

OPERA LILLOANA Nº 54

María Rosana Ayón

— Editora —

— Primer libro sobre la especialidad escrito en Argentina —

Biología Forense

Botánica, ficología, micología, entomología, tafonomía
y genética aplicadas a la criminalística



Fundación Miguel Lillo
TUCUMÁN – ARGENTINA

BIOLOGÍA FORENSE

OPERA LILLOANA 54

Biología Forense

María Rosana Ayón

— Editora —

Servicio de Biología Forense, Departamento Técnico Científico,
Cuerpo de Investigaciones Fiscales, Ministerio Público de Salta.
Avda. Bolivia 4671, (CPA4408FV6) Salta Capital.
rosanaay@yahoo.com.ar



Fundación Miguel Lillo

Ministerio de Educación, Cultura, Ciencia
y Tecnología de la Nación

Ley 12.935 – Tucumán – República Argentina

— 2 0 1 9 —

Ayón, María Rosana

Biología Forense / María Rosana Ayón. - 1a ed. - Tucumán : Fundación Miguel Lillo, 2019.
Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-950-668-037-4

1. Biología. 2. Criminalística. 3. Ciencias Forenses. I. Título.
CDD 570

Opera lilloana

Serie monográfica de la Fundación Miguel Lillo que incluye temas de botánica, zoología y geología en trabajos de investigación original.

Correo electrónico: actazoologica@lillo.org.ar

ISSN 950-668-010-8

Fundación Miguel Lillo, 2019.
www.lillo.org.ar

Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina.
Télefax +54 381 433 0868
www.lillo.org.ar

Editor Área Zoología

Mariano Ordano (Fundación Miguel Lillo y CONICET / Unidad Ejecutora Lillo, Tucumán, Argentina).

Editor gráfico

Gustavo Sánchez (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Editor web

Andrés Ortiz (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Secretaría editorial Área Zoología

Felipe Castro (Fundación Miguel Lillo y Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina).

Pamela Gómez (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Eduardo Martín (Fundación Miguel Lillo y Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina).

María del Pilar Medina Pereyra (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Hugo Pablo Pereyra (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Franco Pucci Alcaide (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Guido van Nieuwenhove (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Florencia Vera Candioti (CONICET / Unidad Ejecutora Lillo, Tucumán, Argentina).

María Paula Zamudio (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

María Eugenia Pérez (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Consultas bibliográficas y ventas

Centro de Información Geo-Biológico del Noroeste Argentino,
Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina.
Correo electrónico: biblioteca@lillo.org.ar

Ref. bibliográfica: Ayón, M. R. [Ed.]. 2019. «Biología Forense». *Opera lilloana* 54, Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina.

ISBN 978-950-668-037-4

Las opiniones y contenidos de los trabajos son exclusiva responsabilidad de los autores y no coinciden necesariamente con las posiciones de los editores o de *Opera lilloana*.

Derechos protegidos por Ley 11.723
Editado en Argentina.

Contenido

El rol de la biología en las ciencias forenses 9
MARÍA ROSANA AYÓN

Una visión general de los indicios biológicos 11
ALEJANDRA GUINUDINIK

Capítulo 1

Criminalística 34
HÉCTOR ROLANDO BARBOZA

Capítulo 2

La botánica y su aplicación en las ciencias forenses 52
OLGA MARTÍNEZ

Capítulo 3

Aplicaciones forenses de las microalgas 62
NATALIA V. MATTANO, NORA I. MAIDANA

Capítulo 4

Micología forense 80
MARÍA CECILIA TRANCHIDA, MARTA NOEMÍ CABELLO

Capítulo 5

Entomología forense 92
MARÍA ROSANA AYÓN

Capítulo 6

- Patología forense 118
CLAUDIA MARCELA PORTELLI

Capítulo 7

- Tafonomía forense 129
NOELIA INÉS ZANETTI

Capítulo 8

- Genética forense 160
CECILIA MIOZZO

PRESENTACIÓN

El rol de la biología en las ciencias forenses

Maria Rosana Ayón

Servicio de Biología Forense, Departamento Técnico Científico, Cuerpo de Investigaciones Fiscales, Ministerio Público de Salta. Avda. Bolivia 4671, Salta Capital.

rosanaay@yahoo.com.ar

La palabra «forense» deriva del latín *forum*, o foro, lugar donde el pueblo o cada ciudad romana establecía el mercado y se llevaban a cabo las transacciones comerciales y algunos procedimientos legales. Durante mucho tiempo el término «forense» tuvo una definición restringida solo al ámbito de una investigación legal; sin embargo, actualmente es utilizado en cualquier análisis de eventos pasados, es decir cuando se busca una evidencia. Así, por ejemplo, cuando se rastrea la fuente de una contaminación se habla de «análisis ambiental forense», o bien se dice que los historiadores realizan un examen forense de documentos.

La Biología Forense se define como la aplicación de conocimientos de las Ciencias Biológicas en investigaciones legales y la criminalística, mediante el estudio sistemático de las huellas o indicios biológicos dejados por el autor o víctima en la escena del crimen, con la finalidad de determinar la relación de éstos con el hecho delictivo y apoyar técnica y científicamente a la investigación criminal. Por lo tanto, la Biología Forense abarca la anatomía humana y fisiología, el estudio de diversos organismos desde virus hasta vertebrados, el tráfico de especies protegidas y el análisis de delitos contra el medio ambiente. El estudio científico de los indicios biológicos tiene por objetivo lograr la certeza para ser aplicable a un contexto legal y es la base racional de la prueba jurídica, pudiendo aplicarse en los siguientes ámbitos:

- En lo civil: filiación, fertilidad.
- En lo penal: delitos contra la vida, el cuerpo y salud, contra la libertad, el patrimonio y medio ambiente.
- En lo laboral: accidentes de trabajo.

La aplicación de la Biología Forense se desarrolla tanto en la escena como en el laboratorio; examinando todo indicio de naturaleza u origen biológico que es abandonado en la escena del crimen, identificando la sustancia biológica de que se trata, comparando con otras sustancias biológicas semejantes y muestras relacionadas con la víctima o el sospechoso y formulando una hipótesis acerca de las circunstancias que originaron su procedencia, con fines reconstructivos.

Hasta el siglo XIX la Biología Forense solo se desarrollaba en el ámbito de la Medicina Legal y la Antropología Forense; a partir del siglo XX se sumó la Genética en la identificación de personas a través de estudios de ADN. En la actualidad a partir del desarrollo de nuevas disciplinas y según la clasificación de los pronunciamientos periciales, se divide la Biología Forense en diferentes ramas: genética forense, hematología forense, espermatología o seminología forense, tricología forense, microbiología e inmunología forense, entomología forense, micología forense, fisiología forense y botánica forense. De estas ramas no todas se aplican de modo habitual en el sistema judicial argentino ya sea por falta de divulgación o especialistas en cada área.

Aunque toda evidencia biológica tiene sus limitaciones, resulta útil para responder los interrogantes que surgen cuando se encuentra un cadáver en circunstancias sospechosas. Ante esta situación, la primera pregunta que se plantea es: ¿son tales restos de naturaleza humana? La respuesta podría ser obvia si el cuerpo se encuentra completo y en estado fresco o si se observa un cráneo. Sin embargo existen escenas donde puede haber huesos esparcidos o algunas manchas de sangre de antigua data. Asumiendo que los resto son humanos la evidencia biológica ayuda a responder otras preguntas posteriores, como: ¿quién es la víctima?, ¿cuál fue la causa de muerte?, ¿hace cuánto se produjo el deceso?, ¿la persona murió en el lugar del hallazgo?, ¿la muerte se produjo por causa naturales, accidente o fue víctima de un acto criminal? Si la persona fue asesinada, ¿quién fue el responsable?

El objetivo de este libro es establecer una guía de las disciplinas vinculadas a la Biología Forense, tanto para quienes tienen la responsabilidad en la investigación legal (peritos, biólogos, bioquímicos, criminalistas, médicos etc.) como para quienes desde el ámbito judicial deben realizar los requerimientos periciales de cada hecho delictivo. Cada capítulo describe las disciplinas que se investigan en el país y fueron elaborados por especialistas en cada área. Teniendo en cuenta que la investigación de hecho delictivo se trata de un trabajo en equipo y multidisciplinario, se consideró de suma importancia incorporar un capítulo sobre Criminalística que aborde el trabajo en la escena del hecho y la importancia de la búsqueda y preservación de indicios, ya que, como se detalló anteriormente, la Biología Forense no solo se desarrolla en el laboratorio sino desde la escena misma. También en la presente obra se incorporó un capítulo sobre Patología Forense y otro sobre Tafonomía Forense, los cuales describen la vinculación de distintos organismos vertebrados e invertebrados y las variables abióticas, con la presencia o modificación de lesiones en un cadáver. La hematología y seminología forense se tratan en el capítulo de indicios biológicos.

Para finalizar quiero expresar mi agradecimiento a mis colegas del Cuerpo de Investigaciones Fiscales del Ministerio Público de la Provincia de Salta, laboratorio del Poder Judicial de la provincia de Jujuy, Universidad Nacional de Salta e investigadores de CONICET por su aporte para la elaboración de este libro, que es el primero sobre Biología Forense que se escribe en el país.

NOTA

Una visión general de los indicios biológicos

Alejandra Guinudinik

Servicio de Biología Molecular Forense, Departamento Técnico Científico, Cuerpo de Investigaciones Fiscales, Ministerio Público de Salta. Avda. Bolivia 4671, (CPA4408FV6) Salta Capital.
aleguinu@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La escena del crimen es el lugar donde ocurre un hecho delictivo; en este contexto es indispensable la intervención de investigadores para la búsqueda de indicios, que permitan el esclarecimiento de lo ocurrido. Teniendo como objetivo, localizar e identificar el mayor número de pruebas materiales con métodos adecuados de recolección y el correcto embalaje, transporte y resguardo que permitan al laboratorio realizar los análisis correspondientes para poder finalmente saber qué pasó, por qué pasó, quiénes son los actores del hecho y, en algunas ocasiones, determinar el cuándo ocurrió.

La prueba material surge del relato de los indicios o «testigos mudos» en el lugar del hecho, los intérpretes de estos testigos mudos son los profesionales de las diferentes disciplinas de las ciencias fáticas, como lo son la biología, bioquímica, química, ingenierías, etc. Las ciencias fáticas aportarán entonces un bien científico que sirve a la ciencia jurídica para lograr certezas y explicaciones lógicas que los magistrados encargados de impartir justicia utilizarán para acercarse a la verdad. Lo que se debe tener presente es que los exámenes biológicos o pruebas de laboratorio, así como las pericias en general, únicamente son admisibles cuando cuentan con las aptitudes técnicas que proporcionan las disciplinas fáticas, ajenas a los estudios jurídicos.

En definitiva, la idea de que el estudio biológico constituye una pericia, es de vital importancia para el proceso penal, toda vez que dicho medio de prueba encuentra regulación en los Códigos de procedimiento nacionales y/o provinciales, y que, por consiguiente, su implementación dentro del ámbito de la investigación penal, se encuentra regida por las normas establecidas en las leyes, siempre teniendo presente que nos estamos refiriendo a la pericia en general y no al método propio del estudio científico, ya que en este caso se requiere de conocimiento técnico muy específico y en donde el dictamen pericial se encuentra regido por los principios y las leyes científicas que estén reconocidos en el ámbito académico-científico, para que hagan fe de sus conclusiones.

PERICIA BIOLÓGICA

En la investigación pericial de un indicio biológico destacan tres grandes etapas (ver Figura 1).

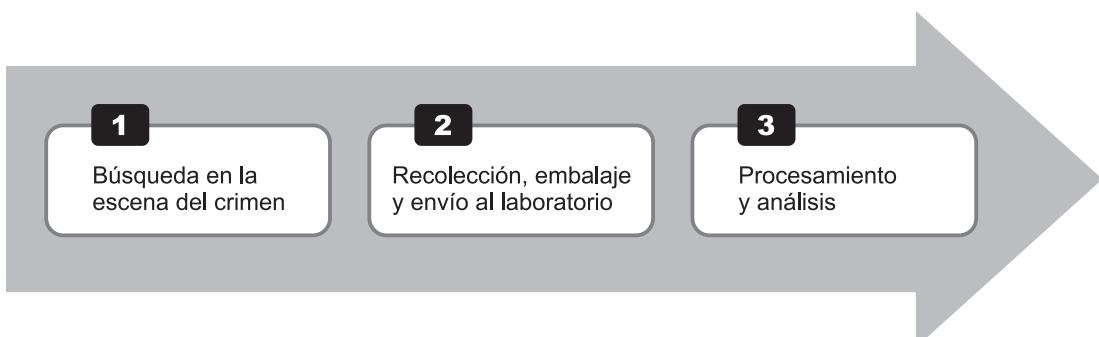


Figura 1. Etapas de la investigación pericial.

BÚSQUEDA EN LA ESCENA DEL CRIMEN

Es muy importante conocer las propiedades de los diferentes indicios que podríamos encontrar en una escena del hecho, enfatizando en el adecuado manejo y resguardo de los mismos que finalmente permitirán a los laboratorios proporcionar resultados para la investigación, coadyuvando a la administración de justicia.

No es objeto de este capítulo el método criminalístico, no obstante, haré un par de recomendaciones a los fines de que, si en algún momento les correspondiera recolectar, recibir, acondicionar o resguardar un indicio el mismo sea tratado de manera adecuada.

Las normas para la búsqueda, colecta y envío de muestras al laboratorio deben cumplirse con rigor de acuerdo con lo que dictan los códigos procesales penales de cada provincia y los protocolos anexados; ya que, en muchos casos, sino es en todos, de ello dependerá el éxito del análisis posterior y le otorgará valor de evidencia al indicio biológico. Si bien cada caso es único y es la combinación de conocimientos y experiencia, la que regula el mecanismo de actuación, se ha de procurar dañar lo menos posible las pruebas y por ello la manipulación debe ocurrir sólo si fuera estrictamente necesario. Cada clase de indicio se maneja de distinta forma de acuerdo con sus características. Uno de los principales criterios es que el indicio más frágil o plausible de contaminación es el que se colecta primero.

Se mirará especialmente en lugares donde puedan quedar restos, incluso aunque se hubieran intentado eliminar limpiando la escena. Este es el caso de las zonas de unión de las baldosas de suelo y paredes, la unión entre la hoja y el mango en un cuchillo, debajo de las uñas de la víctima o agresor, la ropa íntima si se sospecha delito contra la libertad sexual, etc. El uso de sobres de papel en lugar de bolsas de plástico es importante en el caso de indicios biológicos para estudios biológicos y genéticos, pues el plástico o los recipientes herméticamente cerrados crean condicio-

nes de anaerobiosis que favorecen la putrefacción de las muestras y el crecimiento de hongos.

De todas las muestras recogidas en la Inspección Ocular deberán realizarse las correspondientes Actas de incautación de elementos, en la que deben constar perfectamente descriptos los efectos remitidos, en qué lugar estaban, en qué condiciones y a qué laboratorio se mandan para su estudio. Asimismo, se expondrá de forma clara y concisa el tipo de análisis que se desea sobre cada efecto enviado. Debe existir un documento anexo (cadena de custodia) al envío de muestras, que acredite el tránsito de estas en todo momento, comienza en la toma de muestras, su transporte, resguardo, análisis y su devolución al organismo que solicitó el estudio o al depósito judicial.

Hoy en día son de gran importancia las buenas prácticas en la recolección, acondicionamiento, transporte y envío de muestras biológicas, pues si esta etapa no cumple los requerimientos legales y científicos, la prueba no será admitida en el Juicio Oral. Si la evidencia no está perfectamente documentada su origen será cuestionado, si no está bien colectada puede perder las propiedades biológicas a estudiar, si no está perfectamente empaquetada puede ser susceptible de contaminación y si no se toman precauciones para evitar putrefacción y descomposición es posible que la muestra no se pueda analizar.

Una vez en el Laboratorio, el perito debe asegurarse el estado en el que recibe el indicio. Es conveniente tomar fotografías de los efectos recibidos antes de proceder a su análisis. Posteriormente se debe identificar, numerar y describir las zonas que se van a analizar.

RECOLECCIÓN, EMBALAJE Y ENVIO DE MUESTRAS AL LABORATORIO

Vestigios, indicios, evidencias

El término *indicio* proviene de latín *indictum*, que significa signo aparente y probable de que existe alguna cosa. Vestigio en cambio proviene del vocablo latino *vestigium* y tiene varios significados, utilizándose para nombrar a los pedazos, los restos o las huellas de alguna cosa, ya sea física o simbólica. Para la Criminalística tanto el indicio como el vestigio será todo aquel material que se percibe con los sentidos y que tiene relación con un probable hecho delictuoso. Todo objeto, localizado en el lugar de hechos y que por sus características se trate de algún tejido o fluido de origen biológico humano, animal u objeto.

Evidencia es un término que procede del latín *evidentia* y que permite en cambio indicar una certeza manifiesta que resulta innegable y que no se puede dudar. Por lo tanto, podríamos decir que un indicio o vestigio biológico se transforma en evidencia después de su análisis, pues es el resultado de este el que indicará la certeza de que aquel indicio colectado en la escena criminal corresponde al hecho o no.

Para poder realizar de una forma adecuada el proceso de levantamiento de los indicios y lo que ello conlleva, es imprescindible contar con los medios materiales y humanos necesarios para realizar este proceso de una manera óptima y siguiendo

las recomendaciones establecidas. Por otro lado, para que los profesionales o técnicos que llevan a cabo esta labor puedan hacerlo de una forma apropiada es necesario que tengan conocimiento y formación sobre el tema, que permitan no sólo el aprendizaje sino el contacto con otros profesionales para poder intercambiar opiniones.

Por sus características propias, y el contacto con el medio ambiente, los indicios tienden a degradarse afectando total o parcialmente el material biológico a peritar. Podemos decir que los factores pueden ser físicos, químicos y biológicos.

● **Factores físicos y químicos.** La utilización de tratamientos físicos y/o químicos pueden dificultar algunos de los procesos del análisis biológico. Estos tratamientos pueden ser:

● **Inherentes a la propia muestra.** Cuando el producto químico forma parte del soporte o sustrato donde cae la mancha (p. ej. tintes, colorantes, pinturas, esmaltes, aceites, etc.) o bien, cuando las muestras son sometidas a la acción de productos químicos (p. ej. ropas lavadas con lavandinas, agentes blanqueadores y detergentes) en estos casos suele ser inevitable, salvo que la mancha afecte a distintos soportes y haya posibilidad de seleccionar alguno que no haya sufrido este tipo de tratamientos.

● **Provocados.** Cuando las muestras se envían inmersas en conservantes (p. ej. tomas vaginales recogidas con hisopos en medio de transporte bacteriológico, papeles impresos como el de diario, etc.) o han sido tratadas con productos (p. ej. la utilización de reveladores de huellas dactilares) que pueden afectar al análisis de los indicios biológicos. En este sentido, hay que insistir en que cualquiera de estos elementos produce una intensa degradación del material biológico, aunque esté poco tiempo en contacto con las muestras. También hay que tener mucho cuidado con los sistemas de luz UV (ultravioleta) utilizados para la detección de manchas, ya que la luz UV se utiliza para descontaminar las superficies y material empleados entre los procesos de extracción y amplificación de ADN, y si el indicio que estamos analizando para pruebas biológicas luego será analizado genéticamente podríamos estar inutilizando la muestra. Por ello, siempre que se realice algún estudio previo que implique cualquier tipo de tratamiento físico o químico que pueda comprometer el análisis de ADN es conveniente comunicarlo, para valorar cómo puede afectar al análisis y que el magistrado decida cuál análisis será prioritario.

● **Factores biológicos.** Como la contaminación con microorganismos presentes en el organismo y foráneos, que podrían acelerar el proceso de putrefacción alterando las muestras.

Los indicios pueden contaminarse debido a la aparición en el propio indicio de un aporte de material biológico humano ajeno al mismo. Esta contaminación puede clasificarse en:

● **Contaminación de origen.** El material biológico de un indicio se mezcla con material de otro origen en el momento de los hechos. Es inevitable y favorece la valoración. Como ejemplo podemos citar la prenda íntima de una víctima de violación que tiene su propio material genético y al momento del hecho se deposita material del agresor.

● **Contaminación fortuita.** También llamada contaminación anterior o previa. Se debe a la aparición de material biológico en el lugar donde luego aparecerán los indicios. Es inevitable y generalmente dificulta la valoración de la prueba. En este caso podría haber en el lugar del hecho manchas de sangre de una persona que accidentalmente se cortó y encima de esta depositarse las manchas del hecho.

● **Contaminación posterior.** Debido al depósito de diversos orígenes en el indicio con posterioridad al momento de los hechos. Es evitable mediante estrictos protocolos de recolección, embalaje y envío de las muestras.

Por lo expuesto anteriormente, todo elemento de origen biológico, ya sea en forma de mancha o fluido, debe ser manipulado en condiciones de esterilidad con el fin de evitar, por un lado, contaminación del investigador con microorganismos tales como hongos, bacterias, virus, que pueden transmitir enfermedades como tuberculosis, Hepatitis B o HIV al manipular este tipo de material y por otro, que el mismo investigador contamine la muestra con sus propios fluidos, tales como saliva, células epiteliales de las manos, sudor, etc.

Por ello, es recomendable:

- Usar guantes nuevos, cofia, barbijos y no hablar encima de las muestras.
- Limpiar y esterilizar todo el material que se reutiliza durante la toma de muestras (pinzas, abrochadores, cascós, etc.).
- Embalar las muestras en material limpio o estéril.
- Prohibir comer, beber o fumar durante cualquier etapa del proceso.

PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS

Los vestigios biológicos que más comúnmente reciben los laboratorios forenses con fines identificativos están impregnados con sangre, semen, saliva, restos orgánicos, pelos, tejidos, uñas, restos óseos y dientes.

Sangre

Es el indicio biológico más frecuentemente hallado en las escenas criminales. Las manchas sanguíneas constituyen la base del estudio de la hematología forense, que estudia su mecanismo de producción, su forma, extensión, situación, tamaño, color, aspecto, cantidad y orientación. La hematología forense puede ser reconstructora (de esta rama se encarga la criminalística) o identificatoria (de esta rama se encargará el laboratorio).

La sangre es un tejido formado por líquidos y sólidos que circula por los vasos sanguíneos de nuestro organismo. La parte líquida se llama plasma, contiene agua, sales y proteínas y representa aproximadamente el 60% de la sangre. La parte sólida está constituida por glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. Representa cerca

del 8% del peso corporal total del hombre adulto, y tiene un volumen de cinco a seis litros.

Podremos encontrarla en forma líquida o en forma de mancha. El aspecto de las manchas varía con la antigüedad y el soporte sobre el que se encuentran. Generalmente, cuanto más antigua es una mancha de sangre, más oscuro es su color. No obstante, y este criterio puede usarse para cualquier indicio, no debemos confiar solamente en nuestros sentidos y será fundamental el análisis para confirmar la etiología del fluido.

Las condiciones de envío de las muestras de sangre varían según el estado en que se encuentre. Si esta líquida, se recoge con pipeta Pasteur o jeringa y debe introducirse en tubo falcón con anticoagulante EDTA 0,5 M o si presenta coágulos, adquirir la muestra frotando con hisopo de algodón estéril o absorbiendo en papel Whatman 3 MM. Las manchas se deben frotar con tres hisopos estériles como mínimo ligeramente embebidos con solución fisiológica (sólo si la sangre está seca), y podremos considerar en general las siguientes situaciones:

a) Mancha de sangre sobre superficies absorbentes: (prendas íntimas, pantalones, remeras, calzado, etc.) aunque sólo fuera una pequeña parte se enviará completa; si la prenda u objeto fuera suficientemente grande (un sillón, un colchón, cortinados, tapizados de automotores), se recortará la zona manchada dejando un margen de uno o dos centímetros sin mancha que servirá como control negativo. En los tejidos claros las manchas presentan un color rojo oscuro que con el tiempo tiende a ennegrecerse más. En los tejidos oscuros las manchas se visualizan mal y las encontraremos sólo por el tacto acartonado que confieren a la tela. Es aconsejable mandar la prenda bien seca en sobre de papel. La muestra se puede dejar secar a temperatura ambiente y evitando su exposición al sol.

b) Mancha de sangre sobre superficies no absorbentes: si la mancha se encuentra sobre una superficie no absorbente forma costras con aspecto de escamas brillantes; con la antigüedad las costras se van haciendo más oscuras. Si el objeto manchado fuera pequeño (cuchillos, armas de fuego, relojes) se enviará directamente, pero si no fuera posible (pared, suelo, mesa) y se procederá al raspado o hisopado de las costras, posteriormente se colocará en un sobre de papel.

Cuando sospechamos sobre la existencia de material hemático, que, por estar poco visible, ya sea por el color de soporte o por la coloración alterada por el tiempo o lavado, debemos realizar pruebas que se denominan presuntivas.

Las pruebas presuntivas o ensayos preliminares son pruebas rápidas basadas en la actividad de peroxidasa que posee el grupo Hemo de la hemoglobina de la sangre. Las peroxidases sanguíneas son catalasas que, como su nombre lo indica, poseen actividad catalítica (enzimática) en las reacciones de oxidación, ya que tienen la propiedad de descomponer el peróxido de hidrógeno u otros peróxidos orgánicos, produciendo liberación de radicales oxhidrilos según la siguiente reacción, el grupo hem descompone el agua oxigenada produciéndose agua y oxígeno. El oxígeno liberado actúa sobre un reactivo orgánico reducido transformándolo en su forma oxidada que posee un color característico o emite luminiscencia.

Las pruebas presuntivas orientan sobre la posible existencia de sangre en la mancha en estudio, pero no aseguran su presencia.

Suelen utilizarse como ensayos preliminares las siguientes reacciones: Adler y Adler (reacción de la bencidina en medio ácido), Kastle Meyer (reacción de la fenolftaleína, en medio alcalino), reacción de Medeinger (reacción de la leucobase del Verde de Malaquita), Luminol y *Blue Start*. Existen otras pruebas, no obstante, que utilizan demasiada cantidad de muestra no permitiendo realizar otros ensayos por lo que paulatinamente se han dejado de realizar y se han comenzado a priorizar otros estudios como el genético.

Mayor confiabilidad en los resultados ofrecen los reactivos que actúan en medio alcalino, pues disminuye la posibilidad de falsos positivos.

Si el resultado de los ensayos preliminares es negativo, debe descartarse la existencia de sangre en la muestra analizada, puesto que en general son métodos muy sensibles más no específicos (ver Tabla 1). Si el resultado fuera positivo, debemos continuar con los ensayos para confirmar su presencia.

1) Reacción de Adler-Adler.— En el caso de esta reacción el oxígeno al reaccionar con la bencidina, la oxidará formando un compuesto intensamente azul. Este método tiene una sensibilidad de 1/300.000 a 500.000. Un resultado negativo excluye la presencia de sangre; si la reacción es positiva requiere, como toda técnica

Tabla 1. Caracterización de las pruebas para determinación de sangre.

Reacción	Molécula diana	Sensibilidad	Especificidad	Interpretación
Adler y Adler	Peroxidasa	1:100.000	Peroxidases vegetales y animales	Cambio de incoloro a color verde
Kastle Mayer	Peroxidasa	1:1.000.000	Peroxidases animales	Cambio de incoloro a color rosa intenso
Medeinger	Peroxidasa	1:300.000	Peroxidases vegetales y animales	Cambio de incoloro a color verde
Luminol o <i>Blue Star</i>	Peroxidasa	1:5.000.000	Peroxidases vegetales y animales	Luminiscencia azul en la oscuridad
Inmuno-cromatografía	Hemoglobina humana	5 nL	Alta, puede dar reacción cruzada con primates superiores y hurones	Dos bandas en la tira inmuno-cromatográficas
	Glicoforina	50 nL	Alta, sin reacciones cruzadas reportadas	Dos bandas en la tira inmuno-cromatográficas

de orientación del empleo de reacciones de confirmación ya que se pueden tener falsas reacciones positivas con otras sustancias que tengan actividad semejante a las de las peroxidasa o bien con otros materiales oxidantes como podrían ser las peroxidasa vegetales.

Preparación del reactivo de Adler: hay que mezclar 0,25 gramos de bencidina con 175 mL de etanol 96° luego se añaden 5 a 10 gotas de ácido acético glacial y se guarda refrigerado en frasco color caramelo hasta su uso.

La solución reveladora es peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) al 3% que también debe guardarse en frasco color caramelo y debe ser refrigerada.

El procedimiento de aplicación consiste en humedecer un hisopo en agua destilada o solución fisiológica y frotar sobre la mancha problema, luego añadir 1 o 2 gotas de reactivo de Adler, en este paso es muy importante verificar que no aparezca coloración, pues de ser así estaríamos en presencia de un oxidante muy fuerte pero no sangre. Luego se agrega el reactivo revelador y en caso de prueba positiva aparecerá un color azul brillante.

Limitaciones de la prueba residen en la poca capacidad de diferenciar peroxidasa vegetales de animales, y además que es considerado un compuesto altamente tóxico.

2) Reacción de Kastle Mayer.— Es una prueba cualitativa para la detección de hemoglobina que utiliza la fenolftaleína como indicador de color. Cuando la prueba es positiva da una coloración rosa fuerte

Para hablar de las ventajas y limitaciones de la prueba de fenolftaleína, es importante tener en cuenta dos características importantes para la química forense: sensibilidad y especificidad. La sensibilidad se refiere a la mínima cantidad de una sustancia (en este caso sangre) que puede ser detectada por el reactivo. La sensibilidad de la prueba de Kastle Meyer es de aproximadamente 1:5.000.000 a 10.000.000 esto significa que si se agrega a una gota de sangre diez mil gotas de agua todavía podría ser detectada por el peritaje. La especificidad, en cambio, se refiere a cuantas sustancias distintas a la sangre podrían arrojar también un resultado positivo al someterse a la prueba, la literatura sugiere que los falsos positivos podrían ocurrir en presencia de elementos químicos oxidantes muy fuertes, pero no ocurren en presencia de peroxidasa vegetales puesto que ellas reaccionan en medios ácidos y no en básicos como es el caso de esta reacción, conviene destacar que estos falsos positivos suceden sólo después de aplicar la fenolftaleína y antes de agregar el peróxido de hidrógeno. Puede decirse entonces que la prueba de Kastle Meyer es altamente específica para la sangre.

El reactivo de Kastle Mayer se prepara a partir de 2 gr de fenolftaleína, 30 gr de potasa anhidra, 100 gr de agua destilada y 20 gr de polvo de zinc. A continuación, se hierve la mezcla (color rojo) hasta que se decolora totalmente. Esto ocurre porque la fenolftaleína se reduce. Después se filtra en caliente y la solución obtenida, se conserva en frascos oscuros y cerrados herméticamente. El reactivo es muy inestable, y se oxida con mucha facilidad. Poco a poco va retomando un color rosado hasta que vira totalmente. Esta oxidación se puede retrasar si se pone una pequeña cantidad de polvo de zinc dentro del frasco.

La técnica consiste en, una vez obtenido el reactivo, añadir iguales cantidades de este a la solución problema. Al adicionar unas gotas de agua oxigenada, si la muestra contiene peroxidasa, se observa el cambio de color a rosa oscuro. En este proceso debemos tener ciertas precauciones, como que la temperatura debe ser menor de 30°C, porque a temperaturas superiores, el reactivo se oxida, aunque no haya sangre. Debemos controlar también el pH de la muestra, y solamente debemos considerar el resultado de la prueba como positivo, si el viraje se produce inmediatamente a la aplicación del peróxido de hidrógeno.

Por otra parte, se ha demostrado que la reacción es válida para la identificación de sangre antigua y también sangre hervida, y algunos autores indican que también da positiva en las muestras que han sido sometidas a la acción de ácidos o álcalis.

3) Reacción de Medeinger.— También se le llama reacción de la Leuco Malquita verde y tiene idéntico fundamento que las dos anteriores.

El reactivo se puede preparar mezclando 10 mg de leucomalaquita verde en 8 mL de una solución que se prepara a partir de 8 mL de ácido acético glacial y 4 mL de agua destilada. Como revelador se utilizará peróxido de hidrógeno al 3%.

La forma de aplicación consiste en añadir 1 o 2 gotas del reactivo y a continuación 1 o 2 gotas de la solución de peróxido de hidrógeno. Para que la reacción sea considerada como positiva se debe observar en menos de 10 segundos un color azul-verdoso.

La sensibilidad del método es de 1/100000.

4) Reacción de Luminol.— Esta prueba utiliza un compuesto químico luminiscente y, si hubiera sangre en la muestra podríamos ver la producción de luz por parte de las peroxidasa presentes. A diferencia de las otras pruebas, esta suele utilizarse para grandes espacios que fueron lavados o cuando ha pasado mucho tiempo, no es factible su uso en espacios abiertos porque necesitamos oscuridad para su aplicación, tampoco recomiendo su uso en pequeños objetos porque podríamos producir el efecto de dilución de la mancha.

El reactivo se prepara mezclando 0.5 gr de luminol con 25 gr de carbonato de sodio. Esta mezcla es estable y se puede guardar. Cuando se va a hacer la prueba se prepara una disolución con 3.5 g de perborato de sodio en 50 mL de agua destilada y se añade a la mezcla anterior. Habrá que tener cuidado porque existen diferentes formas de preparar el reactivo revelador, una de ellas utiliza como revelador peróxido de hidrógeno y este puede eliminar los glóbulos blancos necesarios para la identificación mediante uso de ADN. Y ustedes se preguntarán ¿por qué esto no interfiere en las pruebas anteriores. Debido a que, en las pruebas de Adler, Kastle Mayer y Medeinger antes de aplicar el reactivo tomamos una muestra que sí será destruida por el peróxido de hidrógeno, pero queda remanente el resto de la evidencia, en el caso del luminol nosotros vamos a poner en evidencia en un lugar las posibles manchas sanguíneas y luego de su aplicación las levantaremos con hisopo para realizar a posterior otra prueba confirmatoria.

La técnica consiste en aplicar el reactivo, con un pulverizador, sobre los objetos o zonas donde se encuentren las manchas que queremos investigar. Si el test

es positivo, se ve una luminiscencia blanco-azulada, que debe ser observada en la oscuridad. Esta prueba es muy útil cuando las manchas son difíciles de ver, cuando se encuentran en superficies oscuras, en grietas o hendiduras o zonas que han sido lavadas.

El luminol no destruye la mancha (preparado en la forma adecuada) y no interfiere en el caso de que se realicen después otras pruebas de confirmación o serológicas. La sensibilidad es de 1/5000000 y es más efectivo con sangre antigua que con sangre fresca. Se puede aumentar la efectividad rociando previamente la mancha con ácido clorhídrico al 2% para descomponer la hemoglobina, pero tendremos en cuenta que luego no podremos realizar identificación mediante ADN en estas muestras.

5) Reacción de *Blue Star*.— Tiene exactamente el fundamento químico de reacción del luminol, la diferencia está en que la molécula fluorescente al ser más grande es más estable en el tiempo, posibilitando una mejor observación de los resultados, además de no necesitar tanta oscuridad para su revelado.

Antes de la realización de cualquiera de estas pruebas es conveniente tener en cuenta la sensibilidad y la especificidad de estos métodos, así como la realización de controles positivos y negativos de reacción cada vez que analizamos una tanda de muestras, esto garantiza el correcto funcionamiento de los reactivos.

En el caso del luminol y *blue star* al tener tantos interferentes es conveniente que antes de realizar la pericia se ensayan los siguientes controles: telas o tejidos manchados con solución de detergente en agua, alcohol etílico 96°, lavandina pura, bebida cola, limpiador de ropas con oxígeno activo, mancha de sangre humana y un negativo con sólo agua destilada estéril.

Falsos positivos en pruebas presuntivas pueden darse con:

- Oxidantes químicos, que se ponen de manifiesto durante el ensayo, cuando agregamos agua oxigenada ya se observa cambio de color. (lavandina, detergentes con oxígeno activo).
- Sales de cobre y níquel, interfieren solamente en solución concentrada, pero reaccionan de forma diferente a la sangre. Una coloración débil aparece antes del agregado de agua oxigenada y se intensifica lentamente después del mismo.
- Otras sustancias (de origen animal): son aquellas que por contener trazas de sangre dan reacción positiva: por ejemplo; pus, secreción nasal, etc.,
- Peroxidas vegetales: son las de mayor incidencia en la producción de falsos positivos. El color de la mancha debe observarse antes de los ensayos, generalmente su color difiere de las manchas de sangre, ya que el verde y el blanco son los colores asociados con el material proveniente de plantas.

Falsos negativos, es decir que aun siendo positiva la sangre no obtengamos prueba presuntiva positiva, pueden darse con:

- Bebidas cola.
- Yodo en todas sus presentaciones.

Luego de las pruebas presuntivas tendremos que realizar las **pruebas para determinar especie**, si es humana o no. Estas pruebas son específicas y confirman la presencia de sangre humana en la mancha investigada. Por lo general la molécula diana es la hemoglobina presente en los glóbulos rojos sanguíneos, pero también hay un kit comercial desarrollado particularmente para determinar una proteína de membrana del glóbulo rojo llamada glicoforina. No obstante, cualquiera sea la molécula que ensayar el fundamento del método es el mismo la inmunoensayo en tira o placa.

El fundamento de la prueba utiliza un ensayo inmunológico de sándwich doble de anticuerpo para detectar selectivamente sangre. En la zona de la línea del test de la membrana se han fijado unos anticuerpos monoclonales frente a hemoglobina humana o glicoforina humana. Durante el proceso, la muestra reacciona con partículas que presentan en su superficie anticuerpos anti-hemoglobina o anti-glicoforina, formando un conjugado. El conjugado se mueve hacia la parte contraria de la membrana por acción capilar. En el caso de obtener un resultado positivo, los anticuerpos específicos presentes en la membrana reaccionarán con la mezcla de conjugado y aparecerán unas líneas coloreadas. Una línea siempre debe verse en la zona de la línea de control ya que sirve como verificación de que el volumen de muestra añadido es suficiente, que el flujo ha sido el adecuado y también como control interno de escasa cantidad o exceso de sangre provocarían un ensayo con resultado falso negativo, razón por la cual el analista debe tener en cuenta cuál será su rango analítico (ver Figuras 2 y 3).

Existen varios factores que alteran la posibilidad de asegurar el origen de la sangre, ellos son la antigüedad de la mancha, acción del sol, humedad, putrefacción, desarrollo de hongos, altas temperaturas, lavado y naturaleza de la superficie donde se encuentra la sangre. Todos estos factores deberán tenerse en cuenta al informar mis resultados.

Todo un capítulo lo constituye la realización de análisis de determinación de factor y grupo sanguíneos, no obstante, no recomiendo su realización por varias razones, la primera es que la cantidad de muestra que necesitamos es excesiva, la

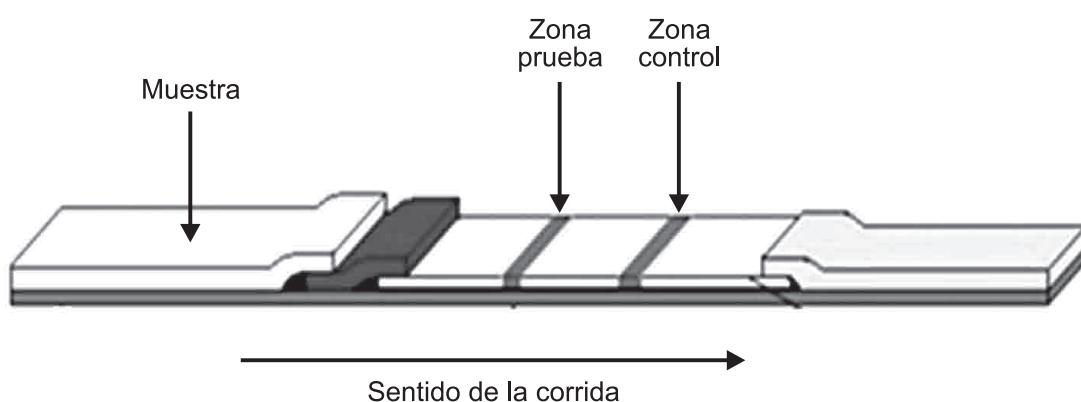


Figura 2. Inmunoensayo de flujo lateral.

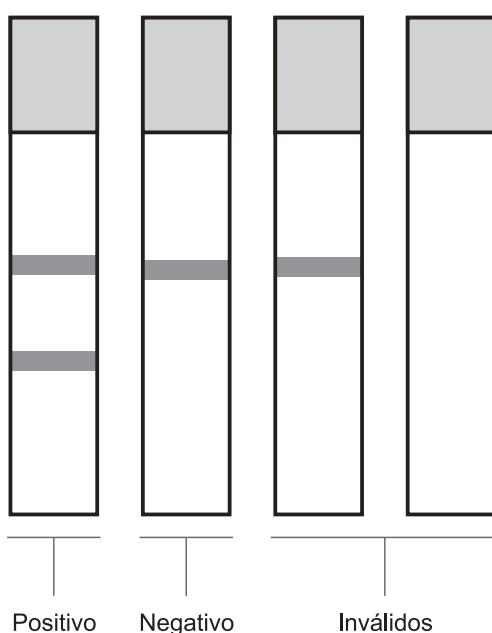


Figura 3. Resultados del test de inmunoensayo.

segunda la reviste la pérdida de estabilidad de aglutinógenos y aglutininas en la muestra con el paso del tiempo y la manipulación de los elementos de prueba. Y de informar grupo y factor sólo podremos decir «se comporta como grupo A, B, AB u O, nunca se establece de forma contundente este tipo de estudios, y además teniendo en cuenta que hoy en día existen técnicas de identificación de alta certeza como la identificación por ADN, no tiene sentido realizar este tipo de pruebas.

Semen

El semen es un líquido heterogéneo, de aspecto lechoso, opalescente, ligeramente amarillo, con un volumen promedio de 3,5 ml por eyaculado. Está compuesto por espermatozoides (10%), plasma seminal (90%), leucocitos y células epiteliales; posee capacidad de fluorescencia, contiene altas concentraciones de semenogelina y de antígeno prostático específico.

En la eyaculación se pueden distinguir diferentes fracciones:

1) Fracción preeyacularia: es de consistencia mucosa, transparente y no presenta espermatozoides. Procede de las secreciones de las glándulas de Cowper y Litre, y su función es lubricar el canal de la uretra.

2) Fracción previa: es fluida y tampoco contiene espermatozoides, tiene un pH ácido, elevada concentración de fosfatasa ácida, antígeno prostático específico y ácido cítrico, condiciones no propicias para los gametos masculinos. Procede de la próstata.

3) Fracción principal: tiene elementos líquidos y gelatinosos. Procede del epidídimos y de los conductos deferentes. Es la fracción que contiene los espermatozoides.

4) Fracción terminal: de consistencia gelatinosa, procede de las vesículas seminales. Tiene un pH alcalino y fructosa, razón por la cual hay espermatozoides presentes, aunque la mayoría inmóviles. Esta fracción es rica en semenogelina.

La importancia de las manchas de semen resulta evidente por ser indicios fundamentales en los delitos sexuales, delitos contemplados en el artículo 119 del código penal y su modificación en la ley N° 27.352.

La búsqueda sobre la víctima y el agresor son indispensables, debiendo tomarse muestras en perineo, vagina, ano y boca de la víctima, según el tipo de agresión y aquí será muy importante el interrogatorio que realicen los profesionales del equipo médico legal, el cual nos informara qué muestras son las importantes, también se tomarán muestras de hisopados de piel y uñas si la víctima se defendió. También será importante realizar una inspección de las ropas de víctima y agresor, especialmente de la ropa interior, toallas higiénicas o papeles con los que pudiera haberse limpiado.

Es muy importante el contexto de la muestra, no es lo mismo si la toma de muestras se realiza dentro de las 24-48 horas de ocurrido el hecho a que, si se toma posterior a las 48-72 horas, puesto que a medida que transcurre el tiempo la posibilidad de encontrar indicios biológicos disminuye. Si se tratase de un abuso sexual de larga data será conveniente hacer un análisis del relato de la víctima del que podremos determinar si es conveniente hacer una búsqueda de otro tipo de pruebas, porque sobre el cuerpo de la víctima no vamos a encontrar indicios.

En estos indicios se realizan pruebas y requiere de las mismas etapas que requiere el estudio de la sangre, y generalmente se analizan conjuntamente.

El semen se puede presentar al investigador en cuatro formas distintas: 1) como mancha; 2) impregnado en un tejido; 3) como fluido mezclado con otros fluidos corporales, como secreción vaginal; 4) como semen líquido.

