

Estudio comparado de los métodos empleados en la estimación del tiempo de deposición de las manchas sanguíneas PRESENTES EN LA ESCENA

EDUARDO H. LEGASPE

Licenciado en Bioquímica-
eduardolegaspe@gmail.com.

MARÍA S. ALDAO

soledad_aldao@hotmail.com

ROSA A. PORTERO ORTIZ

Licenciada en Criminalística-
roan546@hotmail.com

MARIANELA PLACENTE

marianelaplacente@gmail.com

MARÍA S. CAPOSSELA

Perito en documentología-
ma.so.ca@hotmail.com

ANTONELA SEBASTIANELLI

antonelasebastianelli@hotmail.com

RESUMEN

En la escena del crimen, las manchas biológicas desecadas de fluidos, tienen la potencialidad de aportar pruebas que pueden resultar decisivas en la imputación de autoría de delitos.

La sangre por sus características cromáticas y su volumen son frecuentemente halladas.

La estimación del tiempo de deposición permitiría ubicar en tiempo y espacio a los diversos actores que pueden haber participado en los hechos investigados. A pesar de la relevancia de esta determinación, los avances técnicos en esta área del conocimiento no han alcanzado aún la precisión y exactitud suficientes para su aceptación como prueba en un proceso penal.

En el presente trabajo revisamos los métodos analíticos ensayados por los distintos grupos de investigación. Asimismo postulamos futuras líneas de investigación que podrían resultar de utilidad en este campo.

Palabras Clave

Sangre – estimación del tiempo de deposición – criminalística

Introducción

Las Manchas de Sangre Humana son el material biológico que con mayor frecuencia se encuentra en la escena del hecho de una investigación criminal. Desde un punto de vista práctico tienen la potencialidad de aportar datos relevantes. En muchos casos, permiten determinar quién y cómo ocurrieron los hechos. Quién a través de análisis de ADN que permiten la identificación inequívoca de la persona a la que corresponde una muestra biológica.

La biología molecular y sus aplicaciones forenses se desarrollan especialmente luego de los trabajos pioneros de Jeffreys A (Jeffreys, 1985, 1986).

Por otra parte, y en virtud que la volemia en el humano es de aproximadamente 5 litros, muchas veces el “pattern” de huellas hemáticas dejadas es informativo de cómo ocurrieron los hechos (Larkin, 2013).

Para completar la investigación sería de importancia determinar también cuando las máculas hemáticas fueron depositadas y la estimación de la edad de la persona a la que corresponde ese fluido biológico hallado (Cho, 2014; Anderson, 2005). Estos dos últimos temas muy relevantes en la investigación criminal, estimación del tiempo de deposición de la mácula hemática y de la edad de la persona a la que corresponde la muestra son áreas del conocimiento criminalístico que aun se encuentran en etapa de investigación por los diferentes grupos científicos.

Conocer el tiempo transcurrido desde la deposición hasta el hallazgo de la misma permitiría establecer la data de los hechos, reconstruir históricamente los mismos y enriquecer la investigación.

A pesar que este tema es estudiado hace más de un siglo, la complejidad analítica y la enorme cantidad de variables ambientales que rodean a la evidencia, no han permitido superar la etapa experimental y en consecuencia aportar una evidencia aceptable en un proceso judicial.

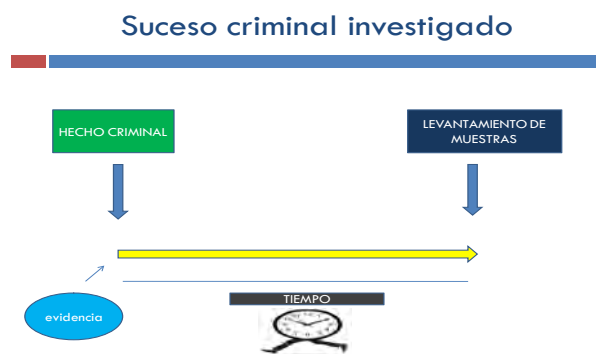


Figura 1: Suceso criminal investigado (propia de los autores)

Principales factores que afectan la estimación de la data de las manchas de sangre

Tiempo entre la deposición y la toma del material

Características del soporte sobre el que la mancha es depositada.

