar si es sangre, en estas muestras?



III. JUSTIFICACIÓN

Existen diferentes métodos de detección de muestras sanguíneas para la aplicación de un estudio forense estos varían según especificidad, sensibilidad y costo. El método más utilizado en diferentes países hoy en día es del luminol pero los reactivos para este método son muy costosos y presentan cierta interferencia en posteriores estudios forense, por lo cual aun no se ha implementado en nuestro país. La detección sanguínea de muestras forenses requiere en principio de un diagnóstico de orientación para determinar presencia o ausencia de sangre en manchas secas de sangre y en muestras forenses, que suelen ser con frecuencia el principal indicio obtenido en la escena del crimen. Esto a hecho que tanto por su frecuencia como por la importancia de los resultados obtenidos en sus estudios, sea uno de los pilares importantes dentro del campo de la Biología Forense. Los análisis destinados a la individualización de las manchas de sangre es norma en todos los laboratorios de biología forense a seguir, las manchas de sangre y su disposición son características en la escena de un hecho, ya que se encuentran en las vestimentas de los autores del crimen, de las víctimas, etc. Es de suma importancia estudiar la fiabilidad de estas pruebas sobre muestras de manchas de sangre seca y los contaminantes ya que se pueden obtener resultados falsos positivos como negativos.

Con frecuencia, las ropas manchadas de sangre durante un acto violento son lavadas para tratar de eliminar los vestigios, lo que plantea una mayor dificultad en la detección de la mancha por lo cual se requiere de métodos precisos como el test de Luminol que es el más eficaz y utilizado en el área. Sin embargo, en este tipo de muestra se plantea la dificultad de la detección de la mancha. Por esta razón se hace imprescindible disponer de métodos de búsqueda más sensibles, capaces de detectar mínimos indicios de presencia de sangre en los diferentes sitios, objetos y vestimenta de la escena del crimen.



En nuestro medio la biología forense en uno de sus campos como la serología forense se encamina a aplicar y desarrollar ensayos de laboratorio para fortalecer el esclarecimiento de casos forenses. Por lo cual se validará la sensibilidad de los métodos de orientación Aminoantipirina y Aminofenazona para detectar la presencia de sangre en muestras forenses en especial manchas secas sobre diferentes soportes que son telas de diferente origen, expuestas a ambiente: cerrado, abierto y enterrado y variando la temperatura, cuyos resultados servirán para posteriores análisis como el estudio del ADN (Acido desoxirribonucleico) donde se pueda obtener el perfil genético del donante de la mancha, cuya investigación en criminalística hasta el momento actual, ha ido precisando de técnicas más sensibles.



IV. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Valorar dos métodos de orientación colorimétricos: aminofenazona y aminoantipirina para la detección de sangre en manchas secas sobre diferente soportes y condiciones como: ambiente, temperatura y sustancias interferentes con fines forenses.

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la capacidad de los métodos colorimétricos: aminofenazona y aminoantipirina para la detección de cantidades mínimas de sangre en muestras forenses.
- Evaluar los métodos colorimétricos aminofenazona y aminoantipirina cuando las muestras han sido expuestas a diferentes condiciones de temperatura.
- Evaluar la capacidad de detectar sangre por los métodos colorimétricos en muestras expuestas en diferentes condiciones de ambiente y tiempo de exposición.
- Determinar la capacidad de detección de los métodos colorimétricos en manchas de sangre que han sido sometidas a lavados con agua y detergente.
- Determinar la especificidad y efectividad de las técnicas cuando las muestras fueron mezcladas con fluidos biológicos
- Determinar si la mezcla de sangre con diferentes sustancias como frutas, vegetales y sustancias químicas pueden afectar a los resultados.



V. DISEÑO TEORICO

A. MARCO REFERENCIAL

Los Investigadores trabajaron mucho en las pruebas de determinación de sangre en la que usaron diferentes métodos como ser la prueba del benzidina hasta que fue descubierto ser un agente carcinógeno, y fue substituida por la prueba de Kastle-Meyer, que utilizó el químico fenoftaleina. Para detectar manchas invisibles de sangre, se utiliza la prueba del luminol, que es un producto químico que rociado en las alfombras y los muebles revela una luz fosforescente leve en la oscuridad donde están presentes las manchas de sangre. La sangre secada tiene una tendencia a cristalizarse, o se puede hacer cristalizar con mezclas del sal -ácido, de varias pruebas cristalinas como la prueba de Teichman, la prueba de Takayama. El término genérico para cualquier manera de determinar si algo es sangre o no se llama una prueba presuntiva. Los científicos forenses utilizan pruebas del antisuero o del gel, para probar si es sangre de animal. De todas formas, la prueba estándar para decir si algo es humana o no se utiliza la prueba de precipitina, y es una técnica que se basa en inyectar a un animal (generalmente un conejo) con sangre humana. El cuerpo del conejo crea los anticuerpos contra células humanas, que se extraen del suero del conejo. Si este antisuero se coloca en una muestra recolectada de la escena de crimen, y crea la coagulación, se sabe que la muestra es humana.⁴

Para esto primero debe determinarse si se tiene una muestra adecuada y su calidad de lo cual la sangre líquida tiene más valor que sangre secada porque más pruebas pueden ser funcionadas. La sangre comienza a secarse después de 3 a 5 minutos de exposición al aire. Mientras que se seca, cambia de color hacia marrón y negro. La sangre en la escena de crimen puede estar bajo la forma de piscinas, gotas, borrones de transferencia, o cortezas. Las piscinas de la sangre tienen obviamente valor más evidente. Los hematíes de la sangre refrigerada tienen una vida útil de cerca de 42 días, y el suero que contiene se puede refrigerar por largo tiempo, casi hasta un año.⁴

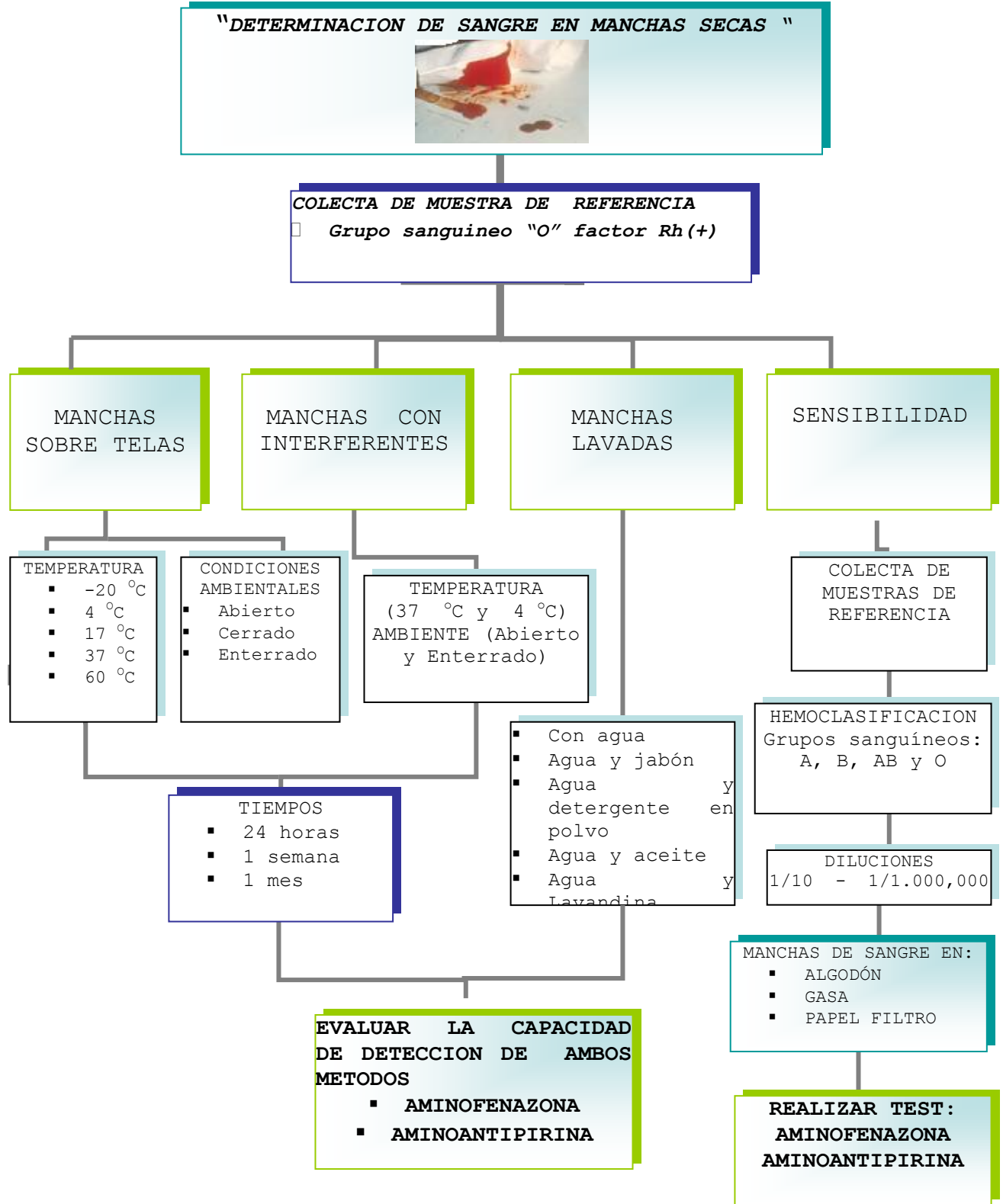


La contaminación biológica es producida por la presencia, en la escena del delito o en el cuerpo de la víctima, de fluidos biológicos de origen humano relacionados con los hechos y puede ser anterior o posterior a la producción de los mismos. También suele ser frecuente en algunos tipos de muestras como en las toallas o los paños de cocina, que son muestras en las que por su propia función suelen encontrarse restos de sustancias propias del lugar mezcladas con manchas de sangre. Otros soportes en las que también es frecuente que exista una contaminación previa a los hechos son las tapicerías, alfombras, fundas de asientos en los coches etc. Por ello es muy importante establecer el valor de los indicios recogidos en este tipo de muestras y de los resultados obtenidos a partir de ellos. La contaminación física por sustancias inherentes a la propia muestra, cuando el producto químico forma parte del soporte o sustrato donde cae la mancha (tintes, colorantes, pinturas, refrescos, café, vino etc.)

En las contaminaciones es importante mencionar procesos de putrefacción de las muestras, este proceso tiene lugar por el desarrollo de microorganismos que degradan los indicios biológicos. Suele estar favorecida por las condiciones de humedad y altas temperaturas y es problemática porque produce la degradación del ADN. Estos procesos pueden ser: Inherentes a la propia muestra por efecto de la antigüedad o de las condiciones ambientales, lo cual es inevitable. Provocados por un defecto en la conservación de las muestras o que estén expuestas durante periodos largos previo al envío al laboratorio, lo que puede ser evitable. Las muestras más sensibles a este tipo de contaminación son las que contienen indicios húmedos por ejemplo ropas de vestir o del hogar con grandes manchas de sangre o de orina en el lugar de los hechos y en el cuerpo de la víctima ⁴



1. MODELO TEORICO





2. DESCRIPCION DEL AMBIENTE DE ESTUDIO

El lugar para este estudio fue en el laboratorio de Inmunoserología del hospital de Clínicas Universitario ubicado en la Avenida Saavedra, zona Miraflores. El hospital ofrece los siguientes servicios: Medicina general consultorios, cirugía plástica y quemados, Anestesiología, cardiología cirugía general, consultorios externos, dermatología, diálisis, emergencias, farmacia, gastroenterología, infectología, laboratorio, medicina interna I y II, neurocirugía, otorrinolaringología, oncología, patología, quimioterapia, salud mental, urología, traumatología

3. DESCRIPCION DEL AMBIENTE DE TRABAJO

La evaluación y análisis de las muestras se realizó en instalaciones del laboratorio del Hospital de Clínicas en la unidad de inmunoserología considerado un laboratorio básico nivel 2 de atención primaria, diagnóstico e investigación cuyas prácticas de laboratorio son con implementos apropiados y señal de riesgo biológico. Se trabaja en mesones al descubierto y se dispone del espacio necesario para el trabajo en condiciones de seguridad y para la limpieza, consta de los siguientes equipos: congeladoras, centrifugas, pupinel, microscopios, lectores de ELISA y equipos automatizados

4. ANTECEDENTES GENERALES DEL PROBLEMA EN ESTUDIO

En el artículo “Fotografía de Manchas de sangre Visualizada por Luminol” de Zweidinger ; Lytle y Pitt demuestran que el uso de pruebas químicas para sangre actualmente depende del descubrimiento de hemoglobina o uno de sus derivados, la Hemoglobina tiene varias propiedades que lo hacen conveniente para este propósito. El más importante, debido a su sensibilidad, es la actividad de peroxidasa del grupo Hem de la hemoglobina que forma la base de la benzidina, verde de leuco-malaquita, fenoftaleina y el luminol que



son pruebas para sangre. El test de luminol esta basado en la observación visual de quimioluminiscencia que es particularmente útil en forense debido a su sensibilidad; es un reactivo de rocío, que permite también el descubrimiento y observación de la forma y estructura fina de las manchas de sangre que serían por otra parte invisible al ojo humano.⁵

Lytle y Hedgecock en el trabajo “Quimioluminiscencia en la Visualización de Manchas de Sangre Forenses” demuestran que la hemoglobina tiene actividad de peroxidasa y es la base para la prueba de la mayoría de los test de benzidina y fenoftaleina normalmente empleados para la cuya reacción para detectar sangre es la producción de luz en sitios donde se encuentra sangre. Esta distinción lo hace algo inoportuno debido a la necesidad de oscuridad. Desde que el luminol es aplicado como un rocío, pueden protegerse las áreas rápidamente para detectar sangre, además el luminol es relativamente no destructivo de sangre y ambientes, el luminol no previene la identificación subsiguiente o el análisis de grupo sanguíneo ABO, e interfiere con el análisis de electroforesis. Aunque a menudo se puede localizar sangre inadvertida para su posterior recolección, por lo que se considera una prueba de valor en investigación de la escena del crimen.⁶

El efecto del lavado del tejido de la prenda en la identificación presunta de manchas de sangre según Lytle y Hedgecock cuyo propósito de su estudio era investigar la retención de las manchas de sangre en doce tipos diferentes de tejidos después de lavarlos varias veces y secarlos. Los resultados de este estudio, indican que la retención de manchas de sangre en los tejidos lavados depende en la composición de fibra particular del tejido y del detergente que se usó en el lavado. Los resultados de esta investigación no revelaron un efecto significativo del tiempo en que seco y en la retención de manchas de sangre, lo cual fue comprobado durante las 48 horas límite de este experimento.⁷



Negre Muño y Castelló Ponce plantean su artículo ¿Manchas de Sangre? Seguridad en pruebas de orientación Menciona que el espectacular avance en la tecnología de investigación de ADN,(ácido desoxiribonucleico) ha supuesto un cambio radical en el estudio de indicios criminalísticos. Sin embargo, el éxito de la investigación depende, en gran medida, de las técnicas que permiten la detección y el estudio previo de la muestra. En el trabajo que sigue, se estudia la fiabilidad de estas pruebas sobre muestras contaminadas en el laboratorio con distintos productos y utilizando diferentes reactivos de orientación. Como consecuencia de la contaminación, se obtienen falsos resultados tanto positivos como negativos, comprobándose que el reactivo más fiable es el Luminol. En una experiencia complementaria se comprueba la eficacia del reactivo sobre muestras lavadas.⁸

Según M. Álvarez Seguí y M. Miquel Feucht menciona que con frecuencia, las ropas manchadas de sangre durante un acto violento son lavadas para tratar de eliminar los vestigios. El análisis del ADN mediante PCR (Reacción en cadena de polimerasa) ha dotado a la criminalística de la posibilidad de estudiar indicios mínimos que, con otros métodos, sería imposible analizar. Este tipo de muestra plantea una mayor dificultad en la detección de la mancha. En el presente trabajo se analiza la sensibilidad del luminol para encontrar manchas de sangre invisibles. Sobre estas manchas se intenta extraer y amplificar ADN Los resultados indica que el luminol es muy eficaz para detectar indicios invisibles. Además, en las condiciones experimentales con las que se ha elaborado este trabajo, no se produce interferencia del reactivo en la posterior extracción y amplificación del ADN⁹

Estudios realizados por Winchester sobre la presencia o ausencia de las manchas de sangre mantienen a menudo información importante investigando aquéllos casos delictivos. Por esta razón determinan si una mancha particular es sangre o no, en cuyo caso. El descubrimiento de sangre es normalmente basado en tres clases de métodos:



Las pruebas de cristalización: Estas pruebas hacen que el Hem forme cristales cuando reacciona con ciertos reactivos. El reactivo piridina es común y forma los cristales rosas característicos.

Las pruebas catalizadoras: Estas pruebas confían en el hecho que los Hem pueden catalizar el peróxido de hidrógeno H_2O_2 dando otra sustancia inferior en la mezcla de la reacción que se oxida, mientras va produciendo un cambio del color. Es importante notar que una prueba positiva no significa que una mancha dada es sangre, permite exclusivamente ver como varias enzimas y ciertos metales pueden dar también resultados positivos.

Los Métodos instrumentales: Como la Cromatografía puede usarse para identificar la presencia de hemoglobina. Estas pruebas se usan prácticamente para varios propósitos diferentes. Éstos incluyen ambos la confirmación de la naturaleza de manchas visibles (es decir que ellos probablemente son o definitivamente no son sangre), el descubrimiento de manchas no visibles (por ejemplo en las plantas o lavado de ropa) y la mejora para ver las manchas. Mejorar la mancha es útil para las situaciones donde una huella, impresiones dactilares, la huella digital etc. se perfila débilmente en sangre, cuando los métodos químicos pueden reforzar esa mancha para que la impresión pueda medirse y puede emparejarse con los sospechosos. En todas estas pruebas es importante asegurar que las reacciones químicas no previenen más tarde a ser de las pruebas hecho para ayudar identificar a quién pertenece la sangre.¹⁰



B. MARCO TEORICO

1. Historia

Mathiew Orfila (1813) hizo importantes contribuciones al desarrollo de las pruebas de la presencia de sangre en un contexto forense y se acreditan como el primer intento a la utilización de un microscopio en la evaluación de las manchas de sangre y semen.

En 1839 H. Bayard publicó los primeros procedimientos fiables para la detección microscópica de los espermatozoides.

En 1853 Ludwig Teichmann, en Kracow, Polonia, desarrolló la primera prueba de cristales microscópicos de hemoglobina utilizando hemin cristales.

En 1863 El científico alemán Schönbein descubrió por primera vez la capacidad de la hemoglobina para oxidar el peróxido de hidrógeno ello se tradujo en la primera prueba presunta de sangre.

En 1900 Karl Landsteiner descubrió los grupos sanguíneos humanos y fue galardonado con el premio Nobel por su trabajo

En 1930 Max Richter adaptado a la técnica tipo de manchas. realizo experimentos de validación específicamente para adaptar un método de la ciencia forense. Landsteiner's continua trabajando en la detección de la sangre, su especie, su tipo y constituyó la base de casi todos los trabajos posteriores.

En 1904 Oskar y Rudolf Adler desarrollaron una prueba presunta de sangre sobre la base de bencidina, un nuevo producto químico desarrollado por Merk.

En 1912 Masaeo Takayama desarrolló otro cristal microscópico prueba de hemoglobina utilizando cristales y hemocromogeno.

En 1915 Leone Lattes, profesor en el Instituto de Medicina Forense en Turín, Italia, desarrolló la primera prueba de anticuerpos de grupos sanguíneos ABO para resolver una disputa conyugal.

En 1923 Vittorio Siracusa Italiano desarrolló la técnica absorción para ABO de pruebas de manchas de sangre.

En 1927 Landsteiner y Levine detectó por primera vez la sangre y los factores que conducen al desarrollo de sistemas de mecanografía.



En 1931 Franz Josef Holzer, un científico austriaco, desarrolló el test absorción inhibición de tipos ABO escribiendo técnica que se convirtió en la base de la que comúnmente es usado en los laboratorios forenses.

