



336427

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO  
CAMPUS CHAPULTEPEC**

**Escuela de Químico Farmacéutico Biólogo.  
Incorporada a la UNAM.**

**Estudio de Efectividad de la cinta REMCO en la  
recolección de indicios biológicos en el lugar de los  
Hechos para estudios con fines Criminalísticos.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

**ALEJANDRO DELGADO JIMÉNEZ**

**DIRECCIÓN DE TESIS:**

**M. ISIDRO HINOJOSA LÓPEZ  
Q. F. B. MA. LOURDES VEGA NAVARRETE**

MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE, 2005

0350599

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



336427

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO  
CAMPUS CHAPULTEPEC**

**Escuela de Químico Farmacéutico Biólogo.  
Incorporada a la UNAM.**

**Estudio de Efectividad de la cinta REMCO en la  
recolección de indicios biológicos en el lugar de los  
Hechos para estudios con fines Criminalísticos.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

**ALEJANDRO DELGADO JIMÉNEZ**

**DIRECCIÓN DE TESIS:**

**M. ISIDRO HINOJOSA LÓPEZ  
Q. F. B. MA. LOURDES VEGA NAVARRETE**

**MÉXICO, D. F.**

**NOVIEMBRE, 2005**

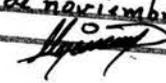
ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**JURADO -**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alejandro Delgado Jimenez

FECHA: 23 de noviembre de 2005

FIRMA: 

Presidente:

**M. Isidro Hinojosa López**

Vocal:

**Q. F. B. Martha Laura Luna Ontiveros**

Secretario:

**Q. B. F. Benjamín Adolfo Fernández Fernández**

1er Suplente:

**Q. F. B. Javier Araiza Santibáñez**

2º Suplente:

**Dr. Guillermo del Rey Pineda**

**Trabajo realizado en el LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal.**

Asesores:

**M. Isidro Hinojosa López**  
**Q. F. B. Ma. Lourdes Vega Navarrete**

## **"Agradecimientos."**

Con todo mi amor, respeto y admiración a mis padres:

### **Alex y Lupita**

Quienes sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme con su apoyo incondicional, consejos y cariño y por que nunca podré pagar todo lo que me han dado y todos sus desvelos ni aún con las mas grandes riquezas del mundo.

Con amor a mi hermana:

### **Aline (la Flak)**

Por siempre estar conmigo apoyándome y dándole un toque de frescura y diversión a cada momento que pasamos juntos.

Con amor y gratitud a:

### **Mis Abuelitos, tíos y primos.**

Por siempre confiar en mí, apoyarme en cada momento que lo necesité y por sus consejos que me ayudaron a ser la persona que soy el día de hoy.

A mis **amigos, profesores y a esas personas especiales** en mi vida que disfrutaron conmigo de tantos momentos haciendo de esta meta algo viable con su apoyo y constante estimulo.

A mi asesor **Isidro Hinojosa** por su apoyo, comprensión y amistad brindada en los años de conocerlo.

A la **Q. F. B. Ma. Lourdes Vega Navarrete** por su apoyo e invaluable colaboración para la realización de este trabajo. Así como a los peritos, compañeros y amigos **Jorge Guillen Alfaro, Maria Eugenia Ambriz Franco y Elena Abarca** por su apoyo, paciencia, enseñanzas y tiempo brindado.

# INDICE

Justificación del Presente Trabajo .....	1
<b>Capitulo I: Introducción</b>	
1.1 Antecedentes Históricos .....	2
1.2 Marco Teórico .....	6
1.3 Objetivos .....	15
1.4 Hipótesis .....	15
<b>Capitulo II: Generalidades.</b>	
<b>1.- Sangre</b>	
1.1 Aspectos generales .....	17
1.2 Vínculo con la Criminalística .....	18
1.3 Rastreo Hemático .....	19
1.4 Características morfológicas en huellas de sangre .....	21
<b>2.- Semen</b>	
2.1 Aspectos generales .....	25
2.2 Importancia en la Criminalística .....	26
Rastreo .....	27
<b>3.- Saliva</b>	
3.1 Aspectos generales .....	28
3.2 Enfoque criminalístico .....	29
3.2 Rastreo .....	29
<b>Capitulo III: Metodologías</b>	
<b>1.- Sangre</b>	
1.1 Procedimiento de levantamiento con la cinta REMCO® .....	31
1.2 Técnicas de Orientación para identificación de Sangre.	
Técnica de la Bencidina o de Adler. ....	32
Técnica de la Fenoftaleína o de Kastle-Mayer. ....	33
1.3 Técnicas de Confirmación.	
Cristales de Hemina o de Teichmann. ....	35
Determinación de grupo sanguíneo .....	36
1.4 Técnicas de determinación del origen de la sangre.	
Reacción de Precipitinas .....	39
1.5 Tipificación	
Individualización .....	42
Extracción por Chelex. ....	43
Amplificación por PCR. ....	44
Electroforesis capilar .....	46

2.- Semen	
2.1 Recolección de muestras con la cinta REMCO®	49
2.2 Técnicas de orientación	
Fluorescencia a la luz ultravioleta	49
Fosfatasa ácida	49
2.3 Técnica de confirmación	
Observación microscópica	51
2.4 Técnica de determinación del origen del semen.	
Reacción de Precipitinas	53
2.5 Tipificación	
Procedimiento	55
Amplificación por PCR	56
3.- Saliva	
3.1 Levantamiento con cinta REMCO®	57
3.2 Técnicas de orientación	
Amilasa	58
3.3 Técnicas de confirmación	
Observación a microscopio	61
3.4 Tipificación (individualización ADN)	
Extracción por Chelex	63
Amplificación por PCR	63
<b>Capítulo IV: Resultados</b>	<b>65</b>
1.- Sangre	67
2.- Semen	68
3.- Saliva	
4.- Discusión de los Resultados.	69
4.1 Sangre	71
4.2 Semen	74
4.3 Saliva	
<b>Conclusiones</b>	<b>76</b>
Sugerencias Adicionales	77
Resumen	78
<b>ANEXO 1: Reactivos</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO 2: Esquematización de Procedimientos</b>	<b>83</b>
Tabla de Ilustraciones	95
<b>Glosario</b>	<b>97</b>
<b>Referencias</b>	<b>101</b>

# **Estudio de Efectividad de la cinta REMCO® en la recolección de indicios biológicos en el lugar de los hechos para estudios con fines Criminalísticos.**

## **Justificación del presente trabajo:**

En todo acto violento se presenta un intercambio sensible de material biológico debido a la interacción autor-víctima-lugar de los hechos, considerados como indicios biológicos de gran importancia para la investigación criminalística de los hechos. La sangre vertida, el semen, la saliva y los cabellos son en la actualidad evidencias tan importantes en la instrucción criminal que, con suma frecuencia, el juez aguarda al dictamen pericial correspondiente para fundamentar su hipótesis o corroborar su sentencia.

La investigación criminalística, funda sus tareas profesionales en el estudio científico de las evidencias materiales y se debe prever que el empírico no confunda con sus argumentos y estar atentos a los razonamientos del científico.

El examen de las máculas sospechosas, la observación y el análisis de los mismos, han ilustrado tantas veces a la justicia; han hecho tan frecuentes e inesperadas revelaciones y esclarecido tantos crímenes, tantos delitos perpetrados sin testigos presenciales que nos demuestra y permite justificar la importancia de la identificación, estudio y análisis de estos valiosos indicios.

Para contribuir con los criminalistas, se llevaron a cabo las técnicas bioquímicas que se realiza comúnmente para la identificación y tipificación de los indicios aportando el fundamento y desarrollo de estas técnicas.

Con el fin de buscar una alternativa más sencilla y disminuir los riesgos de contaminación, deterioro y pérdida de los indicios (fluidos biológicos), además de recuperar el indicio sin pérdida de la forma original que tenía en el lugar de los hechos conociendo la importancia que estas características tienen para el esclarecimiento de delitos; se realiza un estudio observacional, predictivo, concomitante y concluyente para determinar *la efectividad de la cinta REMCO® (lifting tape) en la recolección de indicios biológicos en el lugar de los hechos y su análisis respectivo para estudios de ADN.*

# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN

### Antecedentes históricos:

Antes del siglo XVII, el delincuente cuyas ropas se habían manchado de sangre de la víctima a consecuencia de la comisión del ilícito, casi siempre escapaba de la acción de la justicia, en virtud de que en esa época no se contaba con técnicas que pudieran identificar la sangre y mucho menos otros fluidos biológicos.

Muchos años después, en 1575, surgió una ciencia precursora de la criminalística, la medicina legal, iniciada por el francés Ambrosio Paré, y continuado por Paolo Sachias en 1651.

En 1686, Malpighi hacía valiosas aportaciones al estudio de las impresiones dactilares, tanto que una de las partes de la piel humana lleva el nombre de capa de Malpighi. (Malpighi layer).

En 1753, otro ilustre estudioso y precursor, el doctor Boucher, realizaba estudios sobre balística, disciplina que a la postre se llamaría balística forense, también precursora de la Criminalística.

Un sobresaliente acontecimiento en la historia de la dactiloscopia marcó un tratado publicado en 1823, por Johannes Evangelist Purkinje, quien presentó el ensayo como su tesis para obtener el grado de doctor en medicina, en la Universidad de Breslau. En ese escrito, Purkinje describió los tipos de las huellas dactilares y las clasificó en nueve grupos principales.

En 1853, aparece uno de los primeros precursores de la balística Forense, Henry Goddard, que en opinión de Jurgen Thoward, fue uno de los últimos y mas famosos “bow-street-runners”, de la policía británica, y hace referencia de lo siguiente: “En una de las balas que penetraron el cuerpo de la víctima, Goddard observó una curiosa protuberancia y con dicho proyectil provisto de la mencionada seña particular inicio la búsqueda del asesino. En la sombría vivienda de uno de los sospechosos, Goddard descubrió un molde para balas de plomo, un utensilio bastante común en aquellos días. El molde tenía un pequeño defecto. En él se podía observar claramente una hendidura. El dueño del molde, detenido por sorpresa, confesó su crimen.”

En 1840, el italiano Orfila creó la toxicología, y Ogier la continuaba en 1872, ciencia que auxiliaba a los jueces a esclarecer ciertos tipos de delitos, en donde los venenos eran usados con mucha frecuencia. Esta ciencia o disciplina también es considerada como precursora de la Criminalística.

En 1866, Allan Pinkerton, y su “Pinkerton’s National Detective Agency”, en Chicago, E. U. A., ponía en práctica la fotografía criminal para reconocer a los delincuentes disciplina que posteriormente sería llamada Fotografía Judicial y actualmente se le conoce como Fotografía Forense.

En 1882 Alfonso Bertillón creó en París el servicio de Identificación Judicial en donde ensayaba su método antropométrico dado a conocer en 1885 y adoptado oficialmente en 1888. Dicho método estaba basado en el registro de las diferentes características óseas métricas y cromáticas en personas mayores de 21 años, en once diferentes partes del cuerpo.

Todo lo anterior permite establecer que las investigaciones policíacas se empezaban a guiar científicamente, pero con un porcentaje considerable de empirismo, donde se usaba la intuición y el sentido común y lógicamente no se obtenían resultados muy satisfactorios. Pero todas estas investigaciones y pesquisas empíricas, adquirieron un nombre propio que les dio el mas ilustre y distinguido Criminalista de todos los tiempos, el Doctor en Derecho **Hanns Gross**, denominándole **Criminalística**; en Graz, Austria en 1892, dada a conocer mediante su obra: “Handbuck für Untersucungsrichter als System der Kriminalistik” (Manual del Juez, todos los Sistemas de Criminalística). En 1893 se imprimió la segunda edición en esa misma ciudad.

Se editó y publicó en España en 1894, con el nombre “El manual del juez”, con traducción del eminente jurista Doctor en Derecho, Máximo de Arredondo. Y para Latinoamérica la editó Lázaro Pavía, en 1990, mismo año en que se conoció en México.

El referido jurista Máximo Arredondo, en el prólogo que hace al Manual del Juez, publicado en Madrid, España, en 1894, valora su contenido y justiprecia la fecha en que el doctor Hanns Gross dio a conocer la Criminalística, comentando lo siguiente: “No existiendo, en nuestro país obra alguna que viniera a llenar el vacío de que antes hablábamos, no hemos dudado en acudir a las literaturas extranjera, y muy particularmente a la alemana. Claro que en la literatura alemana se incluye la literatura de Austria, a cuyo país pertenece el autor.

La elaboración del Manual del Juez le tomó a Hanns Gross 20 años de experiencias e intensos trabajos, en donde hizo investigaciones que debe reconocer la instrucción de una averiguación para la aplicación de la técnica del interrogatorio, el levantamiento de planos y diagramas, utilización de los peritos, la interpretación de escrituras, conocimiento de los medios de comunicación entre los participantes de un mismo delito para el reconocimiento de las lesiones, etc., siendo en general un manual útil para los jueces en el esclarecimiento de cualquier caso penal.<sup>(15)</sup>

Del contenido científico del Manual del Juez, se desprende que el Doctor Hanns Gross, en su época constituyó a la criminalística con las siguientes materias: Antropometría, Argot Criminal, Contabilidad, Criptografía, Dibujo Forense, Documentoscopia, Explosivos, Fotografía, Grafología, Hechos de tránsito ferroviario, Hematología, Incendios, Medicina Legal, Química legal e Interrogatorio.

## Evolución de la Criminalística.

En los años de la creación de la Criminalística, varios estudiosos de la investigación criminal se inclinaron en llamar al conjunto de métodos para la investigación de delitos, como Policía Judicial Científica o Policía Científica entre ellos estaban: Alongi, De Benito, Ferri, Lombroso, Nicéforo, Ottolenghi, Reiss, Roumagnac y otros científicos. En Berlín, en 1900, Paul Jeserich respaldaba a Gross con la publicación de su manual “Handbuck der kriminalistischen Photographie”, donde exponía técnicas para la toma de fotografías en las nacientes investigaciones Criminalísticas.

Pero para Hanns Gross, la Criminalística era una disciplina auxiliar jurídico-penal y su obra se tradujo a varios idiomas, provocando el interés de otros especialistas quienes empezaron a hacer observaciones y contribuciones a la naciente disciplina <sup>(49)</sup>.

En varios países se hicieron notorias las necesidades de la policía y nació la imperiosa obligación de llevar a cabo estudios especializados para poder ocupar puestos en la policía conforme progresaron las ciencias y se hicieron nuevos descubrimientos, la Criminalística tomó de ellas lo que era útil para su desarrollo.

En 1897, el profesor Salvatore Ottolenghi presentó un programa para el curso de policía científica, en el cual desarrollaba sus sistemas de enseñanza, aplicados en la Facultad de Medicina en Siena, Italia, desde ese año hasta después de 1915.

En 1899, el propio Ottolenghi, junto con Alongi, fundaron una revista llamada “Polizia Scientifica”. Lombroso, Ferri y Alongi, invocaban pronto en Italia una policía judicial científica de la que formaba parte la identificación de delincuentes, acerca de la cual ya en 1872 había ideado un método antropométrico el italiano Bonini (Bognoni), a quien siguieron en esta senda Anfosso, De Blasio y Otros <sup>(10)</sup>.

Alfredo Nicéforo, en la “Scuola Positiva” en Roma en 1903, con su monografía de estudio y enseñanza de la Criminología, colocaba por primera vez a la Policía Judicial, en el cuadro general de la Criminología.

En **México**, en 1904, el profesor Carlos Roumagnac, escribía los primeros fundamentos de Antropología Criminal con base en estudios efectuados en la cárcel de Belén, México D. F. <sup>(37)</sup>.

En 1907, el propio Roumagnac, ponía en práctica el Servicio de Identificación en la inspección general de policía de la ciudad de México.

A principios del siglo XX, en México los doctores Francisco Martínez Baca y Manuel Vergara, publicaban sus trabajos en el libro “Estudios de Antropometría Criminal”. Además, el primero de los doctores de referencia, escribía “Los Tatuajes”, y el licenciado Julio Guerrero, elaboraba una verdadera tesis llamada “La Génesis del Crimen en México”, obra que en opinión de Carlos Roumagnac, tuvo mucho éxito y se tradujo a otros idiomas <sup>(38)</sup>.

Nuevamente en la Ciudad de México, en enero de 1920, el profesor Benjamín Martínez, fundó el gabinete de identificación y el laboratorio de Criminalística, en la entonces jefatura de policía del Distrito Federal, y escribía algunos de los primeros tratados de Dactiloscopia.

En 1923, Carlos Roumagnac, escribía en México el primer libro sobre policía judicial científica, en donde definía los métodos y técnicas de esa época para las investigaciones criminales.

En 1935, los policiólogos Carlos Roumagnac, Benjamín Martínez, Fernando Beltrán u otros crean en la ciudad de México una escuela para policías en la que se enseñaba la criminalística entre otras materias, llamándola Escuela Técnica Policial.<sup>(19)</sup>

Fue hasta 1938, cuando el doctor José Gómez Robleda, Director de Servicios Periciales, indicaba la aplicación de la Criminalística en la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal, entonces también de Territorios Federales.

En 1946, plenamente entusiasmado con la Criminalística, el doctor Constancio Bernaldo de Quiroz, en las conferencias que dictaba en la Asociación de Abogados de Puebla, México, explicaba que: “De todos los elementos que intervienen en ella, de todos los temas de interés, de novedad que hay en la Policiología, en la Policía Judicial Científica, que así se llama este aspecto de la criminalística, se pueden mencionar solo dos doctrinas, la identificación del malhechor y otra, la que afecta a la confesión del reo”<sup>(7)</sup>.

Pero apunta el doctor Camilo Simonín en 1955, que “Posteriormente a 1919, la policía Científica ha llegado a ser Criminalística, ya que la experiencia ha demostrado que el estudio de las huellas criminales, manifiestamente importantes para la justicia y el descubrimiento de falsos documentos, sobrepasa las responsabilidades de las investigaciones policiales. Especialistas, biólogos, físicos y químicos, deben intervenir; ello encierra la necesidad de crear laboratorios de criminalística, que dispongan de buen instrumental científico y de especialidades competentes<sup>(41)</sup>”.

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

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

La llegada de la dactilografía del ADN a mediados de los años 80's ha tenido un enorme efecto en la habilidad de los laboratorios criminalísticos para identificar sujetos extraordinariamente examinando una gran variedad de los fluidos de sus cuerpos.

La incorporación de técnicas de biología molecular en los laboratorios criminalísticos ha resultado, en un porcentaje creciente notorio, en la identificación de criminales y en la exoneración de inocentes.

El arribo de la tecnología del ADN ha aumentado la habilidad de efectuar análisis de identidad humana. La identificación individual es deseada en gran número de situaciones incluyendo la determinación de perpetradores de actos violentos como homicidios y violaciones, resolviendo casos de paternidad no establecida, y en la identificación de restos de personas desaparecidas o víctimas de desastres masivos.

La tecnología de tipificación del ADN se desarrollo rápidamente durante los 90's hasta el punto donde ahora es posible obtener resultados en pocas horas con muestras con mínima cantidad de material biológico.

La tipificación del ADN, desde que fue introducida a mediados de los 80's, revoluciona la ciencia forense y la habilidad de fortalecer a la ley para relacionar a los perpetradores con la escena del crimen.

La Dactilografía del ADN o tipificación del ADN como es conocida, fue descrita por primera vez en 1985 por el genetista inglés Alec Jeffreys.

Los últimos 15 años han observado un tremendo crecimiento en el uso de evidencias de ADN en las investigaciones de la escena del crimen así como en pruebas de paternidad.

La comunidad de científicos dedicados a la identificación con estas pruebas, han usado una variedad de técnicas incluyendo las pruebas de locus individual, y multi – locus, métodos de RFLP y mas recientemente la PCR (polimerasa chain reaction). Numerosos avances se han hecho en los últimos 15 años en cuanto al procesamiento de las muestras y la sensibilidad de las técnicas. En lugar de requerir grandes manchas de sangre con ADN bien preservado, mínimas cantidades de muestra, tan pequeñas como una sola célula, en algunos casos, pueden producir un perfil de ADN útil.

### **Marco Teórico:**

La Criminalística es indispensable en la investigación de hechos presuntamente delictuosos para una correcta procuración y administración de la justicia, por tal motivo deben conocerla todos aquellos funcionarios que realicen tareas relacionadas con ella, principalmente agentes de la policía, peritos, agentes del Ministerio Público, jueces, magistrados y abogados litigantes.

El doctor mexicano, Moreno González, define a la Criminalística de la forma siguiente: “es la disciplina que aplica fundamentalmente los conocimientos, métodos y técnicas de investigación de las ciencias naturales en el examen del material sensible significativo relacionado con un presunto hecho delictuoso con el fin de determinar en auxilio de los órganos encargados de administrar justicia, su existencia o bien reconstruirlo, o bien señalar y precisar la intervención de uno o varios sujetos en el mismo”<sup>(28)</sup>.

Los criminalistas Sodi Pallares, Palacios Bermudes y Gutierre Tibón, exponen que: “El fin de la criminalística consiste en el descubrimiento del delito, del delincuente y de la víctima a quien perjudicó el delito”. Y agregando de manera muy importante, que “la criminalística es una disciplina explicativa y formalística, constituida por un conjunto sistematizado de diversas disciplinas naturales y que tiene por objeto el descubrimiento y verificación del delito; desde luego que es una disciplina auxiliar, pero que comprueba el delito y estudia al delincuente en forma científica”<sup>(44)</sup>.

## **Indicios en General**

Es conveniente mencionar primero, que “indicio” proviene del latín “*indicium*”, y significa “signo aparente y probable de que existe alguna cosa y a su vez es sinónimo de seña, muestra o indicación”<sup>(12)</sup>. Es de primordial importancia aclarar que la palabra indicio a sido integrada desde tiempo atrás para el orden principalmente penal.

Desde el punto de vista criminalístico, se entiende por indicio “Todo objeto, instrumento, huella, marca, rastro, señal o vestigio, que se usa y se produce respectivamente en la comisión de un hecho”.

Es decir, es toda evidencia física que tiene estrecha relación con la comisión de un hecho presuntamente delictuoso, cuyo examen o estudio de las bases científicas para encaminar con buenos principios toda investigación, y lograr fundamentalmente:

- a) la identificación del o los autores,
- b) las pruebas de la comisión del hecho, y
- c) la reconstrucción del mecanismo del hecho.

Con base en la experiencia y aplicando los métodos inductivo, deductivo, analítico y científico, así como las técnicas adecuadas, se podrá hacer “hablar” a los indicios.

Se debe recordar la famosa sentencia del doctor Edmond Locard y sentir la profundidad científica de su mensaje: “Los indicios son testigos mudos que no mienten”<sup>(29)</sup>.

La criminalística inicia las investigaciones preliminares de manera general hasta llegar a lo objetivo y significativo del pequeño detalle, razón suficiente para que en la búsqueda de indicios que en algunos casos resultan pequeños e insignificantes, se requiera de personal preparado científicamente, experimentado y con vocación sincera. Debe recordarse que no hay delincuente que a su paso por el lugar de los hechos no deje tras de sí alguna huella aprovechable, y cuando no se recogen evidencias útiles en la investigación, la verdad es que no se ha sabido buscarlas en virtud de que casi siempre se manifiesta un intercambio de indicios entre: el autor, la víctima y el lugar de los hechos.

La investigación pericial consta de cuatro etapas:

1. Búsqueda en el lugar de los hechos o sobre víctimas o implicados.
2. Recolección y envío al laboratorio.
3. Exámenes analíticos y su interpretación.
4. Emisión de Resultados mediante dictamen.

Las dos primeras son fundamentales con relación a los vestigios orgánicos, de ahí que se deba saber la forma de identificarlos, recolectarlos y enviarlos.

Los indicios, es decir el material sensible significativo relacionado con los hechos que se investigan, constituyen el objeto formal de estudio de la criminalística. Los indicios pueden ser encontrados tanto en el lugar de los hechos, en el cuerpo de la víctima o del victimario, como de las áreas relacionadas, ya sean próximas o distantes. Su manejo inadecuado conduce a su contaminación deterioro o destrucción, siendo éstas las causas más frecuentes que impiden su ulterior examen en el laboratorio.

Estas muestras levantadas adecuadamente en el lugar de los hechos son transferidas al laboratorio para su estudio, análisis eficientes para lograr explicar los sucesos que se inquieren.

#### Indicios más frecuentes en el lugar de los hechos.

Debe recordarse que los indicios son instrumentos muy delicados de la verdad, y tratados científicamente nos van a ayudar en la investigación de los delitos, y las reflexiones que se hagan de ellos deben efectuarse con base en la experiencia y con el uso de métodos y técnicas muy propias.

Las decisiones de los expertos en las diferentes ramas de la Criminalística, “hacen hablar” a los indicios, e imprimen sus consideraciones en informes o dictámenes periciales, los que van a orientar y a dar luz en la investigación y persecución de hechos presuntamente delictuosos.

Los indicios más frecuentes en el lugar de los hechos y que generalmente están asociados a ilícitos consumados, son los siguientes<sup>(26)</sup>:

- Impresiones dactilares, latentes, positivas y negativas.
- Huellas de **sangre**, con características dinámicas, estáticas, apoyo, embarraduras, etc.
- Huellas de pisadas humanas, calzadas, descalzadas, positivas, negativas e invisibles.
- Huellas de pisadas de animales, positivas, negativas e invisibles.
- Huellas de neumáticos, por aceleración, rodada y frenamiento o desplazamiento.
- Huellas de herramientas, principalmente en robos.
- Huellas de rasgaduras, descoseduras y desabotonaduras, en ropas.
- Huellas de labios pintados sobre papel Kleenex, ropas, tazas, cigarrillos, etc.
- Armas de fuego, armas blancas, balas, casquillos, rastros de sangre, manchas de sustancias, etc.
- Pelos humanos o de animal, o sintéticos, fibras de tela, fragmentos de ropas.
- Huellas de semen en la víctima o en los objetos cercanos a la escena del crimen (sábanas, ropa, baños, papel higiénico, etc.)

Una vez que el lugar de los hechos ha sido totalmente documentado y se ha localizado la evidencia, se podrá empezar el proceso de colección. El proceso de colección usualmente inicia con la evidencia más frágil o más fácil de perder

Las evidencias biológicas son transferidas por vía directa o secundaria, éstas quedan sobre superficies por absorción o adherencia. En general, las muestras líquidas son absorbidas dentro de las superficies y las evidencias sólidas se adhieren a las superficies. El método de recolección depende ampliamente del estado líquido o sólido y de las condiciones de la evidencia.

La recolección de una evidencia de ADN del lugar de los hechos debe ser realizada cuidadosamente, y debe cuidarse también la cadena de custodia con el fin de producir perfiles de ADN que sean significativos y legalmente aceptados en el juzgado. Las técnicas de ADN se han transformado en técnicas altamente sensibles que incluso aquellas muestras tan pequeñas que no puedan ser observadas a simple vista, pueden ser utilizadas para relacionar al probable responsable con el lugar de los hechos. La evidencia debe ser recolectada, preservada, almacenada y transportada cuidadosamente al laboratorio de ADN con el fin de evitar que la prueba quede invalidada por un defecto en la investigación preliminar.

## ADN

Los seres vivos u organismos muestran una similitud fundamental muy acentuada tanto en estructura como en función. Todas las formas vivientes están constituidas esencialmente de una o más unidades básicas o estructurales denominadas células.

La célula, considerada la unidad básica de la vida, constituye esencialmente un sistema complejo, muy organizado, dinámico y autodirigido de moléculas y agregados moleculares, los cuales emplean y toman energía del medio que los rodea para utilizarla en fenómenos de crecimiento y reproducción.<sup>(32)</sup>

Cada una de las células, esta rodeada por una membrana plasmática, contiene un núcleo y buen número de organelos subcelulares (mitocondrias, retículo endoplásmico granuloso, retículo endoplásmico liso y complejo de Golgi).

Dentro de los núcleos de nuestras células esta una sustancia química conocida como ADN que contiene el código informativo para la replicación de la célula, y la construcción de las enzimas necesarias. Debido a que el ADN se encuentra en el núcleo de la célula, comúnmente es conocido como ADN nuclear.

Los ácidos nucleicos incluyendo ADN están compuestos por unidades de nucleótidos que están constituidos por tres partes: una base nitrogenada, un azúcar y un fosfato. Las bases nitrogenadas, conceden la variación en cada unidad de nucleótido, mientras que el fosfato y las porciones de azúcar forman la columna vertebral de la estructura de la molécula del ADN.

El alfabeto del ADN esta conformado sólo por cuatro caracteres representando las cuatro bases: A (adenina), T (timina), C (citosina) y G (guanina). Las varias combinaciones de estas cuatro letras, conocidas como nucleótidos o bases, producen la variedad de diferencias biológicas entre los humanos y todas las criaturas vivientes.

Los humanos tienen aproximadamente tres billones de posiciones de nucleótidos en su genoma ADN. Por lo tanto, con cuatro posibilidades (A, C, G, o T) en cada posición, literalmente, trillones de combinaciones son posibles. El contenido de información del ADN es codificado en un orden (secuencia) de las bases tal cual las computadoras guardan información binaria en una línea de unos y ceros.

Siempre que se enliste una secuencia de ADN se designa el “extremo-5” y el “extremo-3”. Este esquema de numeración se debe a la estructura química del ADN y se hace referencia a la posición de los átomos de carbono en el anillo de azúcar de la columna vertebral del ADN. Una secuencia es normalmente escrito (y leído) de 5’ a 3’.