Humedad ambiental y del soporte

Temperatura ambiental y del soporte

Luz y radiaciones electromagnéticas en general que irradian el material

Contaminación por agentes químicos o microbiológicos

Contenido en el cuerpo in vivo de xenobióticos y drogas naturales que pueden afectar la cinética propia de los elementos celulares normalmente presentes

Diferentes enfermedades que puedan modificar directa o indirectamente la composición normal de la sangre

Volumen de la muestra

Objetivo de este trabajo

Revisión histórica de los métodos empleados para estimar el tiempo de deposición de una muestra hemática, desde 1900 hasta la actualidad.

Comparar las distintas técnicas empleadas estableciendo sus características de precisión y utilidad diferencial.

Repasar posibles vías de investigación futura.

Metodología empleada

Revisión bibliográfica de publicaciones arbitradas presentes en las bases de datos de la Biblioteca del Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación

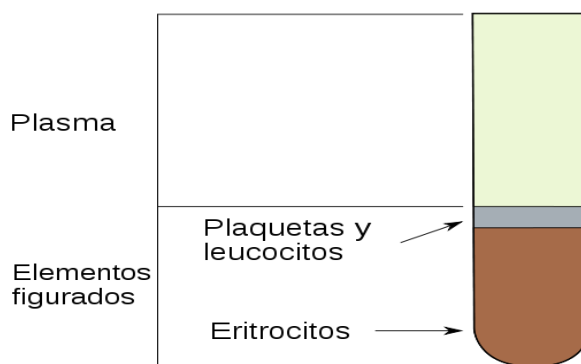


Figura 2 : Componentes de la sangre

Las primeras investigaciones

Los primeros resultados reportados datan de principios del siglo XX.

Las características del instrumental con el que se contaba no permitía establecer relaciones profundas entre materia – energía y por lo tanto su fundamento principal era el cambio de color de la sangre por la oxidación del hierro contenido en los glóbulos rojos

Louis Tomellini de la Universidad de Génova, Italia, se encuentra entre los primeros en ocuparse de este tema. (Tomelli, 1907). Posteriormente Leers describe el envejecimiento por cambios en el espectro de la Hb. (Leers, 1910). En 1960, Patterson con el empleo de espectros de reflectancia de manchas de sangre fue el primero en postular que los cambios de color de las manchas de sangre dependen de las condiciones del medio ambiente. (Patterson, 1960).

Técnicas basadas en cambios de los componentes de los glóbulos rojos

Entre las primeras técnicas de este tipo empleadas, fue la High performance liquid chromatography (HPLC). Esta es un tipo de cromatografía utilizada frecuentemente en bioquímica en separaciones analíticas con fines identificatorios y preparativos.

Con un detector adecuado, permite determinar y cuantificar los componentes individuales de una mezcla.

En el caso de la investigación de los componentes de la sangre, es aplicable a la separación de la hemoglobina (Hb) presente en los glóbulos rojos y sus derivados. La cuantificación de los productos de la degradación de la Hb por HPLC en las manchas de sangre puede ser utilizada como un marcador para la estimación de la antigüedad de las manchas de sangre (Inoue, 1992).

El detector mide la densidad óptica a varias longitudes de onda.

Una longitud de onda conveniente para detección de proteínas en las manchas de sangre es aquella que emplea el rango del espectro de los 220 nm (ultravioleta). Inoue detecta la presencia de una proteína llamada X, que no se encuentra en condiciones in vivo, y establece que ésta podría ser un predictor adecuado de la antigüedad de las manchas de sangre.

El área del pico de proteína X aumentaría con el envejecimiento del material.

H. Inoue et al relaciona el área debajo del pico de 'X' y la del pico de Hb.

Este cociente es 0 para sangre fresca y aumenta a 0,3 para las manchas de sangre almacenadas durante 52 semanas en la oscuridad en 37 grados C.