Las manchas de semen presentan características de acuerdo con el soporte donde se depositan. Sobre tejidos absorbentes (sábanas, ropa, etc.), exhiben un color blanco-amarillento, la forma de sus bordes es irregular, similar a los mapas topográficos. Estas manchas producen efecto de «apergaminamiento» y «almidonamiento» del soporte. Sobre superficies no absorbentes rugosas (cerámica, yeso), el semen formará costras o escamas más o menos grandes de color blanquecino transparente. Sobre superficies lisas (pisos pulidos, vidrios) el semen se extiende formando una mancha grande, delgada y casi transparente, poco visible en superficies oscuras.

Una vez que se ha localizado la mancha debe realizarse el examen analítico para identificar algún componente del semen. Este comprende pruebas presuntivas y confirmatorias.

En los casos en que se supone la existencia de material seminal y que por las características de este no son visibles al ojo desnudo, fundamentalmente por el color de soporte, se llevan a cabo las pruebas presuntivas, que son pruebas rápidas basadas en la investigación de alguna propiedad del semen.

1) Luz de Wood.— La fluorescencia es la propiedad de una sustancia para emitir luz cuando es expuesta a radiaciones de tipo ultravioleta. La luz puede ser apreciada mientras la superficie es irradiada con la fuente de luz en la oscuridad. El espectro de excitación de las muestras de semen tiene longitudes de onda que van de 250 nm (Luz UV) a 500 nm (Luz Azul-verde).

La fluorescencia y fosforescencia del semen está relacionada con la presencia de los aminoácidos tirosina y triptófano, una base nitrogenada llamada flavina y algunas veces por la presencia de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*.

Esta técnica es de utilidad principalmente para el estudio de grandes superficies (sábanas, tapizados, cortinados, automóviles, etc.). Estas últimas fluorescerán sobre fondos no fluorescentes, por lo que en algunos casos donde las prendas contienen fibras de blancos ópticos, se obtiene el efecto inverso donde las manchas fluorescerán con menor intensidad.

Se debe trabajar en lugar oscuro. Podrá hacerse un examen directo con luz UV corta (254 nm) a temperatura ambiente observando una fluorescencia blanca amarillenta y un examen directo con luz UV larga (365 nm) que es poco específica para detectar semen.

También puede refrigerarse el objeto o prenda y cuando irradiamos con la luz UV corta se observa una fosforescencia que persiste por más de 20 segundos después de quitar la luz UV. Tanto la fluorescencia, como la fosforescencia son independientes de la presencia de espermatozoides.

Hay que tener cuidado al valorar la mancha porque la mezcla de semen y sangre puede enmascarar la fluorescencia. La fluorescencia no es específica del semen, sino que producirá la misma reacción con otros fluidos biológicos, como el sudor; pero no fluórese con la saliva y la sangre.

2) Fosfatasa ácida prostática (FAP).— Es una fosfomonoesterasa no específica, se encuentra en niveles altos en el semen, provienen de las células epiteliales de la glándula prostática. El nivel de la actividad de la fosfatasa ácida es 500 a 1000 veces más alta en el semen humano que en otros fluidos o secreciones corporales.

La fosfatasa ácida prostática y las fosfatases ácidas serán encontradas en fluidos vaginales normales, leche, sangre, etc. Son genéticamente idénticas y todas guardan también identidad con la fosfatasa ácida lisosomal encontrada en la mayor parte de los tejidos, por lo tanto, los bajos niveles de actividad encontrados con frecuencia en los lavados vaginales poscoitales resultan, de esa manera, equívocos con respecto al problema de la detección del semen.

Se ha demostrado que niveles elevados de la actividad de fosfatasa persiste en el tracto vaginal después de la agresión sexual. La detección de la fuerte actividad de la fosfatasa ácida es considerada como un rápido indicador de la presencia de plasma seminal. El tiempo aproximado para la detección exitosa de la fosfatasa ácida es de 48 horas después del contacto sexual.

La prueba se fundamenta en que la FAP hidroliza el α -naftil fosfato a pH 5,2 con liberación de fosfato y α -naftol. El naftol reacciona a su vez con un diazorreactivo presente en el sistema 4-clorotolueno-1,5-diazo α -naftalénisulfonato produ-

ciendo un pigmento amarillo, de modo que el aumento de la absorbancia leído a 405 nm es proporcional a la actividad fosfatasa de la muestra.

Analíticamente se cortan fragmentos de tejido impregnados con la muestra. Se coloca en tubo de Kant con solución fisiológica estéril o Buffer fosfato y se eluye la muestra agitando con vórtex o dejando toda la noche en heladera.

Se debe preparar el reactivo con 2 mL de reactivo B (buffer citrato 0,1 mol/L con 14 mmol/L de 1,5-pantanodiol + butanol) y 1 comprimido A (6umol de á-naftil fosfato y 2umol de 4-CTD). Este es estable 24 horas en heladera y 12 hs a temperatura ambiente. Agregar 200 uL de eluido y leer a los 4 minutos a 405 nm. El cambio de coloración a amarillo indicará el positivo. Por lo general vienen presentaciones comerciales de este reactivo que son utilizados en clínica como prueba diagnóstica de patologías humanas, para utilizarla en biología forense es necesario realizar una adaptación y con ello la validación o verificación del método, que incluye determinar sensibilidad, especificidad, rango lineal y límite de detección.

Las **pruebas confirmatorias** son pruebas que nos ayudarán a confirmar la presencia de semen humano en las manchas, en ellas se utilizará el mismo eluido que se preparó para realizar la prueba de FAP y estas son:

1) Semenogelina (SG).— Es una proteína que proviene de la vesícula seminal, el sustrato para el antígeno prostático específico (PSA) y es un marcador útil para la identificación de semen. La SG I y SG II son dos de las principales proteínas secretadas por la vesícula seminal al semen humano. Ellas interactúan no, covalentemente a través de puentes disulfuro de forma instantánea formando un coágulo en la eyaculación. El coágulo es licuado después de unos minutos debido a la acción de una proteasa sérica prostática, el PSA, que rompe a la SG en fragmentos. La SG I y la SG II se han encontrado en varios tejidos: las vesículas seminales, el conducto deferente, la próstata, el epidídimo, el músculo esquelético, el riñón, el colon, la tráquea y en tumores en el pulmón.

El método es una inmunocromatografía en placa que emplea una combinación de conjugado colorante-anticuerpo monoclonal y anticuerpo policlonal en fase sólida, para identificar selectivamente a SG en las muestras en estudio, con un alto grado de sensibilidad. A medida que las muestras del ensayo corren a través de la porción absorbente de la tira, el conjugado de colorante-anticuerpo monoclonal identificado se une a la SG formando un complejo antígeno-anticuerpo. Este complejo se une al anticuerpo anti-SG en la zona de reacción positiva, produciendo una banda de color rosado cuando la concentración de SG es superior a 1 uL/mL en el fluido seminal.

Las muestras se maceran en buffer TB (tris buffer) y se colocan en la ventana del dispositivo, van migrando en el papel de filtro interno por capilaridad, en el recorrido, la muestra que contiene el antígeno se encuentra con los anticuerpos, estos forman un complejo Antígeno-anticuerpo-cromógeno, que quedará atrapado en el primer frente, donde está anclado el anticuerpo, desarrollándose una banda color rosa (ver Figuras 2 y 3).

La orina de hombres y mujeres, y otros fluidos corporales (sangre, saliva, sudor, heces, leche materna, lubricantes y secreciones vaginales) dieron también resultados negativos.

2) Antígeno prostático específico (PSA).— Es una glicoproteína intracelular sintetizada solamente por la glándula prostática, presente en el semen. Es una de las proteínas principales del fluido seminal con concentraciones de 0,2-3 mg/mL. Su función principal es licuar el fluido seminal.

El PSA puede detectarse en casos donde no pueden encontrarse espermatozoides (por ejemplo, hombres vasectomizados, azoospérmicos, etc.).

Una reacción positiva de PSA se considera como una prueba confirmatoria de la presencia de plasma seminal humano.

El PSA es estable y en un frotis vaginal es detectable hasta 14-47 horas después del coito. En manchas de 30 años de antigüedad, el PSA puede ser recuperado a concentraciones detectables, siempre y cuando la muestra haya sido conservada en condiciones idóneas.

El fundamento de la prueba que lo determina se basa en una inmunocromatografía semi-cuantitativa y rápida de PSA que emplea una única combinación de conjugado colorante anticuerpo monoclonal y anticuerpo policlonal en fase sólida, para identificar selectivamente al PSA en las muestras en estudio, con un alto grado de sensibilidad. A medida que las muestras del ensayo corren a través de la porción absorbente de la tira, el conjugado de colorante–anticuerpo monoclonal se une al PSA de la muestra formando un complejo antígeno-anticuerpo. Este complejo se une al anticuerpo anti-PSA en la zona de prueba, produciendo una banda de color rosado. En ausencia de PSA en la muestra, no aparece línea alguna en la zona de prueba. La mezcla reactiva continúa corriendo a través de la almohadilla absorbente, pasando la zona de la zona de control. El conjugado libre se une a los reactivos en la zona de control produciendo una banda de color rosado, lo que indica que los reactivos funcionan correctamente.

La prueba detecta semen en concentraciones desde 4 -10 ng/mL. Al igual que con la SG y la FAP se deben cortar fragmentos de tejido o hisopados impregnados con la muestra y colocar en tubo de Kant con solución fisiológica estéril. Se eluye la muestra agitando con vórtex o se deja toda la noche en heladera.

Sacar las tiras de PSA y rotular. Colocar en la tira reactiva una gota del eluido de la muestra y una gota del buffer de extracción. Colocar la tira en una superficie plana. Leer los resultados a los 5 minutos.

Otros fluidos del cuerpo humano como sangre y orina pueden también contener PSA. Visto que la concentración de PSA en suero humano es normalmente bajo (<4 ng/ml) y está elevado solamente en el caso de enfermedades prostáticas hasta 200 ng/mL, la cantidad de PSA en orina de hombres sanos muestran en algunos casos valores de 800 ng/mL. En caso de duda, una diferenciación entre fluido seminal y orina puede ser posible por la determinación de concentraciones de PSA. El más alto grado de dilución en orina de hombres con un resultado positivo de PSA reportado es 1:200. Por otro lado, muestras de semen generalmente dan resultados positivos

de PSA incluso a factores de dilución de 1:200.000, esto es a 1000 veces mayor a la más alta dilución (ver Tabla 2).

Normalmente las concentraciones de PSA en los otros fluidos corporales son bajas, por tanto, una interferencia con la interpretación del resultado del test es prácticamente imposible trabajando con materiales diluidos/extráídos.

3) Microscopía.— El reconocimiento de un espermatozoide en una mancha es prueba irrefutable de que la misma está constituida total o parcialmente por semen. Esta es la técnica Gold Standard para la determinación de semen.

El espermatozoide posee una cabeza donde se localiza el acrosoma con el material genético (ADN) y el flagelo que le permite la motilidad. El ADN nos permite identificar, de qué individuo proviene. Se estima que en el producto normal de una eyaculación se encuentran alrededor de 60 a 100 millones de espermatozoides por mL de semen. Las excepciones son la oligozoospermia (menor cantidad de espermatozoides) y azoospermia (ausencia de espermatozoides). Siempre que la víctima no se haya higienizado, luego de la eyaculación, los espermatozoides tienen un tiempo de supervivencia, en función de la región del cuerpo donde se hayan depositado. En el fondo de saco vaginal es posible encontrar espermatozoides de 5 a 7 días poste-

Tabla 2. Caracterización de las pruebas para determinación de semen.

Reacción	Molécula diana	Sensibilidad	Especificidad	Interpretación
Luz de Wood	Flavina, tirosina y triptófano	baja	baja	Aparición de fluorescencia blanco-azulada
FAP (fosfatasa ácida Prostática)	FAP	alta	Baja, presenta falsos positivos con otros tejidos y fluidos	Cambio a coloración amarilla
SG (semenogelina)	SG	alta	alta	Presencia de dos bandas en la tira inmunocromatografía
PSA (antígeno prostático específico)	PSA	alta	alta	Presencia de dos bandas en la tira inmunocromatografía
Microscopía óptica	Espermatozoides	alta	media	Espermatozoides con cabeza roja y colas verdes
Microscopía óptica con inmuno-fluorescencia	Espermatozoides	alta	alta	Espermatozoides fluorescentes

riores al acto sexual; en el canal endocervical hasta 4 días, en la región rectal hasta 65 horas, en la región anal 46 horas y en la cavidad oral de 6 a 12 horas.

Tal reconocimiento es fácil en manchas de semen de reciente data, pero se complica al transcurrir el tiempo. Si los espermatozoides han perdido la cola, puede ser difícil reconocerlos sobre todo en muestras contaminadas con bacterias y hongos. Si el sujeto es aspérmino o azoospérmino, la identificación de la mancha se complica aún más.

La tinción de células espermáticas ocurre por una combinación de fenómenos físicos y químicos. El fundamento de la prueba se basa en la afinidad de los colorantes básicos por los elementos celulares ácidos y de los colorantes ácidos por elementos celulares básicos.

La coloración de elección y diferencial se denomina coloración de árbol de navidad o *fast nuclear red*, en ella las cabezas de los espermatozoides se tiñen de color rojo debido a la acción del rojo rápido nuclear que tiñe los núcleos de células. La parte del acrosoma (punta del espermatozoide) se tiñe más suave, mientras que el resto de la cabeza se tiñe de rojo fuerte. La cola se tiñe de color verde debido al colorante pícrico índigo carmín que tiñe el citoplasma.

Para la realización de esta prueba se deben cortar fragmentos de tejido impregnados con la muestra y colocar en tubo de Kant con solución fisiológica estéril o Buffer fosfato, se eluye toda la noche en heladera, se quita el fragmento de tejido, se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se coloca el precipitado sobre portaobjetos, luego se deja secar, se fija con calor y se colorea.

Un problema técnico en esta instancia podría deberse a que las células cuando pierden su hábitat natural sufren cambios estructurales que no permiten identificar especie mediante la simple observación de los espermatozoides en un microscopio óptico (ver Figura 4), por lo tanto, una sola prueba no determina *per se* la etiología

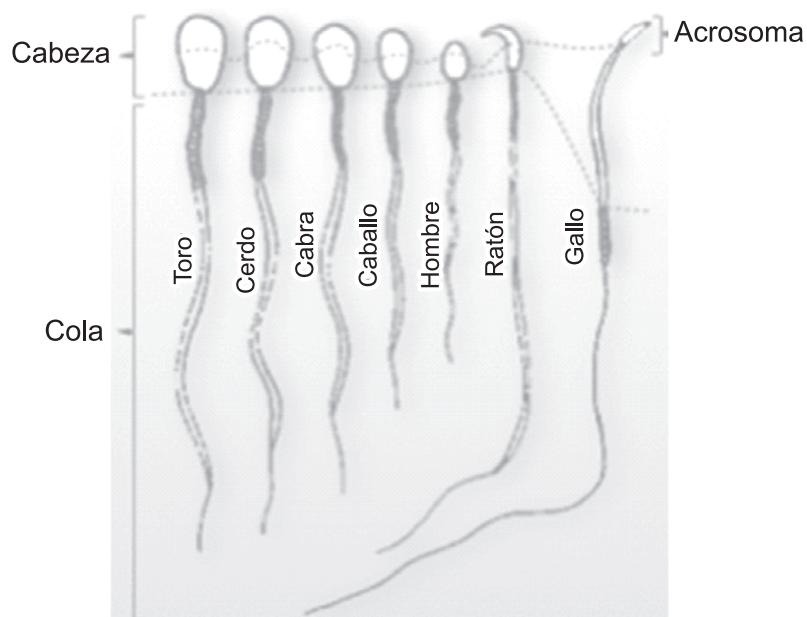


Figura 4. Formas y tamaños de espermatozoides de diferentes especies.

seminal ni puede confirmarnos la presencia de semen humano, deberemos tener en cuenta por lo menos dos pruebas, y esto puede ser tenido en cuenta para todos los fluidos a analizar (ver Tabla 3).

Tabla 3. Interpretación de los resultados de las pruebas para determinar semen.

Prueba	FAP	PSA	Semenogelina	Microscopía	Interpretación
1	Negativa	Negativo	Negativa	Negativa	No hay semen
2	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Hay semen humano
3	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa	Hay plasma seminal humano
4	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa	Hay plasma seminal humano
5	Negativa	Negativo	Negativa	Positiva	Hay semen no humano

Saliva

La saliva es una secreción líquida proveniente de las glándulas salivales que se extienden por todas las regiones de la boca excepto en la encía y la zona anterior del paladar. Se mezcla con el fluido crevicular, microorganismos, células de la mucosa oral, etc. Las glándulas salivales mayores producen el 93% de su volumen y las glándulas salivales menores el 7% restante. La saliva puede contener un alto nivel de actividad de la enzima amilasa. Sin embargo, la misma substancia puede estar presente, pero en niveles mucho más bajos, en otros fluidos como semen y secreción vaginal. También pueden detectarse niveles altos de amilasa en las heces. Por supuesto, la saliva no contiene ADN, pero las células que en ella se encuentran bañadas si lo contienen.

Las manchas de saliva se encuentran en filtros de cigarrillos, chicles, cepillos de dientes, sobres, sellos, bordes de vasos, hojas de coca mascadas, dentaduras postizas, prendas como pasamontañas, etc. Se deberán manipular y colectar con pinzas, o mediante el empleo de hisopos estériles embebidos en solución fisiológica, también estéril. Siempre se colocará de manera individual en sobres de papel correctamente identificados.

Es importante destacar que muchas veces durante la agresión sexual el atacante muerde a la víctima, en este caso podrá hisoparse la lesión para intentar recuperar la saliva depositada en ella.

La localización de estas manchas es difícil puesto que son transparentes, habrá que prestar particular atención a las prendas claras donde puede secar con una tonalidad ligeramente amarillenta, en los géneros oscuros aparecerá blanquecina.

En el piso con baldosas o cerámicas tendrán la apariencia de rostros de caracol. En soportes que no absorben pueden formar pequeñas escamas.

Las pruebas que se realizan también pueden ser presuntivas o confirmatorias.

Una **prueba presuntiva** es la determinación de Amilasa mediante un kit enzimático disponible comercialmente para un ensayo clínico, que deberá validarse en el laboratorio forense para su uso, la misma incluirá determinar sensibilidad, especificidad, rango analítico y límite de detección. Esta prueba no es específica de especie y podría resultar positiva con saliva de animales, semen o fluido vaginal. La diferencia reside en que la actividad de la amilasa salival es 50 veces más alta que en otros fluidos.

Otra prueba presuntiva es la difusión en gel de agarosa, al que le agregamos almidón, se realizan pozos en el gel y se colocan en ellos, las siguientes diluciones: saliva 1:100, saliva 1:500, orina sin diluir, suero sin diluir, semen sin diluir y la muestra problema sin diluir. Se deja incubar toda la noche y al otro día revelamos con solución de Lugol, donde hubo reacción se forma un halo y donde no el agar queda azul. El fundamento de esta reacción es la hidrólisis del almidón por la amilasa salival. Los resultados se interpretan tomando como referencia el diámetro del halo formado en los controles de saliva 1:100 y 1:500, serán positivas las muestras que tienen un halo mayor o igual al control de 1:100 y negativas aquellas que tengan un halo por debajo del control 1:500. Esta técnica es muy laboriosa y al final no nos da un resultado confirmatorio.

Pruebas confirmatorias son aquellas que podrán indicarnos que estamos ante la presencia de saliva humana. Se utiliza un kit de inmunocromatografía en placa de desarrollo para ciencias forenses que utiliza el mismo fundamento técnico que las otras inmunocromatográficas ya descriptas para sangre y semen y que tiene adosada a la membrana un anticuerpo monoclonal anti-amilasa humana, la interpretación es idéntica a los métodos antes descriptos (ver Figuras 2 y 3).

La sensibilidad, especificidad, sencillez de la realización de la técnica, costos, etc. Deben ser evaluados a la hora de decidir cuales métodos serán los implementados en nuestro laboratorio (ver Tabla 4).

Tabla 4. Caracterización de las pruebas para determinación de saliva.

Test	Molécula diana	Sensibilidad	Especificidad
Amilasa enzimática	Alfa amilasa	Media < 1 uL	Baja
Difusión en gel de agarosa-almidón	Amilasa	Baja < 5 uL	Media
Inmunocromatografía	Alfa-amilasa humana	Elevada < 50 nL	Alta

Orina, vómito, sudor, líquido amniótico, materia fecal

Estos fluidos si bien se encuentran en la escena del crimen no existen pruebas certeras para su evaluación o identificación, razón por la cual no vamos a poder caracterizarlos o determinar su procedencia, no obstante, podremos encontrar células en ellos que nos permitirán un análisis de ADN con fines identificatorios.

Células de descamación

Son producidas por el rozamiento de distintas partes de cuerpo con prendas u objetos. A veces puede ser interesante en la práctica forense saber quién ha utilizado una prenda o quién empuñó un arma.

Se enviará completa la prenda u objeto susceptible de análisis. Una vez en el laboratorio será el perito el que decida de qué zona tomar la muestra (cuello, puños, axilas, el interior de la parte delantera en el caso de una gorra, etc.). Se trata de muestras críticas, pues se parte de unas pocas células para el análisis y la cantidad de ADN que se puede extraer a partir de una prenda sin manchas aparentes es mínima, por lo tanto, será imprescindible que el magistrado decida a qué estudio se dará prioridad. Se trata de un tipo de muestras que se han de manipular de manera excepcional a la hora de su colecta por lo que recomendamos siempre el uso de guantes y barbijo para evitar contaminaciones.

Por lo general para su valoración en el laboratorio de bioquímica se utilizará alguna técnica de observación microscópica, no obstante, muchas veces se desaconseja su realización para evitar la pérdida de material plausible de estudio genético.

LO QUE SE VIENE

Una gran desventaja del empleo de los métodos tradicionales es la necesidad de aplicar distintas pruebas para cada tipo de fluido, lo que hace necesaria la división de la muestra, teniendo en cuenta que hay que dejar intacta una parte adicional de la misma para posibles análisis futuros. Por otra parte, el principal inconveniente de los únicos test confirmatorios existentes (sangre y semen) es su naturaleza destructiva. Finalmente, si las manchas están compuestas por fluidos distintos procedentes de uno o varios individuos la complejidad de la identificación de su origen se ve aumentada considerablemente. Todas estas desventajas hacen necesario el desarrollo de métodos confirmatorios y no destructivos de alta sensibilidad y especificidad que permitan la identificación de todos los fluidos corporales y de sus mezclas que sean de utilidad forense.

El análisis de distintos tipos de RNA (especialmente del mRNA y el miRNA) podría ser empleado en investigaciones criminales y estudios forenses postmortem con el objetivo de aportar información complementaria al análisis de los perfiles STR de DNA. Entre las aplicaciones posibles del mRNA se encuentran: a) la identificación de fluidos biológicos, b) la determinación de la causa y circunstancias de

la muerte, c) el establecimiento de la antigüedad de una herida y del tiempo transcurrido desde que una mancha de origen biológico es depositada, y d) la estimación del intervalo postmortem (PMI). Sin embargo, la tipificación de mRNAs está limitada por su baja estabilidad e integridad postmortem, lo que ha llevado al estudio de los micro RNAs, los cuales ya han demostrado ser útiles en la identificación de fluidos corporales. Los distintos tipos de RNA (estructura, origen, biogénesis, función, degradación, estabilidad e integridad postmortem, etc.) los hacen aplicables en el ámbito forense.

Todas las células del cuerpo humano comparten la misma secuencia de DNA en su genoma y, sin embargo, cada tipo celular tiene un patrón de expresión específico en función de los niveles de proteínas concretas necesarios para llevar a cabo su función. Como el mRNA es un intermediario en la síntesis de proteínas, resulta obvio que sus niveles celulares reflejarán la expresión génica específica de cada tejido. Es más, la presencia de determinados mRNAs nos indicará qué genes están siendo transcritos en ese preciso momento. De este razonamiento surge inmediatamente el potencial del análisis del mRNA para identificar tejidos y fluidos corporales humanos. La sangre, el semen, la saliva, las secreciones vaginales y lacrimales, la sangre menstrual o el sudor son algunos de los fluidos encontrados en la escena del crimen, cobrando especial importancia si proceden del atacante.

Así, el análisis de perfiles de mRNA se está convirtiendo en un método confirmatorio complementario que podría sustituir a las pruebas tradicionales de identificación de fluidos corporales humanos, en especial si es posible combinarlo con el análisis del DNA. Pero aún estas pruebas no están disponibles en nuestro país.

VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN

En las pruebas presuntivas, como en cualquier análisis bioquímico o químico, se deben realizar de validaciones y/o verificaciones de los métodos que vamos a utilizar, que nos va a servir para tomar decisiones al respecto de cuál de los métodos es mejor para nuestro sistema y en qué casos podré aplicar uno u otro. Básicamente debemos determinar al menos estos parámetros para métodos cualitativos o semicuantitativos: especificidad, sensibilidad, límite de detección, rango analítico e interferentes. Sobre todo, porque los métodos que utilizamos no están creados para las ciencias forenses, sino que son adaptaciones.

Las pruebas presuntivas y confirmatorias a menudo son un precursor de los exámenes de ADN en elementos de evidencia donde el material biológico está potencialmente presente. Por lo tanto, la calidad e integridad del proceso de estas pruebas es fundamental para el éxito del análisis de ADN posterior.

Se anticipa que estas pautas evolucionarán aún más a medida que surjan las tecnologías futuras (por ejemplo, ARN).

Las pruebas presuntivas son sensibles, pero no específicas. Un resultado positivo indica que las pruebas adicionales podrían ser informativas. Pruebas de confirmación son específicas para el material biológico de interés y reducen o eliminan los resultados falsos positivos).

‘Límite de detección’ es el punto en el que la sensibilidad de la prueba es tal que el material biológico presente es insuficiente para producir un resultado positivo. El resultado puede clasificarse como un falso negativo.

Criminalística

Héctor Barboza

Departamento de Criminalística. Cuerpo de Investigaciones Fiscales. Ministerio Público de Salta.
Avda. Bolivia 4671, (4400) Salta Capital. hectorbarboza-@hotmail.com.ar

INTRODUCCIÓN

En los tiempos actuales, los cambios producidos en las normas legales, la dirección hacia donde avanzan los órganos de justicia, los resultados que la sociedad espera son parámetros que deben ser entendidos por el Licenciado en Criminalística y por los Gabinetes que desarrollan su actividad en la escena del crimen. Es necesario producir un amplio giro en la manera de abordar y desarrollar el trabajo en el lugar del hecho, dejando de lado el viejo concepto de «inspección ocular, relevamiento planimétrico fotográfico», y quedarse limitado a esa labor, sin buscar más resultados que la elaboración de los informes, con lo que termina la participación de los profesionales de criminalística, en la investigación de un hecho. Espero que al finalizar el presente trabajo, pueda transmitir el concepto que reconozco y asigno a la inspección ocular, tratándose de una labor muy amplia, que se desarrolla en distintas áreas, sobre diferentes elementos, en momentos distantes, bajo diferentes condiciones, siendo una actividad tan extensa que resulta muy difícil reducir todo lo desarrollado en un informe y que de este no resulte un aporte a la investigación del hecho criminal.

TRABAJO EN EL LUGAR DEL HECHO

La inspección ocular se entiende como «el acto de observar y aplicar operaciones técnicas de la criminalística en el lugar de los hechos, con el objeto de individualizar y revelar indicios que serán utilizados en el proceso de investigación». Este concepto debería ser tomado como tal y fiel reflejo de lo que implica el desarrollo de este acto criminalístico, entonces si lo aceptamos y aplicamos, no podemos reducirlo a una simple observación en la escena, que luego es plasmada en un informe, con ilustraciones fotográficas y un croquis bien elaborado. Tal vez, encuentre la justificación en la creciente demanda de trabajo, que aumenta día a día, solicitado toda vez con mayor premura, dejando de lado la amplia labor que se debe desarrollar, en pos de cumplir con lo requerido. O tal vez, mi memoria aún siga confundida y continúe elaborando recuerdos de la vieja inspección ocular y en realidad lo que se

debe entender es «el nuevo concepto del desarrollo de la actividad del licenciado en criminalística en el lugar del hecho, donde la inspección ocular es el eje central, y desde allí se brindará información, con fundamentos técnicos-científicos a la investigación».

En consecuencia, sin más giros, iniciaré el desarrollo del concepto que deseo transmitir. El trabajo en la escena no debe circunscribirse a lo que conocemos como Inspección Ocular Criminalística, la que luego será plasmada en un informe, el que conforme a las características del que lo realizó, podrá ser más o menos extenso, de acuerdo con la cantidad de detalles que desea incorporar o valorar y que son de importancia para la presentación del mismo. El Licenciado o Perito en criminalística, debe superar esa etapa, de escaso aporte a la investigación y ampliar su campo de trabajo en búsqueda del esclarecimiento del suceso, basándose en todo indicio que considere y valore como útil para tal fin. Este es el desafío que propongo en cada hecho, hacer algo más de lo que actualmente y en algunos gabinetes están desarrollando, pero desde el punto de vista de la criminalística, basándose y fundamentando cada resultado a partir del indicio encontrado en el lugar, todo ello para dar comienzo a una posible línea de investigación o afianzar otra que ya se está desarrollando.

Este trabajo, a mi criterio, inicia de la manera que se expone a continuación.

CONOCIMIENTO DEL HECHO Y MANEJO DE LA ESCENA: ESTADO EMOCIONAL

Desde el momento en que se informa de la comisión de un delito —en este caso vamos a tomar como ejemplo un homicidio—, se iniciará una actividad que demandará extensas horas de labor, debiendo en primer instancia planificar el trabajo a desarrollar, valorando los medios humanos y logísticos que se posea, sin caer en el nerviosismo que genera el hecho y las circunstancias que lo rodean, debiendo mantener la calma, estado que deberá ser transmitido a los demás integrantes del equipo. Resulta muy difícil que se tomen medidas acertadas bajo presión, alteración u otro estado que perturbe a los profesionales, debiendo recordar el responsable del grupo que cuenta con sólo minutos para valorar si el elemento observado en la escena puede ser considerado como potencial indicio y en su caso administrar la forma correcta del levantamiento, debiendo guardar los recaudos legales que el caso amerita.

Una buena práctica que ayuda a disminuir el error es el trabajo en equipo, el que será propiciado por el responsable o como en muchos lugares del país se lo está llamando «coordinador».

ENTREVISTA CON EL PRIMER INTERVINIENTE

Por lo general, el «primer interventor» es personal policial o de otra fuerza que, anoticiado de un hecho criminal, se constituye al lugar y efectúa las diligencias iniciales, siendo esta persona la que realiza un relevamiento en búsqueda de información.

Existen profesionales que consideran no conveniente tomar conocimiento de detalles del hecho a investigar, ya que podría de alguna forma, la información que se recabe, direccionar la búsqueda de indicios. Lo cual parece ser válido de la forma en que se plantea, pero la experiencia me ha enseñado que una primer entrevista para recabar datos necesarios, resulta de importancia para la elaboración del informe, e inclusive para entender situaciones en el interior de la escena, como ser la presencia de huellas de pie calzado alrededor del cuerpo del extinto, que luego con un simple testimonio se confirma que se trataba del personal médico que constató la muerte. Entonces la entrevista no es perjudicial, sino más bien necesaria. Pero esta información, no deberá limitar la labor del equipo de criminalística, ejemplo si se informa que «el cuerpo está en el baño, donde también se aprecia a simple vista un arma blanca», no tomar por cierto que se trata del único lugar del hecho y dejar de inspeccionar el resto de la propiedad.

Esta entrevista debe ser escuchada por la totalidad del equipo de trabajo, en donde se efectuarán preguntas de rigor y aquellas dudas que surjan durante el relato, e inclusive cada profesional tendrá la oportunidad de interrogar, en relación con la labor que desarrollará a continuación, como por ejemplo el perito en rastros, consultará sobre las personas que ingresaron y por dónde, para no estar realizando trabajos de revelamiento sobre huellas de personas ingresadas a posterior del hecho.

PROFESIONALES QUE INGRESAN Y MODO DE ABORDAR

Considero que un número aceptable para que se conforme un grupo de trabajo en la escena del crimen, son «seis» componentes, entre los cuales están: el coordinador —licenciado en criminalística—, el perito en rastro, el fotógrafo, el dibujante, y dos auxiliares. Sin lugar a dudas, por lo menos cinco de ellos estarán en el interior del lugar del hecho, trabajando directamente sobre los indicios que se encuentren, pero debe existir un orden de ingreso, a efecto de preservar de la mejor manera el material que sea hallado, para ello el coordinador es el primero en avanzar, seguido inmediatamente por el perito en rastro y a continuación por el técnico que desarrollará tareas de fotografía y filmación, quienes harán su labor casi de forma paralela, indicando a continuación algunas consideraciones para cada uno de ellos:

- El coordinador —licenciado en criminalística— o técnico que designe, deberá efectuar una amplia, detallada y minuciosa Inspección, manteniendo una fluida comunicación con los demás actores que desarrollan sus tareas en el hecho, como ser los especialistas del área de Homicidios, el médico legal, los peritos de laboratorio, y por supuesto con el Fiscal o Juez interviniente. Llevar adelante un trabajo aislado carece de todo sentido, ya que el investigador podría —del relevamiento de vecinos— tener información que sea útil a los efectos de la inspección y de la misma manera, desde el interior se podría brindar adelantos que den inicio a una línea de investigación. Si se analiza lo expresado, hace referencia a una «fluida comunicación» y ello no implica que la reunión debe mantenerse al finalizar el trabajo

—que en muchos casos representa entre tres a cuatro horas posteriores— y mientras tanto el tiempo corrió a favor del autor y si lo medimos en kilómetros son cientos y en minutos son muchos, los que servirían para alejarse o para eliminar evidencia. El coordinador será también, quien autorice el ingreso al lugar de personal ajeno al área de criminalística, marcando las pautas para hacerlo, sin olvidar que, una vez finalizado el trabajo en la escena del crimen, no implica que pueden ingresar cuantos profesionales, peritos, técnicos, etc., quieran hacerlo. Es muy importante que el acceso a la escena sea muy limitado, lo indispensable para que se recabe información útil al proceso en el menor tiempo. La escena no será liberada finalizada la inspección ocular», sino que se mantendrá preservada hasta tanto culminen otras diligencias, como por ejemplo la autopsia; de ella el médico legal puede informar que el arma empleada posee determinadas características, que no se corresponden con el material incautado, por lo que se deberá regresar para mejorar la búsqueda, o de un testimonio se afirma la presencia de un elemento de valor, lo que será verificado con una nueva inspección. Por ésta y otras razones, el coordinador deberá —salvo escasas eventualidades— solicitar al Fiscal o Juez que se mantenga el área preservada, hasta tanto se obtengan los primeros resultados.

- Un técnico auxiliar —fotógrafo—, realizará en primer momento filmación del lugar, para luego avanzar con las tomas fotográficas. El relevamiento inicial seguramente lo efectuará sin consultar a su coordinador, ya que es una actividad propia, llevada adelante a partir de los conocimientos que posee, por lo cual no necesita indicaciones, pero la documentación de los detalles de los indicios dependerá de lo señalado por los peritos. Esas documentaciones deberán ser limpias, sin estar afectadas por elementos que perjudican a la imagen, como por ejemplo la intervención de profesionales trabajando o intromisión de material que corresponda al instrumental de los técnicos. Si bien este perito posee una amplia libertad de trabajo, no deberá tomar decisiones o desarrollar actos que impliquen modificaciones en el lugar como, por ejemplo, para mejorar la iluminación de la habitación abrir la ventana y permitir el ingreso de luz, sin que ella haya sido inspeccionada por el licenciado, para constatar si estaba con traba de seguridad o no. Téngase presente que tanto la filmación como las fotografías, son una excelente ayuda memoria para los profesionales que trabajaron y muy seguido, son consultadas para recordar algunos detalles, ratificar o rectificar datos e inclusive son observadas en varias oportunidades en búsqueda de particularidades que no hayan sido identificadas. Por esto y un sinnúmero de motivos más, las fotografías y filmaciones deben representar lo más genuinamente a la escena, en el estado en que fue encontrada, sin incorporar elementos que podrían ser invocados para desvirtuar una investigación.

- El perito en rastros iniciará su labor, primeramente, tratando de revelar huellas de pie calzado para luego continuar con las huellas papilares. El motivo del orden es en razón de que una huella de pie calzado es la primera que será alterada por el ingreso de los profesionales, por supuesto sin ninguna intención, y aún tomando todas las precauciones, es prácticamente imposible evitar la afectación de estas huellas. Especial interés debe tenerse al área que rodea el cuerpo de la víctima,

ya que una huella en esa zona posee un alto valor como evidencia. Algunas de estas pueden apreciarse a simple vista porque están estampadas por la impresión sobre polvo, tierra, barro, sangre u otras sustancias, pero para el caso en que no sea así, es muy útil su búsqueda utilizando luces con cierto ángulo de incidencia. Se debe documentar la totalidad de las huellas de pie calzado encontradas u observadas, dejando el trabajo de descarte para la labor en laboratorio, por la simple razón, de que si en el lugar dejan de documentar una huella por considerarla que no posee el campo suficiente, es decir se trata de un parcial, posiblemente en ese fragmento esté la microcaracterística que identifica a la huella, por lo tanto, no considerar que solamente una huella completa es útil a los fines del estudio, sino que los parciales también puede resultar importantes. A continuación, la búsqueda de huellas dactilares, esta labor debe tener una especial atención, y ser practicada por un profesional que esté afectado exclusivamente a esta técnica y no que sea un acto más dentro de una variada cantidad de labor, esta última afirmación la hago ya que una huella dactilar, consultando una base de datos, podría dar información específica sobre el posible autor. Con respecto a la técnica de revelado con reactivo físico no merece a mi criterio demasiado desarrollo ya que he visto que esta labor es muy bien practicada por los profesionales, pero donde he detectado fallas es al momento de la búsqueda y del levantamiento. En el primer caso, es necesario una buena entrevista con familiares de la persona fallecida, o con alguna persona que pueda explicar sobre la presencia, en algún lugar de la vivienda, de elementos de valor o dinero y que puedan haber sido sustraídos, por consiguiente, el acercamiento del autor a este lugar y estampado de sus huellas dactilares es posible. También juega un papel importante la habilidad del perito para inferir, imaginarse o interpretar los posibles lugares de búsqueda, partiendo por ejemplo de su experiencia. No olvidar que producido el hallazgo y posterior revelado por acción de reactivos y previo a su recolección debe existir el fotografiado, con el objeto de prevenir una posible pérdida o deterioro de la huella al momento del levantamiento, el cual debe realizarse con su respectiva identificación, ya que imagínense un archivo fotográfico conteniendo 20 placas de huellas dactilares, sin ninguna referencia, éstas serán fácilmente confundidas y cuestionadas, debido a que no habrá serios fundamentos para explicar el lugar exacto del hallazgo. Este último es el error más frecuente que se ha detectado y al que muchos profesionales —de la defensa— recurren al momento de cuestionar el rastro dactilar que vincula a una persona. He aquí un ejemplo, imaginemos que el homicidio ocurrió en una casa donde en la parte anterior funciona un negocio, si se revelan 5 rastros papilares, y en el acta de levantamiento solamente se consigna «se encontraban en el interior del domicilio» y así se especifica para todos, en el ítem «lugar de recolección», al momento del juicio la defensa expresará, «ese rastro es de mi cliente —ya que una identificación positiva es prácticamente imposible cuestionar—, pero estaba en el sector del comercio, y es normal que así sea, ya que mi defendido concurrió a realizar una compra».

- El dibujante, posee una labor de vital importancia, no solamente para efectuar la fijación del indicio, es decir, plasmar en un croquis la ubicación exacta de los elementos de interés criminalístico, sino que debe pensar en el trabajo que se

efectúa a posterior, lo que se conoce como «reconstrucción de la mecánica del hecho», donde adquiere importancia el trabajo efectuado por este profesional.

● Auxiliares, uno de ellos cumplirá su actividad al lado del coordinador, siendo en muchos casos, la persona que efectúa una valoración distinta a la adoptada por el líder del equipo. Es el encargado de cumplir con las tareas de llenado de la documentación que acompaña al indicio, de su correcta recolección y acondicionamiento, haciendo cumplir con las normativas legales dispuestas al respecto. El segundo auxiliar, que cumple sus funciones en el laboratorio móvil, es decir su ingreso a la escena es prácticamente nula, será el que proporcionará el apoyo logístico al equipo de trabajo, ejemplo, entre otras tareas, acondicionamiento y encendido del generador eléctrico, ante la llegada de la noche, o será quien efectúe la inspección ocular desde el lado externo de la escena, realizándola a simple vista o con ayuda de instrumental como ser un «dron», que permite visualizar zonas altas, como ser techos de casas, transmitiendo a posterior, el resultado de esta tarea al coordinador.

ESTABLECER LA AUSENCIA DE ELEMENTOS DE PROPIEDAD DE LA VÍCTIMA

El profesional que esté afectado a la inspección ocular, en determinado momento de su trabajo deberá detenerse para establecer si en el lugar existen elementos que estén faltando. Esto es muy importante, ya que posee amplias repercusiones, por un lado, para una correcta calificación legal, entonces el perito deberá ilustrar correctamente al Fiscal o Juez, ya que no resulta lo mismo un homicidio sin otro acontecimiento, que un robo donde se mata a la persona para ocultar el primer delito. Si bien la calificación es un acto exclusivo de la autoridad Judicial, la correcta ilustración de lo acontecido es parte de la actividad del perito que observa el lugar del hecho. Por otro lado, resulta de vital importancia establecer los elementos que están faltando, ya que éstos podrían ser indicios que se encuentren en la casa del sospechoso, y en consecuencia sería un gran paso en la investigación. Si el licenciado no está interiorizado de las cosas ausentes en el lugar, o no posee un bosquejo de las formas que poseen o características que las identifican, muy posiblemente estén al frente de sus ojos, y no las va a reconocer. Por ello esta actividad es de suma importancia, aunque actualmente es dejada de lado y no se realiza ningún intento por desarrollarla. Como se dijo, se podrá entrevistar a una persona que conozca el inmueble, ejemplo un familiar, amigos o persona unida sentimentalmente, donde se solicitará detalles, anotando inmediatamente los mismos, si considera oportuno, con ayuda de un dibujante realizar un bosquejo del elemento e inclusive en estas épocas en donde gran parte de la vida de las personas están registradas en un celular, posiblemente se tenga una imagen del elemento. Si no existe una persona que pueda aportar esta información, se deberá agudizar la búsqueda, realizar ciertas valoraciones, como por ejemplo: leer todo tipo de factura por pago de servicios, comprobante de compras, de arreglos, etc., ya que si encuentro una factura por la compra de una notebook, y una factura por el pago de servicio de internet, pero no encuentro en el lugar el mencionado instrumento, evidentemente éste falta, y se deberán realizar dos acti-

vidades, por un lado dar aviso a los que están realizando la tareas investigativas, a fin de que puedan preguntar a algún allegado si sabe por ejemplo que fue llevado a un servicio técnico, o si se la facilitó en calidad de préstamo a alguna persona, y si no resulta información sobre el paradero, evidentemente el material ha sido sustraído. Ya tengo establecido el faltante de una notebook, pero alguien preguntará y ¿qué datos tengo para individualizarla?, entonces recurrimos a las facturas emitidas por el comercio que la vendió, en donde se colocan datos técnicos específicos y si no fuera así, muchas personas tienen la costumbre de guardar las cajas en las que vienen embaladas, conteniendo en su interior la documentación, precaución que se toma en caso de ser necesario utilizar la garantía, y desde allí también se puede extraer información.

Otra manera de trabajar en este sentido es observar detenidamente los muebles, parte superior o especialmente estantes, en muchos casos una fina capa de polvo o tierra recubre a la superficie, pero se logra apreciar que un espacio, el que inclusive posee forma, no está cubierta por el mencionado polvo, debiendo entender entonces que allí falta algo; ahora nos resta establecer de qué se trata, para ello interpretar en qué sector de la casa está el faltante, como por ejemplo si estoy en la cocina posiblemente se trate de un artefacto destinado al uso en la elaboración de comida, sumado a que la forma del diseño es rectangular y de un tamaño determinado, que nos podría ayudar a inferir que lo que allí está ausente es un «microondas» o similar, entonces el paso siguiente será buscar la caja en la que vino contenido e inclusive, entre los papeles podríamos hallar el recibo de compra o la factura de la garantía.

En consecuencia si fuera necesario, en determinando momento, se podrá solicitar, en el interior del inmueble, la presencia de un familiar o amigo, etc., quienes están al tanto de las pertenencias que poseía la víctima, con el objeto de tener un pormenorizado detalle de las cosas que están faltando en la casa, descripción de las características que lo identifiquen, por la más simple y sencilla razón: los peritos que están en la escena, nunca antes estuvieron presentes en esa casa, por lo tanto no pueden saber si a la víctima le falta algo, aunque recurran a métodos de pura interpretación, que no dejan de ser efectivos.