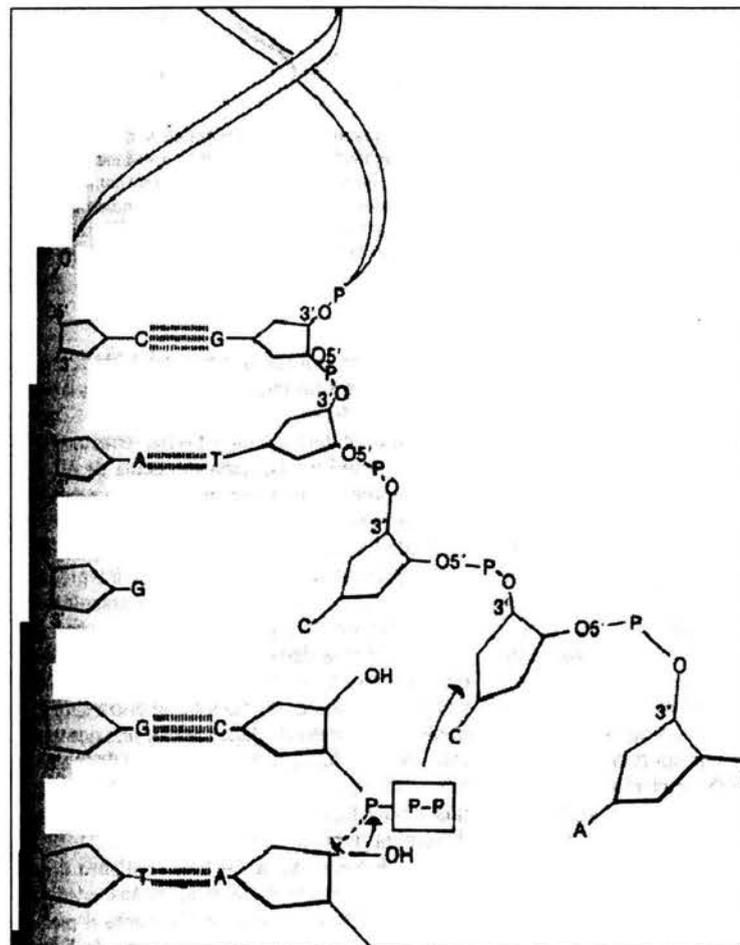


Figura 1. Mecanismo de duplicación de ADN por polimerasa ADN <sup>(5)</sup>

Las ADN polimerasas, son las enzimas que copian el ADN, solo “escriben” las secuencias de ADN 5’ a 3’, muy parecido a como nosotros leemos palabras y enunciados de izquierda a derecha.

## **Pares de las bases e hibridación de las hebras de ADN <sup>(20)</sup>**

En su estado natural en la célula, el ADN está compuesto por dos hebras que están unidas a través de un proceso conocido como hibridación. Las unidades de nucleótidos individualmente son unidos con su base complementaria a través de puentes de hidrógeno que se forman entre las bases. Las reglas de unión entre bases son que adenina solo puede hibridarse con timina y citosina solo puede hibridarse con guanina. En el par formado por las bases adenina-timina existen dos puentes de hidrógeno y en el par de guanina-citosina hay tres puentes de hidrógeno. Debido a esto, el par GC se mantiene unido un poco más fuerte que el par de bases AT. La doble hebra del ADN forma una hélice debido a este fenómeno de apareamiento de bases.

La hibridación de ambas hebras es una propiedad fundamental del ADN. De cualquier manera, los puentes de hidrógeno que tienen las hebras del ADN unidos entre sus pares de bases pueden ser “quebrados” por una temperatura elevada o por tratamiento químico, proceso conocido como desnaturalización. Un método común de desnaturalización de la doble hebra del ADN es calentarlo cerca de temperaturas de ebullición.

La desnaturalización es un proceso reversible. Si la doble hebra de una pieza de ADN es calentada, se separará en dos hebras. Conforme la muestra de ADN se enfría moderadamente, la hebra del ADN encontrará su secuencia complementaria y se volverá a hibridar y a unirse una con otra. El proceso de complementación de que las dos hebras del ADN se vuelvan a unir es conocido como renaturalización o realineación. <sup>(5)</sup>

Existen aproximadamente tres billones de pares de bases en sólo una copia de genoma humano. Obtener un catálogo completo de los genes contenidos en el genoma humano es el objetivo primordial del Proyecto del Genoma Humano, que ha sido un esfuerzo internacional desde 1990. La información del Proyecto del Genoma Humano va a beneficiar a la ciencia médica así como a la identificación forense y nos ayudará a entender como estamos creados genéticamente.

Dentro de las células humanas, el ADN encontrado en el núcleo de la célula está dividido en cromosomas, que son paquetes compactos de ADN y proteínas de protección llamadas histonas. El genoma humano consiste en 22 pares de cromosomas de un autosoma y dos cromosomas determinantes del sexo. Por esto, las células de un humano normal, contienen 46 diferentes cromosomas o 23 pares de cromosomas. Las pruebas de identidad humana son desarrolladas usando marcadores en los cromosomas autosomales, y la determinación de género es dada con marcadores en los cromosomas de sexo.

El material genético en los cromosomas está compuesto por regiones “codificadas” y “no codificadas”. Las regiones codificadas son conocidas como genes y contienen la información necesaria para que la célula pueda producir proteínas. Un gen puede variar desde unos cuantos miles hasta decenas de miles de pares de bases en cuanto a su tamaño. Aproximadamente 50 000 – 100 000 genes existen en el genoma humano, cifra que no podemos conocer hasta que se complete el Proyecto del Genoma Humano. <sup>(5)</sup>

Los genes consisten en exones (porciones de proteínas codificadas) e intrones (las secuencias interpuestas). Los genes sólo conforman aproximadamente el 5% del ADN genómico humano. Las regiones de proteínas no codificadas de ADN forman el resto de nuestro material cromosómico. Debido a que estas regiones no están relacionadas directamente con la producción de proteínas en muchas ocasiones se refieren a estas zonas como ADN chatarra. Los marcadores polimórficos (variables) que difieren entre individuos pueden ser encontrados en todas las partes de las regiones no codificadas del genoma humano. La posición cromosómica de un gene o de un marcador de ADN en una región no codificada es comúnmente denominada como locus (plural: loci). Miles de loci han sido caracterizados o delineados en regiones particulares de los cromosomas humanos a través del esfuerzo mundial en el Proyecto del Genoma Humano.

Pares de cromosomas son descritos como homólogos por que ellos son del mismo tamaño y contienen la misma estructura genética. La copia de cada gene reside en la misma posición (locus) en cada cromosoma del par homólogo. Uno de los cromosomas de cada par es heredado por la madre y el otro por el padre. La secuencia del ADN de cada cromosoma del par de homólogos puede o no ser idéntica desde que las mutaciones se han dado en el tiempo. <sup>(5)</sup>

En la actualidad y tras un largo periodo de investigación, la tecnología del ADN se ha convertido en una herramienta imprescindible en el análisis de indicios biológicos de interés criminal.

Extraer material genético casi de cualquier indicio biológico ha permitido obtener información precisa acerca de la identidad genética del individuo.

Con el desarrollo de la técnica de amplificación genética conocida como PCR y su aplicación en la genética forense se han conseguido resultados óptimos a partir de vestigios con cantidades críticas de ADN.

Debido a las cantidades tan críticas de vestigios biológicos a los que nos enfrentamos en el laboratorio de genética es de suma importancia la correcta recogida de muestras y la protección de las mismas.

Los procesos utilizados para la toma de muestra, pueden afectar la obtención del perfil genético a partir de los indicios o muestras biológicos.

Estos procesos se pueden contaminar o alterar la cantidad de ADN en el momento de la recogida y/o durante el envío al laboratorio. Los factores que afectan a nuestra muestra son:

- Contaminación por material biológico humano
- Transferencia de indicios biológicos
- Contaminación microbiológica
- Contaminación química

Estos pueden disminuirse o minimizarse teniendo en cuenta algunas precauciones básicas durante la recolecta de las muestras como por ejemplo; aislar y proteger lo más rápido posible la escena de delito, utilizar instrumental desechable, no añadir conservadores, dejar secar a temperatura ambiente, empaquetar cada muestra por separado, etc.

Trabajando a partir de muestras biológicas primero se debe de extraer el ADN de esta muestra y después es analizado para evaluar la cantidad de ADN recuperado.

## **Extracción de ADN**

Una muestra biológica obtenida de la escena del crimen en forma de manchas de sangre, semen, una muestra líquida de sangre de un sospechoso, o en un caso de paternidad, contiene un número de sustancias alrededor del ADN.

Las moléculas de ADN deben ser separadas de cualquier otro material celular antes de que puedan ser examinadas.

Proteínas celulares que empaquetan y protegen al ADN en todo lo que rodea la célula pueden inhibir la capacidad de analizar el ADN.

Por lo tanto los métodos de extracción de ADN han sido desarrollados para separar proteínas y otros materiales celulares de las moléculas de ADN.

Después de haber aislado el ADN de estas células, son copiadas regiones específicas con una técnica conocida como PCR.

La PCR produce millones de copias por cada molécula iniciadora de ADN y de este modo permite tener cantidades muy minuciosas de ADN para ser examinadas.

Los productos resultantes de PCR son separados y detectados con el fin de caracterizar la región STR (short tandem repeat) a examinar.

Debido a que muestras biológicas extremadamente pequeñas pueden ser usadas como evidencias, se debe poner especial atención en la contaminación cuando se identifiquen, colecten y preserven las muestras para estudios de ADN. Las muestras pueden estar contaminadas cuando el ADN de otras fuentes se mezcla con el ADN relevante relacionado con el caso. Debido a que la tecnología denominada PCR replica o copia el ADN en la muestra biológica, la introducción de contaminantes de otras fuentes puede resultar muy problemática. Para evitar este escenario, se deben tomar precauciones especiales a fin de prevenir los contaminantes que en cualquier circunstancia son indeseables. Si se recolecta una muestra biológica para estudios de ADN, el proceso de PCR copiará cualquier ADN presente en la muestra, no será posible distinguir entre el ADN del probable responsable y el ADN de otra fuente.

## **Pasos del proceso de muestras de ADN**

### **Biológica.**

El ADN es extraído primero de la fuente del material biológico y después cuantificado para evaluar la cantidad de ADN recuperado.

Después de la extracción del ADN de las células, regiones específicas son copiadas con la técnica conocida como PCR. Esta produce millones de copias de cada molécula iniciadora de ADN y esto permite examinar mínimas cantidades de ADN. Múltiples regiones STR pueden ser examinadas simultáneamente para aumentar la información del análisis.

### **Tecnológica.**

Los productos resultantes de PCR después son separados y detectados para caracterizar la región examinada de STR. Los métodos de separación utilizados hoy en día son electroforesis en capa de gel y electroforesis capilar.

Después de detectados los alelos STR, el número de repeticiones en la secuencia de ADN es determinado, por el proceso denominado genotipificación.

Cada alelo STR es distinguido de otros en la reacción de amplificación por separación basada en su longitud y color. El color resulta de una tinción fluorescente añadida durante la reacción de amplificación.

### **Genética.**

El perfil resultante de ADN de una muestra, que es una combinación de genotipos STR individuales, es comparado con otras muestras. En el caso de una investigación forense, estas muestras deben incluir información de referencia de la muestra como el de una víctima o un sospechoso que son comparados con las evidencias de la escena del crimen. En investigaciones de paternidad, el genotipo del hijo, se debe comparar con el de su madre y el alelo de su padre en investigación. Si no hay relación entre la muestra cuestionada y la conocida entonces se considera que las muestras fueron originadas de diversas fuentes.

El término para fallar la relación entre dos perfiles es “exclusión”.

### **Objetivo general:**

Comprobar si la utilización de la cinta adhesiva REMCO® en la recolecta de las muestras biológicas más comunes encontradas en la escena del crimen como sangre, saliva y semen nos permite obtener muestras viables para su análisis y determinación de un perfil genético aplicables en la investigación criminalística de casos de homicidios, violaciones, etc.

### **Objetivos particulares:**

- Utilización de tamizaje para determinar el origen de las muestras recolectadas en lugares de hechos.
- Proponer una técnica mas sencilla y segura para la recolecta de los indicios biológicos de la escena del crimen para su estudio ulterior.
- Comprobar que la técnica de recolecta de manchas hemáticas con la cinta REMCO® es efectiva, además que permite llevar a cabo la determinación de grupo sanguíneo por la técnica de adsorción elución y obtener el perfil genético del individuo.
- Aplicar técnicas para la identificación y tipificación de los indicios recolectados en el lugar de los hechos con la cinta REMCO®.
- Demostrar que la cinta REMCO® es ideal para levantar muestras de células bucales a partir de diferentes superficies para su posterior análisis en el laboratorio y la secuenciación del ADN genómico.
- Validar la recolecta de muestras seminológicas en el lugar de los hechos con la cinta REMCO®, obteniendo muestras viables para su estudio e identificación del individuo.

### **Hipótesis:**

Al emplear en el levantamiento de indicios biológicos como sangre, saliva y semen en la escena del crimen la cinta adhesiva REMCO® obtendremos una muestra protegida contra la contaminación la cual nos permitirá de forma segura realizar las pruebas en criminalística para determinar de que indicio se trata y establecer el perfil genético de cada una de ellas.

## **CAPITULO II**

### **Generalidades**

## SANGRE

### Aspectos generales.

La sangre es un tejido constituido por células, líquidos y sustancias; es el vehículo del oxígeno y de todos los elementos nutritivos necesarios para el trabajo fisiológico del cuerpo humano. La sangre arterial es de color rojo claro y la sangre venosa es de color oscuro, tiene olor *sui generis* y son ligeramente alcalinas. El medio sólido de la sangre está formado por glóbulos rojos (hematíes o eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos), plaquetas, etc.

El transporte del oxígeno se realiza por medio de los glóbulos rojos, los cuales contienen hemoglobina, la que al combinarse con el oxígeno forma la oxihemoglobina y en esta forma es conducida a todo el organismo. Los eritrocitos o glóbulos rojos están en cantidad aproximada de 4,200.000 a 5,000.000 por  $\text{mm}^3$  en las mujeres; y de 4,600.000 a 6,000.000 en los hombres. Tienen forma de disco bicóncavo, su diámetro es entre 6 y 9 micras y su vida es aproximadamente de 4 meses. Los leucocitos o glóbulos blancos son la fuerza de la seguridad del organismo, se encuentran en cantidad aproximada de 5,000 a 10,000  $\text{mm}^3$  en ambos sexos. Los leucocitos estarán presentes en donde exista una herida, infección o enfermedad, para combatir gérmenes invasores, aunque algunas veces pierdes la batalla. En la actualidad, existen antibióticos, sulfas, etc., que los refuerzan para ganar la batalla contra las enfermedades.<sup>(48)</sup>

Existen diversos elementos leucocitarios como: linfocitos, monocitos, eosinófilos, neutrofilos, mielocitos, metamielocitos, etc.

El medio líquido (suero), conduce las sustancias nutritivas a los diferentes tejidos, como son: proteínas, lípidos, carbohidratos, que son absorbidos a nivel intestinal y los conduce el plasma en forma de quilo; además recibe del hígado diferentes sustancias para ser transportadas a los órganos. También transporta sustancias de desecho que son eliminadas por medio de los riñones y del intestino.

El grupo sanguíneo o genotipo es el resultado de la unión de dos genes, uno de origen materno y otro de origen paterno. En la actualidad se dispone de sueros especiales para la investigación rápida de los grupos sanguíneos, los cuales conforme a la nomenclatura internacional, son: A, B, AB y O.

## Vínculo con la Criminalística

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

Los primeros estudios para la identificación de la sangre, surgen en el año de 1853, cuando el anatomista Ludwig Teichmann Stawlarsky de Cracovia, observa que la sangre tratada con ácido acético formaba cristales característicos a los que da el nombre de cristales hemínicos que más tarde son designados como de Teichmann; los que no se forman en presencia de metales oxidados o con sangre expuesta a más de 140° C.

La identificación de sangre en 1900, Paul Uhlenhuth perfeccionó el procedimiento del suero para distinguir la sangre humana de la animal. Un año después, Karl Landsteiner descubrió grupos sanguíneos con base en la capacidad diferenciadora del suero para conglutinar los glóbulos rojos; aunque no se trataba de una identificación positiva, este análisis servía a menudo para descartar a los sospechosos que eran inocentes<sup>(36)</sup>.

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

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

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

La sangre es el indicio de naturaleza biológica más frecuente en delitos violentos, es el indicio más valioso que puede encontrarse en el lugar de los hechos. No solamente tiene una importancia decisiva para demostrar la perpetración del crimen, sino que también aporta un sólido fundamento para la acusación, constituyendo muchas veces la única prueba plena y fehaciente que conduce inequívocamente a la sentencia del acusado por medio del estudio del ADN de las células presentes en el indicio hemático.

Entre los indicios que frecuentemente se producen durante la comisión de diversos delitos, las manchas de sangre ocupan un lugar preponderante; de ahí la importancia de

efectuar sobre esta evidencia física un estudio eficiente, que sea de verdadera utilidad para el esclarecimiento de los hechos que se investigan.

Por otro lado, en la actitud de defensa, el criminal, la más de las veces, negaba que las manchas encontradas en su ropa fueran de sangre. Ahora bien, en caso de aceptarlo, argumentaba que las manchas no eran de sangre humana, sino de cualquier otra especie animal, ante tales aberraciones, los criminalistas se quedaban con los brazos cruzados, pues, no existían técnicas confiables que dilucidaran tales cuestiones.

Son cuatro los puntos cardinales que encierra esta problemática:

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

Rastreo Hemático.

En el rastreo hematológico que se efectúa en el lugar de los hechos, se debe observar con sumo cuidado, pues existen algunas manchas que son visibles a simple vista, pero hay otras que no lo son, y para dar luz a lo anterior, se realiza una revisión o inspección metódica del sitio:

- a) Utilizando primero el auxilio de la luz artificial, proyectada en forma rasante u oblicua a la superficie por observar, y de ser posible con la ayuda de filtros coloreados que permiten aumentar el contraste entre la mancha y el soporte.
- b) También se puede utilizar la luz ultravioleta en completa oscuridad, que brinda mejores ventajas para efectuar un rastro hemático o de otro tipo de manchas.
- c) El color del soporte donde se encuentra la mancha huella de sangre, facilita o dificulta su localización.

La sangre en el lugar de los hechos.

En el lugar de los hechos, la cantidad y características de la sangre que se observe alrededor de la víctima, pueden indicar el tiempo probable que sobrevivió después de haber sido lesionado, y se debe tener cuidado con lo siguiente:

- a) Algunas lesiones por su ubicación y por la posición del cuerpo, pueden ser tales que la acción de la gravedad haga que la sangre siga emanando hasta acumularse en gran cantidad sobre el piso o soporte que reciba la víctima, interviniendo en algunos casos el declive del piso.

- b) Se debe observar también que la sangre ante mortem se coagula entre 5 y 8 minutos después de expuesta fuera del cuerpo humano, y no así la de postmortem que expuesta al exterior no origina el proceso de coagulación.
- c) La forma, dirección y estado de la huella de sangre originadas ya sea por goteo dinámico, estático, salpicaduras, etc., pueden indicar si la víctima efectuó movimientos o desplazamientos después de haber sufrido lesiones; también si existió lucha y forcejeo; si fue desplazada la víctima de un lugar a otro ya sin vida; si la posición del cadáver corresponde a la original después de la muerte; o si existió probable sobrevivencia cuya atención médica hubiera salvado la vida, esto en caso de que las lesiones no fueran mortales por necesidad.

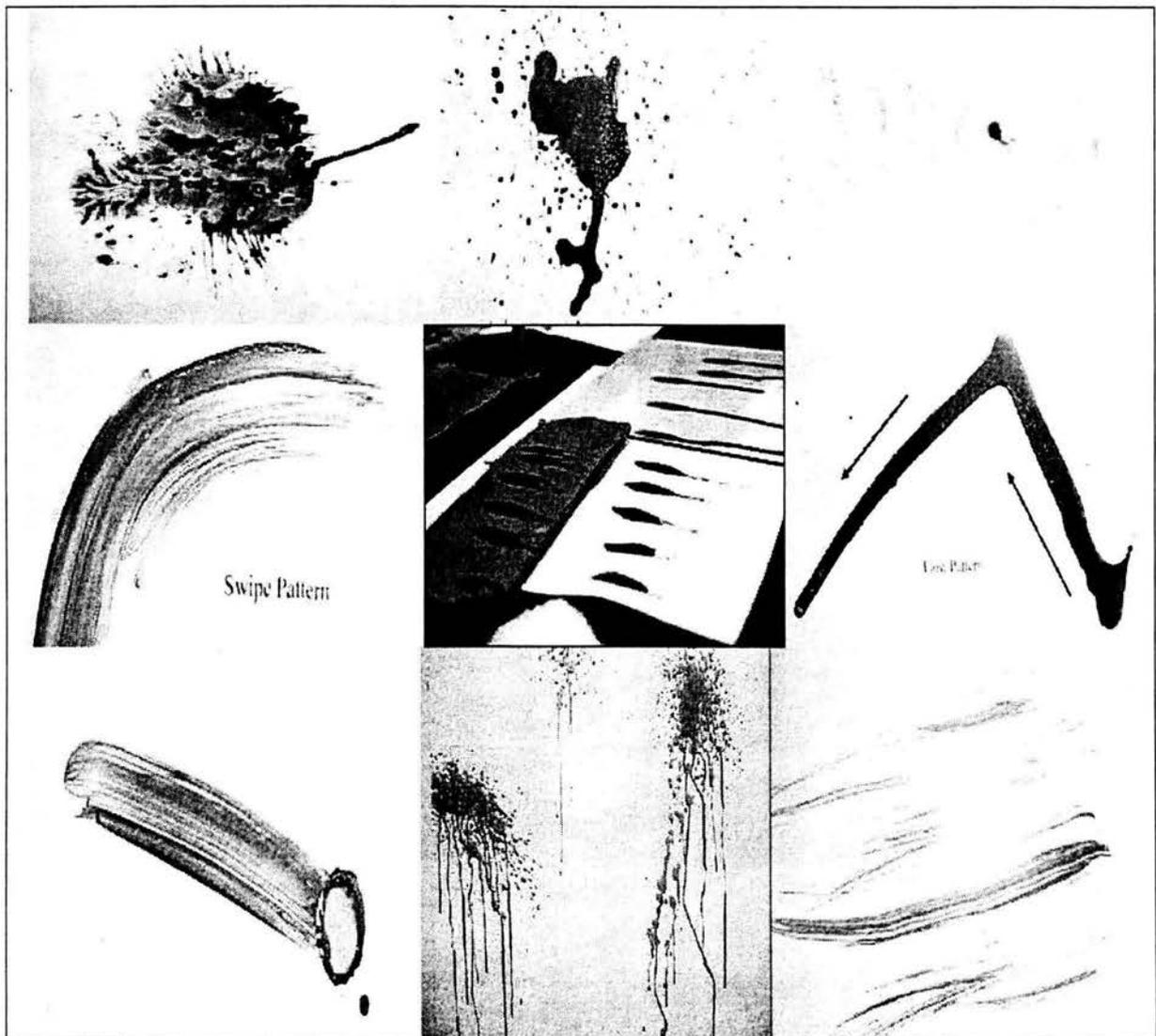


Figura 2. Diversas huellas de sangre originadas en la escena del crimen. <sup>(51)</sup>

### Características morfológicas en huellas de sangre.

Las formas y figuras de las huellas de sangre caídas sobre soportes desde diferentes alturas pueden variar en tamaño y características morfológicas, debido a la cantidad, calidad, origen, dimensión de la lesión en profundidad y longitud, en el espacio durante su caída y características del soporte que la reciba.

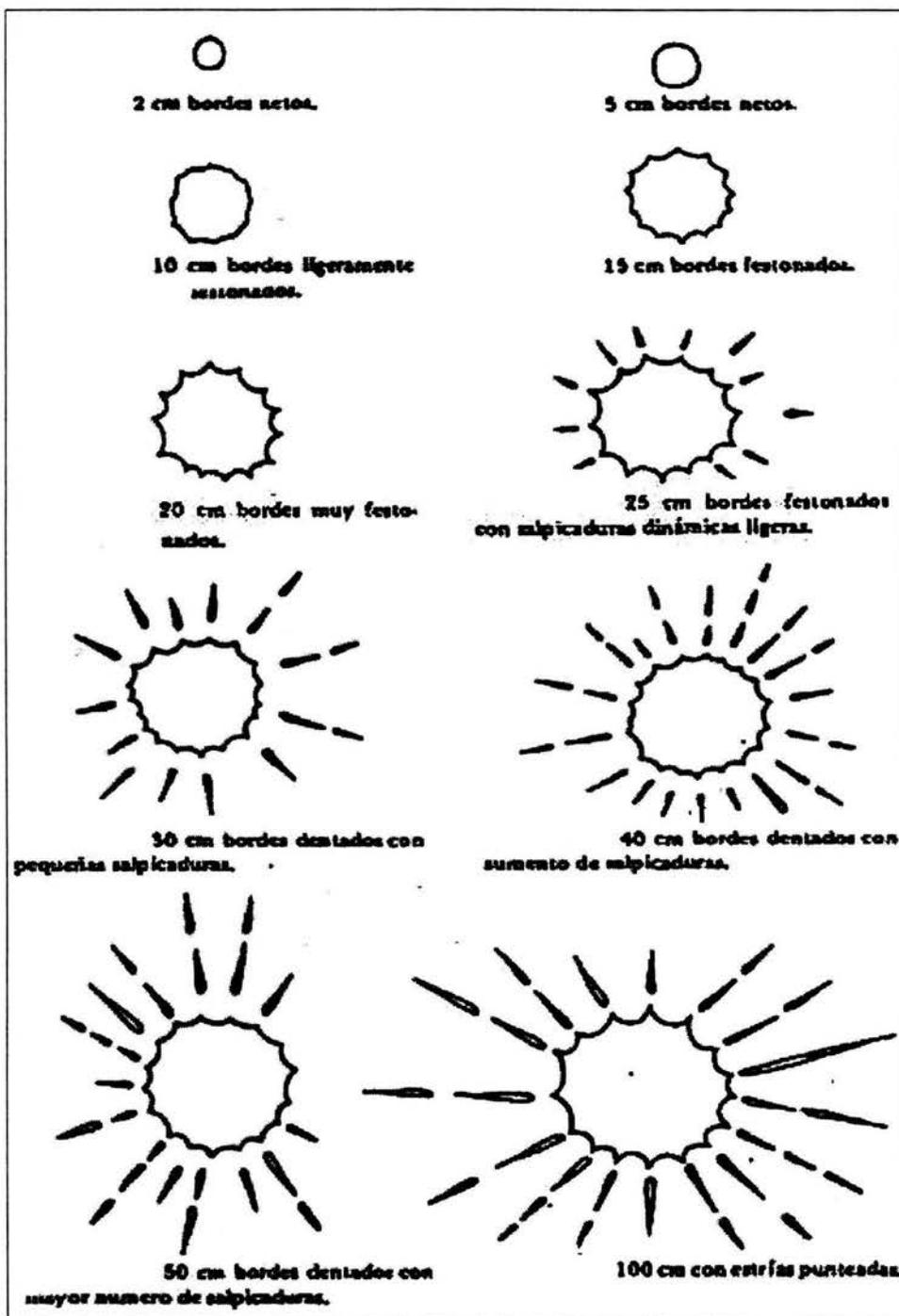


Figura 3. Huellas estáticas. <sup>(25)</sup>

- Las huellas de sangre que gotean sobre un plano inclinado sin que la persona tenga movimiento, se presentan ovals y alargadas con escurrimientos largos en la parte inferior, depende del ángulo de inclinación del soporte que sea menor o mayor. También estáticas.

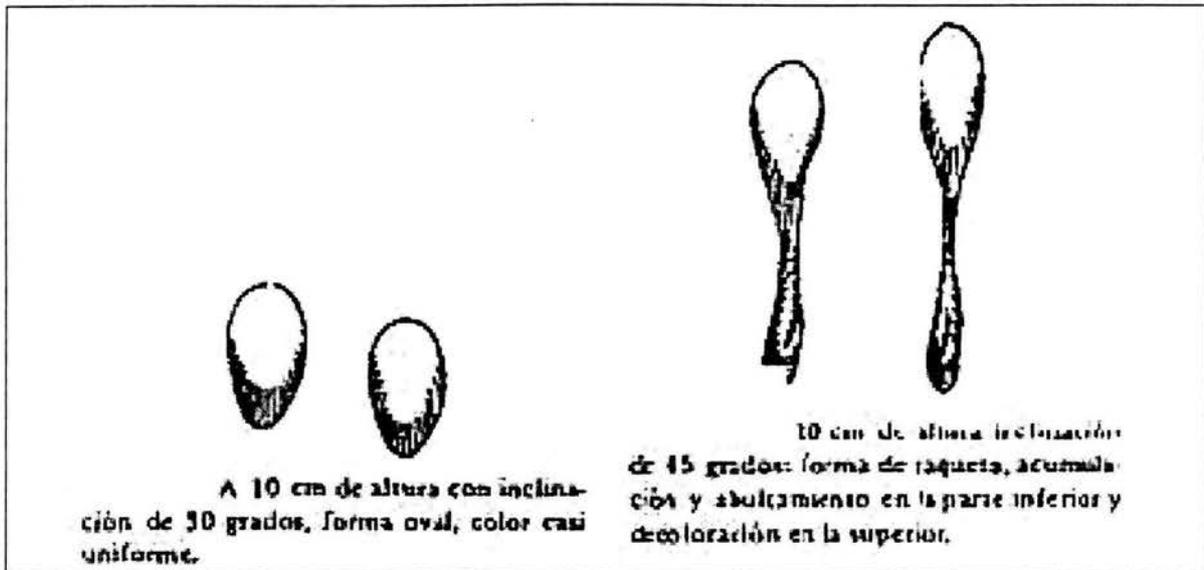


Figura 4. Manchas de sangre a diferentes alturas <sup>(25)</sup>

- Las huellas de sangre que caen sobre un plano horizontal y que están animadas de movimiento lento, se presentan con estrías en uno de sus lados que indican la dirección del movimiento.

