

Excelentísimo Señor Director de la Real Academia de Farmacia
Excelentísimos Señora y Señores Académicos
Señoras y Señores

Doy gracias a Dios por haberme concedido realizar la ilusión de toda mi vida profesional, la de formar parte como Académico de Número de esta Real Academia de Farmacia, en la que el día de hoy tomaré posesión después de leer este discurso.

Quiero, en primer lugar, expresar mi agradecimiento a los Académicos, amigos entrañables que en su día me propusieron como candidato, Excelentísimos Señores don Manuel Lora Tamayo, don Manuel Jáuregui González y don Emilio Fernández Galiano (quien además ha tenido la gentileza de contestar a mi discurso, demostrando la amistad sincera de muchos años).

Asimismo, mi agradecimiento a su Director, a su Secretario Perpetuo y a todos los Académicos que me eligieron, y que depositaron su confianza en mi persona.

En el capítulo de agradecimientos, quiero destacar, de forma especial, a mis compañeros del Instituto Nacional de Toxicología y a mis amigos de profesión, que me han ayudado, moral y materialmente, para que pueda llegar a celebrar en el día de hoy la culminación de mi carrera.

Quiero hacer constar, en el momento de comenzar este discurso,

el apoyo que he tenido siempre en mi familia, y que hoy tengo la alegría de verla aquí reunida.

El destino me lleva a suceder en esta Academia a uno de mis mejores y más queridos amigos, el Profesor Guillermo Folch Jou, con el que he compartido no sólo los problemas profesionales sino también las mismas aficiones. A ambos nos ilusionaba nuestro mar Mediterráneo, y muchas veces hemos hablado de barcos y de temas marineros.

El Profesor Guillermo Folch Jou nació en Madrid, el 19 de marzo de 1917. Estudió Bachillerato, primero en las Escuelas Pías de San Antón y después terminó su Bachillerato en el Instituto Cardenal Cisneros.

Estudió la carrera de Farmacia que termina en 1941 con Premio Extraordinario de licenciatura, y en 1943 es también Premio Extraordinario en el doctorado.

Ingresa como Profesor Auxiliar de Historia de la Farmacia en 1943, pasando a ser nombrado en 1950 Profesor Adjunto, ganando la cátedra de esta especialidad en la Facultad de Farmacia en 1954.

Ese mismo año fue nombrado Director del Museo de Historia de la Farmacia.

En 1954 obtuvo por oposición la plaza de Inspector Regional Farmacéutico en la Dirección General de Sanidad, puesto que ocupó hasta 1958, en que pidió la excedencia.

Es precisamente en esta época cuando de él recibo el máximo apoyo y es entonces cuando iniciamos nuestra amistad sincera, que duró durante toda su vida.

Obtuvo el número uno de las plazas de Inspector Farmacéutico Municipal. Fue premiado con la medalla de Julio Conci por la Academia de Historia de la Farmacia de Italia.

Fue galardonado con el Lauro del palatino por el Nobili Collegio Quimico Farmaceutico de Roma.

Fue miembro de diversas Academias, correspondiente de la de Farmacia de Barcelona, Académico de la Academia Internacional de Historia de la Farmacia, miembro correspondiente de la Sociedad de Historia de la Farmacia de París, socio de Honor de la Academia de Historia de la Farmacia del Perú, miembro de Honor de la Academia de Historia de la Farmacia de Brasil, colegiado de Honor del Nobili Collegio Quimico Farmaceutico de Roma, miembro de la Academia de Historia de la Farmacia italiana, presidente de la Sociedad Española de Historia de la Farmacia.

Es tanta y tan fructífera su labor científica que la enumeración de sus publicaciones nos llevaría todo el tiempo que tenemos disponible

para este discurso. Publicaciones, en su mayor parte referidas a la Historia de la Farmacia, a la que dedicó prácticamente su vida, compartida con la dirección del Museo de Historia de la Farmacia, del que fue impulsor para gloria de la Farmacia Española.

Rindo, pues, homenaje de admiración, cariño y afecto a este insigne farmacéutico, haciendo mías las palabras que él pronunció cuando tomó posesión como Académico de Número de esta Real Academia; refiriéndose a su antecesor, decía textualmente: «Es bien triste que para alcanzar una plaza de académico deba desaparecer quien la ocupa, junto a la alegría se une la tristeza de un recuerdo, el que yo le brindo en este momento, prometiéndole que haré cuanto me sea factible para honrar su medalla, pidiendo a Dios me ilumine para que no se note mucho la falta de aquel hombre».

INTRODUCCION

El tema que voy a desarrollar en este discurso recoge la experiencia personal en los laboratorios de Ciencias Forenses a los que he dedicado la mayor parte de los cuarenta y cinco años de mi vida profesional.

Los laboratorios químico-toxicológicos de hace cuarenta y cinco años se distinguían poco de los laboratorios de análisis químicos, en ellos se efectuaba marcha analítica de aniones y cationes, destrucción de materia orgánica, procesos de destilación, etc., lo que pudiéramos llamar la toxicología de «tubo de ensayo».

En el momento actual, el desarrollo de las técnicas instrumentales, acelerado por la incorporación de sistemas informatizados de recogida y tratamiento de datos, ha modificado la filosofía de todos los análisis químico-toxicológicos, y en general ha desarrollado los modernos laboratorios de investigación forenses.

De otra parte, los laboratorios de medicina legal han experimentado igualmente una evolución en los últimos años, ya que hoy día la biología forense puede resolver temas que hace años era imposible resolver, y así han experimentado variaciones importantes los temas clásicos de medicina legal, como son las manchas de sangre, manchas de esperma, investigación de paternidades, entre otros.

Queremos aclarar, no obstante, que el estudio de las ciencias forenses no constituye un estudio puramente químico, ni farmacológico, ni siquiera médico-legal, sino que comprende todo esto unido a la fisiología, patología, anatomopatología, microbiología y criminalística, todo ello puestos al servicio de la Justicia (352).

En un sentido estricto, para un buen número de autores (80, 207, 234) las investigaciones forenses estarían constituidas por el bloque de especialidades anteriormente reseñadas, de las que habría que separar exclusivamente las actividades del médico legista.

Así pues, la medicina legal y los laboratorios forenses serían los dos grandes campos de las ciencias auxiliares de la Justicia, englobando la investigación forense aquellas técnicas y ciencias fundamentalmente analíticas (312).

No pretendemos en este discurso hacer un estudio general y completo de las investigaciones forenses, sino que únicamente nos vamos a limitar a recoger las técnicas de uso más frecuente en la investigación de la toxicología y de la biología legal, que representen aportaciones realizadas por nuestro grupo de investigación, dando por consiguiente

menor importancia a la descripción de las técnicas en sí que a las variaciones que realizamos de las mismas en la práctica diaria, para de esta manera contribuir al desarrollo que en los últimos años tienen en el mundo los laboratorios forenses.

Dividimos este discurso en dos apartados:

PRIMERO. «ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION EN LAS CIENCIAS FORENSES EN ESPAÑA»

SEGUNDO. «MOMENTO ACTUAL DE LA INVESTIGACION EN LAS CIENCIAS FORENSES EN ESPAÑA»

Este segundo apartado lo dividimos a su vez de la siguiente forma:

A) INVESTIGACIONES QUIMICO-TOXICOLOGICAS EN EL LABORATORIO FORENSE:

I. PREPARACION DE MUESTRAS

- 1) Muestras de plasma
- 2) Muestras de sangre
- 3) Muestras de orina
- 4) Contenido de estómago
- 5) Vísceras

II. ESPECTROFOTOMETRIA

- 1) ULTRAVIOLETA
- 2) INFRARROJA
- 3) DE ABSORCION ATOMICA

III. CROMATOGRAFIA

- 1) EN CAPA FINA
- 2) DE GASES
- 3) DE LIQUIDOS

IV. ESPECTROMETRIA DE MASAS

V. INMUNOENSAYO

B) INVESTIGACIONES MEDICO-LEGALES EN EL LABORATORIO FORENSE:

I. INVESTIGACION DE MANCHAS DE SANGRE

II. INVESTIGACION DE MANCHAS DE ESPERMA

III. INVESTIGACION DE PATERNIDAD

IV. MUERTE POR SUMERSION

C) INVESTIGACION EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGIA

PRIMERO. «ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION EN LAS CIENCIAS FORENSES EN ESPAÑA»

Podemos considerar que la investigación forense en España comienza en la mitad del siglo XIX, y tiene su culminación en la creación de los laboratorios de medicina legal en 1886. La creación de estos laboratorios no constituye un hecho inesperado ni tampoco surgido de modo espontáneo, sino que procede de una larga y difícil gestación (191).

Queremos recordar que en aquella época el pensamiento médico se encontraba dominado por tres grandes escuelas, la anatomoclínica, la fisiopatológica y la etiopatológica (217). De estas escuelas, la de mayor importancia era la fisiopatológica, ya que ésta era la que predominaba en la escuela germánica (Munderlich, Liebermister, Stokes, Kussmaul, etc.). Esta escuela introduce la patología experimental en los laboratorios de análisis, para intentar cuantificar la significación y las alteraciones que se producen en el organismo como consecuencia de la enfermedad.

La investigación de laboratorio por la influencia de la escuela germánica pasa a constituir en la segunda mitad del siglo XIX la fuente más importante de los conocimientos médicos, físicos, químicos y biológicos. Por tal motivo, Ackerknecht la denominó medicina de laboratorio. En este sentido son esclarecedoras las palabras de Claudio Bernard, que decía: «yo considero al hospital sólo como el vestíbulo de la medicina científica, como el primer campo de observación en que debe entrar el médico, pero el verdadero santuario de la medicina científica es el laboratorio».

En España, el incremento de la medicina de laboratorio se desarrolla, precisamente, a final del siglo XIX, favorecido por la situación socio-política y económica de la época, que está definida por la decadencia de las naciones latinas y el auge en todos los campos, y en éste fundamentalmente, del mundo germánico y anglosajón, que preconiza la investigación de laboratorio.

Por otra parte, es evidente que, en aquella época, comienza a desarrollarse la industrialización, y como consecuencia comienza un gran desarrollo urbano. Todo ello influye considerablemente en el aumento de la criminalidad y sobre todo se crea una nueva política para la prevención e investigación de ella, y por esta razón, el desarrollo de la toxicología y la medicina legal científica.

La medicina legal en Europa es reconocida en el siglo XIX como especialidad independiente, merced a tres hechos fundamentales (88): el inicio de su enseñanza, la publicación de las primeras revistas propias y la aparición de especialidades dentro de su seno, como la toxicología y la psiquiatría.

En esta misma época, ya no sólo hay trabajos aislados de medicina legal, sino importantes obras que abarcan la medicina legal y también la investigación toxicológica, y así podemos citar los trabajos de Orfila (275), Casper (76), etc., que tuvieron una enorme divulgación e influencia, incluso en la medicina legal y toxicología de épocas posteriores.

La investigación toxicológica fue, por consiguiente, una rama que brotó de la medicina legal, constituyéndose esta especialidad en entidad propia gracias a la gran personalidad de Orfila, que puede considerarse como el padre de la toxicología, con su «Tratado de Toxicología», escrito en 1814.

En España hay varios autores que se ocupan de problemas médico-legales y toxicológicos, y aunque en las obras de ellos se publican unidas, hay una clara separación de ambas disciplinas.

Hemos de citar en este sentido a Campos, Delgado, González, Murillo, Lorente, Vidal y sobre todo a nuestro gran Pedro Mata, quien consolida en 1843 la enseñanza de la medicina legal y la toxicología en España.

A partir de entonces, la medicina legal fue enseñada en las escuelas de España de un modo digno, mereciendo incluso los elogios de Orfila.

Pese a estos avances, Mata critica al gobierno o a sus asesores, que no vislumbraron la importancia de la medicina legal y la toxicología, y señala la existencia de algunas disposiciones anteriores a 1854, que redujeron a un cuatrimestre la enseñanza de estas disciplinas.

La primera consecuencia de esta enseñanza insuficiente era la falta de formación de especialistas, de aquí que la Justicia tenía que recurrir a echar mano del primer cirujano que encontraba para resolver cualquiera de los múltiples problemas médicos que pudieran plantearse. Por otra parte, la falta de todo tipo de estímulo económico o profesional era un factor más para mantener en embrión y sin desarrollarse a la medicina forense española. «El ánimo se aflige –dice Mata– al contemplar que en el siglo XIX, con tantos adelantos como ha hecho la medicina legal científica de laboratorio en otras naciones, nosotros nos encontramos a la altura de la nación francesa en el siglo XVI.»

En 1855, el gobierno nombró una comisión encargada de elaborar un proyecto sobre el pretendido cuerpo de médicos forenses. Tras el estudio y modificación por parte del Gobierno del Proyecto redactado, se organizaron los médicos forenses por un Real Decreto de 13 de mayo de 1862, que daba cumplimiento a lo dispuesto en la Ley de Sanidad de 28 de noviembre de 1855, y que fue modificado parcialmente por un R. D. de 31 de marzo de 1863.

Sin embargo, no mejoraron en absoluto las peritaciones médico-legales que requerían análisis de laboratorio, es decir, las investigaciones toxicológicas en aquella época estaban completamente desvalidas, aunque desde octubre de 1858 a julio de 1868 funcionó para «analizar todas las materias que los juzgados del Reino creyeron que debían ser sometidas a análisis químicos» una comisión formada por el Catedrático de Medicina Legal y Toxicología de Madrid, por el Catedrático de Historia de la Medicina (que anteriormente lo había sido de Química y Física Médicas) y por el ayudante de esta cátedra.

El Decreto de 13/5/1862, en su artículo 19, autorizaba a los jueces de primera instancia a servirse para estos análisis del farmacéutico, y el artículo 21 indicaba que para los casos de consulta intervendrían el Catedrático de Medicina Legal y el de quinto año de Farmacia, de cualquiera de las universidades.

Pero los catedráticos, así como los farmacéuticos, se negaban con frecuencia a desempeñar este servicio sin remuneración, y, por ello, la antigua comisión, que debía haber cesado en sus funciones a partir de este decreto, continuó en la práctica realizando análisis toxicológicos, pero también sin remuneración. Al cabo de seis años (julio de 1868), cuando se le adeudaban más de quinientos análisis, se negaron a continuar trabajando en tal situación.

Desde julio de 1868 hasta julio de 1886, en que se crean los laboratorios de medicina legal, transcurren dieciocho años de verdadero caos en materia pericial. Transcribimos las palabras de Mata, que son suficientemente gráficas en tal sentido: «andan (los jueces) de un lado a otro buscando quien practique análisis; la antigua comisión se niega, se niega la nueva, se niega la mayor parte, por no decir todos los farmacéuticos, bajo el pretexto de que les faltan los utensilios y reactivos necesarios, se han negado catedráticos de varias universidades, y si no estamos mal informados ha estado reducido ese grande y trascendental servicio a un farmacéutico de esta Corte».

Con la creación de estos laboratorios, y tal como se expone en el preámbulo del R. D. de 11 de julio de 1886, se ve la necesidad de que exista una unidad de criterio científico en los análisis, así como el que sean realizados por personal especializado debidamente remunerado y dotado con todos los medios de investigación necesarios, y en su articulado se recoge:

– Que se realizarán en dichos laboratorios las operaciones de análisis químicos, evacuarán las consultas y verificarán las investigaciones médico-legales que, exigiendo el concurso de las ciencias físico-químicas y naturales, les sean encomendadas.

– Se dan normas para la remisión de muestras, análisis y elaboración del dictamen o declaración con los resultados.

Como puede verse, desde 1886 existe ya una verdadera investigación toxicológica y de ciencias forenses en España, e incluso existe una especialización, ya que, aparte del director, que ha de ser médico, hay dos profesores más: uno, especializado en Ciencias Físicas, Químicas o en Farmacia, o ingeniero especializado en la rama de Química, y otro, profesor especializado en Ciencias Naturales.

Así comienza la investigación forense en España, pero su desarrollo importante se efectúa a partir de la década de 1950, con la implantación de las modernas técnicas instrumentales en estas investigaciones.

SEGUNDO. «MOMENTO ACTUAL DE LA INVESTIGACION EN LAS CIENCIAS FORENSES EN ESPAÑA»

A) INVESTIGACION QUIMICA TOXICOLOGICA EN EL LABORATORIO FORENSE

La Química Forense se ocupa de aquellos casos judiciales para cuyo esclarecimiento se hace necesario un análisis químico, es decir, es la química analítica al servicio de la Justicia.

El desarrollo de las técnicas instrumentales, como anteriormente decía, a partir de 1950, acelerado posteriormente por la incorporación de sistemas informatizados de recogida y tratamiento de datos, ha modificado la filosofía de todos los análisis químicos toxicológicos, y ha provocado una auténtica revolución en el planteamiento y diseño de los modernos laboratorios de toxicología.

I. PREPARACION DE MUESTRAS

La técnica analítica, escogida de acuerdo con la muestra y el tóxico a analizar, es la que gobierna todos los procesos de extracción y purificación que tienen lugar en el laboratorio.

Debemos hablar más de tratamiento o preparación de la muestra que del clásico binomio extracción-purificación, ya que las largas marchas extractivas generales están prácticamente desterradas del laboratorio toxicológico moderno.

Como creemos que la característica diferencial del laboratorio químico forense es el tipo de muestras que maneja, vamos a exponer brevemente los métodos utilizados por nosotros para la preparación de las mismas.

1) Muestras de plasma:

El plasma es una muestra poco habitual en los casos forenses, ya que la hemólisis de la sangre es un fenómeno que tiene lugar espontáneamente en los cadáveres (226). Es importante tratar de conseguir esta muestra en las primeras horas después de la muerte, ya que hay tóxicos cuyo cociente de distribución plasma/sangre es tan alto que resultaría comprometida su investigación toxicológica en la sangre entera (79).

Para algunas técnicas analíticas, el plasma no precisa preparación

alguna. Tal es el caso del inmunoensayo de fluorescencia polarizada para la detección de digoxina (75) o el enzaimmunoensayo para la detección de teofilina (94). Sin embargo, cuando se trata de utilizar técnicas cromatográficas, el plasma debe ser tratado para obtener de él el tóxico o los tóxicos que lleve y desechar los productos procedentes de la matriz biológica que producirían artefactos e interferencias en los equipos analíticos (96). Los tratamientos más frecuentes que nosotros realizamos sobre el plasma en el Instituto Nacional de Toxicología son:

- **Precipitación de proteínas con disolventes orgánicos como metanol o acetronitrilo.** Son de mayor rendimiento que las desproteinizaciones con agentes clásicos como ácido perclórico, tungstico o tricloro acético, que conllevan problemas de adsorción o coprecipitación del tóxico (382). La centrifugación y separación de la fase líquida para su evaporación, en baño bajo corriente de nitrógeno, completan el proceso.

Esta preparación es útil para la determinación de barbitúricos, salicatos, antiepilépticos, acetaminofeno, y, en general, drogas ácidas, por cromatografía de líquidos de alta presión, así como para la determinación de drogas de abuso (232) por enzaimmunoensayo homogéneo.

- **Utilización de columnas empaquetadas.** Utilizamos los cartuchos de fase estacionaria activa, que son minicolumnas comprimidas radialmente y empaquetadas con diversos rellenos cromatográficos. Dada la naturaleza polar de la matriz del plasma, el relleno de elección es la fase reversa C18 de la que con posterioridad son eluidos los tóxicos con el disolvente de polaridad más adecuado (cloroformo, metanol, etc.). De esta forma, se alcanzan altos rendimientos de extracción para tóxicos muy diversos, tales como warfarina (122), antiepilépticos (145), antidepresivos tricíclicos (264) y morfina (114).

También utilizamos columnas de relleno inerte, como las que describiremos más adelante, que aconsejamos para los casos de carbromal (67) o antiepilépticos (323).

2) Muestras de sangre:

La sangre entera es la muestra que con mayor frecuencia se presenta en el laboratorio toxicológico. Su interés analítico estriba en el hecho de que es el único medio biológico sobre el que la cuantificación de un tóxico permite deducir con cierta fiabilidad su relación causa-efecto con la muerte del individuo.

Descartados los tratamientos de la sangre con ácido tungstico o tricloro acético, por los problemas de coprecipitación, adsorción y oclu-

sión que conllevan, nosotros extraemos los tóxicos de la sangre mediante sistemas líquido-líquido con disolventes orgánicos, evitando la formación de emulsiones entre ambas fases. Esto se consigue mediante el uso de columnas empaquetadas con rellenos inertes cuya misión es aumentar en gran manera la superficie de contacto entre el disolvente orgánico y la sangre, al mismo tiempo que favorece el que este contacto tenga lugar de forma lenta y gradual.

Con las columnas de sílice inerte se consigue un buen rendimiento y eluatos limpios para la extracción de barbitúricos (54, 179), opiáceos derivados de morfina (118), así como benzodiacepinas y sus productos de hidrólisis (163).

Otro tipo de columnas que se puede utilizar para la preparación de muestras de sangre son las de relleno de resinas no iónicas, tipo Amberlite XAD-2, que es un polímero de poliestireno de fases ligadas que se suministra en partículas de 20-50 mesh. El fundamento separativo es la absorción del tóxico por las partículas, de donde es posteriormente eluido por el disolvente orgánico. Se puede utilizar en general para todo tipo de tóxicos orgánicos, sin más que atender al pH en que se diluye la sangre y al disolvente orgánico con que se eluye la columna (255, 293).

Dentro ya del campo separativo de la cromatografía líquida aparecen las columnas de sílice ligada (bonded silica), que aseguran como los anteriores la extracción y concentración del analito presente en la sangre sin interferencias de otros compuestos biológicos acompañantes habituales de la matriz (210, 137).

Cuando la cantidad de sangre de que se dispone es pequeña, se pueden utilizar las minicolumnas de fase reversa, de las que hemos hablado para suero (334).

Hasta aquí, nos hemos referido a la preparación de la sangre en todos aquellos casos en que el tóxico o los tóxicos a investigar son de naturaleza orgánica no volátil, lo que incluye drogas, medicamentos y pesticidas que vienen a representar el 85 % de los casos que llegan al laboratorio forense. En los casos en que se va a investigar en la sangre alcoholes, metílico y etílico, o disolventes volátiles y puesto que la técnica analítica idónea para ellos es la cromatografía de gases, la sangre no precisa más preparación que una dilución con el standard interno escogido y una filtración. El filtrado puede ser inyectado en el cromatógrafo de gases, bien mediante dispositivo de espacio de cabeza (18), o bien por inyección directa a través de una precolumna.

De la preparación de la sangre para metales y para tóxicos gaseosos (cianuros, carboxihemoglobina) se hablará en los correspondientes capítulos.

3) Muestras de orina:

La orina es una muestra de gran importancia desde un punto de vista cualitativo; en ella se van a encontrar metabolitos del tóxico o los tóxicos a investigar, y, en ocasiones, estos metabolitos permiten identificar sin género de duda el tóxico de que se trata.

Merece la pena citar como ejemplo, por su importancia y actualidad, la identificación de heroína mediante la investigación de monoacetilmorfina en orina (123).

Por otra parte, hay que tener en cuenta que un buen número de estos metabolitos son productos de transformación del tóxico (hidroxilación, desmetilación, hidrólisis), que se han unido al ácido sulfúrico o al ácido glucurónico en el organismo para formar conjugados de alta polaridad y favorecer así la eliminación de orina.

En estos casos se hace necesario empezar la preparación de la orina en una hidrólisis, que nosotros preferimos hacer por vía enzimática, en lugar de ácida (133, 294).

La orina hidrolizada puede ya ser extraída, bien sea mediante minicolumnas de fase reversa, como las descritas para suero, columnas de sílice (extrelut) (51, 319) o de sílice ligada de las que ya hablamos en la sangre.

Quizá la orina sea el único medio biológico que permite una extracción directa líquido-líquido, con disolventes orgánicos inmiscibles, mediante agitación mecánica, sin graves problemas de formación de emulsiones con el consiguiente ahorro económico que ello supone.

Por otra parte, conviene recordar que existen técnicas, como el enzaimunoensayo o el inmunoensayo de fluorescencia polarizada, que no precisan más preparación de la muestra que un sencillo filtrado y ajuste del pH.

En el caso de alcaloides y otros disolventes orgánicos, la orina se trata como la sangre, diluyéndola en el correspondiente standard interno.

4) Contenidos de estómago:

El contenido de estómago es una muestra de importancia vital en los casos en que la intoxicación ha ocurrido por vía oral. El examen microscópico en busca de restos de comprimidos, el olor y el color, así como la medida del pH, proporcionan muchas veces indicios suficientes para orientar el análisis.

Clásicamente, el contenido de estómago se divide en tres partes: un tercio que se destila en medio ácido y sobre el cual se realizan tests directos: cianuro, fenoles, fósforo, etc. (274).

En el residuo de destilado se realizan tests de metales y tests de aniones.

Otro tercio del contenido se destina a la búsqueda de tóxicos orgánicos, para lo cual se pueden seguir varios caminos (92):

- a) Extracción directa con disolventes orgánicos.
- b) Tratamiento previo de precipitación de proteínas con sulfato amónico.
- c) Extracción continua con etanol en medio ácido.
- d) Tratamiento previo con ácido clorhídrico (40 %) a 100 °C, durante cinco minutos.

Las variaciones de consistencia y volumen de unos contenidos de estómago con otro son tan grandes, que la opción a seguir hay que establecerla a la vista de la muestra, y sabiendo hacia dónde vamos a orientar el análisis. Las opciones b y d se hacen necesarias en los casos en que hay grasa y abundantes restos de comida; el filtrado obtenido en ambos casos se divide en dos partes para obtener los tóxicos alcalinos y los ácidos por separado.

El otro tercio se reserva a disposición de la Autoridad Judicial.

5) Vísceras:

Las vísceras que con mayor frecuencia se utilizan para análisis toxicológico forense son el hígado, riñón, pulmón y cerebro.

Su interés es múltiple: de un lado, porque debido a la distribución del tóxico, que tiene lugar en los tejidos en virtud del coeficiente de partición, es posible encontrar en las vísceras un tóxico que ya ha desaparecido de la sangre o de la orina. Por otra parte, el interés del resultado cuantitativo de determinados tóxicos es grande, ya que, por ejemplo, para el propoxifeno el cociente de las cantidades halladas entre sangre e hígado permiten distinguir una intoxicación aguda de una administración crónica (31). En ocasiones, cuando se trata de tóxicos volátiles, el pulmón va a ser la muestra de mayor interés toxicológico.

El tratamiento que se realiza sobre las vísceras pasa necesariamente por una desproteización que puede realizarse por varios sistemas; nosotros preferimos el tratamiento con sulfato amónico en medio ácido con fosfórico y calentamiento en baño de agua durante treinta minutos. Al cabo de este tiempo se filtra, y del filtrado se hacen dos partes, una parte para tóxicos ácidos y otra para alcalinos, que son extraídos mediante sistemas líquido-líquido con disolventes orgánicos.

Para tóxicos muy liposolubles, recomendamos la extracción continua en dispositivos tipo soxhlet (356).

II. ESPECTROFOTOMETRIA

1) ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Las técnicas de espectrofotometría de absorción en las regiones visibles y ultravioleta del espectro electromagnético han sido ampliamente utilizadas en análisis farmacéuticos y biomédicos, no sólo con fines cualitativos, sino también cuantitativos. En el caso concreto del laboratorio forense se utilizan con ciertas limitaciones, dadas las características de los compuestos orgánicos a investigar: impurezas debidas al material biológico, metabolitos y sustancias relacionadas, que interfieren tanto en el análisis cualitativo como en la cuantificación.

Los métodos de luminiscencia y en particular la espectrofotometría de fluorescencia son muy poco utilizados en el laboratorio toxicológico.

En el Instituto Nacional de Toxicología utilizamos la espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible en los siguientes casos:

- **Determinación del espectro ultravioleta de un compuesto puro.**

De gran utilidad resulta la aplicación de la espectrofotometría ultravioleta o visible a la cuantificación de productos puros que tengan un espectro de absorción en la zona ultravioleta o visible (79). La elaboración de la clásica curva de calibrado a la longitud de onda óptima para el producto en cuestión, permite la valoración cuantitativa de sustancias como heroína, anfetaminas, cocaína, etc., siempre que por otra técnica tengamos la certeza de que estamos ante un producto puro.

- **Determinación de carboxihemoglobina.**

El monóxido de carbono es responsable de un gran número de muertes no sólo por su uso clásico, con fines suicidas, sino sobre todo por los accidentes mortales a que da lugar. Particular interés tienen los casos de incendio en los que interesa saber si las muertes ocurridas han sido por asfixia, humos o combustión.

El monóxido de carbono tiene una gran afinidad por la hemoglobina de la sangre, a la que se une, desplazando al oxígeno y formando un complejo muy estable: la carboxihemoglobina. El efecto tóxico del monóxido de carbono es pues debido a la pérdida de la capacidad de la sangre para transportar oxígeno.

Este tipo de intoxicación se evalúa midiendo el porcentaje de hemo-

globina que se ha transformado en carboxihemoglobina, lo que va a depender de una serie de factores, como cantidad de monóxido de carbono en la atmósfera, tiempo de exposición y frecuencia en la respiración.

Desde el punto de vista analítico, la carboxihemoglobina se diferencia de la oxihemoglobina en su espectro de absorción visible. Esta diferencia es más ostensible cuando lo que se comparan son las formas reducidas de ambos tipos de hemoglobina, ya que mientras el espectro de la oxihemoglobina no varía, en el de la carboxihemoglobina reducida aparece una única banda de absorción característica (banda de reducción de Stokes) (147).

Los métodos analíticos están basados en el estudio espectrofotométrico a distintas longitudes de onda del espectro de mezclas de sangre con distintos porcentajes de oxihemoglobina y carboxihemoglobina, de forma que permitan la comparación a esas mismas longitudes de onda con la sangre problema. El método seguido por nosotros es el de Rodkey (305).

● **Determinación de metahemoglobina.**

La metahemoglobina está causada por la oxidación del hierro ferroso de la hemoglobina a su forma férrica, con lo que se altera la capacidad de la sangre para el transporte de oxígeno.

La metahemoglobina, en un individuo sano, viene a representar el 1 % de la hemoglobina circulante frente al 99 % de la hemoglobina en estado normal. Esta pequeña cantidad de metahemoglobina es metabólicamente reducida por la enzima metahemoglobina reductasa (NADH-dependiente) (75).

Ciertos productos químicos y drogas actúan alterando este equilibrio y produciendo cantidades de metahemoglobina que rebasan los mecanismos normales de reducción: son tóxicos típicos de este grupo los nitritos y nitratos, anilina, acetanilida, fenacetina, sulfonamidas.

El método de análisis seguido en el Instituto Nacional de Toxicología al igual que en el caso de la carboxihemoglobina, está basado en el espectro característico de absorción de la metahemoglobina en la región visible del espectro (Vanderbilt).

● **Determinación de cianuros**

Los cianuros son uno de los tóxicos más potentes y de más rápida acción, de aquí su utilización desde antiguo en casos de homicidios y

suicidio, favorecida por su fácil disponibilidad. En efecto, el ácido cianhídrico y sus derivados (sales sódicas y potásicas, acetonitrilo, cianamida y nitroprusiatos) son muy utilizados en la industria para fumigar barcos y almacenes, en procesos de extracción de minerales, galvanoplastia, pulidos de metales y como fertilizantes. El acrilonitrilo es utilizado en la producción de plásticos sintéticos, y muy usado como material de construcción y decoración. Estos polímeros sintéticos liberan ácido cianhídrico en su combustión (44), lo que obliga a la determinación del ión cianuro en las muertes ocurridas en incendios.

El ácido cianhídrico y sus derivados son tóxicos protoplasmáticos (314) que actúan produciendo una anoxia celular por inhibición reversible de las enzimas que controlan los procesos oxidativos de la función celular. El ión cianuro inhibe de manera general a aquellas enzimas que contienen ión férrico y en particular a la citocromo-oxidasa.

Para la determinación de ión cianuro utilizamos una técnica puesta a punto por nuestro Centro (276), en la cual se realiza la extracción del ión cianuro de las muestras biológicas por microdifusión en células Conway utilizando como reactivo absorbente hidróxido sódico. La valoración se realiza mediante espectrofotometría de absorción visible a 580 nanómetros previa formación del complejo coloreado dibarbiturato de glutaconaldehído.