Espectrometría en el rango visible del espectro

El color de una mancha de sangre cambia con el tiempo del color rojo al marrón, lo que sugiere que la cuantificación de color de las manchas de sangre por métodos de espectroscopia pueden ser un medio idóneo para la determinación de la antigüedad.

Erin K. Hanson¹, Jack Ballantyne (2010) han desarrollado un método para la estimación del Tiempo desde la Deposición de Sangre utilizando el análisis espectrofotométrico UV-VIS de la Hb que se basa en su característica oxidación química (Hanson, 2010).

Realizan un estudio detallado de la banda de Hb Soret ($I_{max} = 412 \text{ nm}$) como estimador de la antigüedad del material. Los autores encuentran diferencias entre las manchas depositadas a diferentes tiempos. (minutos, horas, días y semanas) correlacionan sus hallazgos con la temperatura y humedad relativa del ambiente.

Todos estos enfoques operan en la parte visible del rango espectral (450–700 nm), puesto que el cambio de color de rojo a marrón se produce principalmente en este rango.

Análisis basados en mediciones en el InfraRojo Cercano (NIR)

Además de los estudios realizados en la parte visible del espectro óptico, también puede obtenerse información relevante en la región NIR del espectro (Bontonjic, 2010).

Esta línea de investigación se ha explorado recientemente para discriminar entre las manchas de sangre por proyección de imagen hiperespectral en el InfraRojo (IR) (Brooke, 2010).

El análisis de los espectros NIR es más complicado que los realizados en la región visible fundamentalmente porque los espectros no sólo reflejan las características espectrales de derivados de la Hb, sino también de agua, los lípidos, y diversas proteínas.

La pérdida de agua juega un papel importante para establecer el cambio inicial en los espectros.

Métodos que emplean electrodos de oxígeno.

La cantidad de oxihemoglobina (HbO_2) en la sangre in situ se puede establecer mediante el uso de electrodos de oxígeno disolviendo las manchas en una solución salina y realizando la medición (Matsuoka, 1995).

Este grupo de investigación han analizado el envejecimiento de las manchas durante 10 días. A temperatura ambiente, el decaimiento de HbO_2 es rápido inicialmente, pero disminuye después de unas horas. También encuentra una relación directa del decaimiento de la concentración de HbO_2 a altas temperaturas.

Resonancia electrónica paramagnética (EPR)

La desnaturalización de la Hb en la sangre seca es regida por un cambio de estado de los iones de hierro por oxidación. Estos cambios pueden ser medidos por EPR (Miki,1987).

En las muestras analizadas se observan cuatro señales EPR. Estas señales representan diferentes estados electrónicos del hierro de la Hb.

La HbO₂ es una molécula diamagnética y por lo tanto no tiene ningún espectro EPR.(Marrone,2009).

La intensidad de la señal EPR es función de la antigüedad de la mancha de sangre.

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es un tipo de microscopía de alta resolución. Ésta puede determinar la elasticidad, flexibilidad y la resistencia a la tracción de los glóbulos rojos (Dulinska, 2006).

Las condiciones y estudios que se realicen en general sobre muestras de sangre y en particular el estudio de la Hb debe contemplar el hecho que el sistema homeostático del cuerpo humano genera un ambiente controlado en ciertos parámetros físicos más o menos estables, condición esta que no ocurre in vitro donde la muestra y la Hb se verán sometidas a bruscos cambios.

La elasticidad de los GR aumenta in vitro.

Se encontró que el volumen de la célula se mantiene constante después de la deposición, mientras que la fuerza adhesiva muestra un aumento significativo después de siete días (Wu, 2009).

Técnicas basadas en los glóbulos blancos

Las células sanguíneas de la serie blanca contienen material genético que puede ser extraído del núcleo.

Las moléculas de RNA no es tan estable como la de DNA; por lo tanto, las mediciones de RNA es potencialmente más adecuadas para estudiar la cinética de degradación de la sangre y determinaciones de la estimación e tiempos de deposición (Bauer,2005).