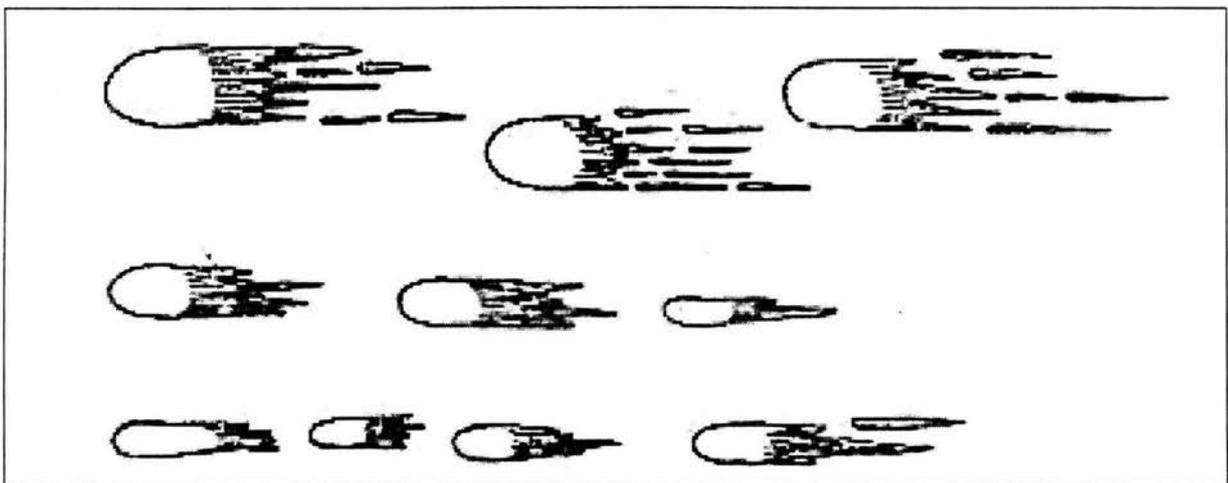


Figura 5. Huellas de sangre animadas de movimiento lento. <sup>(25)</sup>

- Las huellas de sangre que caen sobre un plano horizontal y que están animadas por un movimiento rápido, se presentan con una forma de lagrima, con una sola estría o alargamiento, que indica la dirección del movimiento:

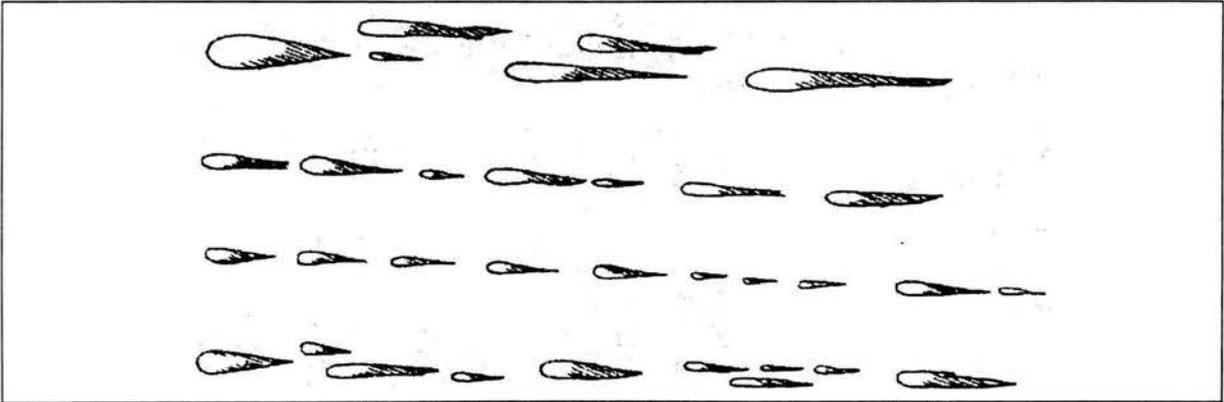


Figura 6. Huellas de sangre animadas de movimiento rápido. <sup>(25)</sup>

- Las huellas de sangre producidas por un goteo ininterrumpido sobre un plano horizontal presentan un rastro de sangre en forma de franja desplazándose estrías en los lados que según su dirección indican el movimiento; es generalmente poco ancha según la cantidad de sangre.



Figura 7. Huella sanguínea de goteo ininterrumpido <sup>(25)</sup>

- Las huellas de sangre proyectadas directamente sobre los muros o paredes presentan forma alargada con salpicaduras laterales y cuando la gota de sangre es abundante se manifiesta un escurrimiento con acumulaciones en la parte inferior y una decoloración en la parte superior. Se llama dinámicas.

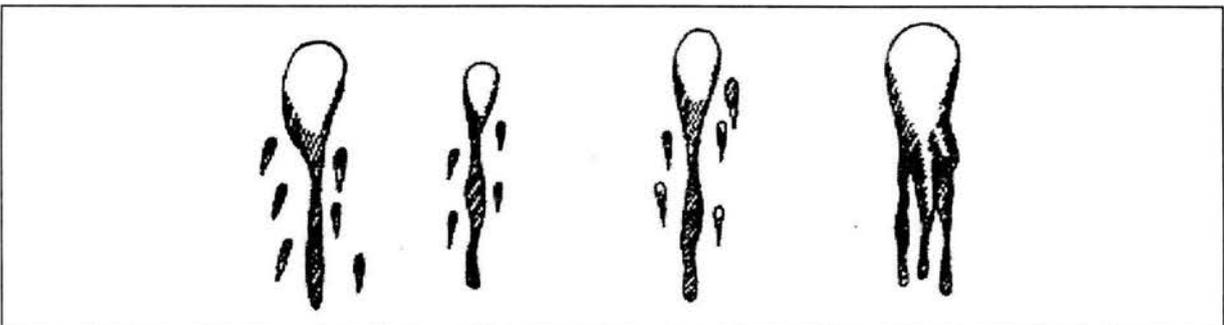


Figura 8. Huellas de sangre comúnmente encontradas en muros y paredes. <sup>(25)</sup>

- Las huellas de sangre sobre muros o paredes originadas por salpicaduras o chisquetes que provienen de pulsaciones del corazón se proyectan con fuerza y son diversiformes, y no sucede así con la sangre venosa cuyos vasos no contienen fuerza. Se les llama dinámicas

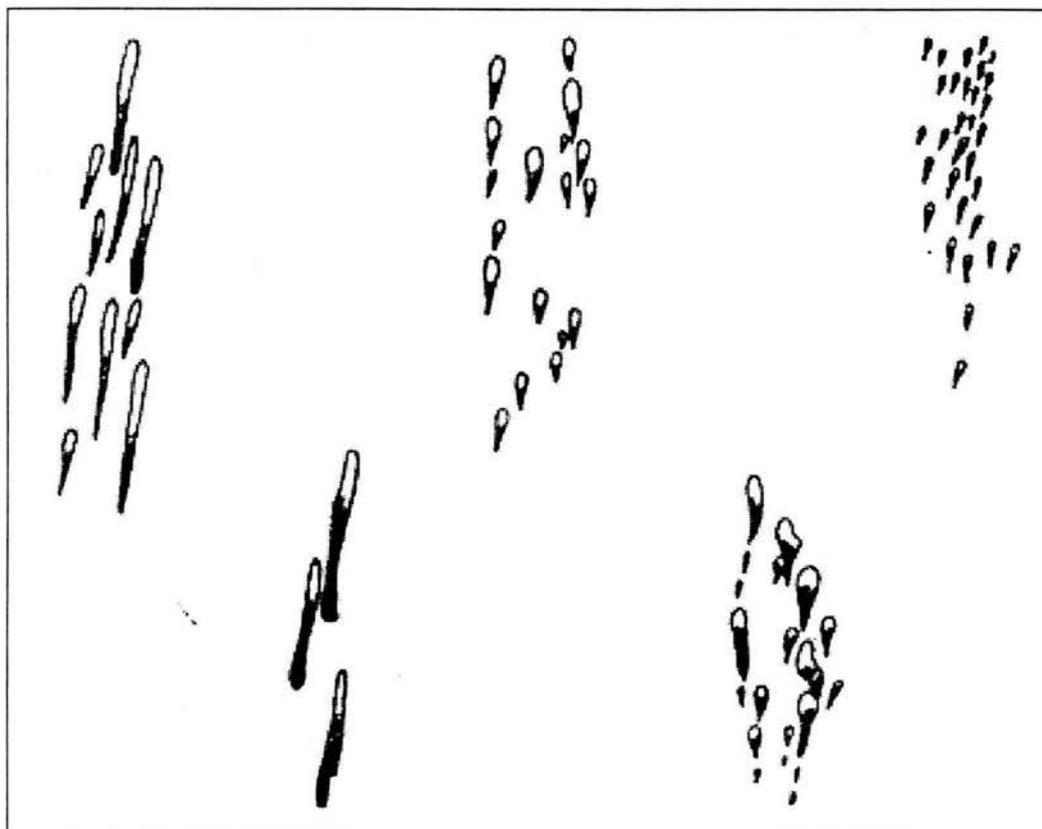


Figura 9. Dinámica del goteo sanguíneo. <sup>(25)</sup>

Tradicionalmente, las manchas hemáticas son recuperadas del lugar de los hechos por medio del uso de hisopos o telas que son humedecidos con solución salina estéril, mismos que son colocados en sobres de papel o bolsas de plástico que son selladas y posteriormente, estos indicios son transportados al laboratorio para su análisis. Este procedimiento conlleva riesgos de contaminación, pérdida y deterioro del indicio. Si el hisopo o tela se introducen en el sobre cuando todavía se encuentran húmedos, el indicio puede transferirse a la superficie del papel y disminuir de manera importante en el medio en el que fue recuperado. Cuando el indicio se coloca dentro de una bolsa de plástico sin haber permitido que se seque, las bacterias que crecen en condiciones anaerobias y aerobias provocarán el deterioro del ADN. Mención importante merece el hecho de que la solución salina cuando no es adecuadamente envasada presenta el riesgo de contaminarse y consecuentemente contaminar el indicio con otra fuente de material biológico.

## SEMEN

### Aspectos generales <sup>(48)</sup>

El semen es una mezcla de espermatozoides y de las secreciones de las vesículas seminales, la próstata y las glándulas de Cowper. El volumen medio de semen en una eyaculación es de 2.5 a 5 mL.

Usualmente tiene un color blanco amarillento pero puede ser pardo con pigmentos de hematina, tiende a amarillo verdoso cuando pasa el tiempo.

El semen total es un líquido muy viscoso y opalescente, con una densidad de 1.028. Su pH varía entre 7.35 y 7.8; sus amortiguadores, fosfato y bicarbonato, contribuyen a proteger los espermatozoides contra el pH vaginal.

Consta de dos elementos distintos:

Las células o espermatozoides

El plasma seminal

El plasma seminal sirve como soporte, vehículo y medio de nutrición y de estabilización al espermatozoide.

#### Composición del plasma seminal:

Glúcidos: fructosa, ribosa, inositol y sorbitol

Compuestos nitrogenados: flavinas, gran concentración de aminoácidos libres, aminas (espermina, colina, y etanolamina), ergotioneina.

Antigénicas: albúmina, alfa-globulinas (fosfatasa ácida y glicoproteína), betaglobulinas (siderofilina) y gammaglobulina.

Enzimáticas: Fibrinolisisina, aminooxidasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y 5-nucleotidasa.

Lípidos: lecitinas y ácidos grasos (prostaglandidas), fosforilcolina.

Minerales: zinc y calcio.

#### Elementos celulares:

Clásicamente, las células características del líquido celular son los espermatozoides, sin embargo el cuadro celular de una eyaculación es mucho más complejo, ya que presenta: células gigantes, células de Sertoli, células epiteliales, leucocitos, células prostáticas, cilindros testiculares y bacterias.

## Espermatozoide.

El espermatozoide humano se encuentra entre las células más pequeñas del organismo; su longitud es de 0.04 a 0.06 mm, tiene forma de un filamento en el que se distinguen tres partes: cabeza, zona intermedia y cola.

La cabeza mide de 3 a 4 micras de longitud, por 2 ó 3 micras de anchura, tiene forma piniforme. Y la cola mide de 0.03 a 0.05 mm de longitud por 0.01 mm de grosor aproximadamente.

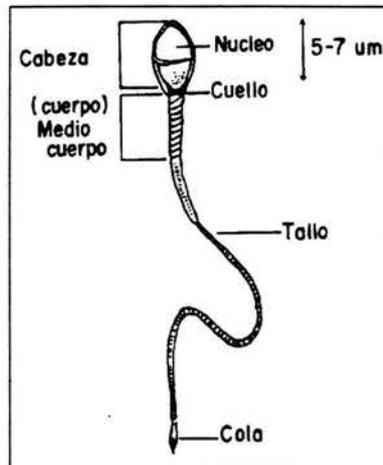


Figura 10. Espermatozoide humano <sup>(11)</sup>

## Importancia en la criminalística

Entre las huellas que pueden resultar de la comisión de un delito contra la honestidad (abusos deshonestos, violación, estupro) y de algunos delitos de escándalo público, figuran las manchas de esperma, como testimonio acusador irrefutable y prueba importante en los delitos.

El estudio del esperma además de lo ya comentado, también es un medio de prueba categórico en causas civiles y penales en las que la impotencia juega un papel decisivo. Acusaciones falsas de violación y de estupro, en el campo penal; impotencia como causa de nulidad matrimonial, caso de disputa de paternidad, etc., en el campo civil.

Las manchas de semen siguen en importancia a las de sangre, ya que se encuentran con frecuencia en delitos sexuales, incluyendo las relaciones entre individuos de sexo masculino. Se encuentran también en lugares de hechos en masturbaciones previas a la realización de algún hecho.

Aparecen constantemente en sábanas, camas, toallas, papel sanitario, pañuelos, pantaletas, braguetas de pantalón, pisos, tazas sanitarias, etc., así como en asientos de automóviles, y directamente sobre la piel de las víctimas o en la vagina, recto o pelos del pubis.

## Rastreo

Es necesario observar con gran cautela para conocer si existe alguna marca de semen visible o invisible, en general estas manchas se aprecian por el color característico blanco semitransparente y de aspecto grumoso cuando son frescas y de color ligeramente amarillo y textura endurecida cuando no son muy recientes, dando una apariencia almidonada al tacto.

Tradicionalmente para la recolección de muestra, es necesario que el observador de campo lleve en su maletín de trabajo:

Tubos de ensaye de 15 cm de largo, hisopos hechos en aplicadores de madera estériles, laminillas portaobjetos y ampollitas de solución salina estéril.

La búsqueda de muestra de semen sobre el cuerpo de la víctima se puede enfocar principalmente en las zonas cercanas a la cadera y en la parte interior de las piernas.

## SALIVA

### Aspectos generales <sup>(48)</sup>

La saliva es un líquido secretado de forma continua en la boca. Normalmente, se secreta la cantidad suficiente de saliva para mantener húmedas las membranas mucosas de la boca y la faringe.

Las glándulas bucales y las glándulas salivales menores secretan pequeñas cantidades de saliva. Sin embargo la mayor parte de la saliva es secretada por las glándulas salivales.

### Composición de la Saliva.

Desde el punto de vista químico, la saliva es un 99.5 % de agua y un 0.5 % de solutos. Entre los solutos existen iones, tales como sodio, potasio, cloruro, bicarbonato y fosfatos. También están presentes algunos gases disueltos y diversas sustancias orgánicas como urea y ácido úrico, globulina y albúmina sérica, mucina, la enzima bacteriolítica lisozima y la enzima digestiva amilasa salival.

Cada glándula productora de saliva secreta diferentes proporciones de ingredientes a la saliva. Las glándulas parótidas están formadas por células que secretan un líquido seroso acuoso que contiene amilasa salival. Las glándulas submandibulares están constituidas por células similares a las existentes en las glándulas parótidas y por algunas células mucosas. Por consiguiente, secretan un líquido espeso con moco pero que todavía contiene bastante enzima. Las glándulas sublinguales están formadas principalmente por células mucosas, por lo que secretan un líquido mucho más espeso que solo aporta una pequeña parte de amilasa a la saliva.

El agua presente en la saliva proporciona un medio para la disolución de los alimentos, de forma que puedan ser saboreados, y para el inicio de las reacciones digestivas.

Los iones de cloruro presentes en la saliva activan la amilasa salival. Los iones bicarbonato y fosfato neutralizan los alimentos ácidos que entran en la boca. Como resultado, la saliva es solo ligeramente ácida (pH de 6.35 a 6.85).

### Funciones de la saliva

El proceso digestivo es necesario para que el cuerpo pueda utilizar los nutrientes. Tiene lugar en el tracto buco-gastro-intestinal y es posible gracias a la actuación de enzimas hidrolíticas que actúan sobre los componentes de la dieta. La primera de ellas es la  $\alpha$ -amilasa salival, que degrada el almidón a una mezcla de hidratos de carbono más sencillos (según el nivel de actividad y el tiempo de actuación, pueden llegar a maltosa e incluso glucosa libre) y un resto, inatacable por ella, llamado dextrina límite.

El contenido en  $\alpha$ -amilasa en saliva es variable, y puede ir desde 0 a 3 mg/ml, puesto que algunas personas no poseen esta actividad, sin que ello suponga ningún problema para ellos si disponen de niveles adecuados de  $\alpha$ -amilasa pancreática.

Sus funciones se pueden resumir en: solubilización del alimento seco, formación del bolo alimenticio, lubricación, enzimático (amilasa), función amortiguadora e higiene oral.

### **Enfoque criminalístico**

Desafortunadamente, cada día es mayor el número de delitos contra el pudor cometidos en las grandes urbes; por lo que ha sido necesario crear oficinas y laboratorios especiales para atender este tipo de delitos.

### **Rastreo**

#### Elementos considerados en la investigación criminal.

Amilasa Salival

Morfología de las Células Epiteliales

Antígenos secretores.

Las marcas de mordidas como evidencias son comúnmente encontradas en crímenes violentos. Debido a las dificultades de comparación física de la dentadura del sospechoso por los sitios en que se encuentran estas marcas como piel elástica y curvada, los criminalistas han considerado utilizar el ADN de la saliva como evidencia para identificar al perpetrador.

La cantidad de saliva depositada en la piel durante una mordida es comúnmente muy pequeña. Es necesario utilizar métodos de colección que permitan recolectar la mayor cantidad del fluido a partir de la piel.

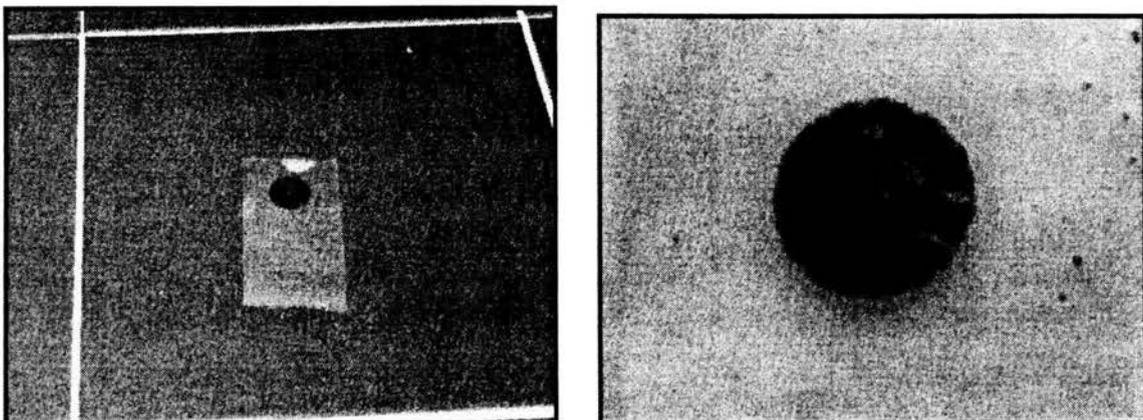
## **CAPITULO III**

### **METODOLOGÍAS**

## Metodología para Sangre.

### Procedimiento de levantamiento de manchas hemáticas con la cinta REMCO®.

- Se colocó la muestra biológica (sangre por goteo), sobre diferentes superficies (loza, madera, aluminio, vidrio, concreto, etc.) simulando diversas escenas del crimen en las que se pudieran encontrar manchas de sangre.
- Se dejó secar la muestra en diferentes condiciones ambientales para comparar la degradación del material genético.
- Se procedió a levantar los indicios biológicos de la siguiente manera:
  - Se aísla y protege lo más rápido posible la escena del crimen.
  - Se identifican las manchas que pudieran ser muestras de algún vestigio biológico.
  - Se cortó un pedazo del material sugerido (cinta adhesiva) suficiente para recoger la muestra manipulando la cinta con guantes de látex colocados correctamente.
  - Se intentó recoger la muestra con la cinta de tal manera que se logre levantar la gota completa.
  - En caso de no lograrse se raspó con una hoja de bisturí nueva con cuidado de no esparcir o perder parte de la muestra y se coloca la cinta sobre el polvo resultante.
  - Una vez adherida la muestra a nuestro material de recolecta, se dobla de tal manera que se logre cubrir la muestra y así protegerla de los factores que pudieran afectarla.
  - Se etiquetó debidamente y se colocó dentro de un sobre de papel etiquetado.
- Se dejó la muestra en este material y en condiciones ambientales para observar que tan fácilmente se degrada el material recogido.



**Figura 11.** Fotos del levantamiento de sangre con la cinta REMCO®. Del lado izquierdo cinta REMCO® sobre mancha hemática en superficie de loza y a la derecha gota levantada del lugar de los hechos.

## Técnicas de Orientación para identificación de Sangre.

### Técnica de la Bencidina o de Adler.

#### Fundamento Químico.

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



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

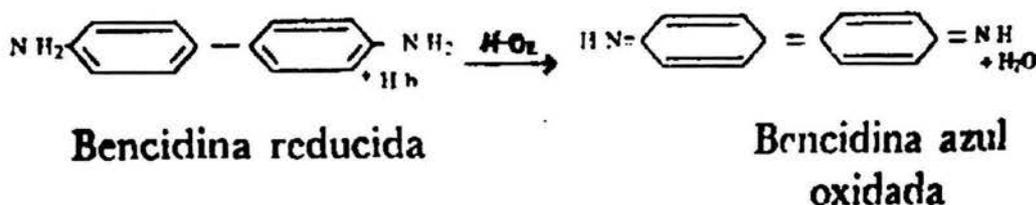


Figura 12. Oxidación-reducción de la bencidina. <sup>(11)</sup>

La oxidación de la bencidina se utiliza como prueba presuntiva para la identificación de sangre. La técnica tiene sensibilidad de 1, 300,000 a 500,000 mm<sup>3</sup>.

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

Sustancias que dan falsos positivos en la técnica de Bencidina <sup>(11)</sup>		
PLANTAS	PRODUCTOS BIOLÓGICOS	OTRAS
Manzanas	Médula ósea	Herrumbre
Espárragos	Leucocitos	Formol
Frijol	Tejido cerebral	Estiércol
Acelgas	Líquido espinal	Sulfato de cobre
Zarzamora	Intestino	Dicromatos
Alcachofa	Hígado	Permanganato de potasio
Papa	Pulmón	Algunos blanqueadores
Nabo	Saliva	
	Moco	
	Pus	

### Procedimiento.<sup>(11)</sup>

Humedecer un hisopo con H<sub>2</sub>O destilada y frotarlo sobre la mancha problema.

Añadir al hisopo 1 ó 2 gotas de solución de bencidina, después de unos momentos observar que no dé coloración con ésta, poner la misma cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el hisopo.

En caso positivo aparecerá rápidamente una coloración azul.

### **Técnica de la Fenoftaleína o de Kastle-Mayer.**

#### Fundamento.

Esencialmente la rige el mismo principio que se aplica en la reacción de Adler:

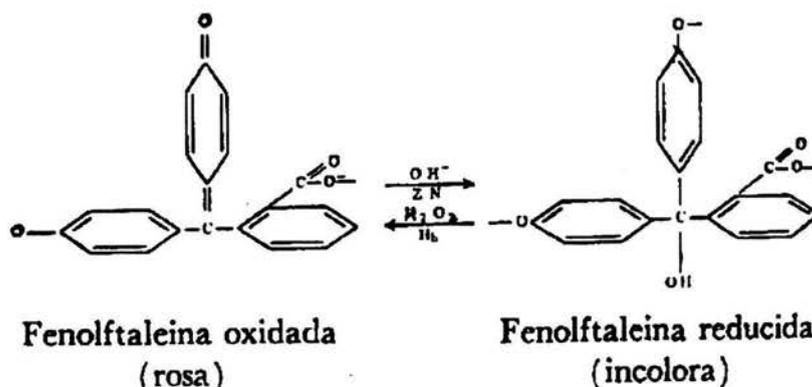


Figura 13. Reacción de Oxidación reducción de la Fenolftaleína<sup>(11)</sup>

La diferencia estriba en que:

- a) Previamente la fenolftaleína debe ser reducida a fenolftaleína (incolora) y este reactivo, por su labilidad, debe ser guardado en refrigeración en frascos ámbar.
- b) Se trabaja en medio alcalino en vez de medio ácido.
- c) Se efectuará un calentamiento previo a 100° C durante un minuto.

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

#### Termolabilidad.

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

#### Tiempo.

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

#### pH.

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

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

#### Procedimiento.

Se humedeció un hisopo con solución salina con el cual se frotó la muestra problema y se paso a un tubo de ensayo con 1 mL. de la misma solución, se calentó un minuto a 100° C, añadir unas gotas de reactivo, se esperaron unos segundos y se agregó agua oxigenada.

En los casos positivos se obtuvo una coloración rosa brillante.



**Figura 14.** Fotografía de control positivo (hisopo con muestra hemática) observándose una clara coloración rosa brillante.

Validación de la técnica de Kastle - Mayer en muestras levantadas con la cinta REMCO®.

Se utilizaron como controles positivos, muestras de manchas hemáticas levantadas de manera tradicional (con hisopo humedecido en solución salina) y como control negativo se colocó un fragmento de cinta REMCO® sin muestra.

A las muestras levantadas con la cinta REMCO® se les realizó esta prueba de orientación de la manera tradicional cambiando únicamente en el sentido de que se inicia a partir de un fragmento de la cinta con una mancha hemática recogida del lugar de los hechos y se colocó en un tubo de ensaye con 1 mL. de solución salina. Posteriormente se calentó un minuto a 100° C y se le añadieron unas gotas de reactivo. Después de unos segundos se agregó agua oxigenada. El control negativo se trató de la misma manera.

El control positivo, se trabajó de manera tradicional.

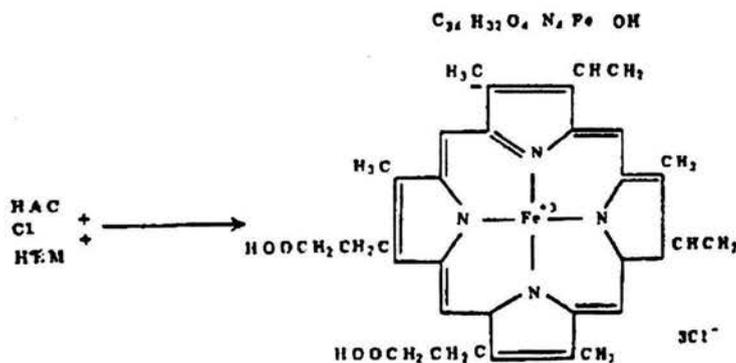
**Técnicas de Confirmación.** <sup>(11)</sup>

**Cristales de Hemina o de Teichmann.**

Fundamento Químico.

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

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



**Cloruro de ferriprotoporfirina (hemina)**

Figura 15. Cristales de Teichmann <sup>(11)</sup>

### Procedimiento.

1. Colocar la muestra problema en el centro de una laminilla de vidrio y calentar a sequedad a temperatura baja.
  2. Poner encima de ella un cubreobjetos.
  3. Deslizar entre laminilla y laminilla, por capilaridad, unas gotas de reactivo de Teichmann.
  4. Calentar lentamente y a baja temperatura la laminilla hasta evaporación.
  5. Dejar enfriar y observar al microscopio.
- En caso positivo se observarán cristales romboidales de color café oscuro.



Figura 16. Fotografía de los Cristales de Teichmann (romboidales de color café oscuro).

Validación de la técnica de Cristales de Hemina o de Teichmann en muestras levantadas con la cinta REMCO®.

- Las muestras levantadas con la cinta REMCO® se trabajaron de la siguiente manera:
  - Se cortó un fragmento de la cinta con la muestra
  - Se colocó este fragmento en un tubo de 1.7 mL. con 0.5 mL de agua inyectable y agitar en vórtex por 3 minutos.
  - Se dejó reposar por 20 minutos para permitir que se libere la muestra
  - Se colocó una gota de esta solución en un portaobjetos y se llevó a cabo la técnica de manera tradicional.

### Determinación de grupo sanguíneo. <sup>(11)</sup>

#### **Técnica de adsorción – elución.**

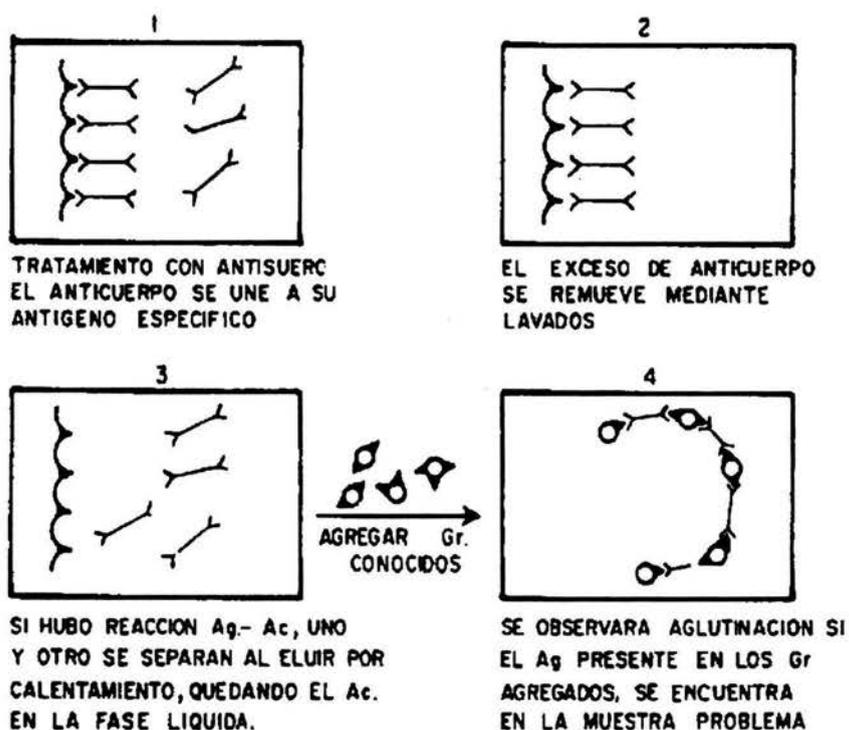
En muestras de sangre fresca, la determinación del grupo sanguíneo es más simple ya que se reduce a poner en evidencia la presencia de los antígenos presentes en los glóbulos rojos mediante reacciones de aglutinación con antisueros específicos.