2) INFRARROJA

La espectrofotometría infrarroja es el estudio de la energía transmitida o absorbida en la región del espectro electromagnético comprendida entre 4.000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} . El espectro infrarrojo está dividido en tres regiones: infrarrojo cercano, medio y lejano. Nosotros utilizamos el infrarrojo medio, ya que es el usado en el análisis de drogas y pesticidas.

Es una técnica que requiere el uso de sustancias puras, de aquí su uso limitado en el campo forense; su principal aplicación es la identificación de un compuesto siempre que tengamos la certeza de que estamos ante un producto puro.

3) DE ABSORCION ATOMICA

La espectrofotometría de absorción atómica es un método analítico para la determinación de elementos inorgánicos, basados en la absorción de la irradiación de átomos libres.

En el proceso de absorción atómica, una luz de una determinada longitud de onda incide sobre un átomo libre en estado fundamental, el cual absorbe la energía y pasa al estado excitado.

La propiedad de un átomo de absorber luz de longitud de onda específica es el fundamento de esta técnica con la que se puede analizar elementos individuales en presencia de otros, ya que la longitud de onda de la luz absorbida es una propiedad específica y característica de cada elemento.

La energía absorbida en este proceso puede ser medida y usada con fines analíticos. A medida que aumenta el número de átomos en el paso de la luz, la cantidad que de ésta será absorbida se incrementará en una forma predecible, por lo que se puede efectuar una determinación cuantitativa del analito presente, midiendo la cantidad de luz absorbida. La absorbancia es el término más conveniente para caracterizar la absorción de luz en la espectrofotometría de absorción, pues esta cantidad guarda una relación lineal con la concentración.

La introducción de sistemas automáticos o semiautomáticos para la toma de muestras, así como los computadores para procesar los datos necesarios en los procesos a realizar, han supuesto un gran avance para esta técnica, ya que ofrecen la posibilidad de calibrar y computar concentraciones de los datos de absorbancia, aun en casos de calibración no lineal.

Todo esto ha hecho que la absorción atómica sea uno de los métodos más usados para la determinación de metales.

Existen varias técnicas dentro de la espectrofotometría de absorción atómica (52), como son:

- a) Espectrofotometría de absorción atómica por llama (244, 40, 361).
- b) Espectrofotometría electrotérmica (238, 295, 127).
- c) Generador de hidruros (302, 149).
- d) Otras técnicas de espectrofotometría de absorción atómica
 - Delves Cup (105, 203).
 - Sampling Boat (195).
 - Técnica de vapor frío (206, 323).

De todas estas técnicas, nosotros utilizamos, principalmente, la de absorción atómica de llama y absorción atómica con cámara de grafito, ya que ambas técnicas se pueden usar para la mayoría de los elementos, y absorción atómica con generador de hidruros, que empleamos en el caso especial de elementos que forman hidruros volátiles como el arsénico.

Metodología

El resultado cuantitativo de una muestra problema se obtendrá por

comparación en condiciones semejantes al de una muestra de concentración conocida, para lo cual se necesita la preparación de patrones del elemento.

Para eliminar las posibles interferencias en la muestra problema debidas al medio, utilizamos el método de adiciones patrón. Un tipo de interferencia que no se corrige con el método de adiciones es la absorción de fondo, que hay que tener siempre en cuenta cuando se trabaja con matrices complejas, como son las biológicas causadas por formas moleculares no disociadas que pueden tener espectros de absorción muy anchos y absorber en la zona de la longitud de onda del elemento a analizar. Para corregirlo utilizamos un sistema automático de corrector de fondo formado por una lámpara de arco de deuterio en la zona ultravioleta o una lámpara de yoduro de tungsteno para la zona visible, conectado al sistema óptico.

Como nosotros trabajamos a nivel de trazas y ultratrazas hay que tener en cuenta tres posibles fuentes de error (184, 14, 37):

- La contaminación en la toma de muestras (recipientes, contaminación ambiental, polvo, vapores, conservantes, anticoagulantes, etc.).
- Pérdidas del elemento debidas a la absorción, precipitación, volatilización, etc.
- Transformaciones físicas y químicas del elemento, de la matriz o de ambos durante el almacenamiento.

El factor más importante a considerar en absorción atómica es el tipo de muestra a analizar, que va a determinar su preparación (149, 105, 39, 90, 235, 6) y la técnica a utilizar; lo idóneo sería la menor manipulación de la muestra, llegando a realizar análisis directos en muestras sólidas y líquidos biológicos. En la mayoría de los casos se requiere una previa destrucción de la materia orgánica.

La elección del tratamiento de la muestra depende entre otros factores (49):

1. **Del elemento a analizar**, ya que tenemos que tener en cuenta sus características físico-químicas, como por ejemplo en un análisis de plomo: hay que tener cuidado en no someter a la muestra a temperaturas superiores a 500 °C, porque a partir de esta temperatura habría pérdidas del analito por volatilización.
2. **Del tipo de matriz**, ya que determinará el tratamiento de la muestra y la elección de la técnica; así y en el caso del plomo, el análisis en sangre puede requerir sólo una simple dilución con Tritón-X, como modificador de matriz para cámara de grafito; en cambio la orina, por su alto contenido en sales, debe some-

terse a una extracción con disolventes orgánicos, con lo que se consigue también una preconcentración (10) y analizarla por llama.

3. **De la concentración** del analito presente en la muestra, por lo que se optará por una técnica u otra, ya que en caso de concentraciones bajas es mejor la cámara de grafito frente a la llama por su mayor límite de detección, lo que determinará el tratamiento a seguir con la muestra.
4. **De la técnica a utilizar**, como antes hemos dicho, ya que la cámara de grafito requiere un menor tratamiento de la muestra frente a la llama.

Nosotros efectuamos la elección entre llama y cámara de grafito, en base al rango de la concentración del analito; a concentraciones bajas, la A.A. con cámara de grafito puede determinar elementos en concentraciones 1.000 veces más bajas que las detectadas con la llama.

En general, consideramos mejor el uso de la cámara de grafito:

- Cuando las concentraciones del analito empiezan a aproximarse a las capacidades de los límites de detección.
- Cuando es limitado el volumen de la muestra, ya que sólo se requiere unos pocos microlitos.

Las muestras recibidas en el Instituto para el análisis de elementos inorgánicos son de naturaleza muy variada:

- Todas las muestras biológicas en general:
 - Sangre, orina, vísceras para cuantificación de elementos.
 - Pelos y uñas, principalmente para la determinación de arsénico, con lo que se puede detectar intoxicaciones antiguas.
 - Contenido gástrico en muertes que se sospecha la ingesta de alguna sustancia tóxica como arsénico, cobre, etc.
- Alimentos y productos diversos sólidos y líquidos sospechosos de haber causado la muerte o supuesto intento de envenenamiento para buscar la presencia de elementos tóxicos: arsénico, talio, potasio, etc.
- Droga para la detección de adulterantes inorgánicos como plomo, talco, etc.

En criminalística, la absorción atómica es la técnica utilizada para la detección y cuantificación de metales en las muestras relacionadas con disparos (piel de orificio de entrada y salida (363), piel de manos, etc.).

La presencia de ciertos metales como plomo, antimonio y bario, en mayor o menor cantidad, es significativo a la hora de diferenciar un

orificio de entrada de uno de salida; siendo muy importante la detección de bario únicamente en orificios de entrada.

El análisis de estos metales (270) presentes en los fulminantes y en los proyectiles, es importante como parte del estudio para determinar la distancia de disparo (213) siempre que se disponga de disparos referencia con el mismo arma y munición.

En caso de duda de si la muerte por disparo ocurrió por suicidio o por homicidio, es de gran ayuda detectar la presencia de estos metales en la piel de las manos de la víctima, que sería indicativo de que esa mano fue la que efectuó el disparo.

Esta técnica también se utiliza como parte del estudio de huesos para datar la fecha de la muerte (77), según la carga inorgánica en plomo, magnesio, hierro, zinc, cobre, ya que con el paso del tiempo estos elementos inorgánicos varían respecto a la materia orgánica: grasas, proteínas, etc.

Se utiliza en el estudio de dientes para calcular la edad del fallecido (336) y se ha utilizado en el análisis de pelos (360) para el diagnóstico individual, pero debido a la gran variabilidad en el contenido de metales (As, Sb, Cu, Zn, etc.), según la zona del cuero cabelludo de donde procede y otros factores externos se debe renunciar a la identificación de los cabellos mediante análisis químicos.

III. CROMATOGRAFIA

1) CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

La cromatografía es un método analítico en el cual las sustancias se separan en base a su diferente migración en un sistema de dos fases: la fase estacionaria y la fase móvil.

Una de las primeras técnicas cromatográficas (144) que se utilizó fue la cromatografía en papel, que encontró gran número de aplicaciones en los diferentes laboratorios de análisis. Hoy día, en nuestros laboratorios de toxicología ha sido sustituida por la cromatografía en capa fina.

En la cromatografía en capa fina, la fase estacionaria está adherida a una superficie de vidrio, aluminio o plástico, y consiste en una fina capa de una sustancia absorbente, finamente granulada. Las separaciones son debidas normalmente a las interacciones entre las drogas y la superficie estacionaria, aunque existen otros mecanismos de separación en los que intervienen a la vez procesos de absorción, partición o intercambio iónico.

Aunque en muchos casos este tipo de cromatografía ha sido sustituida por otras técnicas cromatográficas más sensibles, como la cromatografía gaseosa y cromatografía de líquidos de alta presión, aún ocupa un lugar importante en nuestro laboratorio, como técnica de screening ante un tóxico desconocido, como técnica preparativa, para aislar y purificar sustancias previo uso de otra técnica, o bien para confirmar o descartar una serie de sustancias. De gran ayuda en estos cometidos y, sobre todo, a la hora de identificar un tóxico desconocido, son las compilaciones bibliográficas (348) de R_f de sustancias obtenidas bajo distintos sistemas.

Pasamos a continuación a citar algunos de los análisis en los que aún seguimos usando esta técnica por diversas razones de comodidad, rapidez, bajo costo, alta sensibilidad, etc.

a) Análisis de cannabinoles en orina

El ácido Δ^9 tetrahidrocannabinol-11-oico es el principal metabolito en orina del tetrahidrocannabinol, principio activo del haschís. La confirmación de su existencia en orina la realizamos por cromatografía en capa fina, dado el más bajo coste y posibilidad de realizar mayor número de determinaciones que con otras técnicas alternativas.

Para ello la orina, tras una hidrólisis con KOH, es acidificada a pH 5 y extraída con una mezcla de hexano-acetato de etilo. El extracto obtenido se aplica a una placa de silicagel 60 y se desarrolla con heptano-éter etílico-ácido acético (70-20-4). El revelado lo realizamos con el reactivo azul sólido (327).

b) Investigación de insecticidas organoclorados y organofosforados

Las muestras para determinación de organofosforados se extraen con cloroformo a pH 7 y el desarrollo se efectúa con éter de petróleo-acetona (4-1). El revelado se realiza con cloruro de paladio al 5 % o dianisidina-molibdato sódico.

Para los organoclorados las muestras se extraen a pH 7 con n-hexano y se purifican en columna de florisil. Se desarrolla con ciclohexano-cloroformo (4:1) y el revelado se efectúa con o-tolidina al 5 % en etanol.

Así realizamos un primer análisis orientativo, en el que se pueden detectar los insecticidas más importantes de ambos grupos. La confirmación y cuantificación del insecticida detectado se realiza posteriormente por cromatografía de gases o de líquidos de alta presión.

c) Investigación de azúcares y polioles

Este análisis lo llevamos a cabo en alijos de droga en polvo y pape-linas, en donde los azúcares y polioles son usados como diluyentes de la droga.

La muestra se disuelve en agua y se aplica sobre dos placas de silicagel 60. El desarrollo se realiza con benceno-acético-metanol (35-15-60). Una de las placas se revela con el reactivo de difenilamina-anilina, y tras calentar a 80 °C obtenemos manchas azules con mono y disacáridos (glucosa, fructosa, lactosa, etc.). La segunda placa se revela con reactivo de metaperiodato, en donde, sobre un fondo azul, obtenemos manchas blancas con los polioles (manitol, sorbitol, etc.) y con los mono y disacáridos (376, 22).

La confirmación y cuantificación la hacemos mediante la cromatografía de líquidos de alta presión.

d) Análisis de aflatoxinas

Este análisis puede llevarse a cabo sobre distintos productos alimenticios (principalmente frutos secos) en donde, debido a un mal es-

tado de conservación, exista una proliferación de hongos del género *Aspergillus* y se sospeche la existencia de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂.

El análisis puede realizarse también mediante cromatografía líquida de alta presión, pero la cromatografía de capa fina, gracias a la gran fluorescencia de las aflatoxinas, presenta una sensibilidad similar y suficiente para el análisis, por lo que, por razones de costo, las investigaciones en muchos casos se efectúan por esta técnica.

La extracción la hacemos con cloroformo-metanol y la purificación se efectúa a través de una columna de sílica desengrasando con n-hexano y eluyendo con cloroformo.

La cromatografía se hace sobre una placa de silicagel haciendo una primera elución con éter etílico con objeto de eliminar posibles sustancias que interfieren. Posteriormente, se eluye con una mezcla de cloroformo-metanol (97:3), revelándose con luz ultravioleta. Para confirmación se efectúa una derivatización de las aflatoxinas en placa con ácido tricloroacético (68, 17).

2) CROMATOGRAFIA DE GASES

Desde que en 1952 Martin y James realizan por primera vez la separación de ácidos grasos volátiles mediante cromatografía de gases (186), es largo y fructífero el camino recorrido por esta técnica. Su aplicación al campo de la toxicología puede situarse hacia el final de la década de los sesenta, y su utilización práctica al screening amplio de tóxicos en muestras biológicas puede fecharse en 1971 (Barret) (28).

Las nuevas metodologías de cromatografía de gases permiten el empleo de pequeñas cantidades de muestra: 10 ml de sangre u orina, cuando no menos, son suficientes en la actualidad para un análisis, en contraposición a los 500 gramos de tejido que exigía la marcha de Stass-Otto. La capacidad de resolver de forma simultánea el problema cualitativo y cuantitativo es otra de las grandes ventajas que la técnica ofrece.

La demanda de mayor sensibilidad, especificidad y exactitud fue introduciendo mejoras en todos los aspectos de la técnica cromatográfica: los detectores específicos, como son los de captura de electrones, fotométrico de llama, llama alcalina (nitrógeno-fósforo), conductividad electrolítica de Hall o infrarrojo, permiten la detección de nanogramos de producto en matrices complejas cuyas interferencias en el detector de llama harían imposible el análisis. Las técnicas de derivatización (Ahuja, 1976) (4), permiten el uso del detector de captura de electrones para compuestos no halogenados, así como la resolución cromatográfica de compuestos con gran número de sustituyentes polares que de otra for-

ma no alcanzarían volatilidad suficiente para su elución cromatográfica. Las columnas capilares de alta eficacia introducidas hace veinticinco años por Desty y col. (1958) (108) y Golay (1958) (150), son adoptadas en forma universal en la investigación toxicológica en la década de los setenta (290, 291). Los recientes avances en la preparación de estas columnas, tales como el uso de fases inmobilizadas (158), la desactivación con siloxano y las fases químicamente ligadas, han desplazado por completo a las columnas empaquetadas en lo que se refiere al análisis de mezclas complejas y la determinación a nivel de trazas de compuestos muy específicos en matrices biológicas. Por ejemplo, en el incidente italiano de Seveso fue precisa la utilización de la cromatografía de gases capilar para identificar la clorodioxina, compuesto altamente tóxico, en los tejidos de animales muertos procedentes del área contaminada (Frigerio, 1978) (140).

El desarrollo actual de la cromatografía de gases sigue dos líneas paralelas; de un lado, la mejora de la instrumentación periférica, inyectores automáticos, válvulas de inyección, nuevos detectores, etc., y de otro, la incorporación a la técnica cromatográfica de todas las novedades referentes a tecnología digital. Esta tecnología se incorpora en dos frentes:

- a) Control de los parámetros operativos del instrumento que ha dado lugar a equipos más fiables y baratos.
- b) Tratamiento o proceso de los datos cromatográficos producidos, que puede ir desde el integrador de señal hasta complicadas arquitecturas con recursos compartidos en las que son posibles búsquedas automáticas en librerías de índices de retención e incluso la conjunción de datos procedentes de otras técnicas con el fin de obtener resultados más rápidos y seguros a través del concepto de automatización de laboratorio (214, 107).

El campo de análisis que cubre la cromatografía de gases en toxicología forense es muy amplio, tanto por lo que se refiere a variedad de muestra como por lo que atañe a tóxicos susceptibles de ser investigados.

La mayor parte de las muestras biológicas que han de investigarse por cromatografía de gases han de extraerse y purificarse para poder ser utilizadas, salvo en algunos casos, pocos, en que pueden inyectarse en el cromatógrafo directamente la sangre o la orina, convenientemente diluidas y a través de precolumnas que retienen impurezas de la muestra altamente perjudiciales para la fase estacionaria. Para muestras no biológicas, dependiendo del grado de pureza del producto a investigar, puede usarse la inyección directa, tras una simple disolución en el caso de muestras sólidas o precedida de una dilución en el caso de muestras

líquidas, pero es recomendable una extracción selectiva y la subsiguiente purificación en los casos en que interese el análisis cromatográfico de uno o varios productos que se encuentran en una mezcla multicomponente.

Por lo que se refiere a tóxicos susceptibles de ser investigados por cromatografía de gases, podemos decir que muy pocos compuestos de interés toxicológico escapan a la competencia de esta técnica. Para dar una ligera idea de estas posibilidades, vamos a dar a título de ejemplo algunos de los métodos que utilizamos de forma prácticamente rutinaria en el laboratorio de química del Instituto Nacional de Toxicología. Algunos de ellos tienen su fundamento en técnicas descritas por diversos autores y han sido convenientemente modificados por nosotros.

Para seguir una cierta sistemática, hemos establecido una clasificación por grupos de tóxicos, explicando el método utilizado por nosotros:

a) **Disolventes volátiles polares: etanol, metanol, etc.**

Método:

Columna cromatográfica: Porapak Q. o 5 % Carbpak 20 M (245)

Detector: Ionización de llama

Temperatura: inyector-250

horno-200 para la Porapak Q

detector-250

inyector-200

horno-100 para la Carbpak 20 M

detector-200

Preparación de la muestra:

Para sangre, suero, orina y contenido de estómago, dilución de la muestra con una solución acuosa patrón de isopropanol, que se utiliza como standard interno para la valoración cuantitativa. La muestra así diluida puede inyectarse a través de una precolumna o utilizar un sistema de espacio de cabeza acoplado al inyector.

Aplicaciones:

Intoxicaciones voluntarias o accidentales con alcohol metílico, etilenglicol, etc.

Valoración de etanol de forma rutinaria de **todos** los casos de muerte que llegan al Instituto, en sangre, orina y contenido de estómago.

Investigación de disolventes orgánicos en casos de muerte por inhalación de colas y/o pegamentos.

Investigación de alcoholes y grado alcohólico en bebidas relacionadas con una muerte (adulteradas).

b) Hidrocarburos derivados del petróleo

Método (164):

Columna cromatográfica: OV-101 y OV-17

Temperatura: inyector 300 °C

detector 300 °C

horno-t inicial = 35 °C 1.º/mn t final% 200 °C

Detector: Ionización de llama

Aplicaciones:

Investigación de cualquiera de estos compuestos en casos de intoxicaciones voluntarias o accidentales.

Investigación de restos de gasolina, queroseno, fuel-oil y turpentina en los casos de incendios provocados.

Investigación de disolventes hidrocarbonados utilizados como vehículo de pesticidas, en los casos de intoxicación por éstos.

c) Pesticidas organoclorados

Método (381):

Columna cromatográfica: 8 % Q.FI + 2 % OV-17 en GasChrom Q.
vidrio
cc-metilfenilsilicona

Temperatura: inyector-250 °C

detector-250 °C

horno-200 °C

Detector: Captura de electrones

Aplicaciones:

Investigación de pesticidas organoclorados en los casos de intoxicación voluntaria o accidental, así como de sus metabolitos, en todas las muestras biológicas de que se disponga.

Investigación de residuos de estos pesticidas en alimentos contaminados.

d) Pesticidas carbámicos

Método (338):

Columna cromatográfica: 20 % Carbowax 20 M sobre Chromosorb Q.

Temperatura: inyector-265 °C
horno-variable
detector-266 °C

Detector: Llama alcalina (nitrógeno-fósforo).

Aplicaciones:

Investigación de pesticidas carbámicos en los casos de intoxicación accidental o voluntaria.

Investigación de pesticidas carbámicos en alimentos contaminados.

e) Pesticidas organofosforados

Método (372):

Columna cromatográfica: 10 % DC-200 sobre Gas-Chrom Q
15 % QF-1 y 10 % DC-200 sobre Gas-Chrom Q
cc metilsilicona 25 m

Temperaturas: inyector-300 °C
detector-300 °C
horno-variables

Detector: Llama alcalina (nitrógeno-fósforo)

Aplicaciones:

Investigación de pesticidas organofosforados en casos de intoxicación accidental o voluntaria.

Investigación de residuos organofosforados en alimentos contaminados.

f) Medicamentos, drogas de abuso y sus metabolitos

Método (231):

Columna cromatográfica: cc-metilsilicona 25 m
Temperatura: inyector-300 °C
detector-300 °C
horno-250 °C

detector: Llama alcalina (nitrógeno-fósforo)

Aplicaciones:

Puede decirse que el 80 % de los casos forenses que llegan al Laboratorio de Química son sometidos a «screening general» en el que se pone de manifiesto, caso de existir, la presencia de barbitúricos, benzodiacepinas, fenotiacinas, antidepresivos tricíclicos, opiáceos deri-

vados de morfina, cocaína y anestésicos locales, analgésicos pirazólicos y mórficos, anfetaminas y derivados, antihistamínicos y un largo etcétera, así como los metabolitos fundamentales de todos estos tóxicos.

La interpretación de los resultados se hace mediante unas tablas de tiempos de retención, puestas a punto por nuestro Instituto (231).

Mención especial dentro de este apartado merece el estudio de muestras de drogas procedentes del mercado ilícito, bien sea aprehendidas en la aduana o confiscadas por la policía en la calle.

La identificación de la droga, su riqueza, así como el estudio de los adulterantes y diluyentes que puede llevar, constituye uno de los campos en los que más se utiliza la cromatografía de gases. Fruto de este trabajo son las publicaciones del Instituto Nacional de Toxicología sobre este tema (307, 308).

g) Análisis cuantitativo de morfina en cantidades muy pequeñas

Método (232):

Columna cromatográfica: cc-metilfenilsilicona

Temperaturas: inyector-280 °C

detector-280 °C

horno-250 °C

Detector: Captura de electrones

Aplicaciones:

La cuantificación de morfina en las bajas concentraciones que existe en la sangre de heroinómanos, es un problema fundamentalmente de sensibilidad. La formación del derivado heptafluorobutírico en combinación con el uso de detector de captura de electrones permite unos límites de detección francamente satisfactorios, lo que posibilita la cuantificación exacta de morfina a nivel de trazas en muestras biológicas. Esta metodología ha sido puesta a punto por nosotros para la investigación de morfina en sangre en los casos de muertes por heroína (232).

h) Oleilánilida en aceites y en muestras biológicas

Método (356):

Columna cromatográfica: cc-metilsilicona

Temperaturas: inyector-300 °C

horno-280 °C

detector-300 °C

Detector: Llama alcalina (nitrógeno-fósforo)

Aplicaciones:

El tristemente famoso problema del aceite de colza desnaturalizado con anilina y desviado para consumo humano, que tuvo lugar en España en 1981, hizo que pusiéramos a punto la metodología necesaria para la investigación de anilidas de ácidos grasos, «marcadores» de los aceites tóxicos, tanto en las muestras de aceites sospechosos como en las vísceras de los fallecidos en las primeras fases de la enfermedad (356).

i) **Análisis de bifenilos policlorados**

Método (297):

Columna cromatográfica: cc-metilfenil sílicona

Temperaturas: inyector-300 °C

horno-270 °C

detector-300 °C

Detector: Captura de electrones

Aplicaciones:

El análisis de bifenilos policlorados (pcB), contaminantes ubicuos y persistentes, en muestras biológicas ha sido puesto a punto por nuestro Instituto (297).

3) CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS

Está generalmente admitido que la cromatografía de líquidos de alta presión empezó su desarrollo hacia los años 1964/65, y conviene recordar como base fundamental de esta técnica el trabajo de Martín y Synge (1941) (246), que es una de las publicaciones científicas con mayor visión de futuro que han sido realizadas. De este trabajo destacamos dos ideas que hoy día son básicas en la cromatografía en general, y en la de líquidos en particular:

La introducción del concepto de plato teórico para expresar la eficacia de una columna (en analogía con los procesos de destilación) y la utilización de uno de los líquidos para impregnar el soporte de la columna (fase estacionaria) mientras el otro era utilizado como eluyente (fase móvil), sentando así las bases de la cromatografía de líquidos que posteriormente se desarrollarían en otros trabajos (186, 176, 7).

Las aplicaciones de la cromatografía de líquidos en toxicología forense son tan amplias y variadas como amplio es el número de produc-

tos que en un momento determinado pueden presentar toxicidad para un individuo. Igualmente, variadas son las muestras a analizar que van desde material biológico a sustancias relacionadas con el hecho judicial.

Vemos a continuación los problemas más usuales en el Instituto Nacional de Toxicología que pueden ser solucionados por esta técnica:

- a) Intoxicaciones medicamentosas-screening.
- b) Drogas.
- c) Hidrocarburos aromáticos.
- d) Pesticidas.
- e) Determinaciones específicas:
 - Aflatoxinas.
 - Espumas urea-formaldehído.
 - Anilidas ácidos grasos.
- f) Problemas de índole médico-legal.

a) Intoxicaciones medicamentosas-screening

Un gran número de casos forenses son debidos a intoxicaciones medicamentosas voluntarias o accidentales, lo que obliga a la investigación de estas sustancias y sus metabolitos en material biológico. En estos casos realizamos un screening que cubre el mayor número de estas sustancias, para, en primera instancia, tratar de limitar el campo de investigación.

La cromatografía de líquidos de alta presión cumple un papel trascendental en el análisis toxicológico abarcando dos aspectos bien diferenciados: por un lado, la detección de sustancias que por sus características estructurales son de difícil detección por otras técnicas, y, por otro, como técnica alternativa para la confirmación de otras muchas sustancias que han sido detectadas en primera instancia por otra técnica de fundamento analítico diferente.

Uno de los factores más decisivos para el buen éxito del screening es la selección de la columna cromatográfica a utilizar. Las columnas de fase normal, es decir, con fase estacionaria polar, como sílice, tienen poca aplicación en química forense (95, 384), ya que al trabajar con muestras biológicas de alto contenido en sustancias polares éstas quedan fuertemente retenidas en la columna interfiriendo en sucesivos análisis y acortando mucho la vida de la misma. Por ello, para los análisis toxicológicos se utilizan columnas de fase reversa (101, 100, 236, 193, 1-92), en la que, como su nombre indica, los compuestos eluyen en orden inverso a las de sílice, sin que exista retención de compuestos polares.

Las más usadas por nosotros son las hidrocarbonadas (C8 y C18) de 10 micras, constituidas por unión de hidrocarburos C8 o C18 a los grupos silanos de la sílice. Estas columnas empleadas para el screening están sujetas a unos requerimientos de calidad muy rigurosos, particularmente en lo que se refiere a reproducibilidad y selectividad. Por ello deben ser comprobadas antes de su uso con diversos compuestos de distinta estructura molecular y polaridad.

Para ello utilizamos como patrones la 5 (p-metil-fenil) 5 fenil-hidantoína (MPPH) como sustancia relativamente neutra, y diacepan como sustancia polar básica para detectar la posible polaridad residual, causada por los grupos silano (98). De esta forma hemos comprobado considerables diferencias entre columnas de C18 y C8 no sólo de diferentes casas comerciales, sino también de remesa a remesa en una misma marca. Este problema, que es común a todos los laboratorios de HPLC, hace que a pesar de haber estandarizado al máximo las condiciones de trabajo, no se pueda disponer, como ocurre en cromatografía de gases, de tablas de índices de retención para todas las sustancias analizadas. Ahora bien, existen tablas de grupos de sustancias (153, 309, 224) que nos sirven como orientación y base para la elaboración de nuestras propias tablas.

En casos en que necesitamos una mayor sensibilidad, como ocurre con los compuestos tricíclicos o morfina, en que los niveles en sangre son muy bajos, utilizamos columnas C18 de menor tamaño de partícula 7 ó 5 micras o columnas microbore (316, 315, 241) (semicapilares) de 5 micras de tamaño de partícula. Estas columnas en análisis forenses deben utilizarse con una precolumna para preservarla de las impurezas debidas a la matriz biológica.

La fase móvil es otro factor en cuenta, ya que el éxito de una buena separación cromatográfica no sólo depende de la fase estacionaria, sino también de la adecuada selección de la fase móvil: nosotros utilizamos para el screening tampón fosfato. pH 4/acetónitrilo al 50 %, 30 % y al 10 %, lo que permite la separación de compuestos de poca polaridad, como diacepinas y fenotiacinas, hasta la de sustancias polares, como los salicilatos, pasando por compuestos de mediana polaridad, como barbitúricos.

Otro factor fundamental en cromatografía de líquidos es la selección del detector a utilizar. Para este screening nosotros utilizamos el detector ultravioleta de longitud de onda variable a 210 nanómetros, ya que la mayoría de las sustancias medicamentosas tienen una absorción inespecífica a esta longitud de onda que es adecuada para la determinación cuantitativa de bajas dosis de productos medicamentosos (ug/ml) y sus metabolitos (99, 194).

Para la confirmación de la existencia de sustancias o para descartarla se realiza el análisis a la longitud de onda característica de la sustancia sospechada. Así, en el caso del paracetamol (355, 23), se realiza el análisis a 250 nm, donde el paracetamol tiene su máxima absorción, con lo que obtenemos más selectividad y eliminamos interferencias. En este sentido es muy útil el detector de diodos integrados (124), que barre un rango completo de longitudes de onda de 190-300 nanómetros en unos segundos, pudiendo tomar simultáneamente varias medidas a diferentes longitudes de onda, y fue unido a la moderna tecnología digital simplificando mucho estos análisis (254, 169).

Otra ventaja de utilizar el detector de ultravioleta es el hecho de poder realizar el espectro de absorción de la sustancia que eluye, con lo que tenemos un dato más a la hora de identificación.

Para la confirmación de un tóxico o identificación de uno desconocido, es muy útil acoplar un espectrómetro de masas al cromatógrafo de líquidos. Este acoplamiento en la actualidad cuenta con una serie de problemas, como es la separación del exceso de eluyente en la columna antes de la introducción de los compuestos eluidos en la cámara de ionización, del espectrómetro (196, 142, 187, 166, 239, 281). El uso de columnas microbore ofrece una solución a este problema, pero el acoplamiento LC-MS (165, 362, 280), de manera similar a GC-MS, no ha entrado todavía en el laboratorio forense (117, 143, 211). Para suplir esta falta, nosotros recurrimos a recoger el tóxico a la salida de la columna mediante un colector de fracciones, de donde puede llevarse al espectrómetro de masas para ser introducido directamente.

Otro acoplamiento que se puede utilizar es llevar la sustancia eluida en el colector de fracciones a distintos equipos de inmunoensayos (RIA-EMIT) (223) (380) para la detección de compuestos, como pueden ser los cannabinoides o esteroides anabolizantes.

b) Drogas:

Como ya hemos indicado en otros apartados es una determinación muy extendida en el laboratorio toxicológico, existiendo dos campos de análisis bien diferenciados:

Investigación cualitativa y cuantitativa de productos procedentes del mercado ilícito.

- Muestras de heroína y cocaína

Método (306):

Principios activos, impurezas y adulterantes.

Columna: C18

Disolventes: tampón fosfato pH 4/acetonitrilo

Detector: NV-210 nanómetros

NV-230 nanómetros

Columnas: Si-NH₂

Disolventes: Acetonitrilo/agua.