En 1940 Landsteiner y Wiener describieron por primera vez el factor Rh de la sangre.

En 1945 Frank Lundquist, de la Unidad de Medicina Legal de la Universidad de Copenhague, desarrolló la prueba de la fosfatasa ácida para el semen.

1946 1946 Mourant Lewis describió por primera vez el sistema de grupos sanguíneos.

En 1965, encontraron que alrededor de 80 % de la población humana para ser “secretors,” que significa que los tipos específicos de antígenos, de proteínas, de anticuerpos, y de enzima característica de su sangre se pueden encontrar en otros líquidos y tejidos finos corporales

En 1987 El análisis de ADN fue presentado por primera vez en un tribunal penal de EE.UU, realizado por Lifecodes, donde Tommy Lee Andrews fue declarado culpable de una serie de agresiones sexuales en Orlando, Florida.

En 1996 según el comité internacional de forense evalúa el ADN como evidencia de un crimen, por la interpretación estadística de las pruebas forenses de ADN, un segundo consejo publicó “La Evaluación de la Prueba de ADN Forense”.^{11, 12}

2. Sangre

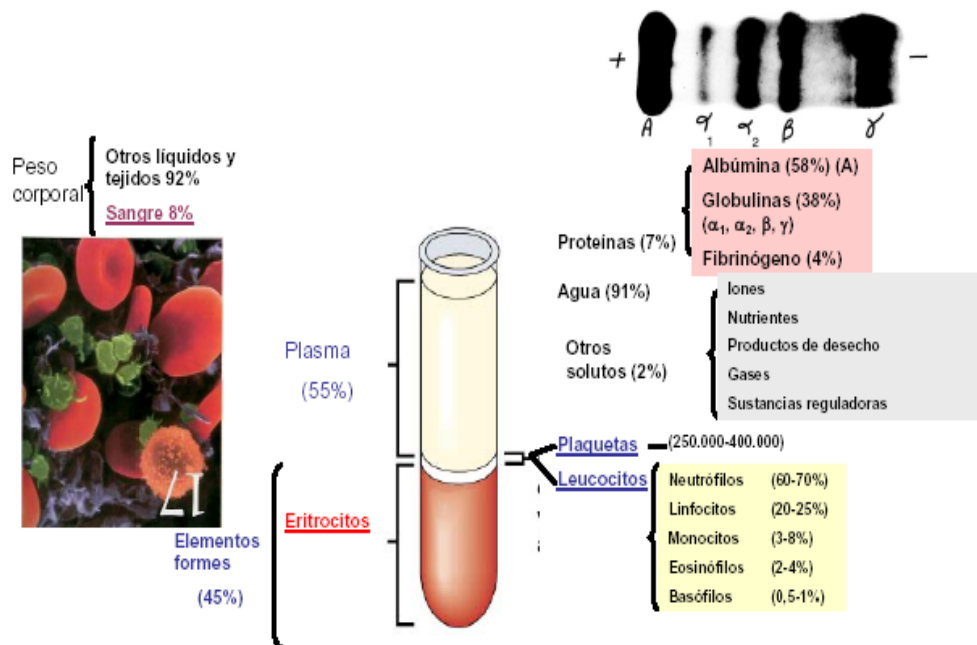
Es una sustancia líquida que circula por las arterias y las venas del organismo. La sangre es roja brillante o escarlata cuando ha sido oxigenada en los pulmones y pasa a las arterias; adquiere una tonalidad mas azulada cuando cedió su oxígeno para nutrir los tejidos del organismo y regresa a los pulmones a través de las venas y de los pequeños vasos denominados capilares. En los pulmones, la sangre cede el dióxido de carbono que ha captado procedente de los tejidos, recibe un nuevo aporte de oxígeno e inicia un nuevo ciclo Este movimiento circulatorio de sangre tiene lugar gracias a la actividad coordinada del corazón, los pulmones y las paredes de los vasos sanguíneos.



3. Composición de la sangre

La sangre está formada por un líquido amarillento denominado plasma, en el que se encuentran en suspensión millones de células que suponen cerca del 45% del volumen de sangre total. Una gran parte del plasma es agua con el 91%. La sangre humana contiene unos corpúsculos o glóbulos rojos, llamados eritrocitos o hematíes; los glóbulos blancos que reciben el nombre de leucocitos; y las plaquetas llamadas trombocitos. La sangre transporta muchas sales y sustancias orgánicas disueltas. (Ver fig. 1). La sangre tiene una densidad relativa que oscila entre 1,056 y 1,066. En el adulto sano el volumen de la sangre es una onceava parte del peso corporal, de 4,5 a 6 litros. El pH de la sangre es aproximadamente de 7 a 7,5. El bióxido de carbono reacciona con el agua para formar un ácido carbónico, H_2CO_3 , por lo que el incremento de la concentración de bióxido de carbono aumenta la acidez de la sangre, lo que a su vez hace disminuir la capacidad de la hemoglobina para acarrear el oxígeno, el aumento de bióxido de carbono acidifica la sangre y la capacidad de la hemoglobina de llevar el oxígeno disminuye en una solución ácida.¹³

FIG. 1 Composición de la sangre

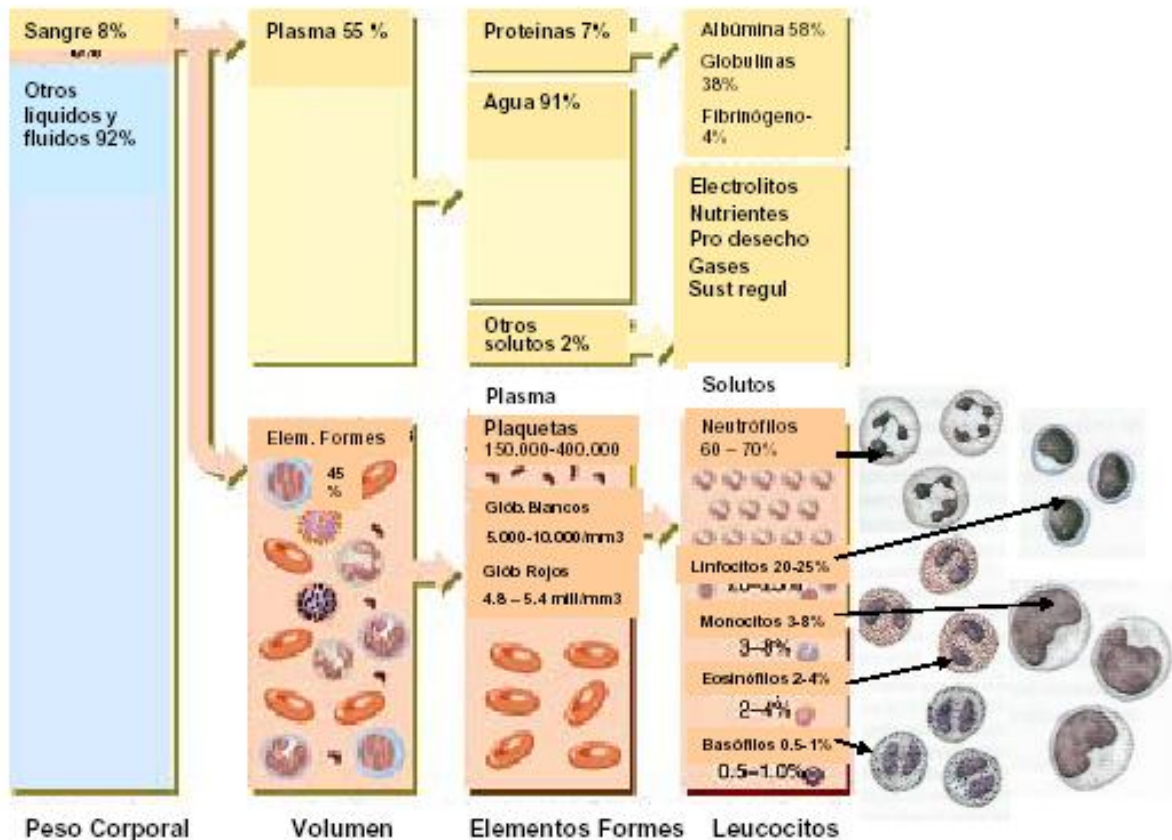


Fuente: <http://www.educared.net/concurso2001/585/bcomposicion.htm>



Los eritrocitos o Glóbulos rojos, tienen forma de discos redondeados, bicóncavos y con un diámetro aproximado de 7,5 micras. Los leucocitos o glóbulos blancos son de dos tipos principales: los granulados, con núcleo multilobulado, y los no granulados o granulocitos incluyen los neutrófilos, que fagocitan y destruyen bacterias; los eosinófilos, que aumentan su número y se activan en presencia de ciertas infecciones y alergias; y los basófilos, que segregan sustancias como la heparina, de propiedades anticoagulantes, y la histamina que estimula el proceso de la inflamación. Los leucocitos no granulados están formados por linfocitos y un número más reducido de monocitos, asociados con el sistema inmunológico. Las plaquetas de la sangre son cuerpos pequeños, ovoideos, sin núcleo, con un diámetro mucho menor que el de los eritrocitos. Los trombocitos o plaquetas se adhieren a la superficie interna de la pared de los vasos sanguíneos en el lugar de la lesión y ocluyen el defecto de la pared vascular ¹³. (Ver fig. 2)

FIG 2 Componentes de la sangre



Fuente: <http://www.educared.net/concurso2001/585/bcomposicion.htm>



4. Plasma

El plasma es una mezcla compleja de proteínas, aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, sales, hormonas, enzimas, anticuerpos y gases en disolución. Es ligeramente alcalino, con un pH (potencial hidrogenion) de 7.4. Los principales componentes son el agua (90 - 92 %) y las proteínas (7 – 8 %). El plasma contiene varias clases de proteínas, cada una con sus funciones y propiedades específicas : fibrinógeno, globulinas alfa, beta y gama, albúminas y lipoproteínas. El fibrinógeno es una de las proteínas destiladas al proceso de coagulación; la albúmina y las globulinas regulan el contenido de agua dentro de la célula y en los líquidos intercelulares. La fracción globulina gamma es rica en anticuerpos, base contra determinadas enfermedades infecciosas. La presencia de dichas proteínas hace que la sangre sea unas seis veces más viscosa que el agua. Las moléculas de las proteínas plasmáticas ejercen presión osmótica, con lo que son parte importante en la distribución del agua entre el plasma y los líquidos tisulares. Las proteínas del plasma y la hemoglobina de los glóbulos rojos son importantes amortiguadores ácido básicos que mantienen el pH de la sangre y de las células corporales dentro de una pequeña variación.¹³

5. Los glóbulos rojos

Los glóbulos rojos, dan a la sangre su color rojo, esto se debe a que en el interior de cada uno de ellos existen de 200 a 300 millones de moléculas de hemoglobina, mediante las cuales realizan su función, que es el transporte de oxígeno por la sangre.

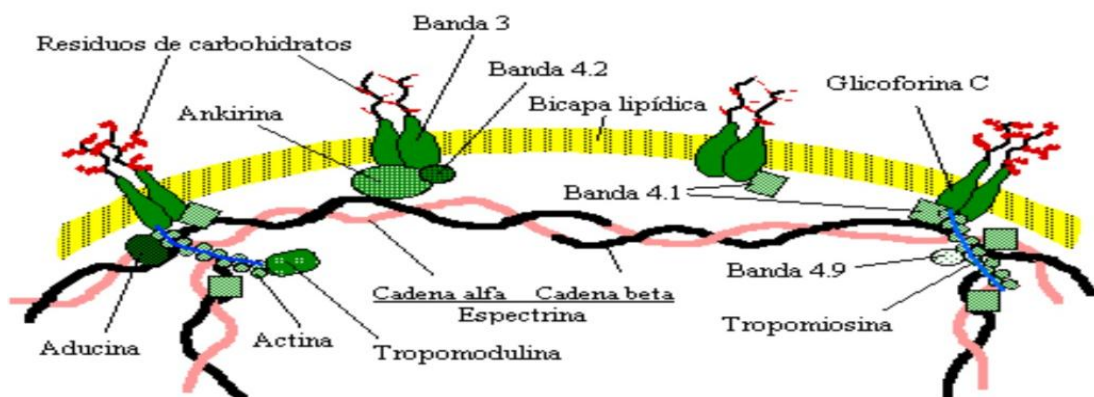
a. **Organización de la membrana eritrocitaria**

El modelo que se observa en la figura detalla la red de proteínas de membrana asociadas con el citoesqueleto y que están involucradas en el control de la forma del eritrocito, uniones con otras células y con el sustrato, así como en la organización de dominios especializados de la membrana. El



componente de mayor masa molecular en el citoesqueleto de la membrana del eritrocito es la espectrina. Tetrámeros de espectrinas están unidos con la membrana por una proteína llamada ankirina, la cual está conectada a la banda 3. El objetivo de la banda 4.2 es estabilizar la unión entre la ankirina y el intercambiador aniónico banda 3. La espectrina se une también con la glicoforina C mediante la banda 4.1; este entramado es anclado en múltiples sitios de la membrana. La banda 4.1, así como la aducina, estabilizan la asociación de la espectrina con la actina. Subunidades de la actina forman microfilamentos con la tropomiosina, a los que se asocia la proteína tropomodulina. La banda 4.9, conocida también como dematina, produce el entrecruzamiento de estos microfilamentos de actina. La estructura de la doble capa lipídica es fundamental en la organización del citoesqueleto, en especial la banda 3 constituye el elemento central de un macrocomplejo de proteínas integrales y periféricas en la membrana del eritrocito. La glicoforina A (GPA) es la sialoglicoproteína predominante en la superficie de los eritrocitos humanos. En estado nativo, la GPA no interactúa significativamente con el citoesqueleto de la membrana del glóbulo rojo aunque se ha observado que la unión de anticuerpos específicos puede producir un incremento en la rigidez de la membrana. La variación de la presión osmótica induce sobre las células una lisis progresiva y una modificación¹⁴

FIG 3 Organización de la membrana eritrocitaria. Red de proteínas de membrana asociadas con el cito esqueleto.



FU

ENTE: Lux SE, Palek J. Disorders of the RBC membrane.; 1995



6. La hemoglobina

La hemoglobina se encuentra exclusivamente en las células rojas de la sangre, en donde se principal función es transportar al Oxígeno desde los pulmones hasta los capilares en los tejidos. La hemoglobina A, la principal en los adultos, está compuesta de cuatro cadenas polipeptídicas (dos cadenas alfa y dos beta) que se mantienen unidas por medio de interacciones no covalentes. Cada subunidad posee estructuras helicoidales y sitio para el grupo Hem, así la hemoglobina tetramérica es mas complicada estructural y funcionalmente que la mioglobina, la hemoglobina puede transportar CO₂ desde los tejidos desde los tejidos hasta los pulmones y de manera inversa llevar Oxígeno a los tejidos desde los pulmones; además, las propiedades de unión de Oxígeno son reguladas en la hemoglobina por efectores alostéricos.

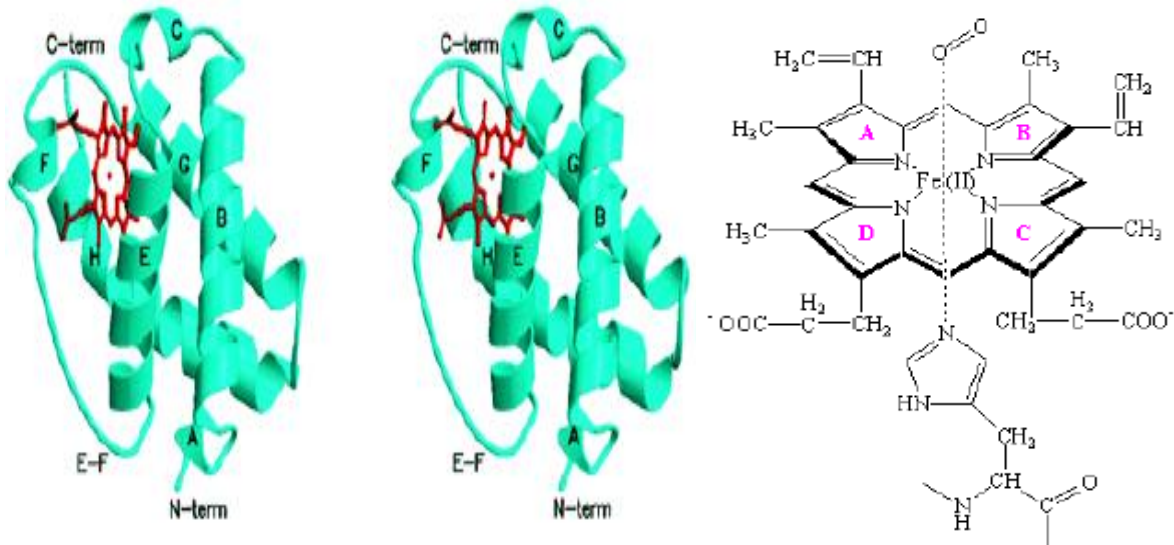
a. Estructura de la hemoglobina

Las cuatro cadenas polipeptídicas de la Hemoglobina (Hb) contienen cada una un grupo prostético hem. Un grupo prostético es la porción no polipeptídica de una proteína. El hem es una molécula de porfirina que contiene un átomo de hierro en su centro. El tipo de porfirina de la Hb es la protoporfirina IX; contiene dos grupos ácidos propiónicos, dos vinilos y cuatro metilos como cadenas laterales unidas a los anillos pirrólicos de la estructura de la porfirina. El átomo de hierro se encuentra en estado de oxidación ferroso (+2) y puede formar cinco o seis enlaces de coordinación dependiendo de la unión del O₂ (u otro ligando) a la Hb (oxiHb, desoxiHb). Cuatro de estos enlaces se producen con los nitrógenos pirrólicos de la porfirina en un plano horizontal. El quinto enlace de coordinación se realiza con el nitrógeno del imidazol de una histidina denominada histidina proximal. Finalmente, el sexto enlace del átomo ferroso es con el O₂, que además está unido a un segundo imidazol de una histidina denominada histidina



distal. Tanto el quinto como el sexto enlace se encuentran en un plano perpendicular al plano del anillo de porfirina. (Ver fig. 4 y 5)

FIG 4: A la izquierda una estructura tridimensional de la hemoglobina; A la derecha estructura de grupo HEM