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

La técnica de adsorción elución es actualmente la más satisfactoria para la determinación de grupo del sistema ABO en manchas de sangre seca.

### Fundamento Químico.

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



**Figura 17.** Esquema del procedimiento y fundamento de la reacción de Adsorción elución para determinación de grupo sanguíneo en manchas de sangre seca. <sup>(11)</sup>

## Procedimiento

- Cortar un fragmento de la tela con la mancha hemática levantada y colocarla en tubos de ensaye correctamente etiquetados.
- Agregar metanol y dejar incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente para fijarla.
- Colocar a secar las manchas alcoholizadas sobre una placa de vidrio con la ayuda de calor generado por una lámpara.
- Una vez secadas las manchas, se colocan en tubos de ensaye por duplicado y se les agrega el antisuero respectivo de la siguiente manera:

1 y 3 muestras  
4 y 7 testigos A  
5 y 8 testigos B  
6 y 9 testigos AB

<b>Anti A</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>Anti B</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>

- Forzar la adsorción con ayuda de un aplicador de madera girando y apretando la muestra.
- Dejar 24 horas adsorbiendo a 4° C
- Dar dos lavados con solución salina isotónica fría (2 mL cada lavado)
- Dar un lavado con solución salina isotónica fría (1 mL) dejando en el tubo solución salina cubriendo la muestra.
- Incubar a 56° C durante 15 minutos.
- Sacar la muestra del tubo y agregar 2 ó 3 gotas de eritrocitos al 2 % A o B dependiendo del tubo que corresponda el antisuero.
- Centrifugar durante 30 minutos.
  
- Interpretación:  
Agitar los tubos uno por uno observando si continúa o se diluye el botón precipitado.

### **Validación de la técnica Adsorción - elución para determinación de grupo sanguíneo en muestras levantadas con la cinta REMCO®.**

Se realizó la técnica de Adsorción elución de manera tradicional a fragmentos cortados de muestras levantadas con la cinta REMCO®.

Como controles y/o testigos, se utilizaron manchas hemáticas sobre tela de grupo sanguíneo conocido y se trabajaron de la misma manera y al mismo tiempo con las muestras de la cinta

## Técnicas de determinación del origen de la sangre.

### **Reacción de Precipitinas <sup>(11)</sup>**

Descubierta en 1900 por Uhlenhuth para determinar si es sangre de origen humano.

#### Fundamento

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

Esta reacción antígeno-anticuerpo está influida por varias fuerzas interactuando entre factores reaccionantes como son: las fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacción de dipolos, atracción entre los antígenos no polares y la superficie del anticuerpo, y la atracción electrostática.

La reacción misma tiene lugar en varias etapas. Inicialmente se forma un complejo antígeno-anticuerpo soluble; conforme la reacción prosigue, ese complejo empieza a formar una red compuesta de moléculas de anticuerpo bivalente y moléculas de antígeno polivalente. Esta formación crece rápidamente formando partículas del tamaño suficiente como para ser insolubles y formar un precipitado visible.

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

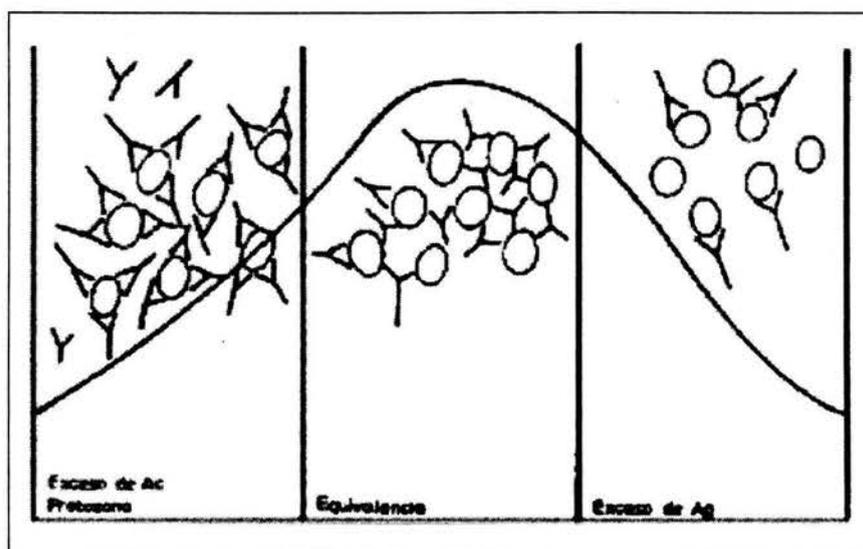


Figura 18. Curva de comportamiento de la reacción antígeno anticuerpo en función de la concentración de ambos. <sup>(52)</sup>

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

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

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

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

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

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

Algunos investigadores han observado falsas reacciones positivas debido a la presencia de sales de sodio o sulfonatos que contienen los polvos para lavado.

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

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

#### Procedimiento.

- Cortar un pequeño fragmento de la mancha de sangre y colocarlo en un tubo de ensaye.
- Agregar unas gotas de solución salina
- Si la solución es turbia se debe centrifugar y utilizar el sobrenadante.
- Colocar dos gotas del extracto diluido en un capilar
- Agregar una cantidad igual de antisuero absorbiéndolo en el mismo capilar de tal manera que quede abajo del extracto de la muestra
- Fijar el tubo de manera perpendicular sobre un soporte.
- La observación se hace con luz indirecta y sobre fondo oscuro.

La aparición de un anillo de precipitación en la interfase de los dos líquidos indica reacción positiva.

### Recomendaciones.

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

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

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

### **Metodología:**

A partir de muestras sanguíneas recuperadas con un hisopo se procedió de la siguiente manera:

- Se colocó el hisopo en un tubo con 1 mL de solución salina
- Se agitó en vórtex por 2 minutos
- A partir de esta solución se realizaron diluciones para encontrar la dilución óptima para la reacción de precipitación en capilar con el antisuero.
  - Se trabajaron dos diluciones a partir del concentrado (1:10 y 1:100)
- En un capilar se colocó aproximadamente 30  $\mu$ L de las diluciones por separado
- Se agregó la misma cantidad en cada capilar de antisuero (anti humano)
- Se colocó los capilares en una base de plastilina fija para poder observar los anillos de precipitación a contraluz
- Como control negativo se trabajó con solución salina y se procesó de igual manera.

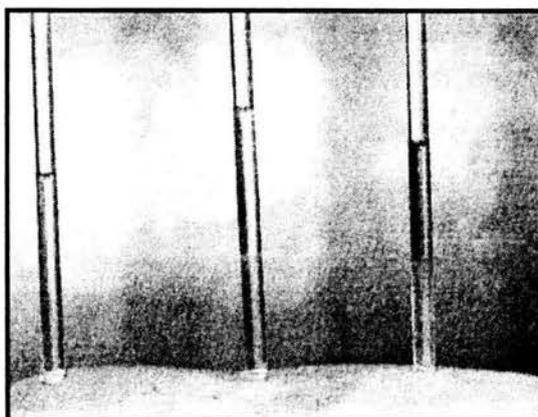


Figura 19. Fotografía de la Reacción de precipitinas. A la izquierda control negativo, en el centro dilución 1:1000 de la muestra, y a la derecha la muestra diluida 1:100.

## Validación de la Reacción de precipitinas con muestras levantadas con la cinta REMCO®.

Con las muestras levantadas con la cinta REMCO®:

- Se cortó un fragmento de la cinta aproximadamente de 0.5 x 0.5 cm que presuntamente contiene sangre humana
- Se cortó este fragmento en pedazos mas pequeños para aumentar la superficie de contacto
- Se colocó estos fragmentos en un tubo de 1.7 mL. con 1 mL. de solución salina inyectable
- Se agitó en vórtex por 3 minutos y se dejó reposar durante 20 minutos más.
- Se tomaron 30 µL de la solución obtenida y se colocaron en el capilar
- Se agregó al capilar la misma cantidad de antisuero y se colocó en una base fija para observar la precipitación.
- El control negativo se trabajó con un fragmento de cinta adhesiva sin muestra, cortada en pedazos más pequeños y de igual manera que las muestras con sangre fue trabajada.

## **Tipificación (individualización ADN)** <sup>(6)</sup>

La incorporación de técnicas de biología molecular en los laboratorios criminalísticos ha resultado, en un porcentaje creciente notorio, en la identificación de criminales y en la exoneración de inocentes.

El arribo de la tecnología del ADN ha aumentado la habilidad de efectuar análisis de identidad humana. La identificación individual es deseada en gran número de situaciones incluyendo la determinación de perpetradores de actos violentos como homicidios y violaciones, resolviendo casos de paternidad no establecida, y en la identificación de restos de personas desaparecidas o víctimas de desastres masivos.

El Dr. Jeffreys encontró que ciertas regiones del ADN contienen secuencias que son repetidas una y otra vez una tras otra. El también descubrió que el número de secciones repetidas presentes en una muestra pueden distinguir entre un sujeto y otro.

Con el desarrollo de una técnica que examine la longitud de variación de la repetición de éstas secuencias, el Dr. Jeffreys creó la habilidad para el desarrollo de análisis para la identificación de humanos.

Estas regiones repetidas de ADN fueron conocidas como VNTR's. La técnica usada por el Dr. Jeffreys para examinar los VNTR's fue llamada RFLP por que esta envolvía el uso de una enzima de restricción para cortar las regiones de ADN circundantes a los VNTR's. Este método fue utilizado por primera vez para ayudar en un caso de inmigración y luego, en breve para resolver un caso de doble homicidio.

La tecnología utilizada para el desarrollo de análisis criminalísticos y forenses de ADN se distinguen en su habilidad de diferenciar dos sujetos y en la velocidad con la que pueda obtenerse resultados. La velocidad de análisis se ha mejorado dramáticamente para los análisis forenses de ADN. Los estudios de ADN previos que tomaban de 6 a 8 semanas ahora pueden ser desarrollados en unas cuantas horas.

La comunidad de científicos dedicados a la identificación con estas pruebas, han usado una variedad de técnicas incluyendo las pruebas de locus individual, y multi – locus, métodos de RFLP y mas recientemente la PCR. Numerosos avances se han hecho en los últimos 15 años en cuanto al procesamiento de las muestras y la sensibilidad de las técnicas. En lugar de requerir grandes manchas de sangre con ADN bien preservado, mínimas cantidades de muestra, tan pequeñas como una sola célula, en algunos casos, pueden producir un perfil de ADN útil.

La determinación del grupo sanguíneo AB0, que fue la primera herramienta genética utilizada para distinguir entre dos sujetos, puede ser desarrollada en pocos minutos pero no es muy informativa. Debido a que solo hay cuatro posibles grupos genotípicos – A, B, AB y 0 – y el 40% de la población es igual. Por esto, los grupos sanguíneos AB0 son útiles para excluir a un individuo de ser la fuente de una muestra en la escena del crimen.

La mejor solución incluyendo un alto poder de discriminación y una velocidad rápida de análisis ha sido obtenida con marcadores STR de ADN.

### **Procedimiento.**

Extracción por Chelex.

Se utilizo esta técnica de extracción debido a que es una técnica sencilla, rápida y no tan cara como otras técnicas, además de permitirnos obtener un buen rendimiento del material a estudiar por su poca muestra requerida para llevarla a cabo (3mm x 3mm).

Chelex es una resina quelante que tiene una alta afinidad por iones metálicos polivalentes. La resina Chelex está compuesta de copolimeros de estireno y divinilbenceno que contiene iones iminodiacetato que actúa quelando grupos. Esto ha sido postulado, ya que la presencia de Chelex durante el punto de ebullición previene: la degradación del ADN por quelación de iones metálicos que pueden catalizar la ruptura del ADN sujeto a altas temperaturas en soluciones con fuerzas iónicas bajas (Singer-Sam, J., Tanguay, R., 1989). El procedimiento de Chelex básico consiste en la ebullición de la muestra en una solución de Chelex al 5%, agregando entonces una fracción del sobrenadante a la mezcla de PCR. El procedimiento Chelex resulta en la desnaturalización de la muestra del ADN.

## Desarrollo.

1. Pipetee 1 mL. de agua destilada estéril dentro de un tubo para centrifuga de 1.5 mL. Adicione lo siguiente, y mezcle suavemente:
  - a. 3  $\mu$ L de sangre completa ó
  - b. La porción de la mancha de sangre en aproximadamente 3 mm de área extendida
2. Incube a temperatura ambiente de 15 a 30 minutos. Mezcle de vez en cuando por inversión o suavemente en vórtex.
3. Centrifugue en micro centrífuga de 2 a 3 minutos de 10 000 a 15000 rpm.
4. Retire cuidadosamente el sobrenadante (todo menos unos 20 a 30  $\mu$ L) y deséchelo. Si la muestra es una mancha de sangre, deje el substrato de tejido en el tubo con la pastilla)
5. Adicione Chelex al 5% para un volumen final de 200  $\mu$ L.
6. Incube a 56° C por 15 a 30 minutos.
7. Mezcle en vórtex a velocidad alta de 5 a 10 segundos
8. Incube en un baño de agua hirviente durante 8 minutos.
9. Mezcle en vórtex a velocidad alta durante 5 a 10 segundos.
10. Centrifugue a micro centrífuga de 2 a 3 minutos de 10 000 a 15 000 rpm.
11. La muestra está ahora lista para el proceso de amplificación por PCR.
12. Almacene el resto del sobrenadante que no se utilice en PCR de 2 a 8° C o congele.

## **Procedimiento para las manchas hemáticas levantadas con la cinta REMCO®**

- Se cortó un fragmento de la cinta donde contenía muestra de unas dimensiones de 3 x 3 mm.
- Se colocó en un tubo eppendorf (1.7 mL) con 200  $\mu$ L de agua estéril.
- Se trabajaron las muestras con la técnica de extracción Chelex.

## **Amplificación por PCR.**

### Reacción en cadena de la Polimerasa.

En 1983, Kary Mullis, de Cetus Corporation, desarrolló una nueva técnica que en la actualidad se usa ampliamente para amplificar un fragmento de ADN específico sin necesidad de células bacterianas. Se sabe que la polimerasa de ADN de especies bacterianas que viven en fuentes termales es estable a temperaturas de 90° C, muy por encima de la temperatura que destruye la actividad de otras polimerasas de ADN. Mullis y sus colaboradores, aprovecharon esta enzima para desarrollar la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR o RCP), en la cual una sola región de ADN, que a veces se presenta fugazmente en mínimas cantidades, se puede amplificar con rapidez y poco costo. <sup>(31)</sup>

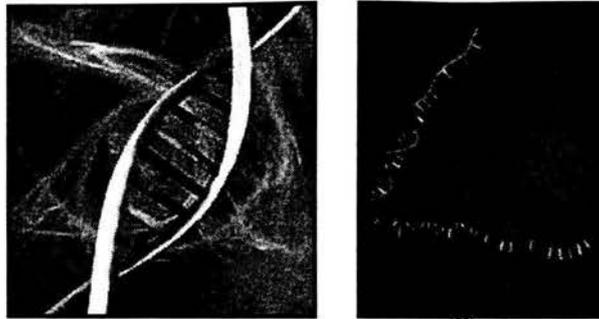


Figura 20. Modelo de ADN. <sup>(53)</sup>

Una muestra de ADN se mezcla con los cuatro desoxirribonucleótidos y una polimerasa de ADN resistente a temperatura, junto con los dos fragmentos de ADN sintéticos cortos (oligonucleótidos) complementarios de las secuencias de ADN en los extremos 3' de la región de ADN que se desea amplificar. Los oligonucleótidos sirven como iniciadores a los cuales se añaden nucleótidos durante los pasos de duplicación. La mezcla se calienta a 92-94°, lo bastante caliente para separar las moléculas de ADN de la muestra en sus cadenas componentes. A continuación, se enfría la mezcla para permitir que los iniciadores se enlacen a los extremos 3' de ambas cadenas del ADN específico y la polimerasa añade nucleótidos a los extremos 3' de los iniciadores. A medida que la polimerasa alarga los iniciadores, copiando selectivamente al ADN específico, forma nuevas cadenas de ADN complementarias. Elevando una vez más la temperatura, las cadenas de ADN originales y las recién formadas se separan. Enseguida se enfría la muestra para permitir que los iniciadores sintéticos en la mezcla se unan una vez más a los extremos 3' del ADN específico, que ahora está presente en cantidad doble de la original. Este ciclo se repite una y otra vez, y en cada ocasión se duplica la cantidad de la región de ADN específica flanqueada por los iniciadores enlazados. En unas cuantas horas se pueden generar miles de millones de copias de esta región específica.

Además de emplearse para amplificar fragmentos de ADN específicos, la PCR puede generar grandes cantidades de ADN a partir de muestras mínimas.

### Procedimiento.

Se llevó a cabo la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa con el Kit de Power Plex (16 system) de Promega\* con una cantidad de ADN de 2.5 µL de cada muestra.

Una vez dispensado la mezcla maestra para amplificación del kit Power Plex y añadidos los 2.5 µL de cada muestra de ADN se colocaron en el termociclador para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa.

## Secuenciación.

Se obtuvieron los perfiles procesando los productos de PCR por electroforesis capilar (ABI Prism 310 y ABI 3100).

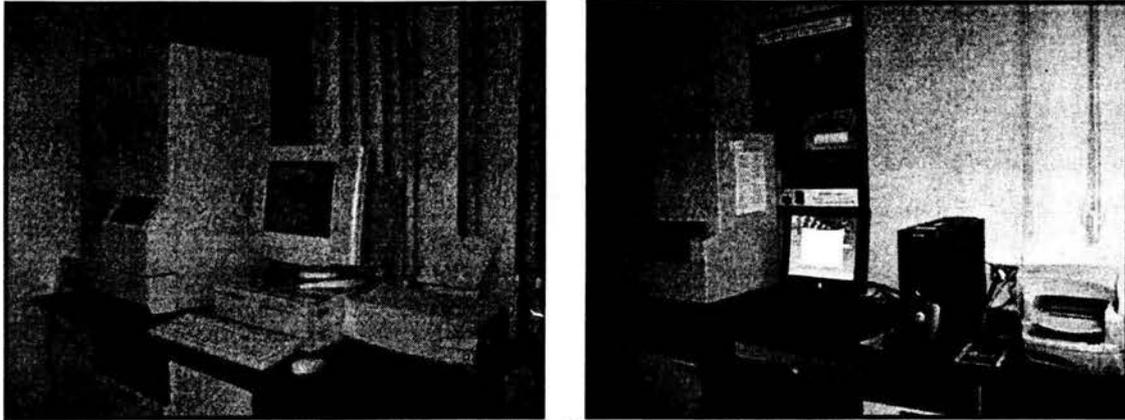


Figura 21. Fotografía de los equipos ABI 310 y ABI 3100.

### Electroforesis capilar:

La electrofóresis capilar (EC) es relativamente una nueva adición a la familia de la electroforesis.

Los elementos primarios de un instrumento de EC incluyen un delgado capilar, dos viales con buffer, y dos electrodos conectados a una fuente de poder de alto voltaje. Los sistemas también contienen una fuente de excitación por láser, un detector de fluorescencia un auto muestras (autosampler), que detiene las muestras en los tubos, y una computadora controla la inyección y detección de las muestras.

Los capilares son hechos de silica flexible (vidrio) y tienen un diámetro interno de 50-100  $\mu\text{m}$  y una longitud de 25-75 cm.

Previamente a la inyección en cada muestra un nuevo gel es vertido para llenar los capilares con una fresca alícuota de solución de polímero. En la EC el gel puede ser tan grande o escuálido que es solo tan amplio para una sola muestra en una sola vez.

Una importante diferencia entre la EC y el gel es que los campos eléctricos son en órdenes de 10 a 100 veces más con EC (Ejemplo 300 V/cm. contra 10 V/cm.), la cual resulta en corridas más rápidas para la EC.

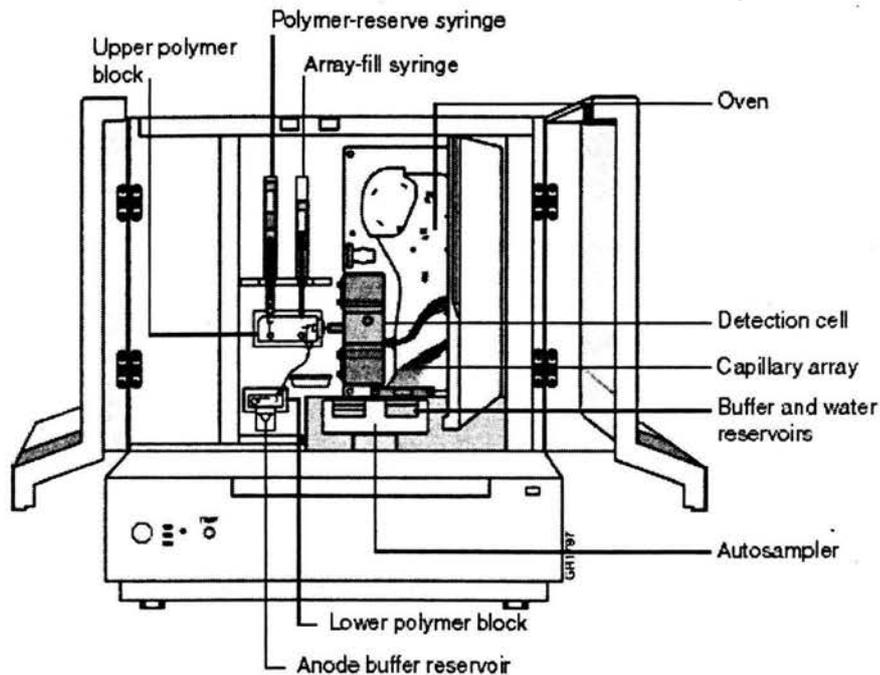


Figura 22. Esquema de los componentes del secuenciador ABI electroforesis capilar. <sup>(4)</sup>

### Procedimiento:

#### ABI Prism 310

- Preparar la mezcla con:  
(1  $\mu\text{L}$  ILS600 x muestra) + (24  $\mu\text{L}$  de formamida x muestra)  
Agitar en vórtex
- Mezclar 25  $\mu\text{L}$  de la mezcla con 1  $\mu\text{L}$  de muestra amplificada
- El control se trabaja con:  
25  $\mu\text{L}$  de la mezcla + 1  $\mu\text{L}$  Allelic ladder mix
- Desnaturalizar las muestras con calor a 95° C durante 3 minutos
- Inmediatamente colocar en frío (hielo) durante 3 minutos
- Colocar en el aparato para llevar a cabo la corrida

#### ABI Prism 3100

- Preparar la mezcla con:  
(1  $\mu\text{L}$  ILS600 x muestra) + (9  $\mu\text{L}$  de formamida x muestra)  
Agitar en vórtex
- Mezclar 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla con 1  $\mu\text{L}$  de muestra amplificada
- El control se trabaja con:  
10  $\mu\text{L}$  de la mezcla + 1  $\mu\text{L}$  Allelic ladder mix
- Desnaturalizar las muestras con calor a 95° C durante 3 minutos
- Inmediatamente enfriar en hielo frapé durante 3 minutos
- Colocar en el aparato para llevar a cabo la corrida

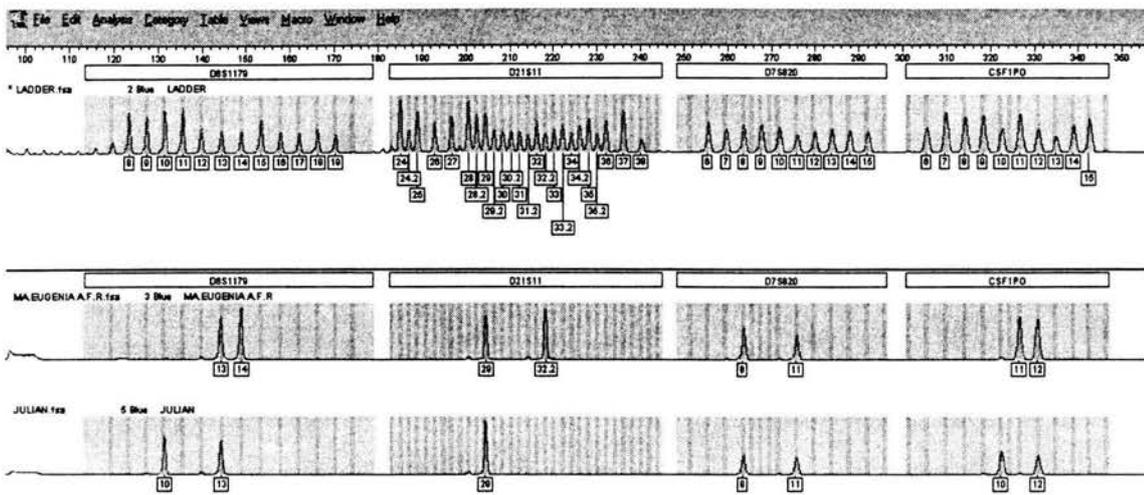


Figura 23. Electroferograma observándose el ladder (escala alélica) y la secuenciación de dos muestras.

## **Metodologías para Semen.**

### Procedimiento de recolección de muestras con la cinta REMCO®

Simulando superficies donde pudiese encontrar muestras de semen en la escena de un delito, se colocó semen en diferentes soportes (vidrio, loza, madera) para después llevar a cabo su levantamiento con la cinta REMCO® de la siguiente manera:

Cortar un fragmento de cinta adhesiva con los cuidados necesarios para impedir contaminación.

Colocar la cinta sobre la muestra que se encontró.

Presionar varias veces la cinta contra la muestra para forzar la adhesión del vestigio a la cinta.

Levantar la cinta lentamente tratando de levantar la mayor cantidad posible de muestra.

Doblar la cinta de manera que quede el vestigio recogido protegido de cualquier tipo de contaminación.

Etiquetar de manera clara.

### **Técnicas de orientación**

#### Fluorescencia a la luz ultravioleta

El líquido espermático, contiene flavina en alta concentración y son las responsables de impartir fluorescencia blanco verdosa al semen cuando las manchas de este son observadas a la luz ultravioleta; por lo tanto este procedimiento es de gran utilidad para la localización topográfica de posibles huellas espermáticas, tanto en el lugar de los hechos como en prendas de vestir.

#### Fosfatasa ácida

El líquido seminal tiene un promedio de aproximadamente 2500 U. King Armstrong de fosfatasa ácida por mililitro, mientras que otros líquidos corporales y otras sustancias extrañas tienen menos de 5 u. por mL.; por lo tanto, la presencia de semen en manchas sospechosas se puede detectar por el hallazgo de elevadas cantidades de fosfatasas ácidas.

#### Fundamento.

La fosfatasa ácida siendo una enzima tiene la propiedad de hidrolizar los ésteres alifáticos y aromáticos del ácido ortofosfórico.

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

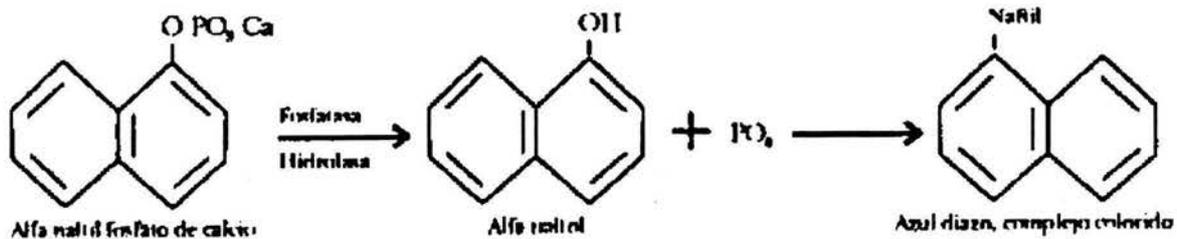


Figura 24. Fundamento de la reacción de la fosfatasa ácida. <sup>(11)</sup>

La fosfatasa ácida del esperma reacciona con el reactivo 1-naftilfosfato de calcio y queda libre alfa naftol; este reacciona con sulfato de dianisiltetrazonio y forma un colorante azoicovioleta intenso.

### Procedimiento.

- La parte del material con la mancha en estudio se recortó al igual que un fragmento no manchado para el ensayo en blanco.
- Ambos recortes se colocaron entre dos trozos de papel filtro sobre una superficie blanca.
- En algunos casos, se puede colocar un fragmento de la mancha únicamente sobre una superficie blanca (papel filtro) para llevar a cabo la reacción.
- Se agregó el reactivo y se observó si existe alguna coloración.
  - En caso de aparecer una coloración violeta dentro de un tiempo de 5 minutos, nos indica la presencia de fosfatasa ácida seminal.