Hasta el momento hemos hecho mención a cosas que por su tamaño, son fácilmente transportables, o pueden ser reducidas en el mercado negro sin mucho impedimento, pero si en el lugar se encuentran boletas por el pago de impuesto del automotor, o pago de combustibles, evidentemente hay un vehículo o motovehículo que está ausente en el inmueble. Esta información deberá ser compartida con los demás actores que trabajan en la investigación, y se realizará en ese momento, sabiendo que los tiempos en esta etapa son muy importantes. Por ejemplo, si determinamos la presencia en el lugar de documentación que certifique un vehículo a nombre de la víctima, donde consta marca, modelo, color e inclusive chapa patente, los encargados de la investigación podrán realizar una innumerable cantidad de diligencias tendientes a la ubicación del mismo, como ser registro de cámaras de seguridad instaladas en la vía pública —de inmediaciones—, cámaras instaladas en comercios cercanos que estén dirigidas hacia la calle, e inclusive recomendar su búsqueda a los móviles policiales que circulen en trabajos de prevención, hasta recabar información

respecto a si el vehículo se encuentra actualmente en disputa, dato de importancia, cuando no se tiene ni una mínima pista en cuanto al agresor.

EVIDENCIA QUE AYUDE A ESTABLECER LA FORMA DE VIDA DEL EXTINTO

Pensar que, con el levantamiento de una huella de pie calzado, de materia orgánica u otra evidencia es suficiente para ayudar al esclarecimiento del hecho, y que como grupo de criminalística he cumplido con mi labor, es caer en la antigua forma de pensar y trabajar. No dudo que resultará de vital importancia la tarea desarrollada, que el hallazgo es trascendental y que una vez sometido a estudio brindará información de calidad, pero sólo lo será siempre y cuando se encuentre a la persona con quien cotejar, mientras tanto es eso, ni más ni menos, información cuyo resultado está supeditado al confronte con material procedente de un sospechoso. Justamente es hacia donde se debe avanzar, en llegar al posible autor, para lo cual se deberá desde el lugar del hecho procurar la localización de indicios que ayuden a establecer líneas de investigación y en consecuencia a la búsqueda del posible autor o autores.

Analicemos el siguiente planteo, «se encuentra el cuerpo de una persona sin vida, en su departamento», todos los indicios indican la existencia de un homicidio, uno de los interrogantes es ¿quién es el autor?, como se verá aparecerá una lista muy amplia de los posibles involucrados, la finalidad de la presente forma de llevar adelante «la inspección», es reducir ese listado, transformándolo en uno más acotado. Sé que los familiares del extinto no estarán muy de acuerdo en que se incursione en la forma de vida del fallecido, pero es una práctica muy necesaria.

Así como se busca una huella dactilar, el profesional deberá leer cada uno de los papeles que posee el fallecido, especialmente aquel que guarda en sectores considerados, a criterio del que busca, como de índole personal; una vez hallado deberá darle la interpretación y valor necesario. En el contexto de una persona de sexo masculino cuyo cuerpo es encontrado en el interior de su departamento, la documentación observada en el lugar será muy variada, entre otros podrán ser, por ejemplo:

- Factura emitida por un comercio, donde consta fecha y hora de realizada la compra, inclusive la cantidad de productos: con este simple papel ubico a la víctima en determinado día, hora específica, lugar exacto e inclusive una valoración de la cantidad de mercadería nos podría dar la idea de qué compro para él o estaba acompañado —por ejemplo: dos hamburguesas, da a entender de que está siendo visitado por alguien—. No es menor la oportunidad de llegar al comercio, teniendo la posibilidad de registrar las cámaras de seguridad, en fecha y hora específica, donde muy posiblemente se podrá ver a la víctima y posible compañero, ya que un lugar donde seguramente están dirigidas las cámaras es la línea de caja y por donde necesariamente deben pasar los consumidores. Reitero, un simple y sencillo ticket, la información que brindó es de un inmejorable valor a la investigación, y salió del lugar del hecho y debió ser encontrada al momento de practicar la inspección ocular, por el profesional que la realiza, es allí a donde se dirige este trabajo.

- Veamos otro ejemplo: «si se encuentran tres tickets de un cine, al analizarlo observo que corresponden a un determinado día de la semana, coincidentes en el horario de concurrencia, tratándose de películas del tipo condicionadas». Ahora es el momento de analizar con el equipo de trabajo, sumando a los encargados de la investigación y compartir los primeros resultados de los indicios hallados, que es «estamos ante la presencia de un masculino que determinado día de la semana, concurre a un horario específico, a ver películas del tipo condicionadas». El análisis permitirá adoptar una línea de investigación sobre lo informado ya que el posible autor podría estar entre el grupo de personas que concurren al cine, determinado día de la semana y a una hora establecida, con el propósito de ver cierto tipo de película, en consecuencia, ese amplio listado que tenía al inicio se disminuye drásticamente y se logró a partir de la evidencia encontrada en el lugar del hecho.

TIEMPO DE PRODUCIDA LA MUERTE

Uno de los planteos que se presenta al inicio de toda investigación es establecer «el tiempo de muerte», circunstancia que por muchos años y hasta la actualidad, es dejada en manos exclusivamente de los médicos. Establecer un tiempo más aproximado, con amplios fundamentos, o disminuir el rango horario que los profesionales médicos establecen, es una tarea en la que otros actores pueden colaborar, en muchos casos con datos ciertos y valederos. El médico forense expresará el tiempo estipulado en base a los conocimientos que adquirió con su experiencia y principios científicamente fundamentados, el investigador aportará a esta tarea, tras haber corroborado testimonios de vecinos que afirman haber visto a la víctima por última vez determinado día y hora, hasta inclusive indicando el lugar; y el técnico en criminalística, que está trabajando en la escena a partir de lo hallado en el lugar, como ser tickets en los recipientes destinados a los residuos o volantes que se encuentren sueltos en algún sector de la vivienda. Los ejemplos a los que podemos recurrir son variados, pero aquí menciono algunos, que han dado resultado en investigaciones que me tocó intervenir: de la lectura de toda documentación que se encontró se desprende que la última extracción desde un cajero de entidad bancaria, la víctima la realizó determinado día, a hora establecida y en lugar indicado, por lo tanto sé que el extinto, por lo menos hasta esa fecha y hora estuvo con vida, luego un ticket que se realiza por el cobro medido de estacionamiento en las calles de una ciudad, donde figura el dominio del rodado, fecha y franja horaria y estos boletos poseen un número que identifica al talonario de donde proviene, una simple entrevista con personal municipal indica el nombre de la calle a la que pertenece, nuevamente posiciona a la víctima ubicado en tiempo, realizando una actividad, en consecuencia, por lo expuesto la conclusión será:

- El médico forense indica que el tiempo de muerte, en base a los fundamentos médicos, es tal.
- El personal a cargo de la investigación establece que la víctima fue vista por vecinos, familiares, amigos, etc., por última vez en determinada fecha y hora.

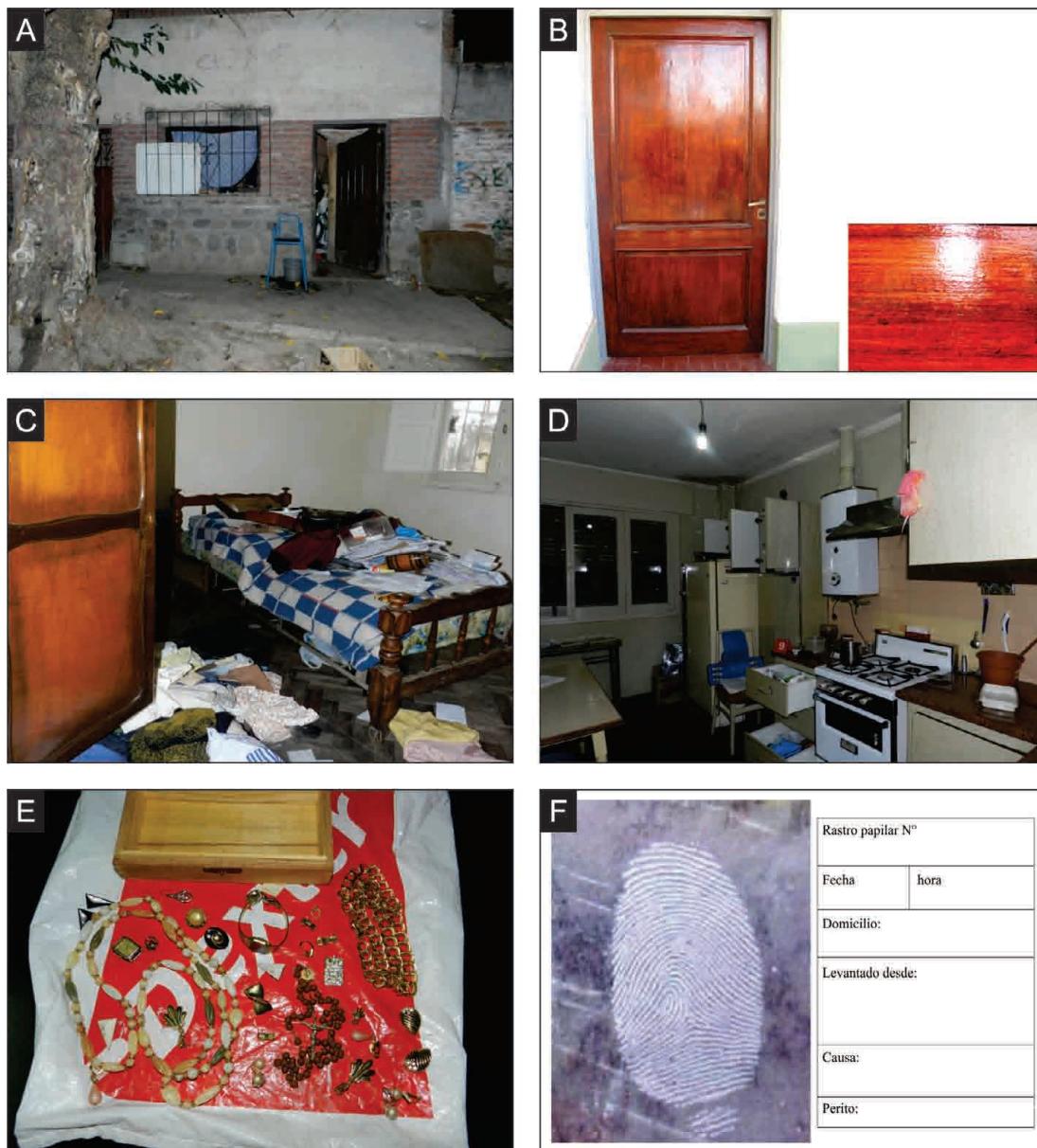


Figura 1. Escenarios criminalísticos. A) El licenciado en criminalística debe tener la capacidad de extraer la mayor cantidad de detalles de esta escena, aunque no parezca que aporte al esclarecimiento del hecho. B) Fotografía de una huella de pie calzado, sobre una puerta. Aunque se trate de un parcial, debe ser documentada, tal vez en esa pequeña porción se encuentre la característica que identifique al calzado. C) En esta escena trabajará en primera instancia el perito en rastros, en búsqueda de huellas papilares. El licenciado en criminalística, hará un análisis —con ayuda de algún allegado a la víctima—, para establecer la falta de algún elemento de valor. Por último esta circunstancia —la del signo de desorden en búsqueda de elementos de valor—, debe ser informada al Juez o Fiscal interviniente, con el objeto de una correcta calificación legal. D) Se aprecian signos de búsqueda en este sector; una amiga de la víctima informó que “en algún mueble guardaba sus joyas” e hizo una descripción y un dictado del diseño de las mismas. E) Secuestro realizado en la casa del sospechoso; fue importante el dibujo del diseño de algunas piezas —realizado por el técnico de criminalística—, con datos aportados por testigos. F) Rótulo para levantamiento de rastro papilar.

- Y el licenciado en criminalística, por intermedio de la documentación hallada en el lugar, puede decir que la víctima ha registrado su última actividad en determinada fecha y hora.
- El análisis de todos estos resultados se pondrá a consideración de la investigación, siendo un paso sumamente importante, establecer con el menor grado de error, el tiempo que lleva fallecida la persona.
- Como se verá, es necesario asignar a un auxiliar, a la búsqueda, lectura y registro de toda documentación que se encuentre, ya que su contenido brinda un sinnúmero de datos de relevante valor a la investigación.
- A esto se podrá sumar, siempre y cuando exista material útil para su estudio —por ejemplo fauna cadavérica—, el veredicto del especialista en Biología Forense u otras disciplinas que también colaboran con la determinación del tiempo de producido el deceso.

RECONOCIMIENTO DE INDICIOS ÚTILES AL ESCLARECIMIENTO

Existen dos formas de pensar, o por lo menos así lo entiendo; por un lado están aquellos grupos de criminalística que acostumbran a recolectar todo lo que es apreciado como potencial evidencia, y los que son más selectivos. El primero piensa que es preferible tenerlo preservado, aunque no sea sometido a estudio, y el segundo que solamente traerá lo que será objeto de análisis y brinde información relevante. Ambos casos tienen sus ventajas y sus fundamentos son entendibles, pero lo que «no se debe dejar de realizar es un análisis e interpretación en el lugar». Aquel que trae absolutamente todo puede caer en el desacuerdo de «recolectar muestras» que nada tienen que ver con el hecho investigado, ejemplo en una plaza, donde por su ubicación brinda la posibilidad de encuentros sexuales, y se apreciaron tres preservativos, dos de los cuales estaban con suciedad, adheridos a la superficie, deteriorados por la acción del sol, pero aun así fue colectado, evidentemente incorporará al hecho dos posibles sospechosos más, que ante la luz del estado de los indicios no tendrían que haber sido considerados; esto es lo que denomino «muestra basura», es decir traer indicios sin efectuar un análisis e interpretación en el lugar y que solamente perjudicará a la investigación.

DOCUMENTACIÓN QUE ACOMPAÑA LOS INDICIOS

Tan importante como identificar e incautar indicios que resulten de utilidad para el esclarecimiento del hecho, es hacerlo respetando todo procedimiento legal que así lo acredite; es de vital importancia acatar lo que indica el código procesal penal de cada provincia o jurisdicción. Actualmente existen diferentes formularios a completar, con datos que se deben llenar, generalmente de manera manual, pero si hay algo que estoy en condiciones de recomendar es que «la elaboración de los proyectos para rótulos, formularios, planillas de cadena de custodia, etc. deben ser realizados

por los profesionales que hacen el trabajo de campo», no dudo de la capacidad y creatividad de aquellos funcionarios que con buena predisposición podrían aportar al respecto, pero quien no trabaja en el lugar del hecho, está muy lejos de entender el por qué de algunas cosas, de la necesidad de resumir trabajo, de acotar tiempos, etc., he aquí, un listado de las dificultades que afrontan los que desarrollan sus actividades en la escena del crimen:

- Inclemencias climáticas.
- Peligrosidad de la zona.
- Escasa colaboración de testigos.
- Enojo de la comunidad donde se desarrolló el hecho.
- Familiares de la víctima alterados.
- Escasos integrantes del grupo de trabajo y gran cantidad de tareas a desarrollar.
- Avances inmediatos en la investigación y necesidad de intervención del grupo en otro escenario.

Tal vez este listado pueda ser superado ampliamente con facilidad, se trata de reflejar algunas de las circunstancias que sólo los que trabajan en el campo, llegan a entender, y saben de la necesidad de que «la documentación que acompaña los indicios debe ser solamente la indispensable y necesaria», conteniendo datos que relacionen al material incautado con el hecho investigado. Teniendo en cuenta algunos aspectos de la Resolución N° 197/11 de la Procuración General de la Provincia de Salta, puede considerarse que la siguiente documentación resulta ampliamente suficiente:

Rótulo

Podrán estar impresos en los sobres de papel, cajas de cartón o recipiente acondicionado a tales efectos, o simplemente formularios que estén libres para posteriormente adherirse al soporte, lo importante es «que estén firmemente adheridos», por lo que su desprendimiento dejará una muestra sin identificación y un rótulo sin muestra. Mi experiencia sugiere que este rótulo esté impreso en el sobre o caja, debiendo contar con la siguiente información (Figura 2):

- **Evidencia (1):** cuando el equipo de criminalística se retira del lugar, debe corroborar que en el acta de incautación figure la misma cantidad de sobres o paquetes que se están llevando. En algunos casos este número coincide con el número de referencia que se coloca durante la inspección ocular, pero no es la regla. Hay indicios que es señalada con un indicador, pero no es recogida, ejemplo: referencia N° 1 una colilla de cigarrillo —si se incauta—, N° 2 una mancha de sangre —si se recoge—, N° 3 una huella de pie calzado —a esto solamente se lo documenta fotográficamente—, es decir, físicamente no es recogida.

- **Fecha y hora (2):** corresponde a la fecha y hora de recolección. Dato muy importante al momento de valorar los resultados de un estudio, ya que el tiempo

INDICIO N° (01): _____	FECHA (02): ____ / ____ / ____	HORA (02): _____
CAUSA (03): _____		
CARATULA (04): _____		
DEPENDENCIA (05): _____		
EVIDENCIA (06): _____		
LUGAR DE HALLAZGO (07): _____		
OBSERVACIONES (08): _____		
PERITO (09): _____		

Figura 2. Rótulo para la identificación de un indicio.

transcurrido desde el momento de producido el hecho, podría tener significativa influencia en la conservación de la muestra. Ejemplo un homicidio ocurrido con utilización de un arma de fuego, y el mismo se produjo a horas 12:00, en tanto que la detención del posible autor se concretó a horas 23:00, existiendo un lapso de 11 horas, donde esta persona pudo haberse higienizado, cambiado de ropa, etc. Se efectúa la recolección de residuos de disparos en ambas manos, y una vez efectuado el correspondiente estudio, el resultado es negativo a la presencia de partículas del tipo características o consistentes, y ello no implica que no haya sido el autor, sino que se deberá valorar el tiempo transcurrido y la posibilidad que tuvo de eliminar la evidencia en sus manos.

- **Número de causa**, expediente, sumario penal, acta de prevención, acta única, o como en cada jurisdicción así lo llamen (3): éste resulta ser un número muy importante para luego vincular al indicio con el hecho que se investiga, pero resulta que no siempre se tiene conocimiento desde el inicio, por lo que es asignado momentos después, pero contar con el mismo resulta de vital importancia.

- **Carátula del hecho y víctima** (4): Se trata de una asignación inicial, no considerándola como definitiva hablando desde el punto de vista de caratular el hecho. Respecto a la víctima, serán necesarios nombre y apellidos, agregando edad. Estos datos, al igual que el número de expediente, son necesarios a los efectos de identificación del indicio y relacionarlos con un hecho.

- **Dependencia** (5): es muy importante a los fines de la identificación de la muestra, en nuestro ámbito existen una gran variedad de dependencias —la mayoría policiales— que inician el año, con el número de acta de prevención o sumario penal, etc., N° «00», por lo que existen tantas actas con un mismo número como cantidad de Dependencias hubiere en una misma jurisdicción, siendo en consecuencia necesario identificar de dónde proviene ésta.

● **Descripción del indicio** (6): debe resumirse en algo muy preciso, con datos que identifiquen al elemento, esto último es lo valioso de la descripción, ejemplo un pantalón de tela jeans, color azul, marca Rin rin, talle 40, es muy genérico, pero si a ello se le agrega «que posee una rotura en el bolsillo posterior derecho, más un desgaste en la botamanga izquierda, parte posterior», así se comienza a identificar una pieza como única. No deben olvidarse que los depósitos de almacenamiento de muestras poseen una gran cantidad de elementos de similares marca, modelo y color, un simple movimiento de muebles puede llegar a mezclarlas, por lo que es muy útil que estén identificadas con características propias.

● **Lugar de hallazgo** (7): muchos insisten en colocar «el lugar del hecho» pero ese dato se puede obtener desde otro informe, lo que se está rotulando aquí es un indicio, por lo que corresponde es agregar datos relacionados el material incautado. Es incorrecto colocar, Lugar de recolección: interior del inmueble sito en calle San Martín 456, y así especificar en todas las muestras recogidas, ya que es un término muy genérico, lo correcto y adecuado es especificar el lugar exacto donde la muestra fue observada y posteriormente levantada.

● **Observaciones** (8): es un ítem que generalmente queda en blanco, no muy utilizado, pero aquí se podrán especificar datos muy importantes relacionados al estado de la muestra, que ayude a su correcta conservación. Inclusive se podría resaltar con color rojo, alguna anomalía que posea el material preservado y que en el lugar del hecho no se pudo salvar. Ejemplo contiene elementos con extremos o puntas muy filosas.

● **Perito** (9): nombre y apellido del perito, técnico o profesional que intervino en la recolección.

Registro de continuidad de indicio y derivadas (planilla cadena de custodia)

Es conocida como «planilla cadena de custodia», tiene por finalidad crear una hoja de ruta, saber por qué Sección de Laboratorio pasó, qué profesional estuvo en contacto con la muestra, qué estudios se practicaron y mucha otra información de interés (Figura 3). Para lo cual, los datos que deberá contener esta planilla, a mi criterio, deben ser:

● **Indicio** (1): más que fundamental, realizar una descripción del material, al cual pertenece la planilla, ya que se trata de una hoja independiente. Esto es para relacionar la muestra con la planilla y en sentido contrario. Fundamental y no puede pasar por alto al técnico que está completando la misma, es que la descripción del indicio debe ser de igual forma que se describió en el acta de incautación.

● **Fecha y hora** (2): aquí se consigna fecha y hora en la que el técnico procedió a la recolección de la misma, luego será fecha y hora en la que se procede a la apertura del sobre para realizar el estudio encomendado, y así sucesivamente.

● **Nombre y apellido** (3): del perito, técnico o persona que entra en contacto con la muestra, no solamente quién analiza, sino también quién efectúa por ejemplo

REGISTRO DE CONTINUIDAD DE INDICIOS Y DERIVADOS
(Planilla cadena de custodia)

Indicio (01):	Fecha (02)	Hora (02)	Nombre y apellido, de quien colecta o recibe la muestra (03)	DNI (04)	Organismo al que pertenece (05)	Calidad en la que actúa (06)	Propósito de recolección o traspaso (07)	Observaciones (08)	Firma (09)
Indicio derivado (10):	Detalle del lugar exacto donde se encontró el indicio derivado (12)	Nombre y apellido del profesional que la encontró (13)	Observaciones (14)	Observaciones (14)	Observaciones (14)	Observaciones (14)	Observaciones (14)	Observaciones (14)	Observaciones (14)
Fecha y hora del hallazgo (11):									

Figura 3. Registro de continuidad de indicios y derivados.

el traslado de la misma. Existen modelos, donde solamente se admite que sea completada por aquel que incautó y a posterior solamente por aquellos profesionales que efectúan la apertura del sobre y análisis de la misma. Pero si fuera así, en la cadena figurará un espacio de tiempo donde pareciera que estuvo en el aire y la realidad indica que se encontraba conservada en un depósito a la espera de la realización del análisis.

- **Documento de identidad (4):** de la persona que entró en contacto con la muestra o efectuó traslado.
- **Organismo al que pertenece (5):** es decir a qué Departamento, Gabinete o Sección, a donde ingresó la muestra; generalmente guarda relación con el profesional que indicó su nombre y apellido.
- **Calidad en la que actúa (6):** podrá ser como técnico, perito, para el caso de estudio, o como personal que sólo efectúa el traslado.
- **Propósito (7):** es decir la razón por la que la muestra ingresa, puede ser análisis, resguardo o traslado.
- **Observaciones (8):** dato importante, es hacer saber si la muestra o paquete ingresa con alguna anormalidad.
- **Firma (9):** rúbrica del profesional, perito o persona.

Indicio derivado

En el lugar del hecho donde se produce la incautación del indicio, existe una observación inicial, podríamos decir del tipo macroscópico, sin detalles, debido a que no es conveniente efectuar una exhaustiva manipulación que podría generar una contaminación o perder material que venga adherido. Una inspección detallada se da en el laboratorio, ejemplo en una prenda, donde se extreman las medidas de seguridad para el profesional y en relación con la preservación de la muestra analizada. Posiblemente adherido a la ropa, podría apreciarse un pelo, esto sería un indicio derivado; o se encuentra en el ruedo de la botamanga de un pantalón un chip para celular, al que también se le daría esta categoría. El sector asignado a este tipo de material incautado debería completarse de la siguiente manera:

- **Indicio derivado (10):** se efectúa un detalle del material observado, agregando especificaciones que lo identifiquen, ejemplo se encontró (1) un pelo, al que se lo podría identificar con el color y longitud del mismo, y no solamente generalizar con la descripción «(1) un pelo».
- **Fecha y hora de hallazgo (11):** sin más explicaciones, corresponde a la fecha y hora de que fue observado y preservado.
- **Detalle del lugar exacto** donde se encontró el indicio derivado (12): Esto es muy importante, a los fines de darle un valor e interpretación al material observado, y puede ayudar entre otras situaciones, a aconsejar su análisis o no.
- **Nombre y apellido del profesional que la encontró (13):** en muchas oportunidades, el análisis se realiza con intervención de más de un técnico, por lo que es aconsejable detallar a ambos profesionales.

- **Observaciones** (14): siempre se indicará sobre alguna anomalía que presente, y que, por ejemplo, pueda producir su alteración o deterioro.
- **Firma** (15): del profesional que produjo el hallazgo.

Acta

El nombre que se le asigna puede ser «acta de incautación», «acta de secuestro», u otra forma similar, pero lo importante es que la misma debe ser labrada en el lugar del hecho, y en presencia de testigos hábiles, que acrediten la veracidad del acto que se está realizando, es decir de la incautación del indicio, donde ellos observarán desde qué lugar están siendo recogidas, el método utilizado y las condiciones en las que se preservan. Este documento posee un valor fundamental, en la tarea que desarrolla el equipo de criminalística, por lo que se deberán respetar todos los protocolos que se indican respecto a la forma de realizarlo. Un detalle que no puede pasar desapercibido es que los testigos deberán estampar su firma, si la misma sólo fuere una rúbrica, se le solicitará la correspondiente aclaración.

MOMENTO DE LIBERAR LA ESCENA

Finalizado el trabajo, el licenciado a cargo de la inspección sugerirá al Fiscal que se mantenga preservado el lugar hasta tanto se llevan otras medidas y se obtengan los primeros resultados, como ser, finalización de la autopsia, primeras declaraciones o información del relevamiento de testigos realizado por personal a cargo de la investigación. Este es uno de los motivos por el que solamente un equipo de criminalística debe trabajar en el lugar, y ser quienes efectúen el relevamiento total, procediendo a extraer la totalidad de la información que se encuentre en la escena, dejando que solamente un mínimo de personas ajenas al relevamiento (como el fiscal, o personal de investigaciones) ingresen; ejemplo resulta imprudente que accedan ocho personas del área de investigaciones o que el médico lo haga con tres ayudantes, pues una innecesaria contaminación se va generando, siendo que el tratamiento de la escena continuará por varias horas más. Si de las primeras diligencias resulta que no existe motivo para mantener preservado el lugar, esto se informará al Fiscal actuante, para que disponga al respecto.

REUNIÓN DE TRABAJO

Paso fundamental, que no puede dejarse de lado o reprogramarse para otra etapa, debe efectuarse a la brevedad ya que allí se propondrán y tomarán decisiones muy importantes relacionadas al futuro de la investigación. Intervendrán los equipos que trabajaron, personal de investigaciones, plantel de criminalística, médico legal, fiscal, auxiliares y sumariante. Cada uno presentará el hecho desde el punto de vista

que le tocó actuar, con ayuda de imágenes y haciendo una primera valoración. El intercambio de información resulta de vital importancia.

A continuación, se establecerán o sugerirán por parte del personal de criminalística los estudios que podrían realizarse sobre el indicio recolectado. Esta es otra actividad a la que el licenciado no está acostumbrado a realizar y me pregunto: ¿Quién sería la persona más adecuada para sugerir qué tipo de estudio se debe practicar sobre un indicio? No es una facultad única y exclusiva del técnico que practicó la inspección, pero considero que es fundamental escucharlo, ya que es esta persona quien estuvo en el lugar, el que percibió ese elemento, quién le dio una interpretación —como para ser seleccionada—, lo vinculó con el hecho atento a su ubicación, a su estado de conservación, etc., sumado a que él sabe en qué estado se encuentra y por consiguiente informará para darle un orden de prioridad, con el objeto de evitar su deterioro, por éstas y varias razones más, considero que es la persona adecuada, para sugerir los estudios a practicar. A continuación, estas sugerencias deberán ser escuchadas por otros profesionales, como ser los técnicos que específicamente realizarán el análisis y expresarán si es probable que el estudio propuesto se lleve adelante, debiendo valorar si se cuenta con el instrumental adecuado y los profesionales necesarios. En esta reunión el Fiscal o Juez, al escuchar a los diferentes técnicos, dispondrá sobre la realización del estudio e inclusive dará otra directiva.

Seguidamente se establecerá un plan de trabajo. Es necesario seleccionar las primeras muestras que, conforme a un pormenorizado análisis, son indicadas como las que aportarán los primeros resultados a la investigación. En principio se tratarán aquellos indicios que sin lugar a duda brindarán excelente información, luego están las que son consideradas como una segunda opción, e inclusive habrá muestras que no serán sometidas a análisis.

El plan de trabajo tiene dos objetivos, por un lado, dar un orden a la investigación, que conlleva valorar el indicio que brinda información transcendental, dejando de lado resultados «basura» que sin lugar a duda harán un severo daño al trabajo, incorporando datos inciertos, pistas falsas, confusión y, en segundo lugar, lograr un adecuado uso de los recursos tanto humanos como logísticos que poseen los laboratorios.

Espero haber logrado transmitir la visión que poseo sobre la participación del equipo de criminalística en el lugar del hecho y, en consecuencia, la labor que asigno a los profesionales, quienes deberán dejar de lado aquel viejo concepto y trabajo asignado, pasando a desarrollar una actividad más protagónica, pero esto sólo es alcanzable si se efectúa un giro en la forma de desarrollar la inspección ocular, y avanzar hacia una mirada integradora y progresista.

LITERATURA CITADA

Resolución N° 197 de la Procuración General de la Provincia de Salta, Manual de Procedimiento del Sistema de Cadena de Custodia. (2011) Salta, Argentina.
Recuperado de <http://www.fiscalespenalesalta.gob.ar/cif/>

La botánica y su aplicación en las ciencias forenses

Olga Gladys Martínez

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta e Instituto de Bio y Geociencias del Noroeste Argentino (IBIGEO-CONICET), Av. Bolivia 5150, (4400) Salta, Argentina.
martinezog@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El hombre interactúa con las plantas desde sus orígenes, no solo porque ellas aportan alimentos, sino también fibras, madera y sustancias químicas, entre otros productos que son utilizados para mejorar su calidad de vida. Entre las plantas que nos rodean (terrestres o embriófitas), existen dos grandes grupos: las briofitas o plantas no vasculares (musgos, hepáticas y antoceros) y las plantas vasculares, superiores o traqueófitas, caracterizadas por presentar órganos diferenciados en raíz, tallo y hojas, y poseer sistemas de conducción definidos para transporte de agua y nutrientes. Entre estas últimas encontramos, pteridofitas o plantas sin semillas (licopodios, equisetos y helechos) y espermatofitos o plantas con semillas que a su vez pueden o no tener flores, angiospermas y gimnospermas (cicas gingkos y coníferas) respectivamente.

En este vasto mundo vegetal, la botánica, es la ciencia que aborda el estudio de las plantas, sus estructuras externas e internas, la función de sus órganos, su diversidad e interacción con el medio que las rodea.

Una de las ramas de la botánica que se ocupa del estudio de las plantas para la solución de problemas legales, ya sean civiles o criminales, se conoce como botánica forense, esta disciplina constituye una herramienta de apoyo para elaborar hipótesis en la investigación de hechos delictivos a través del aporte de disciplinas como la morfología vegetal (se ocupa de las formas y los tejidos externos e internos de las plantas), la dendrocronología (estudia los anillos de crecimiento de los árboles y arbustos leñosos), la palinología (comprende el estudio de polen y esporas), la sistemática vegetal (se ocupa de la clasificación de la diversidad de las plantas), entre otras.

La validez de la botánica forense como herramienta generadora de evidencia para resolver crímenes ha tenido un desarrollo relativamente reciente (Bock y Norris, 1997). La evidencia botánica es importante cuando la escena del crimen y los hallazgos de la autopsia no son suficientes para definir la dinámica y la modalidad del crimen. La identificación de restos vegetales en diversos procedimientos forenses

requiere de especialistas en las diferentes disciplinas botánicas, en consecuencia el trabajo en equipo es necesario para abordar una investigación forense adecuada.

La botánica forense, así como la palinología forense contribuyen a relacionar a un sospechoso con la escena de un crimen, relacionar un elemento dejado en la escena del crimen o escena de descubrimiento con un sospechoso, relacionar un elemento en la escena de descubrimiento con la escena del crimen, probar o refutar coartadas, acotar una lista de sospechosos, determinar el historial de viaje de los artículos (incluidas las drogas), proporcionar información sobre el entorno del cual procede un artículo, proporcionar información sobre la fuente geográfica de los artículos, ayudar a la policía en sus líneas de investigación, facilitar la localización de tumbas clandestinas y restos humanos, aportar al descubrimiento del destino perimortem de una víctima, y contribuir a determinar el período de deposición de restos humanos (Mildenhall, 1990; Stanley, 1992; Szibor, Schubert, Schöning, Krause y Wendt, 1998; Milne, Bryant y Mildenhall, 2004; Wiltshire, 2004); asimismo contribuye a identificar plantas u órganos vegetales responsables de intoxicación o envenenamiento (Brown, 2004).

MORFOLOGÍA VEGETAL FORENSE

Las plantas florecen y fructifican en determinadas épocas del año, por lo tanto son de gran utilidad para datar la época y lugar geográfico de origen donde tuvo lugar un delito, o sobre si un sospechoso pudo haber estado en la escena del crimen. También son relevantes estructuras tales como hojas, raíces, tallos, frutos, semillas o flores que pueden encontrarse enteros o en fracciones. Los restos vegetales pueden estar adheridos al cuerpo, a las prendas o al calzado, o formar parte de restos estomacales o fecales. A partir de estas muestras botánicas que constituyen «evidencias físicas» de un hecho delictivo, es posible lograr la identificación de una planta y su procedencia.

Los órganos vegetales conspicuos más numerosos y evidentes en la naturaleza, son las hojas; estos órganos se caracterizan por su forma, tamaño, color, grado de división de la lámina, venación, indumento (pelos o tricomas y escamas), estructura interna, entre otros. En la mayoría de los casos es necesario contar con hojas enteras para identificar la especie vegetal a la que pertenece, sin embargo algunas estructuras microscópicas pueden contribuir al reconocimiento con solo observar fragmentos milimétricos. Así por ejemplo, en las hojas de *Inga sp.* (Fabaceae, Mimosoideae) se encuentran dos tipos diferentes de pelos o tricomas (glandulares y no glandulares) característicos de la planta (Fig. 1A), asociación que contribuye a su identificación. Además de la forma de los tricomas, su distribución (en una o ambas superficies epidérmicas), densidad, tamaño y organización sobre la lámina también son importantes. En algunas especies los tricomas se encuentran restringidos a las nervaduras y márgenes de las hojas (Fig. 1B), y en otras pueden encontrarse distribuidos uniformemente sobre la superficie de la lámina (Fig. 1C).

Algunas características epidémicas de las hojas y su estructura interna, pueden indicar el ambiente en el cual se desarrollan las plantas. La epidermis es el tejido

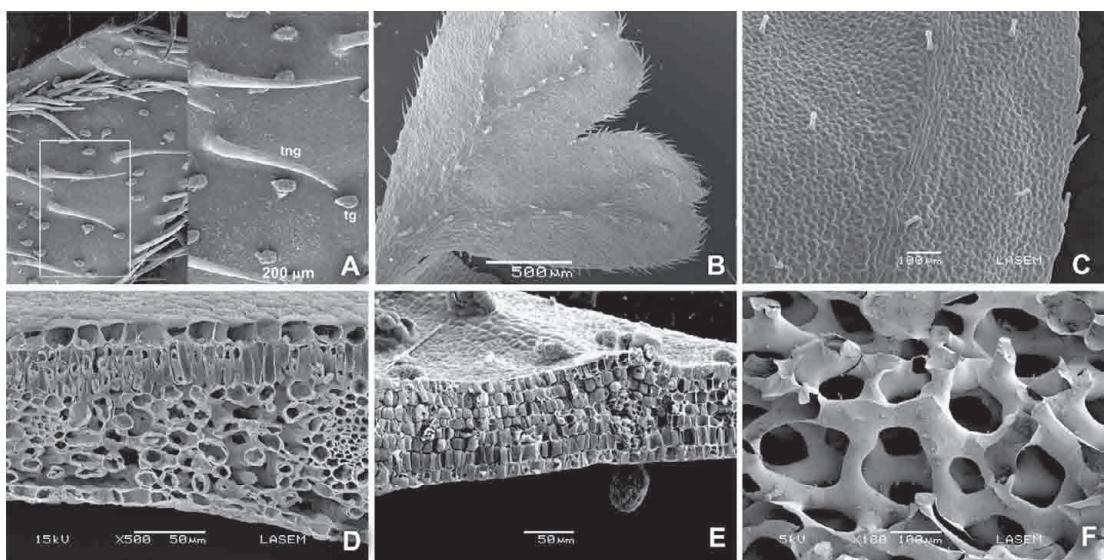


Fig. 1. Detalles de hojas, vistas con microscopio electrónico de barrido. A) Dos tipos diferentes de pelos o tricomas en *Inga* sp. B) Pelos sobre las nervaduras y margen foliar. C) Pelos sobre la superficie de la lámina. D) Mesófilo de *Heterophyllaea pustulata*. E) Mesófilo de *Inga* sp. F) Mesófilo de *Polytaenium lineatum*. Referencias: tg, tricoma glandular; tng, tricoma no glandular.

protector de las plantas, se encuentra interrumpida por poros llamados estomas, los que habitualmente se ubican en la cara inferior de las hojas. Los estomas elevados por encima de la superficie están asociados a las plantas hidrófitas o acuáticas y los hundidos a plantas de ambientes xéricos o secos. La forma de las células epidérmicas también puede estar relacionada con el ambiente, generalmente las plantas de ambientes xéricos tienen paredes anticlinales rectas y las de ambientes mésicos, donde las condiciones ambientales son moderadas, las paredes celulares son onduladas. Superficialmente la epidermis tiene una cubierta de sustancia lipídica denominada cutícula, su espesor es mayor en las plantas de ambientes xéricos. En la epidermis pueden observarse tricomas o pelos, y/o escamas en los helechos, de forma y tamaño muy variable; en general estas estructuras se encuentran con mayor frecuencia en plantas con períodos prolongados de sequía.

En muchos casos, la organización de los tejidos en las hojas se halla estrechamente relacionada con el lugar donde se desarrollan, y para su análisis solo basta un pequeño fragmento. En especies terrestres, en corte transversal de la lámina, se observa que el tejido dominante interno está formado por células con clorofila, denominado mesófilo. Según la forma y organización de sus células, el mesófilo puede ser heterogéneo, formado por un estrato de células elongadas fuertemente empaquetadas y otro con células irregulares sin un orden aparente y con espacios o cavidades entre ellas, tal como ocurre en la «cegadera» *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) (Fig. 1D), en otros casos el mesófilo puede ser homogéneo, con células más o menos semejantes, sin diferenciación en su organización, como se observa en las hojas de *Inga* sp. (Fig. 1E).

Las plantas que viven sobre los árboles o epífitas y las acuáticas, tienen adaptaciones que las diferencian de las plantas terrestres, el helecho *Polytaenium lineatum* (Sw.) J. Sm. (Vittariaceae) es una planta epífita con hojas con mesófilo casi

homogéneo, formado por células parenquimáticas braquiformes ensambladas que dejan espacios poliédricos entre ellas (Fig. 1F), muy diferente a otras plantas, lo que permite reconocerla fácilmente.

La venación de las hojas puede tener patrones de organización característicos en algunos grupos de plantas, a veces son visibles a simple vista, en caso contrario, es necesario extraer el contenido celular mediante técnicas de diafanización o clarificación (D'ambrogio de Argüeso, 1986) para su observación. Las venas simples y dicótomas (cuando se ramifican en dos ramas) son frecuentes en ciertos helechos (Fig. 2A) y en *Ginkgo biloba* L. (Gingkoaceae). La venación más compleja, en forma de retículo, se presenta en algunos helechos (Fig. 2B) y en la mayoría de las plantas como en «cebil colorado», *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul (Fabaceae, Mimosoideae) (Fig. 2C).

Un fragmento de la lámina de la hoja con venación reticulada, puede diferenciarse de otras plantas cuando se trata de una lámina fértil, debido a la presencia de soros en su envés. Los soros, llamados comúnmente «puntos negros», son estructuras donde se forman las esporas o unidades de reproducción de los helechos (Fig. 2B).

Otros órganos como la raíz y el tallo también pueden aportar información. La extensión de las raíces de las plantas y el desarrollo de crecimiento primario a secundario, brindan indicios del tiempo transcurrido, como así también aquellos tallos en los que se forman anillos de crecimiento, indican no solo el tiempo que demandó el crecimiento, sino también el efecto de factores ambientales o eventos ocurridos durante el período de su formación, como golpes o la acción del fuego.

Del mismo modo, micro-restos pueden contribuir a identificar ciertos vegetales, tales como tricomas característicos aislados de *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae) o *Erythroxylum coca* Lam. (Erythroxylaceae), asociaciones de restos epidérmicos, vasos de xilema, fibras, elementos esclerenquimáticos y cristales pueden aproximar a la identificación de ciertas familias, géneros y/o especies, particularmente en casos de material semi-digerido de contenidos estomacales y restos fecales.

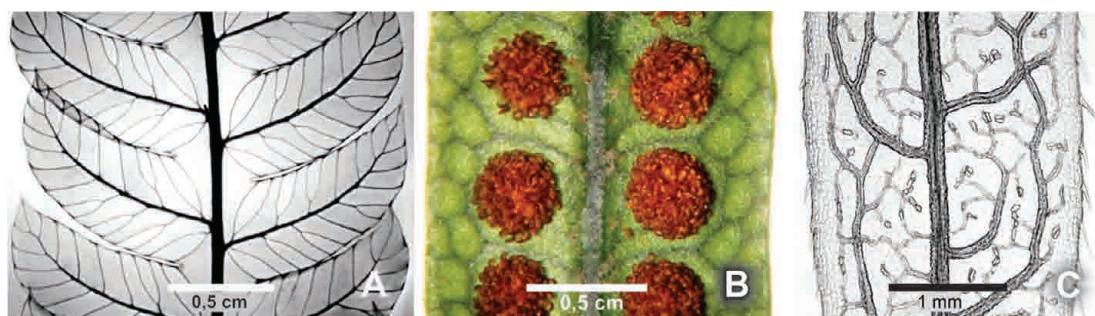


Fig. 2. Fotografías de láminas de hojas. A) Venación libre y dicótoma en hoja diafanizada de *Pteris* sp. B) Venación areolada de *Microgramma squamulosa*. C) Venación reticulada en hoja diafanizada de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*.

PALINOLOGÍA FORENSE

De las disciplinas botánicas, la palinología forense es la más desarrollada. Esta disciplina estudia el polen y las esporas (de musgos, helechos y hongos) que generalmente se encuentran asociadas a estructuras microscópicas denominadas palinomorfos. Según Giner Munuera y García Carrión (2012) los palinomorfos son restos fósiles o recientes, de origen biológico y naturaleza mayoritariamente orgánica, que están prácticamente en cualquier medio terrestre o acuático que podamos considerar, e incluyen una amplia variedad de microorganismos o parte de organismos, tales como: quistes algales, foraminíferos (protozoos principalmente marinos), acritarcos (microfósiles exclusivamente marinos), microfósiles animales (restos de artrópodos y otros invertebrados, como patas, antenas, mandíbulas, entre otros), quitinozoos (exclusivamente marinos), fitolitos (biomineralizaciones), diatomeas (algas microscópicas), radiolarios (protozoos marinos), dinoflagelados (protozoos unicelulares), cocolitos (placas calcáreas de unos protozoos), entre otros. La especial combinación de estos elementos que se presenta en un sedimento se conoce como «huella polínica».

El polen y las esporas tienen paredes externas muy resistentes, compuestas por esporopolenina, una biomolécula altamente resistente que puede sobrevivir en los sedimentos geológicos durante cientos de miles de años y conservar su morfología (Brooks y Shaw, 1978), también le otorga gran resistencia a las altas temperaturas y a la corrosión por tratamientos químicos.