FUENTE: <http://es.wikipedia.org/wiki/Hemoglobina>

Las cadenas polipeptídicas alfa contienen 141 aminoácidos, las no alfa (β , γ , δ) 146 y difieren en la secuencia de aminoácidos. Se conoce desde hace décadas la estructura primaria de las cuatro cadenas de Hb normales. La estructura secundaria es muy similar, cada una exhibe 8 segmentos helicoidales designados con las letras A - H. Entre ellos se encuentran 7 segmentos no helicoidales: NA, AB, CD, EF, FG, GH y HC. Esta distinción es fundamental pues los segmentos helicoides son rígidos y lineales, mientras que los no helicoidales son flexibles. Como el hierro del hem forma un puente covalente con la histidina proximal (F8) y el O_2 se une de forma covalente al Hem y a la histidina distal (E7), el hem queda suspendido en una hendidura no polar entre los helicoides E y F. La difracción de rayos X de alta resolución permitió conocer la naturaleza de los contactos intercatenarios de la Hb. Los que se establecen entre cadenas semejantes, es decir, $\alpha_1\alpha_2$ y $\beta_1\beta_2$ son limitados y de escasa importancia. Los



principales contactos son $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 1\beta 2$ que determinan dos estructuras cuaternarias: una para la oxiHb y otra para la desoxiHb . La parte porfirínica del Hem se sitúa dentro de una bolsa hidrofóbica que se forma en cada una de las cadenas polipeptídicas. Las estructuras obtenidas por difracción de rayos X muestran que en la bolsa del Hem existen unas 80 interacciones entre 18 aminoácidos y el Hem. La mayoría de estas interacciones no covalentes se presentan entre cadenas apolares de aminoácidos y las regiones no polares de la porfirina de la hemoglobina. ¹⁵

b. Oxidación y reducción de la hemoglobina

La oxihemoglobina en solución se autooxida y transforma en metahemoglobina (metHb-Fe+3). Sin embargo, para lograr la fijación reversible del O₂, el hierro del hem debe mantenerse en estado reducido (Ferroso, Fe+2) a pesar de la exposición a diversos oxidantes endógenos o exógenos. Entre estos se encuentran ciertos medicamentos oxidantes y algunas toxinas. Para evitar la inactivación funcional de la Hb, el eritrocito cuenta con una eficiente maquinaria reductora. La oxidación de la Hb es escalonada. Los compuestos intermedios se denominan híbridos de valencia y son el resultado de la liberación de O₂ molecular por parte de la oxiHb que termina generando aniones superóxido o peróxido que oxidan entonces el hierro Fe+2 a Fe+3. Normalmente se genera 0.5% a 3% de metHb al día. A medida que la desnaturalización progresa, la metHb se convierte en hemicromos. Estos aparecen cuando la sexta posición de coordinación del hierro se une de manera covalente con un ligando en la molécula de Hb (histidina distal-E7), lo que distorsiona la estructura terciaria. Los hemicromos pueden ser reversibles o irreversibles dependiendo del grado de distorsión de la molécula de Hb y la capacidad potencial de la enzima metahemoglobina reductasa de reducirlos. Cuando los fenómenos oxidativos facilitan la disrupción de los contactos $\alpha 1\beta 2$, se produce la disociación de las cadenas polipeptídicas en dímeros y monómeros que precipitan y constituyen las inclusiones cocoides intraeritrocitarias denominadas cuerpos de Heinz, que se unen a la membrana y acortan la vida del glóbulo rojo. La reducción de la metHb



se produce básicamente por acción de la enzima citocromo b metahemoglobina reductasa que opera en presencia de dos portadores de electrones, el citocromo b y el NADH+H (nicotinamina dinucleotido reducido). La reducción también se produce por otros agentes como el ácido ascórbico (16%), el glutatión (12%) y la enzima NADPH-flavina reductasa (5%). Las pruebas in vitro demuestran que la metahemoglobina reductasa es el factor limitante de la reducción de metHb. A medida que el O₂ sufre reducciones univalentes, se generan especies reactivas que constituyen los oxidantes responsables de la desnaturalización, no sólo de la Hb, sino de los demás componentes eritrocitarios, tales como los lípidos de la membrana, lo cual conduce a lisis celular. Entre estos derivados están los aniones superóxido, peróxido y los radicales hidroxilo. Para evitar en alguna medida este daño oxidativo, el organismo cuenta con ciertos mecanismos que impiden la acumulación de estas toxinas; algunos se ubican dentro de los eritrocitos. Dentro de estos se encuentran: la superóxido dismutasa, que cataliza la dismutación del superóxido a oxígeno molecular y peróxido; la catalasa, que separa al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. Además interactúa con la membrana en forma dependiente del Ca²⁺ y el pH y funciona como un reservorio de NADPH₄₇, y finalmente, la glutatión peroxidasa, principal selenoproteína del organismo (hecho que explica posiblemente las propiedades antioxidantes de este micronutriente), que cataliza la conversión de peróxido a agua, oxidando el glutatión. El glutatión es el cofactor fundamental de la glutatión peroxidasa. Constituye además el principal agente reductor de los eritrocitos y su síntesis requiere de dos reacciones:

- Ácido glutámico + cisteína ----- γ -glutamil-cisteína
- γ -glutamil-cisteína + glicina ----- Glutacion reducido (GSH)

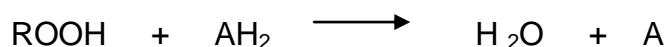
La primera reacción está catalizada por la glutamilcisteína sintetasa y la segunda por la glutatión sintetasa. El proceso que evita la oxidación de la Hb requiere la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG). Para ello es necesario un sistema que mantenga un suministro continuo de GSH. Este sistema está representado por la glutatión reductasa, que cataliza la reducción de



GSSG a GSH, con la participación del NADPH, producido en la vía de las pentosas fosfato. Cualquier alteración en alguna parte de esta vía de síntesis del GSH conduce eventualmente a hemólisis.¹⁶

7. Peroxidasas

La peroxidasa, es una óxido-reductasa son hemoproteínas que contienen un grupo prostético Hemo y utilizan el peróxido de hidrógeno como sustrato oxidante, que contiene un grupo Hemo en el sitio activo, la cual descompone el peróxido de hidrógeno en presencia de un donador de hidrógeno aunque se han encontrado otros tipos de peroxidadas que contienen iones metálicos, como selenio, manganeso y vanadio o flavina. Las peroxidadas son enzimas que catalizan la siguiente reacción:



La reacción importante de las peroxidadas es la anterior, sin embargo existen tres tipos de reacciones en las que puede intervenir: reacciones peroxidativas, oxidativas e hidroxilativas. Para la reacción peroxidativa se requiere de un peróxido orgánico o de agua. El número de compuestos que pueden ser aceptores de hidrógenos para algunas peroxidadas es pequeño. Los compuestos donadores de hidrógenos pueden ser fenoles, aminas u otros compuestos orgánicos. El mecanismo de la reacción se basa en la formación de complejos de enzima-donador de hidrógenos y dos pasos de oxidación univalente. Esta habilidad de catalizar la polimerización, seguido de una precipitación de compuestos aromáticos provenientes de soluciones acuosas es muy importante.

La peroxidasa característica de los hematíes es la *Glutation Peroxidasa* es una selenoproteína que está formada por cuatro subunidades idénticas, y cada una de ellas contiene un residuo de selenocisteína, que es esencial para su actividad enzimático, pero además puede reaccionar de manera efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H₂O₂) usando glutati6n reducido Se han encontrado al menos cinco isoenzimas de GPX en mamíferos. Desde la GPX1-GPX5. La GPX1



se encuentra predominantemente en eritrocitos en la parte citosólica como en la membrana. La glutatión peroxidasa, tienen como sustrato común el H_2O_2 o peróxido de hidrógeno. La gran afinidad por este sustrato hace que se pueda unir al hierro del grupo Hemo por los dos planos del centro activo, el superior y el inferior, dando lugar a una inhibición por exceso de sustrato ya que cuando ambas posiciones están ocupadas por el peróxido de hidrógeno no es posible la unión del otro sustrato que será oxidado. Respecto a ese otro sustrato, su naturaleza y estructura química puede ser muy distinta entre ellos se incluyen fenoles, aminas aromáticas, moléculas orgánicas complejas, o el yoduro y el glutatión antes citados. Otra característica es que es muy resistente a la inactivación térmica por lo cual es considerado una proteína termoresistente muy importante.¹⁷

8. Grupos sanguíneos

a. Sistema ABO

Propuesto por Landsteiner y colaboradores, los cuales comprobaron que la sangre de todo individuo pertenece a uno de cuatro tipos diferentes, que se distinguen uno de otros según el resultado de una reacción de aglutinación. Plantearon la existencia de cuatro fenotipos ABO principales conocidos como grupos O, A, B y AB; en donde los individuos del grupo A poseen el antígeno A (Anti – A) que son glucoproteínas en sus hematíes, los del grupo B el antígeno B (Anti-B), los del grupo AB presentan ambos antígenos y los del grupo O carecen de ambos. El patrón de herencia de estos grupos sanguíneos, corresponde a la interacción de alelos múltiples en los cuales el gen O es recesivo frente a los codominantes A y B. Los grupos sanguíneos son antígenos presentes en un gran número en la superficie de los eritrocitos. Su estructura química consiste en carbohidratos de proteínas y glicolípidos. Los genes A y B codifican a las transferasas A y B (glicosiltransferasas), las que transfieren N acetil-galactosa y galactosa, respectivamente al mismo sustrato, el antígeno H. El gen O es inactivo (debido posiblemente a un fallo estructural



más que a un fallo de la expresión de las transferasas A o B), por lo que este antígeno queda sin modificación. El locus genético para el sistema ABO se identificó en el cromosoma 9 (q34) por estudios familiares y de genética celular.¹⁸

FIG 6: Esquema de reacción de grupo sanguíneo

Grupo sanguíneo	A	B	AB	O
Glóbulos rojos				
En la membrana	Antígeno A	Antígeno B	Antígenos A y B	No antígenos
En el plasma	Anti-B	Anti-A	No anticuerpos	Anti-A y Anti-B

FUENTE: http://alojamientos.us.es/hematologia/practicass_2006-07.pdf

- individuos A tendrán anticuerpos anti-B
- individuos B tendrán anticuerpos anti-A
- individuos AB no tendrán anticuerpos de este tipo
- individuos O tienen los dos tipos de anticuerpos.

El grupo sanguíneo AB0 lo determina un locus situado en el extremo del brazo largo del cromosoma 9. Constituye un caso de alelismo múltiple basado en la existencia de tres alelos:

- I^A que da lugar a la producción de antígenos A.
- I^B que da lugar a la producción de antígenos B.
- i que determina no producción de antígenos.



Los alelos I^A e I^B son codominantes, y el alelo i es recesivo frente a ambos. Estas características determinan la existencia de cuatro fenotipos. El sistema ABO puede resumirse en el siguiente cuadro:¹⁸

Fenotipos	Genotipos	Antígenos en los eritrocitos	Anticuerpos en suero
A	$I^A I^A$ ó $I^A i$	A	anti-B
B	$I^B I^B$ ó $I^B i$	B	anti-A
O	ii	ninguno	anti-A y anti-B
AB	$I^A I^B$	A y B	ninguno

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 contengan¹⁸

b. 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, expresaran el factor Rh O.¹⁹

9. Serología Forense

Las pruebas de sangre como determinación de sangre, tipo sanguíneo, características de la sangre y la examinación de la mancha de sangre, para la preparación del testimonio o de presentaciones en el ensayo son las funciones principales de la serología forense, que también analiza el semen, saliva, otros fluidos corporales y se puede o no se puede implicar con la secuenciación del ADN. Debe ser reconocido, sin embargo, que en muchos laboratorios del crimen, no puede haber distinción clara de este campo, en el personal y sus funciones son realizadas por un criminalista, el bioquímico, el biólogo forense, o el otro técnico forense, y no así por el forense de serología que es una rama importante en el análisis ya que se considera que la evidencia de la sangre y de la mancha de sangre es una parte tan integral de la mayoría de las escenas de crimen que un investigador especialista dará utilizando la probabilidad con frecuencia en testimonios. La sangre es la evidencia más común, más bien conocida, y quizás la de mayor importancia. Su presencia liga siempre a sospechoso y víctima, los patrones de la mancha de sangre hablan mucho de la posición y del movimiento durante el crimen, que pulsó quién primero, de qué manera, y cuántas veces.

En el análisis de muestras biológicas (orina, sangre o contenido gástrico) donde las muestras biológicas usadas entregan información acerca de la presencia de algún tóxico en particular, o de sus metabolitos en el organismo. Se debe tomar en cuenta los tiempos de vida media de los tóxicos, el volumen de distribución y su afinidad por los distintos tejidos. Las muestras principales en este tipo de análisis, son la sangre, el plasma o el suero, ya que éstas distribuyen las sustancias por todo el cuerpo.²²

Es importante destacar el papel fundamental que cumple la analítica instrumental dentro de las técnicas mencionadas anteriormente, ya que gracias



a los avances instrumentales hechos por científicos forenses es posible llegar a resultados certeros, tan necesarios a la hora de defender las metodologías y los resultados obtenidos ante la ley. Por esta razón es cada vez más importante contar con instrumentos más sensibles capaces de llegar a límites de detección más pequeños, mediante el uso de cantidades mínimas de muestra y técnicas analíticas acopladas, para poder determinar la presencia de sustancias donde se creía que no existían. Además, cerca de 80% de la población son “secretors” que significa que sus otros fluidos corporales contienen los mismos antígenos, anticuerpos, y enzimas polimórficas que en su sangre. De hecho, la saliva y el semen en tales individuos tienen concentraciones más altas de los antígenos de A y de B que su sangre por lo cual en serología se deseará a menudo analizar las manchas de otros fluidos corporales. ²⁰

10. La sangre en la escena del crimen

La sangre mojada tiene más valor que sangre secada porque más pruebas pueden ser funcionadas. Por ejemplo, el contenido del alcohol y de la droga se puede determinar de sangre mojada solamente. La sangre comienza a secarse después de 3-5 minutos de exposición al aire. Mientras que se seca, cambia color hacia marrón y negro. La sangre en la escena de crimen puede estar bajo la forma de piscinas, gotas, borrones de transferencia, o cortezas. Las piscinas de sangre tienen obviamente valor más evidente en la obtención de una muestra mojada. Las gotas de la sangre dicen la altura y el ángulo de los cuales la sangre bajó. La ciencia forense del análisis del salpicón de la sangre dice que esa sangre que bajó el perpendicular al piso de una distancia de 0-2 pies haría una gota circular con los bordes levemente raídos. Un borrón de transferencia de la sangre en la pared o el piso dice la dirección de la fuerza del soplo. La dirección de la fuerza está siempre en la dirección hacia la cola, o un extremo más pequeño, del borrón de transferencia, o de la salpicadura. Es decir el área más grande del borrón de transferencia es el punto del origen. Las muestras de sangre se recogen de la víctima, del demandado, y de la escena de crimen. ²¹



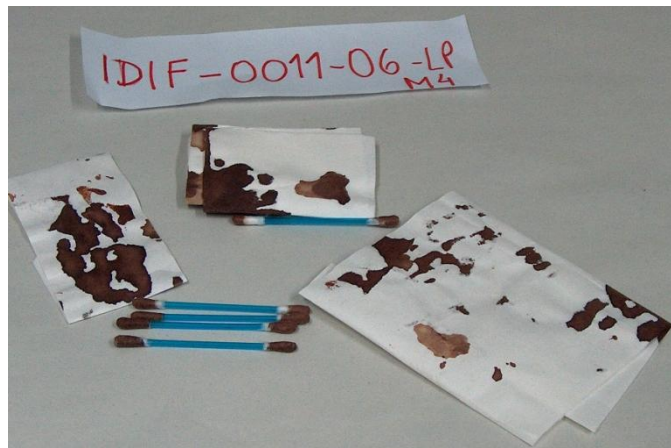
11. Recogida de las muestras de sangre en el campo forense

La sangre se puede encontrar en diferentes estados: líquida o en forma de mancha. El aspecto de las manchas de sangre varía con la antigüedad y el soporte (telas de vestimentas, cerámica, pisos, etc...) sobre el que se encuentran. Como norma general, cuanto más antigua es una mancha de sangre más oscura es su color, pero siempre son las condiciones ambientales las que determinan el aspecto de la mancha. Las condiciones de envío de las muestras de sangre varían según el estado en que se encuentre.

a. Sangre líquida

Es labor del forense realizar las extracciones de sangre, ya sea de cadáveres, o de individuos vivos. Para un buen análisis, se han de enviar 5 ml. de sangre en un tubo perfectamente etiquetado que contenga anticoagulante (EDTA) y preferiblemente refrigerada (4–8 °C). En la etiqueta debe constar al menos la fecha, la localidad, el nombre completo del sujeto al que se le extrajo la sangre y el número de caso o de diligencias. Además es aconsejable disponer de contenedores aptos para introducir los tubos y evitar así su rotura. Cuando no se dispone de anticoagulante ni de neveras portátiles se puede enviar la sangre en forma de mancha, bien sobre una gasa, tela o papel (Fotografía 1). La sangre en forma de mancha se conserva mejor que en su estado líquido cuando no hay posibilidad de refrigerarla.²¹

Fotografía 1: Evidencias de manchas de sangre



b. Manchas de sangre sobre superficies absorbentes

Si tuviéramos una prenda de vestir manchada, aunque sólo fuera una pequeña parte (el cuello o el puño de una camisa) se enviará la prenda completa al Laboratorio (Fotografía 2) pero si la prenda u objeto fuera suficientemente grande (un sofá, un colchón), se recortará la zona manchada dejando un margen de uno o dos centímetros sin mancha. En los tejidos claros las manchas presentan un color rojo oscuro que con el tiempo tiende a ennegrecerse más. En los tejidos oscuros las manchas se visualizan mal y las encontraremos sólo por el tacto acartonado que confieren a la tela. Es aconsejable mandar la prenda bien seca y en bolsa de papel, ya que si se envía húmeda y en bolsa de plástico el proceso de putrefacción se acelera. La muestra se puede dejar secar a temperatura ambiente y evitando su exposición al sol. A veces resulta más difícil obtener resultados en la analítica de manchas con abundante sangre, en las cuales el secado ha sido lento e incompleto, que en pequeñas manchas de sangre donde el secado se ha producido rápida y totalmente, y no ha dado tiempo a que actúen los procesos de descomposición. Es importante recordar que cada prenda debe empaquetarse individualmente y nunca se han de mezclar prendas que procedan de dos individuos distintos en un mismo sobre.²⁰

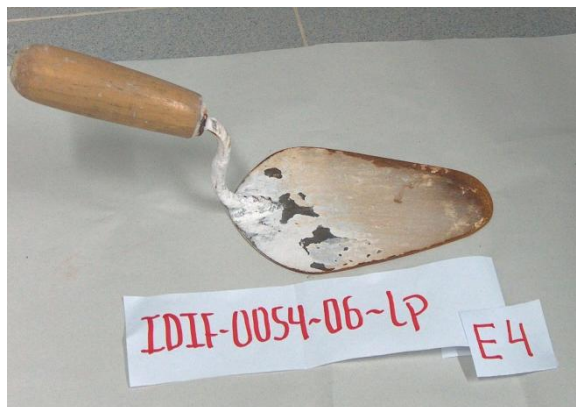
Fotografía 2: Evidencias sobre superficies absorbentes



c. Manchas de sangre sobre superficies no absorbentes

Cuando la mancha se encuentra sobre una superficie no absorbente forma costras con aspecto de escamas brillantes o agujas (Fotografía 3-4); en manchas recientes las escamas son rojas aunque el color depende más bien del grosor de la costra (a menor espesor el rojo es más acusado); con la antigüedad las costras se van haciendo más oscuras. Si el objeto manchado fuera pequeño se enviará directamente, pero si no fuera posible (pared, suelo, mesa) se recogerá la mancha sospechosa de sangre para su envío.²⁰

Fotografía 3: Evidencias sobre superficies no absorbentes



Existen dos formas de recoger una mancha asentada sobre una superficie : mediante raspado: para recoger una mancha mediante este procedimiento es imprescindible que se encuentre en estado sólido, ya seca. Se puede proceder



al raspado mediante una hoja de bisturí desechable, recogiendo las escamas en una hoja de papel que después será doblada a modo de papelina y perfectamente etiquetada. Se recomienda esta forma de recogida para manchas muy concentradas (con gran cantidad de sangre ya seca). Si las escamas se introducen en bote o caja de plástico en el laboratorio será difícil recuperarlas porque la electricidad estática hace que se peguen a las paredes. Si la mancha es muy tenue obtendremos muy pocas b) escamas que se pueden perder durante el proceso de recogida o transporte. Mediante bastoncillo (torunda): con este método se pueden recoger tanto manchas ya secas como todavía húmedas. Si la mancha ya está seca es necesario humedecer ligeramente el algodón con agua (mejor si es agua destilada) o suero salino isotónico (8.5 g %) antes de proceder a su recogida, para facilitar el paso de la mancha desde el soporte donde se encuentra a la torunda.²²

Fotografía 4: Evidencias sobre superficies no absorbentes

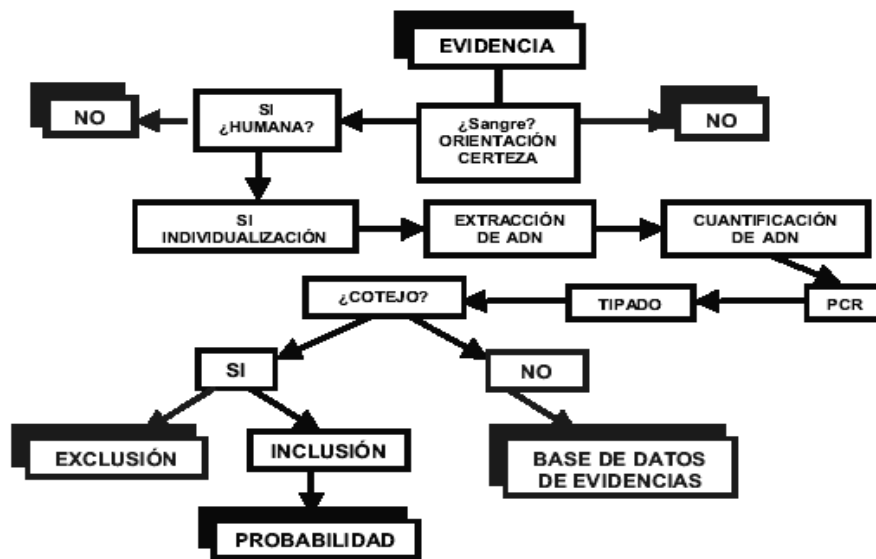


12. Etapas de análisis de una muestra forense



Antes de realizar un estudio de ADN con el fin de individualizar las evidencias existen pasos previos en la analítica que nos permiten discriminar el tipo de resto biológico ante el que nos encontramos. Ello se logra a través de las pruebas preliminares, que si bien son más sencillas que el propio análisis del ADN presente en una muestra, no por ello son menos importantes. El peso de la evidencia varía según se trate de un tipo de resto biológico u otro, es decir, no es lo mismo hallar una mancha de sangre (que puede implicar lucha) que un filtro de cigarrillo (que simplemente puede indicar la presencia de un individuo en la escena del delito, pero no necesariamente su participación activa en él). Sin embargo, en cada caso las circunstancias son diferentes y muestras biológicas que quizá no tengan relevancia en un hecho delictivo la pueden tener en otro distinto ²³

FIG 7: Etapas de análisis de una muestra forense



FUENTE:

<http://www.criminalistica.net/modules.php?name=News&file=article&sid=384>

Existen fundamentalmente tres tipos de pruebas preliminares

Orientativas: Se trata de técnicas que nos revelan la posible naturaleza de la mancha pero no nos aseguran, es decir, sirven sólo para descartar, pero no para concluir. Por ejemplo, la llamada reacción de Adler o el método del trabajo es una sencilla prueba colorimétrica que si resulta positiva nos orienta



a pensar que estamos ante una mancha de sangre, pero sin poder asegurarlo. Si la prueba resulta negativa podremos asegurar que el resto que estamos analizando no es sangre. Estas pruebas son sencillas de realizar, son de bajo costo, muy rápidas, y nos ayudan a seleccionar las manchas a analizar.