Detector: Índice de refracción

Aplicaciones:

Se investiga y cuantifica:

- Principios activos: cocaína, heroína.
- Impurezas de origen, fabricación o hidrólisis; benzoil, ecgorina, monoacetilmorfina, acetilcodeína, narcotina, papaverina.
- Adulterantes: cafeína, fenobarbital, metacualona, procaína, piracetán, lidocaína.
- Diluyentes: hidratos de carbono (glucosa, manitol, lactosa).
- Muestras de LSD.

Método (306):

Columna: C18

Disolventes: tampón fosfato pH 4/acetonitrilo

Detector: ultravioleta 310 nanómetros

Aplicaciones:

Investigación y cuantificación de la dietilamina del ácido lisérgico, en todo tipo de muestras.

- Muestras de resina de cannabis (haschís) y marihuana.

Se investiga el contenido en cannabis: tetrahidrocannabinol (THC) cannabinol (CBN) y cannabidiol (CBD).

Método (25, 24):

Columna: C18

Disolventes: tampón fosfato pH 4/acetonitrilo

Detector: ultravioleta 210 nanómetros

Aplicaciones:

Determinación de la calidad de una resina de cannabis.

- Cuantificando el THC (principio con actividad terapéutica), tiene el inconveniente de la poca disponibilidad de un patrón de THC puro, ya que se descompone muy rápidamente, por lo que el INT ha puesto a punto un método en el cual se valora la calidad de la resina por obtención de los índices THC/CBD CBN/CBD (152).

Investigación de drogas de abuso y sus metabolitos en muestras biológicas

Determinación de morfina (metabolito de heroína).

Método (204, 370):

Columna: C18

Disolvente: tampón fosfato/acetonitrilo

Detector: electroquímico

Aplicaciones:

Detección y cuantificación en muestras biológicas procedentes de heroínómanos.

Determinación de benzoil ecgonina (metabolitos de cocaína).

Método (188, 296):

Columna: C18

Disolvente: tampón fosfato pH 6,5/acetonitrilo

Detector: ultravioleta 234 nanómetros.

Aplicaciones:

Detección y cuantificación en orina de cocainómanos.

Determinación de ácido tetrahidrocannabinol 9 carboxílico (metabolito del Δ 9 tetrahidrocannabinol).

Método (379, 45):

Columna: C18

Disolventes: agua/acetonitrilo

Detector: Ultravioleta 220-280 nanómetros

Aplicaciones:

Detección y cuantificación en orina procedente de individuos sospechosos de consumir cannabis.

c) Hidrocarburos aromáticos

Determinación de hidrocarburos aromáticos.

Determinación de metabolitos de interés toxicológico (hipúrico y metilhipúrico).

Determinación de hidrocarburos aromáticos

Método (262):

Columna: C8

Fase móvil: agua/acetonitrilo

Detector: Ultravioleta 210 nanómetros

Aplicaciones:

Intoxicaciones voluntarias o accidentales por alguno de estos compuestos.

Detección de restos de gasolina, fuel-oil, en casos de incendios provocados (derivados bencénicos, menos volátiles: naftaleno, antraceno, fenantreno, así como derivados, metilados y dimetilados).

Determinación de metabolitos (hipúrico y metilhipúrico)

Método (16):

Columna: C18

Fase móvil: agua/acético/acetonitrilo

Detector: ultravioleta 210 nanómetros

Aplicaciones:

Intoxicaciones agudas o crónicas, voluntarias o involuntarias por hidrocarburos aromáticos.

Intoxicaciones por pesticidas cuyo vehículo sea un hidrocarburo aromático.

d) Pesticidas

Insecticidas organofosforados (189, 69, 215, 104) y carbámicos (287, 266)

Método:

Columna: C18

Fase Móvil: agua/acetonitrilo

Detector: Ultravioleta 210 nanómetros

Aplicaciones:

Nosotros la utilizamos como técnica alternativa o confirmativa a la cromatografía de gases.

Herbicidas del tipo fenoxiderivados y triacinas

Método (162, 282):

Columna: C18

Fase móvil: agua/acetonitrilo (triacinas)

tampón fosfato pH 3/acetonitrilo (fenoxiderivados)

Detector: Ultravioleta 230-281 nanómetros

Aplicaciones:

Intoxicaciones por estos productos directamente o por contaminación de alimentos.

Rodenticidas cumarínicos

Método (366):

Columna: C18

Fase móvil: tampón fosfato pH 4/acetoniitrilo

Detector: Ultravioleta 302 nanómetros

Aplicaciones:

Intoxicaciones con estos productos.

e) Determinaciones específicas

Investigación de aflatoxinas:

Método (93, 359)

Columna: C18 o P8

Fase móvil: metanol/agua

Detección: Ultravioleta 365 nanómetros

Aplicaciones:

Análisis de alimentos en los cuales, y debido a su mal estado de conservación, proliferan hongos, principalmente el *Aspergillus Flavus* y *Aspergillus Parasiticum*, lo que puede llevar a una contaminación por aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ que afectan principalmente a cereales, legumbres, frutos secos, etc. En la leche pueden existir las aflatoxinas M₁ y M₂ (metabolitos de los anteriores).

Detección en orinas de individuos intoxicados con estos alimentos.

Investigación de α amanitina:

Método (38, 283):

Columna: C18

Fase móvil: acetoniitrilo/agua

Detector: Ultravioleta 302 nanómetros

Aplicaciones:

En suero de intoxicados con amanita faloides.

Investigación de formaldehído:

Método (332, 181):

Columna: C18

Fase móvil: acetonitrilo/agua

Detector: Ultravioleta 358 nanómetros

Derivatizante: 2-4 dinitrofenilhidracina

Aplicaciones:

Determinación en muestras biológicas de intoxicados con metanol.

Determinación del grado de inocuidad de espumas ureas-formaldehído.

Investigación de anilidas de ácidos grasos.

Método (356):

Columna: C18

Fase móvil: acetonitrilo/agua

Detector: Ultravioleta 242 nanómetros

Aplicaciones

Aceites relacionados con el síndrome tóxico para la determinación de las anilidas de los ácidos fórmico, acético, laúrico, mirístico, palmítico, palmitoleico, linoleico, oleico, esteárico y araquídico, presentes en estos aceites.

Muestras biológicas procedentes de intoxicados por el llamado síndrome tóxico.

f) Problemas de índole médico-legal

La cromatografía de líquidos juega un papel muy importante en la investigación médico-legal y más concretamente en los siguientes apartados:

Investigación de tintas:

Método (81, 237):

Columna: C18

Fase móvil: agua/metanol
Detector: Ultravioleta 254-580 nanómetros

Aplicaciones:

Con este método es posible detectar diferencias entre los componentes de distintas tintas azules. Muy útil para datar un documento.

Investigación de manchas:

Método (12, 300):

Columna: C18
Fase móvil: agua/acetónitrilo
Detector: Ultravioleta 254 nanómetros

Aplicaciones:

Investigación de aditivos de color, como son restos de carmín en cigarrillos, vasos, servilletas, etc.

Investigación de explosivos:

Método (112, 216, 242):

Columna: C18 o sílica
Fase móvil: agua/metanol
Detector: Ultravioleta 254 nanómetros

Aplicaciones:

La investigación de explosivos cada día es más frecuente, dado el incremento de la criminalidad y atentados terroristas. En general, podemos hablar de dos situaciones en las que es necesario este análisis:

1. Identificación de material no explosionado para obtener información sobre su origen.
2. Investigación de residuos después de la detonación.

En el primer caso es en el que más ayuda presta esta técnica, ya que se cuenta con cantidades considerables del explosivo a investigar.

En el segundo caso, normalmente sólo se cuenta con trazas del material explosionado, que a su vez puede estar contaminado con material extraño. Por esto se necesitan sistemas de detección de mayor especificidad y sensibilidad, siendo el sistema más idóneo el acoplamiento de la cromatografía de líquidos con el espectrómetro de masas (280).

IV. ESPECTROMETRIA DE MASAS

La espectrometría de masas ha adquirido un gran desarrollo en la Investigación Químico-Toxicológica, gracias a numerosos investigadores como Biemann (43), Beynon (33), Budzikiewicz (62), McLafferty (249) y Waller (371).

Podemos decir que en nuestro laboratorio la espectrometría de masas ocupa el vértice de la pirámide que constituyen todos los procesos que intervienen en cualquier investigación químico-toxicológica de tóxicos orgánicos e incluso algunos inorgánicos.

El espectrómetro de masas incluye, como procesos básicos, la introducción y volatización de la muestra, la ionización de las moléculas, la separación de los iones resultantes de acuerdo a sus masas y la medida de la corriente iónica a cada masa (253, 378, 65, 375, 221, 303).

En la introducción de la muestra podemos realizar:

- 1) Introducción controlada: para introducir los patrones de calibración de masas y sintonía del espectrómetro, para gases y líquidos volátiles y para gases reactantes empleados en ionización química.
- 2) Introducción directa (DIP): para aquellos sólidos y líquidos de alto punto de ebullición (27) y las muestras orgánicas con malas propiedades cromatográficas. Aquí es fundamental la aportación de la cromatología de líquidos con sus colectores de fracciones (248), que lleva a cabo la detección, separación y concentración de tóxicos de naturaleza ácida y otros de naturaleza neutra y alcalina no detectables adecuadamente por CG (cromatografía de gases). Esto es corriente con tóxicos como LSD, Tetrahidrocannabinol, Clorofacinona, Temacepam, Acenocumarol, etc.
- 3) Introducción por cromatógrafo de gases: Nosotros la usamos en un 95 % de las muestras estudiadas. Para trabajar con esta vía de entrada es conveniente disponer de un cromatógrafo de gases equipado con una columna que sea idéntica a la del cromatógrafo del espectrómetro de masas. De esta forma el estudio previo del tóxico por CG proporcionará al EM una serie de datos como tiempo de retención, temperaturas de horno e inyector, así como una orientación precisa sobre la naturaleza e identidad del tóxico en estudio, lo que hace en muchas ocasiones que la apartación del espectrómetro de masas sea sólo de confirmación de dicha identidad.

La ionización de la muestra en estudio se realiza básicamente por dos métodos: ionización química (IQ) e impacto electrónico (IE). Existen otros métodos de ionización como: ionización de campo (34), desorción de campo (35), ionización a presión atmosférica (173) y la ionización de desorción de plasma de californio 252 (240) que tiene una valiosa pero todavía reducida aplicación en los laboratorios de toxicología.

Ionización química (IQ) permite determinar claramente el peso molecular de un tóxico (177, 190). Se pueden utilizar varios gases reactantes, como isobutano (313), amoniaco (174), helio (125, 15), argón (178), etc. Nuestro equipo instrumental dispone de la opción de la ionización química y emplea metano (261) como gas reactante. El metano, que fue el primer gas reactante utilizado y es todavía el más popular, proporciona un espectro de IQ, con una cantidad moderada de fragmentación, fácil de interpretar y útil en cuanto a la información estructural que refleja.

Impacto electrónico (IE) es el método de ionización de moléculas orgánicas con interés toxicológico más utilizado (286, 321). Los espectros de IE son complejos y contienen considerable información estructural, pudiendo decir que el espectro de masas obtenido por IE es como la huella dactilar del tóxico en cuestión. Estos espectros pueden estudiarse directamente en aquellas moléculas orgánicas más simples, pero normalmente se requiere el concurso de un ordenador acoplado al espectrómetro, que permite obtener los datos proporcionados por el espectro de masas y realizar otras funciones como control de parámetros operativos, adquisición de datos, proceso de datos, presentación de datos en varios formatos gráficos y tabulados, así como «búsqueda auxiliada por computador», basada en la coincidencia de espectros con los de una librería de espectros de referencia.

Los análisis de espectrometría de masas apoyados en computador los agrupamos en dos categorías: «TIC» repetitivo o corriente total de iones y monitorización de iones seleccionados (SIM).

Corriente total de iones «TIC» repetitivo

En el «TIC» repetitivo el analizador de masas barre repetitivamente el rango completo de masas de interés. Al final del estudio, el computador reconstruye el espectro y el trazado resultante, que mostrará en una pantalla de vídeo o sobre el papel de un registrador. Esta técnica se ha hecho muy popular, ya que permite utilizar el espectrómetro de masas como un detector altamente sensible y selectivo (120). Además, el análisis por «TIC» permite comparar los espectros obtenidos con los espectros patrones almacenados en librerías. Nosotros disponemos de 14 librerías de espectros de masas:

Librería 1.^a, de drogas con 384 espectros. De gran utilidad, ya que los espectros que contiene son de medicamentos y drogas de abuso.

Librería 2.^a, de drogas con 551 espectros. Pese a su denominación también contiene algunos pesticidas organoclorados y organofosforados.

Librería 3.^a, de disolventes y drogas con 128 espectros, de los cuales 97 los hemos aportado nosotros.

Librería 4.^a, con 870 espectros, todos elaborados por nosotros, con patrones de sustancias tóxicas y de metabolismos de diferentes tóxicos que hemos ido detectando en los últimos años en numerosas investigaciones, así como tóxicos y drogas derivatizados con distintos agentes de derivatización y en diferentes condiciones.

Librería 5.^a, de compuestos hidrocarbonados con 2.509 espectros. Pese a sus numerosos espectros, sólo un reducido número de ellos tienen interés toxicológico.

Librería 6.^a, de olores y sabores con 3.118 espectros. Tiene bajo interés toxicológico, aunque sirve de orientación a la investigación de bebidas, alimentos y medicamentos a los que se añaden los aromatizantes y saborizantes cuyos espectros contiene esta librería.

Librería 7.^a, de compuestos con azufre y fósforo con 3.948 espectros. Muy útil en la investigación de pesticidas organofosforados.

Librería 8.^a, de compuestos siliconados con 2.152 espectros. De relativo interés toxicológico.

Librería 9.^a, de compuestos halogenados con 4.328 espectros. De gran interés en la investigación de medicamentos, drogas de abuso y pesticidas organoclorados.

Librería 10.^a, relación prioritaria de contaminantes según la Environmental Protection Agency (EPA) con 227 espectros. De interés toxicológico.

Librería 11.^a, relación de contaminantes industriales según la EPA con 971 espectros. De gran interés por su contenido, ya que cada vez son más frecuentes las denuncias por la contaminación del medio ambiente.

Librería 12.^a, pesticidas con 387 espectros. De enorme interés toxicológico en la investigación de pesticidas organoclorados, organofosforados y carbámicos.

Librería 13.^a, compuestos nitrogenados I con 6.454 espectros. De gran interés toxicológico, ya que contiene un elevado número de espectros de sustancias potencialmente tóxicas con nitrógeno en sus moléculas y con un peso molecular inferior a 235.

Librería 14.^a, compuestos nitrogenados II con 6.028 espectros. De gran interés toxicológico. Contiene espectros de sustancias nitrogenadas con peso molecular superior a 235.

Monitorización de iones seleccionados (SIM)

Es la otra forma de efectuar análisis apoyados en computador. Mientras que el modo operativo TIC permite efectuar análisis cualitativos (confirmación e identificación), el SIM además de los análisis cualitativos, permite efectuar análisis cuantitativos.

Este modo operativo SIM, también llamado fragmentografía de masas, permite adquirir los trazados de corriente de ión seleccionados, teniendo al espectrómetro de masas monitorizando continuamente sólo las masas seleccionadas; tiene las ventajas de una mayor fiabilidad cuantitativa y una sensibilidad por lo menos 100 veces mayor (252) que el modo TIC.

Para las valoraciones cuantitativas por SIM se emplean tanto estándares externos como internos; entre estos últimos se usan isómeros (265), homólogos (225), compuestos de naturaleza química similar (202) y análogos marcados isotópicamente (209, 19).

Basados en estos métodos hemos tenido que realizar modificaciones sobre los mismos (19, 135), con el fin de aplicarlos a investigaciones toxicológicas concretas. Citaremos como ejemplo el empleo de bromuro de metilo deuterado en la investigación de bromuro de metilo en una harina de soja procedente de Brasil, sin el cual no hubiera podido realizarse el análisis.

Exponemos a continuación algunas condiciones operativas realizadas tanto en TIC como en SIM, fruto de nuestra propia experimentación y que creemos de interés.

Modo operativo TIC

l) Medicamentos, sus metabolismos y drogas de abuso

Si en el estudio previo por cromatografía de gases y cromatografía de líquidos (HPLC) se ha detectado una sustancia con una cierta abundancia, se seguirá el modo operativo TIC. La vía de entrada puede ser por el cromatógrafo de gases o introducción directa (DIP). Debido a la gran cantidad de medicamentos, éstos tienen una gran variedad de tiempos de retención, por lo que seguiremos varios métodos.

Método A: Para aquellos tóxicos con un tiempo de retención próximo al de las anfetaminas.
Línea de transferencia 280°.

Fuente de iones 200°.
Analizador 180°.
Multiplicador 1.300 V.
Temperatura horno 90 °C.
Temperatura inyector 300 °C.

A los 2,5 minutos se aplica la siguiente secuencia de ordenador gcc 250, 0, 0, 250, 0, 300, 0, con el fin de efectuar una subida rápida de temperatura del horno.

Intervalo de masas 40-400.

Método B: Las sustancias tóxicas con tiempo de retención próximas a la cafeína.

Horno temperatura 1.^a 180 °C.
Horno temperatura 2.^a 250 °C.
Rampa de temperatura 16°/minuto.
Temperatura inyector 300 °C.
Intervalo de masas 40-400.
Los demás parámetros, como los del método A.

Método C: Sustancias tóxicas con tiempo de retención próximo al del Diacepan.

Horno temperatura 1.^a, 250°.
Horno temperatura 2.^a, 250°.
Temperatura inyector, 300 °C.
Intervalo de masas 40-400.
Los demás parámetros, como los del método A.

Método D: Sustancias tóxicas con tiempo de retención próximo a la estriocina.

Horno temperatura 1.^a, 300°.
Horno temperatura 2.^a, 300°.
Temperatura inyector, 325°.
Intervalo de masas 50-450.
Los demás parámetros, como los del método A.

Método E: Para aquellas sustancias que no tienen buen comportamiento en cromatografía de gases, y son detectadas por cromatografía de líquidos (HPLC), es conveniente usar la introducción directa (DIP). Aquí las condiciones de trabajo son:

Sonda temperatura 1.^a, 30 °C.
Sonda temperatura 2.^a, 350 °C.
Rampa de temperatura, 64 °C/minuto.
Intervalo habitual de masas 40-400.

Una vez obtenido el espectro de masas del medicamento, metabolito o droga de abuso, se busca su espectro en librerías a través de ordenador.

Las librerías más útiles son la 1.^a, 2.^a, 3.^a, 4.^a, 9.^a, 13.^a y 14.^a de las ya expuestas.

Debido a que estas librerías informatizadas son limitadas, se puede estudiar el espectro obtenido, comparándolo manualmente con colecciones de espectros como «Índice de ocho picos de espectros de masas» (247). A medida que se localiza el espectro de una nueva sustancia la incluimos en la librería 4.^a, que es creación nuestra.

II) Pesticidas organoclorados, organofosforados y carbámicos

Método F: Horno temperatura 1.^a, 150 °C.

Horno temperatura 2.^a, 250 °C.

Inyector temperatura, 250 °C.

Rampa de temperatura, 8 °C/minuto.

Las librerías más útiles en este caso son la 3.^a, 4.^a, 7.^a, 9.^a, 10.^a, 11.^a y 12.^a

III) Hidrocarburos derivados del petróleo

Método G: E. multiplicador, 1.300 V.

La línea de transferencia, fuente y analizador, como en el método A.

Horno temperatura 1.^a, 40 °C.

Horno temperatura 2.^a, 200 °C.

Inyector temperatura, 200 °C.

Una vez obtenido el espectro se buscará en librería. Para este caso son útiles la 2.^a, 5.^a, 10.^a, 11.^a

Modo operativo SIM

Se empleará en los casos en que se ha detectado por cromatografía de gases o por cromatografía de líquidos (HPLC) una pequeña cantidad de cualquier sustancia, de la que se quiere confirmar su presencia. Es unas cien veces más sensible que el modo TIC, pero tiene la salvedad de que no puede consultarse en librería; es decir, que permite buscar un tóxico concreto con una sensibilidad de detección próxima a la de los detectores más sensibles de CG, tales como el de Nitrógeno-Fósforo y captura electrónica.

Describiré brevemente dos ejemplos de SIM, uno con introducción a través del cromatógrafo de gases y otro por introducción directa (DIP).

IV) Estudio por el modo operativo SIM

Método H: Metabolitos de la heroína

Los metabolitos de la heroína que investigamos habitualmente son monoacetilmorfina, morfina y codeína. Como la morfina sufre retención en la columna cromatográfica debido a sus grupos polares, se derivatiza el extracto en estudio con BSTFA (Bis-trimetilsililtrifluoroacetamida). Esto permite poder estudiar simultáneamente los tres metabolitos de heroína.

Las condiciones operativas son:

Línea de transferencia, 280 °C.

Fuente de iones, 200 °C.

Analizador, 180 °C.

E. multiplicador, 3.000 V.

Horno temperatura 1.^a, 250 °C.

Horno temperatura 2.^a, 250 °C.

Inyector temperatura, 300 °C.

iones 414-429 (morfina BSTFA).

iones 371-343 (codeína BSTFA).

iones 340-399 (M.A.M. BSTFA).

Este método es de enorme utilidad, ya que permite detectar a cualquiera de estos metabolitos en extractos de vísceras, sangre y orina. Se sigue en investigaciones ordenadas por la autoridad judicial, en casos de muertes por sobredosis de heroína, en análisis a drogadictos en tratamientos de deshabituación y por los que se interesa la autoridad sanitaria y en controles a trabajadores de grandes empresas públicas y privadas.

Método I: Estudio de LSD por DIP, en una fracción obtenida en el cromatógrafo de líquidos (HPLC) por medio de su colector de fracciones.

Las condiciones de trabajo son:

Sonda temperatura 1.^a, 30 °C.

Sonda temperatura 2.^a, 350 °C.

Rampa de temperatura, 64 °C/minuto.

iones 323-221-181.

Es aplicable en el estudio de restos de comprimidos de LSD, contenidos de estómago y orinas.

V. INMUNOENSAYO

La técnica de inmunoensayo más utilizada en Toxicología Forense es el enzimoimmunoensayo. Este método deriva de un inmunoensayo más antiguo, el inmunoensayo de radicales libres o FRAT, que servía para detectar drogas de abuso en orina. El FRAT utilizaba como marcador un grupo funcional conteniendo un radical libre (normalmente un radical hidroxiloestable) que en solución producía una señal capaz de ser detectada por un espectrómetro de resonancia magnética nuclear (32, 42). Aunque era una técnica muy sensible, la instrumentación era costosa y difícil de manejar. De estos inconvenientes nació el enzimoimmunoensayo en un intento de utilizar el mismo fundamento, simplificando la instrumentación. Esto se consigue utilizando como marcador una enzima (66, 317), cuya actividad puede ser medida por espectrofotometría UV-visible. Ambas técnicas tienen su origen en el radioinmunoensayo (RIA), descubierto por Yalow y Berson en 1960 para la detección de la insulina (383).

En síntesis este fundamento es el siguiente: una droga marcada con un determinado marcador (radioactivo en el caso de RIA, radical libre en el caso del FRAT, fluorescencia en el caso de inmunoensayos de fluorescencia, etc.), compete con la droga a investigar, por unirse a un anticuerpo específico. La presencia de la droga en el problema se pondrá de manifiesto porque al unirse al anticuerpo específico desplaza a la droga marcada, la cual quedará en libertad para que su marcaje sea detectado por el instrumento analítico adecuado: contador de partículas en el caso de RIA, espectrómetro de resonancia magnética nuclear en el caso del FRAT, espectrofotómetro UV-visible en el caso de enzimoimmunoensayo, fluorímetro en el caso de inmunoensayo de fluorescencia, etc.

Las principales ventajas de los inmunoensayos son su facilidad de manejo, rapidez de los análisis, sensibilidad y especificidad.

De hecho, los inmunoensayos representan un avance significativo en la capacidad del toxicólogo para detectar drogas en matrices biológicas complejas. Con frecuencia se ha tachado a los inmunoensayos de falta de especificidad, debido a que la especificidad que presentan es de «clase», es decir, de grupo molecular con estructura química similar. Esta característica es precisamente la que da pie a su utilización como técnica de screening, ya que va a permitir al toxicólogo descartar la presencia de un grupo completo de drogas, por ejemplo benzodiazepinas, o bien sospechar que esté ante un tóxico de un determinado grupo,

y actuar ya sobre seguro empleando sobre la muestra la técnica cromatográfica más adecuada (185).

Los enzimoimmunoensayos más utilizados en Toxicología Forense son los relativos a las drogas de abuso, tóxicos que en la actualidad están involucrados en el 80 % de los casos analizados en el laboratorio. Opiáceos derivados de morfina, cocaína y su metabolito, benzoilecgonina, anfetaminas, benzodiazepinas, barbitúricos, metadona y metacualona, propoxifeno y fenciclidina son las principales drogas de abuso que se analizan en un primer screening por esta técnica en nuestro laboratorio.

Aunque en un principio estos inmunoensayos están diseñados para orina, suero o plasma, pueden analizarse también una gran variedad de muestras biológicas, como saliva (155, 250, 29, 172), lágrimas (256) y líquido cefalorraquídeo (320). De mayor interés en química forense son las adaptaciones de la técnica a muestras como sangre entera, bilis y tejidos (331, 139). Estas muestras deben ser previamente homogeneizadas y extraídas a un pH adecuado, y el extracto seco es reconstituido con un medio acuoso. Este procedimiento permite al mismo tiempo eliminar interferencias, turbideces o coloraciones demasiado intensas (333). El Instituto Nacional de Toxicología que fue pionero en España en la introducción de esta técnica, tiene puesta a punto y publicada su propia metodología para la aplicación de la técnica a muestras biológicas (229).

El enzimoimmunoensayo puede también utilizarse como confirmación de la identidad de una determinada droga inicialmente separada por cromatografía de capa fina: la mancha puede ser raspada de la placa, eluida con buffer y analizada por inmunoensayo (251).

Por lo que se refiere a exactitud y precisión, se han hecho muchos estudios comparando el inmunoensayo con otras técnicas. La conclusión que parece desprenderse de ellos, en lo que se refiere a drogas de abuso, es que se puede detectar la droga en cuestión en un 95 % de muestras que la contengan a nivel o por encima del límite de detección especificado para ella (126, 258, 365).

Los inmunoensayos para drogas pretenden ser cualitativos y todo lo más semicuantitativos. Nuestro Instituto publicó las posibilidades de cuantificación que esta nueva técnica ofrecía (230).

Una de las limitaciones de la técnica que se producía en los primeros tiempos, debido al uso de la enzima lisozima como marcador, ha sido superado por la sustitución total de este enzima por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. En la actualidad subsisten pequeñas interferencias debidas fundamentalmente a mezclado incompleto del reactivo,

absorbancias iniciales demasiado altas (304) o muestras turbias que producen dispersión de la luz (311).

Otra de las desventajas de la técnica es su coste. Si bien es cierto que requiere menos trabajo técnico que la cromatografía convencional (335), no es menos cierto que es un equipo de gran coste de mantenimiento. Con el fin de abaratar el precio por análisis, se han diseñado diversos sistemas como los equipos que utilizan menor cantidad de reactivo o la dilución de los reactivos (208). Estas modificaciones, cuando se introducen deben ser cuidadosamente evaluadas, ya que pueden afectar considerablemente los resultados (97, 55).

En resumen y como conclusión debemos recordar que hoy día se dispone en el laboratorio toxicológico de un cierto número de técnicas analíticas de fundamento físico-químico diferente, cada una con sus ventajas e inconvenientes. La combinación de todas ellas es la que en definitiva permite la identificación inequívoca de un tóxico en una determinada muestra (30).

B) INVESTIGACIONES MEDICO-LEGALES EN EL LABORATORIO FORENSE

En este apartado vamos a ocuparnos únicamente de los problemas clásicos de la investigación médico-legal, y dentro de ellos estudiaremos solamente los más usuales en la práctica diaria y concretamente aquellos en los cuales nuestro grupo de trabajo ha realizado comprobaciones o variaciones para mejorar sus técnicas.

I. INVESTIGACION DE MANCHAS DE SANGRE

Las manchas de sangre constituyen el grupo más importante de manchas biológicas desde un punto de vista médico-legal, ya que son las manchas más frecuentes de estudio en los laboratorios de biología forense y además se trata de las manchas biológicas de las que mayor información puede obtenerse.

Los principales interrogantes que se nos presentan en relación con las manchas de sangre son los siguientes:

1. Identificación de la naturaleza sanguínea de la mancha (**Diagnóstico genérico**).
2. Identificación de la especie animal (humano o no) a la que pertenece la mancha de sangre (**Diagnóstico de especie**).
3. Identificación del individuo o grupo de individuos al que puede pertenecer la mancha de sangre (**Diagnóstico de individualización**).

Y de manera menos frecuente:

4. **Diagnóstico del origen de la sangre** (sangre menstrual; sangre fetal...).
5. **Diagnóstico del sexo** del individuo del que procede la sangre.

1. Diagnóstico genérico

Generalmente se emplean dos grandes grupos de pruebas en este tipo de investigaciones:

Primero. Pruebas de orientación: se trata de una serie de reacciones colorimétricas de baja especificidad pero de una alta sensibilidad que van encaminadas a la demostración de la actividad peroxidásica de la sangre. Destacamos por su importancia las siguientes reacciones:

– **Reacción de la bencidina** (Adler, 1904) (3): consistente en hacer reaccionar la presunta mancha de sangre con una solución de bencidina en ácido acético y posteriormente con H_2O_2 al 30 %. En caso positivo se desarrolla una coloración azul intensa. La sensibilidad es aproximadamente de 1:500.000, pero determinados oxidantes así como peroxidasa vegetales producen falsos positivos, lo que cuestiona la especificidad de la prueba.

– **Reacción de la fenoftaleína** (Kastle-Meyer): la reacción tiene un color de viraje rojo y una sensibilidad de 1:1.200.000.

– **Reacción del verde malaquita**: que vira a verde en caso positivo y tiene una sensibilidad de 1:20.000.

Segundo. Pruebas de certeza: se trata de una serie de técnicas de menor sensibilidad que las anteriores pero de gran especificidad, de las cuales destacamos las siguientes:

– **Técnicas microcristalográficas:** se basan en la propiedad de cristalizar de determinados derivados de la hemoglobina, como son las sales halogenadas de la hematina y el hemocromógeno. El primer cristal halógeno de la **hematina** fue descrito por Teichman (1853) tras tratamiento de la sangre con ácido acético en caliente.

Estos cristales observados al microscopio tienen una forma prismática alargada y son de color pardo oscuro. Distintas modificaciones de la técnica original han sido descritas (41, 339).

Otros cristales de interés pero menos utilizados que los de hematina son los de **hemocromógeno** (compuesto nitrogenado de la hematina) indetificados por vez primera por Hoppe y Seyler (1876). Se trata de cristales de color naranja y formas arborescentes.

Como veremos más adelante, estas técnicas microcristalográficas presentan bastantes limitaciones, dando resultados negativos en manchas de sangre antiguas, manchas sometidas a altas temperaturas, o en estado de putrefacción y están siendo desplazadas por técnicas inmunológicas de reconocimiento de hemoglobina.

– **Técnicas espectroscópicas:** Tienen por objeto establecer el espectro de absorción de la hemoglobina (máximos: 577 y 540,5 nm y banda de Soret 412 nm) y de algún derivado como la hematina-alcalina (600 nm) y el hemocromógeno (559 y 530 nm)

– **Técnicas cromatográficas:** Técnicas utilizadas para la demostración de la hemoglobina que presenta una movilidad cromatográfica concreta y que fue descrita por primera vez por Frache (138) en 1939 y perfeccionada por Fiori (129), y con la introducción de la cromatografía en capa fina por Faragó y Celesti y colaboradores (121, 78).

- **Métodos inmunológicos:** Como hemos visto hasta ahora la demostración de la hemoglobina constituye el elemento básico para la realización del diagnóstico genérico.