La morfología de la pared más externa del polen y las esporas es considerada como un carácter de importancia taxonómica que se utiliza para diferenciar grandes grupos de plantas, e incluso especies afines. En la Fig. 3 se puede observar la variabilidad morfológica de polen y las esporas con microscopía electrónica de barrido. Los granos en la mayoría de las plantas suelen encontrarse libres, otras veces se agrupan en unidades conocidas como políades, como se encuentran en «cebil colorado» *Anadenanthera colubrina* (Fig. 3I).

Las dimensiones reducidas de los granos, entre 7 y 200 μm (20–60 μm en promedio), permite que se encuentren cientos de miles en el aire y se adhieran fácilmente a una superficie. En el hombre se adhieren fácilmente a las mucosas húmedas, también se encuentra en el pelo, la piel expuesta, y pueden introducirse en la ropa (Mildenhall, 2008). En la naturaleza se asientan en el suelo o el agua. Por sus dimensiones, la cantidad de muestra requerida para un estudio palinológico también es reducida.

La combinación de sus propiedades, tales como su alta resistencia a factores físicos y químicos, una amplia gama de morfologías indicadoras de diferentes grupos taxonómicos de plantas, y el tamaño reducido de la muestra de estudio, hacen que el polen y las esporas sean de gran utilidad en la ciencia forense (Bruce y Dettmann, 1996). La morfología del polen y las esporas nos indica no solo la especie de la que proviene, sino también el ambiente geográfico donde crecen las plantas, y hasta la edad en los casos de polen fósil.

Debido a que el polen puede trasladarse por acción del viento, el agua, y la migración de los animales, es posible confundir su origen, es por ello que para los

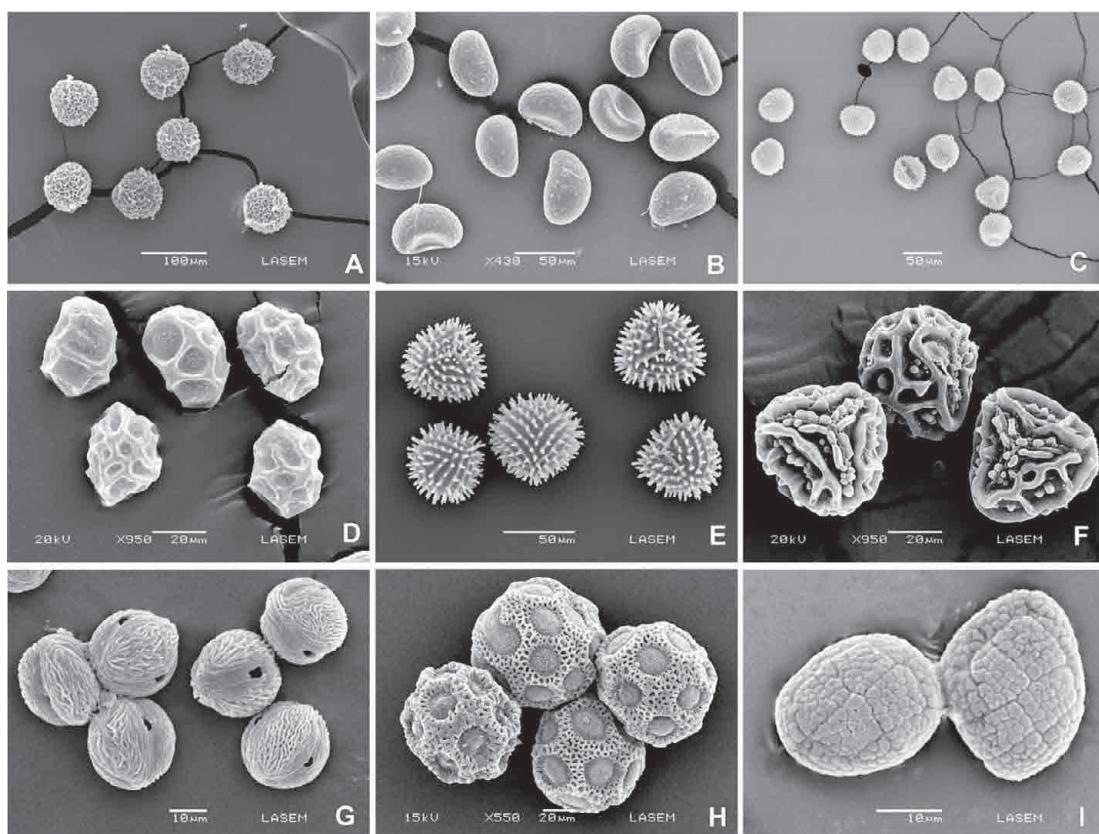


Fig. 3. Polen y esporas, vistos con microscopio electrónico de barrido. A) Esporas de *Argyrochosma nivea* var. *tenera*. B) Esporas de *Campyloneurum aglaolepis*. C) Esporas de *Adiantopsis chlorophylla*. D) Esporas de *Elphoglossum* sp. E) Esporas de *Anemia phyllitidis*. F) Esporas de *Pteris vittata* G) polen de *Schinopsis balansae*. H) Polen de *Opuntia* sp. I) Polen en políades de *Anadenanthera colubrina*.

estudios de palinología forense es necesario realizar previamente un análisis de la vegetación de la región con la finalidad de delimitar las especies vegetales propias del lugar y establecer patrones morfológicos polínicos dominantes.

DIVERSIDAD DE LAS PLANTAS

La diversidad de plantas que habita un ambiente en particular, conforma la vegetación propia de una región caracterizada por factores como el clima, el relieve y el suelo. Estas regiones constituyen unidades de vegetación, y se identifican por la presencia de determinadas especies. Oyarzabal *et al.* (2018) delimitan para la Argentina, desde el punto de vista fisonómico-florístico, 50 unidades de vegetación organizadas a su vez en dominios y regiones definidos por Cabrera (1976). Así por ejemplo, el «pino del cerro» *Podocarpus parlatorei* Pilg. (Podocarpaceae) es una especie propia del Bosque Montano, región que se encuentra entre los 1.500 y los 3.000 m s.n.m. en el Noroeste argentino, y la «lenga» *Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser (Notofagaceae), es propia de los Bosques Andino-Patagónicos, y crece desde los 37.8° S hacia el sur de la Argentina.

La distribución de las unidades de vegetación no coincide con la división política del país, y muchas veces se encuentra fragmentada. La fisonomía de cada una de ellas depende de su composición florística y la época del año. La alteración en la estructura de la flora característica de un sitio, se puede utilizar para identificar una fosa clandestina por las especies vegetales que colonizan un sitio removido, que generalmente mantiene humedad y nutrientes diferentes al resto del suelo, esto puede afectar positiva o negativamente a la germinación de semillas o esporas, y por lo tanto, se desarrollan plantas con necesidades nutricionales diferentes al resto. Esta nueva comunidad florística podrá mantenerse un cierto tiempo, según se trate de plantas anuales, bienales o perennes.

EVIDENCIA FÍSICA BOTÁNICA

La conservación de la evidencia física botánica, libre de contaminación, es fundamental para su estudio. De las muestras botánicas, las palinológicas son las más susceptibles a la contaminación, por lo que las mismas deberían ser tomadas por un palinólogo o técnico competente. Las muestras correspondientes a restos vegetales, tales como fracciones de hojas, raíces, tallos, flores, frutos y semillas, también requieren atención especial, aunque por su tamaño son más fáciles de conservar.

El tiempo de preservación de las muestras no tiene límite mientras las condiciones sean las adecuadas. Así, en la Fig. 4A se observa el aspecto de las células de una raíz de unos 500 años de antigüedad, que fuera conservada en principio por el frío a más de 6000 m de altura, y luego por los científicos en laboratorio. Su excelente conservación ha permitido la recuperación de los tejidos mediante un proceso de rehidratación, y a través de la aplicación de técnicas histológicas e histoquímicas convencionales, se logró identificar el tipo de órgano vegetal, y la estructura del almidón analizada con microscopio electrónico de barrido (Fig. 4B) y microscopio óptico (Fig. 4C) fueron fundamentales para identificarla como una especie de la familia Eupobiaceae (Martínez *et al.* en prep.).

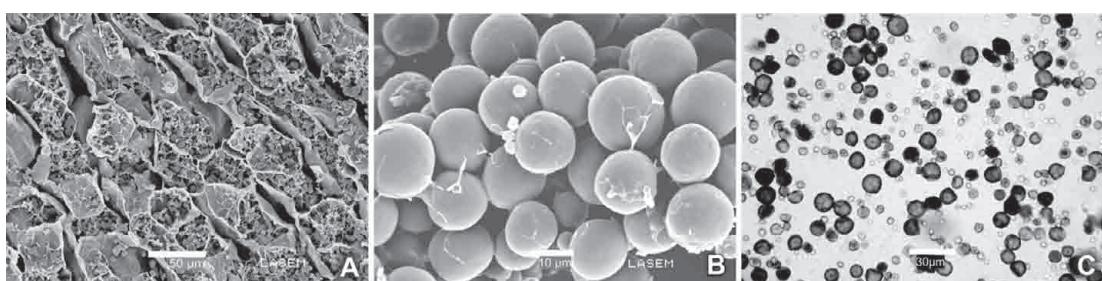


Fig. 4. Fotografías de tejido reservante de raíz de 500 años. A-B) Con microscopio electrónico de barrido. A) Células con granos de almidón en su interior. B) Detalle de granos de almidón. C) Granos de almidón vistos con microscopio óptico.

EJEMPLOS DE ALGUNOS CASOS RESUELTOS MEDIANTE EL USO DE BOTÁNICA FORENSE

Uno de los casos más antiguos de la aplicación de la Botánica Forense data en 1932 en Nueva Jersey, EE.UU., cuando se admite como otra evidencia, un informe botánico para la resolución del secuestro y crimen del hijo, de 20 meses de edad, del famoso aviador Charles Lindbergh. En este caso, el secuestrador olvidó restos de una escalera de madera tósicamente construida para ingresar a la casa de los Lindbergh, que siendo objetos de prueba, fueron recogidos y analizados por un experto en anatomía vegetal quien logró identificar la especie vegetal, y encontró resultado semejante al estudiar unas tablas en posesión de un sospechoso, quien resultó ser el autor del crimen (Ahlgren y Monier, 1993).

Recientemente, Aquila, Gratteri, Sacco y Ricci (2018) informan sobre el caso de un hombre en Italia que llegó al hospital en estado crítico debido a lesiones por descarga eléctrica que posteriormente le provocaron la muerte. Su familia informó que se electrocutó mientras estaba reparando una “araña” en su departamento, y al caerse de una escalera, colapsó en el suelo. Sin embargo, la autopsia reveló la existencia de frutos de *Xanthium spinosum* L. (Asteraceae) en el cabello y ropa de la víctima, lo que llevó al descubrimiento de la falsificación de la escena del crimen. Posteriormente se descubrió que la víctima estuvo tratando de robar cobre de los cables eléctricos, cuando se precipitó desde una gran altura, y al impactar en el suelo los frutos de la planta quedaron adheridos a la ropa y a su cuerpo.

En palinología forense, el caso resuelto más antiguo data de 1959, en Austria, donde un hombre desapareció en el río Danubio cerca de la ciudad de Viena, y no se encontraba el cuerpo. Otro hombre, con motivos para matar a la víctima fue arrestado y acusado de homicidio, pero sin pruebas ni confesión, la causa parecía irresoluble. Hasta que el análisis del barro encontrado en los zapatos del acusado fue entregado al palinólogo Wilhelm Klaus, de la Universidad de Viena, para su análisis. Klaus encontró que la asociación de polen de «abeto» *Abies* sp. (Pinaceae), «sauce» *Salix* sp. (Salicaceae) y esporas del Mioceno, solo podían encontrarse en un lugar específico, y cuando se enfrentó al acusado con los resultados de los estudios y la posible identificación del lugar, el imputado confesó el crimen (Erdtman, 1969).

Recientemente Povilauskas (2017) relata sobre un caso en Buenos Aires, donde la víctima fue encontrada sumergida en un brazo del río Reconquista, y el análisis palinológico del sitio del crimen indicaba predominio de «caña de Castilla» *Arundo donax* L. (Poaceae), además de *Populus* sp. (Salicaceae), *Carex halleriana* Asso (Cyperaceae), *Eclipta* sp. (Asteraceae) y *Eucalyptus* sp. (Myrtaceae). Luego, días posteriores, se encontró en un auto secuestrado una asociación palinológica semejante junto a palinomorfos acuáticos, lo que permitió determinar una ubicación geográfica específica, y sirvió como evidencia para probar que el vehículo estaba involucrado en el crimen.

La palinología forense, también se utilizó en Estados Unidos para establecer el origen de drogas ilícitas incautadas, debido a la contaminación con polen y esporas de los materiales de embalaje. La diversidad polínica y su asociación determinaron la época del año en que fue procesada y el historial de viaje (Stanley, 1992).

El polen se adhiere a las paredes de los edificios, las vigas y las aberturas, ésta particularidad ha contribuido con la investigación sobre el tráfico de drogas, en particular el estudio del tráfico de «marihuana» *Cannabis sativa* L. (Bruni, De Mattia, Galimberti, Galasso, Banfi, Casiraghi y Labra, 2010; Houston, Birck, Hughes-Stamm y Gangitano, 2016).

CONSIDERACIONES GENERALES

La botánica desempeña un papel excepcional en la investigación forense, aunque la metodología para el estudio de las plantas implica la necesidad de realizar estudios taxonómicos, florísticos, morfológicos, histológicos, histoquímicos, moleculares, entre otros, requiriendo para ello del conocimiento de técnicas específicas, y el aporte de especialistas.

Si bien las limitaciones para considerar los estudios botánicos dependen de factores como: deficiente infraestructura para realizar este tipo de investigación, falta de capacitación para colectar muestras y preservarlas, o escaso personal científico calificado para la interpretación correcta de las muestras, la barrera más importante es la decisión de los fiscales, jueces y cuerpos policiales sobre la aceptación o desconocimiento del potencial que guarda la evidencia botánica.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Ing. Pedro Villagrán, Jefe del Dpto. Técnico Científico; a la Dra. Rosana Ayon, Responsable del Servicio de Biología Forense del Cuerpo de Investigaciones Fiscales del Ministerio Público de Salta, por su convocatoria a participar en investigaciones forenses realizadas en el Dpto. Técnico Científico e incluirme en la lista de peritos especialistas en botánica forense; a la Dra. Povilauskas, por facilitar bibliografía; y a los revisores anónimos que brindaron sugerencias y propuestas para mejorar el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahlgren, G. y Monier, S. (1993). *Crime of the Century: The Lindbergh Kidnapping Hoax*. Branden Books.
- Aquila, I., Gratteri, S., Sacco, M. y Ricci, P. (2018). The Role of Forensic Botany in Solving a Case: Scientific Evidence on the Falsification of a Crime Scene. *Journal of Forensic Sciences* 63 (3), 961-964. doi: 10.1111/1556-4029.13639
- Bock, J. y Norris, D. (1997). Forensic botany: an under-utilized resource. *Journal of Forensic Sciences* 42 (3), 364-367. doi: 10.1520/JFS14130J
- Brooks, J. y Shaw, G. (1978). Sporopollenin: a review of its chemistry, palaeochemistry and geochemistry. *Grana* 17, 91-97.

- Bruce, R. G. y Dettmann, M. E. (1996). Palynological analyses of Australian surface soils and their potential in forensic science. *Forensic Science International* 81 (2-3), 77-94. doi: 10.1016/S0379-0738(96)01973-1
- Bruni, I., De Mattia, F., Galimberti, A., Galasso, G., Banfi, E., Casiraghi, M. y Labra, M. (2010). Identification of poisonous plants by DNA barcoding approach. *International Journal of Legal Medicine* 124(6), 595-603. doi: 10.1007/s00414-010-0447-3.
- Brown, A. G. (2004). The combined use of pollen and mineralogy in war crimes investigations in NE Bosnia on behalf of the United Nations International Criminal Tribune for the Former Yugoslavia (UN-ICTY). *Polen*, 14: 116-117.
- Cabrera, A. L. (1976). Regiones fitogeográficas argentinas. En W. F. Kugler (Ed.). *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería* (pp. 1-85). Buenos Aires: Acme.
- D'ambrogio de Argüeso, A. (1986). *Manual de técnicas de histología vegetal*. Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- Erdtman, G. (1969). *Handbook of Palynology. An introduction to the study of pollen grains and spores*. New York: Hafner.
- Giner Munuera, M. y García Carrión, J. S. (2012). Palinología forense el delator olvidado: la «huella polínica» como evidencia policial. *Cuadernos de la Guardia Civil* 46, 1-13.
- Houston, R., Birck, M., Hughes-Stamm, S. y Gangitano, D. (2016). Evaluation of a 13-loci STR multiplex system for *Cannabis sativa* genetic identification. *International Journal of Legal Medicine* 130 (3), 635–47. doi: 10.1007/s00414-015-1296-x.
- Mildenhall, D. C. (1990). Forensic palynology in New Zealand. Review of *Palaeobotany and Palynology* 64, 227-234.
- Mildenhall, D. C. (2008). Civil and criminal investigations. The use of spores and pollen, *SIAK-Journal Zeitschrift für Polizeiwissenschaft und polizeiliche Praxis* (4), 35-52. doi:10.7396/2008_4_E.
- Milne, L. A., Bryant, V. M. y Mildenhall, D. C. (2004). Forensic palynology. En: H. M. Coyle (Ed.), *Forensic Botany: Principles and Applications to Criminal Casework*, Boca Raton: CRC. doi: 10.1201/9780203484593.ch14
- Oyarzabal, M., Clavijo, J., Oakley, L., Biganzoli, F., Tognetti, P., Barberis, I., Maturo, H. M., Aragón, R., Campanello, P. I., Prado, D., Oesterheld, M. y León, R. J. C. (2018). Unidades de vegetación de la Argentina. *Ecología Austral* 28, 40-63. doi: 10.25260/EA.18.28.1.0.399.
- Povilauskas, L. K. (2017). Análisis palinológico de un homicidio en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista Brasilera de Criminalística* 6 (3), 30-36. doi: 10.15260/rbc.v6i3.189
- Stanley, E.A. (1992). Application of palynology to establish the provenance and travel history of illicit drugs, *Microscope* 40, 149–152.
- Szibor, R., Schubert, C., Schöning, R., Krause, D. y Wendt U. (1998). Pollen analysis reveals murder season, *Nature* 395 (6701), 449-450.
- Wiltshire, P. E. J. (2004). The value of obtaining palynological information from corpses, *Polen* 14, 115-116.

Aplicaciones forenses de las microalgas

Natalia V. Mattano^{1,3}, Nora I. Maidana^{1,2}

¹ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental. Laboratorio de Diatomeas continentales, C. Universitaria, Pab. 2. C1428EHA, C. A. de Buenos Aires, Argentina. mattveronat@gmail.com

² CONICET – Universidad de Buenos Aires. Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA), C. Universitaria, Pab. 2. C1428EHA, C. A. de Buenos Aires, Argentina.

³ Gendarmería Nacional. Dirección de Criminalística y Estudios Forenses. División Medicina Forense, Sección Ficología Forense, C. A. de Buenos Aires, Argentina.

¿QUÉ ES LA MUERTE POR SUMERSIÓN O AHOGAMIENTO HÚMEDO?

Existen en la literatura numerosas definiciones de muerte por sumersión. Una de las más aceptadas es la del 1^{er} Congreso Mundial sobre Ahogamientos, Organización Mundial de la Salud (2016): que la define como «el proceso conducente a la imposibilidad de respirar debido a sumersión/inmersión en un líquido». Posteriormente, Concheiro Carro & Suárez Peñaranda (2004) definen la sumersión, en sentido médico legal, como la muerte o el trastorno patológico producidos por la introducción de un medio líquido, habitualmente agua, en las vías respiratorias.

Según la Organización Mundial de la Salud (2016), cada año se producen en el mundo 372.000 defunciones por ahogamiento —lo que representa 42 decesos por hora— de los cuales más de la mitad de las víctimas son menores de 25 años y más del 90% ocurren en países de bajos recursos. Es considerada como una de las 10 causas principales de muerte de personas entre 1 y 24 años de edad.

¿CÓMO OCURRE LA MUERTE POR SUMERSIÓN?

El diagnóstico se basa esencialmente en datos etiológicos, anatómicos y biológicos relacionados con las modificaciones que resultan del ingreso de líquidos en el torrente circulatorio (Tabbara & Dérobert, 1962).

Las etapas del ahogamiento húmedo (Idris *et al.*, 2003; Raffo & Bonnet, 1980; Vallejo, Azparren & Valverde, 2012) consisten en:

- 1) Estado de sorpresa. Cuando ocurre la aspiración de agua (duración entre 5 y 10 segundos).
- 2) Apnea voluntaria (duración de aproximadamente 1 minuto).

3) Respiración profunda desencadenada por presentar estado de hipoxia, hiperkapnia y acidosis. Además, el ingreso del líquido irrita la mucosa bronquial, provocando la formación de una espuma viscosa y rosada denominada «hongo de espuma» (duración 1 minuto).

4) Paro respiratorio, seguido de la disfunción de múltiples órganos y convulsiones. (duración 1 minuto).

5) La última fase es la muerte ocasionada por una fuerte hipoxia en los tejidos, los principales órganos afectados son el corazón y el cerebro. Es por esto que la principal causa de muerte en víctimas de ahogamiento hospitalizadas es el desarrollo de encefalopatías posthipóxicas con o sin edema cerebral (duración entre 3 y 4 minutos).

La temperatura del agua puede influir en cómo se produce el deceso. En el caso en que supere los 35°C (punto de termoneutralidad, cuando el calor perdido se equipara al calor ganado), como por ejemplo en un baño de inmersión con agua caliente, la muerte se puede desencadenar por epilepsia en individuos que presentan alteraciones en la termorregulación o defectos genéticos. En cambio, a temperaturas por debajo de los 25°C el cuerpo comienza a responder mediante un shock térmico, que se intensifica entre los 10-15°C. Cuando la temperatura del agua se encuentra por debajo de los 15°C se reduce considerablemente la etapa 2 (cuando ocurre la apnea voluntaria) y aumenta la incidencia de arritmias, aumentando las posibilidades de ahogamiento. Se considera que la temperatura corporal asociada a la muerte por inmersión en agua fría es de 25°C, aunque hay registros de resucitación exitosa de un adulto con una temperatura corporal cercana a los 13,7°C. (Bierens, Lunetta, & Warner, 2016).

¿QUÉ SON LAS MICROALGAS?

Las algas son un conjunto de organismos, en su mayoría microscópicos, que realizan fotosíntesis y viven fundamentalmente en el agua, aunque hay algunas que pueden hallarse fuera de ella (sobre suelo húmedo, rocas, corteza de árboles y hasta en pelos y plumas de animales acuáticos). Las microalgas son algas microscópicas y generalmente, unicelulares, frecuentes tanto en ambientes marinos como continentales y se considera que son la principal fuente del oxígeno que respiramos (Graham, Graham & Wilcox, 2009).

Las células de las algas suelen estar cubiertas por una pared celular, cuya naturaleza química varía de un grupo al otro. Puede ser orgánica o inorgánica y en algunos casos puede estar reforzada por el depósito de cristales de sílice o de carbonato de calcio o por otros compuestos, como fenoles y algenanos, que le dan resistencia ante la acción de agentes químicos o la degradación por los organismos descomponedores (Graham *et al.*, 2009).

Las algas más comunes en casi todo tipo de ambientes acuáticos son las diatomeas (tienen cubiertas silicificadas), las algas azules (cianobacterias) y las algas verdes (clorofítas), aunque también pueden encontrarse representantes de otros grupos (Fig. 1).

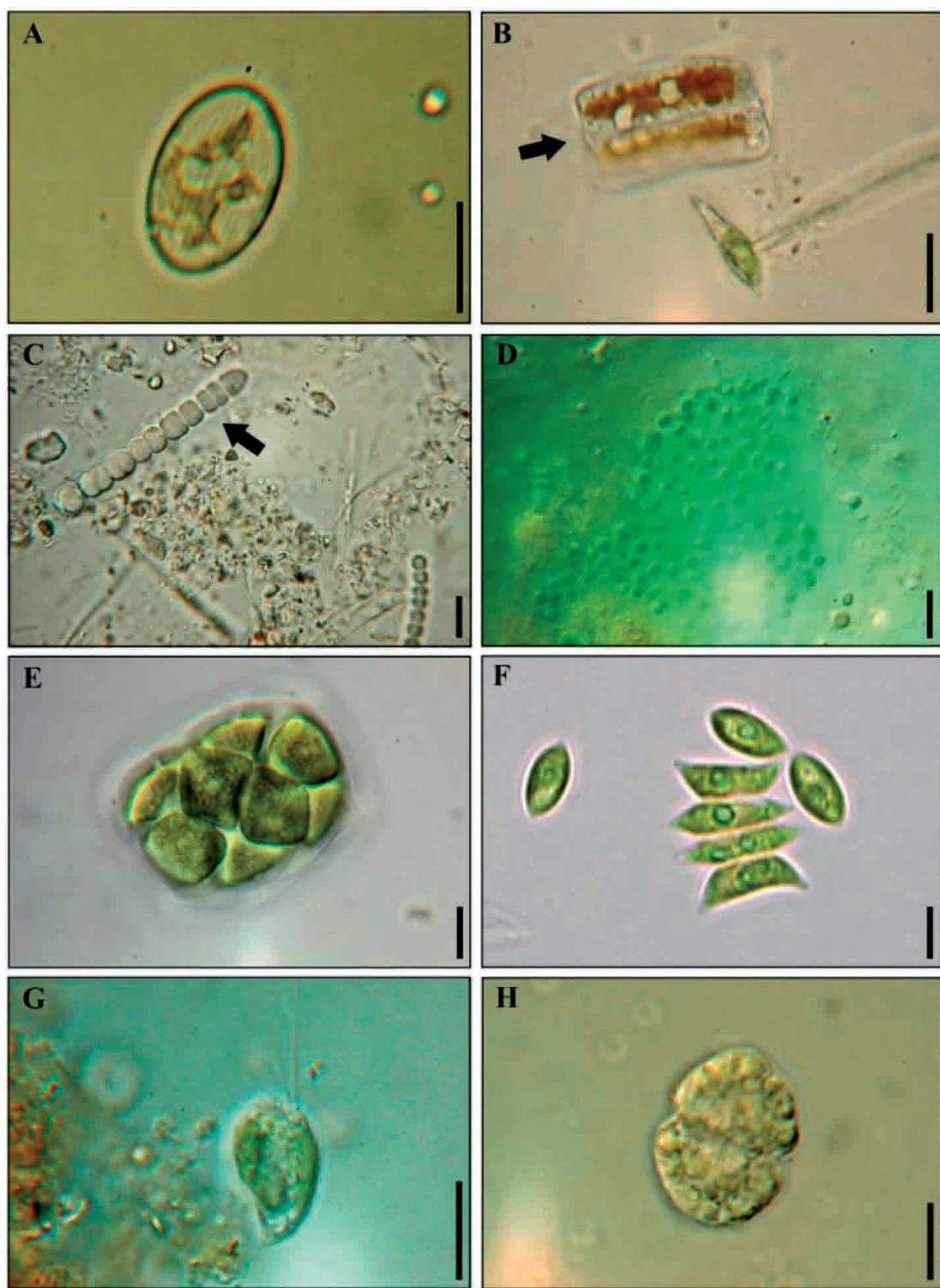


Figura 1. Microalgas frecuentes en cuerpos de agua continentales. A-B: diatomeas. A. *Cocconeis* sp.; B. *Epithemia* sp. (flecha); C-D: cianobacterias. C. *Anabaena* sp. (flecha), D. *Microcystis* sp.; E-F: algas verdes. E. *Pandorina* sp.; F. *Scenedesmus* sp. (gentileza de la Dra. Ángela Juárez, FCEyN, UBA); G: ocrofita; H: dinoflagelado.

La relación entre las algas y el medio que las rodea (su ecología) comenzó a interesar a los investigadores desde que pudieron observarlas al microscopio (descubierto por A. van Leewenhoek en el siglo XVII) y ya en el siglo XVIII, Wahl (1876) publica un artículo sobre algunas de sus aplicaciones.

¿QUÉ INFORMACIÓN PUEDEN APORTAR LAS MICROALGAS?

En la fase de inhalación profunda, las microalgas que están suspendidas en el agua ingresan al cuerpo, penetran la barrera capilar-alveolar y las que son menores que 30 μm (enteras o fragmentadas) podrán ser transportadas por circulación activa, a través de los capilares, a diferentes órganos y tejidos donde finalmente se acumulan (Lunetta, Penttilä & Hällfors, 1998; Pollanen, 1997; Sidari, Di Nunno & Melato, 1999). De esta manera, en los distintos órganos de una víctima de muerte por sumersión se podrán encontrar algas o restos de algas que vivían en el lugar donde se produjo el deceso.

V. Ravenstorf, en 1904, fue el primero en proponer el uso de algas con cubiertas silicificadas (diatomeas) para el diagnóstico de muerte por sumersión (Ludes & Coste, 1996).

¿QUÉ ÓRGANOS SE UTILIZAN PARA EL ANÁLISIS?

Como mencionamos en el apartado anterior, las microalgas ingresan al cuerpo por circulación activa y se acumulan en órganos tan distantes entre sí como el cerebro, los riñones, los pulmones y la médula ósea (Ludes & Coste, 1996).

La mayoría de las investigaciones realizadas para determinar muerte por sumersión mediante el estudio de diatomeas utilizan como principales órganos a los pulmones, los riñones, el bazo y el cerebro. Los pulmones son el primer lugar donde se esperaría encontrar microalgas pero allí también se pueden acumular las que son transportadas por el aire y que fueron inhaladas por la víctima a lo largo de su vida. Si bien el análisis de las algas recuperadas del tejido pulmonar no tendría, entonces, un gran valor diagnóstico, Auer y Möttönen (1988) concluyen, a partir del estudio de 107 cuerpos y manteniendo las condiciones adecuadas para evitar contaminación, que si no se hallan diatomeas en los pulmones tampoco se hallarán en los demás órganos.

Cuando el cuerpo se encuentra en avanzado estado de descomposición, el tejido más apropiado para analizar es la médula ósea debido a que el hueso recubre y aísla a la médula de cualquier contaminación externa mientras esté en el agua y se mantenga intacto (Chandrasiri, 2001; Pollanen, 1997).

Hürlimann *et al.* (2000) comprobaron que la proporción de microalgas que ingresan a órganos como pulmón, duodeno y estómago es de 10 o 100 veces menor que la del agua donde fue hallado el cuerpo, y que continúan disminuyendo en un orden entre 100 y 1000 al llegar a la cavidad cardíaca, los riñones y la médula ósea. Bortolotti, Del Balzo & Tagliaro (2011) también encontraron una diferencia

significativa entre el número de diatomeas recuperadas del pulmón y las halladas en una muestra de médula ósea esternal.

Desde el trabajo pionero de Ravenstorf, el diagnóstico de muerte por sumersión se realizó casi exclusivamente mediante la búsqueda de cubiertas celulares (o fragmentos de ellas) de las diatomeas, por lo que se denominó «test de diatomeas».

Este test ha sido aceptado por muchos autores (Hendey, 1973; Neidhart & Greendyke, 1967; Pachar & Cameron, 1992; Peabody, 1977, 1980; Timpermann, 1972) pero no hay una aceptación total de que las diatomeas puedan ser indicadores precisos de muerte por sumersión, ya que hay reportes que también indican que pueden ser encontradas en órganos de personas fallecidas por causas diferentes (Foged, 1983; Gylseth, Mowé & Watson, 1979; Schellmann & Sperl, 1979). Sin embargo, Díaz-Palma, Alucema & Maidana (2009) consideran razonable suponer que esos casos representan falsos positivos debidos ya sea a contaminación de las muestras o al estilo de vida de la víctima (nadador de mar o de río, por ejemplo). Solo recientemente se incorporaron al diagnóstico, como otras evidencias, los restos de cubiertas de otras microalgas que también viven en los cuerpos de agua, por lo que estos últimos autores proponen denominarlo «test de microalgas».

Al analizar la bibliografía, llama la atención la falta de estandarización respecto a qué órganos se van a estudiar y cómo se los va a procesar para realizar el test, ya que a lo largo de los años se cuestionan los resultados arrojados por este análisis sin que haya un estudio riguroso que los avale.

PROTOCOLO DE RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS EN LOS LABORATORIOS FORENSES

1. Preparación del material

a) Preparación de agua destilada libre de diatomeas (ALD).— Como el perito debe tener la seguridad de que, si encuentra microalgas en las muestras que va a analizar, estas sólo hayan ingresado al cuerpo por circulación activa y como consecuencia del fenómeno de sumersión, todo el material que se use para este test deberá ser lavado previamente con agua destilada que no contenga diatomeas (ALD) ni restos de otras algas.

Para esto, lo recomendable es utilizar agua microfiltrada, que se puede comprar o se la puede preparar filtrando agua destilada con un filtro de fibra de vidrio o téflón, de poro no mayor de $0,45 \mu\text{m}$. No conviene utilizar papel de filtro porque puede contener diatomeas procedentes de la pasta de papel (Teschke & Demers, 2001). Si no se pudiera realizar el filtrado, entonces, y como último recurso, se puede dejar decantar agua destilada, por 12 h y protegida del polvo ambiental, en un recipiente previamente lavado y enjuagado 3 veces (también con agua destilada). Después de ese tiempo, se puede utilizar el agua de la parte superior del recipiente, cuidando de no agitarla. Esto es porque, como las microalgas son más pesadas que el agua, caerán rápidamente por su peso y se depositarán en el fondo del recipiente.

b) Lavado de las herramientas.— Las herramientas que se destinen para este test **no** deben haber sido usadas para otros fines porque podrían haberse contaminado.

Todas las herramientas y materiales no descartables que se vayan a utilizar deberán haber sido mantenidos en remojo, al menos 24 h, en una solución preparada con 100 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y 900 ml de agua destilada, a aproximadamente 80-90°C.

Luego de transcurrido ese tiempo, se enjuaga el material 3 o 4 veces con agua destilada y finalmente, se le dan 2 enjuagues con ALD. Todo puede dejarse secar a temperatura ambiente siempre protegido del polvo. Nunca debe usarse papel para el secado, pero si fuera necesario realizar un secado rápido, salvo que el material sea plástico, se puede usar una estufa.

Una vez seco, el material debe guardarse protegido del polvo ambiental, por ejemplo, envuelto en papel de aluminio.

2. Obtención de las muestras

En todos los casos, y si el volumen de muestra lo permite, lo ideal es guardar una parte de cada una como copia de resguardo. Todas las muestras, una vez colocadas en el recipiente adecuado, deberán conservarse refrigeradas hasta su envío al perito correspondiente.

a) Tejidos cadávericos.— *i) Médula ósea.* Una vez seleccionado el hueso para el análisis (esternón, fémur, húmero), debería ser lavado cuidadosamente con ALD, antes de abrirla y antes de extraer la médula con una herramienta adecuada (previamente lavada como se indicó en el apartado anterior), con el fin de no contaminar la muestra.

La muestra será colocada en un frasco rotulado que haya sido previamente lavado con ALD, secado y pesado, es conveniente que el frasco ya contenga algún disolvente de tejidos, previamente testeado para asegurarse de que no contenga microalgas. Luego de colocada la muestra de tejido en su interior, el frasco deberá ser pesado nuevamente a fin de calcular el peso de muestra obtenido. Este dato deberá figurar en el recipiente que se envíe al perito.

ii) Sangre. Si el corazón no contuviera un volumen adecuado de sangre en su interior, lo ideal es realizar un lavado de la cavidad cardíaca con ADL, utilizando jeringas descartables. Se debe rotular el envase, registrando el volumen de líquido extraído del cuerpo.

Si fuera necesario adicionar algún anticoagulante, deberá controlarse que este también esté libre de microalgas. Para verificarlo, se pueden centrifugar unos 10ml del reactivo a utilizar, descartar el sobrenadante y observar el residuo bajo microscopio, con un aumento de, al menos, 400X. En un caso que analizamos en nuestro laboratorio, verificamos la presencia de dinoflagelados en una muestra de EDTA, usado regularmente como anticoagulante en un laboratorio forense).

iii) *Otros órganos (hígado, riñón, pulmón, etc.).* El órgano a analizar deberá lavarse una vez extraído, con ALD. Con una herramienta adecuada, libre de microalgas, se cortará una porción de tejido de, aproximadamente, 2cm³ y se la colocará en un recipiente limpio, previamente pesado y rotulado.

3. Muestras del lugar del hecho

En el caso de hallar restos de microalgas en los tejidos cadávericos, es conveniente comparar las especies encontradas con las que regularmente viven en el lugar donde se halló el cuerpo a fin de determinar si, efectivamente, ese fue el lugar donde se produjo el deceso. Para esto, se deberán obtener muestras de agua y sedimento.

Es muy importante que las muestras se tomen cuando se recupera el cuerpo de la víctima, ya que los ambientes acuáticos sufren cambios estacionales o interanuales.

Como respuesta a estos cambios, también la composición de especies en general y la de los ensambles de especies dominantes, en particular, en cada época del año suelen presentar diferencias (Round, 1971; Stevenson, Pan & van Dam, 2010), no sólo porque ocurren reemplazos en las especies de algas que viven en el lugar sino porque también aparecen (vivas o muertas) las que son transportadas por la corriente en diferentes momentos del año.

Es conveniente que se informe al perito el tipo de ambiente del que proceden las muestras (lago, laguna, río, arroyo, etc.) y sus características más relevantes (profundidad aproximada, presencia de vegetación marginal, velocidad de la corriente, etc.).

a) **Muestras de agua.**— Deberá utilizarse un envase limpio de 1 o 2l de capacidad. Antes de llenarlo deberá ser enjuagado previamente 2 veces con agua del lugar, cuidando de no remover los sedimentos del fondo.

Lo ideal, y dependiendo de las posibilidades, sería extraer un cubo o balde de agua de unos 5 o 10l de capacidad, de un sitio no muy próximo a la orilla y usar una parte para enjuagar el envase y el resto para el análisis. De esa manera, se evita la remoción de los sedimentos del fondo que podrían agregar elementos extraños a la muestra que se va a analizar.

Para preservar esta muestra deberán agregársele, aproximadamente, 40ml de formaldehido puro (formol) por cada litro de muestra.

Deberá rotularse el frasco con la fecha y el nombre del sitio del que se obtuvo la muestra.

b) **Muestras de sedimento.**— En algunos casos, sobre todo si se trata de ambientes poco profundos, es adecuado analizar también el contenido de microalgas del barro de la orilla de un cuerpo de agua. Esto podría servir también para comparar lo hallado, por ejemplo, en las suelas de los zapatos, en las ruedas, la cajuela o baúl del automóvil de un sospechoso.

Lo ideal es que el lugar del que provenga la muestra esté cubierto de agua y a más de 15cm de profundidad. La muestra se puede tomar por arrastre de un frasco limpio de boca ancha o con una espátula o una cuchara, todo previamente lavado con ALD.

Para la preservación también deberán agregarse aproximadamente 20-30 ml de formol y agitar para que se mezcle bien.

El envase deberá rotularse indicando el tipo de muestra obtenida (agua, sedimento, rocas, etc.), la fecha y el nombre del sitio donde se obtuvo.

4. Envío de las muestras

Las muestras deberán conservarse preferentemente en frío y oscuridad, en sus recipientes bien cerrados y convenientemente rotulados, hasta que puedan ser enviadas al perito que realizará los análisis.

Para su transporte se recomienda cuidar el embalaje para minimizar la posibilidad de pérdidas de material.

Antes de su envío deberá controlarse que las botellas conteniendo agua del lugar del hallazgo del cuerpo estén perfectamente cerradas para que no haya filtraciones del líquido.

PROBLEMÁTICAS A LA HORA DE ELEGIR UN MÉTODO APROPIADO PARA DIGERIR LAS MUESTRAS

Las metodologías clásicas para eliminar la materia orgánica de las muestras, tanto de tejidos como las del lugar del hallazgo del cuerpo son las descriptas, por ejemplo, en Ludes y Coste (1996) o en Battarbee (1986). Estas técnicas incluyen el uso de ácidos fuertes (sulfúrico, nítrico, oxálico, etc.) solos o combinados con otros reactivos o métodos de digestión enzimática. En la literatura se encuentran también algunas propuestas alternativas, como la de Terazawa y Takehiro (1980) que proponen separar el plancton mediante una centrifugación en un gradiente coloidal de sílice. Estos autores señalan que un inconveniente de este método sería la rotura de los especímenes más frágiles durante la centrifugación y la homogeneización mecánica.

Fukui, Hata y Matsubara (1980) desarrollaron una metodología que involucra irradiación ultrasónica de la muestra de tejido previamente solubilizada con Soluene® y que requiere menos tiempo que las técnicas que emplean ácidos fuertes. Matsuamoto y Fukui (1993) utilizan una metodología similar, pero irradiando a 60°C.

Ming, Meng y Wang (2007) señalan que para evaluar el método más apropiado para digerir las muestras biológicas el procedimiento debe ser simple, seguro y rápido; los reactivos a utilizar deben ser baratos y estar libres de diatomeas; el daño que el tratamiento provoque a las diatomeas debe ser mínimo y los residuos orgánicos que puedan quedar luego de la digestión no deben obstaculizar la visualización de las microalgas al microscopio. Estos autores compararon cuatro métodos de digestión diferentes, combinando ácido nítrico con peróxido de hidrógeno; el

método de la proteinasa K descrito por Kobayashi *et al.* (1993) y utilizado también por Ludes, Quantin & Mangin, (1994), el del ácido nítrico en recipiente de teflón (Yange, Chuanying & Xu, 1999) y el que utiliza Soluene®-350 (Sidari *et al.*, 1999). Según Ming *et al.* (2007), la metodología que reúne los requisitos antes mencionados es el de la proteinasa K (aunque no tienen en cuenta que no es un reactivo barato) y señalan también que el mejor sustituto podría ser la digestión con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno, y que el Soluene®-350 no debería ser usado para muestras marinas ya que encontraron que el grado de degradación del material fue elevado.

Para Díaz-Palma *et al.* (2009) el método óptimo es la combinación de la digestión con ácidos y proteinasa K, tanto para muestras de agua como de tejidos. La metodología propuesta por ellos permite recuperar no solo cubiertas de diatomeas sino también de dinoflagelados, silicoflagelados y clorofitas. Otros autores, como Digiancamillo, Domeneghini & Cattaneo (2011) prefieren la combinación de ácido clorhídrico con peróxido de hidrógeno por ser una opción más barata y rápida que el uso de proteinasa K. Fucci (2012) propone la utilización de ácido sulfúrico diluido al 30% como una opción económica y que posibilita la observación en el microscopio de otros organismos microscópicos como por ejemplo radiolarios y, años más tarde, Fucci *et al.* (2015) proponen utilizar sólo peróxido de hidrógeno ya que con este método obtuvieron una mejor preservación de las diatomeas, tanto en agua de mar como de lagos y ríos.

En nuestro laboratorio utilizamos para procesar las muestras de médula ósea un disolvente de tejidos similar al Soluene®-350, que funciona también con muestras recuperadas de ambientes marinos y los métodos tradicionales para los otros órganos.

Una vez procesadas las muestras confeccionamos preparaciones permanentes para su observación con microscopio óptico. Para esto utilizamos distintos medios de montaje con alto índice de refracción, tales como resinas sintéticas (Naphrax ® o Zrax®) o naturales (estoraque o melaza de maíz). El microscopio a utilizar debe ser de óptima calidad para poder capturar las imágenes más detalladas que permitan la identificación de hasta los menores fragmentos (Fig. 2).

Los métodos descritos anteriormente no son usados en forma sistemática por todos los profesionales y plantean la necesidad de realizar más pruebas para encontrar una metodología óptima de tratamiento de las muestras de tejidos, de uso universal que permita la aplicación de un protocolo estandarizado y de esta manera obtener resultados comparables que reduzcan al mínimo la posible aparición de falsos negativos.

¿ES CONFIALBE EL TEST DE DIATOMEAS/MICROALGAS?

En la literatura podemos hallar numerosas citas de falsos resultados negativos y positivos.