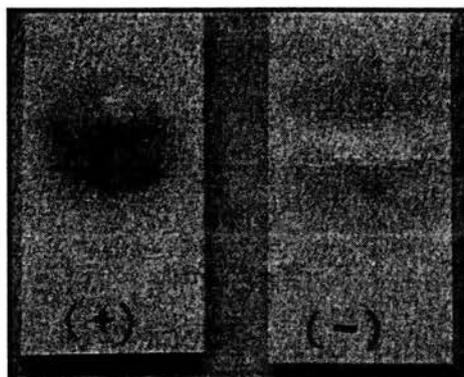


Figura 25. Fotografía del control positivo y negativo de la reacción de fosfatasa ácida

## **Validación con muestras en la cinta REMCO®**

### **Procedimiento**

Con muestras de semen levantadas con la cinta REMCO® se llevo a cabo la técnica de la fosfatasa ácida de la siguiente manera.

- Debido a que no se puede agregar el reactivo directamente a la mancha ya que se encuentra protegido por la cinta, primero se colocó un fragmento de 0.5 x 0.5 cm. de la cinta con la mancha en un tubo de 1.7 mL con 1 mL. de solución salina.
- Se agitó en vórtex por 3 minutos
- Se dejó incubar por 15 minutos la cinta en la solución salina
- Se tomaron 20 µL de la solución en que se encuentra el fragmento con la mancha y se colocaron en un fragmento de papel filtro sobre una superficie blanca
- Se colocó una gota del reactivo sobre la gota colocada en el paso anterior en el papel filtro.
  
- Se observó si existe la presencia de coloración.
  - En caso de aparecer una coloración violeta dentro de un tiempo de 5 minutos, nos indica la presencia de fosfatasa ácida seminal.

### **Técnica de confirmación**<sup>(11)</sup>

La certeza de que una muestra corresponde a semen, se da sin lugar a duda con el hallazgo de los espermatozoides en el espécimen analizado.

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

El espermatozoide humano esta formado por: una cabeza de forma oval que mide 4.6 x 2.6 x 1.5 micras; una pieza intermedia que contiene las mitocondrias y una cola formada por nueve filamentos que rodean a otros dos centrales. En los animales, la cabeza tiene diferente forma y dimensiones.

Debido a que las bacterias atacan su tallo primeramente, en las muestras contaminadas se hace difícil su identificación.

### **Técnica microscópica.**

Para poder identificar una mancha como de semen es necesario observar bajo microscopio un espermatozoide completo, quedando identificado plenamente en cuanto su naturaleza.

Se puede hablar de dos variantes en cuanto a la observación de los espermatozoides: la primera es la observación directa y la segunda mediante una técnica de tinción. Estas, se elegirán dependiendo de las condiciones de la muestra y del observador.

### Tinción diferencial con Rojo rápido Nuclear e índigo carmín (Christmas Tree).

- A la muestra que se observará a microscopio agregar 1 mL. de agua inyectable y agitar en vórtex.
- Después de 15 minutos, agitar nuevamente y centrifugar a 11500 rpm durante 3 minutos.
- Sin destruir el botón celular desechar el sobrenadante dejando aproximadamente 50  $\mu$ L.
- Agitar en vórtex hasta resuspender el botón.
- Colocar 2.5  $\mu$ L. de la muestra concentrada y resuspendida en un portaobjetos.
- Secar ligeramente al calor del mechero o sobre una parrilla de calentamiento.
- Agregar a la muestra en el portaobjetos una gota de rojo rápido nuclear y dejarlo durante 15 minutos.
- Lavar con agua destilada y agregar una gota de índigo carmín y dejarlo un minuto
- Lavar con agua destilada, secar la muestra y observar a microscopio.

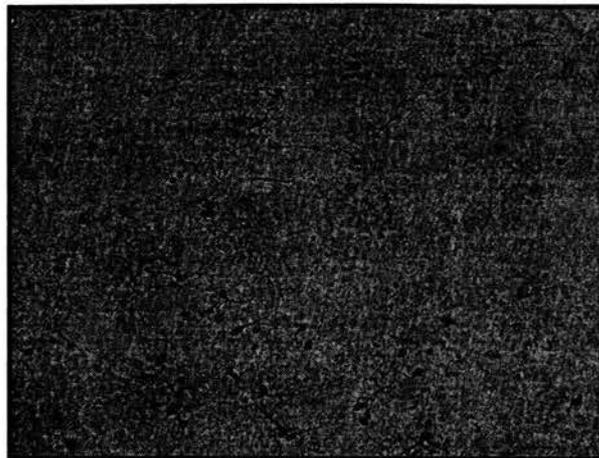


Figura 26. Fotografía de la observación a microscopio de Espermatozoides teñidos con rojo rápido nuclear.

### Validación de muestras con la cinta REMCO®

A las muestras levantadas con la cinta REMCO®, se les realizó la técnica de la siguiente manera:

- Se cortó un fragmento de la cinta con muestra a evaluar de aprox. 0.5 x 0.5 cm
- Se colocó el fragmento de la cinta en un tubo de 1.7 mL. con 1 mL. de agua inyectable, agitar en vórtex por 3 minutos.
- Se dejó reposar por 30 minutos para permitir que se liberara la muestra contenida en la cinta.
- Se extrajo la solución y se vertió en un tubo nuevo para centrifuga.
- Se centrifugó la solución de la muestra a 11500 rpm durante 3 minutos.

- Sin destruir el botón celular se desechó el sobrenadante dejando aproximadamente 50  $\mu\text{L}$ .
- Se agitó en vórtex hasta resuspender el botón.
- Se colocaron 2.5  $\mu\text{L}$ . de la muestra concentrada y resuspendida en un portaobjetos.
- Se secó ligeramente al calor del mechero o sobre una parrilla de calentamiento.
- Se agregó a la muestra en el portaobjetos una gota de rojo rápido nuclear y se dejó durante 15 minutos.
- Se lavó con agua destilada y se le agregó una gota de índigo carmín y dejándolo reposar un minuto
- Se lavó con agua destilada, se secó la muestra y se observó a microscopio.

## **Técnicas de determinación de origen del semen.**

### **Reacción de Precipitinas.**

Descubierta en 1900 por Uhlenhuth para determinar si es sangre de origen humano

#### **Fundamento**

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

Esta reacción antígeno-anticuerpo esta influida por varias fuerzas interactuando entre factores reaccionantes como son: las fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacción de dipolos, atracción entre los antígenos no polares y la superficie del anticuerpo, y la atracción electrostática.

La reacción misma tiene lugar en varias etapas. Inicialmente se forma un complejo antígeno-anticuerpo soluble; conforme la reacción prosigue, ese complejo empieza a formar una red compuesta de moléculas de anticuerpo bivalente y moléculas de antígeno polivalente. Esta formación crece rápidamente formando partículas del tamaño suficiente como para ser insolubles y formar un precipitado visible.

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

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

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

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

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

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

Algunos investigadores han observado falsas reacciones positivas debido a la presencia de sales de sodio o sulfonatos que contienen los polvos para lavado.

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

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

### Procedimiento.<sup>(11)</sup>

- Cortar un pequeño fragmento de la mancha de semen y colocarlo en un tubo de ensaye.
- Agregar unas gotas de solución salina
- Si la solución es turbia se debe centrifugar y utilizar el sobrenadante.
- Colocar dos gotas del extracto diluido en un capilar
- Agregar una cantidad igual de antisuero absorbiéndolo en el mismo capilar de tal manera que quede abajo del extracto de la muestra
- Fijar el tubo de manera perpendicular sobre un soporte.
- La observación se hace con luz indirecta y sobre fondo oscuro.

La aparición de un anillo de precipitación en la interfase de los dos líquidos indica reacción positiva.

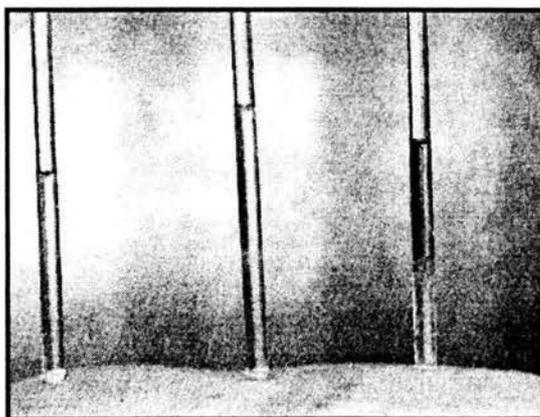


Figura 27. Fotografía de la reacción de precipitinas. A la derecha control negativo, dilución 1:100 de la muestra de semen en el centro, y a la derecha la muestra de semen diluida 1:1000.

### Recomendaciones.

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

Si existen partículas en suspensión o turbidez, la muestra deberá centrifugarse hasta obtener un líquido transparente. La dilución de la muestra problema deberá tener una concentración de 1 a 1000 misma que se controlará con un testigo a la misma dilución.

### Validación de muestras con la cinta REMCO®

Con las muestras levantadas con la cinta REMCO® se procedió de la siguiente manera:

- Se cortó un fragmento de la cinta aproximadamente de 0.5 x 0.5 cm que presuntamente contiene semen humano
- Se fraccionó este segmento en pedazos mas pequeños para aumentar la superficie de contacto
- Se colocaron estos fragmentos en un tubo de 1.7 mL. con 1 mL. de solución salina inyetable
- Se agitó en vórtex por 3 minutos y se dejó reposar durante 20 minutos más.
- Se tomaron 30 µL de la solución obtenida y se colocó en el capilar
- Se le agregó al capilar la misma cantidad de antisuero y se colocaron en una base fija para observar la precipitación.
- El control negativo se trabajó con un fragmento de cinta adhesiva sin muestra, cortándola en pedazos más pequeños y trabajándola de igual manera que las muestras con semen.

### Tipificación (individualización ADN)

El arribo de la tecnología del ADN ha aumentado la habilidad de efectuar análisis de identidad humana. La identificación individual es deseada en gran número de situaciones incluyendo la determinación de perpetradores de actos violentos como homicidios y violaciones, resolviendo casos de paternidad no establecida, y en la identificación de restos de personas desaparecidas o víctimas de desastres masivos.

### Procedimiento.

#### Extracción por Fenol-cloroformo <sup>(34)</sup>

Una extracción orgánica involucra la adición serial de varios químicos. Primero SDS, DTT, EDTA y la proteinasa K son añadidos para llevar a cabo la lisis de la célula y romper las proteínas que protegen el ADN. Después una mezcla de fenol-cloroformo es añadida para lograr separar las proteínas del ADN. El ADN es mas soluble en la porción acuosa que en la mezcla de fenol-cloroformo. Posteriormente se lleva a cabo una precipitación con etanol para remover los inhibidores hemo.

La realización de esta técnica nos consume un periodo de tiempo largo, involucra la utilización de químicos muy agresivos para la muestra y para el analista, y requiere que la muestra sea transferida de un tubo a otro lo que nos puede producir contaminación cruzada.

Esta técnica es utilizada ampliamente en la criminalística ya que aunque el rendimiento de esta es menor en comparación con otras (Chelex, SV, etc.) los reactivos y el equipo requeridos son de bajo costo y de fácil manejo.

Para poder llevar a cabo esta técnica es necesario que el volumen de la muestra sea mayor de 500  $\mu\text{L}$  y así poder obtener la cantidad de ADN necesaria para la obtención de un perfil genético.

#### Desarrollo.

1. A 500 $\mu\text{L}$  de la muestra.
2. Agregar 220  $\mu\text{L}$  de buffer de digestión, 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K y 12 de DTT.
3. Colocar en digestión por 30 minutos a 57° C.
4. Añadir aproximadamente el mismo volumen que el buffer de digestión de la mezcla de fenol-cloroformo
5. Agitar en vórtex durante 1 minuto.
6. Centrifugar por 15 minutos a 12000 rpm.
7. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo de 1.7 mL.
8. Agregar una cantidad de alcohol absoluto aproximadamente del doble del volumen de la fase acuosa.
9. Centrifugar a 15000 rpm durante 30 minutos a cero grados centígrados.
10. Decantar todo el contenido del tubo.
11. Agregar al tubo vacío, 100  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasa.

#### **Procedimiento para las manchas hemáticas levantadas con la cinta REMCO®**

- Se cortó un fragmento de la cinta donde contenía muestra de unas dimensiones de 3 x 3 mm.
- Se colocó en un tubo eppendorf (1.7 mL.) con 500  $\mu\text{L}$  de agua estéril.
- Se trabajaron las muestras con la técnica de Fenol-cloroformo.

#### **Amplificación por PCR.**

##### Procedimiento.

Se llevó a cabo la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa con el Kit de Power Plex (16 system) de Promega\* y con el Kit de Identifiler de Applied Biosystems\* con una cantidad de ADN de 2.5  $\mu\text{L}$  de cada muestra.

Una vez dispensado la mezcla maestra para amplificación del kit Identifiler y añadidos los 1.5  $\mu\text{L}$  de cada muestra de ADN se colocan en el termociclador para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa.

## Secuenciación.

Se obtuvieron los perfiles procesando los productos de PCR por electroforesis capilar (ABI Prism 310 y ABI 3100).

## Procedimiento:

### ABI Prism 310

- Preparar la mezcla con:  
(1  $\mu$ L ILS600 x muestra) + (24  $\mu$ L de formamida x muestra)  
Agitar en vórtex
- Mezclar 25  $\mu$ L de la mezcla con 1  $\mu$ L de muestra amplificada
- El control se trabaja con:  
25  $\mu$ L de la mezcla + 1  $\mu$ L Allelic ladder mix
- Desnaturalizar las muestras con calor a 95° C durante 3 minutos
- Inmediatamente colocar en frío (hielo) durante 3 minutos
- Colocar en el aparato para llevar a cabo la corrida

### ABI Prism 3100

- Preparar la mezcla con:  
(1  $\mu$ L ILS600 x muestra) + (9  $\mu$ L de formamida x muestra)  
Agitar en vórtex
- Mezclar 10  $\mu$ L de la mezcla con 1  $\mu$ L de muestra amplificada
- El control se trabaja con:  
10  $\mu$ L de la mezcla + 1  $\mu$ L Allelic ladder mix
- Desnaturalizar las muestras con calor a 95° C durante 3 minutos
- Inmediatamente enfriar en hielera durante 3 minutos
- Colocar en el aparato para llevar a cabo la corrida

## **Metodologías para Saliva**

### Procedimiento de levantamiento de muestra con la cinta REMCO®

Para simular superficies en las que se puede encontrar saliva en la escena de algún delito como violaciones, se colocó saliva en diferentes soportes: vidrio, loza y piel.

Después de dejar secar la saliva colocada en las superficies, se procede a levantar los indicios biológicos de la siguiente manera:

- Se cortó un pedazo del material sugerido (cinta adhesiva) suficiente para recoger la muestra manipulándola con guantes de látex colocados correctamente.

- Se recogió la muestra con la cinta de tal manera que se lograra levantar la mayor cantidad posible de la saliva vertida.
  - Una vez adherida la muestra a nuestro material de recolecta, se dobló de tal manera que se lograra cubrir la muestra y así protegerla de los factores que pudieran afectarla.
  - Se etiquetó debidamente.
  - Fue colocada dentro de un sobre de papel etiquetado.
- Se dejó la muestra en este material y en condiciones ambientales para observar que tan fácilmente se degrada el material recogido en este material.

### Técnicas de orientación

#### Amilasa

El almidón es un polisacárido compuesto por unidades de glucosa con dos componentes; uno, mayoritario, llamado amilosa, de estructura lineal, y otro, minoritario, amilopectina, de estructura ramificada.

La  $\alpha$ -amilosa esta constituida por cadenas largas no ramificadas, en las que todas las unidades D-glucosa se hallan unidas mediante enlaces  $\alpha$ -(1—4). Las cadenas son polidispersas. La amilosa no es verdaderamente soluble en agua, pero forma micelas hidratadas que dan que dan un color azul con el yodo. En tales micelas la cadena polisacaridica esta retorcida, constituyendo un arrollamiento helicoidal.

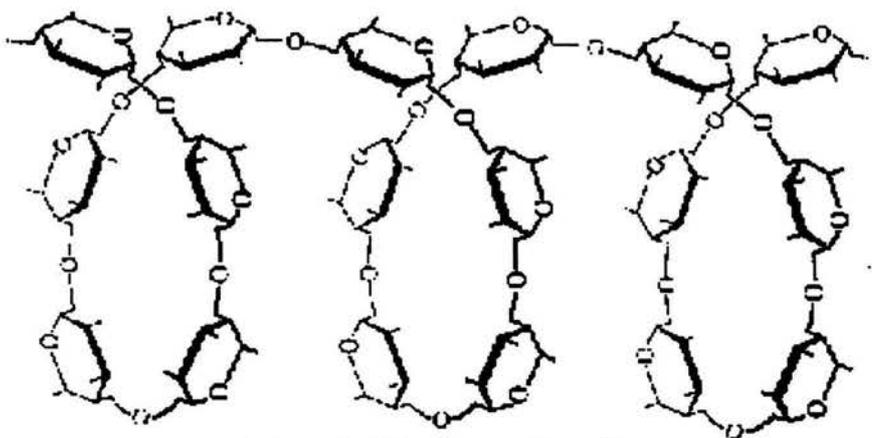


Figura 28. Micelas de amilosa. <sup>(18)</sup>

La amilopectina esta muy ramificada, la longitud media de las ramificaciones es de 24 a 30 residuos de glucosa. Los enlaces glucosídicos del esqueleto son  $\alpha$ -(1—4), pero los de los puntos de ramificación son enlaces  $\alpha$ -(1—6). La amilopectina produce disoluciones coloidales o micelares que dan una coloración rojo violácea con el yodo.

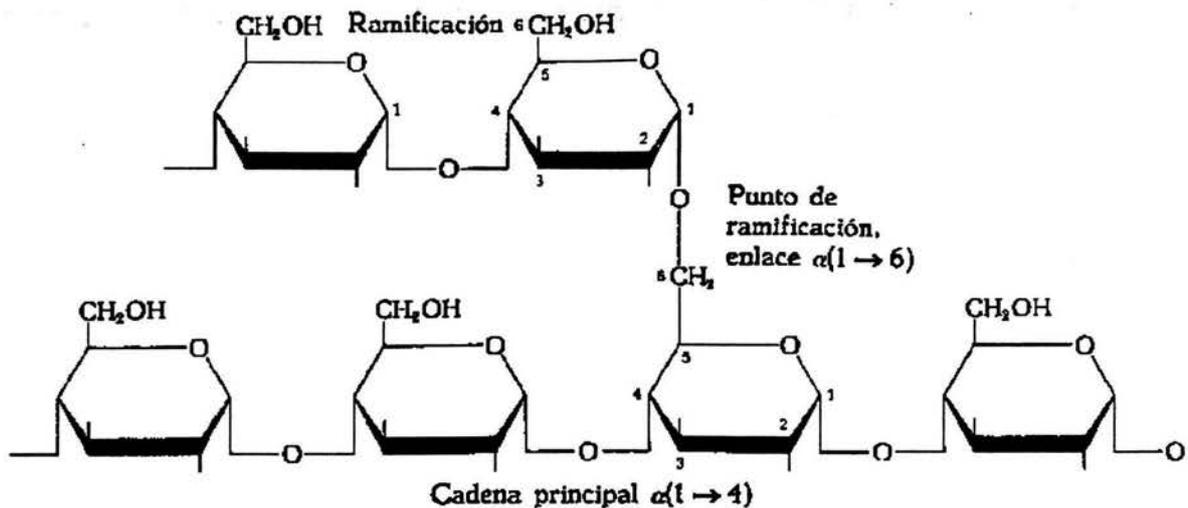


Figura 29. Estructura del almidón. <sup>(18)</sup>

### Fundamento

#### Hidrólisis del almidón.

Los componentes principales del almidón pueden ser hidrolizados enzimáticamente por 2 métodos diferentes.

La amilosa puede hidrolizarse por la  $\alpha$ -amilasa. Esta enzima hidroliza indistintamente al azar los enlaces  $\alpha$ -(1—4) a lo largo de la cadena de la amilosa de tal modo que rinde finalmente una mezcla de glucosa y maltosa libres.

La práctica se aprovecha, para seguir la degradación del almidón por  $\alpha$ -amilasa salival, ya que el almidón forma un complejo azul con iodo, cosa que no pueden hacer los productos de su degradación.

### Procedimiento

- Cortar pequeños cuadros del gel de agarosa-almidón.
- Hacer un pequeño pozo en el centro del cuadro de gel.
- Colocar 8  $\mu$ L de la muestra en el pozo
- Dejar reposar el gel con la muestra por 30 minutos.
- Revelar colocando 2 gotas de lugol al 0.5%.
- Se debe de realizar con un control positivo y uno negativo por cada evento.

En caso positivo se observara un halo alrededor del pozo incoloro en contraste con el color azul del resto del gel.

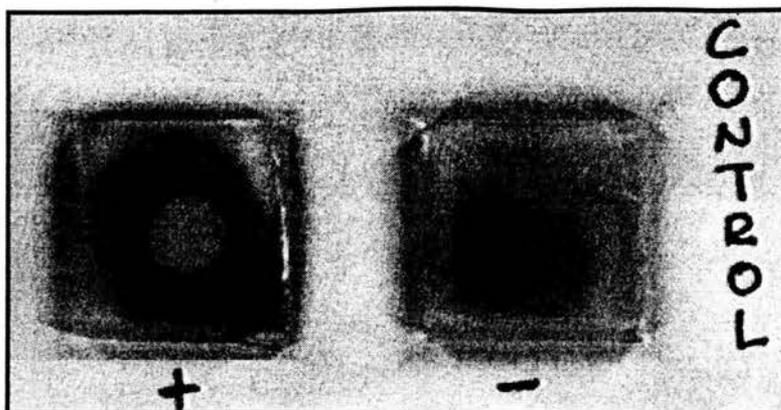


Figura 30. Fotografía de la Reacción Amilasa en gel.

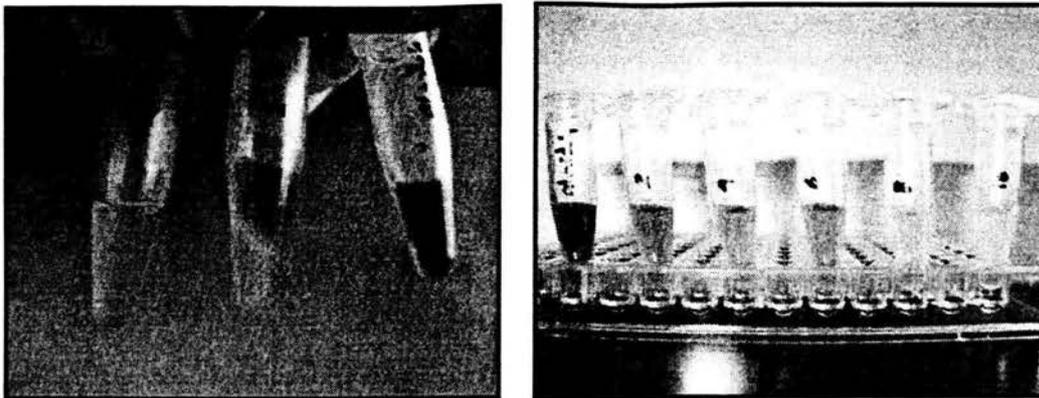
### **Validación con muestras levantadas con cinta REMCO®.**

Se realizó esta técnica de manera tradicional a las muestras levantadas con la cinta REMCO® pero no fue posible observar ninguna reacción positiva.

Debido a esto se modificó la técnica llevándola a cabo en una solución de almidón de la siguiente manera:

#### Procedimiento

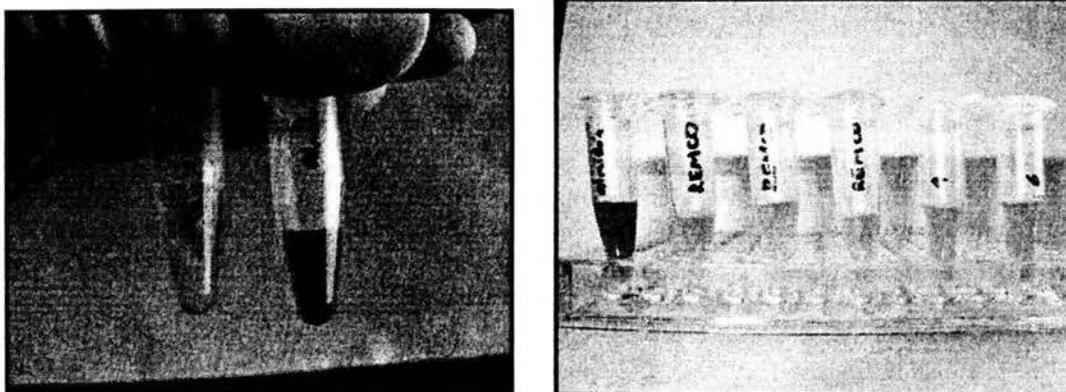
- A las muestras levantadas con la cinta REMCO® se les cortó un cuadro de 0.5 cm para trabajarlo.
  - Se colocó el cuadro en un tubo de 1.7 mL. y se agregaron 0.5mL. de solución salina.
  - Se agitó en vórtex por 5 min.
  - Se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 minutos para permitir la liberación de la muestra de la cinta.
  - Se agitó en vórtex por 30 segundos.
  - Se colocaron en un tubo nuevo de 1.7 mL. 0.5 mL de la solución de almidón y 20  $\mu$ L de la muestra.
  - Se dejó reposar 5 minutos la mezcla y se reveló con una gota de lugol.
- Se observa una coloración más tenue o la ausencia de color en caso positivo.



**Figura 31.** Fotografía en la que se observa del lado izquierdo la diferencia en la tonalidad de los tubos en control positivo, muestra levantada con la cinta REMCO® y el control negativo (almidón) y a la derecha curva de concentraciones de saliva desde 2µL hasta 10µL, observando la diferencia de coloración.

### **Validación con muestras levantadas con cinta REMCO®.**

Al realizar esta técnica con un control positivo (solución con fragmentos de la cinta REMCO® sin saliva) se observó que da la misma coloración tenue que cuando la cinta tiene muestra de saliva; es decir, la cinta adhesiva REMCO® da falsos positivos.



**Figura 32.** Fotografía que presenta las reacciones con falsos positivos en soluciones de la cinta REMCO® sin muestra.

### **Técnicas de confirmación**

#### **Observación a microscopio.**

Para tener la certeza de que la mancha recuperada del lugar de los hechos o del cuerpo de la víctima es de saliva, y que nos será de utilidad para obtener el perfil genético del malhechor es necesario que en este vestigio estén presentes células bucales a partir de las cuales podamos extraer el ADN contenido en su núcleo.

La saliva completa incluye aproximadamente entre 17 a 500 células bucales por µL. Teniendo en cuenta la cantidad de células recuperadas a partir de la evidencia, podemos considerar factible o no el llevar a cabo el procedimiento de extracción y amplificación a partir de esta muestra para obtener un perfil genético.

## Procedimiento.

La muestra en un hisopo:

- Se colocó el hisopo en un tubo de 15 mL limpio.
- Se agregó 1 mL de solución salina inyectable para recuperar el fluido contenido en el hisopo
- Se agitó en vórtex por 2 minutos.
- Extraer con una micro pipeta todo el líquido del hisopo para tratar de no dejar nada en el.
- Se centrifugó la solución durante 3 minutos a 11500 rpm
- Se eliminó el sobrenadante dejando aproximadamente 50  $\mu$ L
- Se agitó en vórtex por 1 minuto.
- Se tomó 3  $\mu$ L del concentrado y colocó en un portaobjetos limpio.
- Se dejó secar la muestra por unos minutos y se llevó a cabo la tinción.

## Tinción Rojo Rápido Nuclear

- Agregar el frote ya fijado en la laminilla 1 gota de colorante rojo nuclear
- Dejar por 10 minutos
- Lavar con agua destilada y dejar secar
- Observar a microscopio

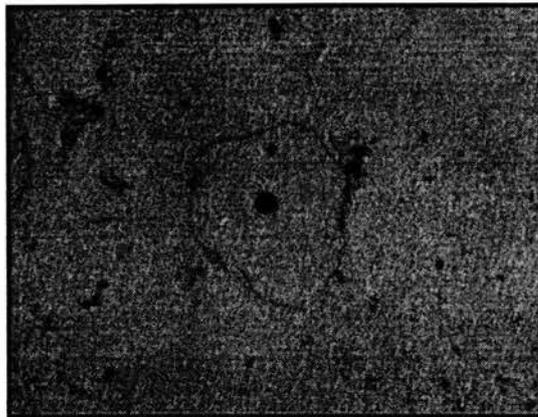


Figura 33. Fotografía de la célula epitelial observada el microscopio (tinción con rojo rápido nuclear).

## Validación con muestras levantadas con cinta REMCO®

A las muestras de saliva recuperadas con la cinta adhesiva REMCO®:

- Se cortó un fragmento de aproximadamente 0.5 x 0.5 cm.
- Se colocó en un tubo de 1.7 mL
- Se le agregaron 500  $\mu$ L de solución salina inyectable y se agitó en vórtex por 2 minutos.
- Se dejó reposar por 30 minutos para permitir que se liberara la muestra
- Se agitó en vórtex

- Se centrifugó a 11500 rpm por 3 minutos
- Se eliminó el sobrenadante dejando aproximadamente 50  $\mu\text{L}$
- Se agitó en vórtex por 1 minuto
- Se tomaron 3  $\mu\text{L}$  de la solución concentrada y se colocaron en una laminilla limpia
- Se dejó secar el frote por unos minutos y se llevó a cabo la tinción con rojo rápido nuclear.

### **Tipificación (individualización ADN)**

#### **Procedimiento para las manchas de saliva levantadas con la cinta REMCO®**

- Se cortó un fragmento de la cinta donde contenga muestra de unas dimensiones de 3 x 3 mm.
- Se colocaron en un tubo eppendorf (1.7) con 500  $\mu\text{L}$  de solución salina estéril.
- Se centrifugó por 3 minutos a 12500 rpm
- Se eliminó el sobrenadante
- Se agitó en vórtex el botón celular
- Se realizó un frote del concentrado para cuantificar las células recuperadas
- Se trabajaron las muestras con la técnica de Chelex.