De certeza: Nos permiten determinar el tipo de resto biológico analizado con seguridad. La detección de hemoglobina en la muestra para determinación de sangre o la visualización al microscopio de espermatozoides para la determinación de semen.²³

Específicas: Nos permiten determinar el tipo de organismo al que pertenece el resto biológico. Una vez que se determina el tipo de muestra que hemos de analizar, interesa saber si se trata de una muestra humana o no. Existen principalmente dos tipos de pruebas específicas: unas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo y otras basadas en el estudio de ciertas regiones del ADN, si bien, en cierto tipo de muestras (pelos, restos óseos) puede realizarse un estudio de las características morfológicas para determinar el tipo de organismo. En el caso de que nos encontremos ante una muestra de origen animal, normalmente los análisis terminarán en este punto a no ser que el objetivo sea precisamente determinar la especie (por ejemplo, en caso de delitos ecológicos).²³

Pruebas individuales se da en el caso de muestras de origen humano se procederá a realizar la segunda etapa del estudio destinada a individualizar la muestra mediante técnicas de ADN que en ocasiones no es posible determinar el tipo de resto biológico hallado por la escasa cantidad de muestra disponible. En estos casos se suele proceder directamente a realizar los estudios de ADN para intentar individualizar la muestra.²³



13. Manchas de sangre

Es el indicio más abundante, mas frecuente por lo general y se toma en cuenta:

- Aspecto de las manchas: Depende del tiempo de antigüedad y del soporte.
- Mecanismos de producción pueden ser por:
 - Proyección. la sangre sale proyectada
 - Altura a mayor altura mas irregular y mayor diámetro
 - Naturaleza del soporte en superficies lisas y no absorbentes gotas circulares
 - Escurrimiento predice los cambios de posición que tubo el cadáver
 - Contacto queda impresión, huella de manos, etc
 - Impregnación inhibición del sustrato por el liquido
 - Limpiadura: mixto entre contacto y la impregnación

Las investigaciones analíticas de la mancha de sangre comprenden:

- Diagnostico genérico
- Diagnostico especifico
- Diagnostico individual
- Diagnostico de sexo del individuo
- Data de una mancha de sangre²³

a. Diagnostico genérico

- Pruebas de orientación: Son de poca especificidad y gran sensibilidad como por ejemplo la evidencia de peroxidasas sanguíneas
- Pruebas de certeza: Son técnicas microscópicas (investigación directa e investigación de elementos formes tras preparación previa).Técnicas microquímicas o cristalográficas (cristales de hemocromogeno).Técnicas espectroscópicas (tienen por objeto



obtener espectro de hemoglobina). Técnicas cromatográficas que aprovechan movilidad de la hemoglobina ²³

b. Diagnostico específico

- Elementos formes
- Hemoglobina
- Suero y proteínas constitutivas
- Determinaciones de anfitígenos de superficie
- Evidencia antihumano en pocillos
- Inmunolectroforesis
- Primero electroforesis y luego doble difusión
- Inmunorreoforesis
- Desarrollo del antígeno y del anticuerpo en la misma placa electroforetica

c. Diagnostico individual

- Métodos basados en la investigación de aglutinogenos (ABO,Rh , etc) por inhibición de la aglutinina o elusión- absorción
- Métodos basados en la investigación de grupos plasmáticos que son : grupos plasmáticos no inmunológicos (haptoglobinas) y grupos plasmáticos inmunológicos (ligados a Ig)
- Investigación de grupos enzimáticos eritrocitarios como la fosfatasa acida, g6pd, etc²³

14. Contaminación de muestras forenses

Las muestras pueden sufrir diferentes tipos de contaminación como ser contaminación biológica de origen humano, la transferencia de indicios biológicos, la putrefacción y los tratamientos físicos y químicos a los que se pueden ver sometidas las muestras.



a. Contaminación Biológica De Origen Humano

Este tipo de contaminación se produce por la presencia, en la escena del delito o en el cuerpo de la víctima, de indicios biológicos no relacionados con los hechos y puede ser anterior o posterior a la producción de los mismos.

La contaminación biológica anterior a los hechos se debe a la presencia de material biológico humano previo a la producción del delito, por lo que es inevitable. Suele ser frecuente en algunos tipos de muestras como p. e. las toallas o los paños de cocina, que son muestras en las que por su propia función suelen encontrarse restos de células epiteliales, manchas de sangre, sudor etc. Otras muestras en las que también es frecuente que exista una contaminación previa a los hechos son las tapicerías, alfombras, fundas de asientos en los coches etc. Por ello es muy importante establecer el valor de los indicios recogidos en este tipo de muestras y de los resultados obtenidos a partir de ellos. En el cuerpo de la víctima también podemos encontrar material biológico anterior a la producción de los hechos realizados por la víctima.

La contaminación biológica posterior a los hechos se debe al depósito de material biológico humano con posterioridad a la producción del delito, por lo que puede ser evitable. Este tipo de contaminación puede estar producida por personas ajenas a la investigación como curiosos, familiares, testigos etc. Es relativamente frecuente ver, en la escena del crimen, a familiares fumando o a testigos reproduciendo los hechos y tocando pruebas. También se pueden dar contaminaciones con frutas, verduras u otras sustancias que tienen un parecido similar con la sangre ya sea de color o ser de color más intenso para hacer desaparecer los indicios o cubrirlos para que a simple vista no se observe con el fin de eliminar las pruebas de un hecho.

Los procesos de putrefacción pueden ser inherentes a la propia muestra por efecto de la antigüedad o de las condiciones ambientales, lo cual es inevitable o provocados por un defecto en el empaquetamiento y conservación de las muestras durante periodo de mantenimiento y envío al laboratorio, lo que



puede ser evitable. Las muestras más sensibles a este tipo de contaminación son las que contienen indicios húmedos como ropas de vestir o del hogar con grandes manchas de sangre o de orina, los fluidos biológicos que son recogidos con hisopos secos o los hisopos humedecidos que son utilizados para recoger manchas secas en el lugar de los hechos y en el cuerpo de la víctima como manchas de sangre. Para evitar la putrefacción es necesario dejar las muestras secar a temperatura ambiente, en un lugar protegido y una vez secas introducirlas en bolsas de papel o cajas de cartón para su envío.

b. Contaminantes físicos y/o químicos

Pueden dificultar algunos de los procesos del análisis genético, fundamentalmente los procesos de amplificación y extracción de ADN. Estos pueden ser inherentes a la propia muestra, cuando el producto químico forma parte del soporte o sustrato donde cae la mancha como ser. tintes, colorantes, pinturas, esmaltes, aceites, o bien, cuando las muestras son sometidas a la acción de productos químicos como ropas lavadas con lejías y detergentes, en estos casos suele ser inevitable, salvo que la mancha afecte a distintos soportes y haya posibilidad de seleccionar alguno que no haya sufrido este tipo de tratamientos. O pueden ser provocados con sustancias del mismo color de la sangre que son mezclarlas con las manchas o cuando las muestras se envían inmersas en productos conservantes o han sido tratadas con productos como en la utilización de reveladores de huellas dactilares que pueden afectar al análisis de los indicios biológicos.

c. Transferencia De Indicios Biológicos

Se debe al traslado, normalmente accidental, de los indicios de una localización a otra, lo que puede dar lugar a una contaminación o puede ocasionar la pérdida de una prueba. Los indicios biológicos que sufren con más facilidad este cambio de localización son los pelos.

15. Métodos para la determinación de sangre



La ciencia del análisis de la mancha de sangre sigue algo tradicionalmente ciertas preguntas surgen como ser:

¿Es la muestra sangre?

Para esto los científicos forenses utilizan color o pruebas cristalinas como ser : La prueba de benzidina era popular para un rato hasta que fue descubierto ser un agente carcinógeno y fue substituida por la prueba de Kastle-Meyer, que utilizó el fenoftalein químico. Cuando entra en contacto con la hemoglobina lanza las enzimas peroxidasas que causan un color rosado brillante a la forma. Para detectar manchas invisibles de la sangre, se utiliza la prueba del luminol, que es un producto químico rociado en las alfombras y los muebles que revela una luz fosforescente leve en la obscuridad donde están presentes las manchas de sangre, la sangre tiene una tendencia a cristalizarse, con pruebas cristalinas como las de Teichman, la prueba de Takayama, y prueba de Wagenhaar. El término genérico para cualquier manera de determinar si algo es sangre o no se llama una prueba presunta.²⁴

¿Es la muestra sangre de animal?

Para esto utilizan pruebas del antisuero o del gel, y es importante probar para la sangre de animal. La respuesta es que cualquier posibilidad de lesión al animal doméstico de la casa debe ser eliminada (o una lucha entre dos animales domésticos, si los animales domésticos están presentes). Los animales domésticos separan normalmente manchas de sangre humanas todo alrededor de la escena de crimen, pero el animal doméstico puede ser una víctima, un autor, o un testigo (por la transferencia de IADN del animal al autor). De todas formas, la prueba estándar para decir si algo es humana o no, se llama la prueba del precipitin, y es una técnica que se basa en inyectar un animal (generalmente un conejo) con sangre humana. El cuerpo del conejo crea los anticuerpos contra-humanos, que entonces se extraen del suero del conejo. Si este antisuero entonces se coloca en una muestra de la escena de crimen, y crea la coagulación, sabes que la muestra es humana.²⁴



¿Si es sangre humana, qué tipo?

Primero debe determinarse si tienen una muestra adecuada y de la calidad. Si es así se hace el grupo directo con el sistema del A-B-O. El indirecto tendría que ser hecho en manchas seriamente secadas, y la técnica más común es la prueba de absorción elusión. Es hecha agregando los anticuerpos compatibles del antisuero a una muestra, entonces calentando la muestra para romper los enlaces del anticuerpo-antígeno, entonces agregando las células rojas sabidas de grupos sanguíneos estándares para ver qué coagula.²⁵

Todos los test usados en la detección de sangre se basan principalmente en la actividad de las enzimas peroxidasa presentes en la sangre, las cuales reaccionan con los agentes químicos causando un cambio de color. Algunas de las pruebas usadas son: el test de benzidina, de leucomalaquita verde, fenoltaleina o tetrametil benzidina. Pero uno de los más famosos es el uso del Luminol, que se utiliza en química forense para detectar trazas de sangre. Éste compuesto es un derivado del ácido ftálico que cataliza la oxidación con peróxido de hidrógeno bajo emisión de luz, es decir su mayor importancia reside en la reacción de quimioluminiscencia que da con peróxidos en presencia de complejos de hierro como catalizador²⁶

a. Test del Luminol

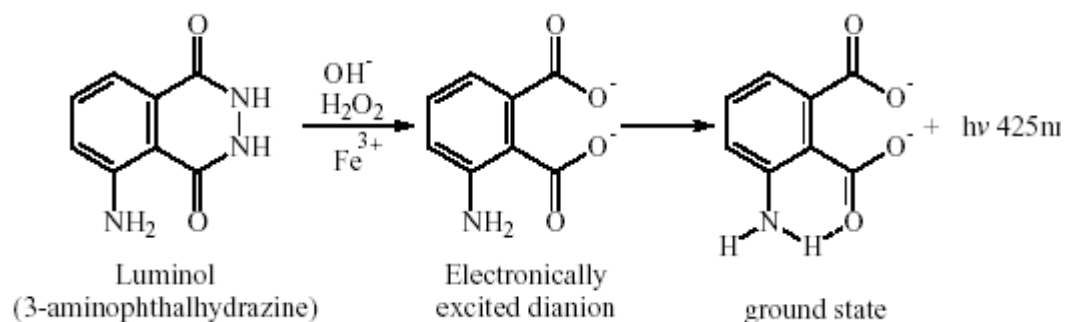
El Luminol es un derivado del ácido ftálico. Se trata de un sólido verdoso poco soluble. Su mayor importancia reside en la reacción de quimioluminiscencia que da con peróxidos en presencia de complejos de hierro como catalizadores. Su fórmula es : $C_8H_8N_3H_2$. El luminol se utiliza en química forense para detectar manchas de sangre ya que éste cataliza la oxidación con peróxido de hidrógeno bajo emisión de luz, el luminol produce luz al oxidarse. Se emplea para la detección de las manchas de sangre porque la hemoglobina que contiene la sangre actúa como catalizador. El luminol posee la capacidad de enseñar por medio de luz visible, cuando es oxidado. Por esto es una herramienta muy utilizada en la investigación forense, ya que gracias a sus



propiedades; puede revelar, en solución con un oxidante, hasta los rastros más pequeños de sangre, por medio de un brillo azulado. Esta peculiar característica facilita el reconocimiento de aquellas sustancias oxidantes o sus catalizadores en situaciones que requieren rapidez y efectividad, tal como la escena de un crimen donde se demanda el señalamiento de cualquier mancha de sangre. Pulverizando una solución de luminol en un área sospechosa se reduce quimioluminiscencia en los lugares en que ha habido sangre, incluso si esta ha sido lavada y no es perceptible a simple vista.

Es muy sencillo establecer condiciones básicas para demostrar la quimioluminiscencia del luminol. Solo se necesita un oxidante, una base, y un catalizador. En este último resalta la sangre al requerir mínimas cantidades y producir un brillo suficientemente consistente e intenso. Por lo tanto la investigación forense puede encontrar de gran utilidad y confianza el uso del luminol como indicador de rastros de sangre.

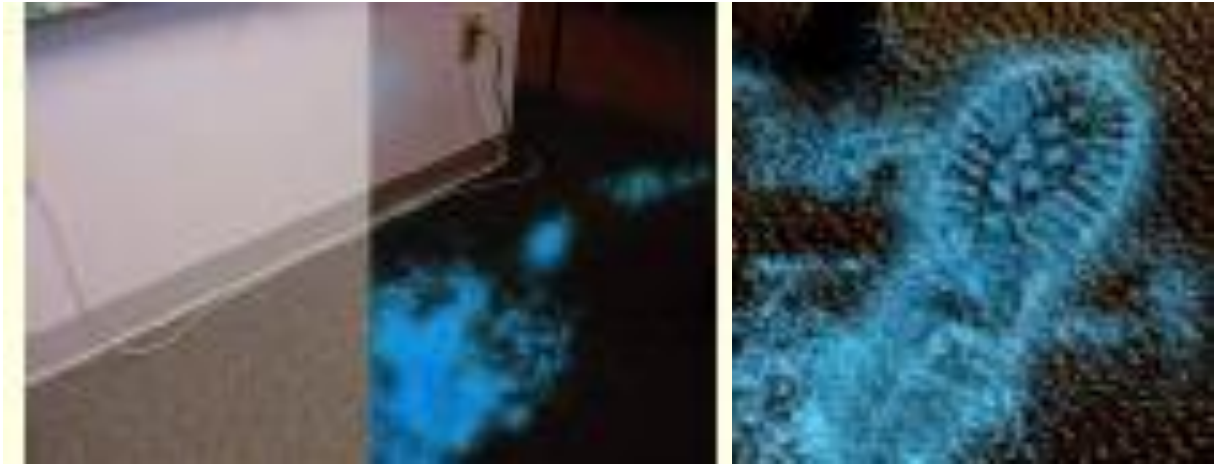
Las confusiones con otra clase de compuestos que puedan dar falsos positivos de sangre en la escena de un crimen pueden ser desmentidos con la observación cuidadosa del color e intensidad del brillo, además de la espuma formada en muestras frescas de sangre. Este producto químico es una herramienta muy importante en el desarrollo de la criminalística de campo, especialmente en el rastreo de hemáties.^{27 28}



Reaccion del luminol



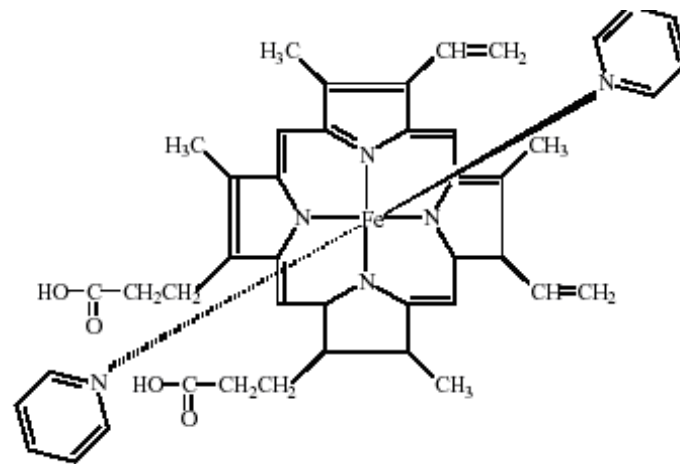
FIG 8: Fotografías de revelado de manchas de sangre en el piso con el test de luminol



FUENTE: <http://www//science,houstuffworks.com/luminol.htm>

b. Pruebas de cristalización

Las pruebas de cristalización que se usan ahora raramente son todos basados en la formación de cristales derivados de hemoglobina como el haematin, haemin y haemochromogen. La prueba se lleva a cabo en un porta objetos del microscopio, con los reactivos agregándose a la mancha dando la formación de cristal observado microscópicamente. Probablemente los mejor conocidos de las pruebas de cristal son los desarrollado por Takayama aproximadamente 80 años antes donde se agregaba a una solución alcalina de piridina se agrega a la mancha y, si es sangre están presentes cristales, rosas de un complejo entre la piridina y el Hem de la hemoglobina cuando la diapositiva se calienta. La estructura del complejo se muestra como la piridina, con varios otras bases nitrogenadas, incluso la nicotina, metilamina, histidina. El complejo formado en la prueba de Takayama generalmente se acepta con las pruebas de cristal donde un resultado positivo confirma la presencia de sangre. La sensibilidad es aproximadamente 0.001 mL de sangre o 0.1 mg de hemoglobina. Un negativo el resultado necesariamente no muestra esa sangre está. Las manchas de sangre a 20 años viejos ha dado los resultados positivos en las pruebas de cristalización.²⁹



Pyridine ferroprotoporphyrin

Complejo formado en el test de Takayama

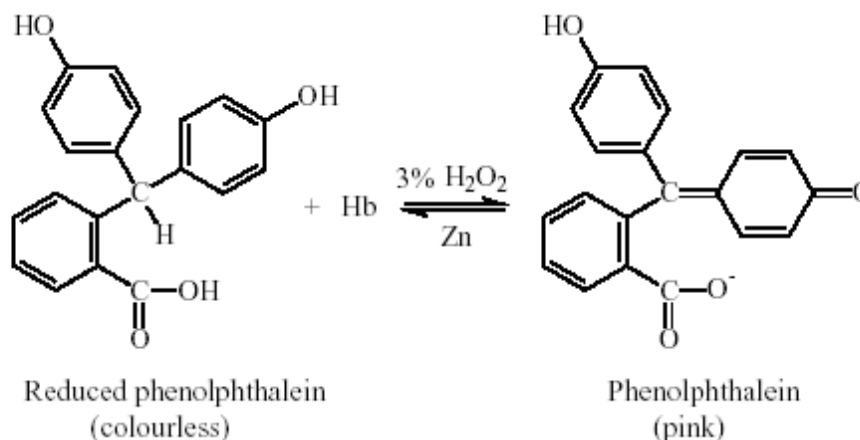
FIG 9: fotografías de resultados positivos de los test de Teichmann lado derecho y takayama lado izquierdo



FUENTE: <http://www.1.folha.uol.com/folhas/ilustrada/ult90u66300.shtml>

c. Prueba de kastle-meyer

La fenoftaleina reducida contiene la solución alcalina y presencia de cinc. Esta solución es el colorante y se da la oxidación con la hemoglobina y peróxido causa que un color instantáneo cambie a rosa luminosa bien conocida. La prueba se usó originalmente en un paso, pero muchas de las interferencias potenciales pueden ser eliminadas llevándolo a cabo en dos pasos.