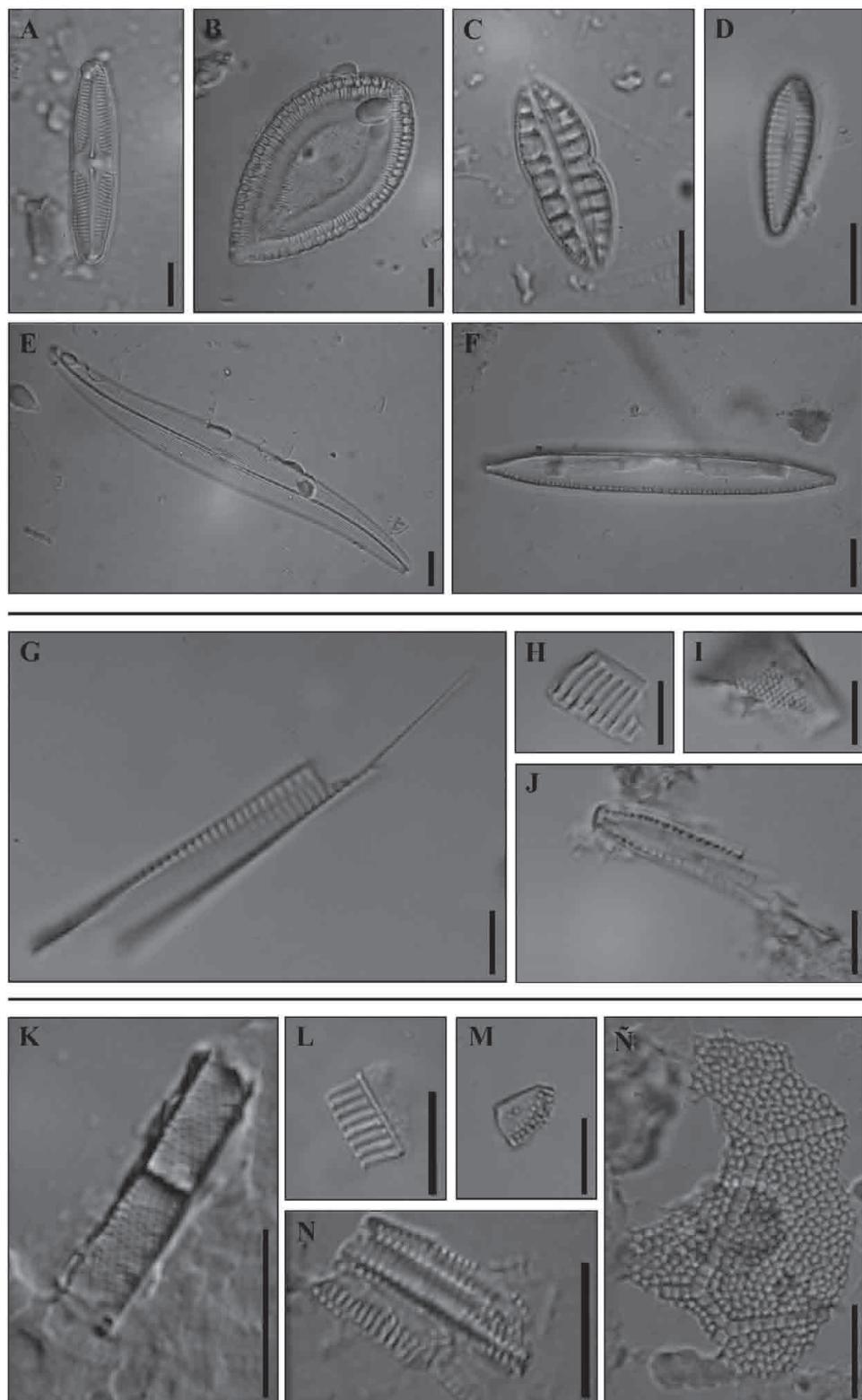


Figura 2. Microalgas recuperadas en el curso de distintos peritajes realizados en el Laboratorio de Diatomeas Continentales (FCEyN-UBA). A-F: cubiertas celulares silícicas (valvas) de diatomeas en muestras procesadas de sedimento y agua. A: *Pinnularia* sp., B: *Surirella ovalis*; C. *Epithemia* sp; D. *Gomphonema* sp.; E. *Gyrosigma* sp.; F. *Nitzschia* sp.; G-J: restos de cubiertas de algas recuperadas de muestras de tejidos cadávericos. G- J: lavado de cavidad cardíaca (fragmentos de distintas diatomeas). K-Ñ: médula ósea. K-N: cubiertas completas (K) y fragmentos de diatomeas (L-N); Ñ: fragmento de la cubierta celular celulósica de un dinoflagelado. Escala 10 μ m.

FALSOS POSITIVOS

Romero Palanco (2007) realizó un listado de posibles fuentes de contaminación en el test de diatomeas:

I) *Ante-mortem.*— Puede darse a partir de la ingesta de algunos vegetales, mariscos y pescados que pueden tener en su superficie un gran número de diatomeas (Yen & Jayaprakash, 2007) o en bebidas, como cerveza o vino, que hayan sido filtradas usando tierra de diatomeas.¹ También puede ocurrir por la inhalación de valvas de diatomeas en suspensión en el aire, por ejemplo, en fábricas de materiales de construcción y de aislantes, en pinturas, papel y al fumar cigarros (Langer, Mackler & Selikoff, 1971) ya que se podrían encontrar en la superficie de las hojas del tabaco cuando se estaban sobre el suelo.

II) *Post-mortem.*— Ludes y Coste (1996) señalan 3 posibles vías de penetración de diatomeas en el cuerpo de una víctima de sumersión: a) por maniobras de reanimación (intubación y ventilación), que fuerzan al agua de sumersión hacia las vías aéreas; b) penetración de agua con alta presión hidrostática por una sumersión prolongada y c) ingreso a través de heridas provocadas en vida. De cualquier manera, en los 3 casos, las algas del medio de sumersión podrían llegar a dar falsos positivos en cavidad cardíaca pero no llegarían a la médula ósea.

III) Durante la preparación de las muestras.— Por no realizar los lavados correspondientes del material e instrumentos con los que se van a manipular las muestras; no testear la pureza de los reactivos y del agua a utilizar y por contacto de la muestra con las ropas del cadáver mientras se realiza la autopsia.

La fiabilidad del diagnóstico depende, indefectiblemente, de bajo qué circunstancias se realizó la extracción de las muestras y de los recaudos tomados durante su procesamiento para evitar cualquier tipo de contaminación. Esto implica la necesidad de trabajar bajo un estricto protocolo (Lunetta, Miettinen & Sajantila 2013; Maidana, 2013). También es importante realizar la comparación de los resultados obtenidos del análisis de tejidos cadavéricos con las muestras del lugar del hecho y esto debe ser llevado a cabo por un especialista en el tema.

FALSOS NEGATIVOS

Estos pueden aparecer, por ejemplo, si la concentración de diatomeas en el medio de sumersión era baja; si la cantidad de líquido inhalado era escasa o si la metodología empleada para digerir las muestras pudo promover la fragmentación o la disolución de los frústulos (Romero Palanco, 2007).

Distintos autores plantean diferentes cifras para considerar un resultado como positivo, Auer y Möttönen (1988) proponen como mínimo 20 diatomeas por mues-

¹ Romero Palanco (2007) traduce erróneamente la palabra alemana *kieselgur* como «silicagel».

tra de pulmón (a partir del procesamiento de 100g de tejido). Ludes *et al.* (1999) sugieren como positivo la identificación de 20 diatomeas por cada 100 μ l de *pellet* obtenido de 10g de pulmón, en cambio para otros órganos considera positivo el resultado si se determinan más de 5 diatomeas completas (2 valvas), sin considerar a los fragmentos. Farrugia y Ludes (2011) consideran 20 diatomeas por 100 μ l de *pellet* extraído de 2g de muestra de pulmón y 5 diatomeas completas (sin incluir fragmentos) por cada 100 μ l de *pellet* extraído de 2g de otros órganos como cerebro, riñón, hígado y médula ósea.

Actualmente la Ficología Forense está ampliando su campo de aplicación y se comienza a vincular también con otras áreas de la Biología, por ejemplo, la Genética Molecular. Autores como Abe *et al.* (1996); Kane, Fukunaga & Nishi (1996) y Rácz *et al.* (2016), entre otros, han empleado *primers* de cianobacterias (por ejemplo, *Synechococcus* sp.), de diatomeas (como *Melosira* sp.) y algas verdes (*Staurastrum* sp.) para el diagnóstico de muerte por sumersión, en caso en que la observación microscópica tradicional arrojara resultados negativos. De esta manera, se busca evitar dar falsos negativos a través del uso de un mayor número de indicadores. Esta metodología todavía no se ha utilizado en médula ósea sino en otros órganos como bazo, hígado o riñón, a pesar de que estos son más fácilmente contaminables y pueden dar lugar a falsos positivos.

ANÁLISIS DE SEDIMENTO EN ROPAS Y CALZADO

La comparación de las algas recuperadas de la vestimenta y pertenencias del sospechoso de haber cometido un delito ayudan a relacionarlo con la escena. A través de la identificación taxonómica de los especímenes encontrados se pueden conocer las preferencias ecológicas de las especies y esta información permite inferir las condiciones ambientales de donde proceden.

Las diatomeas son algas con un amplio rango de distribución geográfica y pueden vivir tanto en ambientes acuáticos como terrestres. La posibilidad de que ocurra la transferencia de las diatomeas desde el ambiente a la ropa es relativamente alta y ocurre luego de un breve contacto con el agua o los sedimentos. Además, como son microscópicas, el sospechoso no visualiza esta transferencia y, a menos que sea un experto, no alterará maliciosamente la evidencia (Scott, Morgan & Cameron, 2014).

Uitdehaag, Dragutinovic y Kuiper (2010) probaron, en prendas de algodón, tres técnicas diferentes de recuperación de diatomeas y, de acuerdo a sus resultados, recomiendan la extracción con etanol para estudios destinados a determinar la fuente específica de agua, a pesar de que con este método quedan fibras de algodón que pueden obstaculizar la visualización de las diatomeas al microscopio.

Por su parte, Scott *et al.* (2014), luego de comparar otros tres métodos de extracción de diatomeas a partir de ropas, recomiendan el uso del peróxido de hidrógeno como el método más eficaz para recuperar un mayor número tanto de individuos como de las especies más representativas.

Levin, Morgan y Jones (2017) realizaron estudios de diatomeas sobre calzado de cuero, lona y gamuza y concluyeron que, aunque el tiempo de contacto con el agua hubiera sido breve, quedaba retenido un número importante de diatomeas en todos los tipos de materiales.

Scott, Morgan y Bull (2017) comentan que a pesar de que actualmente se busca recuperar diatomeas de ropas como superficie con evidencias, debe tenerse en cuenta otras superficies como el calzado, ya que la suela provee contacto directo con cualquier comunidad bentónica de diatomeas cuando el perpetrador o la víctima están en contacto con el agua.

Una vez detectada la presencia de microalgas en ropa, calzado, etc., se compara lo hallado con las especies recuperadas del lugar del hecho, a fin de determinar si el sospechoso tuvo contacto con el sedimento o agua de ese lugar o no. Existen diferentes técnicas de extracción, como por ejemplo sumergir la prenda en agua libre de diatomeas o aplicarle directamente peróxido de hidrógeno y calor (Levin *et al.*, 2017).

Tomando en cuenta la naturaleza silícea de la cubierta celular de las diatomeas que le confiere resistencia al calor, Scott *et al.* (2017) analizaron la potencial recuperación de diatomeas de la ropa luego de una exposición al fuego. Esto se realizó rozando varias veces una platina especial con un disco de adhesivo de carbono en el extremo contra la superficie de la ropa. La observación de estas muestras con el microscopio electrónico de barrido (MEB) reveló que la morfología de las diatomeas no era afectada luego de una exposición breve a temperaturas de hasta 850°C. Jansma (1984) había señalado que las diatomeas presentes en piezas de alfarería prehistórica no se destruían si habían sido sometidas a temperaturas inferiores a los 800°C aunque para Håkansson y Hulthén (1986), la sílice de la pared celular de las diatomeas podría resistir temperaturas hasta 925°C. El MEB permite observar las diatomeas con aumentos mucho mayores que en el microscopio óptico y no es una técnica destructiva, por lo tanto, permite una mayor precisión en la identificación de las especies.

¿PUEDE DETERMINARSE EL INTERVALO DE SUMERSIÓN POST-MORTEM (ISPM)?

La descomposición de un cuerpo sumergido cumple con las mismas etapas destructivas que aquel que se encuentra en tierra, (períodos cromático, enfisematoso y reductivo) y se les suma un proceso de tipo conservador, que es la saponificación o adipocira (Raffo, 1980). La tasa de progresión de estas etapas está influenciada por numerosas variables tales como la temperatura del agua, si el cuerpo estuvo totalmente sumergido o no y si estuvo sometido a la acción de olas o corrientes (Keiper & Casamatta, 2001; Haefner, Wallace & Merritt, 2004; Pollanen, 1997). Estas variables dificultan considerablemente la posibilidad de determinar el ISPM solo con el análisis de la ficoflora.

Cuando un cuerpo permanece sumergido un tiempo considerable, es posible que su superficie sea colonizada por organismos bentónicos, formando películas

denominadas *biofilms* o *algal mats*. No hay suficientes estudios sobre cómo colonizan las algas los cuerpos sumergidos, formando los *biofilms* y cómo es la sucesión de las poblaciones de algas sobre esos cuerpos. Según Raffo (1980), el crecimiento algal podría verse afectado por la contextura del sujeto, presencia y tipo de vestimenta, si hubo exposición temporal al aire, características del cuerpo de agua (profundidad, temperatura, velocidad de la corriente, composición química, etc.). Por tal motivo, se necesitaría, en cada caso, realizar estudios experimentales en el lugar (Rohner & Rothschild, 2013).

Por lo tanto, el uso de las microalgas para determinar el PMSI sigue siendo un tema pendiente (Horton, Boreham & Hillier, 2006; Zimmerman & Wallace, 2008).

PERSPECTIVAS A FUTURO

En Sudamérica y, en particular, en Argentina no se ha realizado, hasta el momento, ningún tipo de investigación relacionada con la Ficología forense. Quedan muchos temas pendientes de investigar, como por ejemplo el tiempo de desarrollo de diferentes *biofilms* en sistemas acuáticos para determinar el ISPM o la aplicabilidad de técnicas moleculares en médula ósea para el diagnóstico de muerte por sumersión.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a la Lic. Andrea Rothschild y a la Srta. Celeste Romero, del Cuerpo Médico Forense (Buenos Aires, Argentina), por facilitarnos el acceso a varias publicaciones relevantes para este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Abe, S., Suto, M., Nakamura, H., Gunji, H., Hiraiwa, K., Suzuki, T., Hoshiai, G. (2003). A Novel PCR Method for Identifying Plankton in Cases of Death by Drowning. *Medicine, Science and the Law*, 43(1), 23-30. doi: 10.1258/rsmssl.43.1.23
- Auer, A., & Möttönen, M. (1988). Diatoms and drowning. *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, 101(2), 87-98. doi: 10.1007/BF200290
- Battarbee, R. W. (1986). Diatom Analysis. In B. E. Berglund (Ed.), *Handbook of Holocene Palaeoecology and Palaeohydrology*, (pp. 527-570). New York: J. Wiley and Sons Ltd., New York.
- Bierens, J., Lunetta, P., Tipton, M. & Warner, D. (2016). Physiology of Drowning: A Review. *Physiology*, 31(2), 147-166. doi: 10.1152/physiol.00002.2015
- Bortolotti, F., Del Balzo, G., Calza, R., Valerio, F. & Tagliaro, F. (2011). Testing the specificity of the diatom test: search for false-positives. *Medicine, Science and the Law*, 51(1_suppl), 7-10. doi: 10.1258/msl.2010.010057

- Chandrasiri, N. (2001). Detection of diatoms in the marrow of thigh bones as evidence of death by drowning. *Ceylon Medical Journal*, 46(4), 145-146. doi: 10.4038/cmj.v46i4.6465
- Concheiro Carro, L. & Suárez Peñaranda, J. M. (2004). Asfixias mecánicas. En J. A. Gisbert Calabuig & E. Villanueva Cañasadas (Ed.), *Medicina Legal y Toxicología*, 6^a ed.(pp. 460-478). Barcelona:Masson.
- Díaz-Palma, P., Alucema, A., Hayashida, G. & Maidana, N. (2009). Development and standardization of a microalgae test for determining deaths by drowning. *Forensic Science International*, 184(1-3), 37-41. doi: 10.1016/j.forsciint.2008.11.015
- DiGiancamillo, A., Domeneghini, C., Gibelli, D. & Cattaneo, C. (2011). Diatom extraction with HCl from animal tissues: A technical note. *Legal Medicine*, 13(5), 268-271. doi: 10.1016/j.legalmed.2011.05.005
- Farrugia, A. & Ludes, B. (2011). Diagnostic of drowning in forensic medicine. In D. N. Vieira (Ed.), *Forensic Medicine-From Old Problems to New Challenges* (pp. 53-60). Rijeka, Croatia: IntechOpen.
- Foged, N. (1983). Diatoms and drowning—once more. *Forensic Science International*, 21(2), 153-159. doi: 10.1016/0379-0738(83)90104-4
- Fucci, N. (2012). A New Procedure for Diatom Extraction in the Diagnosis of Drowning. *Journal of Clinical and Experimental Pharmacology*, 02(01), 1-3. doi: 10.4172/2161-1459.1000110
- Fucci, N., Pascali, V., Puccinelli, C., Marcheggiani, S., Mancini, L. & Marchetti, D. (2015). Evaluation of two methods for the use of diatoms in drowning cases. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 11(4), 601-605. doi: 10.1007/s12024-015-9708-2
- Fukui, Y., Hata, M., Takahashi, S. & Matsubara, K. (1980). A new method for detecting diatoms in human organs. *Forensic Science International*, 16(1), 67-74. doi: 10.1016/0379-0738(80)90181-4
- Graham, J., Graham, L. & Wilcox, L. (2009). *Algae* (2nd ed.). San Francisco: Benjamin Cummings.
- Gylseth, B., Mowé, G. & Watson, A. (1979). Diatoms in lung tissue. *The Lancet*, 314(8156-8157), 1375. doi: 10.1016/S0140-6736(79)92865-4
- Haefner, J., Wallace, J. & Merritt, R. (2004). Pig Decomposition in Lotic Aquatic Systems: The Potential Use of Algal Growth in Establishing a Postmortem Submersion Interval (PMSI). *Journal of Forensic Sciences*, 49(2), 330-336. doi: 10.1520/JFS2003283
- Håkansson, H. & Hulthén, B. (1986). On the dissolution of pottery for diatom studies. *Norwegian Archaeological Review*, 19(1), 34-38. doi: 10.1080/00293652.1986.9965428
- Hendey, N. (1973). The Diagnostic Value of Diatoms in Cases of Drowning. *Medicine, Science and The Law*, 13(1), 23-34. doi: 10.1177/002580247301300103
- Horton, B., Boreham, S. & Hillier, C. (2006). The Development and Application of a Diatom-Based Quantitative Reconstruction Technique in Forensic Science. *Journal of Forensic Sciences*, 51(3), 643-650. doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00120.x

- Hürlimann, J., Feer, P., Elber, F., Niederberger, K., Dirnhofer, R. & Wyler, D. (2000). Diatom detection in the diagnosis of death by drowning. *International Journal of Legal Medicine*, 114(1-2), 6-14. doi: 10.1007/s004149900122
- Idris, A., Berg, R., Bierens, J., Bossaert, L., Branche, C., Gabrielli, A., ... Timerman, S. (2003). Recommended Guidelines for Uniform Reporting of Data from Drowning. *Circulation*, 108(20), 2565-2574. doi: 10.1161/01.CIR.0000099581.70012.68
- Jansma, M. J. (1984). Diatom analysis of prehistoric pottery. In D. G. Mann (Ed.), *Proceedings of the 7th International Diatom Symposium at Koenigstein*, 529-536. Koenigstein, Germany: O. Koeltz.
- Kane, M., Fukunaga, T., Maeda, H. & Nishi, K. (1996). The detection of pico-plankton 16S rDNA in cases of drowning. *International Journal of Legal Medicine*, 108(6), 323-326. doi: 10.1007/BF02432130
- Keiper, J., & Casamatta, D. (2001). Benthic organisms as forensic indicators. *Journal of the North American Benthological Society*, 20(2), 311-324. doi: 10.2307/1468325
- Kobayashi, M., Yamada, Y., Zhang, W., Itakura, Y., Nagao, M. & Takatori, T. (1993). Novel detection of plankton from lung tissue by enzymatic digestion method. *Forensic Science International*, 60(1-2), 81-90. doi: 10.1016/0379-0738(93)90095-R
- Langer, A., Mackler, A., Rubin, I., Hammond, E. & Selikoff, I. (1971). Inorganic Particles in Cigars and Cigar Smoke. *Science*, 174(4009), 585-587. doi: 10.1126/science.174.4009.585
- Levin, E., Morgan, R., Scott, K. & Jones, V. (2017). The transfer of diatoms from freshwater to footwear materials: An experimental study assessing transfer, persistence, and extraction methods for forensic reconstruction. *Science & Justice*, 57(5), 349-360. doi: 10.1016/j.scijus.2017.05.005
- Ludes, B., Quantin, S., Coste, M. & Mangin, P. (1994). Application of a simple enzymatic digestion method for diatom detection in the diagnosis of drowning in putrefied corpses by diatom analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 107(1), 37-41. doi: 10.1007/BF01247273
- Ludes, B. & Coste, M. (1996). *Diatomeïes et Médecine Légitime*. Paris: Tec & Doc Lavoisier.
- Ludes, B., Coste, M., North, N., Doray, S., Tracqui, A. & Kintz, P. (1999). Diatom analysis in victim's tissues as an indicator of the site of drowning. *International Journal of Legal Medicine*, 112(3), 163-166. doi: 10.1007/s004140050224
- Lunetta, P., Penttilä, A. & Hällfors, G. (1998). Scanning and transmission electron microscopical evidence of the capacity of diatoms to penetrate the alveolo-capillary barrier in drowning. *International Journal of Legal Medicine*, 111(5), 229-237. doi: 10.1007/s004140050159
- Lunetta, P., Miettinen, A., Spilling, K. & Sajantila, A. (2013). False-positive diatom test: A real challenge? A post-mortem study using standardized protocols. *Legal Medicine*, 15(5), 229-234. doi: 10.1016/j.legalmed.2013.03.002
- Maidana, N. I. (2013). El test de diatomeas en el diagnóstico de muerte por sumersión. *Acta Nova*, 6(1-2), 70-81.

- Matsumoto, H. & Fukui, Y. (1993). A simple method for diatom detection in drowning. *Forensic Science International*, 60(1-2), 91-95. doi: 10.1016/0379-0738(93)90096-S
- Ming, M., Meng, X. & Wang, E. (2007). Evaluation of four digestive methods for extracting diatoms. *Forensic Science International*, 170(1), 29-34. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.08.022
- Neidhart, D. & Greendyke, R. (1967). The Significance of Diatom Demonstration in the Diagnosis of Death by Drowning. *American Journal of Clinical Pathology*, 48(4), 377-382. doi: 10.1093/ajcp/48.4.377
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *Informe mundial sobre los ahogamientos: prevenir una importante causa de mortalidad*. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/251498/9789243564784-spa.pdf;jsessionid=8E463CC5F4060FCEB9245634350AE7E3?sequence=1>
- Pachar, J. & Cameron, J. (1992). Submersion Cases: A Retrospective Study —1988–1990. *Medicine, Science and the Law*, 32(1), 15-17. doi: 10.1177/002580249203200105
- Peabody, A. (1977). Diatoms in Forensic Science. *Journal of the Forensic Science Society*, 17(2-3), 81-87. doi: 10.1016/S0015-7368(77)71130-2
- Peabody, A. (1980). Diatoms and Drowning—A Review. *Medicine, Science and the Law*, 20(4), 254-261. doi: 10.1177/002580248002000406
- Pollanen, M. (1997). The Diagnostic Value of the Diatom Test for Drowning, II. Validity: Analysis of Diatoms in Bone Marrow and Drowning Medium. *Journal of Forensic Sciences*, 42(2), 286-290. doi: 10.1520/JFS14112J
- Rácz, E., Könczöl, F., Tóth, D., Patonai, Z., Porpácz, Z., Kozma, Z. ... Sipos, K. (2016). PCR-based identification of drowning: four case reports. *International Journal of Legal Medicine*, 130(5), 1303-1307. doi: 10.1007/s00414-016-1359-7
- Raffo, O. H. (1980). *La muerte violenta: lugar del hecho, examen del cadáver, autopsia médico-legal homicidios, suicidios, huellas e indicios, aspectos jurídicos*. Buenos Aires: Editorial Universidad.
- Rohner, H. & Rothschild, M. (2013). Algenrasen auf Wasserleichen zur Abschätzung der Wasserliegezeit. *Rechtsmedizin*, 23(6), 449-453. doi: 10.1007/s00194-013-0911-8
- Romero Palanco, J. (2007). Muertes por sumersión: Revisión y actualización de un tema clásico de la medicina forense. *Cuadernos de Medicina Forense*, 13(48-49). doi: 10.4321/S1135-76062007000200001
- Round, F. (1971). The growth and succession of algal populations in freshwaters. *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Mitteilungen*, 19(1), 70-99. doi: 10.1080/05384680.1971.11903924
- Schellmann, B. & Sperl, W. (1979). Diatomeen-Nachweis im Knochenmark (Femur) Nichtertrunkener. *Zeitschrift Für Rechtsmedizin*, 83(4), 319-324. doi: 10.1007/BF01882178
- Scott, K., Morgan, R., Jones, V. & Cameron, N. (2014). The transferability of diatoms to clothing and the methods appropriate for their collection and analysis in forensic geoscience. *Forensic Science International*, 241, 127-137. doi: 10.1016/j.forsciint.2014.05.011

- Scott, K., Morgan, R., Jones, V., Dudley, A., Cameron, N. & Bull, P. (2017). The Value of an Empirical Approach for the Assessment of Diatoms as Environmental Trace Evidence in Forensic Limnology. *Archaeological And Environmental Forensic Science*, 1(1), 49-78. doi: 10.1558/aefs.32474
- Sidari, L., Di Nunno, N., Costantinides, F. & Melato, M. (1999). Diatom test with Soluene-350 to diagnose drowning in sea water. *Forensic Science International*, 103(1), 61-65. doi: 10.1016/S0379-0738(99)00056-0
- Stevenson, R., Pan, Y., & van Dam, H. (2010). Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*, 2, 57-85. doi: 10.1017/CBO9780511763175.005
- Tabbara, W. & Dérobert, L. (1962). Le diagnostic médico-légal de la submersion vitale par la recherche des diatomées dans la moelle osseuse. In J. Baillière et Fils (Eds.), *Annales de Médecine Légale et de Criminologie*, 42-43, (pp. 374-381).
- Terazawa, K. & Takatori, T. (1980). Isolation of intact plankton from drowning lung tissue by centrifugation in a colloidal silica gradient. *Forensic Science International*, 16(1), 63-66. doi: 10.1016/0379-0738(80)90180-2
- Teschke, K. & Demers, P. (2001). Industria del papel y de la pasta de papel. In Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales Subdirección General de Publicaciones (Ed.), *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo* (pp. 72.1-72.22). Madrid, España: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales.
- Timperman, J. (1972). The diagnosis of drowning. A review. *Forensic Science*, 1(4), 397-409. doi: 10.1016/0300-9432(72)90015-5
- Uitdehaag, S., Dragutinovic, A. & Kuiper, I. (2010). Extraction of diatoms from (cotton) clothing for forensic comparisons. *Forensic Science International*, 200(1-3), 112-116. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.03.039
- Vallejo, G., Azparren, J., Sánchez de León, M., Contardi, L., & Valverde, J. (2012). Pruebas biológicas complementarias en las muertes por sumersión. *Revista Española De Medicina Legal*, 38(1), 17-27. doi: 10.1016/j.reml.2011.12.001
- Wahl, W. (1876). Infusorial earth and its uses. *Journal of the Franklin Institute*, 102(6), 407-422. doi: 10.1016/0016-0032(76)90163-0
- Yange, L., Chuanying, H., Chengxing, W., & Xu, W. (1999). Development of can for destruction of organic material in use for forensic diatom examination. *Forensic Science International*, 101(3), 163-166. doi: 10.1016/S0379-0738(98)00196-0
- Yen, L. & Jayaprakash, P. (2007). Prevalence of diatom frustules in non-vegetarian foodstuffs and its implications in interpreting identification of diatom frustules in drowning cases. *Forensic Science International*, 170(1), 1-7. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.08.020
- Zimmerman, K., & Wallace, J. (2008). The Potential to Determine a Postmortem Submersion Interval Based on Algal/Diatom Diversity on Decomposing Mammalian Carcasses in Brackish Ponds in Delaware. *Journal of Forensic Sciences*, 53(4), 935-941. doi: 10.1111/j.1556-4029.2008.00748.x

Micología forense

María Cecilia Tranchida, Marta Noemí Cabello

Instituto de Botánica C. Spegazzini. Unidades de Investigación Anexo Museo FCNyM 122 y 60 S/N.
(1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina. ctranchida@conicet.gov.ar

INTRODUCCIÓN

La micología es una rama de la biología, definida como la ciencia que estudia todos los grupos de hongos, Chitridiomycota, Mucoromycota, Zoopagomycota, Ascomycota, Basidiomycota y hongos imperfectos (Spatafora *et al.*, 2016). El término hongo o fungi hace referencia a organismos eucariotas, heterótrofos, cuyas paredes celulares son de quitina, entre los que se encuentran los vulgarmente llamados mohos, levaduras y setas. Los hongos se asocian a otros organismos de diferentes maneras: patógenos (causándole enfermedad al huésped), como comensales (sin perjudicarse ni beneficiarse mutuamente), mutualistas (siendo ambos organismos beneficiados por la asociación) o saprobios (degradando materia orgánica) (Alexopoulos y Mims, 1979).

El patrón de distribución geográfica de los hongos no ha sido tan estudiado como el de plantas o animales, pero estos organismos también presentan distribuciones particulares y preferencias de hábitats. Los hongos se dispersan generalmente por esporas de origen sexual o asexual; un hongo puede presentar ambos tipos de esporas en su ciclo de vida. Estas son útiles para la caracterización taxonómica, ya que posibilitan la determinación incluso a nivel de especie. La dispersión de las esporas, ya sea de forma individual o en masas, puede ser pasiva (por semillas, insectos, trozos de madera, heces de herbívoros, gotas de lluvia, etc.) o activa (un ejemplo es el género *Pilobolus*) (Alexopoulos y Mims, 1979). Las esporas por sí solas pueden ser indicativas de hábitats específicos, ya que a menudo son indicadores secundarios de especies de plantas (Wiltshire, Hawksworth, Webbe y Edwards, 2014). Su tafonomía también es compleja, pero hay evidencia de que la mayoría cae muy cerca de donde se reproducen, por lo tanto pueden caracterizar áreas pequeñas (Malloch y Blackwell, 1992; Galante, Hortony Swaney, 2001).

Hasta hace muy poco tiempo, el uso de la Micología como evidencia en casos criminales y su empleo como prueba ante la justicia estaban restringidos a casos relacionados con especies venenosas o psicotrópicas. Sin embargo, durante los últimos años se han registrado algunas situaciones en las cuales la presencia de los hongos ha sido tenida en cuenta como prueba válida ante la justicia (Hitosugi *et al.*, 2006; Tranchida, Bravo Berruezo, Stenglein y Cabello, 2018).

El término micología forense es relativamente nuevo y hace referencia al empleo de los hongos como evidencia para la resolución de casos con intervención judicial (Carter y Tibbett, 2003). El objetivo principal de esta rama de la biología forense es datar intervalos post-mortem y post-entierro a partir de la biota fúngica hallada en la superficie de un cuerpo o en el entorno relacionado a un entierro clandestino.

EVIDENCIA TRAZA

Las esporas de hongos, al igual que otros elementos palinomórficos, pueden ser transportadas mediante el contacto con algún elemento y son sometidas a consideraciones tafonómicas (Wiltshire, 2009a). Generalmente, cualquier superficie puede considerarse fuente de estructuras palinomórficas, siendo el suelo, sedimentos, plásticos, telas y vegetación las mayores fuentes para las investigaciones criminales. Pero las esporas de hongos (incluyendo líquenes) proveen evidencia traza en situaciones en las que otros tipos de estructuras son escasas o están ausentes (Wiltshire, 2009a).

La capacidad del hongo para desarrollarse depende de la existencia de un suministro adecuado de nutrientes. Para encontrar especies de hongos en estudios de campo, los micólogos se valen de su vista, lupa de mano y propia experiencia. Esto sumado a métodos de muestreo de vegetación y suelos, resulta en una buena forma de obtener muestras forenses de palinomorfos que pueden dar evidencia de especies, incluso extraordinariamente raras (Hawksworth y Wiltshire, 2011).

Existen pocos casos en la literatura que informan de hongos utilizados como rastro de evidencia en la escena del crimen; se pueden destacar dos ejemplos del Reino Unido. El primero se trata del homicidio de una mujer joven, cuyo cuerpo fue arrojado a una cama de ortigas. La ortiga (*Urtica dioica* L.) puede estar relacionada con alrededor de 92 especies de hongos, de los cuales aproximadamente 17 son conocidos por su relación con esta planta (Ellis y Ellis, 1997, 1998). Esporas de *Periconia* sp. y *Torula herbarum* (Pers.) Link, se encontraron en preparaciones palinológicas de la escena del crimen y también en el coche del sospechoso. Esto resultó un importante sustento ecológico y palinológico, evidencia que demuestra un vínculo entre el sospechoso y el lugar donde el cadáver había sido depositado (Hawksworth y Wiltshire, 2011).

El segundo caso ocurrió en un contexto de narcotráfico, donde un sospechoso de homicidio se ocultó en una arboleda en Romford, Essex. El ensamblaje de polen de la escena del crimen fue muy similar al asociado en artículos confiscados al sospechoso y la víctima. Las esporas de un hongo patógeno de ciprés *Pestalotiopsis funerea* (Desm.) Steyaert formaron parte de ese conjunto de palinomorfos. Además, esporas de *Endophragmiella* sp. fueron encontradas en la hojarasca y el vehículo usado durante la huida (Wiltshire, 2009b). Este fue un caso donde, a pesar de que los perfiles palinológicos de las muestras control y muestras colectadas para búsqueda de evidencia fueron similares, las esporas de los hongos proporcionaron una resolución adicional que añadió poderosa información para el tribunal.

La precisión de los datos de polen se ven reforzados por las esporas fúngicas, y proporcionan un mayor nivel de correlación entre muestras de comparación y ob-

jetos recuperados de sospechosos. Los hongos generalmente se encuentran en baja concentración en preparaciones palinológicas, significando que debe existir un gran número de palinomorfos para encontrar hongos. Así, las esporas raras mejoran el valor de esta clase de evidencia de rastreo (Wiltshire *et al.*, 2014). Esto está demostrado por un caso de violación investigado por la policía Inglesa en 2009, donde el relato de la víctima y el sospechoso discrepan, entre otros aspectos, respecto del lugar. Diecinueve hongos característicos de hojas muertas y ramas de plantas leñosas se encontraron en la ropa y calzado de la víctima y/o sospechoso. La alta proporción de taxones coincidentes con el sitio descripto por la víctima resultó definitiva para la identificación de la escena real y la posterior confesión del sospechoso y resolución del caso (Hawsworth, 2009a; Wiltshire, 2009a).

INTERVALO POST-MORTEM

En la actualidad y de forma casi sorprendente, es prácticamente nula la información sobre el papel de hongos en la descomposición de los cadáveres humanos (Janaway, 1996; Carter, Yellowlees y Tibbett, 2007). Janaway, Percival y Wilson (2009) comentaron que los hongos del suelo podrían estar involucrados en la superficie del cuerpo. Aunque los humanos sanos pueden tener infecciones micóticas, los hongos involucrados suelen ser especies especializadas, tolerantes a la temperatura del cuerpo humano y capaces de evadir el sistema inmune. Las infecciones comunes van desde hongos dermatofíticos, que parasitan la superficie de la piel, cabello y uñas, a infecciones invasivas, como candidiasis o aspergilosis que desarrolla en distintos tejidos (McGinnis, 1980; Ajello y Hay, 1998; de Hoog, Guarro, Gene y Figueras, 2000). En individuos inmunocomprometidos, una variedad de agentes fúngicos menos especializados pueden ocasionalmente invadir de forma oportunista los tejidos humanos (Smith, 1989).

Los hongos observados durante autopsias médicas pocas veces han sido tenidos en cuenta por los investigadores. Lo estudiado hasta el momento indica que se tratan de organismos sin relevancia médica no especializados, que solo colonizan y descomponen la superficie de los tejidos después de la muerte. Información clave en patología forense se pueden observar en el trabajo de Sakkudo y Knight (2004) que corresponde a un caso de crecimiento fúngico extenso luego de 6 semanas de ocurrido el deceso. Otro ejemplo está documentado por Dolinak, Matschey y Lew (2005), donde el desarrollo de hongos fue evidente luego de meses en un cadáver embalsamado. Sin embargo, los hongos involucrados generalmente no han sido identificados ni siquiera a nivel de género, ni fueron considerados como herramienta forense.

Los primeros investigadores en apreciar que el crecimiento fúngico en cadáveres tenía un papel en la determinación de la hora de la muerte fueron van de Voorde y van Dijck (1982). Estos autores hicieron aislamientos de la piel de una mujer hallada muerta en una habitación en Bélgica. Incubaron el material aislado a la misma temperatura que la que tenía el cuerpo encontrado y midieron los tamaños de las colonias fúngicas diariamente. Estimaron que la mujer había muerto

al menos 18 días antes del hallazgo, y eso estuvo de acuerdo exactamente con la posterior confesión por parte del homicida. Los hongos involucrados en este caso fueron: *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Geotrichum candidum* Link, *Hormodendrum* sp., *Mortierella* sp. y *Penicillium chrysogenum* Thom.

Posteriormente, Ishii, Hitosugi, Yaguchi, Nishimura, Hosoya y Tokudome (2006) informaron crecimiento de hongos en la superficie de un cuerpo momificado encontrado en una casa abandonada, y en restos esqueléticos descubiertos en un bosque; a partir de esto sugirieron que los hongos «pueden revelar hábitats locales». Identificaron *Aspergillus chevalieri* Thom y Church, *Aspergillus repens* (Corda) Sacc, junto a *Aspergillus rubrum* (Jos. König, E. Spieckermann & W. Bremer) Thom y Church y *Gliocladium* sp. (en realidad probablemente una especie de *Clonostachys* sp). Los datos obtenidos concordaron con los resultados de las autopsias correspondientes.

Otro caso donde la incorporación de hongos como evidencia forense resultó fundamental, fue el hallazgo de un cadáver en un sistema de tuberías en Londres. El intervalo post-mortem, al inicio subestimado por las bajas temperaturas, ausencia de insectos y carroñeros, pudo finalmente determinarse por evidencia micológica (Wiltshire, 2005).

En 2009 la policía de Escocia llevó a cabo un estudio (Hawksworth, 2009b) sobre un homicidio en un lugar confinado, de tal forma que no se registraba actividad de fauna cadavérica. El cultivo de hongos detectado en el mobiliario, la recreación experimental de condiciones de humedad acordes (al menos 95% de humedad relativa) (Onions, Allsopp y Eggins, 1981), y la evaluación de la tasa de aumento de tamaño de las colonias permitieron establecer la fecha de la muerte. Las tres especies principales involucradas en esta investigación fueron *Mucor plumbeus* Bonord, *Penicillium brevicompactum* Dierckx y *Penicillium citrinum* Thom.

Las colonias fúngicas en cadáveres humanos, o asociadas a ellos, pueden dar indicaciones de tiempo de muerte, ya que hay información sobre las tasas de crecimiento de muchas especies. Pero la confiabilidad de cualquier estimación depende de la precisión de la identificación del hongo, el método de almacenamiento del cuerpo y la disponibilidad de datos como temperatura y humedad en el sitio. Todavía hay pocos datos precisos sobre tasas reales de crecimiento en tejidos humanos muertos, especialmente bajo diferentes condiciones de temperatura y humedad.

LOCALIZACIÓN DE CUERPOS

El entierro de cadáveres humanos en ambientes naturales y seminaturales ocurre mayormente como intento de ocultar la evidencia de un crimen, y la habilidad para localizar estas tumbas clandestinas puede ser una de las tareas más importantes del proceso de investigación (Tranchida y Cabello, 2017). El primer estudio experimental parece ser el de Parkinson *et al.* (2009), quienes intentaron comparar los cambios en las comunidades de hongos en el suelo en respuesta a la descomposición de cadáveres humanos en la superficie. Sus resultados expusieron que las muestras control fueron significativamente diferentes a las muestras tomadas bajo los cadáveres. A

pesar de lo innovador del ensayo, no se evaluó la sucesión fúngica del suelo bajo la influencia de cuerpos en descomposición y tampoco se identificó a nivel específico la micobiota desarrollada. Anteriormente, Carter y Tibbett (2003) realizaron ensayos en suelos de bosques donde simularon el aporte de compuestos nitrogenados que un cuerpo humano en descomposición haría al suelo y pudieron diferenciar, a grandes rasgos, dos grupos fúngicos heterogéneos durante la sucesión que denominaron: «hongos del Nitrógeno», a los que aparecen en una etapa temprana como hongos imperfectos, Ascomycetes, y Basidiomycetes saprótrofos, que esporulan entre uno y 10 meses después de la incorporación del Nitrógeno al suelo; y «hongos de la post-putrefacción», a los que lo hacen de forma tardía, que pueden esporular entre uno y cuatro años luego del aporte nitrogenado, como Basidiomycetes que forman ectomycorizas. El potencial de los hongos para la detección de lugares de entierro fue mencionado por Sagara (1992) y ha sido resaltado por Carter y Tibbett (2003), y Tibbett y Carter (2003). Sin embargo existe al día de hoy una amplia discusión acerca de la aplicación de estos organismos en la detección de tumbas clandestinas, debido al poco número de casos que sustentan esta evidencia y a la identificación de las especies que los autores antes mencionados realizaron en sus trabajos. Por otro lado los hongos pueden ser indicadores de alteraciones en la escena del crimen, donde ramas o materia vegetal haya sido movida o alterada. Los hongos son geotrópicos, y en el caso de las setas (hongos de sombrero) el estipe o pie crece de manera vertical y el píleo o sombrero de manera horizontal; cuando son movidos enseguida buscan reorientarse para seguir creciendo de esta forma, mostrando deformaciones, haciendo posible reconocer si la escena del crimen ha sido alterada. La policía de Gales se basó en la reorientación de esporóforos de *Marasmius* sp. para desestimar un testimonio durante la identificación de la tumba supuestamente intacta de una víctima de homicidio (Hawksworth y Wiltshire, 2011).

El tiempo es un factor crítico para el empleo de estos datos como evidencia en tales investigaciones. Simples experimentos podrían llevarse a cabo para evaluar el tiempo requerido para la reorientación del hongo.

LOS HONGOS COMO AGENTES DE ENVENENAMIENTO, ALUCINACIONES Y CAUSA DE MUERTE

Es conocido el consumo de hongos por el ser humano, siendo común la intoxicación por especies mal identificadas. La ingesta accidental o deliberada, puede llegar a ocasionar graves enfermedades, e incluso la muerte. Esta situación se ve agravada si quien colecta hongos silvestres no se encuentra entrenado en la identificación, o no cuenta con una guía apropiada para el reconocimiento de las especies de la región.

En la mayoría de los casos, los resultados no son fatales pero varían según la cantidad consumida y la tolerancia de los individuos. En algunas situaciones, la aparición de los síntomas es rápida, mientras que en otras, pueden no ser evidentes por varios días. Las especies de hongos más toxicas son aquellas que producen amanitininas, giromitinas, muscarinas y orellaninas, correspondientes a los géneros *Amanita*

Dill. ex Boehm, *Gyromitra* Fr., *Conocybe* Fayod e *Inocybe* (Fr.) Fr. y *Cortinarius* (Pers.) Gray, respectivamente; de las cuales solo pequeñas cantidades pueden resultar fatales (Benjamin, 1995). El número de especies realmente venenosas es acotado, pero un gran número puede causar trastornos gástricos. Desafortunadamente algunas de las especies venenosas son bastante comunes y para el público no especialista pueden parecer similares a otras especies comestibles. En casos de intoxicación donde no se cuenta con ejemplares intactos para el examen, las esporas y otros restos microscópicos en el contenido de estómago e intestino pueden usarse para determinar la especie. Esto resulta indispensable para el diagnóstico y tratamiento correctos (Margot, Farquhar y Walting, 1984).

El uso de hongos como alucinógenos, neurotrópicos o drogas psicoactivas, tiene sus raíces en la antigüedad tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo. En todos los países que han firmado la Convención de la ONU de 1971, el uso de sustancias psicotrópicas derivadas de hongos es controlado por la legislación. Por ejemplo, el uso y posesión de setas que producen drogas como la psilocibina y la psilocina son ilegales. Existen al menos 216 especies de hongos que se sabe poseen sustancias neurotrópicas, siendo las de los géneros *Psilocybe* (Fr.) P. Kumm. y *Amanita* las más conocidas y buscadas con este fin. Sin embargo, las concentraciones de psilocibina o amanitina pueden variar ampliamente dentro de una sola especie como resultado de factores biológicos o ecológicos (Stamets, 1996; Guzmán, Allen y Gartz, 2000; Guzmán, 2009).