Aprovechando el carácter antigénico del grupo proteico de la hemoglobina distintos autores (131, 260) han utilizado **antisueros antihemoglobina** en técnicas de doble inmunodifusión en agar o bien mediante conrainmunolectroforesis como prueba confirmativa de la presencia de sangre. La técnica de doble inmunodifusión en agar utilizando un antisuero antihemoglobina humana es en la actualidad la prueba de certeza más utilizada por nuestro laboratorio en el diagnóstico genérico de manchas de sangre. Dicha prueba, como veremos más adelante, permite a la vez realizar el diagnóstico de especie, por lo que la técnica cobra aún más interés. La técnica presenta una gran especificidad y una sensibilidad mayor que las otras pruebas anteriormente descritas. Por último simplemente citar el desarrollo de un nuevo inmunoensayo descrito recientemente por Lappas (218), que utilizando un antisuero anti-hemoglobina humana, permite detectar el equivalente a 0,01 ml de sangre humana.

2. Diagnóstico de especie

Dos grandes grupos de métodos son utilizados en el diagnóstico de especie de las manchas de sangre:

- **Métodos inmunológicos.**
- **Métodos electroforéticos.**

Primero. Métodos inmunológicos: Estos métodos aprovechan la propiedad de determinadas biomoléculas (los anticuerpos) de reaccionar específicamente con otras biomoléculas de la sangre que de forma genérica son denominados antígenos. Los distintos métodos utilizados simplemente son distintas formas de poner en evidencia esta reacción antígeno-anticuerpo. A continuación hacemos una breve exposición de estos métodos:

- **Test de inhibición de la antiglobulina:** La técnica propuesta por Anderson en 1952 (11) se basa en la inhibición de la aglutinación de los hematíes ORh+ sensibilizados con anticuerpos bloqueantes, cuando se les adiciona suero antiglobulina (suero de Coombs), si previamente este suero se pone en contacto con una mancha de sangre humana.

- **Técnicas de inmunoprecipitación en gel:** Estas técnicas se basan en que cuando se mezclan en las proporciones adecuadas una solución de antígeno y su correspondiente antisuero, se forma un precipitado. Dicha reacción de precipitación se puede visualizar fácilmente cuando la reacción se lleva a cabo en un medio gelificado como la aga-

rosa. Los antisueros más empleados en el diagnóstico de especie de manchas de sangre son:

- **Antisueros polivalentes:** Anti-proteínas plasmáticas humanas.
- **Antisueros monovalentes:** Frente a una sola fracción antigénica. El más utilizado es el antisuero antihemoglobina A humana. Otros antisueros utilizados son: Anti-albúmina humana, Anti-haptoglobina, Anti-IgG. humana, etc.

Las técnicas de inmunoprecipitación más utilizadas en nuestro Laboratorio son:

- **Doble inmunodifusión (Ouchterlony)**, cuya utilización en el campo de la medicina legal fue propuesta por Muller en 1957 (259). En el test de Ouchterlony el antígeno y el anticuerpo depositados en pocillos, realizados en un gel de agar, difunden el uno hacia el otro y precipitan, formando una línea opaca (banda de precipitación) en la región donde se encuentran en proporciones óptimas. El test permite comparar los antígenos de una mancha problema con un control de proteínas humanas estableciendo las reacciones de precipitación en pocillos adyacentes. Si las líneas de precipitación del control y la mancha problema confluyen completamente, indica identidad inmunológica y por tanto puede afirmarse que la mancha problema es de naturaleza humana.

- **Contrainmunolectroforesis:** En este caso, antígeno y anticuerpo enfrentados en pocillos opuestos en un gel de agar son sometidos a electroforesis, de tal manera que la reacción de precipitación se establece rápidamente. Esta técnica es considerada más sensible que la anterior, pero no permite la comparación de las bandas de precipitación de dos antígenos.

- **Inmunolectroforesis:** En esta técnica las proteínas de un eluido de la mancha de sangre previamente se separan electroforéticamente y posteriormente se detectan por inmunodifusión utilizando el antisuero adecuado.

Segundo. Métodos electroforéticos: Destacamos en este epígrafe la utilización del **isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida** (una técnica electroforética que permite separar las proteínas por su punto isoelectrónico) en el análisis de la hemoglobina humana dentro del diagnóstico de especie de manchas de sangre, ya que las bandas de focalización de la Hb humana presentan p. isoelectrónicos diferenciables de los p. isoelectrónicos de Hb animales, tal como demostró Villanueva (369) y posteriormente otros autores (277, 222).

3. Diagnóstico de individualización

Dentro del diagnóstico de individualización se incluyen todas aquellas técnicas encaminadas a desvelar aquellas características genéticas que permitan clasificar la mancha de sangre en estudio como perteneciente a un grupo de individuos lo más reducido posible. Estas características polimórficas de origen genético se denominan de forma genérica **marcadores genéticos**, siendo los más estudiados los siguientes:

- Antígenos de superficie de eritrocitos.
- Proteínas y enzimas polimórficas.
- Antígenos del sistema HLA.
- Polimorfismos del DNA.

A continuación se describen las técnicas más utilizadas para el tipaje de estos marcadores genéticos.

- **Investigación de antígenos eritrocitarios:** El sistema ABO es todavía hoy en día uno de los marcadores genéticos más empleados en el diagnóstico de individualización de manchas de sangre. Todos los métodos empleados en el tipaje de los antígenos del sistema ABO a partir de manchas de sangre se basan en métodos inmunológicos indirectos. Por su interés y su utilización en nuestro laboratorio destacamos las siguientes técnicas:

- **Técnica de Lattes (220)** que permite la demostración de las aglutininas (anticuerpos) del sistema ABO en costras de sangre seca y por tanto deducir el grupo sanguíneo a que pertenecen. La técnica tiene graves limitaciones, ya que se necesita disponer de costras de sangre de poca antigüedad.
- **Técnica de absorción-elucción:** Método propuesto por Siracusa (330) y Kind (205), y modificado por Nicóls y Pereira Fiori (271) y colaboradores (132), Howard y Martín (175). Se basa en el principio de la elucción térmica del anticuerpo que en una fase precedente es absorbido con el correspondiente antígeno eventualmente presente en la mancha de sangre y posteriormente identificado mediante reacción de aglutinación con hematíes testigo.

Se trata de una de las técnicas más utilizadas en la mayoría de los laboratorios de medicina forense y sometida a algunas modificaciones, se utiliza también en el tipaje de los antígenos eritrocitarios del sistema Rhesus (227) y del sistema MNS_s (285).

- **Técnica de aglutinación mixta (Coombs Dood, 1961) (87):** Basada en el principio de absorción de la técnica anterior, pero en la que no se realiza el paso de elucción y se examina microscópicamente la reacción de aglutinación al poner en contacto un hilo de la mancha con el correspondiente antisuero absorbido y los hematíes testigo correspondientes.

- **Investigación de proteínas y enzimas polimórficas:** La aplicación de los métodos electroforéticos al análisis de proteínas plasmáticas y enzimas eritrocitarias polimórficas ha permitido aumentar el número de marcadores genéticos que se pueden tipar en manchas de sangre. Dentro de los métodos electroforéticos destacamos el **isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida**, que ofrece una alternativa efectiva a los métodos electroforéticos convencionales en el tipaje de marcadores genéticos y que es uno de los métodos más utilizados en nuestro Laboratorio de Biología Forense.

Frente a los métodos convencionales el isoelectroenfoque permite separar las proteínas por sus puntos isoelectrónicos en un determinado gradiente de pH, lo cual lo convierte en un método de alta resolución que ha revelado una heterogeneidad genética mayor que los métodos electroforéticos convencionales.

El número de proteínas y enzimas analizados mediante isoelectroenfoque en manchas de sangre es cada día mayor. A continuación destacamos los sistemas más estudiados y que son de uso rutinario en nuestro laboratorio dentro del diagnóstico de individualización de manchas de sangre.

- Fosfatasa ácida eritrocitaria (64, 61, 263).
- Esterasa D (59).
- Fosfoglucomutasa 1 (60).
- α_1 antitripsina (72).
- Grupo específico componente (374, 58).

Con respecto al tipaje de la proteína grupo específico componente en manchas de sangre hemos de destacar el desarrollo en nuestros laboratorios de un nuevo método de análisis por isoelectroenfoque, que consiste en la utilización de microgeles de poliacrilamida y la detección de las bandas de focalización mediante enzimo-inmunoensayo tras transferencia a una matriz inmovilizante (9).

Se trata de un método rápido y económico que permite detectar la proteína Gc con un límite de sensibilidad de 5,6 nanogramos.

En la actualidad desarrollamos un método similar para el tipaje de la proteína α_1 antitripsina en manchas de sangre.

- **Investigación de los antígenos del sistema HLA:** El gran polimorfismo genético y potencial de discriminación del sistema HLA, tal como ha sido establecido en estudios de paternidad, ha hecho que dicho sistema sea un candidato de estudio en el tipaje de manchas de sangre (269).

El método de tipaje consiste en comprobar la inhibición de la acti-

vidad citotóxica, frente a linfocitos indicadores que llevan el antígeno HLA correspondiente, de los antisueros específicos cuando éstos son previamente mezclados con una porción de la mancha de sangre.

Si bien diversos grupos han publicado resultados satisfactorios en el tipaje de los antígenos del sistema HLA en manchas de sangre, no se trata de una técnica extendida en los laboratorios de medicina forense y dos problemas siguen sin resolverse:

- La baja sensibilidad del método.
- La falta de especificidad debido a la existencia de reacciones cruzadas.

– **Investigación de polimorfismos del DNA:** Por último, simplemente citar que en la actualidad ya existen métodos que permiten detectar en manchas de sangre polimorfismos directamente en el DNA, el material genético que codifica todas las diferencias genéticas.

La técnica se basa en la identificación de polimorfismos de tamaño de determinados fragmentos de restricción del DNA mediante la tecnología de hibridación del DNA (197).

4. Diagnóstico del origen de la sangre

– **Identificación de sangre menstrual:** La identificación de sangre menstrual puede ser algunas veces de importante consideración en la investigación científica de ofensas sexuales.

Aunque no existe un método específico para la identificación de sangre menstrual, a continuación citamos los métodos de mayor interés:

- Investigación microscópica de **células del endometrio** (292, 111).
- Investigación de la **actividad fibrinolítica**, especialmente aumentada en sangre menstrual debido a la presencia de grandes cantidades de Plaminógeno activador (233, 268, 377).
- Investigación del patrón electroforético de la bandas de la **Lactato deshidrogenasa (LDH)**, cuyas isoenzimas LDH-4 y LDH-5 se encuentran aumentadas en sangre menstrual (337).

– **Identificación de sangre fetal:** En muchas ocasiones es de interés establecer si la mancha de sangre es de origen fetal para desvelar un aborto o un infanticidio.

Dos son los componentes que permiten diferenciar la sangre fetal de la sangre del adulto:

- **Hemoglobina fetal (HbF).**
- **Alfa-fetoproteína (AFP).**

Los métodos más utilizados en la investigación de HbF son:

- Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida (71).
- Test de doble inmunodifusión en agar utilizando anti-HbF humana (130).
- Método de desnaturalización por alcali (199).

Para la investigación de la AFP se han descrito distintos métodos, como son:

- Método de doble inmunodifusión (183).
- Radioinmunoensayo (200).
- Enzimoimmunoensayo (201).

5. Diagnóstico del sexo

Por fin, reseñar otro de los diagnósticos con los que se suele enfrentar el laboratorio de biología forense. Se trata en este caso de diagnosticar el sexo de la persona de la que procede la sangre.

La técnica en este caso está basada en la propiedad del cromosoma y en núcleos interfásicos de emitir una fuerte fluorescencia cuando se tiñe con un fluorocromo del tipo de la quinacrina y se analiza mediante microscopía de fluorescencia (212).

II. INVESTIGACION DE MANCHAS DE ESPERMA

La demostración de la presencia de espermatozoides es un dato importante en los delitos contra la libertad sexual, violaciones, abusos deshonestos, etc.

Este estudio está cada vez más solicitado a la Sección de Biología.

Antes de pasar a describir las técnicas que se utilizan, se explican a continuación los componentes y características del espermatozoides, para comprender mejor el porqué de la sistemática que se utiliza.

Fisiología del líquido espermático

El semen es una solución compleja cuyos componentes se forman en los testículos y demás órganos masculinos, fundamentalmente las vesículas seminales y la próstata.

Consta, fundamentalmente, de los espermatozoides suspendidos en el plasma seminal. Los espermatozoides son las únicas células presentes en el semen normal. Comprenden menos del 5 % del volumen del semen. Las vesículas seminales contribuyen aproximadamente un 60 % al volumen del plasma seminal. El líquido procedente de ellas es viscoso, neutro o ligeramente alcalino, amarillento por su elevado contenido en flavina, que es la responsable de la fluorescencia del semen a la luz U. V.

Contiene gran cantidad de FRUCTOSA, principal elemento nutritivo de los espermatozoides. Otros componentes son: potasio, ácido cítrico, ácido ascórbico, ergoteína, fosforilcolina, varios aminoácidos y prostaglandinas.

La próstata contribuye aproximadamente en un 20 % al volumen total del semen. Produce un líquido lechoso, ligeramente alcalino rico en enzimas proteolíticas y fosfatasa ácida. Contienen también calcio, citrato, ESPERMINA y otros aminoácidos y aminos.

Después de formarse en los tubos seminíferos, los espermatozoides siguen hacia el epidídimo y la mayor parte quedan almacenados en el conducto deferente. Durante la eyaculación, cada vesícula seminal vacía su contenido en el conducto eyaculador al mismo tiempo que el conducto deferente vacía el semen, y el líquido fluido y lechoso de la glándula prostática se une a la masa del semen.

Diagnóstico Genérico

Puede pensarse que una sustancia de una composición tan variada y característica ofrece en principio grandes posibilidades a la hora de realizar un diagnóstico definitivo y de certeza en cuanto a su presencia. Pero las dificultades que se plantean en el laboratorio, en el momento del estudio de una posible mancha de esperma, no son pocas; las inherentes a la propia naturaleza de la mancha, su antigüedad, la cantidad de muestra disponible, la contaminación con otros líquidos y fluidos biológicos (fluido vaginal, orina, sangre, etc.) todo ello hace que los componentes se alteren en cuanto a sus propiedades y características, o bien queden enmascarados o se produzcan interferencias.

Por esto es de gran importancia valorar en cada caso los resultados y considerar, a la hora de realizar una determinada prueba y extraer las conclusiones, todos los factores enumerados, teniendo en cuenta la muestra y los medios disponibles.

Análisis en el Laboratorio

Las muestras enviadas para el estudio de la presencia de manchas de semen son muy variadas, hisopos con los que se realiza un «lavado» a la víctima de una violación, prendas de vestir de la víctima o del sospechoso que aparentemente pueden no presentar ningún rastro.

En cualquier caso, es necesario llevar a cabo, en primer lugar, una serie de determinaciones encaminadas a confirmar la presencia de semen, y en segundo lugar, el llamado «diagnóstico de individualización» para establecer, cuando sea posible, una relación entre las manchas y los posibles sospechosos implicados en el delito.

Se enumeran a continuación diversas técnicas propuestas por diversos autores para la detección de los componentes del esperma en las manchas, algunas de las cuales se utilizan rutinariamente en el laboratorio de Biología de nuestro Instituto.

Visualización de espermatozoides. Hasta hace poco, la prueba concluyente y definitiva para la demostración de la presencia de esperma ha sido la visualización de espermatozoides; se trata de efectuar una extensión a partir de un macerado de la muestra para la extracción de los espermatozoides (272) y posterior tinción. En los laboratorios de citología y patología se utiliza el método de Papanicolau; como es complicado y consume tiempo, no se utiliza normalmente en los laboratorios de medicina forense, en los que se prefieren otros más sencillos (hematoxilina, eosina, eritrosina amoniacal, azul de metileno, violeta de geniana).

La observación al microscopio se hace con objetivo de inmersión con iluminación normal, aunque se han propuesto otros métodos (156).

Una objeción que podría hacerse a estos métodos es que las manipulaciones (extracción, fijación, etc.) producen un cierto grado de distorsión que dificulta su reconocimiento. La posibilidad de visualizarlos mediante un microscopio electrónico de barrido, presenta muchas ventajas; la muestra se prepara fácilmente sin necesidad de manipulaciones que alteren los espermatozoides.

Los espermatozoides normales presentan una morfología muy característica que comprende: cabeza, cuello, cuerpo y cola muy larga, y con estructura de cilio.

Son células muy frágiles que se rompen fácilmente a nivel del cuello, lo que dificulta su visualización. Además hay que considerar que no se encontrarán en el semen de individuos azoospermicos o vasectomizados (cada vez mayor número), por lo que su ausencia no significa necesariamente ausencia de semen.

Por esto, existen gran cantidad de técnicas que permiten poner de manifiesto los componentes químicos del plasma seminal que se enumeran a continuación.

Pruebas para los componentes químicos del plasma seminal.

Fosfatasa ácida

El test de la fosfatasa ácida es la otra prueba «reina» para la detección de semen, si bien posee algunas limitaciones. Se basa en la gran actividad de esta enzima en el tejido prostático; pero es un enzima ubicuo, también presente en el fluido vaginal, por lo que una baja concentración hallada en la muestra puede inducir a conclusiones erróneas (325). Está considerada por algunos autores como una prueba irrefutable de la presencia de esperma. Pero cuando es negativa ¿se puede afirmar que no existe esperma? La bibliografía y nuestra propia experiencia nos inclinan a pensar que no es así. Por una parte se han dado casos en que la actividad fosfatásica de la muestra estudiada por colorimetría era baja y sin embargo, se han encontrado, al menos, cabezas de espermatozoides. Y al contrario, en muestras con una alta actividad fosfatásica no se ha detectado por otros métodos la presencia de esperma. Este último problema, que ocurre debido a la actividad fosfatásica que posee también el fluido vaginal (muchas muestras son hisopos introducidos en la vagina de presuntas violadas), hemos conseguido solventarlo en el laboratorio poniendo a punto una técnica que permite distinguir, perfectamente, la actividad fosfatásica propia del esperma, es decir, la actividad fosfatásica prostática de la vaginal (2). En efecto, se ha com-

probado la sensibilidad de este método capaz de detectar la actividad en manchas diluidas; la experiencia indica que la única limitación es la antigüedad de las mismas; con el tiempo, el enzima queda alterado y la actividad llega incluso a desaparecer.

El método utilizado consta de dos fases. En ambas la técnica utilizada es el isoelectro-enfoque en gel de acrilamida (PAGIF).

En la primera se utiliza un gradiente de pH que permite detectar tanto la fosfatasa vaginal como la prostática. Las bandas más anódicas corresponden a la actividad fosfatasa ácida prostática y las más catódicas a la vaginal, existiendo una serie de bandas centrales comunes a ambas; se identifican utilizando controles de fluido vaginal y semen. Tras esta prueba preliminar se realiza otra focalización de la muestra y un control en un gradiente más estrecho que sirve para detectar únicamente la actividad prostática. La aparición de bandas que focalizan en el mismo lugar que el esperma control permite confirmar la presencia de fosfatasa ácida prostática y por tanto de esperma.

Espermina y colina

La detección de estas sustancias puede ser de gran utilidad, ya que se encuentran en individuos vasectomizados, ya que la colina procede de la fosforilcolina de las vesículas seminales y la espermina procede de la próstata. Además, por ser moléculas pequeñas son más resistentes a los factores de desnaturalización (calor, ácidos, antigüedad) que las proteínas. El hecho de que la espermina exista en numerosos tejidos y órganos (testículos, páncreas, hígado, médula ósea, cerebro y sangre) lo mismo que la colina, no plantea en principio problemas de especificidad, ya que nunca se encuentran juntas como en el esperma ni a tan altas concentraciones. Se pueden utilizar varios métodos:

Pruebas cristalográficas

Por su simplicidad, pueden utilizarse como prueba preliminar. Se basan en la formación de cristales con componentes del esperma (espermina y colina). Son pruebas clásicas, enumeradas en toda la bibliografía referente al tema como son los cristales de Florence (yoduro de colina), de Barberio (picrato de espermina), Puranan (flevianato de espermina); la negatividad de la prueba no indica ausencia de esperma, ya que la experiencia muestra un gran porcentaje de falsos negativos. Por ello, y por la escasez de muestra de que a veces se dispone, no es aconsejable su utilización por la pérdida de material.

Métodos enzimáticos

Es posible detectar la presencia de espermina y colina tras una serie de reacciones enzimáticas, cuyo resultado final conduce a la for-

mación de un color característico (345, 344), pero, una vez más, la especificidad no es absoluta, sobre todo en el caso de la colina. Además los reactivos necesarios son costosos, de preparación compleja y altamente inestables, lo que hace que estas pruebas no sean utilizadas rutinariamente en el laboratorio.

Métodos cromatográficos

La cromatografía en capa fina es la técnica adecuada (367, 243). Es rápida, económica y fácil de realizar. Como estándares se utilizan cloruro de colina y tetracloruro de espermina.

En teoría, la cantidad mínima detectable de espermina es de 0,1 ug y la de colina 3,0 ug, lo que significa que podrían detectarse ambas en 10 ul de esperma como mínimo, lo que es bastante difícil que se dé en las muestras habituales; por tanto, sólo es factible en aquellos casos en que la muestra sea abundante. En cuanto a la estabilidad, la colina es la que más se altera con el tiempo.

Prostaglandinas

Se ha propuesto también el análisis de las prostaglandinas para detectar trazas de semen (113). En el semen humano se encuentran cinco series de prostaglandinas E (PGE 1, PGE 2, PGE 3, 19-hidroxi PGE 1 y 19-hidroxi PGE 2) a niveles de ug-mg/ml se originan en las vesículas seminales y por tanto se encuentran también en el eyaculado de hombres vasectomizados a niveles semejantes a los de un hombre normal. Varias prostaglandinas se encuentran en el moco cervical, pero los niveles del orden ug/ml son mucho más bajos que los del semen. Una de las técnicas es la cromatografía de gases, lo cual conlleva un delicado proceso de extracción para disminuir los picos de fondo del cromatograma. La especificidad del método es alta, ya que se trata de moléculas pequeñas de estructura conocida, cuya identidad puede confirmarse mediante un espectrómetro de masas, pero se requiere un equipamiento tan sofisticado que resulta poco útil para utilizarlo de forma rutinaria.

Fructosa

La fructosa es un componente fundamental del plasma seminal, procedente de las vesículas seminales. Las tasas varían mucho de unos individuos a otros y depende de varios factores, de la continencia, del nivel de glucosa sanguínea, de la testosterona y de la concentración de espermatozoides. La técnica es simplemente una cromatografía en pa-

pel, previa cromatografía de intercambio iónico; a pesar de la alta concentración de fructosa se necesita bastante cantidad de muestra.

Leucin Amino-Peptidasa

Este componente procede de la próstata. La estabilidad es bastante alta, aproximadamente dos años, aunque de momento las técnicas no permiten mucha sensibilidad. Mediante la técnica histoquímica, se detecta en manchas de semen diluido ocho veces. La técnica de contrainmuno-electroforesis aumenta un poco la sensibilidad, llegando a detectarse semen diluido 1/32. La especificidad es relativa, ya que las heces vegetales y setas dan falsos positivos que no ocurren con el fluido vaginal (346).

Gamma-Glutamil Transpeptidasa

El fluido seminal humano posee una alta actividad GGT (310). Para algunos autores es más estable que la fosfatasa ácida; ahora bien, su valor en cuanto a especificidad y sensibilidad es muy discutido en la bibliografía: está ausente en la orina y la saliva, en las secreciones vaginales se encuentran a veces tasas que se encuentran en algunas muestras de semen, y la leche humana da también unas tasas encontradas en el semen (340). Puede utilizarse un método histoquímico cualitativo (5) o bien un método cuantitativo espectrofotométrico.

Lactato Deshidrogenasa-LDH-X

La LDH es un enzima muy ubicua en el organismo. Mediante electroforesis puede separarse en cinco isoenzimas enumeradas del uno al cinco, siendo la uno la de mayor movilidad, es decir, la más anódica. Los testículos y espermatozoides presentan una banda específica y característica (48) denominada LDH-X, que se localiza entre las bandas tres y cuatro. La presencia de esta banda tiene tanto valor como la identificación de espermatozoides.

Al estar producida en los testículos, no se produce en los individuos vasectomizados, por lo que si no se detecta no se puede asegurar ausencia de esperma.

La electroforesis en acetato de celulosa de un macerado de la muestra, seguida de una tinción específica para el enzima basada en su propia actividad, es una técnica sencilla y rápida. Una desventaja es que el volumen que puede ser aplicado es limitado (110, 36).

Nuestra experiencia indica que es definitiva en el caso de manchas concentradas y recientes, mientras que tiene una aplicación limitada a la hora de analizar manchas viejas o poco concentradas.

Proteína p30

Como hemos visto hasta ahora, las investigaciones en el campo de la biología forense de las manchas de esperma se centran en encontrar un marcador específico, detectable a bajas concentraciones incluso en individuos vasectomizados, que no se altere por otros fluidos biológicos y para el que la técnica a utilizar sea sencilla y de bajo coste. A este respecto, se ha visto que la p30, una glicoproteína del plasma seminal, ofrece grandes posibilidades.

Trabajos preliminares de Sensabaugh (326) conducen al descubrimiento de un «marcador del semen», un componente del plasma seminal (con lo cual se elimina el problema de la azoospermia), estable y detectable a niveles de trazas. En efecto, estudios realizados en muestras de semen mediante la técnica SDSPAGE (electroforesis en gel de acrilamida conteniendo dodecil sulfato sódico) que permite a las proteínas migrar según su peso molecular, muestra un patrón característico del semen, con unas bandas que no aparecen en otros fluidos biológicos. Una de ellas, la denominada p30 por su P. M. de aproximadamente treinta mil daltons, se aisló y purificó para ser sometida a estudios inmunológicos que demostraran la especificidad en cuanto a la especie y la de órgano.

Así se vio que la glándula prostática era el tejido de origen y que el esperma de animales carece de p30.

Los trabajos de Sensabaugh concluyen que mediante doble inmunodifusión (Ouchterlony), el antisuero más potente es capaz de detectar diluciones de 1/128, lo que equivale a un límite de detección de 15 ug/ml de proteína.

En trabajos posteriores de otros autores (340), mediante contraelectroforesis se alcanza una sensibilidad mayor; en muestras de semen se detecta en diluciones comprendidas entre 1/100 a 1/3.000. Se identifica en manchas de hasta cinco años y no se encuentra en ningún fluido más que en semen y orinas posteyaculación.

Mediante la técnica ELISA, en manchas de semen se habla de diluciones de hasta 1/10.000 y de 1/500 en lavados vaginales (340).

Actualmente en nuestro laboratorio se están efectuando pruebas (8) mediante isoelectroenfoque en poliacrilamida y se han obtenido re-

sultados prometedores en cuanto a especificidad y estabilidad. La sensibilidad alcanza hasta diluciones de 1/300 con muestras de semen, la aplicación de técnicas muy sensibles (inmunológicas) a este «nuevo marcador» ofrece unas posibilidades inmensas al diagnóstico de certeza y, a la vez, al de la especie en la investigación de las manchas.

Lo mismo puede decirse de otro marcador, llamado antígeno específico de la vesícula seminal, que se describe a continuación.

Antígeno específico de la vesícula seminal

Se trata de una serie de antígenos secretados por las células principales del epitelio de las vesículas seminales. Son polipéptidos de bajo peso molecular (8-17.000 daltons), no se han detectado en otros fluidos biológicos humanos y tampoco se encuentran en el semen de animales domésticos, aunque sí en el semen de orangután, gorila y chimpancé.

En las experiencias realizadas (167) utilizando un anticuerpo monoclonal, el MHS-5 (monoclonal antibody mouse anti-human semen 5) que es el que reconoce dichos péptidos, y mediante un ELISA con el sistema biotina-anticuerpo monoclonal/avidina, se han llegado a detectar cantidades tan pequeñas como 10 ug de fluido seminal, sin haberse encontrado reacciones cruzadas con otros fluidos y tejidos o falsos positivos.

Diagnóstico de especie

El plasma seminal contiene una serie de proteínas, algunas de ellas antigénicamente idénticas a las del plasma sanguíneo (fundamentalmente lactoferrina y albúmina), pero además, y como hemos visto, contiene una serie de antígenos organoespecíficos, de forma que una reacción inmunológica enfrentando un suero anti-esperma humano a un extracto de la mancha, permite demostrar al mismo tiempo la presencia de esperma humano para poder detectar la reacción de identidad.

El método utilizado rutinariamente es la doble inmunodifusión en gel de agarosa. Para aumentar la sensibilidad también se puede utilizar el método de contrainmunolectroforesis (91).

Como ya hemos dicho, el estudio de la glicoproteína p30 prostática, es de por sí un diagnóstico específico. Lo mismo ocurre con el antígeno de la vesícula seminal.

Diagnóstico de individualización

La individualización de una mancha de semen por el estudio de

diversos marcadores genéticos, puede ser de gran interés en los casos en que existan sospechosos, ya que éstos podrán ser o no excluidos por la tipificación del esperma. Además, como la mayoría son comunes a la sangre y al semen, podrá establecerse la correlación con un tipado de la sangre para el mismo polimorfismo (21).

El estudio de los marcadores genéticos del esperma puede abordarse desde tres aspectos (47):

1. Sustancias solubles ABH.
2. Antígenos de la superficie de los espermatozoides.
3. Enzimas y proteínas tanto de los espermatozoides como del plasma seminal.

1. Sustancias ABH

Son glicoproteínas presentes en los fluidos corporales (semen, sudor, orina, lágrimas, saliva, secreciones del tracto gastrointestinal, meconio, leche, etc.).

El fluido seminal de los individuos secretores contiene grandes cantidades de dichas sustancias (21) que pueden ser detectadas por el método de absorción-inhibición en microplaca o tubo utilizando preferentemente anticuerpos monoclonales (128). Por el mismo método pueden estudiarse las sustancias Lewis (Lea y Leb) que permiten establecer el estatus secretor/no secretor de la persona de la que procede la mancha.

Al interpretar los resultados, hay que tener en cuenta la posible mezcla de los fluidos corporales que puede darse en muestras recogidas de las víctimas de agresiones sexuales. En este caso, podría establecerse, por eliminación, conociendo el grupo de la víctima, el grupo de la mancha y correlacionar éste con el del sospechoso.

Otros métodos inmunológicos que pueden emplearse para la detección de las sustancias ABH y Lewis son: la absorción-elución con anti cuerpos policlonales, la aglutinación mixta y técnicas con anticuerpos marcados (ELISA) (20).

2. Antígenos de la superficie celular de los espermatozoides

Hay que decir que existe en la bibliografía bastante controversia en cuanto a la expresión de los antígenos ABO en la superficie de los espermatozoides. Para algunos, dicha expresión depende el estatus secretor del individuo, pero estudios más recientes parecen indicar lo contrario (349).

La presencia de otros antígenos como el Rh(D) no ha sido confirmada. Los antígenos M y N sí han sido concretados, así como los del sistema HLA, aunque para estos últimos no esté totalmente aclarada la cuestión de si están presentes en el plasma seminal o en los espermatozoides; en cualquier caso, su aplicabilidad a la individualización de manchas de semen está limitada hasta que se encuentre una técnica adecuada y fiable (299).

3. Enzimas y proteínas

Así como los polimorfismos enzimáticos y proteínicos de los hematíes y plasma sanguíneo se utilizan rutinariamente para la individualización de manchas de sangre, su aplicación a las de esperma está todavía restringida a unos pocos.

En primer lugar, hay que ver si una determinada actividad enzimática o una proteína están presentes en el plasma seminal o en los espermatozoides, y en segundo lugar, establecer si presenta polimorfismo que se confirma por comparación de la expresión de los fenotipos en el semen y en la sangre.

Parece que sólo unos pocos marcadores de este tipo están presentes en el semen a altas concentraciones, de manera que superan el límite de detección aun considerando la dilución a que se someten (46). Estas son: la PGM-1, la peptidasa A y la fosfoglucoasa isomerasa.

De todas ellas, la PGM-1, gracias a la técnica de isoelectroenfoque, que permite distinguir 10 fenotipos diferentes (343), es la que ofrece mayor posibilidad de discriminación (342). De ahí su gran utilidad para la individualización, aunque la antigüedad de la mancha puede resultar una limitación.