Oxidación y reducción de la fenofthaleina por la hemoglobina y el peróxido

En la fórmula original, una cantidad pequeña del reactivo de Kastle-Meyer como preparado es mixto con los volúmenes iguales de 95% etanol y 10% solución de peróxido de hidrógeno. La mancha sospechosa es frotada suavemente con un pedazo pequeño de papel del filtro y una gota del reactivo mixto agregado al papel. El desarrollo de un color rosa es indicativo de la presencia de hemoglobina que ha el peróxido de hidrógeno a un especie oxigenada. Sin embargo, la prueba dará un resultado aparentemente positivo con otros materiales del oxigenado. En la versión del 2-paso de la prueba, el reactivo de Kastle-Meyer es sólo mixto con un igual volumen de 95% etanol. Esta solución se agrega primero a la mancha en el papel del filtro. Si el color rosa desarrolla a rojo a estas alturas, eso está sin la suma de peróxido de hidrógeno, la mancha en cuestión no es sangre. Si hay ninguna reacción, una gota de hidrógeno, a estas alturas la solución del peróxido se agrega, y la presencia de un color rosa indica la presencia probable de sangre. Una muestra que da un resultado positivo en sangre y pruebas de Kastle-Meyer serían informado como sangre probable. A menos que un resultado positivo se obtuvo como consecuencia con una prueba biológica conocida para ser humano-específico, la presencia de sangre no podría confirmarse.

Pruebas que podría usarse para la confirmación habría las reacciones del antígeno-anticuerpo incluido tal cuando Ouchterlony la difusión doble, la presencia de una enzima como alfa-2-HS-glicoproteína conocido para ser



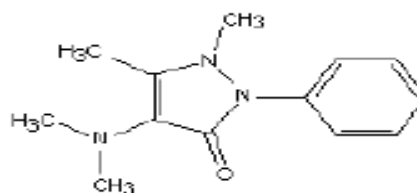
humano específico, o la presencia de una sucesión de ADN específico a los humanos. ²⁹

d. Métodos instrumentales

La alta actuación de la cromatografía en líquido (HPLC) puede usarse para confirmar la identidad de sangre usando la absorbancia de la hemoglobina para el descubrimiento de sangre. Este método también puede usarse para identificar las especies de origen de las variaciones en la hemoglobina y distinguir hemoglobina fetal de la hemoglobina del adulto, y para dar una estimación de la edad de una mancha de sangre. ²⁹

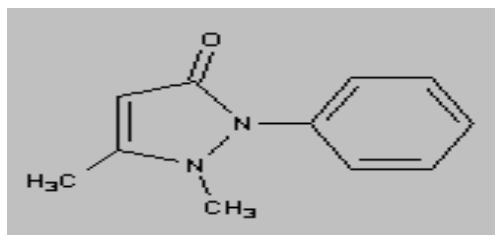
16. Test Aminofenazona Aminoantipirina

Aminofenazona.- Amidopirina es un polvo cristalino blanco inodoro que en solución es incolora, soluble en alcohol y cloroformo utilizada para pruebas colorimétricas con una sensibilidad de 50 mg/L cuya estructura química es :



Aminofenazona

Aminoantipirina : La Antipirina contiene no menos de 99,0 % de $C_{11}H_{12}N_2O$ es completamente soluble en un peso igual de agua fría; la solución es incolora o algo amarilla cuando se observa transversalmente en un tubo, es un polvo cristalino blanco o cristales incoloros, inodoro y con un sabor débilmente amargo. Sus soluciones son neutras al tornasol. Muy soluble en agua; fácilmente soluble en alcohol y en cloroformo; moderadamente soluble en éter. Cuya fórmula es $C_{11}H_{12}N_2O$ ³⁰



Aminoantipirina

a. Fundamento del método

El método de aminofenazona y aminoantipirina tiene como fundamento químico una reacción de oxidación - reducción por lo que se definirá el concepto de ambos, la oxidación 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 un isómero de la porfirina, la protoporfirina IX, unida a un ión 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 con un nitrógeno de un aminoácido histidina y con una molécula de agua respectivamente. Que ejerce una acción catalítica por el grupo Hem que actúa como una enzima la **peroxidasa** gracias a que el ion ferrico tiene propiedades antagonicas por el peróxido de hidrogeno y le da la propiedad de esta enzima que cataliza reacciones de descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, este oxígeno actúa como oxidante de un sustrato que es la aminofenazona o la aminoantipirina promoviendo la formación de color, evidenciando al perito que la muestra puede contener sangre.^{31, 32}

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:



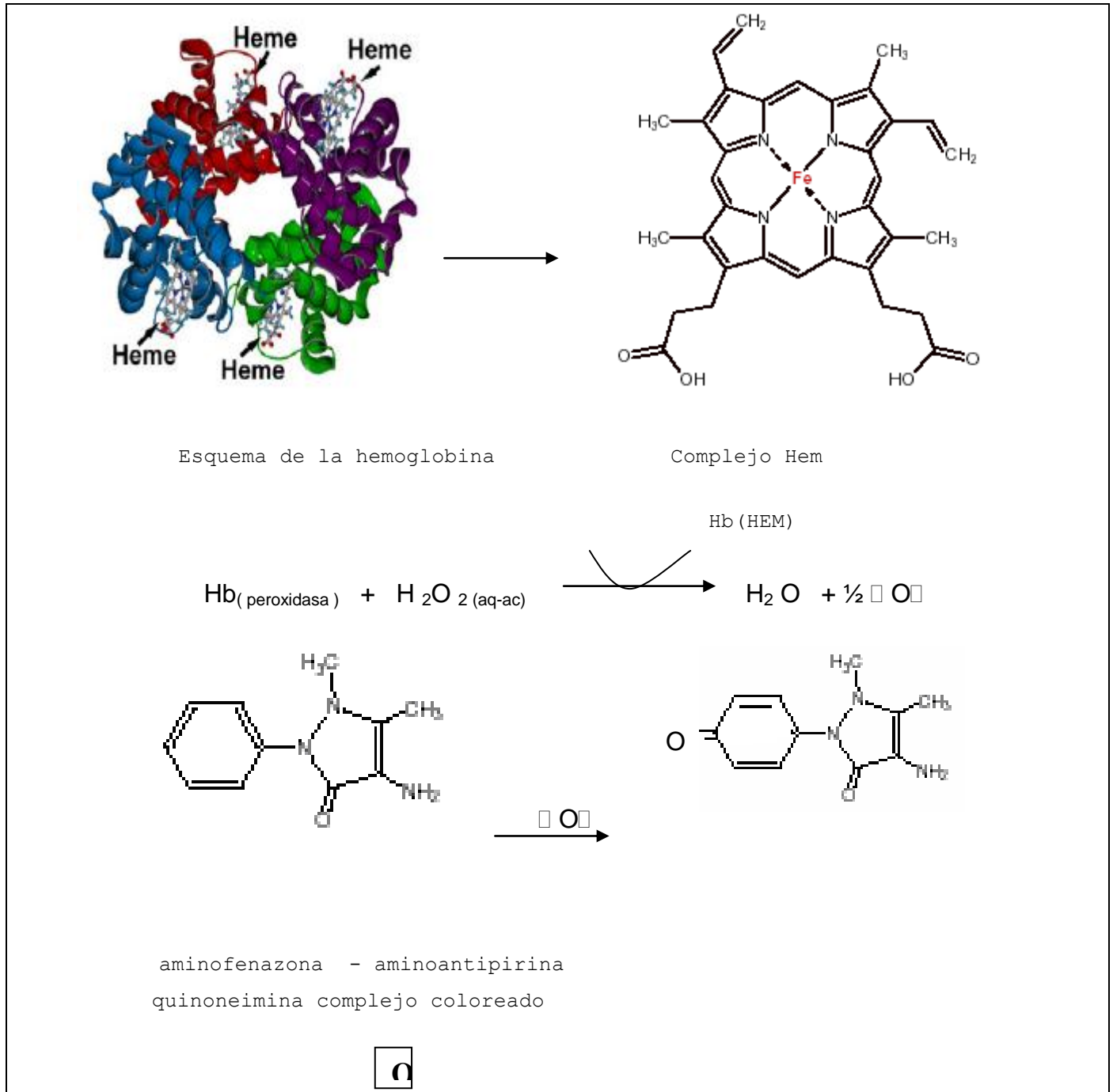
Como se observa el peróxido de hidrógeno, es un agente oxidante fuerte en disolución ácida que le da el ácido acético empleado. Sólo se comporta como reductor frente a oxidantes muy fuertes como el permanganato potásico. Habitualmente, las reacciones de oxidación con el peróxido de hidrógeno, se producen rápidamente en medio básico y de forma muy lenta si el pH es ácido.

Por lo cual en este método el sustrato que interviene es la **aminofenazona** y la **aminoantipirina**. Este compuesto es una amina aromática del tipo



leucobase que, cuando pasa a su forma oxidada por el oxígeno liberado por el peróxido de hidrógeno cambia de color. (Ver fig. 10) ^{31,32}

FIG. 10: Reacción del método aminofenazona y aminoantipirina





Por otra parte la sangre posee enzimas peroxidasas que también son detectadas cuya reacción se basa en que se da una lisis celular en medio ácido, liberando las catalasas y peroxidasas presentes en la célula esto se aprovecha para poder comprobar la presencia de peroxidasas en una muestra, puesto que la reacción no se produciría si no existe catalizador. El medio ácido además es requerido 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 hidrógeno (H_2O_2) como sustrato oxidante, por descomposición se genera agua y O_2 como producto de la reacción enzimática transformando la aminoantipirina a la aminofenazona de incolora a color rosa y violeta. Por lo tanto, el cambio de color indica la posibilidad de que la mancha estudiada sea sangre.^{31,32}

C. MARCO CONCEPTUAL

- FORENSE Ciencia a la cual el médico forense realiza estudios de sustancias biológicas de escenas de violación y crimen relacionados con el ámbito judicial.
- SANGRE: Líquido rojo espeso circulante por el sistema vascular sanguíneo formado por corpúsculos celulares (hematíes, leucocitos y plaquetas) y por una sustancia líquida el plasma sanguíneo que contiene una serie de sustancias (proteínas, minerales y elementos gaseosos).
- SOPORTE Material físico utilizado como depósito para sustancias biológicas líquidas.
- COLORIMETRICO: Técnica para la determinación de la intensidad del color en un líquido o en otra sustancia es la determinación del color en la sangre mediante la utilización de un colorímetro.



VI. HIPOTESIS

A. HIPOTESIS GENERAL

- La ciencia de la serología forense, emplea métodos colorimétrico enzimáticos de los test de aminofenazona y aminoantipirina capaces de detectar sangre en muestras forenses que se encuentran en mínimas concentraciones independientemente del ambiente, tiempo, soporte, y sustancias químicas o biológicas que pueden ser considerados como interferentes.

B. HIPOTESIS ESPECÍFICA

- Los test de Aminofenazona y Aminoantipirina son efectivos y capaces de detectar presencia de sangre en muestras mínimas cuando las muestras son sometidas a diferentes condiciones ambientales, tiempo de exposición y soporte en el cual se encuentran
- La presencia de sustancias contaminantes como: gelatina, vino, salsa de tomate, coca cola, verduras, jugos de frutas y fluidos biológicos, en medio de manchas de sangre seca halladas en el sitio donde se encuentra la muestra, interfieren en los resultados al aplicar los test de Aminofenazona y Aminoantipirina generando resultados falsos positivos.
- Los métodos aminofenazona y aminoantipirina tienen la capacidad de detección de sangre en indicios poco visibles o en muestras lavadas y son importantes para posteriores análisis forenses.



OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION	DIMENSION	ESCALA	CLASIFICACION DE LA ESCALA	INDICADOR
Soporte	Material físico utilizado como deposito para sustancias biológicas liquidas.	Biologico	ordinal	<input type="checkbox"/> Algodón <input type="checkbox"/> Jean delgado y grueso <input type="checkbox"/> Lino <input type="checkbox"/> Seda <input type="checkbox"/> Tela de algodón <input type="checkbox"/> Textil artesanal	Positivo Negativo
Temperatura	Medida relativa del grado sensible del calor o frio	Físico	nominal	<input type="checkbox"/> - 20° C <input type="checkbox"/> 4° C <input type="checkbox"/> 17° C <input type="checkbox"/> 37° C <input type="checkbox"/> 60° C	Positivo Negativo
Tiempo	medida de la duración	Físico	nominal	<input type="checkbox"/> 24 horas <input type="checkbox"/> 1 semana <input type="checkbox"/> 1 mes	Positivo Negativo
Contaminante	Sustancia indeseable presente en el medio ambiente, con efectos adversos	Biológico	ordinal	<input type="checkbox"/> Frutas <input type="checkbox"/> Verduras <input type="checkbox"/> Otras sustancias <input type="checkbox"/> Fluidos biológicos	Positivo Negativo
Dilución	Técnica de laboratorio en la cual se disminuye la concentración de una sustancia, como el suero sanguíneo, en una serie de cantidades proporcionales.	Físico	Nominal	1/10 - 1/ 100.000	Positivo Negativo



VII. DISEÑO METODOLÓGICO

El diseño de investigación es experimental se llevo acabo en manchas de sangre de los grupos sanguíneos A, B, AB y O factor Rh (+), de muestras de sangre recolectadas de pacientes del laboratorio de Serologia del Hospital de Clínicas Universitario durante los meses de noviembre y diciembre del año 2007.

A. METODO DE INVESTIGACIÓN

1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El tipo de investigación es Experimental.

B. METODOS GENERALES DE INVESTIGACIÓN

1. MUESTRAS

- Las muestras utilizadas en el presente estudio fueron sangre entera obtenida por venopunción de la vena cefalica del antebrazo de 4 donadores, un paciente por grupo sanguíneo A, B, AB y O factor Rh positivo recolectadas en tubos vacutainer (línea VACUETTE) con 5% de EDTA.
- Manchas secas recolectadas de los diversos soportes empleados en el presente trabajo, envasados en sobres de papel con su respectiva identificación.
- Manchas secas recolectadas mediante raspado de costras sobre diversas superficies como: paredes, lozas, piedras, objetos metálicos, mueble etc. envasados en sobres de papel con su respectiva identificación.

2. TÉCNICA

- Reacción colorimétrica del test de aminofenazona
- Reacción colorimétrica del test de aminoantipirina



3. MATERIALES

■ Reactivos

- Aminofenazona (4-dimetilamino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-one)
0,5 g/10 mL etanol
- Aminoantipirina (4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-one) 0,5
g/10 mL etanol
- Acido acetico glacial 30%
- Peroxido de hidrogeno 10%
- Hipoclorito de sodio 5 %
- Agua destilada
- Solucion fisiologica 0.85%
- Etanol 90%
- Sueros anti-A , anti-B y anti-D (PLASMATEC LAB.)

■ Material de laboratorio

- Tubo vacutainer (VACUETTE) con EDTA al 5%
- Refrigerador
- Freezer
- Mezclador : Vortex
- Micropipetas de 10 ul a 1000ul de capacidad
- Cronómetro
- Tubos de ensayo
- Pipetas graduadas de vidrio
- Frascos de vidrio color ambar
- Gradillas para tubos
- Tijeras
- pinzas

- Bisturí, agujas de disección



- Soporte de 12 concavidades
- Micropipetas de 10-100 uL y 20-200 uL
- Puntas para micropipetas
- Papel madera, sobres de papel pequeños
- Gasa
- Marcador indeleble
- Aceite
- Detergentes en polvo y jabón
- Soportes:
 - Telas de origen vegetal : Algodón
 - Telas de origen sintético: Jean delgado y grueso, Lino, Seda
 - Telas de origen animal :Textil artesanal
- **Material biológico**
 - Sangre con EDTA al 5% que refiere grupo sanguíneo O factor Rh (+).
 - Sangre con EDTA al 5% que refiere grupo sanguíneo A,B,AB factor Rh (+).
 - Frutas: Cereza, Ciruela, Durazno, Fresa, Mandarina, Manzana, y Uva roja;
 - Vegetales :Rábano, Espinaca, Zanahoria, Berenjena, Tomate, Remolacha y Pimentón;
 - Otras sustancias: Vino tinto, Salsa de tomate, Café, Gelatina, y coca-cola.
 - Fluidos biológicos: saliva, orina líquido biliar y líquido ascítico.



4. PROCEDIMIENTO

■ Manchas de sangre

- a) Se recolectó muestra de sangre por venopunción de la vena cefálica del antebrazo en tubo vacutainer (Linea VACUETTE) con EDTA al 5% de paciente que refería grupo sanguíneo "O" factor Rh (+)
- b) Se realizó manchas con aproximadamente 50 μ l de sangre sobre los diferentes soportes que son :
 - Telas de algodón : tela de algodón, lana de algodón
 - Telas sintéticas : seda, poliéster, lino, Jean delgado y Jean grueso
 - Telas de origen animal :textil artesanal
- c) Las manchas de sangre en cada uno de los soportes se sometió a diferentes condiciones que son :
 - Ambientales: Se expone a un ambiente abierto al aire libre, en ambiente cerrado o bajo sombra y enterrado.
 - Temperatura : Se expone a -20°, 4°,17°, 37° y 60° C. en diferentes equipos que referían estas temperaturas.
- d) El tiempo para cada uno de los soportes con manchas de sangre a diferentes condiciones ambientales fue de 24 horas, una semana y un mes.
- e) Al concluir el tiempo se realizó la prueba de detección de sangre de las manchas por ambos métodos colorimétricos.