#### **Extracción por Chelex.**

1. Se adicionó Chelex al 5% para un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ .
2. Se incubó a 56° C por 15 a 30 minutos.
3. Se agitó en vórtex a velocidad alta de 5 a 10 segundos
4. Se incubó en un baño de agua hirviente durante 8 minutos.
5. Se mezcló en vórtex a velocidad alta durante 5 a 10 segundos.
6. Se centrifugó en una micro centrifuga de 2 a 3 minutos de 10 000 a 15 000 rpm.
7. La muestra está lista para el proceso de amplificación por PCR.
8. Se almacenó el resto del sobrenadante que no se utilizó en PCR de 2 a 8° C o congelado.

#### **Amplificación por PCR.**

##### **Procedimiento.**

Se llevó a cabo la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa con el Kit de Identifilier de Applied Byosystems\* con una cantidad de ADN de 1.5  $\mu\text{L}$  de cada muestra.

##### **Secuenciación.**

Se obtuvieron los perfiles procesando los productos de PCR por electroforesis capilar (ABI Prism 310 y ABI 3100).

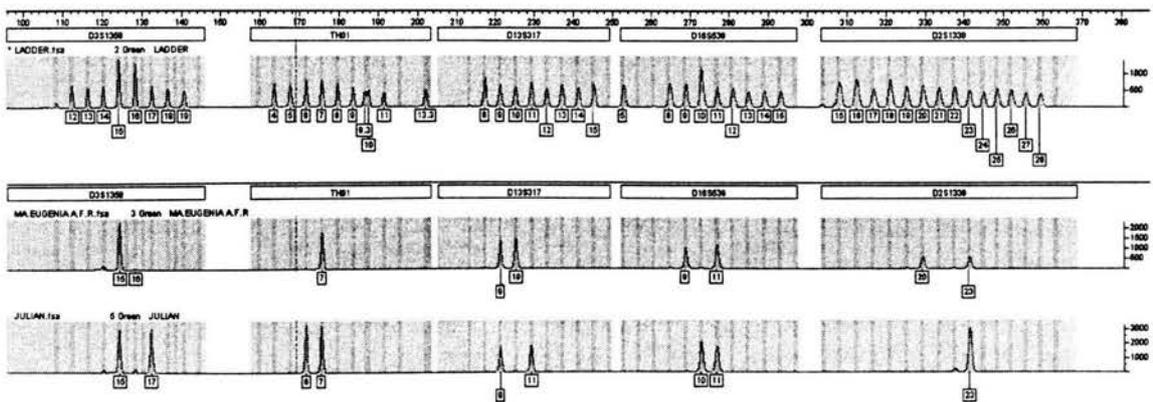


Figura 34. Electroferograma (ladder y dos muestras de saliva)

## Resultados.

### Sangre.

#### Técnica de Fenoftaleína.

La prueba de fenoftaleína se pudo realizar sin modificaciones importantes en muestras recolectadas con la cinta REMCO<sup>®</sup>, obteniéndose resultados óptimos en todos los casos en que se llevó a cabo.

El control negativo (cinta adhesiva sin muestra) que se trabajó de la misma manera, no presentó falsos positivos.

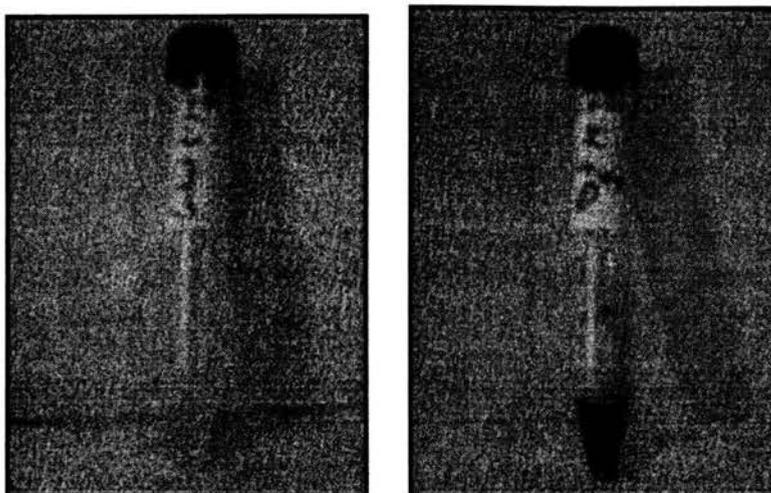


Figura 35. Fotografías de control negativo (lado izquierdo) y muestra levantada con la cinta REMCO<sup>®</sup> (lado derecho).

#### Técnica de Cristales de Teichman.

A las muestras levantadas con la cinta REMCO<sup>®</sup> de manchas hemáticas que se les realizó esta prueba, fue posible observar los cristales de Teichman (Cristales romboidales de color café).

#### Técnica de adsorción elución.

En todas y cada una de las muestras que se levantaron con la cinta adhesiva REMCO<sup>®</sup> y que se sometieron a esta reacción se observaron reacciones fáciles de interpretar y que sin tener que modificar en nada la técnica tradicional se logró determinar el grupo sanguíneo correcto de las muestras.

### **Técnica de Precipitinas:**

Las muestras de sangre trabajadas con la cinta REMCO® y procesadas por la técnica de precipitinas dieron un anillo de precipitación muy fácil de observar y que de manera sencilla nos indica que la sangre recolectada con este material es de origen humano.

Al trabajar la cinta sin muestra como control negativo no se observa ningún anillo de precipitación en el capilar lo que nos permite asegurar que esta cinta no nos proporcionará ningún falso positivo en el desarrollo de esta técnica.

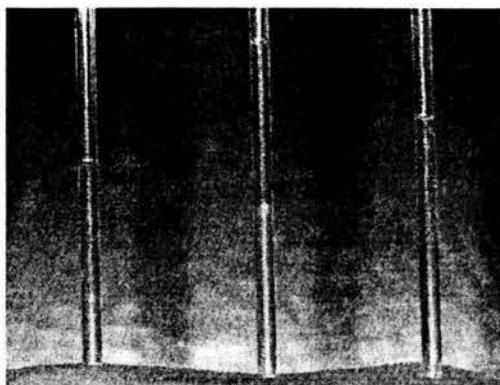


Figura 36. Fotografía en la que se observa a los extremos control positivo (izquierdo) y negativo (derecho) y en el centro la muestra mostrando un claro anillo de precipitación en la interfase de la muestra y el antisuero.

### **Tipificación:**

A partir de todas las muestras de las cuales se extrajo la sangre de la cinta para la extracción del ADN y llevar a cabo su amplificación y secuenciación se obtuvieron en todos los casos resultados favorables brindando el electroferograma correspondiente de cada uno de los individuos.

## Semen.

### Técnica de fosfatasa ácida

En las muestras levantadas con la cinta REMCO<sup>®</sup> que se les realizó esta técnica se observó claramente la coloración que nos indica la presencia de fosfatasa ácida seminal dando resultados favorables para esta técnica.

El control negativo o el ensayo en blanco no presentó ninguna coloración.

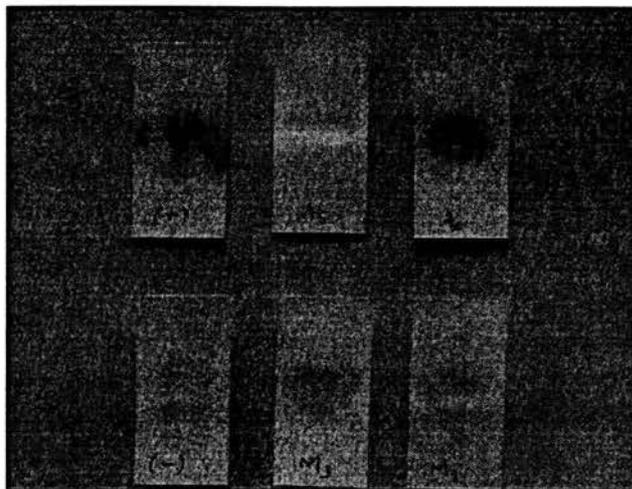


Figura 37. Fotografía de las muestras levantadas con la cinta REMCO<sup>®</sup> y sometidas a la reacción de la fosfatasa ácida con los respectivos controles positivo y negativo.

### Observación Microscópica.

- Con el procedimiento desarrollado para las muestras contenidas en la cinta REMCO<sup>®</sup> se logró extraer células espermáticas que fueron fácilmente observadas al microscopio.

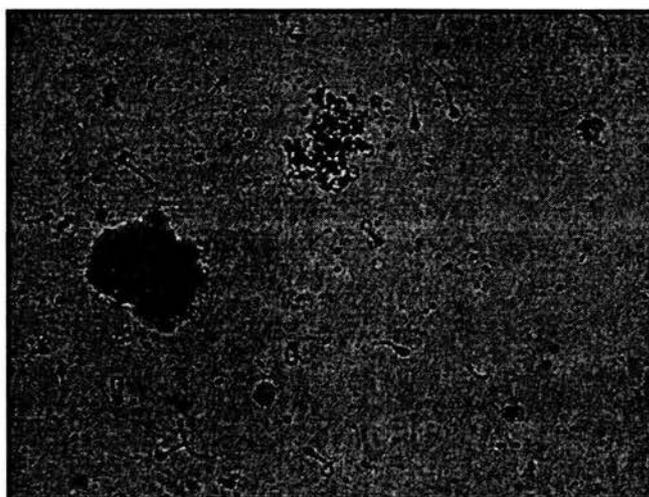


Figura 38. Fotografía de espermatozoides recuperados de la muestra levantada con la cinta REMCO<sup>®</sup> (tinción con rojo rápido nuclear).

### **Técnica de Precipitinas:**

Las muestras de semen trabajadas con la cinta REMCO® y procesadas por la técnica de precipitinas dieron un anillo de precipitación muy fácil de observar y que de manera sencilla nos indica que el semen recolectado con este material es de humano.

### **Tipificación:**

En todas las muestras que se sometieron a la tipificación, se lograron obtener sus perfiles genéticos correspondientes fáciles de identificar,

## **Saliva.**

### **Amilasa:**

En las muestras levantadas con la cinta REMCO® a las que se les realizó la técnica de la amilasa de manera tradicional, así como el control negativo y el positivo, dieron resultados positivos de amilasa, por lo que fue necesario tratar de modificarla. Buscando la manera de mejorar la técnica y lograr obtener resultados favorables en muestras con la cinta, se modificó la técnica y se llevó a cabo en solución pero también mostró falsos positivos por lo que no fue posible determinar si era saliva o no.

### **Observación al microscopio:**

A partir de las muestras levantadas con la cinta REMCO®, fue posible observar una buena cantidad de células por frote lo que nos permitiría obtener la cantidad de ADN necesaria para conseguir descifrar el perfil genético del perpetrador del crimen.

### **Tipificación:**

Se lograron buenos resultados en la tipificación de las muestras recolectadas con REMCO® ya que se obtuvieron perfiles genéticos completos y claros.

## Discusión de Resultados.

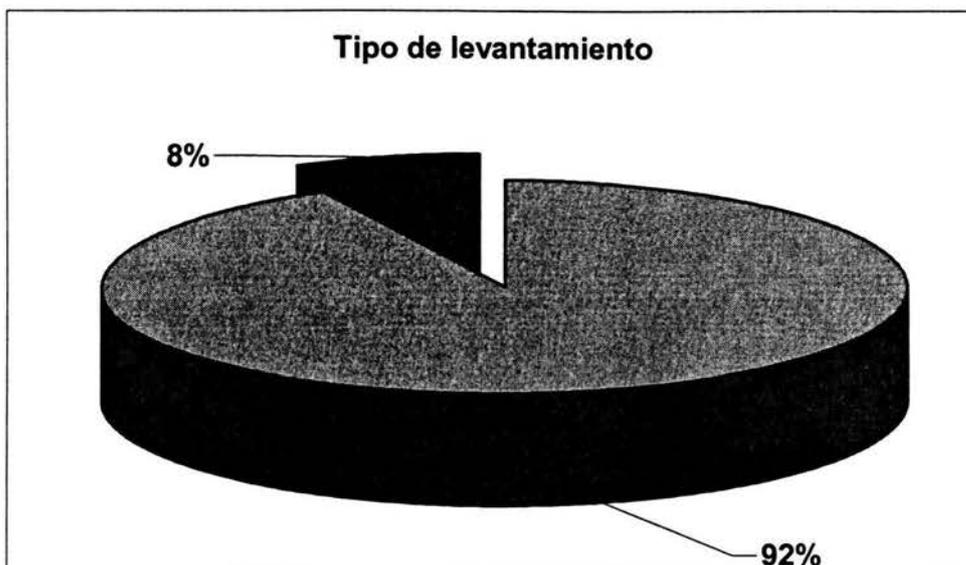
### Sangre

#### ▪ Procedimiento de levantamiento de manchas hemáticas con la cinta REMCO®

En el levantamiento de manchas hemáticas con la cinta adhesiva REMCO® en diferentes soportes, se reporta que en los soportes probados (loza, vidrio, metal a intemperie, metal en sitios cerrados, plástico, impermeabilizante, madera y cartón) se depositaron un total de 200 manchas hemáticas para todas las técnicas a realizar de las cuales:

Número de muestras levantadas por contacto.- 185

Número de muestras levantadas por raspado.- 15



### Técnicas de Orientación para identificación de Sangre.

#### ▪ Técnica de la Fenofaleína o de Kastle-Mayer.

Para llevar a cabo esta técnica se utilizaron como controles positivos sangre depositada en hisopos estériles presentado después de la reacción, una coloración Rosa brillante.

Como control negativo se realizó la técnica con solución salina estéril y como control negativo de la cinta se utiliza un fragmento de la cinta adhesiva sin sangre y en ambos casos no se presento ninguna coloración.

Se tomaron 50 muestras de manchas hemáticas levantadas con la cinta REMCO® para realizarles la técnica de orientación de Kastle Mayer obteniendo de las 50 muestras evaluadas las 50 muestras dieron positivas.

## Técnicas de determinación de origen de la sangre.

### ▪ Reacción de Precipitinas

La reacción de precipitinas se realizó con un antisuero humano comercial. Para estar seguros del correcto funcionamiento del antisuero cada vez es necesario correr un control negativo (agua inyectable) y otro positivo (sangre humana diluida 1:10 en agua inyectable).

Como control negativo de la cinta se tomó un fragmento de ella sin muestra y en ninguno de los ensayos realizados de esta manera (10 repeticiones) se observó precipitación alguna.

Se utilizaron 30 muestras de la cinta REMCO® con sangre para validar la técnica dando en todas ellas una reacción positiva.

## Técnicas de Confirmación.

### ▪ Cristales de Teichmann.

Para realizar esta técnica se realizó primero con sangre completa para poder observar los cristales que esperábamos encontrar en las muestras de la cinta.

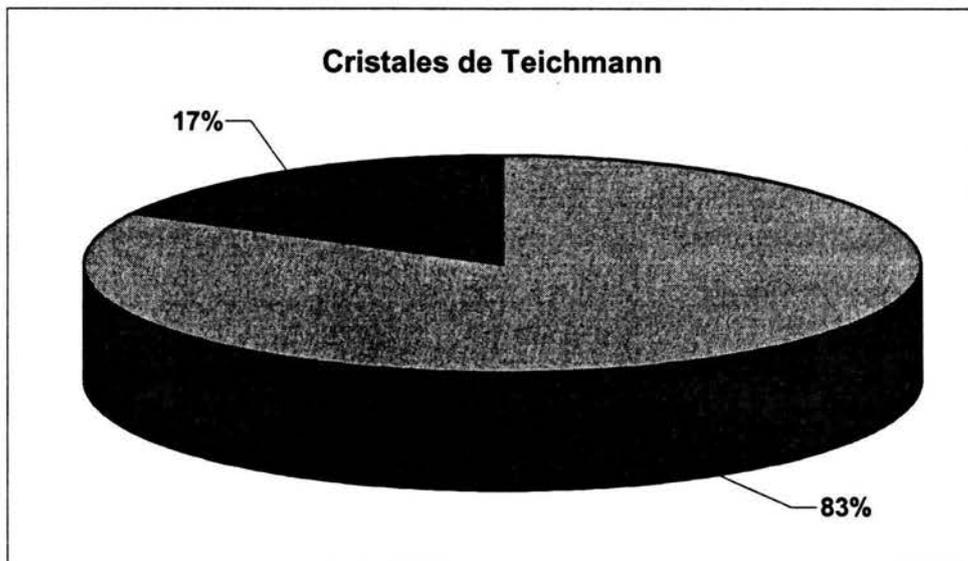
En los controles negativos realizados con agua inyectable y con un fragmento de cinta adhesiva en agua inyectable no se observó la presencia de ningún cristal.

Se tomaron 35 muestras de sangre en la cinta REMCO® a las que se les realizó esta técnica y que se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestras utilizadas para esta técnica: 35

Muestras que dieron resultado positivo: 29

Muestras que dieron resultado negativo: 6



▪ **Determinación de grupo sanguíneo por la Técnica de adsorción – elución.**

Como control negativo se utilizo agua inyectable sin presentar ningún tipo de precipitación después de la reacción.

Se utilizaron controles positivos de cada grupo sanguíneo al mismo tiempo que las muestras a analizar.

Se les determinó el grupo sanguíneo a 10 muestras de sangre en la cinta REMCO® de diferentes grupos obteniendo:

Muestras utilizadas para esta técnica: 30

Muestras que dieron resultado positivo: 30 (100%)

**Tipificación (individualización ADN)**

Se utilizaron 20 muestras para amplificarlas con el kit comercial de Power plex y 5 más para amplificarlas con el kit comercial de Identifiler, ambos por PCR.

De estas 25 muestras amplificadas se sometieron a electroforesis capilar obteniendo en todos los casos perfiles genéticos con buena definición.

**Semen**

**Procedimiento con la cinta REMCO®**

El levantamiento con la cinta REMCO® del semen, aunque es un poco más complicado en comparación con el de la sangre, demostró lograr adherir la suficiente cantidad del indicio a recuperar para poder realizarle las técnicas deseadas.

Se levantaron 150 manchas de semen con la cinta REMCO® para la realización de las diferentes técnicas de orientación, confirmación, de determinación de especie y llegar a la identificación del secretor de tal indicio.

## Técnica de orientación

- **Fosfatasa ácida**

La técnica de fosfatasa ácida es una técnica de fácil interpretación y para la realización con las muestras levantadas con la cinta, no fue necesario llevar a cabo ninguna modificación en el procedimiento tradicional permitiéndonos obtener un alto porcentaje de efectividad para la identificación del semen.

Además de los controles positivos (hisopos con semen) y negativos con los que se realizó esta técnica, se les realizó a 50 manchas levantadas con la cinta adhesiva REMCO® arrojando un 100% de efectividad ya que se presentó una reacción colorida positiva en cada una de las muestras expuestas al reactivo.

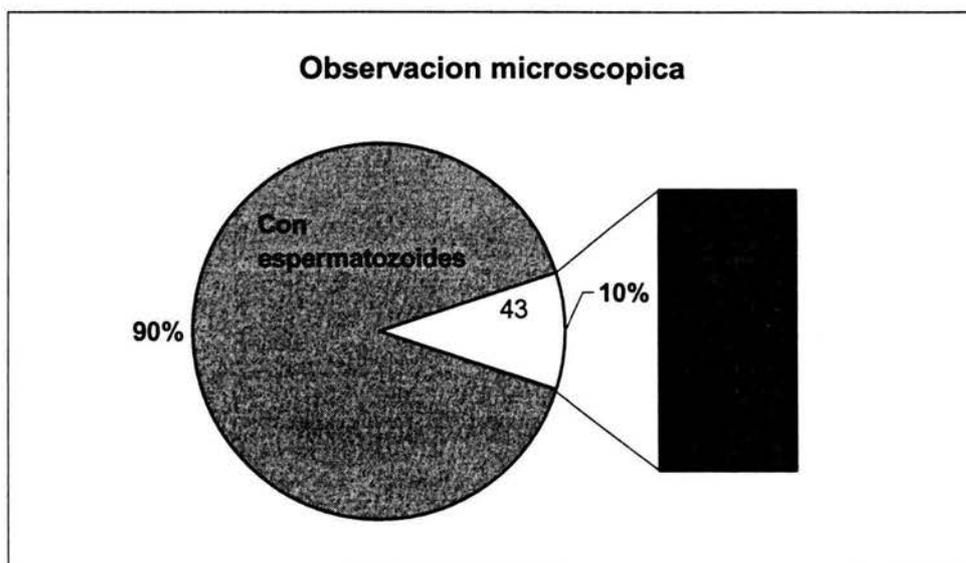
## Técnica de confirmación

- **Observación microscópica**

Para tener la certeza de que un indicio es semen es necesario el observar a microscopio la presencia de espermatozoides. En las muestra levantadas con la cinta REMCO® después de rehidratar el indicio para recuperarlo de la cinta adhesiva fue posible identificar espermatozoides en este fluido y así determinar que existía semen en la cinta y además, abrir la posibilidad de obtener un perfil genético a partir de este material.

De las 50 muestras que dieron positiva la reacción de fosfatasa ácida se les realizó su frote respectivo para observarlo a microscopio y se obtuvo:

Muestras analizadas:	50
Muestras en las que se observaron espermatozoides	45
Muestras en las que no observó ningún esperma	5



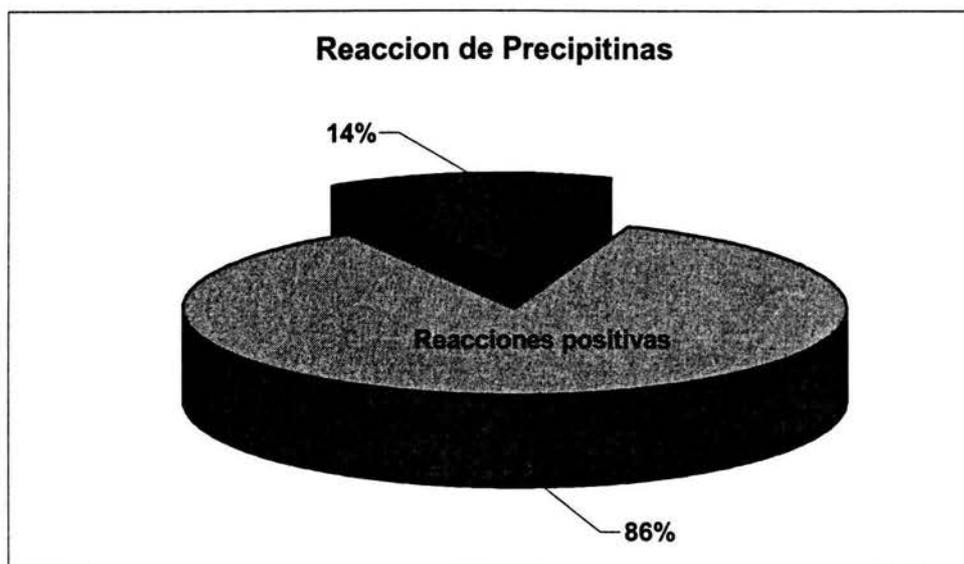
## Técnicas de determinación de origen del semen.

- **Reacción de Precipitinas**

La reacción de precipitinas nos indica si el indicio es o no de origen humano. Se realizó en capilar con un antisuero comercial y se utilizó un control positivo (semen diluido) y uno negativo en cada ocasión que se llevara a cabo la reacción.

Se le realizó esta técnica a 50 muestras levantadas con la cinta REMCO® y se observó que:

Muestras analizadas:	50
Muestras en las que se observó precipitación	43 (86%)
Muestras en las que no observó precipitación	7 (14%)



## Tipificación

Se utilizaron 20 muestras para amplificarlas con el kit comercial de Identifiler por PCR.

De estas 20 muestras amplificadas se sometieron a electroforesis capilar obteniendo en todos los casos perfiles genéticos con buena definición.

## Saliva

### Procedimiento de levantamiento de muestra con la cinta REMCO®

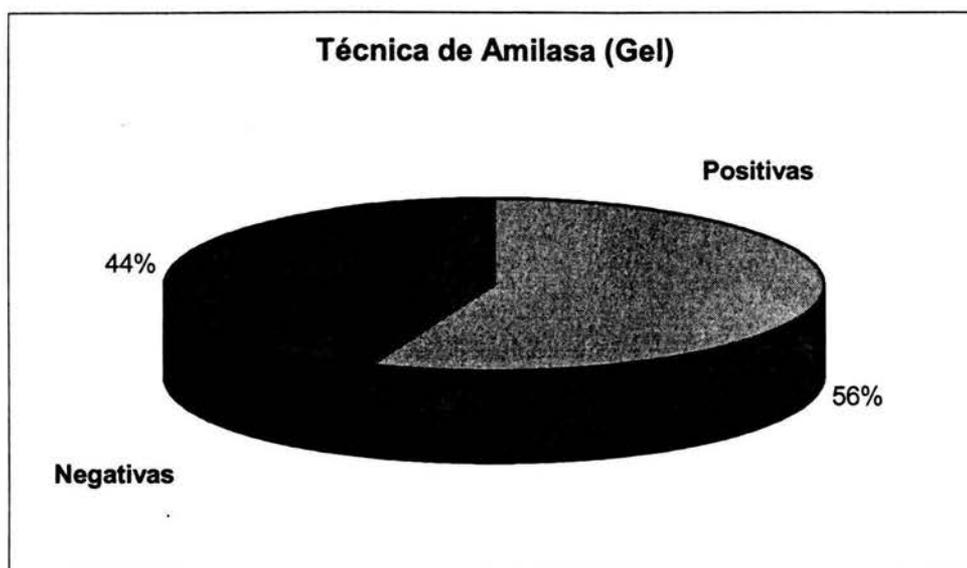
El levantamiento de saliva con la cinta adhesiva REMCO® se llevo a cabo de la misma manera que con sangre y saliva, obteniendo un total de 130 muestras.

### Técnicas de orientación

- **Amilasa**

La técnica de amilasa se basa en una reacción de degradación del almidón por la amilasa salival. Se realizo en gel de agarosa-almidón sin tener que modificar en nada la técnica y corriendo siempre de manera simultánea controles positivos y negativos.

Muestras analizadas	25
Muestras Amilasa positiva	14 (56%)
Muestras Amilasa negativa	11 (44%)



Debido a la baja reproducibilidad y eficacia de está técnica, se le realizo una modificación tratando de mejorarla, llevándola a cabo en una solución de almidón al 1%, la cual se le realizo a 20 muestras con sus controles positivos y negativos respectivos:

Muestras analizadas	25
Muestras Amilasa positiva	25 (100%)
Muestras Amilasa negativa	0

**Falta página**

**N° 75**

## **Conclusiones**

La cinta adhesiva REMCO® brinda una forma fácil, segura y efectiva de levantamiento de indicios biológicos secos encontrados en la escena del crimen sobre superficies lisas y poco porosas.

El levantamiento de sangre con la cinta REMCO® es ampliamente recomendado ya que además de permitirnos un levantamiento sencillo, rápido y evitando cualquier tipo de contaminación, además nos brinda una muestra que cede a un estudio mas detallado de la dinamica de la gota en el laboratorio ya que en casi todos los casos mantiene la forma original del lugar de los hechos.

En el caso de muestras de semen con la cinta REMCO® también presentan una alta efectividad para su estudio criminalístico permitiéndonos llevar a cabo todas las reacciones necesarias para asegurar que se trata de semen y además obtener el perfil genético del individuo para que a través de una confronta identifiquemos al malhechor.

Para muestras de saliva en las que no sea necesario llevar a cabo una reacción de orientación, esta técnica de levantamiento permite recuperar células requeridas para poder obtener el material genético necesario para lograr identificar al perpetrador del crimen. Si no se estuviese seguro de que la muestra es saliva, no recomendaría el levantamiento con esta cinta a menos que se omitiera la reacción orientativa y se tratara directamente de recuperar células de ella.

## SUGERENCIAS

Con el fin de mejorar este trabajo, facilitar y perfeccionar la técnica de recolección de indicios biológicos que en este reporte se sugiere, se pueden realizar los siguientes ensayos:

- Probar la efectividad de levantamiento de indicios biológicos en superficies porosas y/o absorbentes.
- En los casos que se reportan problemas para la recolección del indicio debido a la porosidad del soporte como madera sin barnizar, pisos y paredes con pintura o impermeabilizantes, etc., rehidratar levemente el indicio y después de unos minutos intentar llevar a cabo el levantamiento.
- Colocar en condiciones mas extremas las muestras recolectadas con la cinta, así como almacenarlas por un periodo mayor de tiempo para determinar el tiempo máximo en que se puede mantener sin degradación el material recuperado.
- Investigar una técnica orientativa para saliva que no genere falsos positivos como la Técnica de Amilasa y así poder recomendar ampliamente el uso de la cinta REMCO® para la recolección y embalaje de este indicio.
- Complementar el análisis de la degradación del material genético con un estudio de ADN mitocondrial.
- Realizar un análisis meticuloso de la cinta adhesiva REMCO® con el fin de saber su composición por completo.
- Llevar a cabo una comparación estadística entre el levantamiento de indicios tradicional (con hisopo) y el levantamiento con la cinta adhesiva REMCO®.

## Resumen

En la criminalística, es de gran relevancia el poder analizar de la mejor manera posible, cualquier muestra encontrada en el lugar de los hechos con el fin de esclarecer si existe la participación de uno o varios individuos además de la víctima y a su vez, tratar de obtener un perfil genético que nos permita identificar por completo y evidenciar al malhechor para así lograr resolver estos casos.

Para esto, se realizó la validación de esta técnica de levantamiento de indicios en el lugar de los hechos con los fluidos más comunes en crímenes violentos y/o sexuales (sangre, saliva y semen).

Primero se realizó el mismo tipo de levantamiento para los tres indicios en el lugar de los hechos con la cinta adhesiva en estudio, pero para lograr comprobar su efectividad se llevan a cabo las reacciones específicas utilizadas en la Química Legal para esclarecer un delito.