En cuanto a la peptidasa A, no tiene utilidad en el trabajo rutinario, ya que el polimorfismo sólo se presenta en la raza negra.

Otras proteínas del plasma seminal, como la amilasa y la transferrina, tienen una actividad moderada, muy en el límite de detección. Lo mismo ocurre con ciertos enzimas de los espermatozoides (adenilatokinasa AK, esterasa D, Glioxalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa G-6-PD, 6 fosfogluconato deshidrogenasa 6PGD). De ellas, la glioxalasa es la que tiene mayor validez en cuanto a poder de discriminación.

Todos estos polimorfismos se estudian mediante técnicas electroforéticas.

Los grupos Gm e Inv. de las inmunoglobulinas, presentes en el plasma seminal, son muy útiles, pero se requiere bastante muestra para su detección por técnicas inmunológicas (absorción-inhibición) (328).

Hay que señalar que un polimorfismo muy útil para las manchas de sangre, como es el grupo componente Gc, no se ha detectado en el esperma.

Por otro lado, el esperma también tiene sus propios polimorfismos. Hasta el momento se ha estudiado el de la Gamma glutemil transpeptidasa, GGT, que presenta bastante poder de discriminación con dos alelos y tres fenotipos posibles (1).

Por último, hay que decir que el futuro de la individualización del esperma está en la aplicación de las técnicas de estudio de los polimorfismos del DNA procedentes de los espermatozoides (148).

III. INVESTIGACION DE PATERNIDAD

Nosotros realizamos en el Instituto Nacional de Toxicología este tipo de pruebas, desde que en el Código Civil, tras la reforma de la Ley de 13 de mayo de 1981, recoge en sus artículos 127 a 130 una serie de normas relativas a las acciones de filiación.

Las acciones de filiación se pueden clasificar de la siguiente forma:

- A) Acciones de reclamación del Estado.
 - A1, Acciones de reclamación de la filiación matrimonial.
 - A2, Acciones de reclamación de la filiación extramatrimonial.
- B) Acciones de impugnación.
 - B1, Acciones de impugnación de la maternidad.
 - B2, Acciones de impugnación de la paternidad marital.
 - B3, Acciones de impugnación de la filiación extramatrimonial.

Los problemas médico-legales que se nos presentan corrientemente en las acciones de filiación se pueden resumir en dos cuestiones a las cuales hemos de dar respuesta.

La primera es si el presunto padre implicado es el padre del niño, o bien, dicho de otra forma, la paternidad quedará excluida o es posible.

La segunda cuestión es que si la paternidad es posible ¿qué probabilidad tiene este hombre de ser padre de ese niño concreto con respecto a su madre?

Actualmente en la investigación de la paternidad no sólo podemos responder a la primera pregunta, sino que obtenemos probabilidades de paternidad superior en muchas ocasiones al 99,5 % debido al gran espectro de marcadores genéticos que investigamos en estas pruebas médico-legales. Por supuesto, en el inicio de estos estudios sólo había respuesta en aquellos casos donde la paternidad quedaba excluida, la causa se debía al reducido número de caracteres genéticos que se utilizaban en estas investigaciones.

Pasemos a explicar en qué consiste la peritación médico-legal que realizamos en el Instituto Nacional de Toxicología.

Si bien antes debemos dejar constancia de que para que un carácter pueda ser utilizado con el fin de esta investigación debe reunir las siguientes condiciones (147):

- 1) Objetividad: que pueda examinarse sin que tenga que colaborar el sujeto.

- 2) Variación discontinua: o caracteres cualitativos que se manifiestan con intensidades distinguibles haciendo posible una clasificación de los sujetos en grupos perfectamente definidos.
- 3) Persistencia: es necesario que el carácter que vamos a estudiar no pueda ser modificado por causas externas (alimentación, clima...).
- 4) Expresividad: el carácter en estudio deberá manifestarse más o menos ostensiblemente para que no pase inadvertido al observador y pueda ser utilizado en la investigación.
- 5) Penetrancia: no deberán estudiarse aquellos caracteres que produzcan sus efectos en un determinado número de sujetos pero no en todos, o bien que se manifiesten del mismo modo en los individuos.
- 6) Frecuencia génica: no deberá tratarse de un carácter de frecuencias ni muy raro ni muy frecuente, ya que su aplicación no sería entonces muy práctica.
- 7) Expresión en función de la edad: los caracteres que se manifiestan con posterioridad al nacimiento no deberán utilizarse.
- 8) Posibilidades al estudiar un carácter: es necesario el empleo de un carácter que no entrañe dificultades para su observación, ni requiera exploraciones peligrosas como biopsias, etc.
- 9) Por último y más importante este carácter deberá ser transmitido por la herencia, cumpliendo las leyes de Mendel.

Los grupos sanguíneos reúnen todas las condiciones para ser utilizados en las acciones de filiación. Se trata en efecto de caracteres hereditarios, objetivos, discontinuos, no influenciados por causas externas, son monómeros, tienen una expresividad y penetración casi total y sus frecuencias de aparición son óptimas para la finalidad perseguida. Además la mayoría se manifiestan desde el momento del nacimiento y no exige para su determinación sino una pequeña muestra de sangre o saliva en algunas circunstancias.

Es más, por haberse realizado amplios estudios sobre frecuencia de aparición de los distintos grupos sanguíneos en diversas poblaciones, podemos realizar cálculos con base estadística sobre probabilidades de paternidad o maternidad.

Peritación Médico-Legal

1. Investigación Bioantropológica

La peritación médico-legal sobre investigación de paternidad va dirigida en una triple dirección (228):

- 1) Capacidad de generación del presunto padre.

- 2) Determinación de la fecha de fecundación.
- 3) Presencia en el hijo de caracteres genético-hereditarios, procedentes de la madre y/o del presunto padre.

Capacidad de generación del presunto padre: es evidente que una esterilidad masculina excluye la posibilidad de paternidad. La esterilidad hay que entenderla aquí tanto como impotencia para el coito como para incapacidad fecundante. Por tanto, una alteración anatómica o fisiológica a cualquier nivel (testículos, vías espermáticas, sistema nervioso...) puede ser causa de esta incapacidad y por consiguiente de exclusión de paternidad.

Entre las posibles causas de esterilidad masculina debemos citar: ausencia de testículos, bien por aplasia congénita o consecutiva a accidentes o intervenciones quirúrgicas, criptorquidia bilateral, enfermedades infecciosas testiculares (tuberculosis, sífilis), carcinoma, tratamientos radioterápicos, obstrucción de vías seminales (blenorragias, vasectomía), etc.

Cuando en la anamnesis previa a la recogida de muestras se pone de manifiesto la existencia de alguna de estas anomalías, es preceptivo el examen clínico y el análisis del líquido seminal (espermiograma).

Determinación de la fecha de fecundación: su interés estriba en que en determinadas y raras ocasiones puede ser también causa de exclusión de paternidad.

Se trata de poner en relación la fecha de coito fecundante cuando éste fue único con el momento del ciclo ovular femenino en que tuvo lugar, así como la duración del embarazo obtenida a partir de aquél, con el grado de desarrollo alcanzado por el feto en el momento del parto.

No pueden admitirse como fecundantes los coitos que tengan lugar durante la menstruación, probabilidad que podemos hallar en los delitos de violación. En los restantes momentos del ciclo ovular, que, como de todos es sabido, unos períodos son fértiles y otros infértiles, sólo permiten llegar a conclusiones del orden de la probabilidad, pero no a exclusiones, puesto que se conoce la existencia de ovulaciones aberrantes, así como numerosos casos de desviaciones en el tiempo, de lo que estadísticamente podemos considerar como normal. Únicamente en el caso en que pudiera demostrarse la existencia previa de un embarazo al coito presuntamente considerado fecundante, cabría la posibilidad de rechazar tal hipótesis.

En cuanto a la duración del embarazo obtenida a partir de las fechas del coito fecundante o de la última menstruación, así como del parto, se ha propuesto como indicio de verosimilitud de una paternidad, al relacionarla con el desarrollo alcanzado por el feto.

Hay dos casos extremos que resultan evidentes: un embarazo de seis meses de duración con un feto con signos de madurez (por ejemplo, talla de 51 cm y peso de 3.500 g) y un embarazo de nueve meses con un feto que presenta signos de prematuridad. Estos casos resultan inverosímiles.

En cambio, en los casos intermedios la valoración resulta más difícil. No obstante, estudiando estadísticamente la relación entre los caracteres fetales y la duración de la gestación, numerosos autores han elaborado tablas o fórmulas muy fáciles de utilizar y con las que podemos obtener los grados de probabilidad de que un feto con determinados caracteres haya nacido tras un período de gestación conocido. Podemos citar las tablas de Guthman y Knöss, Wichmann, Freudenley, que relacionan las tallas fetales en centímetros con la duración del embarazo en días, estableciendo además la probabilidad en cada caso y adjetivándolo en el caso de Wichmann con las expresiones: máxima inverosimilitud, muy inverosímil, inverosímil, tan inverosímil como verosímil, ni excluible ni demostrado, tan verosímil como inverosímil, verosímil, muy verosímil y máxima verosimilitud.

Hay que hacer la advertencia de que estos grados de probabilidad a que nos estamos refiriendo son exclusivamente elementos de orientación sin que se les pueda dar la categoría de prueba evidente.

Presencia en el hijo de caracteres genético-hereditarios procedentes de la madre y/o del presunto padre:

a) **Caracteres raciales:** En nuestro medio, constituido fundamentalmente por individuos de raza blanca, no suele tener utilidad el estudio de este tipo de caracteres; sin embargo, en casos en que la pareja esté constituida por individuos pertenecientes a distintas razas, el estudio de estos caracteres adquiere importancia inusitada. Esta importancia deriva de que son caracteres que se heredan siguiendo las leyes de Mendel: el cruce de dos individuos de la misma raza da siempre descendientes de la misma raza, el cruce de dos individuos de razas distintas origina siempre mestizos con caracteres raciales intermedios. Por consiguiente, una pareja de raza blanca o una de raza negra no pueden ser nunca padres de un niño mulato.

Al hablar de individuos de la misma raza, nos referimos a razas puras en todos los casos, pues si los padres son mestizos la complicación es mayor, ya que el fenotipo puede corresponder a una u otra raza, y sin embargo el genotipo presentar caracteres de ambas. En estos casos resulta imprescindible el estudio de los árboles genealógicos de los progenitores.

b) **Caracteres sensoriales:** Las capacidades gustatoria, olfativa y visual se ha visto que se transmiten por herencia, conociéndose en la

actualidad algunos de estos caracteres: ceguera para los colores, anosmias específicas, sabor de la feniltiocarbamida, etc.

Quizá la más conocida e importante de las exploraciones de estos caracteres sea la llamada prueba del sabor. La feniltiocarbamida o feniltiourea, así como otras sustancias emparentadas químicamente con ella, resultan de intenso sabor amargo para algunas personas y en cambio son insípidas para otras. Por consiguiente, la población cabe dividirla en saboreadores y agéusicos o no saboreadores.

Esta capacidad gustativa se transmite mediante una herencia autosómica, ligada a un único gen. Existen un par de alelos, uno de ellos (T) dominante. Las personas portadoras de uno o dos de estos alelos dominantes serán saboreadoras, las personas portadoras de los dos alelos recesivos (t) serán agéusicas (364).

La exploración se lleva a cabo mediante la técnica de Harris y Kalmus (1950), con la ayuda de una escala de soluciones de concentración creciente, constituida por 14 soluciones de feniltiocarbamida.

Las personas que se adjetivan de gustadores son aquellas que perciben el sabor amargo en las soluciones más diluidas que el valor crítico que separa las curvas de distribución bimodal correspondientes a la población en la que se efectuaría el estudio.

Es posible obtener con aproximación satisfactoria el genotipo TT, Tt o tt de las personas investigadas, y conociendo la frecuencia de los alelos T y t en la población cabe incluir este carácter en el cálculo de la probabilidad de paternidad.

También el estudio de los caracteres olfatorios tiene interés. Hoy día se sabe que existen individuos con anosmia específica ante determinados odorantes primarios, siendo sin embargo normoósmicos a otros odorantes. Se han señalado anosmias específicas, al menos para 31 odorantes primarios en el 0,1 al 47 % de la población (168).

Los tests realizados con estos odorantes primarios (ácido isoaltrícico, pentadecalactona (almizcle), mentol, vainilla, trimetilamina, 1-pirrolina, etc.) revelan una distribución bimodal de sus umbrales, igual que veíamos en la prueba del sabor. Los datos obtenidos hasta hoy son compatibles con un modelo de herencia autosómica monogénica, heredándose la sensibilidad al olor como rasgo dominante y la anosmia como un rasgo recesivo. Para la realización del test se preparan distintas soluciones de odorantes primarios, siguiendo las recomendaciones de Amoore y se van dando a oler durante un tiempo lo más breve posible, tapando inmediatamente los botes.

c) **Caracteres antropológicos:** El estudio de las características físicas cuya heredabilidad es de todos conocida tiene también gran im-

portancia. En esencia consiste esta prueba en anotar los caracteres de la madre, del hijo y del presunto padre y proceder posteriormente a su comparación. Es evidente que cuanto más difiera antropológicamente el hijo de su madre, tanto más cercano se encontrará a los caracteres paternos.

Los caracteres antropológicos más frecuentemente estudiados son: **en la cabeza:** cabello (color, forma, modo de implantación, pico de viuda), cejas (forma), ojos (color del iris, índice interocular), nariz (altura, forma, tamaño, posición de las ventanas nasales, forma de la punta), labios (grosor, forma, altura), lengua (enrollable), dientes, (ausencia de incisivos laterales, incisivos afilados), mentón (prognatismo), oreja (forma, cerumen). **En el tronco:** presencia de efilides (manchas rojizas o pecas), la mancha mongólica y los naevi pigmentarios, color de la piel. Estudio radiológico de la columna vertebral, pues, desde Kuhne, se sabe que existen variaciones en la columna vertebral que vienen determinadas por desplazamiento craneal o caudal de los límites entre las diferentes regiones de la misma. La desviación craneal (Cr) es dominante sobre la caudal (cr). Si la madre tiene desviación caudal y el hijo desviación craneal, el padre forzosamente ha de presentar desviación craneal. **En las extremidades:** interesa: zurdez, grado de extensión de la segunda falange del pulgar, presencia de vello sobre la primera falange de los dedos, huellas dactilares (284) (fórmula decadactilar, morfología nuclear, número dactilar total, valor S/V 10 (170) que da una estimación de la desviación standard del número dactilar de los dedos de un individuo), huellas palmares (368) (fórmulas cualitativa y cuantitativa, ángulo atd o ángulo de Penrose e índice de Cummins o índice de horizontalidad de las crestas).

El estudio de este tipo de caracteres antropológicos permite en ocasiones descartar una paternidad y en los restantes casos obtener una probabilidad que, de acuerdo con Baumann y colaboradores, puede calificarse con las siguientes expresiones: muy improbable, improbable, posible, probable, muy probable y cierto.

d) **Caracteres psicológicos:** Tiene menos interés, pues aunque se transmiten hereditariamente se desconoce el mecanismo y además no son fáciles de explorar, ya que la mayoría de las investigaciones se realizan sobre niños. Sin embargo, de todos es conocido cómo se transmiten de padres a hijos las aptitudes profesionales, cualidades artísticas, gustos, tendencias, carácter, etc., por lo que cuando la edad del hijo lo permite, se deben investigar también este tipo de caracteres.

e) **Caracteres patológicos:** Han sido objeto de muchas investigaciones, por lo que son hoy día muy bien conocidos en cuanto a un mecanismo de transmisión hereditario.

Las enfermedades hereditarias pueden ser autosómicas (dominantes o recesivas) y ligadas al sexo.

f) **Caracteres patológicos transmitidos con herencia dominante:**

- Alteraciones morfológicas: braquidactilia (brevedad anormal de la segunda falange), polidactilia, brevedad del 4.º metacarpiano, aracnodactilia, 5.º dedo de la mano o del pie arqueado, uñas en garra, hipospadias, etc.
- Trastornos orgánicos: enfermedad de Bechterew (espondiloartritis), acondroplasia, osteopetrosis (fragilidad ósea) con conjuntiva azul y sordera progresiva, catarata hereditaria, aniridia, riñones poliquísticos, psoriasis, etc.
- Trastornos humorales: diabetes insípida, colemia familiar, diatesis cistínica, etc.
- Trastornos neuropsíquicos: corea crónica de Huntington, neurofibromatosis, enfermedad de Thomsen (miopatía congénita), miopatía de Landouzy Dejerine, etc.

g) **Caracteres patológicos transmitidos con herencia recesiva:**

En estos casos resulta imprescindible en el estudio reconstruir el árbol genealógico. Entre los más importantes citaremos: albinismo, ataxia hereditaria de Friedrich, idiocia familiar amaurótica, ceguera hereditaria, nistagmus primario, sordomudez congénita familiar, síndrome de Laurence Bield (retinitis pigmentaria familiar), xeroderma pigmentosa, ictiosis congénita, esquizofrenia, alcaptonuria, etc.

h) **Caracteres patológicos transmitidos ligados al sexo:** Hay que distinguir entre los que van ligados al cromosoma X y los que van unidos al cromosoma Y.

Ligados al cromosoma X citaremos: hemofilia, daltonismo, atrofia del nervio óptico, hemeralopía, anhidrosis con hipertrichosis y anodontia, etc.

Ligados al cromosoma Y: ictiosis congénita, pies palmeados.

2. Investigación Inmunoematológica

Grupos sanguíneos eritrocitarios

Los grupos sanguíneos eritrocitarios son caracteres polimórficos y se transmiten según las leyes de Mendel, de forma simple; esto hace que se considere su estudio de gran utilidad dentro de la investigación de paternidad.

Los principales sistemas que se estudian son:

Sistema ABO

Fue descubierto por Landsteiner en el año 1900 y ha sido muy estudiado dada su trascendental importancia en el campo de las transfusiones sanguíneas (157).

Se investiga la presencia de los antígenos eritrocitarios, mediante técnicas directas, con antisueros específicos comercializados. La sangre del grupo A aglutinará con antisuero anti-A, la del grupo B con anti-B, la del grupo AB con anti A y anti B, y la del grupo O con anti H. La sangre del grupo A presenta los subgrupos A₁ y A₂, existiendo también antisuero A₁.

Según las leyes de la herencia el hijo nunca podrá poseer un carácter que no posea ninguno de los progenitores. Por ejemplo, de una madre del grupo A y un padre del grupo O nunca podrá nacer un hijo B. En este caso el padre quedaría excluido.

Así mismo, si un padre es homocigoto, sólo posee un determinado carácter, tendrá obligatoriamente que dárselo a su hijo.

Los antígenos A y B pueden detectarse incluso en el embrión de seis semanas, si bien no es aún posible la diferenciación de los subgrupos.

Enfermedades como la leucemia podrían alterar los resultados en cuanto a este sistema se refiere, lo que deberá tener en cuenta.

Sistemas MNS

Fue descrito por Landsteiner y Levine en 1927, y completado por Walsh y Montgomery en 1947 con el antígeno S y su forma alélica s (13).

Este sistema es el de mayor poder discriminatorio para exclusión de paternidad y en pruebas de identificación.

Se investiga la presencia de los antígenos mediante técnicas directas y técnicas de Coombs con antisueros específicos.

Los antígenos M, N, S y s se pueden encontrar en sangre cordonal y aparecen en el feto entre las 12 y 16 semanas de gestación.

Sistema P

Fue descubierto simultáneamente y por los mismos autores que el sistema MNS.

Este sistema parecía ser uno de los más simples en cuanto a la

herencia, las sangres podían ser P(+) o P(-), pero con el tiempo se ha ido complicando al irse descubriendo nuevos alelos más raros (13).

Se investiga por la técnica indirecta de Coombs. Los antígenos del sistema P tardan mucho tiempo en desarrollarse completamente, así hasta los siete años de edad. En sujetos con ciertas enfermedades parasitarias como el quiste hidatídico, ascarirosis, oxiuriasis, etc., su antigenicidad es notablemente mayor que en sujetos sanos.

Sistema Rh

El estudio de los anticuerpos existentes en una mujer cuyo hijo había nacido muerto por reacción hemolítica llevó a Levine y Stenson al descubrimiento de este sistema en el año 1939. Al año siguiente Landsteiner y Wiener inocularon conejas con sangre de un macaco y obtuvieron que eran capaces de aglutinar tanto los eritrocitos del mono como los del 85 % de la población. El 15 % restante se consideró Rh(-) (157).

Se investiga por técnicas directas de aglutinación con antisueros específicos para los antígenos D, C, E, c y e. El antisuero anti d no existe, lo cual se subsana calculando la frecuencia para todos los genotipos posibles.

Sistema Lutheran

Fue estudiado por Callender y Race y Payton en 1948. Presenta dos alelos dominantes a y b de frecuencias muy distintas en la población y con marcadas influencias raciales. El antígeno Lu^a tarda bastante en desarrollarse, pudiendo no llegar a hacerlo hasta los quince años totalmente. Existe además la presencia de un gen silencioso que debe ser tenido en cuenta.

Sistema Kell

Fue descubierto por vez primera por Coombs, Mourant y Race en 1946 (9). Los alelos K y k se comprueban examinando la aglutinación de los hematíes con dos productos anti K y anti k, mediante el test de Coombs indirecto, al igual que el sistema anterior.

Todos los antígenos del sistema Kell se hallan presentes en el momento del nacimiento (109). La incompatibilidad feto materna de este sistema puede producir ictericias graves en el recién nacido, de igual complejidad que las producidas por otros sistemas.

Sistema Duffy

Fue descrito en 1950 por Cutbush, Mallison y Porkin (13). Existe una gran variabilidad racial, lo cual debe ser tenido en cuenta en el momento de manejar las frecuencias poblacionales.

Es así mismo necesario tener presente que son antígenos codominantes Fya y Fyb, y que puede haber un gen silencioso Fy. Se investiga por técnicas de Coombs indirectas.

Sistema Kidd

Fue descubierto por Allen, Diamond y Niedziela en 1951, al estudiar un neonato con anemia hemolítica. El antígeno descubierto se llamó JKa y el sistema se completaría con otro alelo JKb, y en menor proporción el JK que no aglutinaría ni con anti JKa, ni con anti JKb (13).

Se investiga por la técnica de Coombs indirecta. Los antígenos del sistema están presentes en el feto a partir de la décima semana.

Sistema Lewis

Fue descrito por Mourant en el año 1946 y consta de un par alélico Lea y Leb que determinan dos anticuerpos anti Lea y anti Leb (13).

Hay que tener en cuenta la edad, pues este sistema no se encuentra plenamente desarrollado en los primeros años de vida. Igualmente pueden alterar los resultados ciertas enfermedades como la leucemia.

Tiene relación con el sistema secretor, o propiedad que tienen ciertos individuos de poseer en las secreciones capacidad antigénica ABH, propiedad que posee el 80 % de la población europea.

Pueden así mismo ser estudiados otros sistemas sanguíneos como el Diego Y Xg, entre otros, si bien son de menor interés en la investigación de paternidad.

En el siguiente cuadro se indican los principales sistemas sanguíneos eritrocitarios, con la probabilidad parcial y acumulada de exclusión de paternidad, de la cual se tratará detenidamente más adelante al estudiar los cálculos probabilísticos en esta investigación de paternidad.

Grupos sanguíneos	Probabilidad parcial de exclusión
ABO	0,167
MNSs.	0,316
P	0,030
Rh	0,290
Kk	0,041
Fy	0,071
JK	0,187
Lu	0,027
Le	0,022
Do	0,181
Xg	0,076
	0,80

Probabilidad de exclusión acumulada. Recogido de la tabla M. Goudemand y Ch. Salmon 1980. «Immuno-hematologie et immunogenetique.»

Sistema Leucocitario HLA

El sistema HLA ha sido denominado también complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

Su historia se inicia en 1952, cuando J. Dausset (109) observó en sueros de personas que habían recibido múltiples transfusiones cómo aglutinaban sólo con leucocitos y no con eritrocitos en 1958 se descubrió el primer antígeno leucocitario, también por J. Dausset. Desde entonces hasta ahora ha habido un largo recorrido, y como rama de la ciencia que empieza y se desarrolla necesita su propio lenguaje.

Por eso existe un comité de OMS que, en la actualidad, su principal misión es la revisión de la nomenclatura de los antígenos, según la información aportada por los «Workshops» (109).

Cada antígeno se identifica con una letra para el locus que lo controla (entendiendo por locus como la posición ocupada por un gen en todos los cromosomas homólogos), seguido por un número definiendo la especificidad particular de este locus. La letra W indica que es una especificidad provisional y que desaparecerá cuando no haya dudas en la claridad, reproductibilidad, así como en la disponibilidad del antisuero apropiado para su definición.

El sistema HLA (H = Human, L = Leukocyte, A = Antigens) está constituido por un grupo numeroso de genes, íntimamente relacionados, situados en el brazo corto del par cromosómico 6. A cada gen que

consiste en un segmento de ADN le corresponde un locus determinado y es el responsable de la síntesis de unas sustancias que se expresan en la superficie celular contra las cuales se dirige fundamentalmente la respuesta inmune tras una estimulación alogénica. Son, pues, los antígenos de histocompatibilidad.

Hasta el momento han sido encontradas cinco series de genes que ocupan cinco locus denominados HLA-A; HLA-B; HLA-C; HLA-D y HLA-DR. Cada ser humano posee 10 genes HLA correspondiendo dos genes al locus HLA-A, dos genes al locus HLA-B, dos genes al locus HLA-C, dos genes al locus HLA-D y otros dos genes al locus HLA-DR (147).

Los locus A, B y C poseen alelos (entendiendo por alelos cada una de las formas alternativas de un gen dado, concernientes al mismo carácter) que controlan la existencia de antígenos presentes en la superficie de todas las células nucleadas del organismo. El locus D codifica los determinantes de la serie D, con varios alelos que son los responsables de la reacción mixta linfocitaria. Finalmente, en otro locus vecino se encuentran los genes también polimórficos, que controlan los antígenos de la serie DR, presentes sobre la membrana de estirpes celulares muy restringidas (linfocitos B, macrófagos y espermatozoides). Este sistema es sumamente interesante por las numerosas implicaciones que tiene en biología y medicina, especialmente el tipaje serológico del sistema HLA es útil en el trasplante de órganos, estudio de la genética y dinámica de las poblaciones (estudios antropológicos, epidemiológicos) y en medicina legal (investigación de la paternidad).

Centrándonos en este último campo, la investigación de la paternidad, el estudio de los genes del sistema HLA supone un gran progreso para este tipo de pruebas.

Existiendo una serie de condiciones indispensables para que todo sistema sanguíneo pueda ser incluido en este tipo de pruebas (103).

- La transmisión genética debe ser bien conocida.
- Los determinantes genéticos deben estar bien desarrollados desde el nacimiento de la persona, y deben perdurar constantes durante toda la vida.
- La identificación de los antígenos debe ser realizada con métodos fiables y reproductibles en sangre fresca.

El sistema HLA cumple estas condiciones indispensables y además responde a estos criterios (103).

- La transmisión mendeliana simple del sistema está bien establecida por su estudio en un número muy elevado de familias.
- Todos sus caracteres son codominantes.
- Los antígenos pueden ser demostrados desde la sexta semana de vida del embrión, y permanecer estables para toda la vida.

- La frecuencia de recombinación entre los dos loci principales es inferior al 1 %.
- El estudio de estas especificidades se realiza por los tests de microlinfocitotoxicidad o de fijación de complemento sobre los linfocitos, siendo ésta una técnica perfectamente fiable.

La característica más destacable de este sistema es el polimorfismo tan amplio que posee, lo que permite a las acciones de filiación poder excluir falsos padres o bien establecer la probabilidad de paternidad de un hombre que no haya sido excluido.

A continuación citamos la relación de especificidades del sistema HLA (locus A-B-C) estudiadas por nosotros.

HLA-A	HLA-B	HLA-C
A ₁	B ₅	CW ₂
A ₂	BW ₅₂₍₅₎	CW ₃
A ₂₈	B ₅₁₍₅₎	CW ₄
A ₃	B ₇	CW ₅
A ₉	B ₈	
A ₂₃₍₉₎	B ₁₂	
A ₁₀	B ₄₄₍₁₂₎	
A ₂₅₍₁₀₎	B ₄₅₍₁₂₎	
A ₂₆₍₁₀₎	B ₁₃	
A ₃₂	B ₁₄	
A ₁₁	B ₁₅	
A ₂₉	BW ₆₃₍₁₅₎	
A ₃₀	B ₃₈₍₁₆₎	
A ₃₁	B ₃₉₍₁₆₎	
AW ₆₆	B ₁₇	
	B ₁₈	
	B ₄₉₍₂₁₎	
	BW ₂₂	
	BW ₅₅₍₂₂₎	
	BW ₅₆₍₂₂₎	
	B ₂₇	
	B ₃₅	
	B ₃₇	
	B ₄₀	
	BW ₆₀₍₄₀₎	
	BW ₇₃	

Todo individuo tiene un par de cromosomas seis, y por tanto dos dotaciones de alelos A, B, C, D, DR; cada uno expresa un antígeno. Esta

dotación de antígenos codificados en un cromosoma constituye un «haplotipo»; por tanto, cada individuo posee dos «haplotipos», uno procedente del padre y otro de la madre (transmisión mendeliana codominante).

Resulta fácil comprender que una vez estudiado el sistema HLA en el presunto padre, madre e hijo, y conocidos el material genético de estos individuos para este sistema, se establece cuáles son los haplotipos que posee cada persona.

A continuación el perito valora los resultados obtenidos y establecerá una de las dos conclusiones siguientes (324).

Primera: El hombre implicado no puede ser el padre del niño, **se afirma la exclusión de paternidad**, debido a que los dos haplotipos que posee el niño no han podido ser heredados del presunto padre.

Segunda: El hombre implicado puede ser el padre del niño, se establece el **cálculo de la probabilidad de paternidad**, debido a que uno de los haplotipos que posee el niño ha podido ser transmitido por el hombre implicado.

Para realizar el cálculo de la probabilidad de paternidad es preciso utilizar frecuencias de los haplotipos HLA, y en éstas se deben tener en cuenta la raza de cada individuo testado, debido a que estas frecuencias varían de caucasianos europeos a caucasianos norteamericanos y éstos de la raza negra a la japonesa o índica, etc.

Lo ideal sería utilizar frecuencias de haplotipos del país al que pertenezcan los individuos implicados, por supuesto esto se hace extensible a todos los demás marcadores estudiados (grupos eritrocitarios, proteínas plasmáticas y enzimas eritrocitarias).

La experiencia de los laboratorios especializados permite afirmar que los tipajes de HLA constituyen unos análisis de gran utilidad en las investigaciones de paternidad, siendo la probabilidad de exclusión a priori para este sistema de un 90 % (157).

Proteínas plasmáticas y enzimas eritrocitarias

Una de las características inherentes a la naturaleza humana es la individualidad y como consecuencia la rica diversidad que presentan los seres humanos entre distintas poblaciones y en el seno de una misma población.

Estas diferencias entre los distintos individuos, que tienen un origen genético y por tanto se transmiten de padres a hijos de acuerdo a unas leyes determinadas, no sólo se limitan a caracteres físicos o antropobio-

lógicos (por ejemplo la talla, color de iris, forma del pabellón auricular, huellas dactilares...), cuya evaluación genética es difícil, debido a que presentan una herencia multifactorial y además están sometidos a una gran influencia ambiental, sino que también existen una serie de MARCADORES GENETICOS MOLECULARES, monofactoriales y sin varianza ambiental, cuyo análisis ha permitido demostrar que existe una extraordinaria diversidad a nivel bioquímico entre los individuos.

El desarrollo de distintas técnicas inmunológicas y bioquímicas ha permitido analizar de manera satisfactoria, objetiva y rigurosa los mecanismos hereditarios de estos MARCADORES GENETICOS MOLECULARES, siendo los de naturaleza sanguínea los que más ampliamente han sido aceptados en la investigación biológica de la paternidad. En epígrafes anteriores se han expuesto algunos de estos marcadores (antígenos eritrocitarios y antígenos del sistema HLA) a continuación se describe la utilidad de las proteínas del plasma humano y de los enzimas eritrocitarios en la investigación biológica de la paternidad.