■ Manchas de sangre con interferentes

- a) Con el fin de evaluar la interferencia de sustancias que puedan generar resultados falsos positivos en la técnica se hicieron manchas sobre las prendas de tela de algodón.
- b) Los interferentes que se utilizaron fueron :
 - Frutas: Mora , fresa, uva roja, naranja ,plátano y papaya
 - Vegetales: Rábano, espinaca, acelga, apio, zanahoria, tomate, zapallo, remolacha y pimentón.
 - Otras sustancias: Vino tinto, salsa de tomate, café, gelatina, alcohol yodado, coca cola.
 - Fluidos biológicos: liquido ascítico, liquido biliar, saliva y orina.
- c) Para realizar las manchas se tomó 1 parte de muestra de sangre con una parte de interferente (relación volumen/ volumen) en este trabajo se utilizó aproximadamente 100 μ l de muestra y 100 μ l de interferente y se mezclaron.
- d) Se procedió a realizar manchas con 50 μ l de la mezcla sobre tela de algodón.
- e) Estas manchas contaminadas se sometieron a diferentes condiciones como :
 - Calor a una temperatura de 37 °C
 - Frío a una temperatura de de 4 °C .
 - Ambiente abierto al aire
 - Enterrado
- f) El tiempo durante el cual estuvieron estas manchas fueron de: 24 horas, 1 semana y 1 mes respectivamente.
- g) Se realizó controles de cada uno de los interferentes con los test de aminofenazona y aminoantipirina en soporte de vidrio de 15 concavidades.
- h) Luego de concluir el tiempo se realizó la prueba de detección de sangre de dichas manchas por ambos métodos.



■ Manchas de sangre lavadas

- a) Se realizaron 10 manchas de sangre de aproximadamente 1 cm. sobre tela sintética de 20 cm de largo por 4 de ancho .
- b) Estas manchas fueron lavadas con :
 - Agua únicamente
 - Agua y jabón
 - Agua con detergente en polvo (ACE)
 - Agua con aceite
 - Agua con lavandina.
- c) Se lavaron a mano las telas manchadas y en cada lavado se procedió a cortar dos pedazos de tela de 0.5 por 0.5 cm del sitio donde se observó la mancha.
- d) Se realizó la detección de sangre sobre la tela directamente por ambos métodos.
- e) Se lavaron las telas manchadas hasta que no se observaron y que con las pruebas de detección se obtuvieron resultados negativos.

■ Prueba de sensibilidad

- a) Se recolectó muestra de sangre con EDTA al 5% por venopunción de la vena cefálica del antebrazo de 4 pacientes que referían grupo sanguíneo A, B, AB y O.
- b) Se realizó hemoclasificación de los grupos sanguíneos del sistema ABO (A , B, AB y O) por el método de aglutinación utilizando sueros anti-a , anti-B y anti D. (PLASMATEC LAB).
- c) Se realizaron diluciones seriadas base 10 a partir de una dilución 1/10 con solución fisiológica al 0.85 % de cada uno de los grupos, las diluciones fueron :

- 1/100	- 1/10.000
- 1/500	- 1/50.000
- 1/1.000	- 1/100.000
- 1/5.000	- 1/500.000
- 1/1.000.000	



- d) De estas diluciones se hicieron manchas por triplicado sobre :
- Algodón
 - Gasa
 - Papel filtro
- e) Se realizó la prueba de detección de sangre por ambos métodos

■ **Determinación de presencia de Sangre por los métodos de Aminofenazona y Aminoantipirina**

Pre-tratamiento de las muestras

- a) En tubos de ensayo se colocó un fragmento de la mancha de 0,5 x 0,5 cm de cada experimento y se agregó 1 ml de solución salina al 0.85%, dejando por el tiempo necesario para separar la mancha del soporte. Dejar por 30 minutos a temperatura del laboratorio o 24 horas en refrigerador hasta que las manchas sean extraídas del soporte.
- b) Mezclar con ayuda del Vortex
- c) De acuerdo con el tipo y cantidad de material de estudio se colocó un fragmento de cada una de los soportes o un fragmento de costras o escamas dentro del tubo de ensayo o en un soporte socavado de vidrio. Si la cantidad de muestra es muy pequeña o muy diluida depositar sobre algodón o sobre el soporte socavado y realizar la reacción directamente sobre la muestra.

Detección de sangre

- a) La reacción se llevo a cabo en:



- Un soporte de vidrio de 12 concavidades para muestras pretratadas.
 - Directamente sobre la muestra en el soporte de tela sobre una base de vidrio.
- b) Las cantidades que se utilizaron de muestras y reactivos para el desarrollo de estos métodos colorimétricos fueron :
- Una suspensión de la mancha a examinar (50 ul)
 - Solución de aminofenazona o aminoantipirina (50 ul)
 - Solución acidificante de ácido acético glacial (20 ul)
 - Un volumen de perhidrol (50 ul)
- c) Para llevar a cabo la reacción colorimétrica se hizo en muestra pretratada o muestra sobre un soporte de tela, algodón, papel filtro o gasa para luego agregar ácido acético glacial, solución de aminofenazona o aminoantipirina y el perhidrol.
- d) Posteriormente se realizó controles :
- Un control positivo de sangre humana empleando los métodos colorimétricos y observar resultados.
 - Un control negativo de solución fisiológica empleando los métodos colorimétricos y observar resultados.
 - Un control sustrato reactivos mas aminoantipirina o aminofenazona y observar resultados.
- e) Se preparó las muestras pretratadas para el desarrollo de la reacción de ambos métodos observando un cambio de coloración que se indica en la siguiente tabla.



RESULTADO	AMINOFENAZONA	AMINOANTIPIRINA
Positivo	Lila o Violeta	Rosa o Fucsia
Negativo	Incoloro	No desarrolla color a los 3 minutos
Control positivo	Violeta	Fucsia
Control negativo	No desarrolla color	No desarrolla color a los 3 minutos

- f) La lectura para la reacción se realizó máximo 3 minutos después de haber añadido el último reactivo o cuando se presenta la coloración del control negativo, reportando como positivo (+) o negativo (-) directamente.
- g) Las muestras que presentaron respuestas negativas fueron procesadas nuevamente agregando un fragmento adicional de la muestra (esto se realiza solo cuando la cantidad de material o muestra lo permita).
- h) En casos en los que no se desprende la mancha del material adicionar hidróxido de amonio y dejar en extracción por lo menos 2 horas a T° ambiente y repetir la prueba
- i) Anotar los resultados obtenidos como (+) positivo) y (-) negativo.

C. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

1. RECOLECCIÓN

La recolección de datos se realizó por tablas de registro de resultados obtenidos al final de cada prueba experimental.

2. ELABORACIÓN

- a. Revisión: Se realizó por medio de las tablas de registro elaboradas al terminar cada determinación según las diferentes condiciones.



- b. Clasificación : Se tomó en cuenta la clasificación de las variables anteriormente citadas en el trabajo
- c. Presentación : Exposición de cuadros

3. ANALISIS ESTADÍSTICO

Es un análisis Cualitativo clasificado en subtítulos de cada experimento que se reporta como positivo o negativo de la prueba.



IX. RESULTADOS

	AMINOFENAZONA	AMINOANTIPIRINA
CONTROL NEGATIVO (reactivos)	Neg.	Neg.
CONTROL POSITIVO (sangre)	Pos.	Pos.
CONTROL SUSTRATO (soportes)	Neg.	Neg.

TABLA 1: Resultados de control negativo (reactivos), positivo (reactivos mas sangre) y sustrato (reactivos mas peroxido de hidrogeno)

CONTAMINANTES		AMINOFENAZONA	AMINOANTIPIRINA
FRUTAS	MORA	-	-
	FRESA	-	-
	UVA ROJA	-	-
	NARANJA	-	-
	PLATANO	-	-
	PAPAYA	-	-
VERDURAS	ZANAHORIA	-	-
	ACELGA	-	-
	ESPINACA	-	-
	TOMATE	-	-
	PIMENTON	-	-
	ZAPALLO	-	-
	RABANITO	+/-	+/-
	REMOLACHA	+/-	+/-
FLUIDOS BIOLÓGICOS	L.. ASCITICO	-	-
	L. BILIAR	+/-	+/-
	ORINA	-	-
	SALIVA	-	-
OTRAS SUSTANCIAS	VINO	-	-
	SALSA DE TOMATE	-	-
	CAFÉ	-	-
	GELATINA	-	-
	ALCOHOL YODADO	-	-
	COCA COLA	-	-

TABLA 3: Resultados del test de aminofenazona y aminoantipirina en sustancias empleadas como contaminantes. (+)=test positivo (-)=test negativo (+/-)= presenta un mínimo de color en la reacción del test.



DILIUCION SANGRE		GRUPO A	GRUPO B	GRUPO AB	GRUPO O
AMINOFENAZONA	1//10	+	+	+	+
	1/100	+	+	+	+
	1/500	+	+	+	+
	1/1000	+	+	+	+
	1/5000	+	+	+	+
	1/10000	+	+	+	+
	1/20000	+	+	+	+
	1/30000	-	+	+	+
	1/50000	-	-	-	-
	1/100000	-	-	-	-
	1/500000	-	-	-	-
	1/1000000	-	-	-	-
AMINOANTIPIRINA	1//10	+	+	+	+
	1/100	+	+	+	+
	1/500	+	+	+	+
	1/1000	+	+	+	+
	1/5000	+	+	+	+
	1/7000	+	+	+	+
	1/8000	-	+	+	+
	1/10000	-	-	-	-
	1/30000	-	-	-	-
	1/50000	-	-	-	-
	1/100000	-	-	-	-
	1/500000	-	-	-	-
	1/1000000	-	-	-	-

TABLA No 4: Tabla de resultados de sensibilidad del test de aminofenazona y aminoantipirina directo (+)= test positivo (-)= test negativo





TIEMPO	SOPORTE	CONDICION							
		TEMPERATURA					AMBIENTE		
		- 20 °C	4 °C	16 °C	37 °C	60 °C	ABIERTO	CERRADO	ENTERRADO
24 HORAS	TELA ALGODÓN	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-
	LANA ALGODÓN	+	+	+	+	+	+	+	+
	SEDA	+	+	+	+	+	+	+	+
	POLIESTER	+	+	+	+	+	+/-	+	-
	LINO	+	+	+	+	+	+	+	+
	TELA JEAN DELGADO	+	+	+	+	+	+	+	+
	TELA JEAN GRUESO	+	+	+	+	+/-	+	+	+
	TEXTIL ARTESANAL	+	+	+	+	+	+	+	+
SEMANA	TELA ALGODÓN	+	+	+	+	-	+	+	-
	LANA ALGODÓN	+	+	+	+	+	+	+	+
	SEDA	+	+	+	-	-	+	+	+
	POLIESTER	+	+	+	-	-	-	+	-
	LINO	+	+	+	+	-	+	+	-
	TELA JEAN DELGADO	+	+	+	+	+	+	+	+
	TELA JEAN GRUESO	+	+	+	-	-	+	+	+
	TEXTIL ARTESANAL	+	+	+	+	-	+	+	-
UNA	TELA ALGODÓN	+	+	+	-	-	+	+	-
	LANA ALGODÓN	+	+	+	-	-	+	+	-
	SEDA	+	+	+	-	-	+	+	-
	POLIESTER	+	+	+	-	-	-	+	-
	LINO	+	+	+	-	-	+	+	-
	TELA JEAN DELGADO	+	+	+	-	-	+	+	-
	TELA JEAN GRUESO	+	+	+	-	-	-	+	-
	TEXTIL ARTESANAL	+	+	+	-	-	-	+	-
UN MES	TELA ALGODÓN	+	+	+	-	-	+	+	-
	LANA ALGODÓN	+	+	+	-	-	+	+	-
	SEDA	+	+	+	-	-	+	+	-
	POLIESTER	+	+	+	-	-	-	+	-
	LINO	+	+	+	-	-	+	+	-
	TELA JEAN DELGADO	+	+	+	-	-	+	+	-
	TELA JEAN GRUESO	+	+	+	-	-	-	+	-
	TEXTIL ARTESANAL	+	+	+	-	-	-	+	-

TABLA 6: Resultados del test de Aminofenazona en manchas de sangre sometidas a diferentes condiciones de ambiente durante periodos de tiempo variables (+) = test positivo

(-) = test negativo (+/-) = poca coloracion



TABLA 7: Resultados del test de Aminoantipirina en manchas de sangre

TIEMPO	SOPORTE	CONDICION															
		TEMPERATURA					AMBIENTE										
		20	4	16	37	60	ABIERTO		CERRADO	ENTERRADO							
CONDICION		NUMERO DE LAVADOS					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
24 HORAS	POLIESTER	+	+	+	+	+	+				+	+					-
	LINO	+	+	+	-	-	+				+	+					-
	TELA JEAN DELGADO	+	+	+	+	+	+				+	+					+
	TELA JEAN GRUESO	+	+	+	+	-	+				+	+					+
SEMANA	TEXTIL ARTESANAL	+	+	+	+	+	+				+	+					-
	TELA ALGODÓN	+	+	+	+	-	+		+/ -		+	+					-
	LANA ALGODÓN	+	+	+	+	+	+		+		+	+					+
	SEDA	+	+	+	-	-	+		+		+	+					-
	POLIESTER	+	+	+	-	-	-		-		+	+					-
	LINO	+	+	+	+	-	+		+		+	+					-
	TELA JEAN DELGADO	+	+	+	+	-	+		+		+	+					+
	TELA JEAN GRUESO	+	+	+	-	-	+		+		+	+					+
UN MES	TEXTIL ARTESANAL	+	+	+	+	-	+		+		+	+					-
	TELA ALGODÓN	-	-	-	-	-	+		+		+	+					-
	LANA ALGODÓN	+	+	+	-	-	-		-		+	+					-
	SEDA	-	-	-	-	-	+		+		+	+					-
	POLIESTER	+	+	-	-	-	-		-		+	+					-
	LINO	+	+	-	-	-	-		-		+	+					-
	TELA JEAN DELGADO	+	+	+	-	-	-		-		+	+					-
	TELA JEAN GRUESO	+	+	-	-	-	-		-		+	+					-

sometidas a diferentes condiciones de ambiente por periodos de tiempo variables (+)= test positivo (-)= test negativo +/- poca coloración



AGUA	Estado de la mancha*	v	v	v	v	v	v	v	pv	pv	pv
	Aminofenazona	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Aminoantipirina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DETER-GENTE EN POLVO	Estado de la mancha*	v	v	v	v	v	pv	pv	i	i	i
	Aminofenazona	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	Aminoantipirina	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
JABON	Estado de la mancha*	v	v	v	pv	pv	i	i	i	i	i
	Aminofenazona	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	Aminoantipirina	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
LAVAN-DINA	Estado de la mancha*	v	v	pv	pv	i	i	i	i	i	i
	Aminofenazona	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	Aminoantipirina	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AGUA Y ACEITE	Estado de la mancha*	v	v	v	pv	pv	pv	pv	pv	i	i
	Aminofenazona	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Aminoantipirina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*v =visible pv = poco visible i = invisible

TABLA 8: Resultados del test de aminofenazona y aminoantipirina en manchas sometidas a lavados (+)=test positivo (-)= test negativo



EXPOSICION POR 24 h CON CONTAMINANTE		TEMPERATURA				AMBIENTE			
		AMINOFENAZONA		AMINOANTIPIRINA		AMINOFENAZONA		AMINOANTIPIRINA	
		CALOR 4 °C	FRIO 37°C	CALOR 4 °C	FRIO 37°C	AREA ABIERTA	ENTERRADO	AREA ABIERTA	ENTERRADO
FRUTAS	MORA	+	-	+	-	-	-	-	+
	FRESA	+	+	+	+	+	-	+	+
	UVA ROJA	+	+	+	+	+	-	+	+
	NARANJA	+	-	-	-	-	-	-	-
	LIMON	+	-	-	-	-	-	-	-
	PLATANO	+	+	+	+	+	+	+	+
VERDURAS	PAPAYA	+	+	+	+	+	+	+	+
	ZANAHORIA	+	+	+	+	+	+	-	-
	ACELGA	+	-	+	-	-	+	-	-
	ESPINACA	+	-	+	-	-	-	-	-
	TOMATE	+	-	+	-	-	-	-	-
	PIMENTON	+	-	+	-	-	+	-	-
	ZAPALLO	+	+	+	+	-	-	-	-
	RABANITO	+	+	+	+	+	-	+	-
FLUIDOS BIOLOGICOS	REMOLACHA	+	+	+	+	+	+	+	+
	L. ASCITICO	+	+	+	+	+	+	+	+
	L. BILIAR	+	+	-	+	-	+	-	+
	ORINA	+	+	+	+	+	+	+	+
OTRAS SUSTANCIAS	SALIVA	+	+	+	+	+	+	+	+
	VINO	+	+	+	+	+	+	+	+
	SALSA DE TOMATE	+	-	-	-	+	-	+	-
	CAFÉ	+	+	-	+	+	-	+	-
	GELATINA	+	+	+	+	+	+	+	+
	ALCOHOL YODADO	-	-	-	-	-	-	-	-
COCA COLA	+	+	+	+	+	+	+	+	

TABLA 9: Resultados del test de aminofenazona y aminoantipirina sobre muestras preparadas con sangre y contaminantes expuestas durante 24 horas (+)=test positivo (-)= test negativo



EXPOSICION POR 1 SEMANA CON CONTAMINANTE		TEMPERATURA				AMBIENTE			
		AMINOFENAZONA		AMINOANTIPIRINA		AMINOFENAZONA		AMINOANTIPIRINA	
		CALOR 4 °C	FRIO 37°C	CALOR 4 °C	FRIO 37°C	AREA ABIERTA	ENTERRADO	AREA ABIERTA	ENTERRADO
FRUTAS	MORA	+	-	-	-	-	-	-	-
	FRESA	+	+	+	+	-	-	-	-
	UVA ROJA	+	+	+	+	+	-	-	-
	NARANJA	+	-	+	-	-	-	-	-
	LIMON	+	-	+	-	-	-	-	-
	PLATANO	+	+	+	+	-	+	-	-
PAPAYA	+	+	+	+	-	+	-	-	
VERDURAS	ZANAHORIA	+	+	-	+	-	-	-	-
	ACELGA	+	-	+	-	-	-	-	-
	ESPINACA	+	-	+	-	-	-	-	-
	TOMATE	+	-	-	-	-	-	-	-
	PIMENTON	+	-	+	-	-	-	-	-
	ZAPALLO	+	-	-	-	-	-	-	-
	RABANITO	+	+	+	+	-	-	-	-
REMOLACHA	+	+	+	+	-	-	-	-	
FLUIDOS BIOLOGICOS	L. . ASCITICO	+	+	+	+	+	-	-	-
	L. BILIAR	+	+	+	+	-	-	-	-
	ORINA	+	+	+	+	-	-	-	-
	SALIVA	+	+	+	+	+	+	+	-
OTRAS SUSTANCIAS	VINO	+	+	+	+	+	+	+	+
	SALSA DE TOMATE	+	-	-	-	-	-	-	-
	CAFÉ	+	+	-	+	+	-	-	-
	GELATINA	+	+	+	+	+	+	+	+
	ALCOHOL YODADO	-	-	-	-	-	-	-	-
	COCA COLA	+	+	+	+	+	-	+	-

TABLA 10: Resultados del test de aminofenazona y aminoantipirina en manchas de muestras preparadas con sangre y contaminantes expuestas durante 1 semana +=test positivo -= test negativo



EXPOSICION POR 1 MES CON CONTAMINANTE		TEMPERATURA				AMBIENTE			
		AMINOFENAZONA		AMINOANTIPIRINA		AMINOFENAZONA		AMINOANTIPIRINA	
		CALOR 4 °C	FRIO 37°C	CALOR 4 °C	FRIO 37°C	AREA ABIERTA	ENTERRADO	AREA ABIERTA	ENTERRADO
FRUTAS	MORA	-	-	-	+/-	-	-	-	-
	FRESA	-	+	-	+	-	-	-	-
	UVA ROJA	-	-	-	-	-	-	-	-
	NARANJA	-	-	-	-	-	-	-	-
	LIMON	-	-	-	-	-	-	-	-
	PLATANO	-	+	-	-	-	-	-	-
PAPAYA	-	+	-	-	-	-	-	-	
VERDURAS	ZANAHORIA	-	+	-	-	-	-	-	-
	ACELGA	-	-	-	-	-	-	-	-
	ESPINACA	-	-	-	-	-	-	-	-
	TOMATE	-	-	-	-	-	-	-	-
	PIMENTON	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZAPALLO	-	-	-	-	-	-	-	-
	RABANITO	-	+	-	-	-	-	-	-
REMOLACHA	-	+	-	+	-	-	-	-	
FLUIDOS BIOLOGICOS	L.. ASCITICO	-	+	-	+	+	-	-	-
	L. BILIAR	-	+	-	+	-	-	-	-
	ORINA	-	+	-	-	-	-	-	-
	SALIVA	-	+	-	-	+	-	+	-
OTRAS SUSTANCIAS	VINO	-	+	-	-	+	-	+	-
	SALSA DE TOMATE	-	+	-	-	-	-	+/-	-
	CAFÉ	-	+	-	-	-	-	-	-
	GELATINA	-	+	-	-	-	-	-	-
	ALCOHOL YODADO	-	+	-	-	-	-	-	-
	COCA COLA	-	+	-	-	+	-	-	-

TABLA 11: Resultados del test de aminofenazona y aminoantipirina en muestras preparadas con sangre y contaminantes sometidas durante un mes (+)=test positivo (-)= test negativo (+/-)=poca coloración



X. DISCUSIÓN

El estudio pericial de las manchas de sangre es fundamental en la investigación para sospechar y confirmar que se ha cometido un acto de violencia, puede proporcionar datos, confirmar o descartar hipótesis y se pueden analizar dando datos concluyentes para lo cual exige una sistemática obligada.