En el caso de la sangre, se colocó por goteo en diferentes superficies. Las muestras fueron expuestas a diferentes temperaturas y recuperadas del sustrato original en diferentes tiempos por medio del uso de la cinta REMCO®. Las manchas hemáticas recuperadas fueron protegidas con un doblez de la misma cinta y se almacenó para posteriormente ser analizado.

Para saber si la mancha se trata de sangre o no se le realiza una técnica de orientación. En este caso se realizó la reacción de fenoftaleina que es una técnica de observación de color. Con el fin de conocer el origen, humano o animal (Técnica de determinación de especie) se realizó la reacción conocida como de Precipitinas que se fundamenta en una reacción antígeno-anticuerpo. Posteriormente se realizó la determinación de grupo sanguíneo por la técnica de Adsorción-Elución que es especial para manchas hemáticas secas y por ultimo se realiza la tipificación que es un proceso metodológico que a grandes rasgos se divide en 3 etapas: extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico), cuantificación y amplificación por la Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en ingles PCR-Polimerasa Chain reaction) y secuenciación por electroforesis capilar) para lograr obtener el perfil genético del perpetrador del crimen.

El segundo indicio es el semen, de igual manera, primero se debe de asegurar que se trate de semen con técnicas presuntivas en este caso se determinó con la técnica de fosfatasa ácida que se fundamenta en que esta enzima está presente en concentraciones muy altas en el líquido seminal. En orden consecutivo se lleva a cabo la observación microscópica de espermatozoides lo que con certeza nos confirma si es o no semen. Posteriormente se realizó la determinación de su origen con la técnica de Precipitinas y se procedió a la tipificación con la amplificación por PCR, la cuantificación por electroforesis en gel y la secuenciación por electroforesis capilar.

A las muestras de saliva se les realizó la técnica orientativa de amilasa la cual se aprovecha, para seguir la degradación del almidón por  $\alpha$ -amilasa salival, ya que el almidón forma un complejo azul con iodo, cosa que no pueden hacer los productos de su degradación. La observación microscópica de células bucales se considera como una técnica confirmativa que además nos asegura si será o no posible según el número de células observadas la extracción del material genético para la amplificación por PCR y su respectiva secuenciación.

## ANEXO 1

### REACTIVOS

#### 1. Solución de Bencidina

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

2.  $H_2O_2$  al 3%; almacenar en frasco gotero ámbar.

#### 3. Solución de fenolftaleína:

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

Disolver estas sustancias y colocarlas a reflujo con el polvo de zinc hasta completa decoloración. Esta solución madre deberá añadirse polvo de zinc.

#### 4. Solución de trabajo de fenolftaleína:

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

#### 5. Reactivo de Teichmann.

Cloruro de sodio	0.1 g.
Bromuro de potasio	0.1 g.
Yoduro de potasio	0.1 g.
Ácido acético c.b.p.	100 ml.

#### 6. Mezcla de reacción para el ABI Prism 310

- Preparar la mezcla con:  
(1  $\mu$ L ILS600 x muestra) + (24  $\mu$ L de formamida x muestra)  
Agitar en vórtex
- Mezclar 25  $\mu$ L de la mezcla con 1  $\mu$ L de muestra amplificada
- El control se trabaja con:  
25  $\mu$ L de la mezcla + 1  $\mu$ L Allelic ladder mix
- Desnaturalizar las muestras con calor a 95° C durante 3 minutos
- Inmediatamente colocar en frío (hielo) durante 3 minutos
- Colocar en el aparato para llevar a cabo la corrida

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## 7. ABI Prism 3100

- Preparar la mezcla con:  
(1  $\mu\text{L}$  ILS600 x muestra) + (9  $\mu\text{L}$  de formamida x muestra)  
Agitar en vórtex
- Mezclar 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla con 1  $\mu\text{L}$  de muestra amplificada
- El control se trabaja con:  
10  $\mu\text{L}$  de la mezcla + 1  $\mu\text{L}$  Allelic ladder mix
- Desnaturalizar las muestras con calor a 95° C durante 3 minutos
- Inmediatamente enfriar en hielo frapé durante 3 minutos
- Colocar en el aparato para llevar a cabo la corrida

## 8. Mezcla maestra de amplificación por PCR del Kit de Power Plex (16 system) de Promega\*.

<b>Componentes de la mezcla maestra para PCR</b>	<b>Volumen por muestra.</b>
Agua libre de nucleasa	16.7 $\mu\text{L}$
Gold star 10X buffer	2.5 $\mu\text{L}$
Power plex 1610X Primer pair mix	2.5 $\mu\text{L}$
Ampli taq Gold ADN polymerasa	0.8 $\mu\text{L}$

Volumen total de la mezcla maestra: 22.5  $\mu\text{L}$

Volumen de muestra de ADN a añadir: 2.5  $\mu\text{L}$

---

Volumen total de mezcla: 25  $\mu\text{L}$

## 9. Mezcla maestra de amplificación por PCR del Kit de Identifiler de Applied Biosystems\*.

<b>Componentes de la mezcla maestra para PCR</b>	<b>Volumen por muestra.</b>
Amp F/STR PCR Reaction Mix	10.5 $\mu\text{L}$
Ampli Tag Gold ADN Polimerasa	0.5 $\mu\text{L}$
AmpF/STR Identifiler Primer Set	5.5 $\mu\text{L}$

Volumen total de la mezcla maestra: 10.5  $\mu\text{L}$

Volumen de muestra de ADN a añadir: 1.5  $\mu\text{L}$

---

Volumen total de mezcla: 25  $\mu\text{L}$

#### 10. Gel agarosa-almidón.

Agarosa-almidón (9:1)	0.45 g.
Solución salina estéril	50 mL.

#### 11. Solución de almidón al 1%.

Disolver 1 g de almidón en 100mL de solución salina estéril.

#### 12. Rojo rápido nuclear.

Rojo Rápido Nuclear.....	50 mg
Sulfato de Aluminio .....	2.5 g
Agua destilada .....	100 ml

Calentar el agua destilada a ebullición en un vaso de precipitado de 500 ml y agregar el sulfato de aluminio agitar, posteriormente agregar el rojo rápido nuclear agitar, dejar enfriar y filtrar con papel Watman de numero 1 rotular.

#### 13. Verde Índigo Carmín.

Ácido pícrico.....	1.3 g
Índigo Carmín.....	0.23 g
Agua destilada.....	100 ml

A un vaso de precipitado de 500 ml con agua destilada agregar ácido pícrico, agitar y posteriormente agregar índigo carmín agitar y guardar en un frasco color ámbar.

#### 14. Cristal Violeta 0.5% p/v.

Disolver 0.5g de cristal violeta en 100 mL. de de agua destilada o desionizada. Almacenar en refrigeración (2 a 8° C).

#### 15. Buffer de digestión.

Mezclar 1 mL. de Tris HCl 1M, pH 7.5, 2 mL. de EDTA 0.5M, 1 mL. de NaCl 5M, 10 mL. de SDS al 20% p/v y 86 mL. de agua destilada.  
Almacenar a temperatura ambiente.

#### 16. EDTA 0.5M pH 8.0

Lentamente agregue 186.1 g de tetracetato etylendiamina disodica 2H<sub>2</sub>O a 800 mL de agua desionizada. Agite vigorosamente con un agitador magnético. Ajuste el pH a 8.0 añadiendo lentejas de NaOH (aproximadamente 20 g). Finalmente ajuste el volumen a un litro con agua desionizada. Esterilice en autoclave.

### **17. Proteinasa K. (10 mg/mL)**

Disolver 100 mg de Proteinasa K en 10 mL de agua destilada. Se recomienda tomar alícuotas de 0.5 mL para su manejo y guardar en congelación.

### **18. NaCl 5M**

Disolver 292.2 g NaCl en 800 mL de agua destilada. Ajustar el volumen final a 1 litro.

### **19. SDS 20% p/v.**

Precaución: Use máscara protectora al pesar SDS.

Lentamente disolver 200 g de sulfato de sodio dodecyl grado de electroforesis (ultra puro) en 800 mL de agua destilada. Para facilitar la disolución, la mezcla deberá ser calentada. Ajuste el volumen a un litro con agua destilada.

### **20. NaOH 10M**

Precaución: Esta reacción es exotérmica.

Lentamente disuelva 400 g de NaOH en 800 mL de agua destilada. Enfríe a temperatura ambiente y ajuste el volumen a un litro.

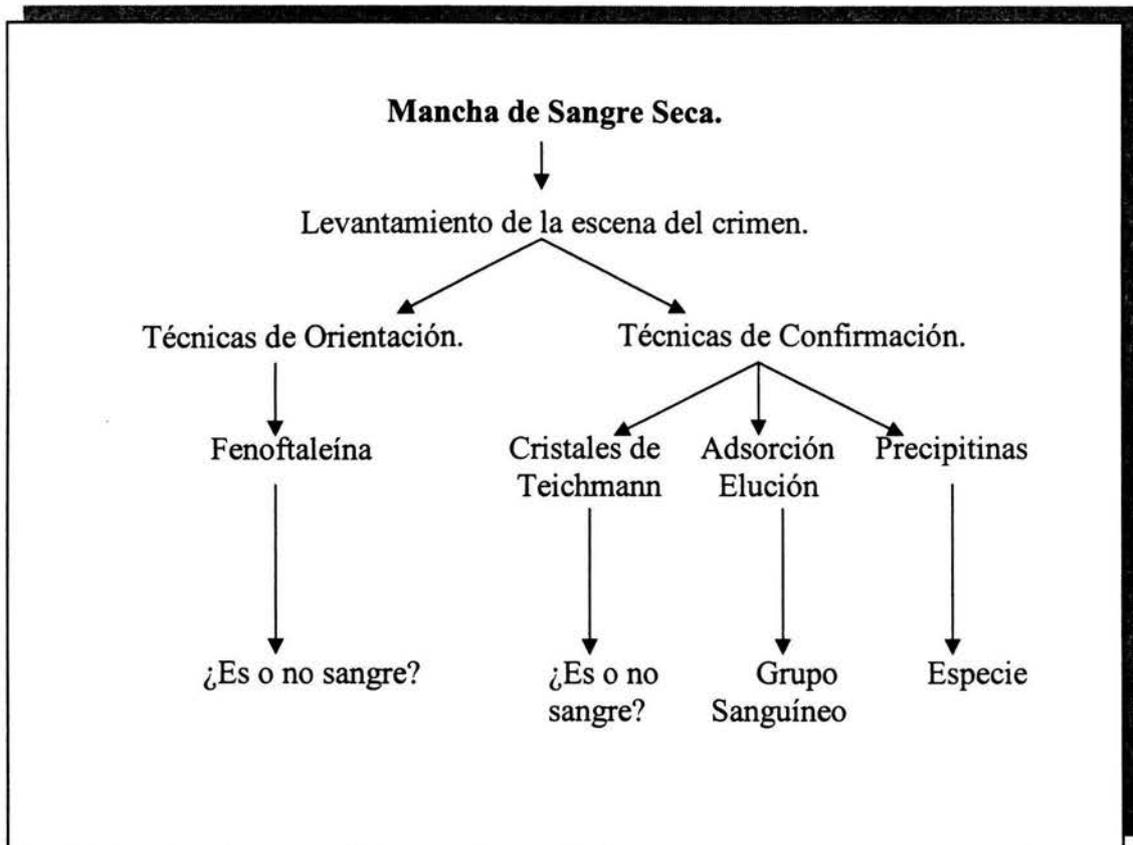
### **21. Tris HCL 1M pH 7.5**

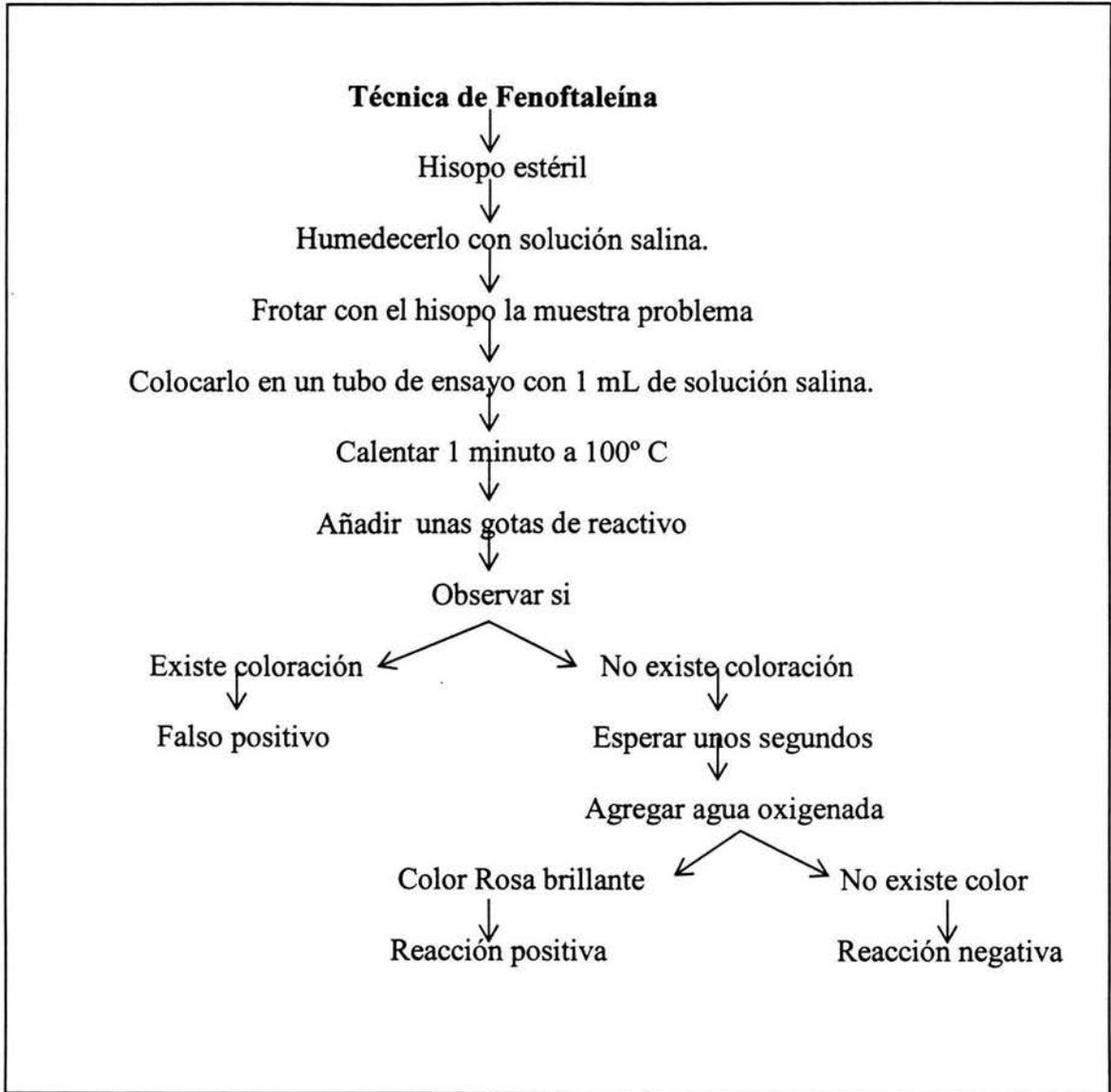
Disuelva 121.1 g de base Tris en 800 mL de agua destilada. Ajuste el pH a 7.5 a temperatura ambiente añadiendo HCl concentrado. (Aproximadamente 65 mL).

Ajuste el volumen final a 1 litro con agua destilada.

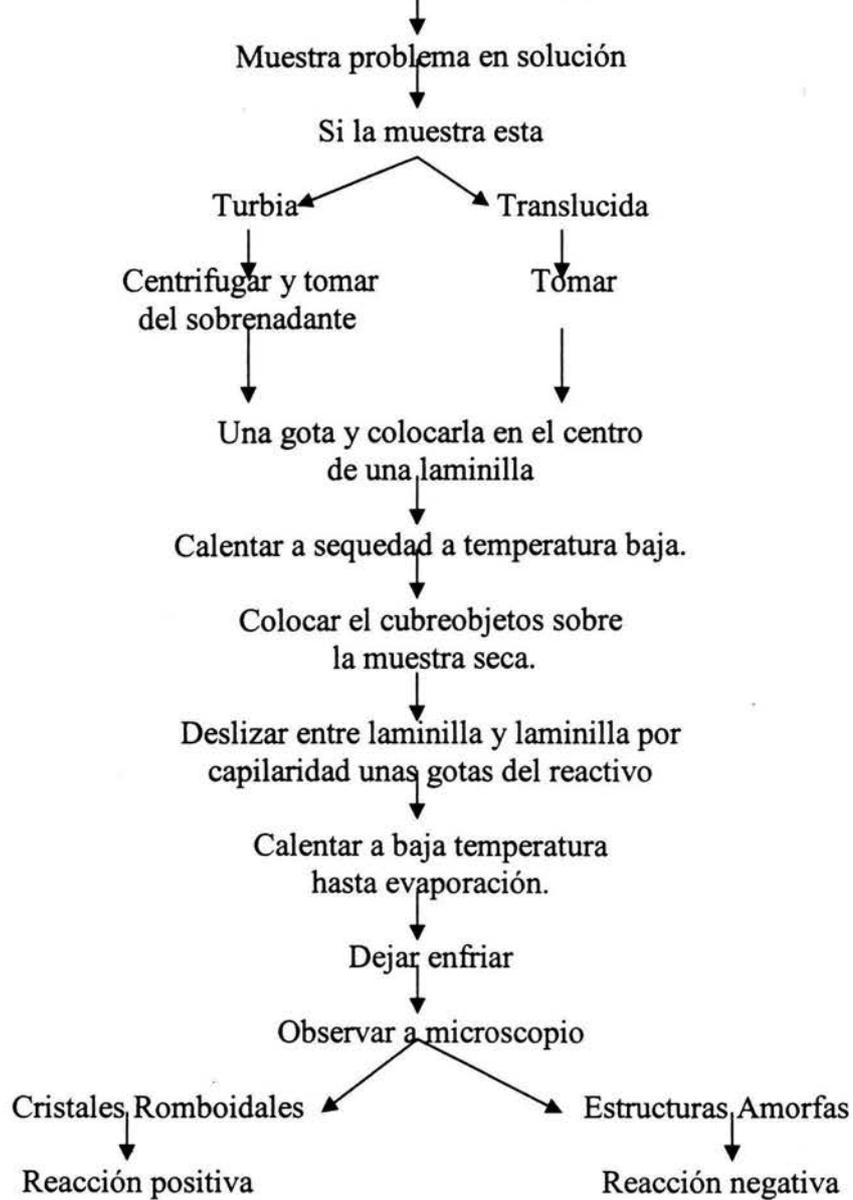
## ANEXO 2

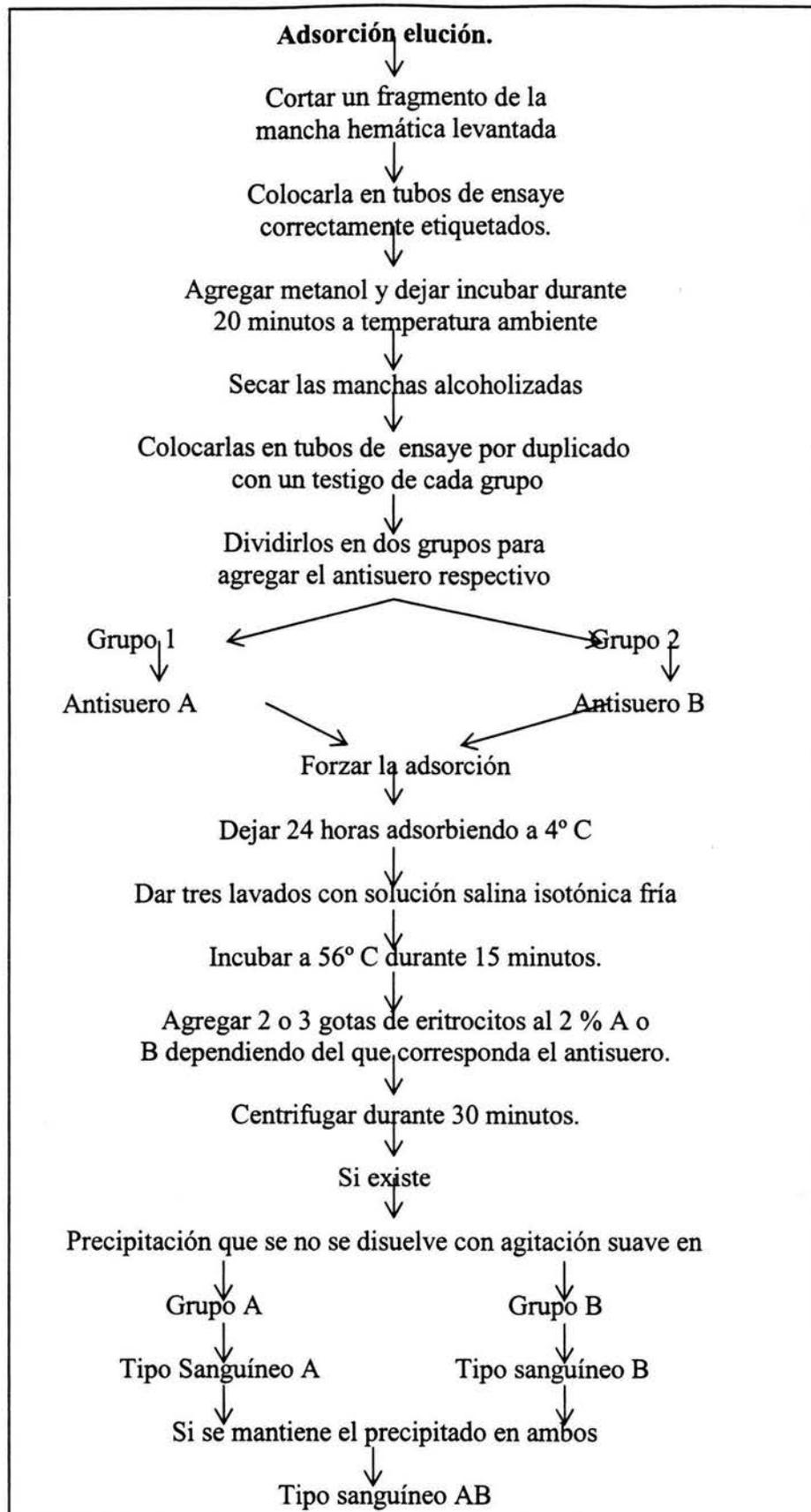
### ESQUEMATIZACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE LAS TÉCNICAS DE ORENTACIÓN Y CONFIRMACIÓN.