Las proteínas son macromoléculas biológicas con una gran variedad de funciones en el organismo humano. Se trata de largas cadenas compuestas por una serie de unidades repetidas de acuerdo a una secuencia determinada. Estas unidades son los aminoácidos, algunos de los cuales presentan carga eléctrica.

Puesto que una proteína está constituida por una cadena de aminoácidos, la proteína en conjunto tendrá una carga neta, y por tanto sometida a un campo eléctrico se moverá en un sentido y a una velocidad que dependerá de su carga, de tal manera que si dos o más proteínas tienen diferentes cargas eléctricas, se desplazarán a velocidades diferentes, con lo cual quedarán separadas.

En estos principios está basado el método de electroforesis, una técnica de laboratorio usual en nuestros días para el análisis genético de las proteínas y que fue utilizada por vez primera con tales fines, en 1949 por Linus Pauling y colaboradores en el Instituto Tecnológico de California.

Posteriormente, otros muchos investigadores han utilizado la electroforesis en el análisis sistemático de las proteínas. Las primeras conclusiones derivadas de estos análisis indicaban que en una gran proporción de las proteínas estudiadas una misma proteína no era igual en todos los individuos de una población, es decir, se trataba de sistemas polimórficos, que además presentaban una base genética y se heredaban según leyes mendelianas sencillas, sin presentar variaciones influenciadas por el ambiente.

La aplicación de los procedimientos electroforéticos a las proteínas de la sangre humana ha conducido también al descubrimiento de una gran cantidad de proteínas polimórficas.

En 1955, estudiando el plasma sanguíneo (fracción líquida de la sangre), Oliver Smithies (341) descubrió la primera proteína plasmática polimórfica: las haptoglobinas, y en 1963 (171) Hopkinson y col., estudiando los enzimas (proteínas catalizadoras de reacciones bioquímicas) del interior de los glóbulos rojos, descubrieron el primer polimorfismo enzimático humano de la Fosfatasa ácida, sistema que rápidamente fue adoptado por múltiples laboratorios de investigación de la paternidad.

Posteriormente se han descubierto nuevos enzimas eritrocitarios y proteínas plasmáticas, que presentaban un polimorfismo con base genética gracias sobre todo al perfeccionamiento de las técnicas electroforéticas. En este sentido es necesario destacar la introducción en el campo de la medicina-legal de una variante de la técnica electroforética: el isoelectroenfoque, que ha aumentado la resolución y eficacia de este tipo de análisis y que es la técnica utilizada en el Instituto Nacional de Toxicología.

En la tabla 1 se relacionan las proteínas plasmáticas y enzimas eritrocitarios más utilizados en la investigación biológica de la paternidad y que son ampliamente aceptadas en tales investigaciones por distintos Organismos Científicos Internacionales (Soc. de Hematogenética Forense, Asociación Americana de Bancos de sangre...).

Hay que hacer la salvedad de que los sistemas Gm y Km (alotipos de las inmunoglobulinas) que aparecen en la citada tabla son detectados por técnicas inmunológicas, aprovechando su diversidad antigénica, y no por técnicas electroforéticas.

Para darnos una idea de la gran utilidad de estos sistemas en la investigación biológica de paternidad, en la tabla 1 se hace referencia a la probabilidad de exclusión a priori (Pe) de cada sistema, lo cual nos indica la proporción de peritaciones en las que la supuesta paternidad de un individuo podrá ser definitivamente descartada.

Tabla 1

Enzimas eritrocitarios y proteínas plasmáticas más utilizadas en la investigación biológica de la paternidad

Sistema Enzimas eritrocitarios (a)	Probabilidad de exclusión a priori % (Población Caucasoide)
Fosfoglucomutasa-1	0,252
Fosfatasa Acida eritrocitaria	0,254

Glutamato-Piruvato Transaminasa	0,187
Glioxalasa	0,185
Esterasa D	0,089
Adenosin Deaminasa	0,043
Adenilato Kinasa	0,032
G-Fosfogluconato deshidrogenasa	0,021

Proteínas plasmáticas (b)

Grupo específico componente	0,31
α_1 - Antitripsina	
Transferrinas	0,18
Properdina (Bf)	0,16
Haptoglobinas	0,18
C ₃	0,15
Gm	0,21
Km (1)	0,08

(a) Según los datos de A. Carracedo Alvarez (70).

(b) Según los datos de Dale D. Dykes (102).

Polimorfismos cromosómicos y del ADN

Una manera atractiva de abordar la investigación de los caracteres hereditarios sería tratar de estudiar directamente el material biológico portador de la herencia, en vez de estudiar los productos sintetizados según el código de este material hereditario.

A principios del siglo XX, T. H. Morgan demostraba que los caracteres hereditarios se localizaban en determinadas estructuras filamentosas, que se encuentran en los núcleos de las células y cuyo número era constante para cada especie. Se trataba de los cromosomas.

Más tarde los genetistas tuvieron la sorpresa de comprobar que la herencia estaba determinada por un mensaje escrito a lo largo de los cromosomas y residía en uno de sus componentes mayoritarios, el ácido desoxirribonucleico (ADN), cuyo mensaje lineal, formado por un alfabeto químico de cuatro bases (secuencia generadora de un número prácticamente ilimitado de combinaciones), permitía explicar la gran diversidad genética de los organismos, y, por otro lado, su estructura de «doble hélice», (descubierta por Watson y Crick en 1954), hacía posible comprender cómo la información genética podía ser fielmente copiada y transmitida a lo largo de las generaciones sucesivas.

Una primera aproximación, pues, al estudio del material portador de la herencia es el análisis de los cromosomas. A este respecto, hay que resaltar que a partir de 1971 (Conferencia de París) (279), se han desarrollado una serie de modernas técnicas de tinción de los cromosomas cuya aplicación ha permitido detectar una gran variabilidad en la longitud de determinadas zonas de tinción en los cromosomas de distintos individuos. Estas variaciones se conocen con el nombre de polimorfismos cromosómicos y se transmiten a la descendencia como un rasgo mendeliano dominante, lo que ha permitido su aplicación a la investigación biológica de la paternidad.

Una descripción de las distintas técnicas de tinción, así como de los distintos polimorfismos cromosómicos descritos hasta la fecha, está fuera de las pretensiones de este trabajo y a continuación simplemente se citan algunos de los polimorfismos más estudiados en la investigación biológica de la paternidad.

- Polimorfismo del cromosoma Y. Se trata del aumento o disminución de la parte distal de los brazos largos de este cromosoma, cuando se tiñe con determinadas sustancias fluorescentes (Nuzo F. y Col. 1966) (De Grouchy, 1977) (273, 159).
- Polimorfismo de los cromosomas 1, 9, y 16 mediante técnicas de tinción denominadas de BANDAS-C.

Según Georgette Bujdosó y colaboradores (63), el análisis cromosómico en las investigaciones de paternidad debe realizarse cuando:

- a) Dos o más hombres son acusados de la paternidad y los análisis antropobiológicos y de marcadores genético moleculares no ofrecen resultados satisfactorios.
- b) Cuando no existen diferencias significativas en los valores de la probabilidad de paternidad de los supuestos padres acusados de la paternidad biológica.
- c) Y cuando, sin excluirse la paternidad, el valor de la probabilidad de paternidad obtenido no tiene significación.

Por fin, simplemente apuntar otra de las maneras de analizar el material hereditario.

Se trata de intentar descifrar el alfabeto químico que se encuentra escrito a lo largo de la molécula de ADN.

En este sentido y gracias al enorme desarrollo tecnológico en el campo de la Ingeniería Genética, en la actualidad los genetistas moleculares han empezado a detectar una serie de secuencias de ADN polimórficas, de probada herencia mendeliana, cuyas posibilidades teóricas en la investigación biológica de la paternidad parecen ser ilimitadas.

Para hacernos una idea del valor de estos polimorfismos, simplemente reseñar el reciente estudio realizado por Balazs y colaboradores

(26), en el cual se comparan los resultados obtenidos en el tipaje del sistema HLA y los resultados obtenidos en el estudio de los polimorfismos de ADN en más de 100 casos en los que se discute la paternidad. La conclusión obtenida por estos autores es que por ambos métodos se obtiene el mismo número de exclusiones, así como los mismos valores de probabilidad de paternidad en los casos en que no es posible la exclusión.

Aunque en la actualidad estas pruebas no se realizan en el Instituto Nacional de Toxicología, son complicadas, caras y de larga duración, han abierto enormes posibilidades en el estudio de la variación genética y la herencia y dejan una puerta abierta, para que en un futuro próximo la asignación positiva de la paternidad pueda ser una prueba de certeza absoluta.

Estudio biomatemático

Una vez realizadas las distintas pruebas en el laboratorio para determinar los caracteres (fenotipos) presentes en los sujetos (presunto padre, madre e hijo) correspondiente a cada uno de los sistemas sanguíneos, mediante la comparación de los caracteres de la madre y del niño con los del presunto padre, podemos obtener dos conclusiones previas:

Primera. Exclusión de paternidad: mediante la aplicación de las leyes de Mendel y la genética de los sistemas examinados (toda persona hereda un alelo paterno y otro materno para cada carácter sanguíneo estudiado), un padre puede ser excluido como padre biológico cuando se establece alguno de los dos criterios siguientes:

- a) El hijo/a no puede poseer un carácter que no esté presente en su madre o en su padre. Esta exclusión es evidente: ejem.: un hijo/a que sea Rh(+) no puede nacer de padres Rh(-).
- b) Cuando en el hijo/a falta un carácter que se encuentra en homocigosis en el padre. Ejem.: un niño M (homocigoto MM) no puede tener por padre un sujeto N (homocigoto NN). Esta exclusión es correcta pero es necesario actuar con las máximas precauciones, pues hay que tener en cuenta las posibilidades de un Ag o de un haplotipo raro y la existencia de genes silenciosos.

En ambos casos puede asegurarse la exclusión de paternidad con certeza absoluta.

Aplicando estos dos criterios de exclusión y basándonos en las frecuencias génicas en la población, podemos establecer la probabilidad

de exclusión para cada uno de los sistemas elegidos antes de conocerse los resultados del análisis en la investigación de paternidad; esta probabilidad determina la proporción de sujetos, tomados al azar, excluidos de paternidad para una pareja madre-niño, tomada igualmente al azar.

Tabla 2
Probabilidades parciales y acumuladas de exclusión de la paternidad

HLA	Grupos sanguíneos	Grupos de proteínas		
0,90	ABO	0,167	Bf	0,187
	MNS	0,316	Gm	0,229
	P	0,030	Km	0,058
	Rh	0,290	Gc	0,269
	K	0,041	Hp	0,184
	Fy	0,071	C ₃	0,141
	Jk	0,187	Tf	0,131
	Lu	0,027	PAc	0,235
	Do	0,181	PGM	0,254
	Xg	0,076	AK	0,034
0,80		ADA	0,038	
		6PGD	0,022	
		sGPT	0,187	
		Est D	0,089	
		Gt	0,066	
		Glo	0,186	
		0,92		
0,98				
0,998				

La tabla anterior muestra las probabilidades parciales y acumuladas de exclusión de paternidad para cada uno de los sistemas.

Se puede observar que existen dos categorías de marcadores:

- a) Los sistemas de mayor exclusión, que son aquellos que permiten eliminar una proporción relativamente elevada de hombres acusados injustamente.

En este grupo pueden incluirse los sistemas MN, Rh, ABO, etc., siendo el HLA el sistema que ocupa el primer lugar.

- b) Los sistemas de menor exclusión son aquellos que permiten excluir un número bajo de hombres acusados falsamente de paternidad. Son, por ejemplo, los sistemas P, Se, etc.

La probabilidad de exclusión va aumentando progresivamente a medida que se aumenta el número de sistemas estudiados. Así puede observarse en la tabla que, estudiando sólo los grupos sanguíneos, no puede excluirse más que a un 80 % de hombres acusados falsamente. Por el contrario, si utilizamos todos los sistemas presentes en la tabla se podría excluir a un 99,8 de falsos padres.

Segunda. Probabilidad de paternidad: si el hombre no es excluido como padre biológico, ello significa que los caracteres presentes en el hijo/a lo están también en la madre o en el presunto padre; se impone calcular la probabilidad de paternidad.

Este valor expresa la probabilidad que tiene el presunto padre de ser el padre biológico.

Basándonos en los fenotipos del presunto padre, madre e hijo obtenidos, mediante los test genéticos en el laboratorio y conociendo las frecuencias génicas de estos sistemas en la población, podemos calcular la probabilidad de paternidad.

El método más utilizado en la actualidad es el propuesto por Essen-Möller, basado en el teorema de Bayes: en la fórmula de Essen-Möller se incluyen los siguientes conceptos:

Prob. «a priori»: en la fórmula de Essen-Möller se representa por la letra Y. Es la probabilidad que tendría un hombre cualquiera de un determinado grupo de población de ser padre de ese hijo/a (que posea esos caracteres concretos), hijo de una madre concreta.

Prob. «a posteriori»: se representa por la letra X en la fórmula de Essen-Möller. Es la probabilidad de que el hombre que nosotros estudiamos como presunto padre tenga los mismos caracteres sanguíneos que el padre biológico de ese hijo/a concreto, hijo de esa madre concreta, es decir, que sea el verdadero padre.

$$\text{Prob. de paternidad } W = \frac{X}{X + Y}$$

Otro parámetro muy utilizado es el llamado «Índice de paternidad», el cual relaciona la probabilidad del supuesto padre (X) con la probabilidad de paternidad de un hombre tomado al azar (Y).

$$\text{I. P.} = \frac{X}{Y}$$

Este índice indica cuántas veces es mayor la probabilidad del presunto padre con respecto a un hombre tomado al azar de ser el padre biológico del hijo/a.

Queda la posibilidad de que, además de aquel hombre estudiado como presunto padre, exista alguno/os en la población que también pudiera/an haber transmitido aquellos caracteres sanguíneos al niño.

Hummel y col. establecieron unos «Precidados verbales» de paternidad aceptados internacionalmente que son los siguientes:

99,8 a 99,9 – paternidad prácticamente probada.

99,0 a 99,7 – extremadamente probable.

95,0 a 98,9 – muy probable.

90,0 a 94,9 – indicio de paternidad.

80,0 a 89,0 – paternidad no significativa.

Causas de error en las peritaciones de investigación de paternidad

El profesor Fiori divide las causas de error en una peritación de investigación de paternidad en: errores de naturaleza técnica y errores de naturaleza científica.

Para evitarse los errores de naturaleza técnica deben tomarse la siguientes precauciones (57):

- 1.º Que la peritación de investigación de paternidad sea llevada a cabo por personal especializado tanto en el conocimiento de las técnicas a realizar como en la genética de los sistemas que van a ser estudiados.
- 2.º El material utilizado debe ser meticulosamente marcado con los nombres de cada uno de los sujetos, evitando de esta manera el cambio de sangres.
- 3.º Las pruebas deben ser realizadas por dos técnicos y la interpretación de las mismas debe hacerse independientemente.

En el caso de que existiera alguna discrepancia, las pruebas deberían repetirse.

- 4.º Deben de incluirse controles para cada una de las pruebas.
- 5.º Los antisueros utilizados en estas pruebas deben estar en óptimas condiciones.

Entre los errores de naturaleza científica son importantes (147):

– **Recientes transfusiones sanguíneas:** una investigación de paternidad realizada poco tiempo después de una transfusión sanguínea puede alterar el resultado, pudiéndose detectar algún factor que proceda de la sangre transfundida; sin embargo, la supervivencia de estos grupos es escasa y varía en el receptor entre 100 a 120 días. En algunos casos como el HLA es muy corta.

- **La edad:** la mayoría de los antígenos están ya desarrollados en el recién nacido y permanecen constantes a lo largo de la vida. No obstante, existen algunos antígenos que no lo están en el recién nacido, como por ejemplo los antígenos del sistema Lewis; por ello, las peritaciones de investigación de paternidad deben realizarse a partir de los dos años de edad en el niño.

- **Ciertas enfermedades:** enfermedades como la leucemia pueden afectar a los sistemas ABO y Lewis, que pueden llegar a desaparecer. Hipoglobulinemias pueden producir que algunos de los antígenos del sistema Gm y Km estén en bajas concentraciones. En mielomas, quistes ováricos y otros procesos pueden alterarse también las haptoglobinas, las gammaglobulinas y el sistema ABO.

- **Los genes raros y los genes silenciosos:** en la investigación de paternidad el perito debe confrontar todos los fenotipos posibles en cada uno de los sistemas; para ello debe tener en cuenta los antígenos o haplotipos raros y los genes silenciosos; así, por ejemplo, siendo la madre M (homocigoto MM), el padre podría ser NMg en vez de N (homocigoto NN), y el niño MMg, en vez de M (homocigoto MM). La presencia de este gen (Mg) podría explicar la anomalía observada. La utilización de un reactivo anti Mg podría aclarar este genotipo.

- **Mutaciones espontáneas:** la probabilidad de que se puedan dar mutaciones espontáneas es del orden del uno por un millón (según Steveson y Kerr). Este valor permite que se pueda prescindir de esta posibilidad en la investigación de paternidad. En el caso de que se detectara una mutación espontánea tendría que realizarse el estudio del árbol genealógico.

Conociendo que se pueden presentar todas estas circunstancias, y por tanto llevando a cabo todo tipo de precauciones tendentes a evitarlas, podemos afirmar que los resultados de peritación de investigación de paternidad son de alta fiabilidad a condición de utilizar un gran número de sistemas.

IV. MUERTE POR SUMERSION

He querido tocar este tema por la importancia cualitativa y cuantitativa en el campo de las ciencias forenses.

La comprobación diagnóstica de muerte por sumersión es un estudio que se realiza habitualmente en la sección de biología del Instituto Nacional de Toxicología. Sabido es que en la sumersión pueden darse dos formas: sumersión inhibición y sumersión asfixia.

La sumersión inhibición, según Gisbert y Simonin (147, 329) es consecutiva a un reflejo inhibitor de la respiración y de la circulación, desencadenado por el contacto brusco de la piel y mucosas de las vías respiratorias altas con el agua fría. Sin embargo, no es esta forma la que nos interesa ahora, sino la sumersión por asfixia, cuyo diagnóstico médico legal pasamos a comentar.

Este diagnóstico se basa en demostrar una serie de alteraciones físico-químicas en la sangre debido a la penetración del líquido de sumersión, generalmente agua, en el torrente circulatorio, así como investigar la presencia de los elementos sólidos contenidos en estos líquidos (50, 219, 298).

De esta forma el trabajo que realiza la Sección de Biología se puede dividir en estos dos grandes apartados:

1. Demostración de la hidremia.
2. Investigación de diatomeas.

1. Demostración de la hidremia:

La presencia del agua en la sangre, o, lo que es lo mismo, la dilución de ésta, se demostrará estudiando los componentes sanguíneos y las características físico-químicas de la sangre del ventrículo izquierdo y poniendo estos hallazgos en relación con los obtenidos en la sangre del ventrículo derecho (245-347).

La hemodilución será mayor en el compartimento izquierdo que en el ventrículo derecho, debido a que en éste el volumen de líquido de sumersión que llega será siempre menor que en el izquierdo, ya que ha de recorrer toda la circulación mayor (373).

Algunos autores como Derobert (106) afirman que no debe considerarse la hemodilución como un diagnóstico suficiente de muerte por sumersión. Basan su aserto en que la hemodilución está en función de

la duración de la actividad cardiocirculatoria en la sumersión, y ésta puede ser muy variable, yendo desde el síncope en el agua, en cuyo caso no hay hemodilución, hasta una sumersión de duración máxima, en que sí se demostraría.

A lo largo de la historia, la demostración de la hidremia se ha realizado de muy diferentes maneras. Así Brouardel y cols (53) en 1897 realizan el conteo de hematíes en las sangres extraídas, así como la determinación del residuo seco de un volumen medio de sangre.

Gettler (146) fue el primero en utilizar la determinación de cloruros en las muertes por sumersión. Sus resultados fueron los esperados, es decir, la sangre del corazón izquierdo presentaba una menor concentración de cloruros en los cadáveres ahogados en agua dulce, lo que indicaba la dilución de esta sangre respecto a la del corazón derecho.

Sin embargo, los cadáveres hallados en agua salada presentaban resultados inversos, es decir, mayor concentración de cloruros en la cavidad izquierda que en la derecha.

En 1903, Pleczek (289) efectuó la determinación del peso específico de la sangre, observando las variaciones en los ahogados. Posteriormente, Piñeiro (288) reiteró la utilidad de este parámetro como diagnóstico de muerte por sumersión.

Trabajos posteriores realizados en 1963 por Durlacher y col (116) comprueban que el estudio del peso específico de la sangre es el único parámetro, de todos los utilizados, con el cual consiguen que los resultados ratifiquen que la hemodilución de los ahogados se produce en la cavidad izquierda, respecto a la derecha.

La determinación de la conductividad eléctrica sanguínea fue propuesta por Carrara (1902) (74), entendiéndose por conductividad eléctrica la inversa de la resistencia específica. Este parámetro también resultó que disminuía en la sangre de los ahogados en agua dulce y aumentaba en los cadáveres encontrados en agua de mar.

También Carrara (1901) (73) utilizó la crioscopia o determinación del punto de congelación como parámetro útil en estos diagnósticos.

El cálculo de las tasas de hemoglobina, sodio y potasio son elementos útiles y están aplicándose desde hace ya muchos años. Sin embargo, existen controversias respecto a ello. Estudios de Durlacher y col (116) llegaban a la conclusión de que son determinaciones de dudosa utilidad. Por el contrario, en 1971 Ezatollah Foroughi (119) consigue resultados con estas determinaciones que apoyan la teoría de la hemodilución en la sangre de los ahogados.

La metodología seguida en nuestros laboratorios es la siguiente:

partiendo de dos muestras de sangre, recogidas de las cavidades derecha e izquierda del corazón, se procede a la separación por centrifugación del plasma, con el cual vamos a trabajar. El volumen de sangre debe ser el máximo posible que se pueda extraer de las cavidades cardiacas.

En la determinación de la tasa de hemoglobina el método elegido es el designado por el Comité Internacional de Standarización de Hematología (182). Valoración de la cianometahemoglobina espectrofotométricamente bajo la acción del ferricianuro potásico y del cianuro potásico.

Las determinaciones de sodio y potasio se deben realizar por métodos más sensibles, como es la fotometría de llama.

La valoración de cloruros se realiza volumétricamente según el método mercurimétrico en presencia de un indicador de calor (161).

Hay que llamar la atención sobre el hecho de que todas estas determinaciones se deben realizar sobre sangres que se encuentren en buen estado de conservación, pues en el momento en que la putrefacción se instaura, los resultados no pueden ser en absoluto tomados en consideración.

Ello es así porque como consecuencia del proceso de putrefacción tiene lugar una demolición de las moléculas proteicas, dando origen a componentes más simples, pero también físicamente más activos, con lo cual se modifican los resultados de una manera imprevisible (147).

Por otro lado, según parece demostrar la experiencia de diferentes investigadores, Derobert (106) y Durlacher (116), el hecho de no poder comprobar la hemodilución de la sangre en el cadáver no implica que la muerte no haya sido por sumersión; por tanto, un resultado negativo en esta experiencia no implicaría de modo absoluto que el diagnóstico de sumersión sea negativo.

2. Investigación de diatomeas:

En el agua o líquido donde presuntamente se ha producido la muerte se pueden hallar diferentes elementos sólidos. Dentro de estos elementos formes, los que tienen mayor interés en las investigaciones de este tipo son unas algas unicelulares denominadas diatomeas. Como el líquido de sumersión penetra por el torrente circulatorio, también por éste se introducirán estas algas y difundirán por todo el organismo. Por esto la investigación en diferentes órganos y tejidos del cadáver, de estas diatomeas, es una prueba de gran interés.

Las características fundamentales de estas algas y a las que se debe su importancia diagnóstica son las siguientes:

El componente silíceo de sus paredes las hace resistentes a los tratamientos químico-físicos que se utilizarán más tarde en la investigación forense.

En el transcurso del tiempo, las estructuras de las diatomeas permanecerán intactas, debido a la resistencia de sus paredes.

Las dimensiones de estas algas son tan pequeñas que incluso atraviesan los capilares sanguíneos.

En cuanto al significado de la investigación de diatomeas en el diagnóstico de muerte por sumersión, el primer antecedente lo encontramos en 1904, cuando Revenstorf (301) demuestra por vez primera la presencia de diatomeas en pulmón de ahogados, mediante una sencilla técnica de extracción, troceado y maceración del órgano en agua destilada, para posteriormente concentrar el eluido por centrifugación y analizar mediante microscopio óptico el sedimento.

Treinta años más tarde, Kasperek (198) vuelve a demostrar la presencia de diatomeas en pulmón de ahogados tras someter al órgano a digestión química y analizar el residuo resultante.

En 1942 aparecen las primeras críticas a los hallazgos anteriores, ya que Incze (180) demuestra la presencia de diatomeas en pulmones de individuos no ahogados que se mantuvieron en agua rica en diatomeas tras la muerte. El mismo investigador en un Congreso de la Sociedad Húngara de Patología (1942) presenta el descubrimiento de numerosas diatomeas en el ventrículo izquierdo y en órganos de individuos presuntamente ahogados en el Danubio, descubrimiento que siete años más tarde sería ratificado por Mueller y Görg (257) al publicar el resultado de una de las más importantes investigaciones en el campo de la sumersión, que demuestra la penetración de diatomeas en la circulación general durante la sumersión. El mismo año Tamaska (350) demuestra la presencia de diatomeas en la médula ósea de individuos ahogados, en una publicación que pasará desapercibida para la comunidad científica de la época.

Ya en los años sesenta, distintos investigadores (Thomas, Van Hecke y Tiperman (358) y Tamaska (351) señalan uno de los grandes problemas en este tipo de investigaciones. Se trata de la posibilidad de contaminación durante el examen postmortem, lo cual daría lugar a falsos resultados positivos. Como consecuencia se resalta la necesidad de llevar a cabo la investigación sobre órganos cerrados y en especial sobre médula ósea de huesos largos.

En los años setenta, Gordon (154) vuelve a proponer la investigación de diatomeas en la sangre de ventrículo izquierdo, y Schwar (322) propone la investigación de diatomeas en la circulación general. En

1977, Durigon y Eliakis (115) descubrieron un nuevo método de destrucción de la materia orgánica utilizando disolventes orgánicos en vez de ácidos fuertes.

Por fin, en la década de los ochenta, se descubrieron algunos procedimientos para el aislamiento de diatomeas, mediante centrifugación en gradiente o bien mediante el uso de ultrasonidos (141). Por otro lado, algunos autores como Foged (134) y Schneider (318) descubren la presencia de diatomeas en distintos órganos de individuos no ahogados y por tanto cuestionan la validez de la investigación de diatomeas en el diagnóstico de la muerte por sumersión.

En el laboratorio de Biología actualmente realizamos el estudio de diatomeas en la sangre extraída del ventrículo izquierdo, sangre del derecho, pulmones, hígado y médula ósea. Es el hallazgo de las mismas en estas vísceras y su posterior concordancia con las estudiadas en el líquido de sumersión una prueba de sumersión vital.

Las técnicas utilizadas esquemáticamente son:

Concentración de diatomeas, bien por centrifugación o bien por microfilmación, con filtros de un tamaño de $1,2 \mu - 5 \mu$.

Destrucción de materia orgánica en las muestras que lo requieran, bien por incineración o tratamiento con ácidos fuertes.

Investigación de diatomeas tras sedimentación o filtración en microscopio óptico en campo claro.

V. INVESTIGACION EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGIA

Creemos interesante para finalizar este discurso hablar sobre la investigación experimental en toxicología, a la que nosotros hemos prestado una gran importancia y muy especialmente al animal de experimentación como reactivo-vivo. De modo general, la Toxicología Experimental estudia la interacción de una sustancia química en un sistema biológico, en un intento de definir la probabilidad de producir efectos adversos en el organismo intacto. Si los cambios perjudiciales se producen, investiga su naturaleza, incidencias, mecanismos de producción y reversibilidad.

Así mismo deben quedar delimitadas las dosis máximas tolerables que no producen efectos nocivos. Los resultados de los ensayos de toxicidad dependen primariamente de tres factores generales, que han de ser seriamente considerados en el momento de realizar el diseño experimental; éstos son: el animal de experimentación, el cual sigue constituyendo la herramienta básica y habitual de estos estudios; el medio ambiente en el cual vive durante el ensayo (estabulario), y las características del producto químico que se administra (353).

Vamos a revisar cada factor separadamente, antes de proceder a enumerar los ensayos más frecuentes en la metodología toxicológica.

1) El animal de laboratorio

El animal de experimentación es el reactivo biológico que recibe el producto en estudio por diferentes vías.

La precisión y repetitividad de los resultados que se obtienen dependen en gran medida de la calidad y correcto estado sanitario del animal utilizado (354).

Los objetivos del experimento son los que han de marcar las características de los animales a ser elegidos. Así, se ha de tener en cuenta: el período de vida, la anatomía, el tamaño corporal, los sistemas fisiológicos y metabólicos, los requerimientos nutricionales, la susceptibilidad e infecciones o trastornos degenerativos, las respuestas inmunes, la incidencia de tumores espontáneos, los modelos de comportamiento, etc.

En base a estos criterios se determinarán para cada ensayo las características de los animales en cuanto a especie, cepa, edad, sexo, peso corporal, ciclo sexual, dotación genética (endógenos, hereróga-

mos, mutantes, híbridos), calidad microbiológica (convencional, exentos de organismos patógenos) e incluso la fuente comercial.

El uso de animales en la investigación ha desarrollado una serie de recomendaciones, estándares y regulaciones con el fin de mejorar, por un lado, la conducción del propio diseño, y, por otro, la buena manipulación de los animales durante el estudio (136) (85).

2. Características ambientales. Estabularios

La disposición de un espacio adecuado para el alojamiento de los animales y el control de las condiciones ambientales en el mismo son un requisito para cualquier estudio de toxicidad y muy especialmente para los de larga duración. El estabulario representa una parte más de un laboratorio de investigación y su diseño debe realizarse en base a contribuir a elevar la calidad de los estudios.

Los factores ambientales más importantes a ser controlados aparte de las condiciones de transporte y cuarentena son: la temperatura y la humedad de las salas, la presión barométrica, la presencia de agentes químicos en el aire, la ventilación, el espectro e intensidad de la luz, los ciclos de luz-oscuridad, la calidad y cantidad de la dieta, el método de disponibilidad del agua y calidad de la misma, el tamaño y material de la caja, el tipo de cama y su frecuencia de cambio, los procedimientos de manejo, la intensidad de los ruidos y tipo de programas de higiene que se utilizan.

Las pautas a seguir para el control de estos factores se encuentran recogidas en las directrices correspondientes (160).

3. Características de la sustancia química en estudio

Las características físicas y químicas del producto en ensayo (estructura, solubilidad, estabilidad, pH, tamaño de partícula, etc.) son importantes variables que influyen en la respuesta biológica. Así mismo, pueden determinar los procedimientos de extracción y ensayo en sus determinaciones tisulares o en fluidos biológicos, permitiendo, además, realizar estimaciones lógicas en cuanto a la naturaleza de los metabolitos que se puedan obtener.

DISEÑO EXPERIMENTAL. ESTANDARIZACION DE PROTOCOLOS Y PROCEDIMIENTOS. NORMAS DE BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO

El diseño experimental debe establecerse en base a los objetivos

del estudio, y ambos son recogidos en el Protocolo. Este exige una planificación cuidadosa en la que se indiquen todos los detalles del ensayo.

Los protocolos y procedimientos han sido objeto de numerosas revisiones y recomendaciones, muchas de ellas encaminadas a conseguir una mayor uniformidad y estandarización, de forma que permitan obtenerse resultados internacionalmente comparables. En este sentido, las directrices de mayor difusión son las establecidas por la FDA (136), la OCDE y por la Comunidad Económica Europea (82, 83, 86).

Uno de los más importantes avances en la estandarización de los estudios de toxicidad ha sido la implantación de las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP), definidas como aquellas que afectan tanto a la organización como a las condiciones en las que los estudios se planifican, realizan, controlan, registran y presentan.

METODOS DE ENSAYO EN LA EVALUACION DE LA TOXICIDAD

Los estudios toxicológicos se diseñan para producir una amplia variedad de efectos en una serie progresiva de experimentos, que comienzan por un ensayo agudo de corta duración y pueden finalizar en estudios más largos y complejos de muchos meses de tratamiento.