En las pruebas presuntivas o de orientación de probabilidad en el campo de la serología forense está el método estudiado en el presente trabajo que es el test de la aminofenazona y aminoantipirina que pone de manifiesto a la hemoglobina de la sangre que actúa como peroxidasa y su función es catalizar la descomposición del agua oxigenada y para esto se utilizan reactivos con reacción colorimétrica cuyos resultados en cambio de color son pruebas cualitativas para detectar presencia de sangre.^{xxxiii}

En este trabajo nos enfocamos en la capacidad de este método para detectar manchas secas de sangre por diferentes periodos y en diferentes condiciones y si estas detectan presencia de sangre según la antigüedad de la mancha. Tomando en cuenta a las peroxidasas en este caso la hemoglobina cumple esta función de peroxidasa que son enzimas que catalizan reacciones bisustrato de carácter redox en la que el sustrato oxidante es el peróxido de hidrógeno y el segundo sustrato reductor que es oxidado por el peróxido son compuestos donadores de hidrógeno que pueden ser fenoles, aminas aromáticas, compuestos orgánicos o el yoduro y el glutatión cuyo mecanismo de reacción se basa en la formación de complejos de enzima-donador de hidrógenos y dos pasos de oxidación univalente.



1. Cuando se compara la efectividad y capacidad de detectar sangre de los dos test presuntivos aminofenazona y aminoantipirina se demostró en la *tabla 5* que en diferentes soportes la Aminofenazona dio positivo hasta 1/10.000 para los grupos sanguíneos A, B, AB y O con factores Rh (+) e incluso en el algodón para el grupo AB hasta 1/50.000 y para la Aminoantipirina dio positivo hasta 1/5000 para grupos sanguíneos A;B;AB y O con factores Rh (+) e incluso menor para el grupo AB (hasta 1/1000) lo cual indica que el test de aminofenazona resulto ser una excelente prueba presuntiva, por que el test de aminoantipirina requiere de concentraciones mayores de sangre para detectarla.

Comparando estos resultados con los resultados de la *tabla 4* obtenidos directamente sin emplear soportes los resultados no varían en proporciones mayores dando positivo hasta 1/20.000 para el grupo sanguíneo A y 1/30.000 para los grupos sanguíneos B; AB y O esto para la aminofenazona y para la aminoantipirina da positivo hasta 1/8000 para los grupos sanguíneos B; AB y O factor Rh (+) y hasta 1/7000 para el grupo sanguíneo A factor Rh (+) lo cual demuestra que el rango de interferencia de los soportes son mínimos ,los soportes empleados fueron : Algodón cuyo componente mayor de la fibra de algodón es la celulosa (94 %) después esta la cera (0.6 %) componente importante en la fibra de algodón porque es la responsable de la absorción de agua o humedad cuya capacidad de absorción de humedad es un 7.6 % y soporta temperaturas de hasta 90°C y su perdida por desecación (perdidas de masa) no deben superar el 9 % de la muestra ; Gasa es algodón hidrófilo con 100 % de algodón blanqueado, desengrasado y sin apresto (goma con que se unen las telas) con una hidrofiliidad o tiempo de inmersión de 10 segundos y una capacidad de absorción de humedad de 6.5 % y soporta temperaturas de 90 -100 °C y cuya perdida por desecación no deben superar el 8% de la muestra; Papel filtro de 100 % de fibras de celulosa pura de grado alfa con un bajo contenido de



cenizas (< 0.1 %) cuya eficacia en la retención de partículas, velocidad de flujo y carga de partículas , se emplean en las técnicas de análisis para determinar e identificar las partículas presentes o como soporte. Con elevada retención de partículas muy finas lo que nos proporciona un mayor grado de retención de muestra y las pérdidas por desecación son mínimas.^{xxxiv , xxxv}

Se utilizó estos soportes aprovechando sus propiedades físicas y por que poseen características similares en su composición, cuyo componente mayor es el polisacárido celulosa que es insoluble y consta de unidades \uparrow - D glucopiranosas enlazadas mediante enlaces \uparrow 1-4 para formar largas cadenas reforzadas por enlaces cruzados de hidrogeno y en sus propiedades físicas ya mencionadas aprovechadas para que así tengan la misma función y no puedan interferir en la muestra que sufre diferentes procesos de tratamiento industrial para ser aplicados en la medicina u otros campos que requieren que estos estén libres de algún compuesto o sustancia que pudiera afectar a células del organismo y sus funciones por lo cual son utilizados como soportes en nuestra prueba evaluando la capacidad de estos para poder absorber en su superficie mayor concentración de sustancia orgánica y no alterar sus propiedades en este caso de la sangre y que estas por desecación puedan retener mayor cantidad de muestra , considerando que son los soportes ideales para recolectar muestras de sangre en la escena del crimen o almacenar sangre seca como manchas de sangre en el caso del papel filtro.

En cuanto a la especificidad del método se observó que ambos métodos tanto la aminofenazona como la aminoantipirina no presentan similar capacidad de detección para un grupo específico, para todos los grupos sanguíneos demuestra detectar sangre hasta una concentración similar de sangre en cada soporte según las tablas 4 y tabla 5 donde se indica



que hasta una dilución 1/10.000 para la aminofenazona detecta sangre en cambio para la aminoantipirina solo detecta hasta 1/1000 esto observando que es hasta estas diluciones donde todas las diluciones dan positivo.

2. Manchas lavadas con frecuencia las ropas manchadas de sangre durante un acto violento son lavadas para tratar de eliminar los vestigios por lo tanto se plantea una mayor dificultad de detectar la mancha. En este trabajo se analizó la sensibilidad de los métodos de la aminofenazona y la aminoantipirina para detectar indicios de sangre en manchas lavadas repetidamente con diferentes detergentes. Para lo cual se ha escogido un soporte blanco (tela de algodón) para facilitar la visualización de las manchas, obviamente en telas de colores o de material más absorbente las manchas serán invisibles con menos lavados. Los resultados según la tabla 8 indica que las manchas de sangre lavadas con agua simplemente y con agua y aceite no desaparecen dando positivo hasta el décimo lavado donde las manchas se mantienen poco visibles, esto se debe a que sus propiedades de polaridad de estos no son afines a la sangre por lo tanto estas permanecen y solo se logra disminuir las cantidades de sangre por acción mecánica que uno ejerce al lavar las prendas. Pero las manchas lavadas con jabón desaparecen más rápido y dan positivo para sangre en ambos métodos hasta el cuarto lavado, donde las manchas eran ya invisibles. Por lo cual se observa que el jabón que es una sal alcalina de un ácido graso de cadena larga con un extremo hidrófobo y otro hidrófilo disuelven las manchas por afinidades de polaridad donde la parte hidrófila ($-\text{COONa}$) se disuelve en el agua y la parte hidrófoba se une a las moléculas de grasa o restos orgánicos (sangre) formando una emulsión y eliminándolo por el agua, es el detergente ideal para hacer desaparecer manchas de sangre en pocos lavados, en cambio las manchas lavadas con detergente en polvo dan resultados positivos hasta el sexto lavado esto ya en manchas invisibles observados en la tabla 8



teniendo en cuenta que el detergente en polvo es sintético y su componente activo es similar al del jabón con agentes tensoactivos aniónicos que disminuyen la tensión superficial del agua y facilitan la reacción con contaminantes y partículas de suciedad de la prenda eliminándolos por repulsión formando complejos solubles, también tiene otros componentes como ser poli fosfatos, silicatos, carbonatos y perboratos que blanquea las manchas, tiene sustancias fluorescentes, carboximetilcelulosa, colorantes y perfumes todos estos encargados de eliminar los contaminantes y la suciedad de las prendas y además tiene enzimas (proteasas) que rompen moléculas de restos orgánicos como leche, sangre etc. que serían los únicos que actuarían con las manchas de sangre pero como están en concentraciones inferiores a 0.5 % se logra eliminar las manchas con más lavados. Y con la lavandina se tiene resultados positivos para sangre hasta la quinta lavada con la aminoantipirina y hasta la sexta con la aminofenazona donde las manchas eran ya invisibles debido a que por acción mecánica del lavado se pierde los componentes celulares del hematíe ya que el hipoclorito de sodio es una solución hipertónica cuya concentración mayor de solutos hace que el hematíe elimine agua intracelular y se destruya por un desequilibrio de polaridad de membrana eliminando todos sus componentes y se pierde en especial la hemoglobina que es desnaturalizada por el hipoclorito en el agua y tenemos resultados negativos de presencia de sangre.^{xxxvi,xxxvii}

3. Soportes y tiempo: Considerando que en una escena de crimen se encuentra evidencias de sangre en diferentes estados como ser líquida o seca en forma de mancha en diferentes prendas de vestir manchadas, objetos del lugar que pueden ser absorbentes o no absorbentes en las cuales se encuentra como una costra. De acuerdo a como se realizó el crimen o algún acto violento y al sitio donde se encuentran la sangre, pueden estar sometidos a diferentes cambios



ambientales como clima, o que traten de hacer desaparecer estas evidencias enterrándolas y el tiempo durante el cual permanecieron dichos indicios de sangre. También se tomo en cuenta la forma y la temperatura al cual se debe almacenar las muestras de sangre o manchas secas para remitirlas al laboratorio para su posterior análisis .

En este trabajo se demostró que se puede detectar presencia de sangre hasta las 24 horas sin que interfieran la temperatura ni el ambiente en todos los soportes, dando resultados positivos para la aminofenazona y aminoantipirina pero ya a una semana se encuentra mayor cantidad de resultados negativos para ambos métodos en especial a 37 °C, 60 °C y enterrado . Lo que se debe considerar es que a mayor tiempo de exposición es difícil detectar sangre demostrando que a un mes incrementan resultados negativos.

En la tabla 7 se observa que el test de aminoantipirina se vio alterada dando negativo en muestras que fueron enterradas durante 24 horas ,una semana y un mes en todos los soportes empleados en cambio en las *telas jean dio positivo hasta una semana*. Y a un mes de exposición se encuentran resultados negativos para ambos métodos a temperaturas mayores de 16° C y enterrados. En la tabla 6 se observó que las manchas de sangre dan resultados positivos para la aminofenazona hasta un mes cuando están a 4° C, 20°C y en área cerrada al igual que la aminoantipirina pero este da negativo sobre soportes de tela de algodón y seda .

Según los resultados observados en dichas tablas la detección de sangre mediante presencia de hemoglobina en un soporte se da por la capacidad de absorción en sus fibras de la muestra de sangre y que estas las puedan retener por mas tiempo y mantener sus propiedades, en este trabajo se observa que la lana de algodón ,jean delgado y por



ultimo el lino mantienen muestras de sangre. Y que el test de aminofenazona presenta menor cantidad de resultados negativos que la aminoantipirina por lo tanto es un método más sensible y no se ve afectada por las condiciones.

Los soportes de telas que se utilizaron fueron clasificados como telas de origen vegetal, telas sintéticas y de procedencia animal. Las telas de origen vegetal de algodón cuyo componente principal es la celulosa en forma amorfa y cristalina que le da la forma a la fibra de algodón y la cera que participa en la absorción de agua, como lubricante y en el estiraje para poder fabricar diferentes telas empleando además gomas pecticas, almidón, aceite y colorantes lo que demuestra que no existen componentes que puedan interferir en la reacción enzima -sustrato a mayor tiempo de exposición y condición a la que se encuentra, dando resultados falsos positivos o negativos, considerando también su capacidad de absorción de humedad esta entre 6-7% lo que indica que retiene mayor cantidad de muestra pero se ve afectada por la humedad lo cual hace que se pierda muestra .

Los soportes de origen sintético poliéster, lino, jean delgado y grueso fabricados de componentes degradados del petróleo son compuestos de poliamida sintética en forma de multifilamentos entrelazados, tiene gomas pecticas en mayor proporción ,colorantes y fibras que presentan un 0.4 % de absorción de humedad que resiste temperaturas de 130-135 °C estos soportes retienen muestras líquidas de sangre en su superficie, haciendo que sequen en forma de costras y se pueda mantener la hemoglobina estable por mas tiempo ya que soportan altas temperaturas.

Las telas de origen animal como el textil artesanal son soportes adecuados para mantener sngre en medio de su superficie ya que sus componentes como la queratina, ceramidas,proteinas y lipidos la lavoline



le dan mayor resistencia y no afectan en la conservación de la muestra seca .

En caso de la temperatura se toma en cuenta que la mayoría de las enzimas, en este caso la peroxidasa (hemoglobina) 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, esta actividad enzimática puede detenerse totalmente, si el calentamiento es suficientemente largo y a temperaturas de 80-85 ° C la peroxidasa pierde su actividad en forma definitiva lo que se observo en este trabajo que a 60°C dan resultados negativos a mayor tiempo de exposición.

Según estos resultados se muestra que ambos métodos son efectivos para detectar sangre hasta 24 horas de exposición pero a 1 semana de exposición ya varían encontrando que la aminofenazona es el que presenta mas positivos para sangre que la aminoantipirina y a un mes se determino que da positivo para sangre en ambiente cerrado y a bajas temperaturas.

4. Contaminantes : En una escena de crimen suele existir contaminación de las evidencias o manchas de sangre estos contaminantes pueden ser de origen biológico, de origen físico o químico ,por la presencia de sustancias interferentes similares a la sangre o que la putrefacción y los tratamientos físicos y químicos a los que se pueden ver sometidas las muestras puede dificultar algunos de los procesos del análisis y



detección de sangre y fundamentalmente los procesos de amplificación y extracción de ADN.

La contaminación biológica es producida por la presencia en la escena del delito o en el cuerpo de la víctima, de fluidos biológicos de origen de la víctima o de sustancias características del sitio que en muchas ocasiones pueden ocasionar putrefacción. Observando la importancia de que puedan existir otras sustancias además de sangre sobre el soporte donde se encuentra y que estos puedan interferir en nuestra prueba de orientación para detectar sangre y ocasionar resultados falsos positivos o negativos en nuestro test se trabajó en manchas de sangre con posibles contaminantes como ser sustancias interferente, extractos de frutas y verduras y fluidos biológicos exponiéndolas por diferentes periodos de tiempo.

Los resultados observados en la tabla 9 cuyo contaminante son frutas a 24 horas de exposición indican que para mora, naranja y limón dan negativo en área abierta y a temperaturas de 4 °C y positivo para el resto de las frutas tanto con aminofenazona y aminoantipirina en cambio en la tabla 10 a una semana de exposición dan resultados positivos en calor y frío para todas las frutas y negativo en estas mismas condiciones para naranja, limón y mora y en condición de ambiente enterrado y abierto todos los resultados son negativos para ambos test. Resultados de la tabla 11 a un mes de exposición a temperaturas de 4 °C se observan resultados positivos para papaya, plátano y fresa y negativo para el resto de las frutas en condiciones de ambiente y temperatura para aminofenazona y aminoantipirina. Por lo cual se analizó si en las manchas de sangre mas contaminante existe algún compuesto capaz de actuar como sustrato y que por lo tanto pueda competir con la aminoantipirina o la aminofenazona por el peroxido de hidrogeno o bien alterar de alguna forma el mecanismo de catálisis



impidiendo la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno dando falsos negativos en los tests al impedir la oxidación de la aminofenazona y la aminoantipirina. Puede existir compuestos capaces de ocasionar falsos negativos para la detección de sangre en la mancha, de los contaminantes estudiados se observa en este trabajo que los extractos de limón, naranja, mora, vegetales verdes, tomate y pimentón al igual que la salsa de tomate daban negativo para sangre en ambos tests por lo cual se estudia los componentes de estos contaminantes que interfieren actuando en la reacción enzimática de oxidorreducción, como sustrato (teniendo en cuenta que los sustratos más afines para este proceso son compuestos con fenoles, aminas aromáticas y compuestos orgánicos), o ser sustancias muy reductoras. En este proceso todos los interferentes mencionados contienen vitamina C o ácido ascórbico es la forma enólica del 3-ceto-1-gulofuranolactona compuesto de cristales blancos de sabor ácido hidrosolubles fuertemente reductor es estable a la congelación, luz y al oxígeno y labil al calentamiento su estructura es parecido a un monosacárido pero contiene un grupo enol en el segundo y tercer átomo de carbono este grupo es sensible a las oxidaciones y por ser un compuesto muy reductor podría ocurrir que tuviera mayor capacidad para oxidarse que la aminofenazona o la aminoantipirina consumiendo el oxígeno liberado por el peróxido de hidrógeno e impidiendo que este sea captado por la aminofenazona o la aminoantipirina y no se observa el cambio de coloración en ambos métodos, o que el ácido ascórbico actuara reduciendo a la aminofenazona o aminoantipirina previamente oxidada por el peróxido de hidrógeno, de forma que impidiera que se pusiera de manifiesto el color característico porque desaparece rápidamente al ser reducidos dando resultados falsos negativos.^{xxxviii}

En las verduras se debe tomar en cuenta que los vegetales verdes son ricos en minerales como el hierro el cual es considerado como un interferente que impide la reducción del hierro del grupo HEM de la



hemoglobina inhibiendo su acción catalítica de enzima y no se da la descomposición del peróxido de hidrógeno para la oxidación de la aminofenazona o aminoantipirina y producción de color dando lugar a resultados falsos negativos. Otra situación es cuando se puede producir falsos positivos con el rábano ya que es rico en peroxidasas esto ocurre siempre y cuando la muestra este directamente expuesta con el extracto de rábano en cantidades abundantes.

En resultados observados en las tablas 9 y 10 se detecta sangre a 24 horas y a una semana de exposición tanto con la aminofenazona y la aminoantipirina con los fluidos biológicos como: Líquido ascítico es un líquido acuoso que contiene albúmina, glucosa y electrolitos, que se acumula en la cavidad peritoneal en determinados trastornos; Líquido biliar que es una secreción amarga, amarillo-verdosa por la presencia de pigmentos biliares, tales como la bilirrubina. tiene compuestos derivados del colesterol y ácidos como los ácidos cólicos, desoxicólico, quenodesoxicólico y litocólico; La orina cuyos constituyentes normales son agua, urea, cloruro sódico y cloruro potásico, fosfatos, ácido úrico, sales orgánicas y el pigmento urobilina; La saliva que contiene agua, mucina, sales orgánicas y una enzima digestiva, la ptialina. Estudiando la composición de estos líquidos no existen compuestos interferentes en ellos que puedan afectar la reacción de nuestro método.

En este trabajo se emplean otras sustancias de apariencia similar a la sangre donde los resultados de las tablas 9 y 10 indican ser positivos para sangre a 24 horas y a una semana de exposición excepto en la salsa de tomate que da resultados negativo por la presencia de ácido ascórbico del tomate, y en el alcohol yodado que coagula la muestra por lo tanto no se logró determinar presencia de sangre en la mancha.