Este último autor utilizó la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (polymerase chain reaction), y demostró la relación entre los diferentes tipos de RNA (mRNA versus rRNA), encontrando que cambia con el tiempo en forma lineal cuando la sangre humana se seca.

La inestabilidad del RNA implica que inducen cambios pequeños de su estructura que pueden ser determinados y correlacionados con el estudio de la antigüedad de las manchas.

Técnicas basadas en compuestos presentes en el plasma sanguíneo

Además de la Hb que ya fuera ampliamente estudiada, otras proteínas presentes

en el plasma pueden resultar de interés en estas investigaciones. Rajamannar (1977) estudió la descomposición de diversas macromoléculas, globulinas, así como albúmina en sangre entre el período que abarca la sangre fresca hasta el año de antigüedad.

La técnica analítica empleada fue la inmunolectroforesis. Se emplean fibras de algodón empapadas con sangre para los análisis.

La presencia y la concentración de globulinas podrían ser un indicador de la antigüedad de la sangre desecada (Rajamannar, 1977).

Estudios más recientes en la búsqueda de la determinación de la antigüedad de las manchas de sangre está utilizando la descomposición de aminoácidos (aa) del plasma de la sangre.

La relación de varios aa puede medirse con racemización del ácido aspártico (Arany, 2011).

Este método también se está aplicando para la datación de los fósiles en la investigación arqueológica.

Esta técnica es particularmente adecuada para el largo plazo, determinaciones de (>10 años), debido a las tasas de decaimiento muy lento en la degradación de este aminoácido.

Otro enfoque reciente, que resulta novedoso, es estimar deposición de rastro con biomarcadores circadianas (Ackermann, 2010).

Mediante el uso de ensayos de inmunoabsorción enzimática se observa el perfil característico de 24 h de dos hormonas, la melatonina (pico de concentración por la tarde noche) y cortisol (pico en la mañana).

Este enfoque es distinto de todos los ensayos analíticos explicados anteriormente ya que no puede determinar la antigüedad de la mancha, sino sólo el tiempo de deposición de rastro dentro de la ciclo de 24 horas.

Sin embargo estos estudios son interesantes, porque abren un nuevo campo para la investigación forense de biomarcadores.

Comparación de técnicas

Las diferentes técnicas descritas pueden compararse en varias formas.

La exactitud, la precisión y la sensibilidad para determinar el tiempo de deposición son tres factores relevantes que deben ser examinados en relación a su posible empleo con bases científicas.

En general se observa que las técnicas son complementarias entre sí, algunas tienen mayor utilidad para cortos períodos luego de la deposición y otras sirven para períodos más prolongados.

Esto sugiere como posibilidad el empleo combinado de más de una técnica con su complementaria.

Bremmer realizó un estudio comparado en relación a la desviación estándar de las técnicas y el tiempo de deposición en el cual resultan de mayor utilidad (Bremmer, 2012).

Discusión y conclusiones

Numerosas técnicas han sido exploradas durante los últimos 100 años con el objeto de establecer la antigüedad de las manchas de sangre desde la deposición hasta el levantamiento en la escena del hecho.

Sin embargo todavía el estado del conocimiento las sitúa en la fase experimental.

Ninguna tiene la consistencia suficiente en términos de exactitud, precisión y sensibilidad como para ser admitidas como prueba en la práctica forense.

El examen del problema se ha enfocado por los diversos grupos científicos, en su gran mayoría, por determinar la edad absoluta pero es muy escasa la bibliografía sobre estudios que comparan la edad relativa entre dos manchas presentes en conjunto en un mismo soporte - evidencia. Por otra parte la interacción entre las manchas y los distintos soportes donde pueden haber sido depositadas y sus características tampoco han sido suficientemente investigados.

La evaporación del fluido hemático es un fenómeno físico interesante porque conjuga una serie de procesos que intervienen en su ocurrencia, como la temperatura ambiental, del soporte, adhesividad de la muestra a la superficie, tensión superficial y otros.

Estas últimas líneas de investigación brevemente reseñadas potencialmente pueden ofrecer buenos resultados y aportar datos relevantes en un tema que es de gran importancia.