En escenas del crimen es común encontrar especies fúngicas que no son de la región, debido a su exportación y tráfico. No obstante, se pueden detectar los compuestos psilocina y psilocibina mediante métodos de cromatografía de capa fina (TLC), por cromatografía de gases, espectrometría de masa (GC-MS), cromatografía líquida de gases (GLC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y espectroscopia. Los métodos químicos son especialmente valiosos para detectar la presencia de hongos alucinógenos en preparaciones en forma de polvos, tabletas o cápsulas (Heim, Genest, Hughes y Belec, 1996; Cole, 2003).

Si bien no es normalmente fatal el uso irresponsable de las especies antes mencionadas, éste puede conducir a la muerte ya sea como resultado de un comportamiento errático bajo la influencia de las drogas que contienen, o como resultado de mezclar extractos de los hongos junto con otras drogas.

EL DESARROLLO DE LA MICOLOGÍA FORENSE EN LA ARGENTINA

La Micología Forense como línea de investigación en la Argentina surge en el año 2012, en el marco de las investigaciones desarrolladas en el Instituto de Botánica Carlos Spegazzini, Universidad Nacional de La Plata junto al CONICET. El objetivo general que plantean los investigadores es: i) estimar intervalos post-mortem a partir de los hongos hallados en cadáveres; ii) conocer el intervalo post-entierro a partir de la biota fúngica del suelo en fosas clandestinas.

El estudio más destacado en el intento de establecer el intervalo post-entierro se realizó sobre el caso de la desaparición de un individuo, reportado a la policía local (Tranchida, Centenoy Cabello, 2014). El cuerpo fue hallado pasados 24 días del reporte de su desaparición en un descampado de la provincia de Buenos Aires. Al momento del hallazgo, aspectos de la vegetación, datos climatológicos, y las diferencias de composición específica de la biota fúngica entre muestras de suelo tomadas bajo el cadáver y en sitios control permitieron estimar la fecha del deceso. En el suelo bajo el cuerpo se identificaron: *Dichotomomyces cepii* (Milko) D.B. Scott, *Talaromyces trachyspermus* (Shear) Sotolk y Samson, *Talaromyces udagawae* Stolk y Samson, *Talaromyces flavus* (Klöcker) Sotolk y Samson, *Penicillium restrictum* J.C. Gilman y E.V. Abbott, *Penicillium purpureescens* (Sopp) Raper y Thom y *Penicillium frequentans* Westling mientras que en las muestras control fueron identificadas *Mucor hiemalis* Wehmer, , *Mortierella* sp., *Absidia* sp., *P. frequentans*, *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luannsa-ard, Houbreken Hywel-Jones y Samson, *Trichoderma koningii* Oudem, *Fusarium oxysporum* Schltl, *Clonostachys rosea* (Link) Schroers, Samuels, Seifert y W. Gams, *Aspergillus terreus* Thom, *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. La diferencia en cuanto a la composición de especies de las muestras bajo el cadáver y las muestras control, están relacionadas con los compuestos nitrogenados que recibe el suelo por la descomposición de los restos humanos. Según Tibbett y Carter (2003), los hongos de suelos forestales tratados experimentalmente con urea, amonio u otros compuestos nitrogenados como los que libera el cuerpo al descomponerse, pueden formar estructuras de esporulación en un tiempo mucho menor al que lo harían en suelos sin tratamiento con nitrógeno. Como se mencionara anteriormente, los denominados «hongos del Nitrógeno» y de la «post-putrefacción», son grupos de organismos descomponedores que intervienen en diferentes etapas del proceso de sucesión intrínseco que ocurre durante la descomposición natural de un cuerpo. Los hongos del nitrógeno se hallan en las primeras etapas de la sucesión, e incluyen Ascomycetes y Basidiomycetes saprótrofos. De acuerdo con Sagara (1992), y Fukiharu y Hongo (1995), *D. cepii*, *T. trachyspermus*, *T. flavus*, y *T. udagawae*, que pertenecen a los Ascomycota, corresponderían a los hongos de fase temprana o «del nitrógeno», y el hallazgo de estas especies con sus cuerpos fructíferos es un buen indicador de un período de 25 días post-entierro del cuerpo. Este estudio es el primer registro para Argentina y América del Sur de hongos de suelo aislados e identificados a partir de un sitio donde ocurrió la descomposición de un cuerpo en condiciones naturales.

Por otro lado se realizan estudios de hongos asociados a cuerpos humanos en descomposición y el intervalo post-mortem. El número de estudios sobre la relevancia del papel de los hongos que intervienen en la descomposición de cadáveres, ha ido en aumento en los últimos años, como lo demuestra un creciente número de publicaciones en micología forense (Schwarz *et al.*, 2015).

En Argentina, los primeros pasos se han dado estudiando la diversidad de hongos sobre cuerpos con diferente intervalo post-mortem (IPM, conocido por las autopsias e investigaciones policiales). El primero (cadáver 1) con un IPM de 4 meses (encerrado en una habitación donde la temperatura fue de entre 8 y 17°C), hallado en posición supina, con notable estado de descomposición y evidente crecimiento fúngico en toda su superficie, el resultado de la autopsia realizada concluyó

que la muerte se debió a causas naturales por paro cardiorrespiratorio; el segundo cuerpo (cadáver 2), fue encontrado aproximadamente 20 horas (IPM) después del reporte de desaparición de la víctima, en posición supina en el piso de un edificio en construcción, la temperatura promedio fue de 12 °C, la autopsia determinó que la causa de la muerte era fractura de cráneo.

Las muestras fueron tomadas mediante técnicas microbiológicas estándares con material estéril y procesadas según Tranchida *et al.* (2018).

A partir del cadáver 1 fueron aisladas e identificadas colonias de *Chrysosporium merdarium* (Link) J.W. Carmich, *Cladosporium cladosporioides* (Fresenius) de Vries, *Arthrinium arundinis* (Corda) Dyko y B. Sutton, *Microascus brevicaulis* Abbott, *Aspergillus niger* Tiegh., *A. terreus* Thom, *Candida guilliermondii* (Castell.) Langeron y Guerra (Saccharomycetes; Saccharomicetaceae), y *Candida lipolytica* (F.C. Harrison) Diddens & Lodder ; mientras que a partir del cadáver 2 solo fueron aisladas *A. terreus*, *A. niger* y *C. guilliermondii*.

Es conocida la patogenicidad de *M. brevicaulis* en humanos debido a su actividad queratinolítica, por lo que es capaz de infectar las uñas (Cox e Irving, 1993). No hay información disponible actualmente sobre el rol particular de actividades enzimáticas y metabólicas de especies obtenidas de cadáveres (Ajello, 1998).

Se sabe que los hongos del suelo son capaces de invadir la superficie de un cuerpo sin vida debido a la falta de barreras inmunológicas presentes y activas en el cuerpo humano vivo y saludable (Sagara, Yamanakay Tibbett, 2008; Janaway *et al.*, 2009). Por el contrario, las especies de hongos que son patógenos para los seres humanos, pueden tolerar las temperaturas corporales de los mamíferos y superar las barreras de inmunidad.

El presente estudio aporta valiosa información a los pocos trabajos previos en micología forense, siendo esta la primera cita de las especies *Chrysosporium merdarium*, *Cladosporium cladosporioides*, *Arthrinium arundinis* y *Candida lipolytica* en asociación con cadáveres humanos. El grupo de hongos hallados en el cadáver 1, dan un indicio de la biota fúngica que puede identificarse a partir cuerpos humanos con IPM de cuatro meses durante el otoño-invierno en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Por otro lado según Hawksworth y Wiltshire (2011) los hongos pueden colonizar el cuerpo entre los 3 y 7 días posteriores al deceso, por lo que mediante la biota fúngica aislada del cadáver 2 se pudo estimar que su IPM fue menor a 72 hs.

Debido a que los registros acerca de los hongos como herramienta para establecer tiempo y lugar de muerte son todavía preliminares y hasta el momento estudiados en casos aislados, con resultados no obtenidos por experimentación sistemática, el avance de la micología forense en la Argentina postula a nuestro país entre los pioneros en la implementación de esta nueva herramienta.

CONSIDERACIONES GENERALES ACERCA DE LA MICOLOGÍA FORENSE

Los hongos claramente pueden proporcionar datos útiles y por esta razón las comunidades fúngicas pueden ser propuestas como herramienta forense. La escasa

cantidad de datos obtenidos a partir de estudios de campo resulta de la falta de investigadores forenses entrenados en esta disciplina, sumado a la poca información acerca de que los hongos pueden contribuir significativamente en la investigación. Una caracterización completa de los aislamientos fúngicos a nivel de especie en cada caso forense es fundamental para obtener la información necesaria sobre las colonias de hongos aisladas, como sus requerimientos nutricionales, temperatura óptima y actividades enzimáticas, que permitirán a los investigadores determinar el IPM y el lugar de la muerte. La obtención de tales datos, sin embargo, requiere personal capacitado en el área de micología con énfasis en las ciencias forenses. Esto es el principal inconveniente ya que existen pocos lugares en el mundo donde se estudia la implicancia de los hongos como evidencia forense., Sumado al escaso número de investigadores formados y entrenados en la identificación sistemática del gran número de especies de hongos descriptos, el cual se incrementa año a año. A la falta de profesionales se suma la falta de guías de identificación de hongos, por ejemplo alucinógenos y venenosos que ayuden al reconocimiento de las especies halladas en las escenas de crimen. Puede emplearse la identificación molecular de las especies, para lo que es necesario una base de datos sólida con secuencias cuya identificación morfológica de las colonias haya sido precisa, y se sabe que actualmente en GenBank existen errores en este aspecto.

Por otro lado, es necesario que los oficiales de la justicia conozcan acerca del actual desarrollo de esta herramienta y su implicancia como evidencia judicial, ya que son quienes deben solicitar la toma de las muestras, el análisis de las mismas y el aporte que de ellas se pueden obtener para la resolución de casos. En vista de lo anterior, las situaciones en que la justicia puede considerar el uso de la micología se puede resumir de la siguiente manera:

- Como parte integral de la evaluación ecológica en las escenas del crimen, especialmente en situaciones al aire libre.
- Cuando el momento de la muerte o la deposición es incierto y las colonias de hongos son evidentes en restos humanos, vestimenta o artículos asociados. Esto es particularmente importante si no es posible obtener datos a partir de la entomología. Si hongos y fauna cadavérica se encuentran juntos, los hongos se pueden considerar como una línea independiente de evidencia.
- Cuando se encuentran hongos en las posesiones de un sospechoso, en contenido intestinal, o en alimentos y bebidas asociados con muertes o comportamiento neurotrópico.

A nivel mundial se están realizando poco a poco tareas de investigación para proporcionar información adicional a las causas judiciales a partir de la micología. Cabe resaltar la necesidad de obtener datos de casos reales como de experimentación a campo, tarea que hoy debería ser prioridad para los grupos de investigación en el área. El fruto del esfuerzo conjunto de los investigadores, convertirá sin duda a la micología forense en una herramienta sólida y bien establecida que ayude a resolver casos complejos en todo el mundo.

LITERATURA CITADA

- Ajello, L., Hay, R. J. (1998). Medical mycology. En Topley Wilson's Microbiology and Microbial Infections (487-496). London: Arnold.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C. W. (1979). Introductory Mycology. New York: Wiley J. and Sons.
- Benjamin, D.R. (1995). Mushrooms: Poisons and Panaceas. A Handbook for Naturalists, Mycologists, and Physicians. New York: W.H Freeman.
- Carter, D.O., Tibbett, M. (2003). Taphonomicmycota: fungi with forensic potential. Journal of Forensic Science, 48, 168-171.
- Carter, D.O., Yellowlees, D., Tibbett M. (2007). Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems, Naturwissenschaften, 94, 12–24.
- Cole, M.D. (2003). The analysis of psilocybin and psilocin from fungi. En The Analysis of Controlled Substances (127– 137). New York: J. Wiley.
- Cox, N.H., Irving, B. (1993). Cutaneous 'ringworm' lesions of *Scopulariopsis brevicaulis*. British Journal Dermatology, 129(6), 726–728.
- deHoog, G.S., Guarro, J., Gene J., Figueras, M.J. (2000). Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed. Netherlands:Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Dolinak, D., Matschey, E.W., Lew, E. O. (2005). Forensic Pathology: Theory and Practice. Amsterdam: Elsevier.
- Ellis, M.B., Ellis, J.P. (1997). Microfungi on Land Plants: An Identification Handbook, 2nd ed. England: Richmond Publishing.
- Ellis, M.B., Ellis, J.P. (1998). Microfungi on Miscellaneous Substrates: An Identification Handbook, 2nd ed. England: Richmond Publishing.
- Fukiharu, T., Hongo, T. (1995). Amonia fungi of Iriomote Island in the Southern Ryukyus, Japan and new ammonia fungus, *Hebeloma luchuense*. Mycoscience, 271 (36), 425-430.
- Galante, T.E, Horton, T. R., Swaney D.P. (2001). 95% of basidiospores fall within 1 m of the cap: a field- and modelling-based study. Mycologia, 103, 1175-1183.
- Guzmán, G. (2009). The hallucinogenic mushrooms: diversity, traditions, use and abuse with special reference to the genus *Psilocybe*. En Fungi from Different Environments (256–277). England: Science Publishers. .
- Guzmán, G., Allen, J. W., Gartz, J. (2000). A worldwide geographical distribution of the neurotropic fungi, an analysis and discussion. Annales del MuseoCívico de Rovereto, 14, 89–280.
- Hawksworth, D. L. (2009 a). Report on Identification of Fungal Spores, Report to Wiltshire Constabulary.
- Hawksworth, D. L. (2009b). Final Report on Mycological Findings Associated with Operation Lynx, Report for Tayside Police, Dundee.
- Hawksworth, D.L., Wiltshire P. E. J. (2011). Forensic mycology: the use of fungi in criminal investigations. Forensic Science International, 206, 1–11.
- Heim, R., Genest, K., Hughes, D. W., Belec, G. (1966). Botanical and chemical characterization of a forensic mushroom specimen of the genus *Psilocybe*. Journal of Forensic Science Society, 6, 192–201.

- Hitosugi, M., Ishii, K., Yaguchi, T., Chigusa, Y., Korus, A., Kido, M. (2006). Fungi can be a useful forensic tool. *Legal Medicine*, 8, 240–242.
- Ishii, K., Hitosugi, M., Yaguchi, T., Nishimura, K., Hosoya, T., Tokudome, S. (2006). Analysis of fungi detected in human cadavers. *Legal Medicine*, 8, 188–190.
- Janaway, R. C. (1996). The decay of buried human remains and their associated materials. En: *Studies in Crime: An Introduction to Forensic Archaeology* (58–85). London: Routledge.
- Janaway, R. C., Percival, S.L., Wilson, A. S., (2009). Decomposition of human remains. En *Microbiology and Aging: Clinical Manifestations*(313–334). New York: Springer.
- Margot, P., Farquhar, G., Watling, R. (1984). Identification of toxic mushrooms and toadstools (agarics) – an on-line identification program. En *Databases in Systematics* (249–261), London : Academic Press.
- Malloch, D., Blackwell, M. (1992). Dispersal of fungal diasporas. En *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem* (147–171).New York: Marcel Dekker.
- McGinnis, M. R. (1980). *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. New York: Academic Press.
- Onions, A. H. S., Allsopp, D., Eggins, H. O. W. (1981).*Smith's Industrial Mycology*. London: Edward Arnold.
- Parkinson, R. A., Dias, K. R., Horswell, J., Greenwood, P., Banning, N., Tibbett, M., Vass, A. A. (2009). Microbial community analysis of human decomposition in soil. En *Criminal and Environmental Soil Forensics* (379-394). Dordrecht: Springer Science and Business Media.
- Sagara, N. (1992). Experimental and epigeous fungi. En *The fungal community. Its organization and role in the ecosystem* (427-428). New York: Marcel Dekker.
- Sagara, N., Yamanaka, T., Tibbett, M. (2008). Soil fungi associated with graves and latrines: toward a forensic mycology. En *Soil analysis in forensic taphonomy: chemical and biological effects of buried human remains* (67-107). USA: CRC Press.,
- Saukko, P., Knight, B. (2004). *Knight's Forensic Pathology*. London: CRC Press.
- Schwarz, P., Dannaoui, E., Gehl, A., Felske-Zech, H., Birngruber, C. G., Reinhard, B., Dettmeyer, R. B., Verhoff, M. A. (2015). Molecular identification of fungi found on decomposed human bodies in forensic autopsy cases. *International Journal of Legal Medicine*, 129, 785-791.
- Smith, J. M. B. (1989). *Opportunistic Mycoses of Man and Other Animals*. Wallingford: CAB International.
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O'Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M., Stajich, J. E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028-1046.
- Stamets, P. (1996). *Psilocybin Mushrooms of the World and identification guide*. California: Ten Speed Press.

- Tibbett, M., Carter, D.O. (2003). Mushrooms and taphonomy: the fungi that mark woodland graves. *Mycologist*, 17, 20-24.
- Tranchida, M. C., Centeno, N. D., Cabello, M. N. (2014). Soil fungi: Their potential uses a forensic tool. *Journal of Forensic Science*, 59, 785-789.
- Tranchida, M. C., Cabello, M. N. (2017). The Mycology as Forensics Tool. *Advanced Techniques in Biology and Medicine*, 5, 226.
- Tranchida, M. C., Bravo Berruezo, L. E., Stenglein, S. A., Cabello, M. N. (2018). Mycobiota associated with human cadavers: First record in Argentina. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, 51 (2), 39–47.
- van de Voorde, H., van Dijck, P. J. (1982). Determination of the time of death by fungal growth. *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, 89, 75–80.
- Wiltshire, P. E. J. (2005). Estimated Time of Death of a Corpse on a Railway Line at Ruislip Station. London: Report for British Transport Police.
- Wiltshire, P.E.J. (2009 a). Forensic ecology, botany, and palynology: some aspects of their role in criminal investigation. En *Criminal and Environmental Soil Forensics* (129–149). Dordrecht: Springer Science and Business Media. .
- Wiltshire, P. E. J. (2009 b). Report on Palynological Analysis of Comparator Samples, Clothing and Footwear in the Case of R. v. I. Wiltshire, Report to Wiltshire Constabulary.
- Wiltshire, P. E.J., Hawksworth, D. L., Webbe, J. A., Edwards, K. J. (2014). Palynology and mycology provide separate classes of probative evidence from the same forensic samples: A rape case from southern England. *Forensic Sciences International*, 244, 86–195.

Entomología forense

María Rosana Ayón

Servicio de Biología Forense, Departamento Técnico Científico, Cuerpo de Investigaciones Fiscales, Ministerio Público de Salta. Avda. Bolivia 4671, (CPA4408FV6) Salta Capital.
rosanaay@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

La entomología forense es una rama especializada de la Biología que tiene como objeto de estudio a la fauna cadavérica, es decir insectos y otros artrópodos presentes en un cadáver. Vinculada al ámbito judicial, se divide en tres áreas principales: entomología urbana, entomología de productos almacenados y entomología médico-criminal o legal.

La entomología forense urbana incluye aspectos relacionados con el derecho civil que involucran artrópodos como plagas de casas y jardines, o bien el derecho contravencional y penal como ser infracciones a leyes de protección del medioambiente. La entomología forense de productos almacenados generalmente trata infestaciones de artrópodos o contaminación de productos comerciales de gran alcance, mientras que la entomología forense médico legal se ocupa del uso de insectos u otros artrópodos asociados a un cadáver en descomposición, para determinar el intervalo postmortem (IPM), que es el tiempo transcurrido entre la muerte de una persona y el descubrimiento del cadáver, así como en el inicio de la investigación pericial. De esta forma se proporcionan datos no disponibles mediante el uso de los métodos clásicos de la medicina para establecer la data de muerte (Anderson y Van Laerhoven, 1996; Greenberg y Kunich, 2002), siendo el componente dominante y el más importante de la entomología forense general.

Al producirse la muerte, la datación de fenómenos biológicos resulta de interés para la investigación forense. Tanto en el ámbito civil como en el penal, se presentan situaciones en las cuales el hecho de precisar el momento en que ocurrió la muerte puede determinar si hubo o no abandono de persona, establecer el orden de fallecimiento de dos personas a fin de otorgar derechos sucesorios, incriminar o exculpar a un posible sospechoso de homicidio; en función del tiempo en el que ocurrió el deceso (Trezzza, 2012). En el inicio del proceso de descomposición, los parámetros médicos pueden establecer la causa, forma y tiempo de muerte. Sin embargo, a medida que avanza este proceso, la determinación del IPM en la autopsia se hace más difícil y menos precisa.

La actividad entomológica sobre restos humanos en descomposición es normalmente inhibida por las medidas higiénicas de enterramiento o cremación, pero

existen circunstancias como el homicidio o muerte súbita que pueden exponer los cuerpos a los efectos naturales del medio ambiente, incluyendo la colonización de insectos (Nourteva, 1977). Durante la descomposición el cadáver experimenta cambios físicos, biológicos y químicos que proveen protección, humedad y alimento a los insectos sarco-saprófagos (Henssge, Madea, Knight, Nokes, Krompecher, 1995; Begon, Harper, Townsend, 1999). Durante la degradación cadavérica ciertos recursos se agotan y otros quedan disponibles, provocando cambios en la composición específica de insectos a medida que avanza el proceso de descomposición que puede producirse en un período de escala de meses o años (Begon *et al.*, 1999; Carvalho, Thyssen, Linhares, Palhares, 2000; Anderson, 2001; Byrd y Castner, 2009).

HISTORIA

El primer documento registrado sobre entomología forense fue reportado por un investigador chino en el siglo XIII, en el libro de Medicina Legal *Hsiyüan Chilu* (Benecke, 2001). Se describe el caso de una persona apuñalada en un campo de arroz. El día después de la muerte, el investigador llamó a todos los trabajadores y les ordenó colocar sus herramientas de trabajo en el suelo. Trazas invisibles de sangre atrajeron a las moscas hacia una de las herramientas y al ser confrontado el dueño de la herramienta confesó su crimen.

En la Edad Media varios documentos ilustran gusanos en cadáveres, incluyendo la «Danza de la muerte» en el siglo XV y en el siglo XVI en una escultura de marfil «Esqueleto en la tumba». Cada ilustración representa la reducción interna de los órganos y la presencia de insectos (Benecke, 2001). En 1752 Gleditsch (citado en Bornemissza, 1957) describe el rol de los escarabajos de las tumbas o *burying beetles* y entre 1800 y 1900, durante exhumaciones en Francia y Alemania, médicos legistas observaron que los cuerpos enterrados eran habitados por artrópodos.

La entomología forense nace en Francia en 1886, cuando sus tribunales solicitaron el auxilio de los naturalistas para fijar la fecha de muerte de individuos cuyos cadáveres habían sido ocultados y luego encontrados por la policía. En 1894, el entomólogo Pierre Mégnin publica «La Fauna de los Cadáveres. Aplicación de la Entomología a la Medicina Legal». Allí define a los diferentes grupos de artrópodos como «escuadrillas de la muerte», ya que los insectos son atraídos de forma selectiva y en un orden preciso según las fases de descomposición del cadáver.

A partir de 1920 se realizaron trabajos en Europa y EE.UU. sobre descripción de fauna cadavérica y listas de especies, pero con enfoque en ecología, metabolismo o anatomía (Benecke, 2001). Un nuevo ciclo de avances en entomología forense surgió a mediados de la década de 1950, con los experimentos de Bornemissza (1957), en Australia y Reed (1958) y Payne (1965) en Estados Unidos, que estudiaron la sucesión de insectos y las diferentes etapas de descomposición en cadáveres de animales. En 1986, Smith publica el primer libro sobre entomología forense «Un Manual de Entomología Forense», siendo según Hall (1990), una excelente referencia que reúne toda la información pertinente sobre el tema. Desde entonces, se desarrolla investigación básica y de aplicación de la entomología forense en América (Early y Goff,

1986; Goff, Early, Odo, Tullis, 1986; Galloway, Birkby, Jones, Henry, Parks, 1989; Shean, Messinger, Papworth, 1993; Goff, 1993; Jongy Chadwick, 1999; Anderson, 2001; Allaire, 2002; Archery Elgar, 2003; Watson y Carlton, 2003; Tabor, Brewster, Fell, 2004; Tabor, Fell, Brewster, 2005; Gill, 2005; Joy, Liette, Harrah, 2006; Bucheli, Bytheway, Pustilnik, Florence, 2009; Byrd y Caster, 2009; Brundage, Bros, Honda, 2011); Europa y Asia (Castillo, 2002; Arnaldos, Romera, García, Luna, 2001; Arnaldos, Romera, Presa, Luna, García, 2004; García Rojo, 2004; Grassberger y Frank, 2004; Eberhardt y Elliot, 2008; Sharanowski, Walker, Anderson, 2008; Matuszewski, Bajerlein, Konwerski, Szpila, 2008, 2010; Wang, Li, Chen, Chen, Yin, 2008; Azwandi Abu, 2009; Sert, Kabalak, Sabanoglu, 2012; Coban y Beyarslan, 2013; Perveen y Khan, 2013; Morales Rayo, San Martín Peral, Saloña Bordas, 2014; Martin Vega, Nieto, Cifrán, Diaz Aranda, 2017); Australia (Voss, Spafford, Dadour, 2009) y África (Kelly, Van Der Linde, Anderson, 2009; Ekanem y Dike, 2010; Dupont, Champlain, Cyrille, Felix, 2011; Parry, Mansell, Weldon, 2016).

En América del Sur se han realizado estudios en Brasil (Souza y Linhares, 1997; Moura, Carvalho, Monteiro-Filho, 1997; Carvalho *et al.*, 2000; Cruz y Vasconcelos, 2006; Moretti, Ribeiro, Thyssen, Solis, 2008; Biavati, Santana, Pujol, 2010; Oliveira y Dias Vasconcelos, 2010; Ferro y Fischer 2011; Oliveira, Soares, Vasconcelos, 2016; Vasconcelos, Salgado, Barbosa, Souza, 2016); Colombia (Wolff, Uribe, Ortiz, Duque, 2001; Olaya Masmela 2001; Pérez, Duque, Wolff, 2005; Martínez, Duque, Wolff, 2007; Salazar Ortega, 2008; Segura, Usaquet, Sánchez, Chavaire, Bello, 2009; Segura, Bonilla, Usaquet, Bello, 2011; Grisales *et al.*, 2010; Beltrán Alfonso y Villa Navarro, 2011; Barrios y Woff, 2011; Ramos Pastrana y Wolff, 2011; Ramos Pastrana, Velásquez, Wolff, 2014); México (Valdes Perezgasga, Sanchez Ramos, García Martínez, Anderson, 2010); Perú (Iannacone, 2003); Venezuela (Liria Salazar, 2006; Velázquez, 2008); Bolivia (Castillo, Sanabria, Monroy, 2017) y en Argentina (Oliva, Ravioli, Trezza, Navari, 1995; Oliva, 1997, 2001; Centeno, 2000; Centeno, Maldonado, Oliva, 2002; Trigo y Centeno, 2014; Mariani, García Mancuso, Varela, Inda, 2014; Zannetti, Visciarelli, Centeno, 2014, 2015a, 2015b; Zannetti, Camina, Visciarelli, Centeno, 2016 en Buenos Aires; Aballay, Murua Acosta, Centeno, 2008, 2012; Aballay, Fernández Campón, Mulieri, Urquiza, 2011; Aballay, Jofre, Centeno, 2017 en San Juan, Catamarca y Mendoza; Battán Horenstein y Salvo, 2012; Battán Horenstein y Salvo, 2012, Battán Horenstein, Arnaldos, Rosso, García, 2005; Battán Horenstein, Linhares, Rosso, García, 2007, 2010; Battán Horenstein, Rosso, García, 2012 en Córdoba; Armani, Centeno, Dahinten, 2015; Armani, Dahinten , Centeno, 2017 en Chubut).

ETAPAS DE DESCOMPOSICIÓN

Desde que se produce la muerte aparecen una serie de cambios en el cadáver que de acuerdo a características de aparición, persistencia y desaparición reciben diversas denominaciones. La descomposición es un proceso continuo y sin etapas discretas, comenzando desde la muerte hasta la reducción esquelética del cadáver, con características físicas y químicas particulares (Schoenly y Reid, 1987; Goff, 2009). Sin embargo, estas transformaciones cadavéricas transcurren en una cronología predecible,

por lo tanto se aplica su estudio a la estimación de la data de la muerte. Los signos de transformaciones cadavéricas pueden clasificarse en modificaciones inmediatas, intermedias y tardías (Trezza, 2012; Caputi, 2015).

Los fenómenos inmediatos se caracterizan por la presencia de:

- Deshidratación: producto de la evaporación del agua corporal. Está directamente influenciada por la temperatura y se acelera en ambientes calurosos, ventilados y con corrientes de aire.
- Livideces: manchas que aparecen en la piel de determinados sectores corporales como consecuencia de acumulación posicional de sangre por acción de la gravedad.
- Rigidez cadavérica: es un estado de endurecimiento generalizado del cuerpo producido por la tiesura y acortamiento del tejido muscular.
- Enfriamiento cadavérico: descenso postmortem de la temperatura corporal hasta nivelar la ambiental, a excepción de que la temperatura ambiente sea superior a la temperatura corporal, en cuyo caso no habrá descenso térmico.

Los fenómenos mediatos son un complejo proceso que conduce a la desaparición progresiva de las partes blandas del cuerpo por acción de sustancias químicas y actividad bacteriana; con el accionar ocasional de entomofauna carroñera, hongos y carroñeros vertebrados. Este proceso evoluciona en fases sucesivas:

- Periodo cromático: cambios en la coloración de la piel con presencia de palidez cérea, mancha verde abdominal en la región de la fossa ilíaca derecha. Su coloración inicial, entre verde y azulada, aumenta paulatinamente su intensidad y se extiende a zonas contiguas. Las bacterias intestinales comienzan a reproducirse y se diseminan por el cuerpo. Este desarrollo bacteriano en los vasos superficiales de la piel produce que se dibuje la trama vascular sobre la superficie cutánea en tono rojizo, violáceo o verdoso.
- Período enfisematoso: se desarrollan gérmenes bacterianos productores de gas que se acumula dentro de las cavidades corporales provocando el aspecto de hinchado en el cuerpo.
- Período colicuativo: se acentúan las transformaciones cutáneas a medida que avanza la putrefacción, se desprenden los cabellos, vello corporal y las uñas. Los gases atrapados dentro del tejido y cavidad corporal comienzan a liberarse con transformación colicuativa de las partes blandas esqueléticas y de los órganos internos.

En los fenómenos tardíos se observan las siguientes características:

- Período reductivo: desaparecen progresivamente los tegumentos restantes y los restos viscerales que aún quedan conforman una masa amorfa negruzca denominada putríago.
- Período de esqueletización: progresiva disagregación y desaparición de las estructuras ligamentarias y capsulares articulares, con el progresivo desprendimiento de las distintas partes esqueléticas.

- Periodo de descalcificación y pulverización esquelética: desmineralización ósea y posterior desintegración.

Existen procesos naturales de conservación cadavérica que pueden actuar impidiendo que la putrefacción se instale ya sea a través del congelamiento o bien deteniendo la evolución de la misma en distintos momentos de su desarrollo mediante procesos tales como la adipocira o saponificación (se origina en el tejido adiposo cadavérico observándose una sustancia de color blanco amarillenta de aspecto jabonoso y semisólida), la corificación (producida por un complejo proceso de deshidratación, coagulación cutánea y transformación de sustancias grasas dando un aspecto del tegumento de cadáver de cuero «recién curtido») y el proceso de momificación (la putrefacción colicuativa es reemplazada por una desecación de los tejidos como consecuencia de una profunda deshidratación tisular desde la superficie) (Trezzà, 2012).

La entomología ha establecido cinco estadios relacionando la etapa tanatológica y la actividad de la entomofauna carroñera en el cadáver. Si bien esta división de etapas es artificial, las mismas tienen una utilidad definida ya que permiten organizar los reportes de investigación y facilitan la interpretación de la información en procesos legales (Goff, 2009).

En 1965, Payne destaca cinco etapas durante el proceso de descomposición de un cuerpo:

- Etapa fresca: comienza en el momento de la muerte hasta que se hace evidente la hinchazón del cadáver.
- Etapa hinchada: los gases producidos por la actividad metabólica de bacterias anaerobias causan primeramente la hinchazón del abdomen y luego de todo el cuerpo.
- Etapa de descomposición activa: comienza con la ruptura de la piel, escape de gases y distensión del cuerpo; el olor es fuerte y rancio.
- Etapa de descomposición avanzada: la mayoría de las larvas abandonan el cuerpo y sólo se observan pupas; toda la carne es removida del cuerpo, quedando algunos restos en la cavidad abdominal; el olor es menos evidente.
- Etapa seca o de restos: desaparece toda la carne, los restos se reducen a piel, cartílagos y huesos.

INSECTOS CARROÑEROS

La entomofauna que coloniza un cadáver puede ser colectada, identificada y preservada de acuerdo al tiempo de su llegada durante la degradación cadavérica. Dípteros (moscas), coleópteros (escarabajos) e himenópteros son los órdenes de insectos de importancia en este proceso (Carvalho y Linhares, 2001).

CICLO DE VIDA

La mayoría de los insectos son ovíparos y los embriones completan su desarrollo fuera del cuerpo de la hembra, aunque también existen especies vivíparas y ovovíparas. Los insectos presentan metamorfosis, proceso complejo que involucra mudas periódicas hasta llegar a la etapa adulta; casi la totalidad son hemimetábolos (tienen metamorfosis incompleta) u holometábolos (tienen metamorfosis completa), aunque algunos pocos grupos se consideran ametábolos, es decir no tienen ningún cambio, excepto en el tamaño a lo largo de su ciclo.

El desarrollo postembrionario está dividido en una serie de etapas cada cual separada de la próxima por una muda o ecdisis. Las formas que el insecto asume entre las mudas son llamadas estadíos, siendo que después de la eclosión del huevo sigue el primer estadío, después de una muda el segundo estadío y así sucesivamente hasta la última muda en la cual emerge el adulto o imago. Los estadíos juveniles se denominan larva y el estadío intermedio entre larva y adulto se denomina pupa, en insectos holometábolos.

Los principales órdenes de insectos involucrados en el proceso de descomposición presentan metamorfosis completa, entre ellos los Díptera Muscoidea son los necrófagos más frecuentes. Este grupo presenta tres estadíos larvales, diferenciándose por el desarrollo de los espiráculos anteriores y las hendiduras de los espiráculos posteriores. Una vez alcanzado el estadío larval III, la larva deja de alimentarse y generalmente se aleja del sustrato, se entierra en el suelo o se esconde en pliegues de las prendas de vestir para empupar. La prepupa o larva postalimentaria (*postfeeding larvae*) se reconoce por ser de un color blanco crema. La pupación se produce dentro de una cubierta con forma de barril, denominada pupario, producto de la modificación de la cutícula larval. El proceso de metamorfosis continúa transformándose en pupa, estado de quiescencia sin movimientos de desplazamiento pero con grandes cambios fisiológicos en su interior, dando lugar al desarrollo y emergencia del adulto. La figura 1 muestra el ciclo de vida de díptero de la familia Calliphoridae.

DIVERSIDAD DE ENTOMOFAUNA CARROÑERA

Entre los dípteros, las familias más importantes son: Calliphoridae, Muscidae, Fanniidae y Sarcophagidae (Greenberg, 1991; Catts y Goff, 1992; Carvalho *et al.*, 2000).

Los Calliphoridae son los dípteros necrófagos más relevantes que juegan un importante rol ecológico en el proceso de descomposición, ya que consumen gran parte del cadáver (Centeno, 2000) y generalmente son los primeros en colonizarlo. Los adultos presentan colores metálicos brillantes y vuelo potente, son atraídos por fuentes de alimento con alto contenido de azúcar o proteínas (néctar o materia orgánica en descomposición) o bien por flores que imitan el olor de la materia orgánica en descomposición. El comportamiento de apareamiento lleva a las moscas a poner los huevos durante la luz del día, sin embargo en algunos casos se registró oviposición nocturna (Greenberg, 1990; Singh y Bharti, 2001; Wyss, Chaubert, Cherix,

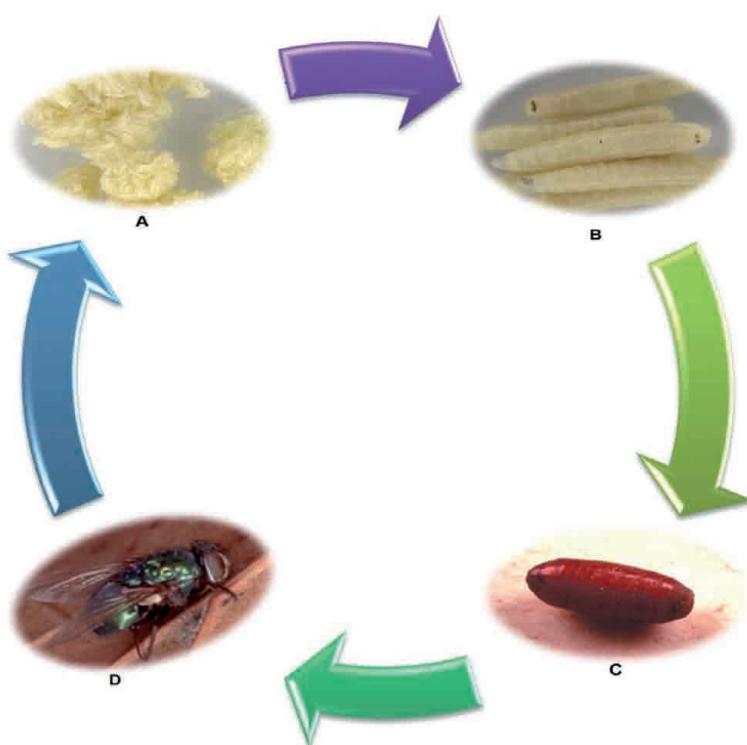


Figura 1. Ciclo de vida del díptero Calliphoridae.

2003). Además son considerados de importancia médica-veterinaria por causar miasis en animales y humanos; ser portadores de virus, bacterias y helmintos (Zumpt, 1965; Lima y Luz, 1991) e incluso algunas especies son empleadas en terapia larval o biocirugía (Sánchez *et al.*, 2004; Figueroa *et al.*, 2007).

Los dípteros de la familia Sarcophagidae poseen una morfología bastante uniforme. Los adultos presentan una coloración grisácea con pruinosidad plateada o dorada y con tres franjas longitudinales oscuras en el tórax. Las hembras son ovovíparas, es decir realizan posturas de larvas, lo que constituye una ventaja adaptativa frente a los grupos ovíparos. La mayoría de las especies se alimentan y crían sus larvas en materia orgánica en descomposición aunque existen especies parasitoides y algunas causan miasis.

Los múscidos presentan coloración variada desde gris, negro o amarillo azul o verde metálico. Su biología y los hábitos son muy variados, ya que los adultos pueden alimentarse de materia orgánica animal o vegetal en descomposición, polen o incluso sangre. Entre los múscidos de interés forense se puede citar a las especies de *Ophyra* (Robineau Desvoidy), *Hydrotaea* (RobineauDesvoidy), como también *Musca domestica* (Linnaeus), *Muscina stabulans* (Fallén), *Muscina assimilis* (Fallén) y *Synthesomyia nudiseta* (van der Wulp), aunque solo *M. domestica* fue citada como colonizadora primaria en cadáveres (Oliva, 1997; Battán *et al.*, 2005), el resto de las especies aparecen asociadas a la descomposición activa o avanzada.

Las Fanniidae son comúnmente llamadas «moscas de las letrinas», son de tamaño pequeño y de color negro, gris o marrón oscuro. Están asociadas a excremento, vegetales en descomposición, productos lácteos y materiales saturados de orina. De

acuerdo a Centeno *et al.* (2002) en el cadáver se encuentran cuando existe abundante putríago durante la descomposición activa y avanzada.

Otro grupo asociado a los cadáveres en descomposición son las Piophilidae, llamadas «moscas saltadoras», las cuales se asocian con fuentes de alimentos ricos en proteínas en una variedad de hábitats que pueden incluir carroña, huesos, piel y pelo. El nombre común proviene de un comportamiento inusual exhibido por las larvas de algunas especies, donde pequeñas papilas en el segmento anal se agarran con su boca y se sueltan repentinamente. Esta acción arroja la larva al aire 7 o 10 cm y lateralmente hasta una distancia de 20 cm, esta técnica es utilizada como mecanismo de «escape» efectivo y para la migración de larvas. Entre las especies podemos mencionar a *Piophila casei* (Linnaeus) («gusano del queso»), que aparece en etapas avanzadas de descomposición.

La familia Stratiomyidae también se puede encontrar en cuerpos en descomposición. Se cita a *Hermetia illucens* (Linnaeus) frecuente en cadáveres humanos al aire libre o enterrados en EE.UU., Hawaii y Brasil (Furman *et al.*, 1959; Pujol Luz *et al.*, 2006). Esta especie deposita una masa de alrededor de 500 huevos en materia orgánica tal como estiércol, carroña, basura o residuos orgánicos (Di Claro y Kaufman, 2009) y a diferencia de la mayoría de otras especies de dípteros, domina en etapas de descomposición avanzada y seca (Lord, Goff, Adkins, Haskell, 1994). Según Sheppard, Tomberlin, Joyce, Kiser, Summer (2002), *H. illucens* tolera valores altos de temperatura y humedad, pudiendo ovipositar en un rango de 24°C a 40°C, con humedades relativas de 30% a 90%, requiriendo una intensidad mínima de luz para el apareamiento.

En cuanto a los coleópteros, la familia Staphylinidae es uno de los grupos que presenta mayor número de especies, conociéndose a nivel mundial más de 47.000 (Navarrete Heredia, Newton, Thayre, Ashe, Chandler, 2002). Según Fernández, Gamarra, Outerelo, Cifria, Baz, 2010, el mayor número de especies e individuos aparece en altitudes medias y su actividad coincide con las máximas temperaturas y las mínimas precipitaciones. De acuerdo a Chani Posse y Thayer (2008), el modo predominante de alimentación en los estafilínidos es la depredación generalista o especialista. Las presas de los depredadores generalistas pueden incluir una variedad de larvas y adultos de Díptera, Coleoptera, larvas de Lepidóptera, Acarina, Araneae, Collembola, Nematoda y Diplopoda.

Las especies de Silphidae tienen hábitos necrófagos o predadores, a veces los dos combinados. Los adultos depredan sobre huevos y larvas demoscas (Payne y King, 1970 en Oliva y Di Orio, 2008; Sabanoglu y Sert, 2010). Están asociados a las etapas de descomposición activa y avanzada (Kocarek, 2003; Matuszewski *et al.*, 2008; Midgley, Richard, Villet, 2010) además tienen preferencia por lugares húmedos y sombreados (Quiroz Rocha, Navarrete Heredia, Martínez Rodríguez, 2008; Velázquez y Viloria, 2009).

Según Smith (1986), los coleópteros derméstidos son un componente significativo de la entomofauna carroñera en animales y humanos, además tienen un comportamiento necrófago. Ellos reducen hasta un 50% el cadáver alimentándose de restos de piel y huesos en estados avanzados de descomposición (Early y Goff 1986; Von Hoermann, Ruther, Aysse, 2012). Los derméstidos adultos muestran

una respuesta negativa a la luz (fototaxis negativa), sin embargo cuando la comida escasea, los escarabajos se alejan de la fuente de alimento actual hacia una fuente de luz. En un cadáver en el que no quedan especímenes vivos de derméstidos, su excremento proporciona evidencia de significado forense; siendo un indicador de la presencia de esta especie.

La familia Cleridae se encuentra asociada desde la etapa hinchada hasta la de descomposición avanzada, son atraídos por la saponificación de ácidos grasos (Turchetto, Lafisca, Constantini, 2001). Los cléridos son de colores brillantes negro o verde metalizado y tanto la larva como el adulto son predadores de estadios inmaduros de coleópteros y dípteros. En el cadáver tienden a permanecer ocultos en el suelo durante el día.

La familia Histeridae se puede encontrar en el cadáver desde la etapa hinchada hasta la etapa seca. Las larvas y adultos de histéridos se alimentan de las larvas de dípteros que colonizan el cuerpo en estas etapas de descomposición. Estos escarabajos tienden a estar activos durante la noche y se esconden debajo del cadáver durante el día.

Durante la etapa seca de descomposición es común encontrar a coleópteros Trogidae. Estos presentan un cuerpo rugoso, usualmente son de forma oblonga a ovalada con una longitud de 5 a 20 mm y de color marrón. Los adultos a menudo se cubren con lodo y putrílago que se incrusta en el cuerpo provocando que el coleóptero se parezca mucho a un pequeño pedazo de escombro o tierra, que puede ser fácilmente pasado por alto. Sus larvas son fácilmente reconocibles, ya que tienen una forma típica de «C».