El tiempo puede influir en la identificación de sangre y más si contiene contaminantes que pueden variar sus propiedades lo que se demuestra



en los resultados obtenidos en la tabla 11 es que a mayor tiempo de exposición como ser un mes dan resultados negativos para sangre este se debe a que las muestras entran en procesos de putrefacción, este proceso tiene lugar por el desarrollo de microorganismos que degradan los indicios biológicos y suele estar favorecida por las condiciones de humedad y altas temperaturas cuyos factores predisponentes son el medio ambiente, el único factor que retrasa el proceso de putrefacción son temperaturas bajas y que las manchas de sangre estén conservadas a temperaturas de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, demostrándose así que las manchas de sangre con contaminantes presentan resultados positivos para la aminofenazona a temperaturas de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y para la aminoantipirina dan positivo para sangre en fresa, plátano, remolacha, líquido ascético y líquido biliar.

En las *tablas 9, 10 y 11* se observa que el medio ambiente afecta en la detección de sangre dando resultados negativos para muestras enterradas sin influir el tiempo ya que son muestras más sensibles las que contienen indicios húmedos (p. e. ropas de vestir o del hogar con grandes manchas de sangre o de orina en el lugar de los hechos y en el cuerpo de la víctima que aceleran el proceso de putrefacción).

En las condiciones experimentales de este estudio los resultados indican que es posible que la presencia de un contaminante pueda impedir detectar sangre presente en una muestra o indicio y que la aminofenazona es más sensible que la aminoantipirina.

XI. CONCLUSIONES

- El método presuntivo o de orientación aminofenazona se constituye como la prueba más apropiada en la detección de sangre en estudios forenses de posibles manchas secas de sangre ya que no



se ve afectada por condiciones de ambiente, temperatura o el soporte en el cual se encuentra la muestra.

- La capacidad de detectar la mínima cantidad de sangre por los métodos realizada mediante diluciones nos indica que la aminoantipirina requiere altas concentraciones de sangre para ser detectada en cambio la aminofenazona es sensible a menores concentraciones hasta una dilución de 1/10.000 a 1/50.000 por lo cual es el método mas sensible por que no varia con los grupos sanguíneos A, B, AB y O..
- Se puede detectar presencia de sangre en manchas secas hasta un mes de exposición si se encuentra en un ambiente cerrado a temperatura inferiores a 4°C, en cambio si ha sido expuesta a temperatura altas, ambientes húmedos o enterrados y abiertos la antigüedad de la mancha se ve afectada en su detección por ambos métodos de orientación.
- Según los métodos de experimentación se demuestra que se puede detectar sangre en manchas secas siempre y cuando este en un soporte absorbente que no interfiera en la degradación de la muestra y se almacene a temperatura ambiente en un lugar cerrado
- Se demostró que tanto la aminofenazona como la aminoantipirina tienen una capacidad de detectar muestras minimas casi invisibles en tela de manchas secas sometidas a lavados por lo cual adquieren un especial relieve.
- En este estudio se observó que los tests de aminofenazona y aminoantipirina en presencia de contaminantes vegetales y frutas citricas en la muestra de sangre puede impedir su detección, uno



de sus componentes interfiriendo en la reacción en este caso posiblemente el ácido cítrico.

- Los fluidos biológicos, sustancias químicas y otras sustancias mencionadas no interfieren en la detección de sangre por aminofenazona y aminoantipirina. La detección se ve afectada por la putrefacción de la muestra en presencia de sustancias interferentes y el tiempo de exposición al ambiente.
- Se debe considerar que los métodos presuntivos o de orientación son indispensables para seguir una serie de procedimientos para la correcta identificación de sangre y ayuden a esclarecer los hechos y proporcionar pruebas necesarias para llevar a buen fin una acción judicial.

XII. RECOMENDACIONES

- Según los estudios realizados en este trabajo el método de orientación aminofenazona es más sensible hasta una dilución 1/10.000 a 1/50.000, por lo cual se puede emplear en el análisis de manchas secas para detectar presencia de sangre.
- El soporte adecuado para recolectar indicios de sangre es el papel filtro, la gasa y no así el algodón por que presenta una reacción de coloración con el test de aminoantipirina.
- Es posible utilizar las pruebas de orientación aminofenazona y aminoantipirina en la detección de sangre hasta las 24 horas de exposición al ambiente de la muestra forense.



- Si se tiene manchas secas de sangre deben estar almacenadas en ambiente cerrado y a temperaturas inferiores a 4°C para que sea posible su detección.
- Las sustancias que presenten una similar apariencia con la sangre o que sean características del sitio donde se encuentra la muestra forense no interfieren en la reacción de detección de sangre por métodos analizados.
- Se debería seguir estudios posteriores para determinar por que no se detecta sangre en manchas secas sobre soportes absorbentes enterrados o si influye la tierra para la detección de sangre..
- Se deberán hacer estudios sobre la interferencia de el acido cítrico en la detección de sangre por estos métodos y cual es la concentración a la que interfieren con los métodos.

XIII. BIBLIOGRAFIA

1. Gaensslen R; Lee C.; Forensic Science An Introduccion to Criminalistics De Forest P.R. McGraw hill; (New York):1983.p.632-643
2. Medicina Legal; Gisbert Calabuig JA.: Los indicios en Medicina Legal y Toxicología 5ª Ed. Barcelona: Salvat; 1998. p. 11-30
3. Bonnet E.: "Medicina Legal" .2 ed Buenos Aires: Ed. López Libreros Editores. 1978.p.465-78
4. Sheehan F.X; Kobilinsky L.: Identificación de Sangre Humana:;Journal Of Chemical Education; Cs for. (Brasil)1994.vol 61 ,(6):1-2
5. Zweidinger, RA Lytle, LTn Pitt, CG: Photography of Bloodstains Visualized by Luminol: Jornal Of For. Cien (brasil)1993. Vol 18.p.3-7
6. Lytle, LT Hedgecock, DG Hedgecock: Chemiluminescence in the Visualization of Forensic Bloodstains :DG(chile) .1998.vol 23 :p.1-13
7. Cox M Books; Effect of Fabric Washing on the Presumptive Identification of Bloodstains: Journal of For Cs(New York) 1990 vol 35 :81-99
8. Negre Muñoz, A. Castelló Ponce, P. Gil Pitarchi F.A. Verdú Pascua: ¿Manchas de Sangre?: Seguridad en pruebas de orientación. Cuadernos de Med. For (México) 2003:34:p.29-34



9. Castelló Ponce, M. Álvarez Seguí, M. Miquel Feucht y F.A. Verdú Pascua Revelado de Manchas Latentes: Efectividad del Luminol y Evaluación de su Efecto Sobre el Estudio del DNA.; Cuad Med Forense, 11(42), Octubre 2005:267274
10. Dr. Winchester (ESR forensic): detección de sangre por métodos químicos XII-Biotech : Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/342/34202503.pdf>
11. Chamberlain A.; Simpson O.J. ;Historia de la serología; MIND/FCYI(en línea)2000(fecha de acceso 1 de diciembre 2007)disponible en: <http://wwwfaculty.ncwc.edu/TUCONNOR/425/425lect13.htm-micro>
12. Douglas S. Historical Review. Blood, pure and eloquent history (Oxford): *Br Med J* 1999; 107: 22-32.
13. Shirlyn B. McKenzie Hematología Clínica; México D.F. El manual moderno S:A. 1988 ;pag 2-9 ,24-51
14. Lic. Ada Amalia Arce Hernández y Lic. Rinaldo Villaescusa Blanco Organización de la membrana eritrocitaria: banda 3, estructura y función; Artículos de revisión; Habana Cuba (2005):p 1-5
15. Telen M. Eritrocitos maduros. *En*: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens J, Lukens J (eds.). *Wintrobe Hematología clínica*. Buenos Aires: Intermédica; 1994. p. 80-105.
16. Schultz R. Devlin T:bioquímica de Proteínas fisiológicas. ed.7:Barcelona: Edit.Reverté; 1993. p. 95-133
17. Chen Y.P., Woodin S.A.,Lincoln D.E.; Biol.Chem.peroxidasas: 1996;271;p.4609-4612
18. Ballester Santovenia A. Frecuencia de los grupos sanguíneos A1, A2, Aint, Ael, B y O en donantes de sangre. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1997;13(2):122-31 Disponible en: http://www.med.uchile.cl/apuntes/archivos/2005/medicina/grupos_sanguineos_genetica.pdf
19. Salmon Ch, Cartron JP, Rouger Ph. Les groupes sanguins chez l'homme. Paris: Ed. Masson, 1991.
20. Carmen Solís Ortega y Francisco Álvarez Fernández; **Recomendaciones para la Recogida y envío de las muestras de sangre; comisaría general de policía científica.**



Laboratorio de biología / ADN: Madrid. Sociedad internacional de genética forense, España. 2000

21. Jeffrey J.; Wilson, V and Thein, S.; analysis using Y-chromosome STRs. *Forensic Sci Int.* 2001 Dec 15;1-24(1):p.5-10
22. Serology Forensic. Recuperado el 21 Jul. 2006: disponible en:<http://faculty.ncwc.edu/toconnor/425/425lect13.htm>.
23. Criminalistica.com.mx La pagina de Criminalística de México :Disponible en: http://criminalistic.org/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=75
24. James, S., Kish, P. y Sutton, P. *Principios del análisis del patrón de la mancha de sangre*. FL: Presión del CRC:2005
25. Culliford, B; *La examinación y el mecanografiar de manchas de sangre en el laboratorio del crimen*, el instituto nacional de la aplicación de ley y la justicia criminal. (1971).
26. Patricia M. Caro: *Manual de Química Forense*.. Ed la Roca., Buenos Aires, Argentina. 2004
27. Springer, E. "Detection of dry body fluids by inherent short wavelength UV luminescence: preliminary results", *Forensic Sci Inter*, 66: 89-94, 1994.
28. Reconocimiento de sangre por medio de luminol: Disponible en www.prof.uniandes.edu.co/~infquimi/VI_feria/id54.htm - 18k
29. Nishi K, Ito N, Mizumoto J, Wada K, Tsuji T, Kimura A. Reliability of blood grouping of aged blood to direct hemagglutination methods and absorption elution method. *Nippon Hoigaku Zasshi*. 1985; 39(2): 131-137.
30. Anónimo 2005 Guía de validación de Métodos analíticos :Disponible en : http://net.salud.sacr/ms/dre.Guia_validación.doc Anónimo
31. Perutz MF Luzzatto L, Notaro R. Structure and mechanism of haemoglobin. *Br Med Bull* 1976; (32: 9195-208.
32. Some Oxidation-Reduction Reactions ; Nature No 3602 (1983) disponible en: www.journal/quimicayciencias.cjb.net
33. Lourdes Luengo (1998) Disponible en : <http://www.arrakis.es/~lluengo/enzimas.html>
34. Gama de Productos de EGARFYMA S.A. Disponible en: <http://redalyc.egarfyoma.mx/redalyc/342.htm>
35. Papeles filtro millipore; Millipore Corporation Bedford MA ;Francia 2002 Pag 1-4



36. Ciencianet:Componentes de un detergente ; Disponible en <http://www.chemistry.co.nz/deterginfo.htm>
37. CRIC PI. Molina 8 Los Detergentes, Barcelona 2000 :Disponible ,en <http://www.opcions.org/>
38. Sannumi ; fENNEMa Bachowski andersonm : Propiedades del acido ascórbico :Revision pag 1-12



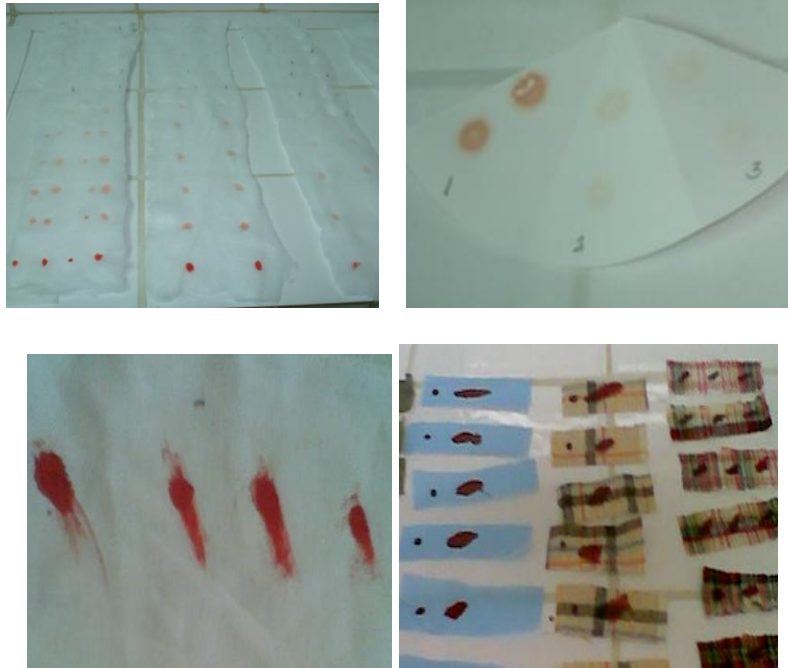
ANEXOS



Fotografía 5 Reactivos y soporte utilizado para llevar a cabo la reacción



Fotografía 6 : de sustancias de contaminantes utilizados en la practica



Fotografía 7: Arriba manchas de sangre sobre algodón, gasa y papel filtro; Abajo manchas de sangre en diferentes soportes de telas.



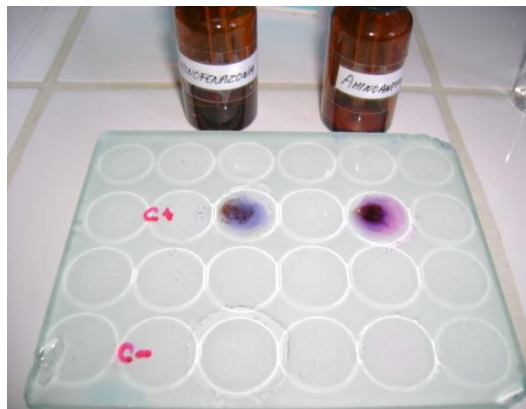
Fotografía 8: Muestras de manchas de sangre en soportes de tela enterradas



Fotografía 9: Manchas de sangre en temperaturas de 4 grados centígrados



Fotografía 10: Manchas de sangre sometidas a calor en hornos pupinell



Fotografía 11: Control negativo y control positivo con aminofenazona lila y aminoantipirina rosado



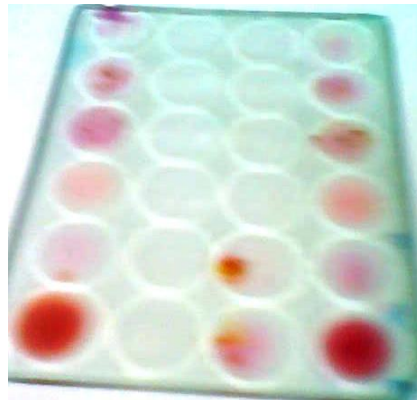
Fotografía 12: Determinación de sensibilidad en soporte gasa grupo sanguíneo "O" lila=aminofenazona y Rosado=aminoantipirina



Fotografía 13: Determinación de sensibilidad en soporte algodón grupo sanguíneo "O" lila=aminofenazona y Rosado=aminoantipirina



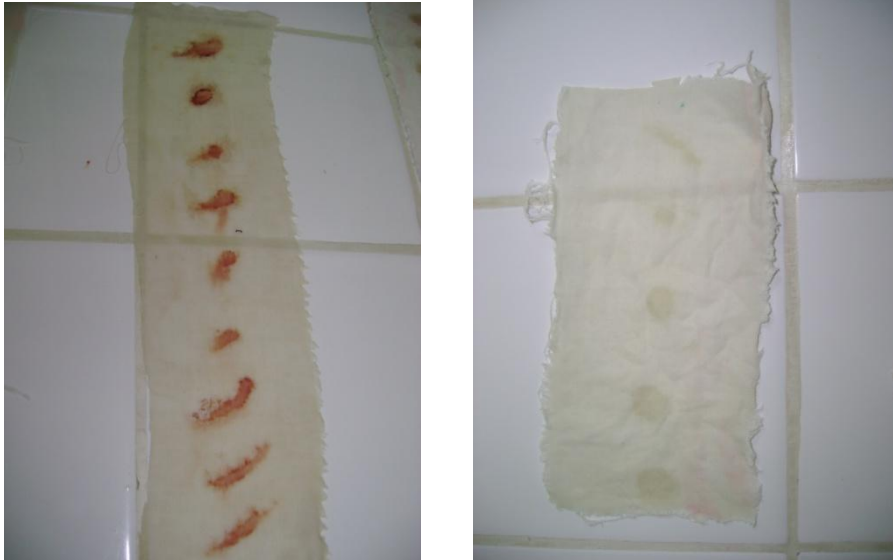
Fotografía 14: Determinación de sensibilidad en soporte Papel filtro grupo sanguíneo "O" lila=aminofenazona y Rosado=aminoantipirina



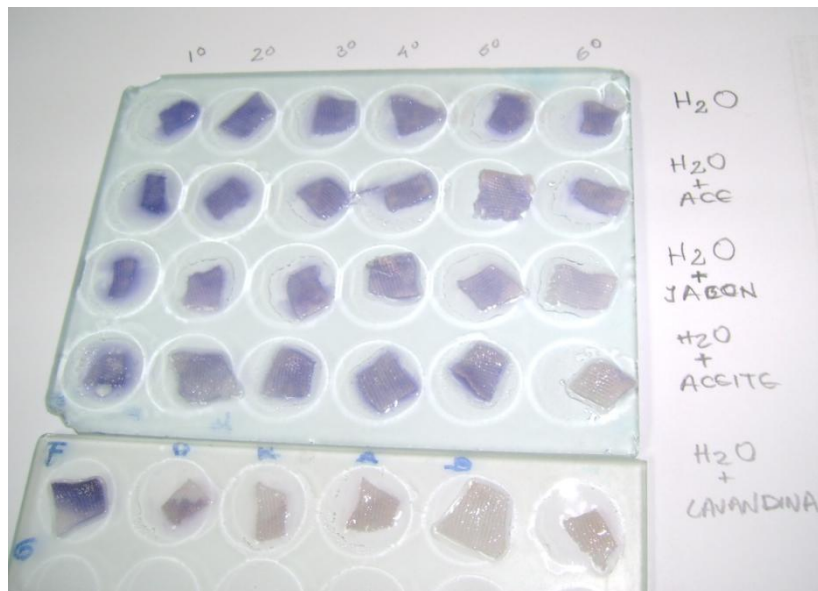
Fotografía 15: Test aminofenazona donde no se encuentra reaccion positiva con contaminantes jugos y frutas no se observa el color lila.



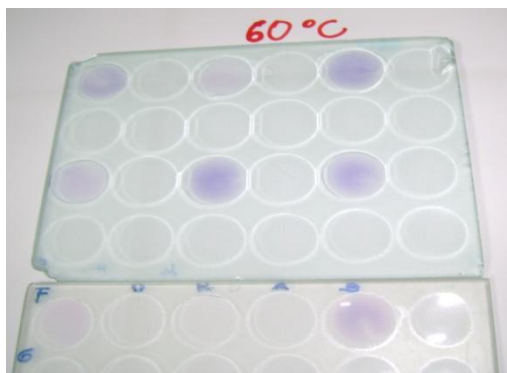
Fotografía 16: Suspensiones de manchas de sangre refrigeradas durante una semana reacción con aminofenazona color lila



Fotografía 17: Manchas de sangre sobre tela de algodón (izquierda) y manchas de sangre lavadas (derecha)



Fotografía 18: Reacción de aminofenazona en Manchas lavadas



Fotografía 19: Test de aminofenazona (lila) en manchas sometidas a 60 grados centígrados



Fotografía 20: Test de aminoantipirina en manchas a 4 Grados centígrados con contaminantes



Fotografía 21: Resultados del test de aminofenazona en manchas sometidas a temperaturas de 60 grados centígrados



Fotografía 22: Resultados del test de aminofenazona en muestras enterradas durante un mes



Fotografía 23: Test de amonoantipirina a 24 horas a 4 grados centigrados