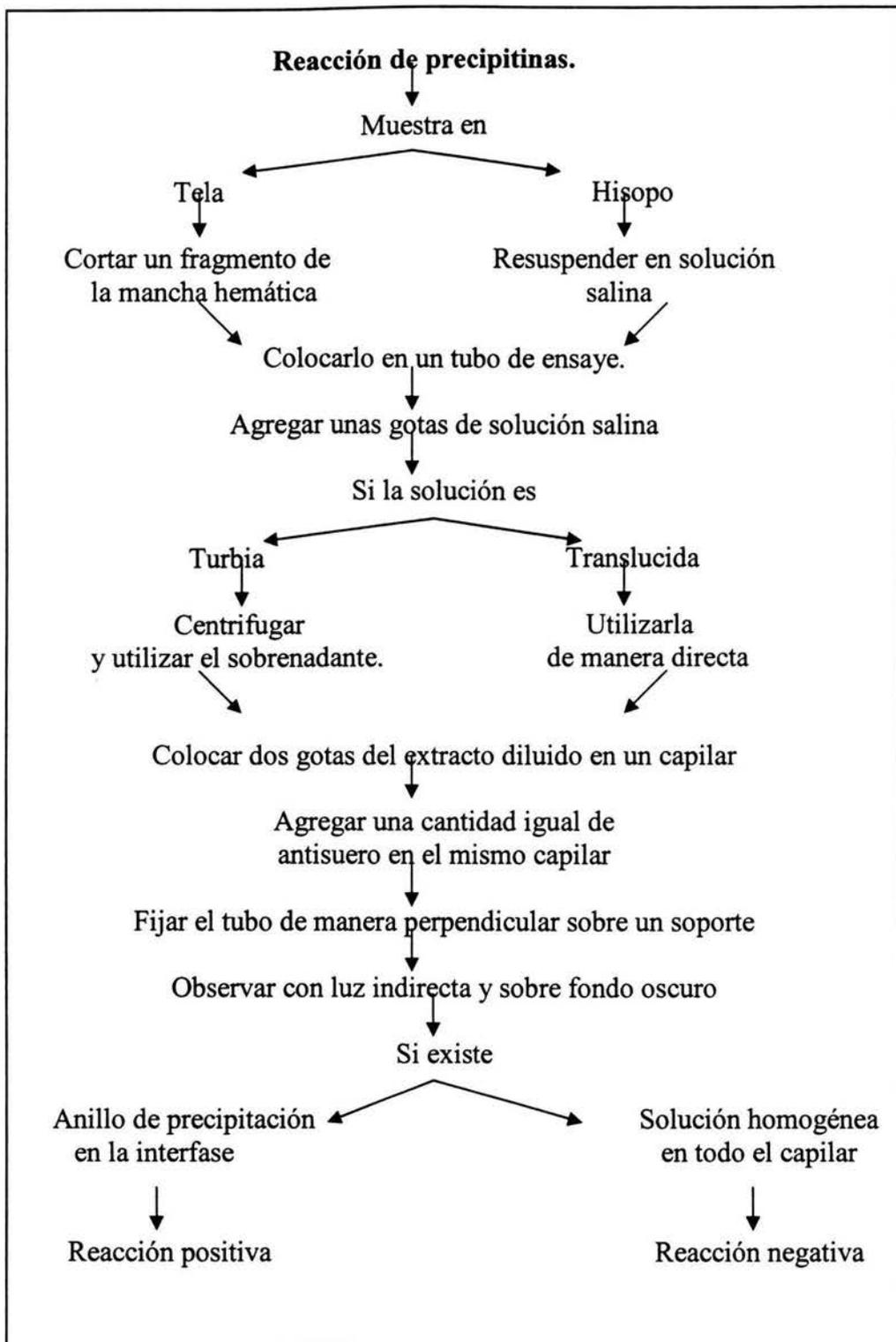




### Técnica de Cristales de Teichmann

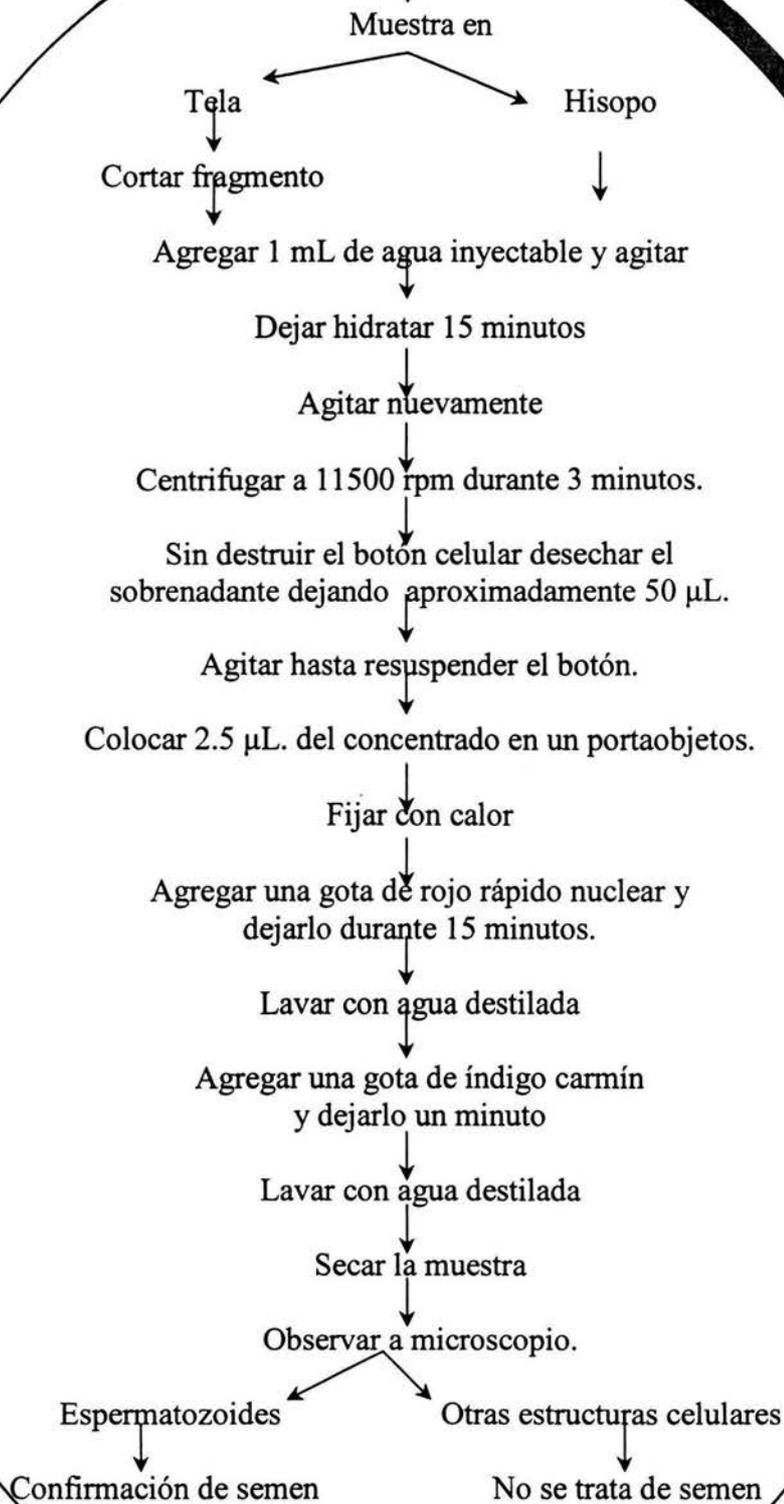


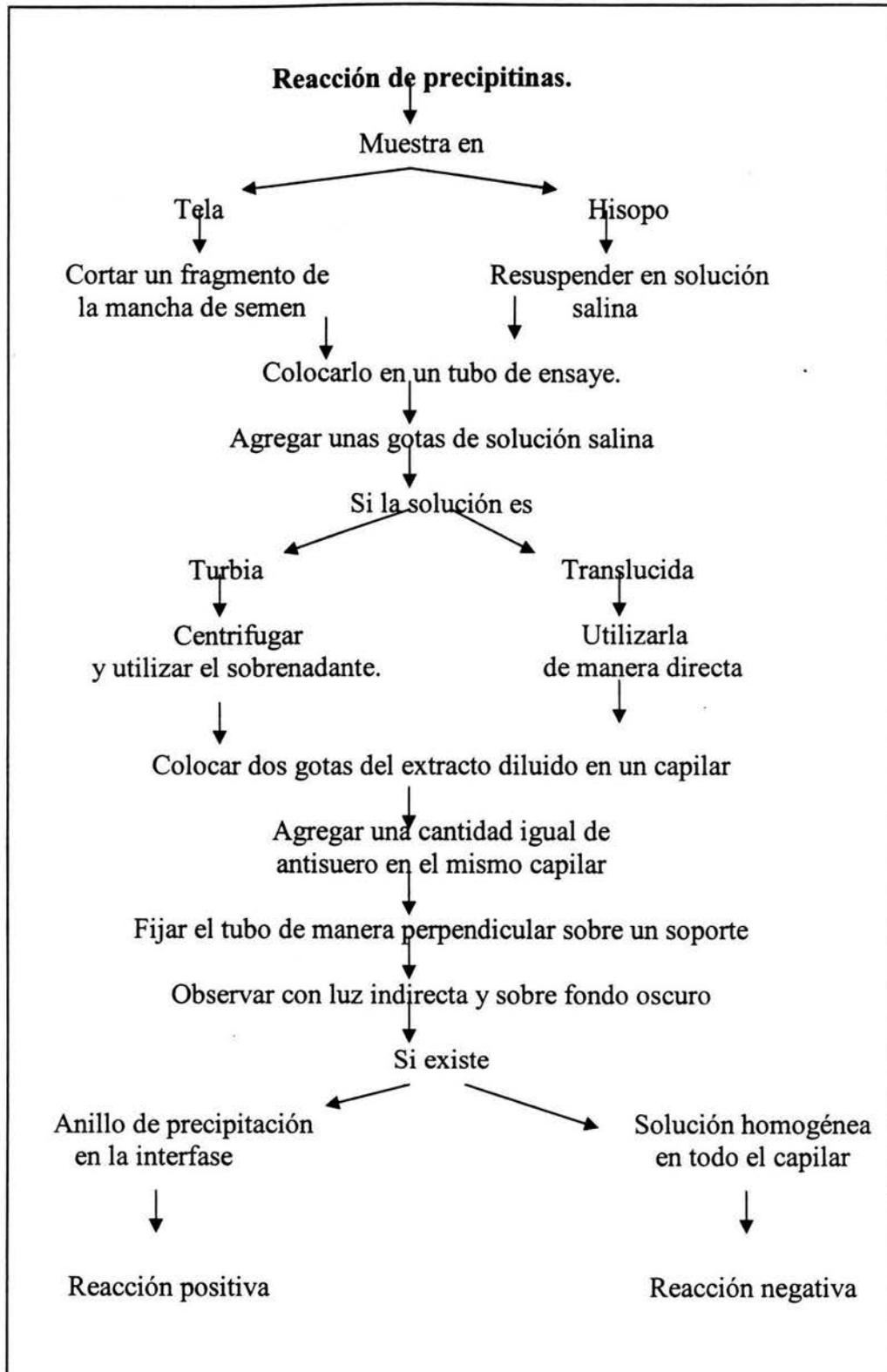






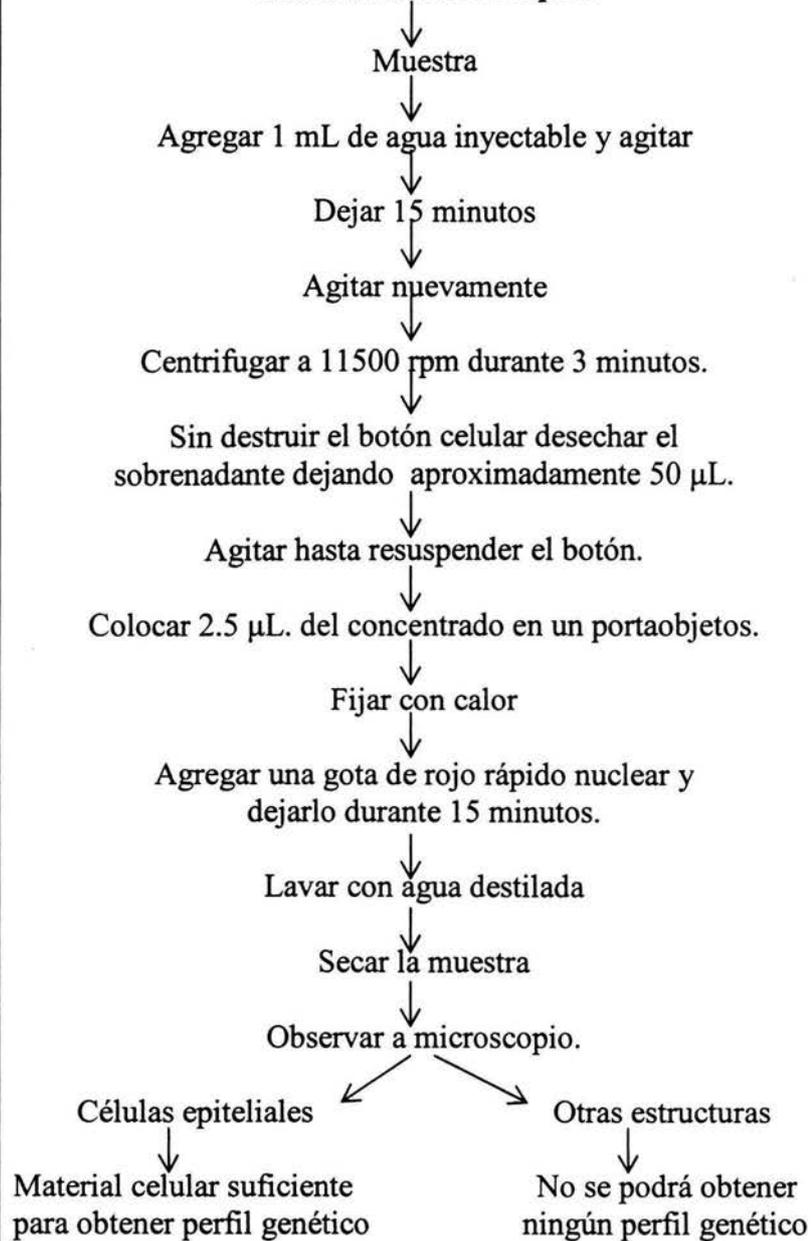
## Técnica de Microscópica





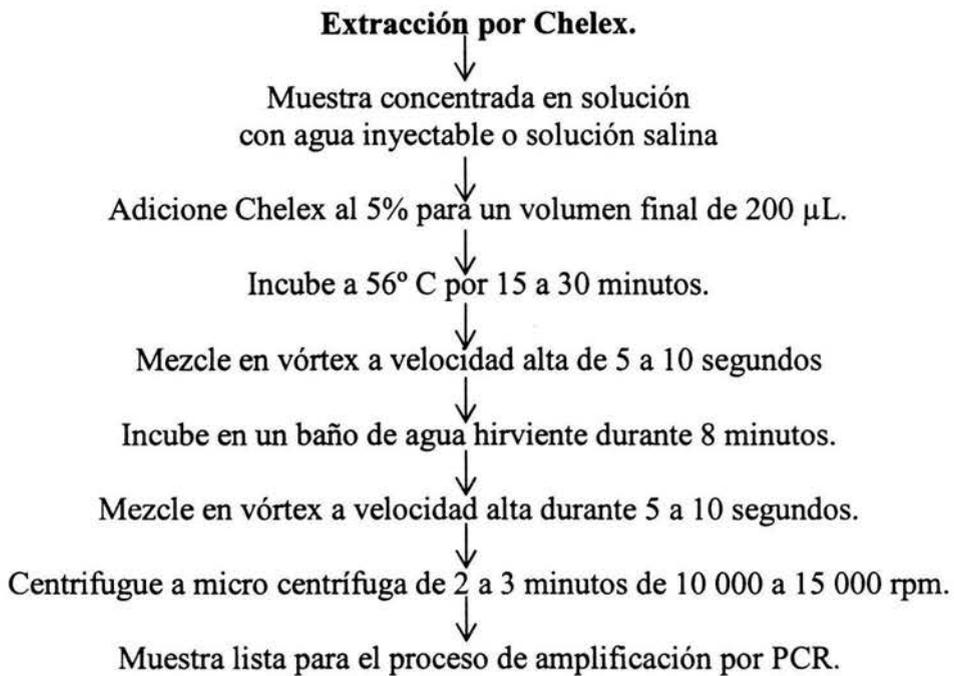


### Técnica de Microscópica





### Extracción de ADN



### **Extracción por Fenol - Cloroformo.**

↓  
A 500  $\mu$ L de muestra en solución  
con agua inyectable o solución salina

↓  
Agregar 220  $\mu$ L de buffer de digestión,  
20  $\mu$ L de proteinasa K y 12 de DTT.

↓  
Colocar en digestión por 30 minutos a 57° C.

↓  
Añadir aproximadamente el mismo volumen que  
el buffer de digestión de la mezcla de fenol-cloroformo

↓  
Agitar en vórtex durante 1 minuto.

↓  
Centrifugar por 15 minutos a 12000 rpm.

↓  
Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo de 1.7 mL.

↓  
Agregar una cantidad de alcohol absoluto  
aproximadamente del doble del volumen de la fase acuosa.

↓  
Centrifugar a 15000 rpm durante 30  
minutos a cero grados centígrados.

↓  
Decantar todo el contenido del tubo.

↓  
Agregar al tubo vacío, 100  $\mu$ L  
de agua libre de nucleasa.

↓  
Muestra lista para el proceso de amplificación por PCR.

## Tabla de Ilustraciones.

- Figura 1. Mecanismo de duplicación de ADN por polimerasa ADN <sup>(5)</sup>
- Figura 2. Diversas huellas de sangre originadas en la escena del crimen. <sup>(51)</sup>
- Figura 3. Huellas estáticas. <sup>(25)</sup>
- Figura 4. Manchas de sangre a diferentes alturas <sup>(25)</sup>
- Figura 5. Huellas de sangre animadas de movimiento lento. <sup>(25)</sup>
- Figura 6. Huellas de sangre animadas de movimiento rápido. <sup>(25)</sup>
- Figura 7. Huella sanguínea de goteo ininterrumpido <sup>(25)</sup>
- Figura 8. Huellas de sangre comúnmente encontradas en muros y paredes. <sup>(25)</sup>
- Figura 9. Dinámica del goteo sanguíneo. <sup>(25)</sup>
- Figura 10. Espermatozoide humano <sup>(11)</sup>
- Figura 11. Fotos del levantamiento de sangre con la cinta REMCO<sup>®</sup>. Del lado izquierdo cinta REMCO<sup>®</sup> sobre mancha hemática en superficie de loza y a la derecha gota levantada del lugar de los hechos.
- Figura 12. Oxidación-reducción de la bencidina. <sup>(11)</sup>
- Figura 13. Reacción de Oxidación reducción de la Fenofaleína <sup>(11)</sup>
- Figura 14. Fotografía de control positivo (hisopo con muestra hemática) observándose una clara coloración rosa brillante.
- Figura 15. Cristales de Teichmann <sup>(11)</sup>
- Figura 16. Fotografía de los Cristales de Teichmann (romboidales de color café oscuro).
- Figura 17. Esquema del procedimiento y fundamento de la reacción de adsorción elución para determinación de grupo sanguíneo en manchas de sangre seca. <sup>(11)</sup>
- Figura 18. Curva de comportamiento de la reacción antígeno anticuerpo en función de la concentración de ambos. <sup>(32)</sup>
- Figura 19. Fotografía de la Reacción de precipitinas. A la izquierda control negativo, en el centro dilución 1:1000 de la muestra, y a la derecha la muestra diluida 1:100.
- Figura 20. Modelo de ADN. <sup>(53)</sup>
- Figura 21. Fotografía de los equipos ABI 310 y ABI 3100.
- Figura 22. Esquema de los componentes del secuenciador ABI electroforesis capilar. <sup>(4)</sup>
- Figura 23. Electroferograma observándose el ladder (escalera alélica) y la secuenciación de dos muestras.
- Figura 24. Fundamento de la reacción de la fosfatasa ácida. <sup>(11)</sup>
- Figura 25. Fotografía del control positivo y negativo de la reacción de fosfatasa ácida
- Figura 26. Fotografía de la observación a microscopio de Espermatozoides teñidos con rojo rápido nuclear.
- Figura 27. Fotografía de la reacción de precipitinas. A la derecha control negativo, dilución 1:100 de la muestra de semen en el centro, y a la derecha la muestra de semen diluida 1:1000.

Figura 28. Micelas de amilosa. <sup>(18)</sup>

Figura 29. Estructura del almidón. <sup>(18)</sup>

Figura 30. Fotografía de la Reacción Amilasa en gel.

Figura 31. Fotografía en la que se observa del lado izquierdo la diferencia en la tonalidad de los tubos en control positivo, muestra levantada con la cinta REMCO<sup>®</sup> y el control negativo (almidón) y a la derecha curva de concentraciones de saliva desde 2 $\mu$ L hasta 10 $\mu$ L, observando la diferencia de coloración.

Figura 32. Fotografía que presenta las reacciones con falsos positivos en soluciones de la cinta REMCO<sup>®</sup> sin muestra.

Figura 33. Fotografía de la célula epitelial observada el microscopio (tinción con rojo rápido nuclear).

Figura 34. Electroferograma (ladder y dos muestras de saliva)

Figura 35. Fotografías de control negativo (lado izquierdo) y muestra levantada con la cinta REMCO<sup>®</sup> (lado derecho).

Figura 36. Fotografía en la que se observa a los extremos control positivo (izquierdo) y negativo (derecho) y en el centro la muestra mostrando un claro anillo de precipitación en la interfase de la muestra y el antisuero.

Figura 37. Fotografía de las muestras levantadas con la cinta REMCO<sup>®</sup> y sometidas a la reacción de la fosfatasa ácida con los respectivos controles positivo y negativo.

Figura 38. Fotografía de espermatozoides recuperados de la muestra levantada con la cinta REMCO<sup>®</sup> (tinción con rojo rápido nuclear).

## Glosario.

**Absorber:** Sorber, chupar, embeber, penetrarse, impregnarse. Parónimo adsorber,

**Adsorción elución:** Técnica aplicada para determinar grupo sanguíneo (ABO) en manchas de sangre seca.

**Absorción inhibición:** Técnica aplicada para determinar los secretores de grupo sanguíneo en fluidos biológicos y órganos.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico, material genético responsable de la transmisión de la herencia presente en cada célula del organismo.

**ADN Mitocondrial:** ácido desoxirribonucleico, material genético responsable de la transmisión de la herencia presente en las mitocondrias.

**Adsorción:** Fijación superficial de un gas o un líquido en un sólido.

**Aglutinógenos:** Producto del proceso de aglutinación antígeno-anticuerpo.

**Alelo:** Una de dos o más formas alternativas de un gen, cada uno con una secuencia de nucleótidos única; no obstante, los alelos diferentes de un gen dado, se reconocen generalmente por los fenotipos y no por la comparación de su secuencia de nucleótidos.

**Amilasa:** Diastasa contenida en la saliva, el jugo pancreático y algunos vegetales, que transforman el almidón en maltosa.

**Anticuerpo:** Sustancia producida en el cuerpo por la introducción de antígeno cuya acción reacciona específicamente.

**Antígeno:** Sustancia extraña que en el organismo puede estimular la formación de anticuerpos.

**Antropometría:** Método de identificación de delincuentes que se basa en la descripción del cuerpo humano (medidas, características, fotografías, huellas dactilares)

**Autosoma:** Cromosoma no sexual

**Bencidina:** Sustancia utilizada para detectar posible presencia de sangre.

**Balística:** Arte de calcular el alcance y dirección de los proyectiles.

**Cadena de custodia:** Registro fiel del curso seguido de los indicios desde su descubrimiento hasta su resguardo final.

**Cariotipo:** Dotación cromosómica de una célula u organismo, caracterizada por el número, tamaño y configuración de los cromosomas.

**Ciencias forenses:** Conjunto de disciplinas que auxilian a los órganos de justicia en la investigación de delitos.

**Código:** Conjunto de reglas para transferir información de un alfabeto o idioma a otro.

**Criminalística:** Ciencia que aplica el método y las técnicas de las ciencias naturales en la investigación de los delitos.

**Cromatografía:** Método físico-químico que permite separar los componentes de una mezcla.

**Cromosoma:** Estructura filiforme, hallada en el núcleo de la células, que contiene los genes en una secuencia lineal; molécula completa de ADN que comprende el genoma de una célula procariótica; molécula de ADN en complejo con histonas y otras proteínas en las células eucarióticas.

**Dactiloscopia:** Estudio de las huellas digitales con fines de identificación.

**Desnaturalizar:** Variar la forma, propiedades o condiciones de una cosa.

**Dictamen:** Opinión, juicio, parecer, informe.

**ADN polimerasa:** Enzima responsable de la síntesis del ADN a partir de trifosfatos de desoxirribonucleósidos bajo la dirección de un filamento molde de ADN.

**Duplicación:** Mutación cromosómica caracterizada por la presencia de dos copias de un segmento cromosómico en el genoma haploide.

**DTT:** 1,4 Ditiotreitól

**Electroforesis:** Técnica para separar moléculas basado en su movilidad diferencial en un campo eléctrico.

**Enzima de restricción:** Endonucleasa que reconoce secuencias de nucleótidos específicas en el ADN y que luego efectúa una ruptura del doble filamento de la molécula de ADN. El ADN de un organismo que posee esta enzima suele estar modificado en los sitios de reconocimiento, para evitar autorruptura, mediante un enzima modificador que reconoce los sitios y metila los nucleótidos específicos en cada sitio.

**Eritrocitos:** Corpúsculo o glóbulo rojo de la sangre; hematíe.

**Epistaxis:** se diagnostica por la posición, forma de la mancha y presencia del epitelio ciliado.

**Evidencia:** Certeza clara, manifiesta, de una cosa.

**Fenolftaleína:** Sustancia química en medio básico que permite detectar la posible presencia de sangre con una reacción colorimétrica.

**Fagocito:** Un leucocito que engloba y destruye las bacterias y otras células que llevan complejos antígeno-anticuerpo en sus superficies.

**Fenotipo:** Las características observables de un individuo, resultantes de la interacción entre el genotipo y el ambiente en el que ocurre el desarrollo.

**Fosfoglutamasa:** Enzima que se encuentra en los glóbulos rojos y que permite la individualización de la sangre.

**Gen:** En el genoma de un organismo, una secuencia de nucleótidos a lo que se le puede asignar una función específica.

**Genoma:** Contenido genético de una célula o virus.

**Grupo AB0:** Tipos en que se clasifica la sangre de los distintos individuos, en relación con las propiedades de aglutinación que se produce al mezclar éstas con los sueros específicos.

**Hematología:** Es el estudio de la sangre y de los tejidos formadores de la misma, y como tal constituye una rama separada de la ciencia médica.

**Hematemesis:** Contiene restos alimenticios y células del aparato digestivo. En manchas secas hay hematina ácida.

**Hemoglobina:** Sustancia contenida en los eritrocitos y que da el color rojo a la sangre.

**Ilícito:** No lícito. Que no está permitido por la ley.

**Indicio:** Material sensible significativo de un hecho delictuoso, que permite su reconstrucción así como la identificación de su(s) autor(es). Todo objeto, instrumento, huella, marca, rastro, señal o vestigio, que se usa y se produce respectivamente en la comisión de un hecho

**Iniciador o cebador:** Sustrato requerido para una reacción de polimerización y que es estructuralmente similar al producto de la reacción.

**Inmunoelectroforesis:** Método de estudio de fluidos biológicos por la separación de las proteínas por electroforesis y precipitación por la acción de inmunosueros.

**Leucocitos:** Glóbulos blancos de la sangre con función fagocitaria.

**Leucomalaquita verde:** Sustancia química usada para hacer pruebas preliminares de identificación de sangre en el lugar de los hechos.

**Locus:** Lugar un mapa genético en el que reside una mutación o un gen particular; a menudo se usa en lugar de mutación o gen.

**Lugar de los hechos:** Lugar donde ha ocurrido un ilícito.

**Luminol:** Sustancia química para detectar restos de manchas sanguíneas no visibles al ojo humano, gracias a su luminiscencia.

**Luminiscencia:** Emisión de luz como resultado de una causa externa o calor.

**Mácula:** Mancha.

**Método Científico:** Proceso lógico y ordenado que los estudiosos de la ciencia observan en el curso de sus investigaciones.

**Mitocondria:** Clase de organelo celular microscópico que contienen material genético y que se halla relacionado con el aporte de energía para las diversas funciones celulares.

**Paternalidad:** Lazo jurídico entre el padre y sus hijos.

**PCR:** Reacción en cadena de la Polimerasa.

**Polimerasa:** Enzima que reúne en una unidad mayor, o polímero, un número de subunidades similares o idénticas.

**RFLP:** restriction fragment length polymorphism.

**Saliva:** Humor acuoso y algo viscoso, segregado por las glándula de la boca.

**Sangre:** Fluido rojo, espeso que circula por el sistema vascular sanguíneo. Se compone de un plasma donde flotan glóbulos rojo o hematíes, glóbulos blancos o leucocitos y plaquetas.

**SDS:** dodecil sulfato de sodio

**Teichmann:** Técnica usada para identificar sangre, mediante la formación de cristales con derivados de la hemoglobina.

**VNTR:** variable number tandem repeats.

## Referencias.

1. Alex M. Garvin, Filtration Based DNA Preparation for Sexual Assault Cases J Forensic Sci, September 2003, Vol. 48, No. 5
2. Allery JP, Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. J Forensic Sci 2001;46
3. AmpFISTR® Identifiler™. PCR Amplification Kit. User's Manual Applied Biosystem
4. Applied Biosystems , ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, User Guide
5. Ayala J. F., Kiger J. A., (1984) Genética Moderna, Fondo Educativo Interamericano, Barcelona, España. Pag: 48, 58, 292-298.
6. Balazs, I., Baird, M., McElfresh, K., y Shaler R. (1990). Experimental techniques for the isolation and analysis of DNA from forensic materials. DNA in forensic science. Ellis Horwood: Inglaterra. 40-73.
7. Bernalde de Quiroz, Constancio. Panorama de la Criminología. Ed. José M. Cajiga Jr. Puebla-México, 1948. pp 91-92
8. Butler J. M., (2001), Forensic DNA Typing, Academic Press, Barcelona, Spain.
9. Butler John M. "Forensic DNA Typing" Academic Press London 2001 pp 205-206
- 10.
11. Franco de A. M., (1999), Hematología Forense, Ed. Porrúa, México, Pag. 1-7, 23-45
12. García Pelayo y Gros, Ramón. Pequeño Larousse Ilustrado. Ed. Larousse. México 1974. p.573
13. Gisbert y Manuel del Toro, Pequeño Larousse Ilustrado. Ed. Larousse. Paris 1998.
14. Gross, Hanns. Manual del Juez. Est. Tip. Viuda e hijos de M. Tello. Madrid-España. 1894. p.54
15. Gross. Op. Cit. Resumen general de los principales capítulos.

16. Lee C. H., Palmbach T., Miller M. T., Henry Lee's Crime Scene Handbook. Elsevier Academic Press.
17. Lee C. H., Tirmady F., (2003). Blood evidence – How DNA is revolutionizing the Way We Solve Crimes –. Perseus Publishing.
18. Lenninger A. L. (1985), Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular. Ediciones Omega, 10ª Reimpresión, 2ª edición, pag.: 268-272, 968.
19. López Calderón, Salvador. Criminología. No. 8. Ed. Tolloacan, S. A. Toluca-México, 1978. p. 40
20. Lorente M y Lorente JA (1994). La Medicina Clínica ante los indicios biológicos criminales y la identificación genética clínica: 113-115.
21. Martínez Jarreta Ma Begoña “La prueba de AND en Medicina Forense” MASSON. S.A Barcelona 1999. pp 309-313.
22. McCabe, E.R.B., Huang, Shu-Zhen, Seltzer, W. K y Law, M. L. (1987) DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: potencial applications to newborn screening. Hum. Genet. 75 213-216.
23. Miesfield R.L. Applied Molecular Genetics. John Wiley & Sons. 1999
24. Montagna C. P., The recovery of seminal components and DNA from the vagina of a homicide victim 34 days postmortem. J. Forensic Sci; JFSCA, Vol 41, No. 4 July 1996 pp. 700-702
25. Montiel Sosa J., “Criminalística”. Editorial Limusa Noriega-Editores. México 1993: pp. 85-98
26. Montiel Sosa, J. Criminalística para agentes del Ministerio Publico. Instituto de Formación profesional. México 1976. pp. 25-26
27. Montiel J. S., (1990). “Criminalística” Tomo 1. Ed. Limusa Noriega. 3ª Reimpresión México. Pag. 17-28, 33-39, 47-52.
28. Moreno González, Luis R. Manual de Introducción a las Ciencias Penales. Cap. La Criminalística. Secretaria de Gobernación. México, D. F. 1976. P. 344-345
29. Moreno González, Luis. Manual de introducción a la Criminalística. Ed. Porrúa, S.A. México 1977. p. 175
30. Moreno, G.R., (2000) “Los indicios biológicos del delito” Instituto Nacional de Ciencias Penales, México. Pág. 89.

31. Mullis, K. (1990). "Reacción en cadena de la polimerasa". Investigación y ciencia. No.165, 30-37.
32. Nason A., Biología. Limusa-Wiley. México 1969 p. 51
33. Perkin-Elmer (1997). User's manual "AmpFlstr Profiler. PCR amplification kit". The Perkin-Elmer Corporation. USA.
34. Rajamannar K., "Determination of the age of bloodstain using immunoelectrophoresis". Journal of Forensic Science 1977; 22(1):159-164
35. Revista Jalisciense de Ciencias forenses. Año 1 No. 01 Guadalajara, Jalisco Abril 2002. Instituto Jalisciense de ciencias forenses
36. Revista MD. Incorporation. México, D. F. 1976. numero de marzo, p. 58
37. Richard C. Li, Ph. D. and Howard A H., p. D., J.D., (2003), Using Hydrophilic Adhesive Tape for Collection of Evidence for Forensic DNA Analysis. J. Forensic Sci, JFS2003121\_486.
38. Roumagnac, Carlos. Los Criminales en México. Tip. El Fénix. México, 1904
39. Roumagnac. Op. Cit. p. 5
40. Sambrook J. "Molecular Cloning" A laboratory manual, Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press New York 1989
41. Simonín, Camilo. Medicina Legal Ed. JIMS. Barcelona-España., 1966. p. 812. Cap. Criminalística
42. Singer-Sam, J., Tanguay, R., "Use of Chelex to Improve the PCR Signal from a small number of Cell", in amplifications. A forum of PCR users, Sept. 1989. Issue 3.
43. Sirchie Finger Print Laboratories, Inc., (1995). Seminal Fluid Field Test Kit; Cat. No. SF298
44. Sodi Pallares, Ernesto; Palacios Bermúdez, Roberto y Tibón, Gutierre. La Criminalística y su importancia en el campo del Derecho. Populibros la Prensa. México1970. p. 4
45. Sueros hemoagrupadores anti A, B, AB, para pruebas en tubo o con placa. Ed. Organización de Reactivos Biológicos e inmunología.

46. Sweet D, Lorente M., Lorente J. A., Valenzuela A., Villanueva E., PCR-based DNA typing of saliva stains recovered from human skin. *J. Forensic Sci*; 1997; 42(3):447-451
47. The Perkin-Elmer Corporation, (1993), *Ampli Type User Guide Version 2*
48. Tortora G. J., Grabowski R. S., (1998), *Anatomía y Fisiología*. Harcourt Brace, 7ª edición, Madrid, España. Pag.: 567-588, 692, 772-774, 934.
49. Vandenberg N., van Oorschot R. A. ., Mitchell R. J., An evaluation of selected DNA extraction strategies for short tandem repeat typing. *Electrophoresis* 1997, 18, 1624-1626.
50. Villareal Rubalcaba, *Apuntes de Criminalística*. Multicopiados. México 1969. p. 8.
51. [www.peelpolice.on.ca/FFIS/Fimages/Fflow.jpg&size=7.8kB&name=flow.jpg&rcurl=http%3A%2F%2Fwww.peelpolice.on.ca/FFIS/FBloodPat.html&rurl=http%3A%2F%2Fwww.peelpolice.on.ca/FFIS/FBlood-Pat.html&p=blood+patterns&type=jpeg&no=3&tt=200](http://www.peelpolice.on.ca/FFIS/Fimages/Fflow.jpg&size=7.8kB&name=flow.jpg&rcurl=http%3A%2F%2Fwww.peelpolice.on.ca/FFIS/FBloodPat.html&rurl=http%3A%2F%2Fwww.peelpolice.on.ca/FFIS/FBlood-Pat.html&p=blood+patterns&type=jpeg&no=3&tt=200). **Blood Spatter Interpretation**
52. [www.adam.com/urac/edrev.htm](http://www.adam.com/urac/edrev.htm)
53. [www.corbis.com](http://www.corbis.com)