Con respecto a los himenópteros, éstos acuden a los cuerpos en descomposición para alimentarse o completar sus ciclos vitales buscando hospedador. La presencia de hormigas y avispas pueden provocar un efecto significativo en la reducción de la velocidad de descomposición, debido a la disminución o eliminación de poblaciones de larvas. Así mismo, Mello y Aguiar Coelho (2009) sugieren que la presencia de parasitoides debe tenerse en cuenta ya que ellos interrumpen el ciclo de vida de los califóridos y pueden alterar, inclusive en semanas la determinación del IPM.

De acuerdo con Goff (1993), se reconocen cuatro tipos de relaciones róficas en la comunidad carroñera:

- Necrófagos: son organismos que consumen los tejidos en descomposición del cadáver, constituidos por larvas de moscas Calliphoridae y Sarcophagidae, adultos de coleópteros Silphidae y Dermestidae principalmente. Para estas familias necrófagas el cadáver sirve como sustrato para la oviposición de adultos y fuente de alimento de los inmaduros.
- Necrófilos: son predadores y parasitoides de los necrófagos, representados por coleópteros Cleridae, Staphylinidae e Histeridae y algunas familias de himenópteros como parasitan las larvas o pupas de las moscas.
- Omnívoros: son los que actúan como necrófagos o necrófilos (avispas, hormigas y algunos coleópteros).
- Especies adventicias: son los que usan el cadáver como una extensión de su propio hábitat natural.

ESTIMACIÓN DEL INTERVALO POST MORTEM

A menudo los dípteros necrófagos ovipositan sobre la carroña desde las primeras horas de la muerte. Esta acción inicia un reloj biológico que permitirá la determinación de los tiempos de desarrollo de la progenie de la mosca y de tal manera se podrá estimar el intervalo post-mortem.

Es posible utilizar los datos entomológicos para estimar el IPM de dos maneras básicas. Una de ellas durante los procesos tempranos de descomposición, a partir del estudio de los distintos estadios que se desarrollan en los restos, se puede estimar el tiempo transcurrido desde la primera colonización del cuerpo. Si se logra encontrar el estadio más antiguo que se desarrolló en el cadáver y se establece su edad, en horas o días, es posible conocer desde cuándo el cuerpo fue expuesto por primera vez a la acción de los insectos (Centeno, 2000; Magaña, 2001; Centeno *et al.*, 2002).

Si ha transcurrido mucho tiempo, los restos o señales de los artrópodos en sus sucesivas oleadas sirven para establecer una sucesión temporal y de esta forma también se obtiene una estimación del tiempo transcurrido (Castillo, 2002). Por lo tanto, el conocimiento de los factores que pueden interferir en la descomposición y la colonización del cadáver son de suma importancia para el establecimiento del IPM.

SUCESIÓN CADAVÉRICA

Un cadáver es una fuente de alimento para un gran número de insectos y la composición específica de los mismos cambia a medida que avanza el proceso de descomposición (Byrd y Castner, 2009) y esta sucesión degradativa que tiene lugar en los cadáveres se produce en un período de escala de meses o años (Begon *et al.*, 1999). En la descomposición cadavérica ciertos recursos se agotan y otros quedan disponibles provocando una adición o sustitución de especies de forma predecible determinándose si éstos son necrófagos o bien necrófilos (Payne, 1965, Smith, 1986; Goff, 1993; Catts y Haskell, 1990; Carvalho *et al.*, 2000; Anderson, 2001; Tabor *et al.*, 2005).

Según Anderson (2001) la colonización de insectos en los cadáveres depende de la región geográfica o de la región biogeoclimática entre otros factores; definiéndose región biogeoclimática por el hábitat, la vegetación, tipo de suelo y las condiciones meteorológicas. Ello afecta la descomposición de los restos, que a su vez influye sobre los insectos que lo colonizan.

La secuencia de colonización y el tiempo de arribo de las especies pueden variar de región en región. Por ejemplo, de acuerdo a Pérez *et al.* (2005), en la estación primavera, *Lucilia sericata* (Meigen) es colonizadora primaria en Medellín, Colombia; mientras que, según los registros de Tabor *et al.* (2004) *Phormia Regina* (Meigen) coloniza el cadáver en etapa fresca en Virginia, EE.UU. y según Voss *et al.* (2009) en Perth, Australia, la colonizadora primaria es *Calliphora dubia* (Macquart); para la misma estación. Esto significa que los datos generados en una región o zona biogeoclimática no deben ser utilizados para determinar el tiempo de muerte en una región diferente (Goff, 1993); por lo que es necesario desarrollar una base de

datos de insectos para cada región. De esta manera el conocimiento de la secuencia de los insectos que colonizan un cadáver en un área dada, permitirá determinar el Intervalo Post Mortem (Byrd y Castner, 2009) en esa región.

Con estos fines se realizan experiencias de campo reuniendo la información básica para establecer la línea de base a partir de la cual se puedan realizar pericias forenses en forma confiable. Para estos estudios de descomposición se utilizan una amplia variedad de animales que incluyen: gatos, perros, ardillas, conejos, pollos y otras aves. Sin embargo, el modelo animal de descomposición más aproximado al humano es el cerdo doméstico (*Sus scrofa* L.) (Goff, 1993), por la cantidad de pelos, dieta y fisiología. Esto permite la realización de estudios comparativos y extrapolar los resultados a la especie humana; además no presenta problemas especiales de naturaleza ética en la sociedad.

VARIABLES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO DE DESCOMPOSICIÓN

El conocimiento de las variables que pueden alterar las etapas de descomposición, la colonización y la sucesión de insectos en el cadáver es otro requisito para la estimación del IPM.

Los insectos son animales ectotérmicos, es decir su temperatura es controlada, principalmente, por una fuente externa de calor y su capacidad de generar calor metabólico es insignificante. Las temperaturas tienen un impacto directo en su biología, así la actividad de vuelo y la oviposición de los adultos y el desarrollo de los distintos estadios en el proceso de metamorfosis son dependientes de la temperatura.

La temperatura es el principal factor que influye también en la velocidad de la descomposición, debido a su gran influencia sobre la putrefacción y la actividad de los insectos (Mann, Bass, Meadows, 1990; Campobasso, Di Vella, Intronà, 2001). Tantawi, El-Kadry, Greenberg, El-Ghaffar (1996) mostraron una correlación directa entre la tasa de descomposición y la temperatura, así un aumento o un descenso de la temperatura alteran las tasas de descomposición. Las bajas temperaturas preservan el cuerpo de fenómenos putrefactivos debido a la inhibición de la actividad microbiana y entomológica. Según Shean *et al.* (1993) y Sharanowski *et al.* (2008), los cadáveres expuestos al sol presentan una tasa más rápida de descomposición y un período corto para la colonización de los insectos, pero con mayor variación de la temperatura ambiente con respecto a la temperatura del cadáver, a diferencia de lugares sombreados donde la fluctuación de temperatura es menor.

Además de la temperatura ambiente existen otros factores que se deben tener en cuenta como ser la humedad, la estación, hora del día, la vegetación, la accesibilidad y posición física del cadáver, el tamaño y tipo de cadáver, la acción de vertebrados, la abundancia de insectos y el microclima (Smith, 1986; Catts y Haskell, 1990; Anderson, 2000). La entomofauna carroñera puede variar en una misma región según se trate de una zona urbana o rural, así algunas especies de insectos se encuentran tanto en regiones urbanas, como en regiones rurales, mientras que otras especies

restringen su distribución a determinados hábitats, siendo estas de utilidad para determinar si hubo o no traslado del cadáver (Catts y Haskell, 1990).

Cuando las condiciones del tiempo son favorables, la llegada de los dípteros al cuerpo y la oviposición ocurren dentro de pocos minutos después de la muerte (Smith, 1986). Sin embargo, las especies de dípteros poseen diferencias en la habilidad de ingresar a lugares cerrados, como habitaciones, edificios, baúl de automóviles, sótanos y cadáveres con vestimenta (Pohjoismaki, Karhunen, Goebeler, Sauko, Sääksjärvi, 2010). Estas diferencias influyen retrasando la colonización del cadáver, y alterando la composición de la entomofauna asociada a los cuerpos encerrados, donde la diversidad de especies es menor en relación a los cuerpos expuestos (Goff, 1991). Con respecto al tamaño, cuando los insectos están presentes, los cadáveres pequeños se descomponen más rápido que los cadáveres de mayor tamaño debido al menor volumen de sustrato alimenticio disponible para ser consumido por insectos.

Otra variable a tener en cuenta es la presencia de tóxicos en el cadáver. La entomotoxicología constituye una nueva área dentro de la entomología forense que consiste en la utilización de métodos de análisis toxicológico en insectos involucrados en la descomposición cadavérica para identificar la presencia de drogas y toxinas en los tejidos cadavéricos (Introna, Campobasso, Goff, 2001). La entomotoxicología también estudia el efecto de estas drogas en el desarrollo de los insectos y su implicancia en la determinación del IPM ya que diversas sustancias pueden interferir en la tasa de desarrollo larvario, lo que puede llevar a errores en la estimación del IPM por métodos entomológicos (Goff y Lord, 1994; Goff, Brown, Omori, 1992; Estrada, Grella, Thyssen, Linhares, 2009). Según Goff, Omori, Goodbrod (1989), Goff, Brown, Hewdikarran, Omori (1991) y Catts y Haskell (1990), la cocaína y la heroína aceleran la tasa de desarrollo de larvas de dípteros sarcófágidos; mientras que algunos antibióticos, como la cefazolina y la gentamicina, reducen la velocidad de desarrollo y la supervivencia de larvas (Sherman y Tran, 1995).

La presencia de vestimentas puede alterar la velocidad de descomposición y la colonización del cadáver acelerando o retardando el proceso de putrefacción. La ropa funciona como una barrera al acceso de los insectos, lo que puede retrasar la descomposición y la sucesión en varios días (Goff, 1992). Sin embargo, en cuerpos que traen poca ropa, no hay impedimento para la colonización de insectos, además brinda un microambiente más protegido y con mejores condiciones de humedad y temperatura que favorecen el desarrollo larval, lo que puede conducir a un aumento en la velocidad de descomposición del cuerpo (Mann, 1990; Campobasso *et al.*, 2001). El enterramiento también restringe el acceso de muchos de los insectos involucrados en la sucesión cadavérica, sin embargo pueden encontrarse especies necrófagas porque colonizaron el cadáver previo al enterramiento o bien por la llegada de especies que tienen la habilidad de penetrar el suelo hasta alcanzar el sustrato (Rodriguez y Bass, 1983).

Los dípteros preferentemente colocan sus huevos en las cavidades naturales del cuerpo (boca, nariz, oídos, ojos, ano y vagina), o en sus adyacencias para ofrecer un lugar protegido y húmedo para el desarrollo larval (Campobasso *et al.*, 2001; Cross y Simmons, 2010). De acuerdo con Mann *et al.* (1990), Vass, Bass, Wolt, Foss,

Ammons (1992) y Campobasso *et al.* (2001) las lesiones atraen a los insectos para la oviposición y aceleran la tasa de descomposición del cuerpo.

Las interacciones tróficas entre las especies que colonizan el cadáver también constituyen un factor importante que impacta en los patrones de sucesión (Anderson, 2001; Early y Goff, 1986), ya que en la competencia por espacio y alimento, algunas especies pueden depredar sobre otras. Entre estas, se destaca *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), especie introducida que tiene la capacidad de atacar y comer larvas de otros dípteros, incrementando su abundancia relativa y produciendo exclusión competitiva de otros miembros de la comunidad. Así también, algunas especies de hormigas, particularmente *Solenopsis sp.* (Westwood), se alimentan de los huevos de dípteros que se encuentran sobre el cadáver y provocan un efecto significativo reduciendo la velocidad de descomposición (Payne, 1965; Greenberg, 1991). Por lo tanto, en presencia de especies predadoras, la composición de la entomofauna carroñera puede ser alterada, con la posibilidad de disminución o eliminación de poblaciones de larvas de otras especies.

COLECTA DE INDICIOS ENTOMOLÓGICOS

Considerando que el IPM puede determinarse a través del estudio de la entomofauna cadavérica que coloniza el cadáver, es deseable que un entomólogo sea quien colecte las muestras en la escena del hallazgo. Sin embargo, son pocas las situaciones donde esto es posible, ya sea por la falta de profesionales entomólogos vinculados directamente al sistema judicial o bien por la distancia donde ocurrió el hecho que impiden la presencia del experto durante el levantamiento del cuerpo. Por lo tanto, es necesario contar con información completa acerca de la escena del hallazgo y sus características ambientales, como también resulta imperioso que el personal que acude a la escena haya recibido la formación adecuada en entomología forense.

Según Haskell, Lord, Byrd (2001) el uso de insectos en el ámbito forense requiere de una identificación taxonómica adecuada de las especies involucradas y un correcto levantamiento, conservación y envío de sus muestras. Los últimos puntos son de relevancia ya que el reconocimiento específico se alcanza si los caracteres morfológicos de importancia taxonómica se han conservado correctamente. En el ámbito de la entomología forense los problemas implican errores en la metodología y procedimiento de colecta y en la insuficiente cantidad de muestras recogidas. Los principios que deben aplicarse son la recogida del mayor número de ejemplares y, sobre todo, no seleccionarlos deliberadamente en función de su localización, aspecto, tamaño. Sólo un muestreo aleatorio puede asegurar una representatividad real de la entomofauna presente (Pasquerault, Vincent, Dourel, Chauvet, Gaudry, 2006).

Existe bibliografía general que sugiere procedimientos de colecta y análisis de muestras entomológicas, entre las que se puede citar a Catts y Haskell (1990) y Byrd y Castner (2009). En Argentina, a través del Programa Nacional de Criminalística, dependiente del Ministerio de Justicia y Derechos Humanos (www.jus.gob.ar), se implementó un protocolo guía para el levantamiento y conservación de evidencia, entre ellas las entomológicas.

La colecta de fauna entomológica debe hacerse sobre el cuerpo y en sus alrededores. Se buscan huevos, larvas, exuvias, pupas, puparios y adultos de todos los órdenes de insectos. En las primeras etapas de descomposición se debe prestar especial atención a los orificios naturales del cuerpo y a las heridas con la finalidad de buscar puestas de insectos necrófagos. En cadáveres en estado de esqueletización la búsqueda debe realizarse en la tierra que está por debajo del cadáver y sus alrededores.

Cuando se descubre un cadáver en el interior de una habitación es conveniente buscar las pupas y puparios no solo en el suelo, sino también en lugares oscuros (bajo muebles, baldosas, alfombras, electrodomésticos). En cuanto a las muestras tomadas en autopsia estas no reemplazan a las levantadas en la escena del hallazgo, ya que son complementarias. Además es importante identificar de forma precisa el lugar del levantamiento de las muestras en el cadáver, tanto en la escena del hallazgo como durante la autopsia. Es de suma importancia colectar una doble muestra de estadíos inmaduros, una para conservar y otra para criar en laboratorio hasta la emergencia del adulto, a fines de facilitar la identificación taxonómica de las especies.

Teniendo en cuenta la relación entre los insectos y el medio ambiente, se deben registrar tanto las variables ambientales, como también todas las características del lugar del hallazgo y las que afectan directamente al cadáver como ser el enterramiento y el ocultamiento del mismo. Con respecto a cadáveres encontrados en interiores se deben considerar las aberturas, tales como ventanas, postigos, puertas y también tener en cuenta si la calefacción se encuentra en funcionamiento o no.

Los parámetros ambientales que se deben registrar son los siguientes:

- 1) Temperatura del suelo en la superficie.
- 2) Temperatura bajo el cadáver.
- 3) Temperatura de la masa de larvas.
- 4) Humedad y temperatura de la escena.

La Tabla 1 muestra la metodología de levantamiento, conservación y embalaje de los distintos estadíos de entomofauna carroñera, de acuerdo al protocolo establecido para los laboratorios de Argentina, basado en las propuestas de Byrd y Castner (2009) y Amendt, Campobasso, Gaudry, Reiter, LeBlanc, Hall (2007). En todas las muestras colectadas se deben indicar: número de muestra, nombre del colector, lugar del cuerpo donde fue colectada, fecha, hora, lugar o localidad, provincia, número de causa, expediente o actuación policial.

Tabla 1. Metodología de levantamiento, conservación y embalaje de entomofauna carroñera.

Estadios	Recolección	Conservación y embalaje
HUEVOS	Con pinzas. Colocar en un trozo de carne (5 x 5 x 1 cm aprox.). Envolver el trozo en sobres de papel metalizado dejando entreabierta una de las caras. Colocar en un recipiente plástico con 5 cm de tierra. Cubrir con tela voile y sujetar al recipiente con doble banda elástica.	Posteriormente llevar a cámara de cría hasta la emergencia del adulto.
	Con pinza entomológica o espátula usando guantes de látex y evitando la ruptura de la muestra. Colocar en un recipiente y verter agua caliente. Dejar la muestra en el recipiente por 10 minutos.	Trasladar la muestra a frascos de vidrio o plástico herméticos con alcohol 70%. Realizar doble rótulo, uno con papel vegetal escrito con lápiz que se introduce en el frasco y otro (tipo adhesivo) que se pega al exterior del recipiente.
LARVAS Y PUPAS	Dípteros Larvas: colocar en un trozo de carne (5 x 5 x 1 cm aprox.). Envolver el trozo en sobre de papel metalizado dejando entreabierta una de las caras. Colocar en un recipiente plástico con 5 cm de tierra. Cubrir con tela voile y sujetar al recipiente con doble banda elástica. Pupas: Colocar en un recipiente plástico con 5 cm de tierra. Cubrir con tela voile y sujetar al recipiente con doble banda elástica.	Posteriormente llevar a cámara de cría hasta la emergencia del adulto.
	Coleópteros Con pinzas entomológicas o con mano usando guantes de látex y evitando la ruptura de las muestras.	Trasladar la muestra a frascos herméticos de vidrio o plástico con alcohol 70%.
ADULTOS	Dípteros Sobre el cadáver con red entomológica. Introducir los especímenes en frasco matador con acetato de etilo y tapar. Dejar la muestra en el frasco por el lapso aproximado de 15 minutos hasta la muerte de los especímenes.	Trasladar a sobre de papel.
	Coleópteros Con pinzas entomológicas o amano utilizando guantes de látex y evitando la ruptura de la muestra.	Colocar en frascos herméticos de vidrio o plástico con alcohol 70%. Realizar doble rótulo, uno con papel vegetal escrito con lápiz que se introduce en el frasco y otro (tipo adhesivo) que se pega al exterior del recipiente.

CONSIDERACIONES FINALES

La investigación de una muerte requiere de un trabajo multidisciplinario, con la cooperación de criminalistas, magistrados y científicos, a fines de tener una plena comprensión de la evidencia obtenida en la escena del hallazgo y en la autopsia. De todas las colaboraciones profesionales requeridas, para la determinación del intervalo post mortem, es necesaria una estrecha interacción entre el entomólogo y el médico forense. El médico forense realiza el examen externo e interno del cadáver, analiza las características de las lesiones y los cambios postmortem, como así también supervisa el levantamiento de evidencia física sobre el cadáver. La información que brinda el médico forense y los criminalistas son fundamentales para la interpretación de la evidencia entomológica y para determinar el inicio de la actividad de los insectos, basada ya sea en la composición de la entomofauna carroñera o en la edad de desarrollo de los insectos.

La aplicación de la entomología forense requiere un amplio conocimiento de los factores que interfieren con el proceso de colonización, la acción de los insectos sobre cadáveres en descomposición, su distribución, biología, ecología y comportamiento.

LITERATURA CITADA

- Aballay, F. H., Fernández Campón, F., Mulieri, P. R., Urquiza, S. V. (2011). Sarcophagidae (Diptera) de importancia forense en la puna de Catamarca: la ovoviviparidad como ventaja en condiciones de extrema aridez. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 70, 255-266.
- Aballay, H., Murúa, A. F., Acosta, J. C., Centeno, N. D. (2008). Primer registro de artropodofauna cadavérica en sustratos humanos y animales en San Juan, Argentina. *Revista Sociedad Entomológica Argentina*, 67, 157-163.
- Aballay, F. H., Murúa, A. F., Acosta, J. C., Centeno, N. D. (2012). Succession of carrion fauna in the arid region of San Juan province, Argentina: its forensic relevance. *Neotropical Entomology*, 41, 27-31.
- Aballay, F. H., Jofré, F., Centeno, N. D. (2017). Asociación y estratificación de la entomofauna cadavérica a diferentes profundidades en el suelo como indicadores complementarios en largos intervalos post mortem. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 19, 225-234.
- Allaire, M. T. (2002). *Postmortem interval (PMI) determination at three biogeoclimatic zones in southwest Colorado, Louisiana* (Tesis doctoral, State University and Agricultural and Mechanical Louisiana State University, USA) Recuperado de https://digitalcommons.lsu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1140&context=g_radschool_theses.
- Amendt, J., C. P., Campobasso, E., Gaudry, C., Reiter, Le Blanc H. N., Hall, M. J. R. (2007). Best practice in forensic entomology standards and guidelines. *International Journal Legal Medicine*, 121: 90-104.

- Anderson, G. S. (2000). Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). *Journal of Forensic Sciences*, 45, 824-832.
- Anderson, G. S. (2001). Insect succession on carrion and its relationship to determining time of death. En *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations* (143-176). Florida, CRC Press.
- Anderson, G. S., Van Laerhoven, S. (1996). Initial studies on insect succession on carrion in Southwestern British Columbia. *Journal Forensic Science*, 41, 617-625.
- Archer, M. S., Elgar, M. A. (2003). Effects of decomposition on carcass attendance in a guild of carrion-breeding flies. *Medical and Veterinary Entomology*, 17, 263-271.
- Armani, A. P., Centeno N. D., Dahinten, S. L. (2015). Primer estudio de artrópodo fauna cadavérica sobre modelos experimentales porcinos en el noreste de la provincia del Chubut, Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 74, 3-4.
- Armani, A. P., Dahinten, S., Centeno, N. D. (2017). Artropodofauna cadavérica asociada a cerdo doméstico (*Sus scrofa*) en un ambiente ribereño en Chubut, Argentina. *Revista Colombiana de Entomología*, 43, 262-267.
- Arnaldos, I., Romera, E., García, M. D., Luna, A. (2001). An initial study on the succession of sarcosaprophagous Diptera (Insecta) on carrion in the southeastern Iberian Peninsula. *International Journal of Legal Medicine*, 114, 156-162.
- Arnaldos, M. I., Romera, E., Presa, J. J., Luna, A., García, M. D. (2004). Studies on seasonal arthropod succession on carrion in the southeastern Iberian Peninsula. *International Journal Legal Medical*, 118, 197-205.
- Azwandi, A., Abu, H. A. (2009). A preliminary study on the decomposing and dipterans associated with exposed carcasses in an oil palm plantation in Bandar Baharu, Kedah, Malaysia. *Tropical Biomedicine*, 26, 1-10.
- Barrios, M. L., Wolff, M. I. (2011). Initial study of arthropods succession and pig carrion decomposition in two freshwater ecosystems in the Colombian Andes. *Forensic Science International*, 212, 164-172.
- Battán Horenstein, M., Salvo, A. (2012). Community dynamics of carrion flies and their parasitoids in experimental carcasses in central Argentina. *Journal of Insect Science*, 12, 1-10.
- Battán Horenstein, M., Arnaldos, M. I., Rosso, B., García, M. D. (2005). Estudio preliminar de la comunidad sarcosaprófaga en Córdoba (Argentina): aplicación a la entomología forense. *Anales de Biología*, 27, 191-201.
- Battán Horenstein, M., Linhares, A. X., Rosso, B., García, M. D. (2007). Species composition and seasonal succession of saprophagous calliphorids in a rural area of Córdoba, Argentina. *Biology Research*, 40, 163-171.
- Battán Horenstein, M., Linhares, A. X., Rosso, B., García, M. D. (2010). Decomposition and dipteran succession on pig carrion in central Argentina: ecological aspects and their importance to forensic science. *Medical and Veterinary Entomology*, 24, 16-25.

- Battán Horenstein, M., Rosso, B., García, M. D. (2012). Seasonal structure and dynamics of sarcosaprophagous fauna on pig carrion in a rural area of Cordoba (Argentina): Their importance in forensic science. *Forensic Science International*, 217, 146-156.
- Begon, M., Harper, J. L., Townsend, C. R. (1999). Ecología. Individuos, Poblaciones y Comunidades. Barcelona, España: Omega.
- Beltrán Alfonso, C . P., Villa Navarro, F. A. (2011). Sucesión de insectos en cadáveres de ratas Wistar (Muridae: *Rattusnorvegicus*) (Berkenhout, 1769) en Bosque húmedo Premontano (Ibagué Colombia). *Tumbaga*, 6, 93-105.
- Benecke, M. (2001). A brief history of Forensic Entomology. *Forensic Science International*, 120, 2-14.
- Biavati, G. M., Santana, F. H. De A., Pujol Luz, J. R. (2010). A checklist of Calliphoridae Blowflies (Insecta, Diptera) associated with a pig carrion in Central Brazil. *Journal of Forensic Science*, 55, 1603-1606.
- Bornemissza, G. F. (1957). An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. *Australian Journal of Zoology*, 5, 1-12.
- Brundage, A., Bros, S., Honda, J. Y. (2011). Seasonal and habitat abundance and distribution of some forensically important blow flies (Diptera: Calliphoridae) in Central California. *Forensic Science International*, 212, 115-120.
- Bucheli, S. R., Bytheway, J. A., Pustilnik, S. M. y Florence J. (2009). Insect successional pattern of a corpse in cooler months of subtropical southeastern Texas. *Journal Forensic Science*, 54, 452-455.
- Byrd, J. H., Castner, J. L. (2009). The Utility of Arthropods in Legal Investigations. Boca Raton, Florida, Estados Unidos: CRC Press.
- Campobasso, C. P., Di Vella, G., Intronà, F. (2001). Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Science International*, 120, 18-27.
- Caputi, E. M. (2015). Tanatología Forense. Buenos Aires, Argentina: La Rocca.
- Carvalho, L. M. L., Linhares, A. X. (2001). Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in southeastern Brazil. *Journal of Forensic Science*, 46, 604-608.
- Carvalho, L. M. L., Thyssen, P. J., Linhares, A. X., Palhares, F. A. B. (2000). A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 135-138.
- Castillo, M. (2002). *Estudio de la entomofauna asociada a cadáveres en el Alto Aragón (España)*. Recuperado de <https://www.sea-entomologia.org%2FPDF%2FMSEA06.pdf>
- Castillo, P., Sanabria, C., Monroy, F. (2017). Insectos de importancia forense en cadáveres de cerdo (*Sus scrofa*) en La Paz Bolivia. *Medicina Legal de Costa Rica*, 34, 26-34.
- Catts, E. P., Goff, M. L. (1992). Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*, 37, 253-272.
- Catts, E. P., Haskell, H. (1990). Entomology and Death: A Procedural Guide. Clemson, South Carolina: Joyce's Print Shop, Inc.

- Centeno, N. (2000). La entomología forense: aplicaciones, fundamentos y algunos datos sobre la Argentina. Boletín de la Sociedad Entomológica Argentina, 16, 9-11.
- Centeno, N., Maldonado, M., Oliva, A. (2002). Seasonal patterns of arthropods occurring on sheltered and unsheltered pig carcasses in Buenos Aires Province (Argentina). *Forensic Science International*, 126, 63-70.
- Chani Posse, M., Thayer, M. K. (2008). Staphylinidae. En Biodiversidad de Artrópodos Argentinos (471-494). Mendoza, Argentina: Sociedad Entomológica Argentina.
- Çoban, E., Beyarslan, A. (2013). Identification of dipteran species of forensic entomology importance in summer season in Edirne. *Journal Science Technology*, 3, 18-21.
- Cross, P., Simmons, T. (2010). The influence of penetrative trauma on the rate of decomposition. *Journal of Forensic Science*, 55, 295-301.
- Cruz, T. M., Vasconcelos, S. D. (2006). Entomofauna de solo associada à decomposição de carcaça de suínoemum fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, Brasil. *Biociencias*, 14, 193-201.
- Di Claro, J., Kaufman, P. E. (2009). Black soldier fly, *Hermetia illucens* Linnaeus (Insecta: Diptera: Stratiomyidae). EENY 461 Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Recuperado de <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/in/in83000.pdf>
- Dupont, F. Y., Champlain, D. L., Cyrille, A. A., Felix, B. B. (2011). A preliminary study of arthropod associated with carrion in Yaounde, Cameroon: a first step in forensic entomology in Central Africa. *Journal of Ecology and The Natural Environment*, 3, 215-220.
- Early, M., Goff, M. L. (1986). Arthropod succession patterns in exposed carrion on the island of Oahu, Hawaii. *Journal Medical Entomology*, 23, 520-531.
- Eberhardt, T. L., Elliot, D. A. (2008). A preliminary investigation of insect colonization and succession on remains in New Zealand. *Forensic Science International*, 176, 217-223.
- Ekanem, M. S., Dike, C. M. (2010). Arthropod succession on pig carcasses in Southeastern Nigeria. *Papéis Avulsos de Zoologia, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo*, 50, 561-570.
- Estrada, D. A., Grella, M. D., Thyssen, P. J., Linhares, A. X. (2009). *Taxa de desenvolvimento de Chrysomya albiceps (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense*. *Neotropical Entomology*, 38, 203-207.
- Fernández, V., Gamarra, P., Outerelo, R., Cifria, B., Baz, A. (2010). Distribución de estafilínidos necrófilos (Coleoptera, Staphylinidae, Staphylininae) a lo largo de un gradiente altitudinal en la Sierra de Guadarrama, España. *Boletín Real Sociedad Española de Historia Natural (Sec. Biol.)*, 104, 61-86.
- Ferro, G. B., Fischer, H. Z. (2011). Entomofauna necrófaga associada à decomposição de carne bovina em malocalidade de Sorocaba-SP. *Revista Electrónica de Biología*, 4, 1-25.

- Figueroa, L., Flores, J., Rodríguez, S. (2007). Desarrollo de un método de crianza de larvas moscas de la especie *Lucilia sericata* para ser utilizadas en Terapia larval. *Parasitología Latinoamericana*, 62, 79-82.
- Furman, D. P, Young, R. D., Catts, E. P. (1959). *Hermetia illucens* (Linnaeus) as a factor in the natural control of *Musca domestica* Linnaeus. *Journal of Economic Entomology*, 52, 917-921.
- Galloway, A., Birkby, W. H., Jones, A., Henry, T. E., Parks, B. (1989). Decay rates of human remains in an arid environment. *Journal of Forensic Science*, 34, 607-616.
- García Rojo, A. M. (2004). Estudio de la sucesión de insectos en cadáveres en Alcalá de Henares (Comunidad Autónoma de Madrid) utilizando cerdos domésticos como modelos animales. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 34, 263-269.
- Gill, G. J. (2005). Decomposition and arthropod succession on above ground pig carrion in rural Manitoba. Public Safety Canada, Canadian Police Research Centre. Technical Report TR-06-2005.http://publications.gc.ca/collections/collection_2008/ps-sp/PS63-2-2005-6E.pdf
- Goff, M. L. (1993). Estimation of postmortem interval using arthropods development and successional patterns. *Forensic Science Review*, 5, 81-94.
- Goff, M. L., Early, M., Odo, C. B., Tullis, K. (1986). A preliminary checklist of arthropods associated with exposed carrion in the Hawaiian Islands. *Proceedings of the Hawaii Entomological Society*, 26, 53-57.
- Goff, M. L., Omori, A. I., Goodbrod, J. R. (1989). The effect of cocaine in tissues on the development of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Medical Entomology*, 26, 91-93.
- Goff, M. L., Brown, W. A., Hewadikaram, K. A., Omori, A. I. (1991). Effect of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera, Sarcophagidae) and implications of this effect on estimation of post mortem intervals using arthropod development rates. *Journal of Forensic Sciences*, 36, 537-542.
- Goff, M. L., Brown, W. A., Omori, A. I. (1992). Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on the estimations of postmortem intervals. *Journal of Forensic Science*, 37, 867-872.
- Goff, M. L., Lord, W. D. (1994). Entomotoxicology: a new area for forensic investigation. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 15, 51-57.
- Goff, M. L. (1991). Comparison of insect species associated with decomposing remains recovered inside dwellings and outdoors on the Island of Oahu, Hawaii. *Journal Forensic Science*, 36, 748-753.
- Goff, M. L. (2009). Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers. *Experimental and Applied Acarology*, 49, 21-36.
- Grassberger, M., Frank, C. (2004). Initial study of arthropod succession on pig carrion in a central European urban habitat. *Journal Medical Entomology*, 41, 511-523.

- Greenberg, B. (1990). Nocturnal oviposition behaviour of blow flies (Diptera: Calliphoridae). *Journal Medical Entomology*, 27, 807-810.
- Greenberg, B. (1991). Flies as forensic indicators. *Journal of Medical Entomology*, 28, 565-577.
- Greenberg B., Kunich J. C. (2002). Entomology and the law. Cambridge University Press, Cambridge, 306 pp.
- Grisales, D., Ruiz, M., Villegas, S. (2010). Insects associated with exposed decomposing bodies in the Colombian Andean coffee region. *Revista Brasileira de Entomologia*, 54, 637-644.
- Hall, R. D. (1990). Medicocriminal Entomology. En *Entomology y Death: A Procedural Guide* (1-8). Clemson, South Carolina: Joyce's Print Shop, Inc.
- Haskell, N. H., Lord, W. D., Byrd, J. H. (2001). Collection of entomological evidence during death investigations. En *Forensic entomology—the utility of arthropods in legal investigations*(81-120). Boca Raton, Florida, Estados Unidos: CRC Press.
- Henssge, C., Madea, B., Knight, B., Nokes, L., Krompecher, T. (1995). *The Estimation of the Time since Death in the Early Postmortem Interval*. Londres, Inglaterra, Arnold Editorial.
- Iannacone, J. (2003). Artropofauna de importancia forense en un cadáver de cerdo en el Callao, Perú. *Revista Brasileira Zoología*, 20, 85-90.
- Introna, F., Campobasso, C. P., Goff, M. L. (2001). Entomotoxicology. *Forensic Science International*, 120, 42-47.
- Jong, G. D., Chadwick, J. W. (1999). Decomposition and arthropod succession on exposed rabbit carrion during summer at high altitudes in Colorado, USA. *Journal Medical Entomology*, 36, 833-845.
- Joy, J. E., Liette, N. L., Harrah, H. L. (2006). Carrion fly (Diptera: Calliphoridae) larval colonization of sunlit and shaded pig carcasses in West Virginia, USA. *Forensic Science International*, 164, 183-192.
- Kelly, J. A., Van Der Linde, T. C., Anderson, G. S. (2009). The influence of clothing and wrapping on carcass decomposition and arthropod succession during the warmer seasons in Central South Africa. *Journal of Forensic Sciences*, 54, 1105-1112.
- Kocarek, P. (2003). Decomposition and coleoptera succession on exposed carrion of small mammal in Opava, the Czech Republic. *European Journal Soil Biology*, 39, 31-45.
- Lima, M. L. P. S., Luz, E. (1991). Espécies exóticas de *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) como veiculadoras de enterobactérias patogénicas em Curitiba, Paraná, Brasil. *Acta Biológica do Paraná*, 20, 61-83.
- Liria Salazar, J. (2006). Insectos de importancia forense en cadáveres de ratas, Carabobo – Venezuela. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 23, 33-38.
- Lord, W. D., Goff, M. L., Adkins, T. R., Haskell, N. H. (1994). The black soldier fly *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) as a potential measure of human postmortem interval: observations and case histories. *Journal Forensic Science*, 39, 215-222.

- Magaña, C. (2001). La entomología forense y su aplicación a la medicina legal. Data de muerte. Aracnet 7, Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa, 28, 49-57.
- Mann, R. W., Bass, W. M., Meadows, L. (1990). Time since death and decomposition of the human body: variables and observations in case and experimental field studies. Journal of Forensic Sciences, 35, 103-111.
- Mariani, R., García Mancuso, R., Varela, G. L., Inda, A. M. (2014). Entomofauna of a buried body: study of the exhumation of a human cadaver in Buenos Aires, Argentina. Forensic Science International, 237, 19-26.
- Martín Vega, D., Nieto, C. M., Cifrián, B., Baz, A., Díaz Aranda, L. M. (2017). Early colonisation of urban indoor carcasses by blow flies (Diptera: Calliphoridae): an experimental study from central Spain. Forensic Science International, 278, 87-94.
- Martínez, E., Duque, P., Wolff, M. (2007). Succession pattern of carrion feeding insects in Paramo, Colombia. Forensic Science International, 166, 182-189.
- Matuszewski, S., Bajerlein, D., Konwerski, S., Szpila, K. (2008). An initial study of insect succession and carrion decomposition in various forest habitats of Central Europe. Forensic Science International, 180, 61-69.
- Matuszewski, S., Bajerlein, D., Konwerski, S., Szpila, K. (2010). Insect succession and carrion decomposition in selected forests of Central Europe. Part 2: Composition and residency patterns of carrion fauna. Forensic Science International, 195, 42-51.
- Mégnin, P. (1894). La faune de cadavres. Application de l'entomologie à la médecine légale, *Encyclopédie Scientifique des Aides-Mémoire*, Paris, Masson.
- Mello, R. S., Aguiar-Coelho, V. M. (2009). Durations of immature stage development period of *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera, Pteromalidae) under laboratory conditions: implications for forensic entomology. Parasitology Research, 104, 411-418.
- Midgley, J. M., Richards, C. S., Villet, M. H. (2010). The utility of Coleoptera in forensic investigations. En Current Concepts in Forensic Entomology (57-68). Dordrecht, The Netherlands, Springer.
- Morales Rayo, J., San Martín Peral, G., Saloña Bordas, M. I. (2014). Primer estudio sobre la reducción cadavérica en condiciones sumergidas en la Península Ibérica, empleando un modelo de cerdo doméstico (*Sus scrofa* L., 1758) en el Río Manzanares (Comunidad Autónoma de Madrid). Ciencia Forense, 11, 261-294.
- Moretti, T. C., Ribeiro, O. B., Thyssen, P. J., Solis, D. R. (2008). Insects on decomposing carcasses of small rodents in a secondary forest in southeastern Brazil. European Journal of Entomology, 105, 691-696.
- Moura, M. O., de Carvalho, C. J. B., Monteiro-Filho, E. L. A. (1997). A preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, State of Paraná. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 92, 269-274.
- Navarrete Heredia, J. L., Newton, A. F., Thaye, M. K., Ashe, J. S., Chandler, S. 2002. Guía Ilustrada para los Géneros de Staphylinidae (Coleoptera) de México. México. Universidad de Guadalajara y Conabio.

- Nuorteva, P. (1977). Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. En *Forensic Medicine: A Study in Trauma and Environmental Hazards* (1072-1095). W.B. Philadelphia, United State: Saunders Company.
- Olaya Masmela, L. A. (2001). Entomofauna sucesional en el cadáver de un cánido en condiciones de campo en la Universidad del Valle (Cali-Colombia). *Cuadernos de Medicina Forense*, 23, 5-14.
- Oliva, A., Ravioli, J., Trezza, F., Navari, C. (1995). *Entomología Forense*. Prensa Médica Argentina, 82, 229-234.
- Oliva, A. (1997). Insectos de interés forense de Buenos Aires (Argentina). Primera lista ilustrada y datos bionómicos. *Revista del Museo argentino de Ciencias Naturales «Bernardino Rivadavia»*, Entomología, 7, 13-59.
- Oliva, A. (2001). Insects of forensic significance in Argentina. *Forensic Science International*, 120, 145-154.
- Oliva, A., Di Orio, O. R. (2008). La familia Silphidae Latreille, 1807 (Coleoptera) en la Argentina. En *Biodiversidad de Artrópodos Argentinos* (461-470). Mendoza, Argentina: Sociedad Entomológica Argentina.
- Oliveira, D. L., Soares, T. F., Vasconcelos, S. D. (2016). Effect of bait decomposition on the attractiveness to species of Diptera of veterinary and forensic importance in a rainforest fragment in Brazil. *Parasitology Research*, 115, 449-455.
- Oliveira, T. C., Dias Vasconcelos, S. (2010). Insects (Diptera) associated with cadavers at the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil and its implications for forensic entomology. *Forensic Science International*, 198, 97-102.
- Parry, N. J., Mansell, M. W., Weldon, C. W. (2016). Seasonal, locality and habitat variation in assemblages of carrion associated Diptera in Gauteng Province, South Africa. *Journal of Medical Entomology*, 53, 1322-1329.
- Pasquerault, T., Vincent, B., Dourel, L., Chauvet, B., Gaudry, E. (2006). Los muestras entomológicas: de la escena del crimen a la peritación. *Ciencia Forense*, 8, 39-55.
- Payne, J. A. (1965). A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. *Ecology*, 46, 592-602.
- Payne, J. A., King, E. W. (1970). Coleoptera associated with pig carrion. *Entomologist's Monthly Magazine*, 105, 224-232.
- Pérez, S. P., Duque, P., Wolff, M. (2005). Successional behavior and occurrence matrix of carrion-associated arthropods in the urban area of Medellin, Colombia. *Journal of Forensic Science*, 50, 1-7.
- Perveen, F., Khan, A. (2013). Characterization of insect-fauna of the free-ranging urban dog, *Canis domesticus* (L.) carcass in tropical region of Pakistan: A tool for forensic entomology. *Advances in Entomology*, 1, 29-37.
- Pohjoismäki, J. L. O., Karhunen, P. J., Goebeler, S., Sauko, P., Sääksjärvi, I. E. (2010). Indoors forensic entomology: Colonization of human remains in closed environments by specific species of sarcosaprophagous flies. *Forensic Science International*, 199, 38-42.
- Pujol-Luz, J. R., Marques, H., Ururahy Rodrigues, A., Rafae, J. A., Santana, F. H. A., Arantes, L. C., Constantino, R. C. (2006). A forensic entomology case from the Amazon rainforest of Brazil. *Journal of Forensic Sciences*, 51, 1151-1153.

- Ministerio de Justicia de la Nación.(2017). *Protocolo unificado de los Ministerios Públicos de la República Argentina. Guía para el levantamiento y conservación de la evidencia.* Buenos Aires, Argentina. Recuperado de <http://www.jus.gob.ar/media/3288076/Protocolo%20unificado.pdf>
- Quiroz Rocha, G. A., Navarrete Heredia, J. L., Martínez Rodríguez, P. A. (2008). Especies de Scarabaeinae (Coleoptera: Scarabaeidae) y Silphidae (Coleóptera) necrófilas de bosque de pino-encino y bosque mesófilo de montaña en el municipio de Mascota, Jalisco, México. *Dugesiana*, 15, 27-37.
- Ramos Pastrana, Y., Wolff, M. (2011). Entomofauna cadavérica asociada a cerdos expuestos al sol y sombra, en el piedemonte amazónico colombiano. *Revista Momentos de Ciencia*, 8, 45-54.
- Ramos Pastrana, Y., Velasquez Valencia, A., Wolff, M. (2014). Preliminary study of insects associated to indoor body decay in Colombia. *Revista Brasileira de Entomologia*, 58, 326-332.
- Reed, H. B. (1958). A study of dog carcass communities in Tennessee, with special reference to the insects. *The American Midland Naturalist*, 59, 213-245.
- Rodriguez, W. C., Bass, W. M. (1983). Insect activity and its relationship to decay rates of human cadavers in east Tennessee. *Journal Forensic Science*, 28, 423-432.
- Sabanoglu, B., Sert, O. (2010). Determination of Calliphoridae (Diptera) fauna and seasonal distribution on carrion in Ankara Province. *Journal Forensic Science*, 55, 1003-1007.
- Salazar Ortega, J. (2008). Estudio de la entomofauna sucesional asociada a la descomposición de un cadáver de cerdo doméstico (*Sus scrofa*) en condiciones de campo. *Universitas Sciantarium Revista de la Facultad de Ciencias*, 13, 21-32.
- Sánchez, M. C., Chuaire, L., Narváez, R., Segura, N. A. (2004). Biocirugía: utilización de larvas de insectos necrófagos en la curación de heridas. La terapia larval. *Ciencia Salud*, 2, 156-164.
- Schoenly, K., Reid, W. (1987). Dynamics of heterotrophic succession in carrion arthropod assemblages: discrete seres or a continuum of change? *Oecologia*, 73, 192-202.
- Segura, N. A., Bonilla, M. A., Usaquet, W., Bello, F. (2011). Entomofauna resource distribution associated with pig cadavers in Bogota DC. *Medical and Veterinary Entomology*, 25, 46-52.
- Segura, N. A., Usaqué, W., Sánchez, M. C., Chuaire, L., Bello, F. (2009). Succession pattern of cadaverous entomofauna in a semi-rural area of Bogotá, Colombia. *Forensic Science International*, 187, 66-72.
- Sert, O., Kabalak, M., Sabanoglu, B. (2012). Determination of forensically important Coleoptera and Calliphoridae (Diptera) species on decomposing dog (*Canis lupus familiaris* L.) carcass at Ankara Province Hacettepe. *Journal Biology Chemistry*, 40, 99-103.
- Sharanowski, B. J., Walker, E. G., Anderson, G. S. (2008). Insect succession and decomposition patterns on shaded and sunlit carrion in Saskatchewan in three different seasons. *Forensic Science International*, 179, 219-240.