A continuación vamos a descubrir cada tipo de ensayo.

1. Determinación de la toxicidad por administración única. Toxicidad aguda DL50

Este estudio permite apreciar los niveles de dosis que pueden producir la muerte del animal, determinar la DL50, así como conocer los síntomas de la intoxicación aguda junto con las circunstancias de la muerte. Por ello deben recogerse sistemáticamente a lo largo del mismo todas las observaciones clínicas y patológicas.

Generalmente, se determina en dos especies de animales (ratas y ratones de ambos sexos) y en, al menos, dos vías de administración, una de las cuales asegure la total absorción del producto.

Los estudios de toxicidad aguda en animales ayudan a pronosticar efectos tóxicos potenciales en seres humanos expuestos a dosis letales. Por otra parte, la determinación de la DL50 permite su comparación con otros productos y orienta en la elección de las dosis en estudios posteriores.

2. Determinación de la toxicidad por administración reiterada

Las pruebas de toxicidad por administración reiterada van encaminadas a poner en evidencia las alteraciones funcionales y anatomopatológicas inducidas por la administración de la sustancia química en estudio y establecer las condiciones de aparición de las mismas, en función de la posología.

En estos estudios se determina, además, si se produce acumulación del producto, inducción o inhibición de enzimas de biotransformación, estimulación de otras vías de transformación, etc.

La duración de estos ensayos se establece en base a la duración prevista de exposición del hombre a la sustancia química. No puede formularse una regla universal a este respecto. A título orientativo se pueden seguir las recomendaciones de la CEE o las dictadas por la OMS que se muestran en la tabla 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1

Duración del tratamiento en el hombre	Duración de los ensayos de toxicidad reiterada
1. Una o varias administraciones en un solo día	2 semanas
2. Administración reiterada de hasta 7 días	4 semanas
3. Administración reiterada de hasta 30 días	3 meses
4. Administración reiterada superior a 30 días (consecutivos o no, en un año)	6 meses

Tabla 2

Período de administración al hombre	Duración propuesta en más de una especie de animales de experimentación
Dosis única o en pequeño número	2 semanas por lo menos
Hasta 4 semanas	de 13 a 26 semanas
Más de 4 semanas	26 semanas por lo menos (sin incluir los estudios de carcinogenicidad)

En la realización de los estudios por administración reiterada se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- Desde el punto de vista **farmacocinético y metabólico**, las especies animales a elegir deben ser las más próximas al hombre. Esta consideración es difícil de cumplir, dado que en la mayoría de los casos se carece de ese tipo de datos.

Por esta razón, estos estudios se realizan en dos especies animales, una roedor y otra no roedor, sobre los cuales se efectuarán estudios metabólicos y farmacocinéticos (56).

- La **posología y vía de administración** deben elegirse de tal modo que se obtenga en el animal suficiente producto químico o metabolitos para poner en evidencia los órganos diana sobre los que se ejercen los efectos tóxicos.

En todos los casos se necesita establecer tres niveles de dosis, un nivel alto que debe provocar efectos tóxicos severos, un nivel intermedio que puede provocar algún efecto tóxico y un nivel bajo que no produzca toxicidad. Para efectos comparativos se dispondrá en el estudio de un nivel de dosificación 0, que será tratado con el vehículo. La vía de administración elegida debe ser la prevista en la exposición en el hombre.

Consideraciones estadísticas:

El número de animales que se utilizará en cada caso será el suficiente para garantizar al final del estudio la obtención de conclusiones estadísticamente válidas, respecto a las diferencias en las respuestas de los animales tratados frente a los controles.

Otras consideraciones se contemplan en las directrices de la OCDE, tales como la disposición de grupos satélites para estudios de reversibilidad, etc.

De una manera general, en estos ensayos se debe obtener información concerniente a:

- Mortalidad y morbilidad de los animales.
- Comportamiento y estado clínico.
- Crecimiento ponderal y consumo de alimento y agua.
- Variaciones del estado fisiológico con ayuda de métodos no traumáticos tales como examen ocular, electrocardiográficos, etc.
- Modificaciones de parámetros hematológicos, de bioquímica clínica (sangre, orina), hormonales, etc.
- Modificaciones funcionales de ciertos órganos (hígado, riñón, etc.).
- Lesiones anatomopatológicas eventuales evaluadas macroscópicamente, peso de los órganos que se consideren oportunos y obligatoriamente los estudios histológicos de los tejidos u órganos citados en las Recomendaciones de la CEE (84).

- Reversibilidad de los efectos tóxicos observados.

Desde el punto de vista de la duración, los estudios de administración reiterada son denominados comúnmente:

- Subagudos: duración aproximada de 21-28 días.
- Subcrónicos: duración aproximada de 3-4 meses.
- Crónicos: duración aproximada de 6 a 12 meses.

En la mayoría de los casos, los estudios subagudos o subcrónicos son las evaluaciones previas para establecer o estimar las dosis máximas toleradas a utilizar en los estudios crónicos.

Determinación del poder mutagénico y cancerogénico

Desde hace algunos años y por el enorme riesgo que supone la existencia del poder mutagénico, se realizan sistemáticamente este tipo de ensayos, aún en fases relativamente precoces de los estudios de toxicidad. La posibilidad de producir mutaciones puntuales (modificación de una fase o de un pequeño número de ellas), en la molécula de ADN o de provocar aberraciones cromosómicas (alteraciones microscópicas en la estructura o en el número de cromosomas) debe de quedar establecida, tanto por la relación existente entre el poder mutagénico y el riesgo cancerogénico como por la determinación de las consecuencias de las modificaciones del material genético en células germinales.

La evaluación del poder mutagénico requiere la confrontación de una batería de ensayos que exploren las mutaciones puntuales y las alteraciones cromosómicas. En la bibliografía se describen numerosos tipos de ensayos, de los cuales no todos tienen una validez reconocida.

La OCDE en sus directrices para los ensayos de sustancias químicas recomienda la elección entre los siguientes:

- Ensayos de retromutación en *Salmonella typhimurium* (test de Ames) y en *Escherichia coli*.
- Ensayos de mutación «in vitro» en células de mamífero.
- Ensayo de micronúcleos.
- Ensayos citogénicos «in vivo» en médula ósea de mamífero. Análisis cromosómico.
- Ensayos citogénicos «in vitro» en células de mamífero.
- Ensayos del letal recesivo ligado al sexo en *Drosophila melanogaster*.
- Ensayos del letal dominante en roedores.

Los estudios de **cancerogénesis** son en general necesarios:

- Cuando el producto químico es susceptible de ser administrado durante un largo período de tiempo.

- Cuando la estructura química sugiera un potencial cancerogénico.
- En los casos en los que el producto haya mostrado ciertos «aspectos particulares» en su actividad biológica, durante los estudios de toxicidad general o en los ensayos de mutagénesis.

Estos estudios deben efectuarse en dos especies, que en la práctica son siempre roedores (ratón, rata, hámster), aunque en casos excepcionales por las características del producto pueden elegirse otras especies (primates).

La duración de estos estudios es de un mínimo de 18 meses en el ratón y el hámster y de 24 meses en la rata.

Si los niveles de supervivencia son elevados esta duración puede prolongarse durante seis meses más.

La elección de la dosis es un aspecto de suma importancia.

Como en otros estudios, son requeridos tres niveles de dosificación, el más elevado debe provocar un efecto tóxico mínimo y el más débil será como máximo del orden de 2 ó 3 veces la dosis terapéutica humana.

Para su realización se tendrán en cuenta todas las consideraciones descritas anteriormente en los ensayos de toxicidad por administración reiterada.

Por la duración y el costo económico que supone la realización de los estudios de cancerogénesis, se está desarrollando otro tipo de ensayos más cortos de los cuales se dispone ya de un cierto número de ellos. Son pruebas no totalmente validadas, basadas en procesos de transformación celular «in vitro» sobre estirpes particulares de ratones o sobre células embrionarias de hámster.

Como ensayos «in vivo» de duración media (6 meses) pueden citarse los de inducción de tumores cutáneos o pulmonares en ratones, y mamarios en la rata.

Determinación de los efectos sobre la reproducción

Dentro del estudio de toxicidad de un producto químico, se debe abordar la investigación de los efectos de la sustancia sobre: el apareamiento, modificaciones de la fertilidad por alteración de los gametos, efectos sobre el huevo fecundado en los estadios de preimplantación e implantación, efectos tóxicos sobre el embrión y sobre el feto, existencia de maternotoxicidad con efectos secundarios en el embrión y el feto, efecto sobre el crecimiento en el útero y sobre el desarrollo, inter-

ferencia con el parto, efecto sobre el desarrollo posnatal, la lactación y el destete y efectos tardíos en la descendencia.

Estas investigaciones se realizan en tres fases o segmentos denominados:

- Segmento 1: que desarrolla el estudio de la fertilidad y capacidad reproductora general.
- Segmento 2: que estudia la embriotoxicidad, fetotoxicidad y teratogenia.
- Segmento 3: dedicado al estudio de peri y postnatalidad.

Extrapolación al hombre de los resultados obtenidos en estudios de toxicidad experimental

Los resultados obtenidos en los estudios de toxicidad en animales de laboratorio son de indudable valor en la orientación y capacidad de pronóstico de la toxicidad relativa de un compuesto químico en el hombre. No obstante, dadas las inherentes diferencias interespecíficas, la ausencia de toxicidad en animales no puede ser prueba absoluta de la seguridad de las sustancias.



CONSIDERACION FINAL:

Con lo expuesto he pretendido dar a conocer lo que ha sido y es el Laboratorio Forense en España y, sobre todo, intentar comunicar mi experiencia de cuarenta y cinco años de dedicación a estos Laboratorios. En éstos hemos introducido mejoras en las técnicas analíticas, tanto en lo que se refiere a las variaciones de las técnicas conocidas, como al desarrollo de nuevas técnicas para su mejor realización, dentro de la química toxicológica y de la medicina legal, en estos laboratorios.

Espero y deseo que este discurso haya alcanzado las cotas que para él nos fijamos y esté a la altura científica que corresponde a esta Real Academia. Si ello se ha conseguido, estaré satisfecho en la seguridad que si así fuera, será gracias, indudablemente, a estar a mi lado el Excmo. Señor don Emilio Fernández Galiano, que da a este acto la altura y categoría que corresponde, y por ello, nuevamente le doy las gracias más entrañables.

He dicho.

Madrid, 18 de febrero de 1988

BIBLIOGRAFIA.

1. Abe, S.; Hiraiwa, K.
J. Forensic Sci. Int. 32: 29-32. 1986.
2. Ablett, P. J.
J. Forensic Sci. Soc. 23: 255-256. 1983.
3. Adler, O.; Adler, R.
Zeitschr. F. Physiol. Chemie. 41: 59. 1904.
4. Ahuja, S. A.
J. Pharm. Sci. 65: 163-81. 1976.
5. Albert, Z.; Orlocosmy, M.; Szewczuk, Z.
Nature. 191: 767-768. 1961.
6. Alder, J. F.; Batorew, M. C. C.
Anal. Chim. Acta. 135: 229. 1982.
7. Alm, R. S.; Williams, R. J. P.; Tiselius, A.
Acta. Chem. Scand. 6. 826-836. 1952.
8. Alonso, A.
XIII Jornadas Españolas de Medicina Forense. Valencia. 1987.
9. Alonso, A.
J. Forensic Sci. (en imprenta).
10. Allain, P.; Mauras, J.
Clin. Chim. Acta. 91: 41. 1979.
11. Anderson, J. R.
Amer. J. Illinois Path. 24: 920. 1954.
12. Andrasko, J.
J. Forensic Sci. Int. 17: 235-251. 1981.
13. Antich, J.; Ballesta, F.; Egozme, J. *et al.*
Genética Médica. Ed. Espaxs. Barcelona. 1978.
14. Arnard, V. A.; White, J. M.; Nino, H. V.
Clin. Chem. 21: 595. 1975.
15. Arsenault, G. P.
J. Am. Chem. Soc. 94: 8.241. 1972.
16. Ascier, A.; Deutsch, A. M.
J. Chromatogr. Biomedical. Appl. 182: 88-93. 1980.
17. Association Official Analytical Chemists.
Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists Natura Poison. 1976.
18. Auliffe, C. S. Mc.
Chem. Technol. 1: 46-51. 1971.
19. Axen, U.; Green, K.; Horling, D.; Samuelson, B.
Biochem. Biophys. Rest. Commun. 45: 519. 1971.

20. Baechtel, F. S.; Henning, F. C.
Advances in Forensic Haemogenetics 1. Brinkmann and K. Henning Ed. Springer Verlag. Berlin. 1986.
21. Baechtel, F. S.
J. Forensic Sci. 30: 1.119-1.129. 1986.
22. Bailey, R. W.; Bourse, J.
J. Chromatogr. 4: 206-213. 1960.
23. Baker, J. K.; Skelton, R. E.; Cheng-Yu, Ma.
J. Chromatogr. 168: 417-427. 1979.
24. Baker, P. B.; Gough, T. A.; Wagstaffe, P. J.
J. Anal. Toxicol. 7: 7-10. 1983.
25. Baker, P. B.; Vouler, R.; Bagon, K. R.; Gough, T. A.
J. Anal. Toxicol. 4: 145-152. 1980.
26. Balazs, I.; Wexler, K.; Nicholas, L.; Miyaraki, F.; Allen, F.
Advances in Forensic Haemogenetics 1. Brinkmann and K. Henning Ed. Springer Verlag. Berlin. 1986.
27. Baldwin, M. A.; McLafferty, F. W.
Org. Mass Spectron. 7: 1.353. 1973.
28. Barret, J. M.
Clin. Chem. Newsletter. 3 (1): 1. 1971.
29. Bartels, H.; Oldigs, M. D.; Guenther, E.
Eur. J. Pediatrics. 126: 37. 1977.
30. Baselt, R. C.
Advances in Analytical Toxicology. Vol. 1. Biom. Publ. 1982.
31. Baselt, R. C.; Wright, J. A.; Turner, J. E.; Cravey, R. H.
Arch. Tox. 34: 145-152. 1975.
32. Bastiani, R. S.; Phillips, R. C.; Schneider, R. S.; Ullman, E. F.
Am. J. Med. Technol. 39: 211. 1973.
33. Baynon, J. H.; Saunders, R. A.; Williams, A. E.
The Mass Spectra of Organic Molecules. Elsevier, New York. 1968.
34. Beckley, H. D.
Field Ionization Mass Spectrometry. Pergamon Press, Oxford. 1971.
35. Beckley, H. D.; Schulten, H. R.
Angrew. Hem. Int. Ed. Engl. 14: 403. 1975.
36. Beckmann Instruments.
Manual Beckmann de Electroforesis en Equipo Microzone. 1971.
37. Behne, D.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19: 115. 1981.

38. Beliaro, F.; Massano, G.
J. Chromatogr. 6 (3): 551-558. 1983.
39. Berman, E.
Toxic Metals and their Analysis. Heyden, London. 1980.
40. Berndt, H.; Jackwerth, E.; Fressenius, Z.
Anal. Chem. 290: 105. 1978.
41. Bertrand, G.
Bull. Academie Med. Seance du 24 Nov. 1931.
42. Bidalset, J. H.
J. Chromatogr. Sci. 12: 293. 1974.
43. Biemann, K.
Mass Spectrometry, Organic Applications. McGraw-Hill. New York. 1962.
44. Birky, M.
Toxicol. 6. 7: 265. 1973.
45. Black, D. L.; Goldberger, B. A.; Isenenschmid, D. S.; White, S.
J. Anal. Tox. 8: 224-227. 1984.
46. Blake, E. T.; Sensabaugh, G. F.
J. Forensic Sci. 23: 717-729. 1978.
47. Blake, E. T.; Sensabaugh, G. F.
J. Forensic Sci. 21: 784-796. 1976.
48. Blanco, A.; Zinnham, W. W.
Science. 139: 601-602. 1963.
49. Bock, R.
A Handbook of Descomposition Method in Analitical Chemistry. International Texbook Co. Glasgow. 1979.
50. Bonnet, E. F. P.
Medicina Legal. López Editores. 1980.
51. Breiter, J.; Helger, R.; Lang, H.
J. Forensic Sci. 7: 131-140. 1976.
52. Brockaert, J. A. C.
Spectrochim. Acta. 336b: 931. 1981.
53. Brovardel, P.
La pendaison, la strangulation, la suffocation, la submersion. Ed. Bailliere, Paris. 1897.
54. Bruckener, A.; Bernheim, M.
Ärztli. Lab., 24: 198-200. 1978.
55. Brunk, S. D.; Hadjioannou, T. P.; Hadjioannou, S. I.; Malmstadt, H. V.
Clin. Chem. 22: 905. 1976.
56. Bryant, H. H.; Felton, L. C.; Krauz, J. C.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 121: 210. 1957.
57. Bryant, H. H.; Weville, J.

- Disputed paternity, the value and application of blood test.* New York. 1980.
58. Budowle, B.
Forensic Sci. Int. 33: 187-196. 1987.
 59. Budowle, B.
Electrophoresis. 5: 314-316. 1984.
 60. Budowle, B.
Electrophoresis. 5: 165-167. 1984.
 61. Budowle, B.
Electrophoresis. 5: 254-255. 1984.
 62. Budzikiewicz, H.; Djerassi, C.; Williams, D. H.
Mass Spectrometry of Organic Compounds Holden-Day. San Francisco. 1968.
 63. Bujdoso; Somogyi, E.; Bergon, V.
Forensic Sci. Inter. 25: 35-43. 1984.
 64. Burdett, P. E.; Whitehead, P. H.
Anal. Biochem. 77: 419-428. 1977.
 65. Burlingame, A. A. Ed.
Topics in Organic Mass Spectrometry. John Wiley and Sons. New York. 1970.
 66. Butler, V. P.
J. Immunol. Methods. 7: 1. 1975.
 67. Butte, W.; Fresenius, Z.
Anal. Chem. 290: 156. 1978.
 68. *Bol. Of. Estado.* España.
Métodos Oficiales. 14-X-1981.
 69. Cabras; *et al.*
J. Chromatogr. 176: 473. 1979.
 70. Carracedo Alvarez, A.
Universidad de Santiago. Dpto. de Medicina Legal. 1982.
 71. Carracedo, A.
Advances in Forensic Science. 1. Henry C. Lee y Robert E. Gaesslen Ed. Biomedical Publications. Foster City. California. 1985.
 72. Carracedo, A.; Concheiro, L.; López-Rivadulla, N.
Forensic Sci. Int. 19: 181-184. 1982.
 73. Carrara, M.
Arch. Scienze Med. 25: 71. 1901.
 74. Carrara, M.
Arch. Scienze Med. 26: 229. 1902.

75. Casaret and Doull
Toxicology 3 rd. Ed. Macmillan Publishing Company New York. 1946.
76. Casper, J. L.
Tratado Médico de Medicina Legal. Madrid. 1884.
77. Castellano Arroyo, M.
Tesis Doctoral, Fac. Medicina Dpto. Medicina Legal Universidad de Granada. 1976.
78. Celesti, R.; Cavera, A.; Polilli, M.
La Diagnosi. 21: 255. 1971.
79. Clarke, E. G. C.
Isolation and identification of drugs. Sec. Ed. Pharm. Press. London. 1986.
80. Clement, S. L.
Sciences Legales et Police Scientifique. Masson, París. 1987.
81. Colwell, L. F.; Karger, B. L.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 49: 1.039-1.049. 1977.
82. Comunidades Europeas 75/318/CEE. 20 mayo 1975.
J. O. Comunidades Europeas, L 147, 9 junio 1975.
83. Comunidades Europeas 83/570/CEE.
J. O. Comunidades Europeas, L. 332, 28 noviembre 1983.
84. Comunidades Europeas 83/571/CEE. 26 octubre 1983.
J. O. Comunidades Europeas, L. 332, 28 noviembre 1983.
85. Comunidades Europeas 86/609/CEE. 24 noviembre 1986.
J. O. Comunidades Europeas. L. 358, 18 diciembre 1986. Anexos I y II.
86. Comunidades Europeas 87/18/CEE. 18 diciembre 1986.
J.O. Comunidades Europeas, L. 15/29, 1987.
87. Coombs, R. R. A.; Dood, B. E.
Med. Sci. Law. 1: 359. 1961.
88. Corbella, J.
Historia de la Medicina Legal, T. VII de H. Uni. de la Med. Salvat, Barcelona. 1976.
89. Craig, J.; Fowler, S.; Scott, A. C.
J. Forensic Sci. 30: 103-113. 1985.
90. Cresser, M. S.
Solvent extraction in flame spectroscopic analysis. Butterworth, London. 1976.
91. Culliford, B. J.
Nature 201: 1.092-1.093. 1964.

92. Curry, A. S.
Poison detection in human organs. 3 rd. Ed. Springfield. Illinois. 1976.
93. Chambon, P.; Danos, D.; Chambon, R.; Geahchan, A.
J. Chromatogr. 259: 372-374. 1983.
94. Chand, J.; Gotchen, S.; Gushaw, J. B.
Clin. Chem. 28: 361-367. 1982.
95. Chau, M. L.; Whetsell, C.; Mc. Chesuey, J. D.
Chromatogr. Sci. 12: 512-516. 1974.
96. Chinn, D. M.; Sennison, T. A.; Crouch, D. J.
Clin. Chem. 26: 1.201-1.204. 1980.
97. Christensen, N. J.
J. Clin. Lab. Invest. 38: 781. 1978.
98. Daldrup, T.; Kardel, B.
J. Chromatogr. 18: 81-83. 1984.
99. Daldrup, T.; Michalke, P.; Schönemann, E.
Ed. *Fortschritte der Rechtsmedizin*. Springer, Berlin-Heidelberg. New York. Ed. Forte. 1983.
100. Daldrup, T.; Michalke, P.; Böhme, W.
Chromatogr. Newslett. 10: 1-7. 1982.
101. Daldrup, T.; Susanto, F.; Michalke, P.; Fresenius, Z.
Anal. Chem. 308: 413-427. 1981.
102. Dale, D. Dykes.
Probability of inclusion in paternity testing. The American Association of Blood Banks, 1982.
103. Dausset, J.
Complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme. Flammarion Medicine Science, París. 1981.
104. De Neet, J. H.; Porsius, A. J.; Van Rooy, H. H.
J. Chromatogr. Biomedical Appl. 224: 1.333. 1981.
105. Delves, H. T.
Analyst. 95: 431. 1960.
106. Derobent, L.
Medicine Legale. Ed. Flammarion, París. 1980.
107. Dessey, R. E.
Anal. Chem. 58: 78 A. 1986.
108. Desty, D. H.; Goldup, A.; Whyman, B. H. F.
J. Inst. Petrol. 45: 287-297. 1958.
109. Diego Acosta, A. M.
Sistema HLA: Estructura genética y función. *Tiempos Médicos*. Tomo XXVI. 303. 2: 10. Nov. 1985.

110. Divall, G. B.
Electrophoresis. 6: 249-258. 1985.
111. Divall, G. B.
Advances in Forensic Science. 1. Henry C. Lee, Robert E. Gaensslen Ed. Biomedical Publications. Foster City. California. 1985.
112. Doeli, J. O.; Juhos, A.
Inst. Laboratory. May/June: 15-25. 1980.
113. Douse, J. M. F.
J. Chromatogr. 348: 111-112. 1985.
114. Drost, R. H.; Van Ovijen, R. D.
J. Chromatogr. 310: 193-198. 1984.
115. Duringon, M.; Eliakis, E.
Bull. Med. Leg. 20, 5: 513. 1977.
116. Durlacher *et al.*
Arch. Pathol. 56: 454-461. 1963.
117. Eckers, C.; Skradalat, D. S.; Henion, J.
J. Chromatogr. Sci. 20: 330-337. 1982.
118. Edlund, P. D.
J. Chromatogr. 106: 109-116. 1981.
119. Ezatollah Foronghi, M. D.
J. Forensic Sci. 16: 269-282. 1971.
120. Falkner, F. C.; Sweetman, B. J.; Waton, J. T.
Appl. Spectrosc. Rev. 10: 51. 1975.
121. Farago, A.
J. Chromatogr. 21: 156. 1966.
122. Fasco, M. J.; Cashin, M. S.; Kaminsky, L. S.
Liquid. Chromatogr. 2 (4): 565-575. 1979.
123. Fehn, J. Meggs, G.
J. Anal. Toxicol. 9: 134-139. 1985.
124. Fell, A. F.; Scott, H. P.; Gill, R.; Moffat, A. C.
J. Chromatogr. 273: 3-17. 1983.
125. Fentiman, A. F.; Foltz, R. L.; Kinzer, G. W.
Anal. Chem. 45: 580. 1973.
126. Fenton, J.; Schaffer, M.; Chen, N. W.; Bermes, E. W.
J. Forensic Sci. 25: 314. 1980.
127. Fernández, F. J.; Hilligons, D.
Atomic Spectroscopy, 3, 4. July-August, 1982.
128. Fiori, A.
Advances in Forensic Sciences. 1. Foster City. California. Biomedical Publications. 1985.
129. Fiori, A.
Minerva Medicoleg. 77: 51. 1957.

130. Fiori, A.
Methods of Forensic Sciences. 1. Interscience Publisher, New York. 1962.
131. Fiori, A.
Methods of Forensic Sciences. 1: 243. 1962.
132. Fiori, A.; Marigo, M.; Benziolini, P.
J. Forensic Sci. 8: 419. 1963.
133. Fish, F.; Hayes, T. S.
J. Forensic Sci. 18: 676-683. 1973.
134. Foged, N.
Forensic Sci. Int. 21: 153-159. 1983.
135. Foltz, R. L.
Biomed. Mass. Spectrom. 2: 227. 1975.
136. Food and Drug Administration.
Nonclinical Laboratory Studies. Good Laboratory Practice Regulations. Fed. Regist. 143: 59.986-60.024. 1978.
137. Ford, B *et al.*
J. Anal. Toxicol. 7: 116-118. 1983.
138. Frache, A.
Zacchia. 3: 331. 1939.
139. Fransioli, M. G.; Szabo, E. T.; Sunshine, I.
J. Anal. Toxicol. 4: 46. 1980.
140. Frigerio, A.
Blood, Drugs and others Analytical Challeges. Ellis Horwood, Chichester. 1978.
141. Fukui, Y.; Mata, M.; Takahashi, J.; Matsubara, K.
Forensic Sci. Int. 16: 67-74. 1980.
142. Games, D. E.
Analyt. Proc. 17: 322-327. 1980.
143. Games, D. E.; Laudt, M. S.; Westwood, S. A.; Cocksedge, M. J.
Biomed. Mass. Spectrom. 9: 215-225. 1982.
144. Gasparic, J.; Churacek, J.
Paper and thin-layer Chromatography. Ellis Horwood, LTD. Chichester. 1978.
145. Genge, R. C.
Clin. Chem. 27 (1): 198-199. 1981.
146. Getter, O. A.
JAMA. 77: 1.650. 1921.
147. Gisbert Calabuig, J. A.
Medicina Legal y Toxicología. Fundación García Muñoz. Valencia. 1985.

148. Giusti, A.; Baird, M.; Pascuale, S.; Balasz, I.; Glassberg, J.
J. Forensic Sci. 31: 409-417. 1986.
149. Godden, R. G.; Thomerson, D. R.
Analyst. 105: 1.137. 1980.
150. Golay, M. J. E.; Desty, D. H.
Gas Chromatography. Butterworth, London. 1958.
151. Gómez, F. J.; Rodríguez Chacón, J. M.
VII Jornadas Toxicol. Españolas. Córdoba. 1985.
152. Gómez, J.; Tena, T.; Rodríguez Chacón, J. M.
VII Jornadas Toxicol. Españolas. Córdoba. 1985.
153. Gómez, G.; Tena, T.
Biocongres tox. Sevilla. 1982.
154. Gordons, I.
Forensic Sci. Int. 1: 389-395. 1972.
155. Gorodetzky, C. W.; Kulberg, M. P.
Clin. Pharmacol. Ther. 15: 579. 1974.
156. Gortner, G. V.
J. Forensic Sci. 23: 830-832. 1978.
157. Goudeman, M.; Salmon, Ch.
Immunohematologie et Inmunogenetique. Flammarion. Médecine-
Science. París. 1980.
158. Grob, K.; Grob, G.
J. Chromatogr. 211: 243-246. 1961.
159. Grouchy, J.
Am. Genet. 20: 133. 1977.
160. *Guide for the care and use of laboratory animals.*
Bethesda, M. D.; U.S. Public Health Service. Dept. of Health, Edu-
cation and Welfare. (DHEW Publ. 78-23). 1978.
161. Gundler, E.
Clin. Chem. 14: 1.172. 1968.
162. Harvey, G. J.
Liquid Chromatogr. 9. 7: 1.563-1.576. 1986.
163. Harzer, K.; Barchet, R.
J. Chromatogr. 132: 83-90. 1977.
164. Hayes Jr. P. C.; Pitzer, E. W.
J. Chromatogr. 253: 179-198. 1982.
165. Henion, J. D.
Anal. Chem. 50: 1.687-1.693. 1978.
166. Henion, J. D.; Mayling, G. A.
Biomed. Mass. Spectrom. 7: 115-122. 1980.

167. Herr, J. C.; Woodward, M. P.
J. Forensic Sci. 32: 346-356. 1987.
168. Hirth, L.; Abardanian, D.; Goedde, H. W.
Hum. Heret. 36: 1-5. 1986.
169. Hodnett, C. N.; Eberhardt, R. D.
J. Anal. Toxicol. 3: 187-194. 1979.
170. Holt, S. B.
Ann. Hum. Genetic. 24: 253. 1960.
171. Hopkinson, D. A.; Spencer, N.; Harrys, H.
Nature. 199: 967-971. 1973.
172. Horming, M. G.; Broron, L.; Nowlin, J.
Clin. Chem. 23: 157. 1977.
173. Horning, E. C.; Horning, M. G.; Carroll, D. I.; Dzidic, I.
Anal. Chem. 45: 936. 1973.
174. Horton, D.; Wander, J. D.; Foltz, R. L.
Carbohydr. Res. 36: 75. 1975.
175. Howard, M. G.; Martin, P. D.
J. Forensic Sci. Soc. 9: 28. 1969.
176. Howard, G. A.; Martin, A. J. P.
Biochem. J. 46: 532-538. 1950.
177. Hunt, D. F.
Adv. Mass Spectrom. 6: 517. 1974.
178. Hunt, D. F.; Ryan, J. F.
Anal. Chem. 44: 1.306. 1972.
179. Hurabielle, M.; Maindault, F.; Program, P.; París, M.
Le Pharmacien biologist. Tome XIII, n.º 123. 1979.
180. Incze, Gy.
Zbl. Allg. Path. Anat. 79: 176. 1942.
181. Inst. Nacional de Toxicol.
Método del INT. (Sin publicar.)
182. Inter. Committee for Standarisation in Haematology.
Brit. J. Haemat. 13: 71. 1967.
183. Ishizu, M.
Rep. Nat. Res. Inst. Police. Sci. 26: 75-76. 1973.
184. Iyengar, V.
Anal. Chem. 54: 554 A. 1982.
185. Jain, N. C.; Sueth, T. C.; Budd, R. D.; Olson, B. A.
Clin. Toxicol. 16: 201. 1980.
186. James, A. T.; Martin, A. J. P.
Biochem. J. 50: 679. 1952.