Bibliografía

Ackermann K., Ballantyne K.N., Kayser M. (2010). Estimating trace deposition time with circadian biomarkers: a prospective and versatile tool for crime scene reconstruction. *Int. J. Legal Med.*

[Anderson S](#), [Howard B](#), [Hobbs GR](#), [Bishop CP](#). (2005). A method for determining the age of a bloodstain. *Forensic Sci Int.* 2005 Feb 10;148(1):37-45.

Arany S., Ohtani S. (2011). Age estimation of bloodstains: a preliminary report based on aspartic acid racemization rate. *Forensic Sci. Int.* Oct 10;212(1-3):e36-9.

Bauer M., Polzin S., Patzelt D. (2003). Quantification of RNA degradation by semiquantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains. *Forensic Sci. Int.* 138 94–103.

- Botonjic-Sehic E., Brown C.W., Lamontagne M., Tsaparikos M. (2009). Forensic Application of near-infrared spectroscopy: aging of bloodstains. *Spectroscopy* 24 42–48.
- Bremmer R, Van Gemert M, Van Leeuwen T, Aalders M, De Bruin K. (2012). Forensic quest for age determination of bloodstains. *Forensic Science International* [serial online]. March 10,;216(1-3):1-11.
- Brooke H., Baranowski M.R., McCutcheon J.N., Morgan S.L., Myrick, M.L. (2010). Multimode imaging in the thermal infrared for chemical contrast enhancement. Part 1:Methodology. *Anal. Chem.* 82 8412–8420.
- [Cho S](#), [Ge J](#), [Seo SB](#), [Kim K](#), [Lee HY](#), [Lee SD](#). (2014). Age estimation via quantification of signal-joint T cell receptor excision circles in Koreans. *Legal Medicine (Tokyo)*. May;16(3):135-8.
- Dulinska I., Targosz M., Strojny W., Lekka M., Czuba P., Balwierz W.et al. (2006). Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy, *J. Biochem. Biophys. Methods* 66: 1–11.
- Hanson E.K., Ballantyne J. (2010). A blue spectral shift of the hemoglobin solet band correlates with the age (time since deposition) of dried bloodstains. *PLoS ONE* 5e12830.
- Inoue H., Takabe F., Iwasa M., Maeno Y. (1991). Identification of fetal hemoglobin and simultaneous estimation of bloodstain age by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Legal Med.* 104 127–131.
- Jeffreys A., Wilson V, Thein S. (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature (serial online)*. January 1; 316(6023):76-79.
- Jeffreys A, Brookfield J, Semeonoff R. (1986). DNA fingerprint analysis in immigration test-cases (reply). *Nature (serial online)*. January 1, 322(6076):291.
- Larkin B, Banks C. (2013). Bloodstain pattern analysis: Looking at impacting blood from a different angle. *Australian Journal Of Forensic Sciences (serial online)*. March 1; 45(1):85-102.
- Leers O. (1910). *Die forensische blutuntersuchung*. Berlin.
- Marrone A., Ballantyne J. (2009). Changes in dry state hemoglobin over time do not increase the potential for oxidative DNA damage in dried blood. *PLoS ONE* 4 pe5110.
- Matsuoka T., Taguchi T., Okuda J. (1995). Estimation of bloodstain age by rapid determinations of oxyhemoglobin by use of oxygen-electrode and total hemoglobin. *Biol. Pharm. Bull.* 18 1031–1035.
- Miki T., Kai A., Ikeya M. (1987). Electron spin resonance of bloodstains and its Application to the estimation of time after bleeding. *Forensic Sci. Int.* 35 149–158.

- Patterson D. (1960). Use of reflectance measurements in assessing the colour changes of ageing bloodstains, *Nature* 187, 688–689.
- Rajamannar K. (1977). Determination of the age of bloodstains using immunoelectrophoresis. *J. Forensic Sci.* 22.
- Tomellini L. (1907) De l'emploi d'une table chromatique pour les taches du sang. *Arch.d'Antropologie criminelle de Criminol.* 14 2.