187. James, D. E.
Biomed. Mass. Spectrom. 8: 454-463. 1981.
188. Jatlow, P. I.; Van Dyke, C.; Barash, P.; Byck, R.
J. Chromatogr. 152: 115-121. 1978.
189. Johnson.
J. Chromatogr. 149: 571. 1978.
190. Joluo, B. L.; Munson, B.
Biomed. Mass Spectrom. 1: 86. 1974.
191. Jover Zamora, J. M.
Historia Universal de la Medicina, T. VI. Salvat, Barcelona. 1976.
192. Kabra, P. M.; Mc Donald, D. E.; Marton, L. J.
J. Anal. Toxicol. 2: 127-133. 1978.
193. Kabra, P. M.; Stafford, B. E.; Marton, L. J.
J. Anal. Toxicol. 5: 177-182. 1981.
194. Käferstein, H.; Stich, G.
Beitr. Gerichtl. Med. 41: 95-101. 1983.
195. Kahn, H. L.; Peterson, G. E.; Schallis, J. E.
At. Absorpt. Newsl. 7: 35. 1968.
196. Kalgert, B. L.; Kirby, B. L.; Vouros, D. P.; Foltz; Hidy, R. L.
B. Anal. Chem, 51: 2.324-2.329. 1979.
197. Kanter, E.; Baird, M.; Shaler, R.; Balazs, I.
J. Forensic Sci. 31: 403-408. 1986.
198. Kasperek, B.
Dtsch. Z. Gerichtl. Med. 27: 132-142. 1937.
199. Katsumata, Y.; Oya, M.
Advances in Forensic Sciences. 1. Lee Gaenssten Ed. Biomedical Publications. Foster City California. 1985.
200. Katsumata, Y.; Oya, M.; Suzuki, O.; Kido, A.; Yada, S.
Acta. Crim. Med. Leg. Jpn. 44: 169-172. 1978.
201. Katsumata, Y.; Sato, M.; Tamaki, K.
J. Forensic Sci. (En imprenta.)
202. Kelly, R. W.
J. Chromatogr. 54: 345. 1971.
203. Kerber, J. D.; Fernández, F. J.
At. Absorpt. Newsl. 1.078. 1971.
204. Kim, C.; Kats, T.
J. Anal. Tox. 8: 135-137. 1984.
205. Kind, S. A.
Nature. 187: 789. 1960.
206. Kirkbright, G. F.
Atomic Absorption Spectroscopy in Elemental Analysis of Biolo-

- gical Materials: Currents Problems and Techniques with Special References to Trace Elements.* IAEA, Vienna 1980.
207. Kirk, P. L.
Crime Investigation. Wiley. New York. 1974.
 208. Kleine, J. O.
Clin. Chem. Acta. 82: 193. 1978.
 209. Knapp, D. R.; Gaffney, T. E.
Clin. Pharmacol. Ther. 13: 308. 1972.
 210. Komiskey, H. L. *et al.*
J. Anal. Toxicol. 9: 131-133. 1985.
 211. Krien, P.; Devant, G.; Hardy, M.
J. Chromatogr. 251: 129-140. 1982.
 212. Kringsholm, B.; Thomsem, J. L.; Henningsen, K.
J. Forensic Sci. 9: 117-126. 1977.
 213. Krishnan, S. S.
J. Forensic Sci. 19. 2: 351-356. 1974.
 214. Krull, I.; Swartz, M.; Driscoll, J. L.
Advances in Chromatography. Marcel Dekker, New York, 1984.
 215. Kvalvag *et al.*
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60: 911. 1977.
 216. Lafleur, A. L.; Morrisean, B. D.
Anal. Chem. 52: 1.313-1.318. 1980.
 217. Laín Entralgo, P.
Historia Universal de la Medicina. T. VII. Salvat, Barcelona. 1976.
 218. Lapas, N. T.; Fredenburg, M. E.
J. Forensic Scienc. 26: 564-569. 1981.
 219. Lartigue, G.
Accidents par sumersion et submersion. Enc. Med. Chir. Int. París. 1966.
 220. Lattes, L.
Individualitat des Blutes. Ed. Verlag Julius Springer. Berlin, 1925.
 221. Lawson, A. M.; Draffen, G. H.
Prog. Med. Chem. 12: 1. 1975.
 222. Lawton, M. E.; Sutton, J. G.
J. Forensic Sci. Soc. 22: 361-366. 1982.
 223. Law, B.
J. Forensic Sci. Soc. 21: 31-39. 1981.
 224. Law, B.; Gill, R.; Moffat, A. C.
J. Chromatogr. 301: 165-172. 1984.
 225. Lee, M. G.; Millard, B. J.
Biomed. Mass. Spectrom. 2: 78. 1975.

226. Lee, H. C.; Gaeslen, R. E.
Advances in Forensic Sciences. Vol. 1. Ed. Bron. Publ. California, 1985.
227. Lincoln, P. S.; Dood, B. E.
Med. Sci. Law. 8: 288. 1968.
228. López Gómez; Gisbert.
Tratado de Medicina Legal. Edit. Saber. Valencia. 1970.
229. Lora Tamayo, C.
IV Jornadas Toxicológicas Españolas. León, 1981.
230. Lora Tamayo, C.
IV Jornadas Toxicológicas Españolas. León, 1981.
231. Lora Tamayo, C.; Rams, M. A.; Chacón, J. M. R.
J. Chromatogr. 374: 73-85. 1986.
232. Lora Tamayo, C.; Tena, T.; Tena, G.
J. Chromatogr. 422: 267-273. 1987.
233. Lulliford, B. J.
J. Forensic Med. 6: 112-115. 1959.
234. Lundquist, F.
Methods Forensic Sciences. Interscience New York. 1963.
235. Lund, W.; Thomassen, Y.; Doble, P.
Anal. Chim. Acta. 93: 53. 1977.
236. Lurie, I.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60: 1.035-1.040. 1977.
237. Lyter, A. H.
J. Forensic Sci. 27: 154-160. 1982.
238. L'vov, B. V.
Atomic Absorption Spectrochemical Analysis. Adan Higer, London. 1970.
239. Mc Fradden, W. H.
Analyt. Proc. 19: 258-262. 1982.
240. MacFarlane, R. D.; Torgerson, D. F.
Science. 191: 920. 1976.
241. Machledt, W.; Otto, J.; Wachliz, E.
J. Methods Enzymol. 47: 210. 1977.
242. Maehly, A.; Strimberg, L.
Chemical Criminalistics. Ed. Springer, Berlin. Heildelberg, New York. 1981.
243. Mallcock, R. R.
J. Forensic Sci. 19: 172-174. 1974.
244. Manning, D. C.
At. Absorpt. Newsl. 14: 99. 1975.

245. Manno, B. R.; Manno, J. E.
J. Anal. Toxicol. 2: 257-261. 1978.
246. Martin, A. J. P.; Syunge, R. L. M.
Biochem. J. 35: 91. 1941.
247. Mass Spectrometry Data Centre.
The Eight Peak Index of Mass Spectra. Her Majesty Stationary Office. London. U. K. 1974.
248. McFadden, W. H.; Schwarts, H. L.; Evans, S.
J. Chromatogr. 122: 389. 1976.
249. McLafferty, F. W.
Interpretation of Mass Spectra. 2nd. Ed. W. A. Benjamin, Inc. Reading, Massachusetts. 1973.
250. Mc Auliffe, J.; Sherwin, A. L.; Lepick, I. E.
Neurologic. 27: 409. 1977.
251. Michalek, R. W.; Rejent, T. A.
J. Anal. Toxicol. 4: 215. 1980.
252. Middleditch, B. S.; Desiderio, D. M.
Anal. Chem. 45: 806. 1973.
253. Milne, G. W. A. Ed.
Mass Spectrometry, Techniques and Applications. Interscience. New York, 1971.
254. Miller, J. M.; Tucker, E.
Int. Laboratory. May-June; 16-33. 1979.
255. Missen, A. W.; Lewin, J. F.
Clin. Chem. Acta. 53: 389. 1974.
256. Monaco, F.; Mutani, R.; Mastropolo, C.; Tandin, M.
Epilepsia. 20: 705. 1979.
257. Mueller, B.; Gorgs, D.
Dtsch. Z. Gerichtl. Med. 39: 715-725. 1949.
258. Mule, S. J.; Bastos, M. L.; Lokofsky, D.
Clin. Chem. 20: 243. 1974.
259. Muller, M.; Fontayne, G.; Muller, P.; Donazzan, M.
Ann. Med. Leg. 37: 277. 1957.
260. Muller, M.; Fontaine, G.; Muller, P.; Gourguechon, A.
Medicine Sci. Law. 1: 378. 1961.
261. Munson, M. S. B.; Field, F. H.
J. Am. Chem. Soc. 88: 2.621. 1966.
262. Murakany, F. J.
J. Chromatogr. 178: 393-399. 1979.
263. Murch, R. S.; Budowle, B.
International Symposium on the Forensic Applications of Electrophoresis. FBI Academy. Onantico. VA. 25-29. June 1984.

264. Narasimachari, N.
J. Chromatogr. 225: 189-195. 1981.
265. Narasimachari, N.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 56: 36. 1974.
266. Nelsen, J.; Cook, A.
J. Agric. Food Chem. 61: 15. 1978.
267. Nelson, K.; Bowers, L.
Clin. Chem. 29: 1.175. 1983.
268. Newall, P.
5th International Meeting of Forensic Sciences. Toronto. Canada. 1970.
269. Newall, P. J.
Advances in Forensic Science. Henry C. Lee. Robert E. Gaensslen Editors. Biomedical Publications. Foster City. California. 1985.
270. Newton, J. T.
J. Forensic Sci. 26: 302-312. 1981.
271. Nickolls, L. C.; Pereira, M.
Med. Sci. Law. 2: 172. 1962.
272. Nuesne, E. E.
J. Forensic Sci. 22: 596-598. 1977.
273. Nuzzo, F.; Cavierel, F.; Caviezel, F.
Lancet II. 260. 1963.
274. Oliver, W. T.; Funnel, H. S.
Anal. Chem. 33: 439. 1961.
275. Orfila, M.
Tratado de Medicina Legal. Madrid, 1847.
276. Ortega, M.; Vallejo, E.
Anales de la Real Academia de Farmacia. 4-5. 1966.
277. Oshima, M.; Inque, E.; Hara, M.
Forensic Sci. Int. 20: 277-286. 1982.
278. O'Callaghan, J.
Compendio de Derecho Civil. Tomo IV. Ed. de Derecho Reunidas. Madrid, 1983.
279. Paris Conference, 1971. *Standardization in Human Cytogenetics Birth Defects.* The National Foundation NY. Vol. 8. 7. 1972.
280. Parker, E.; Voyksuer, R. D.; Tondeur, Y.
J. Forensic Sci. 27: 495-505. 1982.
281. Parker, G. B.; Koss, R. F.; Utter, J.; Mayes, B. A.; Endelson, J.
J. Pharm. Sci. 71: 932-934. 1982.
282. Paschal *et al.*
J. Environ. Sci. Health. B. 13: 105. 1978.

283. Pastorello, L.; Tolentino, D.
J. Chromatogr. 233: 398-403. 1982.
284. Penrose, L. S.
Nature. 4.871: 933-938. 1963.
285. Pereira, M.
Med. Sci. Law. 3: 268. 1963.
286. Pflieger, K.; Maurer, K.; Weber, A.
Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons and their Metabolites VCH. Weimheim, 1985.
287. Pieper, G. R.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 22: 167. 1979.
288. Pileiro.
Rev. de Med. Legal. 7: 3-7. 1927.
289. Placzek.
Loc. cit. en DALLA VOLTA, A. *Trattato di Medicina Legale.* Ed. S. E. L. Milano, 1938.
290. Plotczyck, L. L.
J. Chromatogr. 240: 349-360. 1982.
291. Plotczyck, L. L.; Carson, P.
J. Chromatogr. 257: 211-226. 1983.
292. Popielski, B.
Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences et des Lettres. Class de Medicine. 1949.
293. Pranita, P. A. F.; Milzoff, J. R.; Stolman, A.
J. Forensic Sci. 19: 917. 1974.
294. Predmore, D. B.; Christian, G. D.
J. Forensic Sci. 22: 481-489. 1977.
295. Price, W. J.
Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption. Heyden, London, 1979.
296. Raffeo, A. P.; Denisc, K.; Foltz, R. L.
J. Chromatogr. 126: 717-722. 1976.
297. Rams, M. A.; Chacón, J. M. R.
VI Jornadas Toxicológicas Españolas. Córdoba, 1985.
298. Redding; Pearson.
J. Amer. Med. Ass. 178, n.º 2. 1969.
299. Regueiro, J. R.; Arnaiz-Villena, A.
J. Forensic Sci. 29: 430-435. 1964.
300. Relandt, D. J.; Triuler, W. A.
J. Forensic Sci. Soc. 20: 111-120. 1980.

301. Revenstorf.
Ujschr Gerichtl Me. XXVII: 274-299. 1904.
302. Robbins, W. B.; Carusso, J. A.
Anal. Chem. 51: 889 A. 1979.
303. Roboz, J.
Adv. Clin. Chem. 17: 109. 1975.
304. Rodgers, R.; Crowl, C. P.; Eimstad, W. M.
Clin. Chem. 24: 95. 1978.
305. Rodkey, F. L.; Hill, J. A.; Pitts, J.; Robertson, F. R.
Clin. Chem. 25: 1.389-93. 1979.
306. Rodríguez Fernández, A.; Rodríguez Chacón, J. M.
VII Jornadas Toxicológicas Españolas. Córdoba. 1985.
307. Rodríguez, A.; Rodríguez, J. M.; Gómez, J.
VII Jornadas Toxicológicas Españolas. Córdoba. 1985.
308. Rodríguez, A.; Rodríguez, J. M.; Gómez, J.
XIII Jornadas Españolas de Medicina Forense. Valencia. 1987.
309. Roger, M.; Smit, T. G.; Hurdley, R.; Gill, R.; Moffat, A. C.
J. Chromatogr. 355: 75-86. 1986.
310. Ronalkni, S. B.; Rowe, J. A.
Lancet. 1. 323-324. 1973.
311. Rosenthal, A. F.; Vargas, M. G.; Klass, C. S.
Clin. Chem. 22: 1.899. 1976.
312. Saferstein, R.
Criminalistics. Prentice Hall Inc. USA. 1981.
313. Saferstein, R.; Chao, J. M.; Manura, J.
J. Forensic Sci. 19: 463. 1974.
314. Saundus, W. B.
Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose, Company Philadelphia. 1963.
315. Scott, R. P. W.; Kucera, P.; Monroe, J.
J. Chromatogr. 186: 475. 1979.
316. Scott, R. P. W.; Kucera, P.
J. Chromatogr. 169: 52. 1979.
317. Scharper, S. L.; Cooreman, W. M.; Blomme, W. J.; Laekeman, G. M.
Clin. Chem. 22: 733. 1976.
318. Schneider, V.
Forensic Sci. Abst. 7: 166. 1981.
319. Scherman, J. M.; Hoellinger, H.; Sounier, M.; Moffelt, J. Nguyen-Hoang-NAU.
J. Chromatogr. 196: 342-346. 1980.

320. Schottlelious, D. D.
Raven Press, New York, 95. 1978.
321. Schötz, H.
Benzodiazepines. Springer-Verlag. Berlin, 1982.
322. Schwar, T.
J. Forensic Sci. 411-417. 1972.
323. Schweizer, K.; Wichard, H.; Brechbühler, T.
Clin. Chem. Acta. 90: 203-208. 1978.
324. Seignalet, L.
J. Genetique Humaine. 31: 181-190.
325. Sensabaugh, G. F.
J. Forensic Sci. 24: 346-365. 1979.
326. Sensabaugh, G. F.
J. Forensic Sci. 23: 106-115. 1978.
327. Seul, L.; Kanter, Leo.
J. Chromatogr. 234: 201-208. 1982.
328. Shaler, R. C.
J. Forensic Sci. 27: 231-235. 1982.
329. Simonin, C.
Medicina Legal Judicial. Ed. Jims. 1962.
330. Siracusa, V.
Arch. Antrop. Crim. 43: 362. 1923.
331. Slighton, E. F.
J. Forensic Sci. 23: 292. 1978.
332. Sami Selim.
J. Chromatogr. 136: 271-277. 1977.
333. Spriehler, V. R.; Reed, D.; Gravey, R. H.
J. Forensic Sci. 20: 647. 1975.
334. Staiger, M. A.; Nguyen-Dinh.; Churchill II, F. C.
J. Chromatogr. 225: 139-149. 1981.
335. Stanley, P. E.; Peikert, M. R.
Epilepsia. 19: 265. 1978.
336. Steenhout, A.; Pourtois, M.
Brit. J. Ind. Med. 38: 297-303. 1981.
337. Strombaugh, P. M.; Kearuy, J. J.
J. Forensic Sci. 23: 94-105. 1978.
338. Strother, A.
J. Gas Chromatogr. 6: 111. 1968.
339. Stryzowskic.
Therap. Zeitung. Throng. Ref. 165. 1912.
340. Stubbing, N. A.; Newall, P. J.
J. Forensic Sci. 30: 604-614. 1985.

341. Sumithies, O.
Biochem. J. 61: 629. 1955.
342. Sutton, J. G.
J. Forensic Sci. 24: 189-192. 1979.
343. Sutton, J. G.; Burgess, R.
Vox Sanguinis. 34: 97-103. 1978.
344. Suzuki, O.; Oya, M.; Matsumoto, T.; Yada, S.
J. Forensic Sci. 25: 99-102. 1980.
345. Suzuki, O.; Matsumoto, T.; Oya, M.; Asano, M.
J. Forensic Sci. 26: 410-415. 1981.
346. Suzuki, O.; Oya, M.
Advances in Forensic Sciences. 1. Biomedical Publications. Foster City, California. 1985.
347. Swann, H. G.; Sparfford, N. R.
Biol. Med. 9: 356-382. 1949.
348. TIAFT.
Thin Chromatografic Rf Values of Toxicologically Relevant Substances on Standarized System. VCH. Verlagsgesellschaft. 1987.
349. Takeda, K.; Hiraiwa, K.
Tohoku J. Exp. Med. 147: 267-272. 1985.
350. Tamaska, L.
Dtsch. Hetil. 16: 509. 1949.
351. Tamaska, L.
Dtsch. Z. Gerichtl. Med. 51: 398-403. 1961.
352. Tena, G.
Toxicología, Jurisprudencia. 1951.
353. Tena, G.
Mesas Redondas de Investigación de Fármacos. LAEF. Madrid. 1982.
354. Tena, G.
Encuentro Nacional sobre Investigación de Fármacos. Madrid. 1984.
355. Tena, G.; Gómez, J.; Tena, T.
Bicongrestox. Sevilla, 1982.
356. Tena, G.; Rams, M. A.; Lora Tamayo, C.
1^{er} Congreso Iberoamericano de Toxicología. Sevilla. 1982.
357. Tarazowa, K.; Takatori, T.
Forensic Sci. Inter. 16: 63-66. 1980.
358. Thomas, F.; Van Hecke, W.; Timperman, J.
Ann. Med. Leg. 4: 369-373. 1962.

359. Tongtanvch Anukarahanonta.
J. Chromatogr. 275: 387-393. 1983.
360. Tsalev, B. L.; Zaprianov, Z. K.
Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice. Vol. 1: 55.
361. Tsalev, D. L.; Petrov, I.
Anal. Chim. Acta. 111: 155. 1979.
362. Tsuge, S.; Hirata, Y.; Takeuchi, T.
Anal. Chem. 51: 166-169. 1979.
363. Valero, C.; Pérez Cao, A.; Azparren, J.; Martín Castillo, A.; Cano, P.; Sancho, M.
XIII Jornadas Españolas de Medicina Forense. Valencia, octubre 1987.
364. Vals, A.
Introducción a la Antropología. Ed. Labor Universitaria. Barcelona. 1980.
365. Van der Slooten, E. P.; Van der Helm, H. J.
Clin. Chem. 22: 789. 1976.
366. Vanhaelen, J.
J. Chromatogr. 129: 397-402. 1976.
367. Vessel, D. V.; Modglin, F. R.; Webster, L. G.
J. Forensic Sci. 12: 554-557. 1967.
368. Villalain, J. D.; Muñoz Tuero; Moya Pueyo.
Rev. Esp. Med. Legal. 10. 11: 67.
368. Villalain, J. D.; Muñoz Tuero, L.; Moya Pueyo, V.
Rev. Esp. Med. Legal. 10. 11:67
369. Villanueva, E.; López Jorge, J.; Gisbert, J. A.; Castilla, J.
Acta. Med. Leg. Soc. 24: 581-599. 1975.
370. Wallace, J. E.; Herrys, S. C.; Peek, M. W.
Anal. Chem. 52: 1328-1330. 1980.
371. Waller, G. R. Ed.
Biochemical Application of Mass Spectrometry.
Interscience, New York, 1972.
372. Watts, R. R.; Storherwe, R. W.
J. Ass. Offic. Anal. Chem. 52: 513. 1969.
373. Werner, U.; Spitz, M. D.
Arch. Pathol. 71. Junne 1961.
374. Westwood, S. A.
Electrophoresis. 6: 498-503. 1985.
375. West, A. R. Ed.

- Advances in Mass Spectrometry*. Vol. 6. Applied Sciences Publisher.
Barking, Essex. U. K. 1974.
376. Whay, G.
J. Chromatogr. II. 479-486. 1963.
Whithead, P. M.; Divall, G. B.
Clin. Chem. 19: 762-765. 1973.
378. Williams, D. H.; Howe, I.
Principles of Organic Mass Spectrometry. McGraw-Hill, London, 1972.
379. Williams, D. L.; Moffat, A. C.
J. Chromatogr. 186: 596-603. 1979.
380. Williams, D. L.; Moffat, A. C.; King, L. J.
J. Chromatogr. 155: 273-283. 1978.
381. Windham, E. S.
J. Ass. Offic. Agr. Chem. 52: 1273. 1969.
382. Winlein, M.
Practice of High Performance Liquid Chromatography.
H. Engelhart. Springer - Verlag. Ed. Berlin, 1986.
383. Yalou, R. S.; Berson, S. A.
Nature. 184: 1648-1649. 1960.
384. Zeenw, R. A.; Westenberg, H. G. M.
J. Anal. Toxicol. 2: 229. 1978.

**DISCURSO
DE
CONTESTACION**

Por el Académico de Número Excelentísimo Señor Don Emilio Fernández-Galiano Fernández.

Excmo. Sr. Director,
Excmos. Sres. Académicos,
Señoras y Señores:

Algunas personas opinan que las Academias son unas instituciones anacrónicas, formadas por cuadros envejecidos y apoltronados, indiferentes ante los problemas del mundo que les rodea e incapaces de una auténtica renovación debido, entre otras cosas, a que sus nuevos miembros son elegidos mediante sistemas que conducen a una persistente endogamia. Y tratan de justificar sus pretendidas aserciones presentando ejemplos aislados siempre fáciles de hallar en colectividades relativamente numerosas. Por desgracia, las personas que así piensan no suelen frecuentar nuestros salones, puesto que si así lo hicieran en un día tan señalado como el de hoy quedarían sorprendidas al comprobar de qué manera se debilitaban sus argumentos profundizando un poco sobre el simbolismo del acto al que asistimos. Puesto que hoy nos hemos congregado para la toma de posesión como Académico de Número del Excmo. señor don Guillermo Tena Núñez, que ha sido elegido por esta Real Academia por sus excelentes méritos pero, al propio tiempo, para cubrir el área importantísima de la Toxicología forense, que creo que por primera vez va a estar representada entre nosotros, y para reforzar la representación de la industria farmacéutica, presente aquí desde hace largos años pero que, por razones biológicas, se ha ido debilitando poco a poco. De esta manera, nuestra Academia, atenta a la evolución de la aplicación de los conocimientos científicos, llama a compartir sus tareas a una persona que las realizará, sin duda, con una visión moderna, actualizada, muy a tono con los tiempos de participación y comunicación en que vivimos.

Me honró hace algunas semanas la Junta de Gobierno de esta Real Academia con el encargo de contestar en su nombre al discurso de ingreso del recipiendario y acepté muy gustoso por dos motivos: por estar convencido de que nuestra Corporación se enriquece considerablemente al integrar en sus filas a un hombre tan singular en muchos aspectos, y por tener la oportunidad de dar rienda suelta a mis profundas vivencias, pues, en cierto modo, la vida del académico que hoy recibimos ha estado muy vinculada a la mía, por haber sido circunstancialmente compañero de juegos en la niñez, habiéndose mantenido desde entonces nuestra amistad, aunque hayamos seguido caminos profesionales bien diferentes que a él le han conducido al éxito fulgurante y a mí a un modesto funcionariado docente. Por ello, cumplo el encargo no sin cierta emoción, pues con los años se va uno haciendo más sensible hacia determinados recuerdos.

El doctor don Guillermo Tena encaminó sus estudios universitarios hacia la carrera de Farmacia, obteniendo su licenciatura en 1944, doctorándose años después. Era hijo del doctor don José Tena Sicilia, prestigioso profesional de la medicina forense, y ello, posiblemente, condicionó su vocación por los mismos caminos, por lo que también terminó su licenciatura en Medicina, que había de complementar su formación en la línea de trabajo elegida.

Comenzó su actividad forense en la Escuela de Medicina Legal de la Universidad Complutense de Madrid, ingresando años después en el Instituto Nacional de Toxicología, primeramente como director del Laboratorio de Sevilla y, más tarde, del de Madrid, alcanzando la categoría de Director General del Instituto, cargo que desempeña en la actualidad. Es lógico, pues, que en el transcurso de una vida dedicada a la Toxicología forense haya sido acreedor de numerosas distinciones a nivel nacional e internacional, siendo miembro honorífico de diversas instituciones, en especial de Iberoamérica.

Su dedicación al campo de la investigación toxicológica se completa con otras actividades en forma de cursos, publicación de numerosos trabajos de investigación, así como diversos libros, además de muchas conferencias impartidas y asistencias a congresos. Entre los nombramientos y distinciones de que ha sido objeto figura el de Académico correspondiente de esta Real Academia de Farmacia.

Pero el doctor Tena ha desarrollado también una notable actividad en el campo profesional farmacéutico, y esta es una segunda pero importante faceta de su personalidad. Además de ejercer durante algún tiempo en una oficina de farmacia, desarrolla una activa labor en el campo de la industria farmacéutica, fundando varias sociedades dedicadas a la producción de medicamentos, contribuyendo así notablemente a esa tarea que hoy día tanto se valora, la creación de puestos de trabajo.

Hemos escuchado el discurso del doctor Tena en el que ha expuesto con todo detalle las técnicas de uso más frecuente en la actualidad para investigaciones en toxicología y en medicina legal y no he podido por menos que recordar el viejo Instituto de Toxicología de mi época estudiantil, situado en una de las plantas de este mismo edificio, precursor del espléndido organismo actual dotado de suficientes medios materiales y personales, donde se aplican los procedimientos analíticos de más auténtica actualidad.

Aunque toda la historia de la humanidad se ha caracterizado por un relevo de generaciones, herederas todas ellas de los logros y descubrimientos de las anteriores, lo que ha permitido un progreso continuo, dado el carácter uniformemente acelerado del proceso en virtud del cual cada generación supera a las anteriores, creo que la generación actual ha conocido un desarrollo inédito en las anteriores y que, probablemente, será excedido por la próxima. Esto nos ha hecho pasar en una sola vida de la radio de galena a las complejas transmisiones desde sondas espaciales situadas a muchos millones de kilómetros, por poner un ejemplo que a diario se nos presenta. En el terreno de lo analítico, el discurso que acabamos de escuchar nos muestra el paso de la utilización de una química ya anticuada (lo que el nuevo académico llama toxicología «de tubo de ensayo») al empleo de las técnicas instrumentales más modernas, como espectrofotometría, cromatografía de diversos tipos o espectrometría de masas.

Como no podía por menos de suceder, esta evolución de las investigaciones forenses ha seguido en España los mismos caminos que otras muchas ciencias que despegaron en el siglo XVIII, especialmente en la época de la Ilustración, para sufrir una detención en su avance en el XIX y proseguir su desarrollo en el XX, adquiriendo así un retraso evidente con respecto al mundo germánico y anglosajón. No obstante, esto no quiere decir que no existieran figuras de prestigio que en la mayoría de los casos se debatieron entre grandes dificultades para poder desarrollar una labor eficaz.

Esto sucedió con Mateo José Buenaventura Orfila, mahonés, procedente de una familia de comerciantes, que estudió medicina en Valencia y Barcelona y que después pretendió estudiar química en Madrid con Proust, que en aquellos tiempos (1806) dirigía el laboratorio fundado por el rey Carlos IV. La circunstancia de que el químico francés había regresado ya a París movió a Orfila a marchar a Francia, donde se doctoró, llegando a ocupar una cátedra de química y a ser nombrado presidente de la Academia de Medicina, después de haberse nacionalizado ciudadano francés. Todo ello en una época en que España libró una guerra por la independencia y sufrió varias convulsiones políticas, lo que nos hace pensar que si Orfila hubiese permanecido en su país de origen

dudosamente hubiera llegado a alcanzar su merecida fama en investigación toxicológica.

También Pedro Mata, contemporáneo de Orfila, aunque más joven, tuvo que emigrar á Francia por motivos políticos y aprovechó la emigración para trabajar con él, regresando después a nuestro país, donde obtuvo la cátedra de Medicina Legal de la Universidad de Madrid, siendo el introductor de estas disciplinas en España.

El nuevo académico nos habla del comienzo de la investigación forense en España hace más de un siglo y relata «la larga y difícil gestión» (estas son sus palabras) que precedió a la institucionalización de estos estudios, confirmada mediante la creación de unos laboratorios oficiales, y esto nos da lugar a meditar sobre cuánto esfuerzo, cuántas energías y cuántos sinsabores derrocharían los esforzados varones que libraron la batalla para colocar a España al nivel del resto de las naciones europeas. Si bien en esta rama del saber nos muestra el doctor Tena que a partir de 1960 las cosas han cambiado notablemente y se utilizan modernas técnicas instrumentales, lo que equivale a decir que la Administración se preocupa de proporcionar los medios para ello, no podemos por menos de meditar sobre el tiempo que pierden los científicos en luchas análogas que, si al final se resuelven favorablemente, se considera como bien empleado.

La estructura organizativa española (y también, sirva de consuelo de gentes poco avisgadas, la de muchos otros países), obliga a que el investigador que quiere trabajar tenga que dedicar un porcentaje muy elevado de su tiempo en procurarse los medios que le permitan realizar su trabajo, con lo que su eficacia se ve notablemente disminuida. Una organización racional de la investigación científica aconsejaría no distraer al investigador de su trabajo creativo y estar la administración atenta a suministrarle los medios necesarios para el desarrollo de su labor, pero todo parece indicar que nos encontramos lejos de alcanzar ese ideal por ahora utópico. En cualquier caso, como un ejercicio de distracción, podríamos calcular cuántas horas de su tiempo dedicó el doctor Tena al «papeleo» para elevar la dignidad y el prestigio del organismo que dirige y cuánto hubiera sumado a su trabajo científico si se le hubiese liberado de tan penoso esfuerzo.

Mucho ha evolucionado la investigación toxicológica y, con ella, los laboratorios encargados de realizarla, en los últimos años, pero permítaseme detenerme, para terminar mi intervención, en un aspecto más de esta evolución que aconseja reforzar para el futuro determinadas líneas de investigación. Desde hace ya unos años se está produciendo un movimiento de regreso a la naturaleza por parte de los hombres, lo que está condicionando algunas repercusiones. En primer lugar, un re-

nacimiento de la medicina naturista con un aumento del consumo de plantas medicinales que a veces son recolectadas por los mismos usuarios que las utilizan con criterios exclusivamente intuitivos, lo que puede dar lugar a accidentes cuyo origen tienen que investigar los laboratorios forenses. En segundo lugar, el renacimiento de un sentimiento atávico de interés por la naturaleza y el hacinamiento en el que el hombre vive en la mayoría de las ciudades hace que éste, gracias a los medios técnicos de que dispone, aproveche sus días de asueto para volver a sus orígenes, al medio natural del que procede. A este sentimiento obedece el interés por la segunda vivienda, esta vez en pleno campo, la construcción de casas con chimeneas (método de calentamiento bastante más incómodo y oneroso que una calefacción central) o la recolección más o menos indiscriminada de frutos silvestres, con el peligro que eso muchas veces supone.

A los laboratorios de investigaciones toxicológicas se les presentan cada vez más nuevos casos accidentales, producto de la imprudencia de los hombres que intentan el retorno a la vida natural sin estar tan preparados a afrontarla como lo estaban nuestros antepasados primitivos. Es el precio que el hombre paga por su pretensión de volver, quizá tardíamente, a sus raíces. Es previsible que los problemas que esta actitud plantea se vayan agudizando en el futuro.

El enfrentamiento con estos nuevos problemas es el trabajo diario de los toxicólogos como el nuevo académico, al cual, en nombre de nuestra Corporación, le doy la bienvenida.