- Shean, B. S., Messinger, L., Papworth, M. (1993). Observations of differential decomposition on sun exposed vs. shaded pig carrion in coastal Washington State. *Journal of Forensic Science*, 38, 938-949.
- Sheppard, D. C., Tomberlin, J. K., Joyce, J. A., Kiser B. C. (2002). Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Medical Entomology*, 39, 695-698.
- Sherman, R. A., Tran, J. M. T. (1995). A simple, sterile food source for rearing the larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Medical Veterinary Entomology*, 9, 393-398.
- Singh, D., Bharti, M. (2001). Further observations on the nocturnal oviposition behavior of blow flies (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 120, 124-126.
- Smith, K. V. G. (1986). *A Manual of Forensic Entomology*. London, England: Trustees of the British Museum (Natural History) and Cornell University Press.
- Souza, A. M., Linhares, A. X. (1997). Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. *Medical Veterinary Entomology*, 11, 8-12.
- Tabor, K., Brewster, C., Fell, R. (2004). Analysis of the successional patterns of insects on carrion in southwest Virginia. *Journal of Medical Entomology*, 41, 785-795.
- Tabor, K. L., Fell, R. D., Brewster, C. C. (2005). Insect fauna visiting carrion in Southwest Virginia. *Forensic Science International*, 150, 73-80.
- Tantawi, T. I., El-Kady, E. M., Greenberg, B., El-Ghaffar, H. A. (1996). Arthropod succession on exposed rabbit carrion in Alexandria, Egypt. *Journal Medical Entomology*, 33, 566-580.
- Trezzza, F. C. (2012). *La data de muerte*. Buenos Aires, Argentina: Dosyuna.
- Trigo, A. V., Centeno, N. (2014). Abnormal Succession of Insect Fauna on Pig Carrasses in Tandil (Argentina, Buenos Aires Province). *Advances in Entomology*, 2, 102-13.
- Turchetto, M., Lafisca, S., Constantini, G. (2001). Post mortem interval (PMI) determined by study of sarcophagous biocenoses: three cases from the province of Venice (Italy). *Forensic Science International*, 120, 28-31.
- Valdes Perezgasga, M. T., Sanchez Ramos, F. J., Garcia Martínez, O., Anderson, G. S. (2010). Arthropods of forensic importance on pig carrion in the Coahuilan Semidesert, Mexico. *Journal of Forensic Science*, 55, 1098-1101.
- Vasconcelos, S. D., Salgado R. L., Barbosa T. M., Souza, J. R. B. (2016). Diptera of medico-legal importance associated with pig carrion in a tropical dry forest. *Journal of Medical Entomology*, 53, 1131-1139.
- Vass, A. A., Bass, W. B., Wolt, J. D., Foss, J. E., Ammons, J. T. (1992). Time since death determinations of human cadavers using soil solution. *Journal of Forensic Sciences*, 37, 1236-1253.
- Velásquez, Y. (2008). A checklist of arthropods associated with rat carrion in a montane locality of northern Venezuela. *Forensic Science International*, 174, 68-70.

- Velásquez, Y., Viloria, A. L. (2009). Effects of temperature on the development of the Neotropical carrion beetle *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae). *Forensic Science International*, 185, 107-109.
- Von Hoermann, C., Ruther, J., Ayasse, M. (2012). The attraction of virgin female hide beetles (*Dermestes maculatus*) to cadavers by a combination of decomposition odour and male sex pheromones. *Frontiers in Zoology*, 9: 9-18.
- Voss, S. C., Spafford, H., Dadour, I. R. (2009). Annual and seasonal patterns of insect succession on decomposing remains at two locations in Western Australia. *Forensic Science International*, 193, 26-36.
- Wang, J., Li, Z., Chen, Y., Chen, Q., Yin, X. (2008). The succession and development of insects on pig carcasses and their significances in estimating PMI in south China. *Forensic Science International*, 179, 11-18.
- Watson, E. J., Carlton, C. E. (2003). Spring succession of necrophilous insects on wildlife carcasses in Louisiana. *Journal of Medical Entomology*, 40, 338-347.
- Wolff, M., Uribe, A., Ortiz, P., Duque, A. (2001). A preliminary study of forensic entomology in Medellin, Colombia. *Forensic Science International*, 120, 53-59.
- Wyss, C., Chaubert, S., Cherix, D. (2003). Case study determining post-mortem interval with four blowfly species (Diptera: Calliphoridae): the importance of cross assessment. En M. Hall (presidencia), *Proceedings of the European Association for Forensic Entomology Conference*, llevado a cabo en el first Meeting of the European Association for Forensic Entomology, London, England.
- Zanetti, N. I., Viscearelli, E. C., Centeno, N. D. (2014). Taphonomic marks on pig tissue due to Cadaveric Coleoptera activity under controlled conditions. *Journal of Forensic Sciences*, 459, 997-1001.
- Zanetti, N. I., Viscearelli, E., Centeno, N. D. (2015a). Associational patterns of scavenger beetles to decomposition stages. *Journal of Forensic Sciences*, 60, 919-927.
- Zanetti, N. I., Viscearelli, E., Centeno, N. D. (2015b). Trophic roles of scavenger beetles in relation to decomposition stages and seasons. *Revista Brasileira de Entomologia*, 59, 132-137.
- Zanetti, N. I., Camina, R., Viscearelli, E. C., Centeno, N. D. (2016). Active search on carcasses versus pitfall traps: a comparison of sampling methods. *Neotropical Entomology*, 45, 221-226.
- Zumpt, F. (1965). *Myiasis in Man and Animals in the Old World*. London, UK: Butterworths.

Patología forense

Claudia Marcela Portelli

Servicio de Patología Forense. Departamento de Criminalística. Cuerpo de Investigaciones Fiscales. Ministerio Público de Salta. Avda. Bolivia 4671. Salta Capital. Código Postal A4408FV6.
cmp_ap@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

La patología forense es la rama de la medicina legal que aplica los conocimientos integrados de las ciencias médicas a la resolución de problemas medicolegales (Vazquez Fanego, 2003). Ésta se encarga de determinar la causa y mecanismo de la muerte, naturaleza y vitalidad de las lesiones (Castellano Arroyo, Villanueva Cañas & Hernandez Jerez, 2004; Davis, 2005; Vazquez Fanego, 2003).

La comprensión de los procesos biológicos subyacentes a la muerte son de gran importancia para el patólogo forense para poder diferenciar los cambios post mortem versus patologías propias (Tsokos, 2005).

Las lesiones causadas por animales pueden ser numerosas, en ocasiones pueden simular auténticas lesiones vitales o pueden distorsionar dichas lesiones producidas en un cadáver independientemente del ambiente en el que se encuentren, ya sea en el interior de una vivienda, al aire libre, enterrados o sumergidos. En cuerpos en estado de putrefacción pueden enmascarar la lesión que produjo el deceso (Byard, James & Gilbert, 2002; Garamendi, López-Alcaraz & Rodriguez, 2008; Lee, 2000).

El desafío del patólogo forense es determinar si las lesiones observadas son vitales; si fueron causadas por animales domésticos, salvajes, marinos o insectos y si éstas fueron la causa real del deceso (Bury, Langlois & Byard, 2012; Byard, 2011; Garamendi *et al.*, 2008; Tsokos & Schulz, 1999).

A continuación desarrollaremos tres ítems de interés médico legal: efectos causados por animales en las muertes por sumersión, mecanismos por el cual los animales pueden modificar o producir lesiones en cadáveres y el accionar de la fauna cadavérica enmascarando o produciendo lesiones.

MUERTE POR SUMERSIÓN

La muerte por sumersión se define como la muerte causada por asfixia secundaria a la permanencia en agua (Bell, 2005; Concheiro Carro & Suarez Peñaranda, 2004; Giertsen, 2000; Shkrum & Ramsay, 2007).

Ante un cuerpo encontrado en agua, el forense debe determinar si esa persona se encontraba con vida al caer al agua, si las lesiones que presenta son vitales o postmortem, si dichas lesiones fueron producidas por la fauna del sitio de sumersión, ya sean aguas dulces o saladas, si fueron producidas en sitios de aguas en movimiento por arrastre del cuerpo en terrenos pedregosos o aguas estancadas, o bien en el contexto de una muerte homicida (Bell, 2005; Concheiro Carro & Suarez Peñaranda, 2004; Giertsen, 2000; Shkrum & Ramsay, 2007; Duband, Forest & Péoc'h, 2011a).

En todos estos casos los exámenes complementarios son de gran ayuda y están orientados al estudio histológico del pulmón y a la investigación de marcadores biológicos del medio de sumersión (Bell, 2005; Concheiro Carro & Suarez Peñaranda, 2004; Giertsen, 2000).

Desde la anatomía patológica los pulmones se encuentran hiperinsuflados, debido al ingreso de líquido por la vía aérea, histológicamente muestran sobre-distensión alveolar, con ruptura de septos alveolares y edema, se puede observar aspiración de partículas o cuerpos extraños del medio de sumersión como hollín o plantas (Bell, 2005; Concheiro Carro & Suarez Peñaranda, 2004; Dettmeyer, 2011; Giertsen, 2000).

Entre los marcadores biológicos utilizados para determinar si una sumersión fue vital o pre-morten versus sumersión post-mortem, los más estudiados son las diatomeas, se desarrollan en detalle en el capítulo 4 de este libro. Éstas se encuentran en órganos como pulmón, cerebro, riñón, médula ósea y sangre cuando el cadáver se encuentra en avanzado estado de putrefacción. Su presencia ayuda a determinar la vitalidad de la sumersión (Benecke, 2004; Concheiro Carro & Suarez Peñaranda, 2004; Duband, Forest & Péoc'h, 2011b; Giertsen, 2000).

Para una correcta determinación de diatomeas se debe comparar las presentes en el medio de sumersión en el que se encontró el cuerpo, con las observadas en pulmón y el resto de los órganos analizados. Es importante remarcar que la muestra de agua se debe tomar al mismo momento del levantamiento del cadáver (Benecke, 2004; Concheiro Carro & Suarez Peñaranda, 2004).

RECOLECCIÓN DE ANIMALES ACUÁTICOS

El cuerpo sumergido, a menudo atrae animales acuáticos como peces, tortugas y crustáceos que producen lesiones por depredación postmortem que van desde lesiones en piel como las producidas por cangrejos, estrellas de mar y crustáceos; amputación de miembros por tiburones; o destrucción total de los órganos internos por distintas especies de peces (Bell, 2005; Benecke, 2004; Duband *et al.*, 2011a; Duband *et al.*, 2011b; Giertsen, 2000; Shkrum & Ramsay, 2007).

Se debe ser extremadamente cuidadoso al momento de analizar un cuerpo sumergido, ya que en estos casos confluyen numerosos eventos que llevan a daños posmortem y las lesiones en piel suelen ser poco específicas (Duband *et al.*, 2011b). Es fundamental observar los bordes de la herida, la presencia o no de infiltración hemática y realizar el estudio microscópico para un correcto diagnóstico.



Fig. 1. Lesión contusa con bordes irregulares sin infiltración hemática, la cual pudo ser producida por roce con elemento contuso al ser arrastrado en el lugar de sumersión o por fauna del sitio de sumersión.

Al estudiar el caso de un cuerpo ahogado, observamos una lesión contusocortante en el cuero cabelludo (Fig. 1) el cuerpo se encuentra en estado de putrefacción y se plantea el diagnóstico diferencial de sumersión homicida y se precisa determinar si la lesión fue realizada con algún elemento contuso que golpea contra el cráneo, o si la fue muerte accidental por caída involuntaria y la lesión se produce por choque con algún elementos contusos presente en el sitio de sumersión, al ser arrastrado por el agua o secundaria al accionar de fauna acuática del sitio, luego de producido el deceso.

Observamos que los bordes de la herida no muestran signos de vitalidad como infiltración hemática y en el estudio histológico se observan papilas dérmicas desnudadas con signos de autólisis y putrefacción, capilares congestivos, no se observa infiltración hemática dérmica ni infiltrado inflamatorio (Fig. 2), utilizando coloración especial de Tricrómica de Masson se resalta la congestión vascular y se confirma la ausencia de hemorragia dérmica (Fig. 3).

Estos hallazgos son compatibles con una lesión no vital, probablemente provocada por el medio de sumersión y se debe ser extremadamente cuidadoso al momento de analizar un cuerpo sumergido ya que, como señalamos anteriormente, en estos casos confluyen numerosos eventos que llevan a daños postmortem.

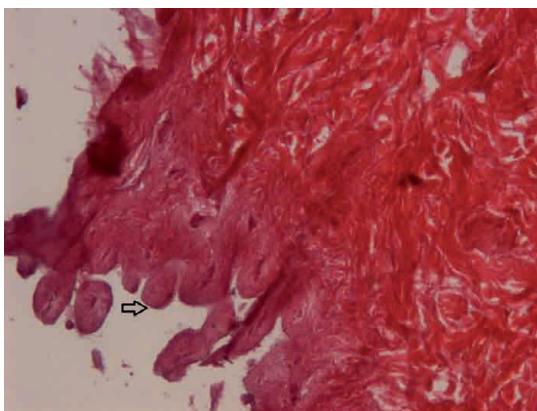


Fig. 2. Se observa piel con signos de autólisis y putrefacción, obsérvese las papillas dérmicas denudadas (flecha). Hematoxilina Eosina 10X.

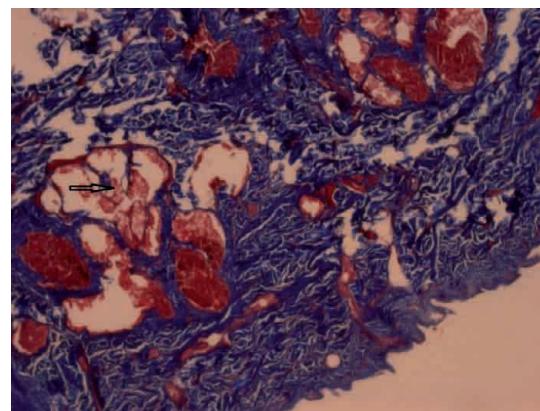


Fig. 3. Se identifica en azul el colágeno dérmico sin hemorragia y los vasos sanguíneos sin lesión, con ectasia (flecha). Tricrómica de Masson 20X.

LESIONES CAUSADAS POR ANIMALES

Artrópodos

Los insectos como hormigas, avispas y abejas suelen provocar una lesión rojiza pequeña en la piel que desaparece en un corto período de tiempo. El examen histológico puede ser requerido para determinar la vitalidad de dichas lesiones (Lee, 2000).

Ciertas especies de hormigas como *Solenopsis* sp. y *Myrmecia* sp. han sido reconocidas como letales al causar reacciones alérgicas. Los hallazgos postmortem estarán relacionados a fallo multiorgánico por la reacción de hipersensibilidad y el estudio de la zona de picadura para determinar la vitalidad de la misma (Garamendi *et al.*, 2008; Lee, 2000).

La acción de las hormigas puede causar una gran variedad de lesiones postmortem presentando áreas irregulares, serpinginosas de úlceras superficiales cutáneas. Macroscópicamente tienen aspecto seco y apergaminado (Byard, 2005; Campobasso, Marchetti & Colonna, 2009; Garamendi *et al.*, 2008).

Las lesiones suelen presentarse típicamente en lugares como párpados, labios y nudillos (Garamendi *et al.*, 2008).

Las avispas, al igual que otros insectos, raramente pueden causar la muerte, excepto en casos de shock anafiláctico o toxicidad sistémica. Los venenos de los himenópteros poseen una gran capacidad antigenica y por tanto un gran poder de sensibilización. (Contreras Zuniga, Zuluaga & Casas Quiroga, 2008; Pastrana, Blasco & Pinillos, 2003).

La reacción sistémica tóxica son originadas por la gran cantidad de veneno inoculado y las reacciones de hipersensibilidad son secundarias a la liberación de histamina producidas por la degranulación de mastocitos y basófilos (Contreras Zuniga *et al.*, 2008; Pastrana *et al.*, 2003).

Los hallazgos de autopsia evidencian múltiples picaduras agrupadas ya que generalmente atacan en enjambres, lo que es más comúnmente visto en especies africanizadas (Lee, 2000).

Al igual que con las hormigas, el estudio patológico determinará la vitalidad de las mismas por la reacción inflamatoria local.

Las picaduras de abejas varían significativamente en sus niveles de agresión, y se producen por medio de una punta o saco (aguijón) que tiene pocos milímetros de longitud y permanece unido en la lesión después de la inserción del veneno. El registro de picadura aparece rosado o rojizo con el área central pálida tumefacta donde se observa como protruye el aguijón. La imagen que se muestra en la figura 4, corresponde a un cuerpo en estado de putrefacción incipiente donde no se encontraron lesiones traumáticas que justifiquen el deceso, y al realizar el estudio patológico de las picaduras se pudo observar en la zona central el saco o aguijón (Lee, 2000). Histológicamente se observa la piel que presenta reacción inflamatoria polimorfonuclear con eosinófilos y se puede reconocer restos del aguijón (Fig. 5).

La mayoría de los escorpiones son inofensivos para el ser humano, aunque algunos pueden injectar suficiente veneno como para matar un niño pero rara vez un adulto ya que la peligrosidad del veneno es inversamente proporcional al peso de la víctima. Los hallazgos de autopsias no son específicos, incluyen edema pulmonar, fallo cardíaco, trastornos hemorrágicos y neurotoxicidad (Lee, 2000).

La gran mayoría de las arañas son venenosas, pero no presentan riesgo de muerte para el ser humano. Las lesiones típicas de una picadura de araña se manifiestan con eritema, dolor local, hemorragia y ulceración de la zona luego de algunos días de producida la picadura. Sistémicamente producen fiebre, malestar general y dolor muscular (Lee, 2000).



Fig. 4. Múltiples lesiones puntiformes producidas por picadura de abejas dispersas en ambos miembros inferiores.

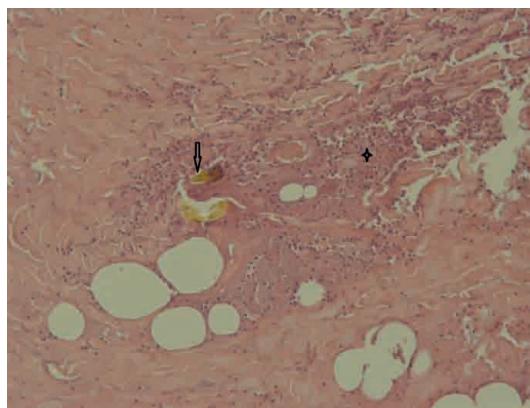


Fig. 5. Sección de piel donde se observa restos del aguijón (flecha) e infiltrado inflamatorio adyacente (*) lo que informa la vitalidad de la lesión. Hematoxilina Eosina 10X.

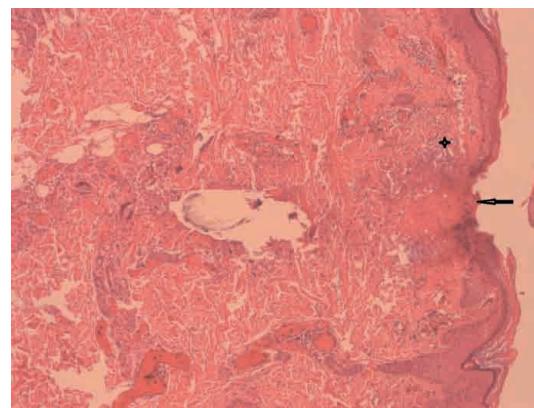


Fig. 6. Sección de piel donde se observa ulceración epidérmica (flecha) e infiltrado inflamatorio adyacente (*) lo que informa la vitalidad de la lesión. Hematoxilina eosina 10X.

Los casos fatales se asocian a coagulación intravascular diseminada, edema de glotis, hemólisis y microhemólisis en túbulos renales (Figs. 7 y 8).

Vertebrados terrestres

La depredación postmortem por animales especialmente el perro son frecuentes de observar en la práctica y es fundamental diferenciar entre mordeduras pre-mortem y lesiones post-mortem (Bury *et al.*, 2012; Byard, 2011).

Las lesiones postmortem pueden ser causadas por uno o varios animales que interactúan en el lugar donde se produjo la muerte y usualmente se observan en casos de muertes naturales en el interior del domicilio o al aire libre. Es frecuente observar la amputación de falanges o la falta total de tejidos blandos con esqueleti-

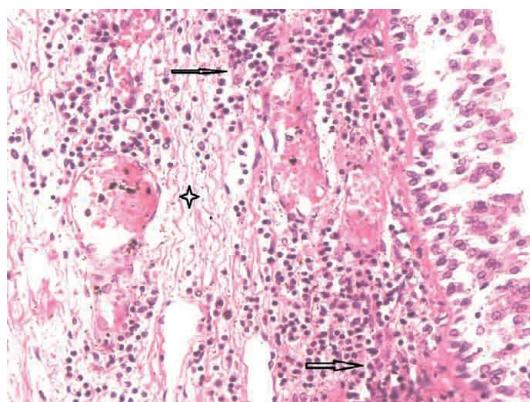


Fig. 7. Se observa un corte histológico de glotis con epitelio estratificado edematoso. En lámina propia (*) marcado edema con intenso infiltrado inflamatorio con eosinófilos (flecha). Hematoxilina eosina 10X.

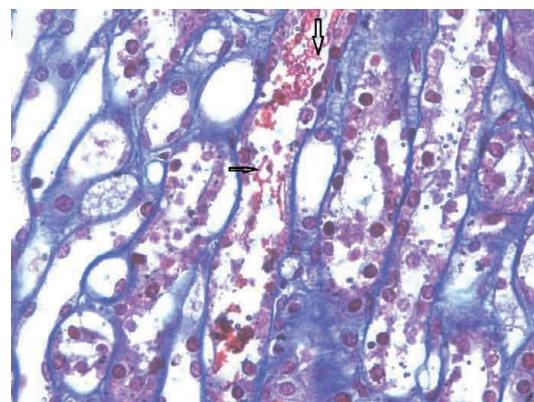


Fig. 8. Túbulos renales con microhemólisis de eritrocitos (flecha). Tricrómica de Masson 20X.

zación del miembro (Figs. 9 y 10). Generalmente este ataque se limita a zonas sin vestimenta, como cabeza, cuello y miembros; estas heridas generalmente muestran un aspecto desgarrado, sin infiltración hemática (Bury *et al.*, 2012; Buschmann *et al.*, 2011; Byard, 2011; Tsokos & Schulz, 1999).



Fig. 9. Miembro superior izquierdo con falanges desgarradas producto de un ataque postmorten de cánido.



Fig. 10. Esqueletización de miembro superior producida por cánidos.



Fig. 11. Estigma de garras felinas en cuello.

La geografía del lugar del hallazgo es importante para determinar si la muerte fue producida por el accionar de la fauna autóctona. Por ejemplo, en la Puna Salteña, donde viven numerosos animales salvajes, se encontró el cuerpo sin vida de una joven cuyas lesiones presentaban bordes hemáticos infiltrados y tumefactos lo que llevó a concluir que su muerte se produjo por ataque de félido salvaje ya que claramente se observan los estigmas de garras felinas (Fig. 11) (Portelli, Eveling & Mamaní, 2012).



Fig. 12. Lesión no vital (flecha), la cual fue producida por larvas de la familia Diptera, Calliphoridae. Herida vital (*).

LESIONES CAUSADAS POR ENTOMOFAUNA CADAVÉRICA

La fauna cadavérica es de gran importancia y brinda valiosa información al momento de determinar el intervalo postmortem de un cuerpo, y conocer si dicho cuerpo fue trasladado de un sitio a otro luego de su deceso (Benecke, 2004).

Una acumulación inusualmente numerosa de larvas en un área del cuerpo puede indicar la presencia de una herida antemortem también denominada vital, que no necesariamente debe ser la herida causal de la muerte, ya que los fluidos corporales atraen a los insectos. A medida que se alimentan pueden crear nuevos orificios o lesiones artefactuales que no se relacionan con heridas vitales y pueden ser malinterpretadas como heridas premortem. Con el estudio histológico, se podrá determinar vitalidad o no de la misma; en la figura 12 se observa en cara lateral de flanco derecho solución de continuidad postmortem, producida por fauna cadavérica. (Bell, 2005; Lew & Matshes, 2005).

Con el paso del tiempo, la fauna cadavérica puede producir reducción de la masa corporal, particularmente la esqueletización del cráneo y la reducción de los órganos internos (Fig. 13), lo que dificulta realizar un diagnóstico certero de la causa de muerte.



Fig. 13. Esqueletización de cabeza y cuello producida por accionar larvas *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae).

Sinopsis: ante una autopsia de un cuerpo en estado de putrefacción o sospecha de accionar de fauna ambiental (Lew & Matshes, 2005):

- Realice una autopsia completa y examine todos los órganos, tome muestras de todos los fluidos y órganos para estudios complementarios.
- Reconozca el artefacto postmortem y diferéncielo de la verdadera patología o lesión premortem.
- Correlacione los antecedentes patológicos y la escena para determinar la causa y mecanismo de muerte.

LITERATURA CITADA

- Bell, M. (2005). Drowning. In D. Dolinak, E. W. Matshes & E. O. Lew (Eds.), *Forensic Pathology: Principles and Practice* (pp. 227-238). Elsevier Academic Press.
- Benecke, M. (2004). Arthropods and Corpses. In M. Tsokos (Ed.), *Forensic Pathology Reviews Book Series: Vol. 2* (pp. 207-240). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Bury, D., Langlois, N., & Byard, R. W. (2012). Animal Related Fatalities—Part I: Characteristic Autopsy Findings and Variable Causes of Death Associated with Blunt and Sharp Trauma. *Journal of Forensic Sciences*, 57 (2), 370-374. doi: 10.1111/j.1556-4029.2011.01921.x
- Buschmann, C., Solarino, B., Püschel, K., Czubaiko, F., Heinze, S., & Tsokos, M. (2011). Post-mortem decapitation by domestic dogs: three case reports and review of the literature. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 7 (4), 344-349. doi:10.1007/s12024-011-9233-x
- Byard, R. W. (2005). Autopsy problems associated with postmortem ant activity. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 1 (1), 37-40. doi:10.1385/FSMP:1:1:037
- Byard, R. W. (2011). Animals, autopsies and artefacts. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 7, 309-310. doi:10.1007/s12024-011-9269-y
- Byard, R. W., James, R. A., & Gilbert, J. D. (2002). Diagnostic Problems Associated with Cadaveric Trauma from Animal Activity. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 23 (3), 238-244. doi:10.1097/00000433-200209000-00006
- Campobasso, C. P., Marchetti, D., Introna, F., & Colonna, M. F. (2009). Postmortem Artifacts Made by Ants and the Effect of Ant Activity on Decompositional Rates. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 30 (1), 84-87. doi:10.1097/PAF.0b013e318187371f
- Castellano Arroyo, M., Villanueva Cañas, E., Lachica López, E., Hernandez Jerez, A. (2004). Patología Forense. En J. A. Gisbert Calabuig y E. Villanueva Cañas (Ed.) (pp. 307-359), Medicina Legal y Toxicología. Elsevier Masson,
- Giertszen J. C. (2000). Drowning. In J. K. Mason & B. N. Purdue (Eds.), *The Pathology of Trauma* (pp. 265-282). London: Arnold.
- Concheiro Carro, L. & Suarez Peñaranda, J. M. (2004). Asfixias mecánicas. En J. A. Gisbert Calabuig & E. Villanueva Cañas (Eds.), *Medicina legal y toxicología*, 6 (pp. 471-478). España: Elsevier Press.

- Contreras Zuniga, E., Zuluaga, S. X., & Casas Quiroga, I. C. (2008). Envenenamiento por múltiples picaduras de abejas y choque anafiláctico secundario: descripción de un caso clínico y revisión de la literatura. *Acta Toxicológica Argentina*, 16 (2), 27-32.
- Davis, J. (2005). Medicolegal Death Investigation. In D. Dolinak, E. W. Matshe & E. O. Lew (Eds.), *Forensic Pathology: Principles and Practice* (pp. 1-8). Elsevier Academic Press.
- Dettmeyer, R. B. (2011). Aspiration and Inhalation. In R. B. Dettmeyer. *Forensic Histopathology: Fundamentals and Perspectives* (pp. 211-213). Berlin: Springer Press.
- Duband, S., Forest, F., Clemenson, A., Debout, M., & Péoc'h, M. (2011). Postmortem injuries inflicted by crawfish: Morphological and histological aspects. *Forensic Science International*, 206(1-3), e49-e51. doi:10.1016/j.forsciint.2010.08.006
- Duband, S., Forest, F., Gaillard, Y., Dumollard, J. M., Debout, M., & Péoc'h, M. (2011). Macroscopic, histological and toxicological aspects of early Gammarus pulex scavenging. *Forensic Science International*, 209 (1-3), e16-e22. doi:10.1016/j.forsciint.2011.03.025
- Garamendi, P. M., López-Alcaraz, M., Mazón, A., & Rodríguez, J. (2008). Lesiones post mortales por fauna cadavérica. La acción de las hormigas sobre el cadáver. *Cuadernos de Medicina Forense*, 14 (52), 155-159. doi:10.4321/S1135-76062008000200006
- Lee, K. (2000). Injuries caused by animals. In J. K. Mason & B. N. Purdue (Eds.), *The Pathology of Trauma* (pp. 265-282). London: Arnold..
- Lew, E. & Matshes, E. (2005). Postmortem Changes. In D. Dolinak, E. W. Matshes & E. O. Lew (Eds.), *Forensic Pathology: Principles and Practice* (pp. 525-554). Elsevier Academic Press.
- Pastrana, J., Blasco, R., Erce, R., & Pinillos, M.A. (2003). Picaduras y mordeduras de animales. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26 (Supl. 1), 225-241.
- Portelli, C. M., Eveling, C. R., Lamas, J., & Mamaní, P. J. (2012). Ataque fatal en humano, por puma (Puma concolor). *Cuadernos de Medicina Forense*, 18 (3-4), 139-142. doi: 10.4321/S1135-76062012000300008
- Shkrum, M. J., & Ramsay, D. A. (2007). Bodies Recovered From Water. In M. J. Shkrum & D. A. Ramsay (Eds.), *Forensic Pathology of Trauma: Common Problems for the Pathologist* (pp. 243-293). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Tsokos, M. (2005). Postmortem Changes and Artifacts Occurring During the Early Postmortem Interval. In M. Tsokos (Ed.), *Forensic Pathology Reviews* 3(pp. 183-238). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Tsokos, M., & Schulz, F. (1999). Indoor postmortem animal interference by carnivores and rodents: report of two cases and review of the literature. *International Journal of Legal Medicine*, 112 (2), 115-119. doi:10.1007/s004140050
- Vazquez Fanego, H. O. (2003). Especialidades auxiliares: Patología Forense. En H. O. Vazquez Fanego (Ed.) *Investigación médicolegal de la muerte: Tanatología Forense* (pp. 41-61). Buenos Aires: Astrea Press.

Tafonomía forense

Noelia I. Zanetti

Laboratorio de Invertebrados II, Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas (INBIOSUR) (CONICET-UNS), San Juan 670, (8000) Bahía Blanca, Prov. de Buenos Aires, Argentina.

E-mail: noeinez@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

La palabra «tafonomía» proviene del griego, *taphos* (tumba) y *nomos* (ley). Es una parte de la paleontología que estudia la descomposición, preservación, dispersión, erosión, entierro o exposición de organismos muertos. Posteriormente se incorporaron otras disciplinas como antropología forense denominándose tafonomía forense.

La tafonomía forense generalmente se relaciona con procesos de tiempo corto que ocurren luego de la muerte y durante la descomposición. Este campo es dominado por la entomología, antropología y arqueología (Stokes *et al.*, 2009). Es decir que la tafonomía forense examina como las variables bióticas y abióticas (condiciones climáticas, estado del cadáver, proliferación de algas, vegetación, acción de animales, etc.) pueden alterar cadáveres o restos de animales o humanos, y por lo tanto cambiar la evidencia en investigaciones legales.

El origen y edad de las heridas en los cadáveres puede ayudar a determinar la causa de muerte (Kondo *et al.*, 1999; Cecchi, 2010).

Un cadáver puede ser alimento o refugio. Tanto vertebrados como invertebrados pueden ser agentes importantes de la tafonomía. La actividad carroñera puede alterar u obstaculizar evidencia de la causa de muerte, acelerar la descomposición y desarticulación, dispersar, modificar y destruir el esqueleto humano, dificultando la identificación del mismo (Synstelien, 2015). Ciertas lesiones post mortem pueden: modificar heridas ante mortem, eliminar caracteres identificatorios (por ejemplo: estrangulación o herida de bala), o confundirse con heridas ante mortem, complicando la investigación o llevando a interpretaciones erróneas (Vanin y Zancaner, 2011). Por lo tanto es importante conocer el patrón de lesiones dado que se puede identificar la especie animal involucrada (Byard *et al.*, 2002).

Dentro de un contexto paleontológico o arqueológico, los insectos fósiles, sus restos y/o marcas pueden proveer información valiosa sobre la tafonomía del cadáver, las prácticas funerarias de las sociedades antiguas, la actividad que el artrópodo tenía en la tumba y a veces proveer información sobre paleoambiente y paleoclima, y también filogenética (Rogers, 1992; Martin y West, 1995; Hasiotis *et al.*, 1999; West y Martin, 2002; Britt *et al.*, 2008; Huchet, 2014). La aplicación del estudio de

entomología forense a los estudios tafonómicos mejora la habilidad de determinar la estación de muerte y el tiempo relativo que pasó entre la muerte y el entierro Bader *et al.* (2009).

INVERTEBRADOS CARROÑEROS

Anteriormente se mencionó que algunos invertebrados pueden alimentarse de cadáveres o restos animales y humanos, causando artefactos. Entre ellos los artrópodos son un grupo importante y existen trabajos que describen la acción de hormigas, termitas, coleópteros, tineidos, dípteros, artrópodos acuáticos, etc. Además se han detectado marcas en huesos fósiles desde el triásico al pleistoceno, atribuyéndose las mismas a insectos. Estos últimos también pueden realizar otros efectos tafonómicos como: acelerar los procesos de descomposición, y esto a su vez llevar a la momificación; pueden transportar huesos, enterrar cadáveres y secretarle sustancias que alteren la descomposición, (Weigelt, 1989; Lyman, 1996; Ratcliffe, 1996; Byrd y Castner, 2000; Schroeder *et al.*, 2002). A su vez hay diversos factores que pueden influenciar la actividad de los insectos, por ejemplo, la actividad de los vertebrados carroñeros puede prevenir la descomposición y alterar la actividad de los insectos, por alimentarse de los mismos o remover tejidos blandos y/o dispersar los restos, así los insectos tendrán poca participación en el cadáver o bien se acelerará la sucesión de los mismos o el fenómeno opuesto (Sorg y Marden 2013); el entierro del cadáver o restos en suelo, lo cual restringe el acceso a los carroñeros disminuyendo la descomposición cadavérica; entre otros (Rodriguez y Bass, 1985; Rodriguez, 1997; VanLaerhoven y Anderson, 1999; Fiedler y Graw, 2003).

Termitidae (Isoptera)

Tanto en estudios arqueológicos como experimentales se ha encontrado que las termitas poseen actividad osteofágica.

En 1911, se realizó el primer reporte de insectos (termitas) consumiendo hueso humano de momias antiguas de Nubia (Derry, 1911). Años más tarde, se realiza el primer trabajo experimental sobre la acción de termitas en hueso (Watson y Abbey, 1986). Las marcas más viejas que indicarían actividad de insectos eusociales, particularmente termitas, se hallaron en un dinosaurio en China (Xing *et al.*, 2013).

Las termitas consumen hueso, fresco o añejado, dejando distintos tipos de marcas: destrucción, agujeros, depresiones superficiales en forma de parches irregulares o lineales que representan áreas de forrajeo o galerías, respectivamente, túneles, marcas con forma de estrella y estriaciones paralelas y sub-paralelas, e inclusive nidos usando huesos (Hill, 1987; Tappen, 1994; Huchet *et al.*, 2011; Backwell *et al.*, 2012; Queiroz *et al.*, 2017) (Figura 1). Las depresiones encontradas en fósiles son poco profundas (menos de 5 mm), con borde áspero y circular (menos de 1 mm a 15 mm o más de ancho) (Hill, 1987; Tappen, 1994). Las marcas mandibulares a veces se ven en hueso liso y sano (Watson y Abbey, 1986) y la masticación de las

termitas puede confundirse con corrosión de suelo ácido (Pokines y Symes, 2013). También las termitas pueden actuar destruyendo ligamentos y capas cartilaginosas (Coe, 1978).

Entre las especies de termitas involucradas o estudiadas están: *Odontotermes zambesiensis* Sjöstedt, *Trinervitermes trinervoides* Sjöstedt, *Amitermes amifer* Silvestri, *Nasutitermes corniger* Motschulsky, *Microcerotermes indistinctus* Mathews.

En muchos casos las marcas realizadas por las termitas y su periodo de actividad proveen datos de temperatura y humedad (datos micro-ambientales) de tiempo pasado y potencian su uso como indicadores de estacionalidad (Backwell *et al.*, 2012, Queiroz *et al.*, 2017).

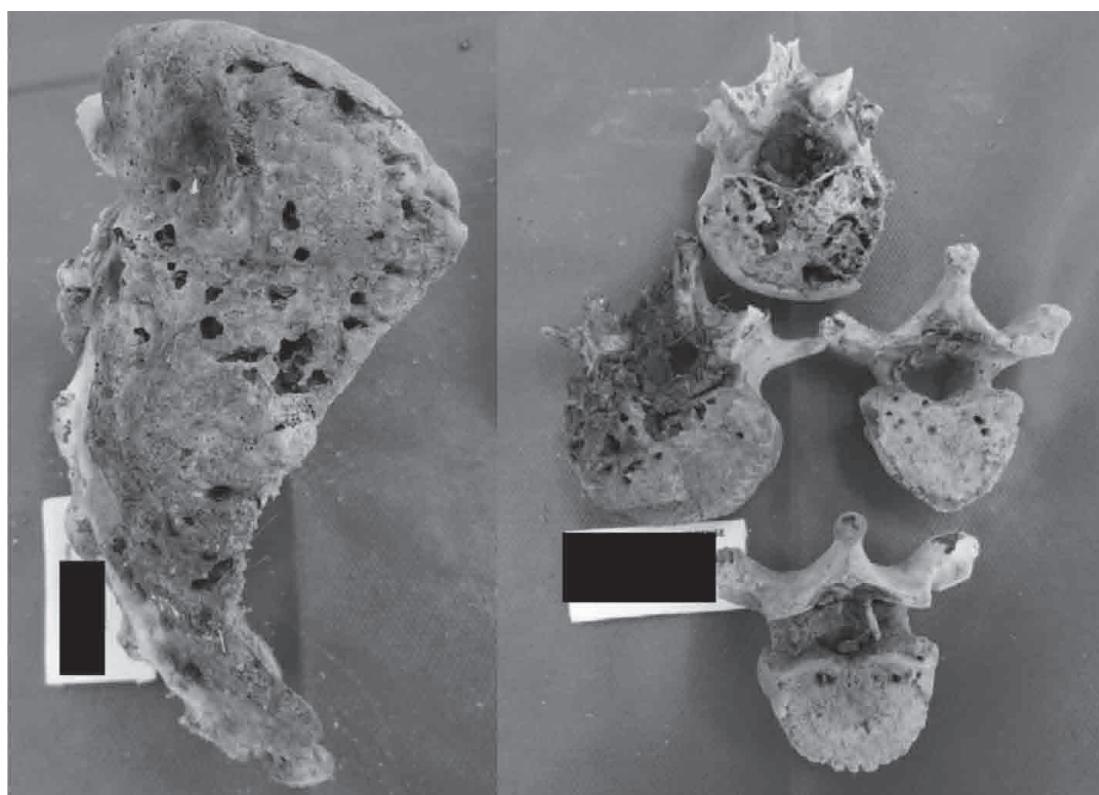


Figura 1. Marcas en hueso producidas por *Nasutitermes corniger*, Motschulsky (Isoptera). Foto extraída de Queiroz *et al.* (2017).

Blattidae (Blattodea)

Al investigarse la muerte repentina de niños, se observaron heridas post mortem causadas por cucarachas, que generaron confusión con heridas ante mortem como estrangulamiento y quemaduras de distintas épocas (Denic *et al.*, 1997). En un trabajo experimental, se halló que la especie *Periplaneta americana* L. puede producir descoloración, destrucción de hueso y masticación (Parkinson, 2012) (Figura 2). Pueden masticar piel callosa, uñas, y pestañas, de personas, y a veces de niños durmiendo. También en niños sin atención y mala higiene, se observaron heridas en la carne

y piel de la cara, las cuales sugirieron que ocurrieron al alimentarse las cucarachas (Robinson, 2005; Byrd y Castner, 2009). Las mordeduras llegan a formar lagunas apergaminadas sobre la piel debido a la unión de las mismas (hasta 30 mordeduras unidas) (González Medina *et al.*, 2013).

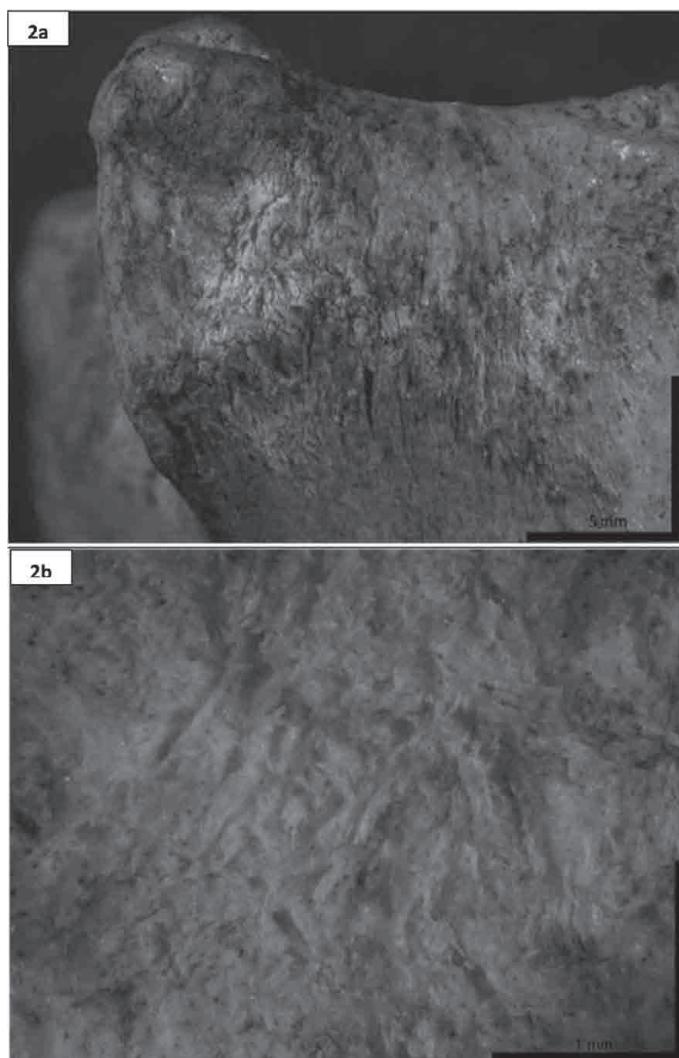


Figura 2. Daño óseo producido por *Periplaneta americana* (Blatidae). a) Destrucción en una falange bovina causada por masticación (magnificación 7x). b) Idem a) pero con mayor magnificación (40x). Foto extraída de Parkinson (2012).

Formicidae (Hymenoptera)

Las hormigas tienen varios roles, entre ellos pueden consumir carne y exudados de cadáveres o bien prestar otros insectos. Los efectos de estos himenópteros sobre los cadáveres fueron descriptos por Saukko y Knight (2004), Byard (2005), Garamendi *et al.* (2008), Campobasso *et al.* (2009), Pérez Martínez *et al.* (2014), quienes pudieron observar áreas irregulares, serpentinas, hinchadas y con ausencia de piel, puntuaciones pequeñas y del tipo arañazo como consecuencia de las mor-

didas. Generalmente la coloración de las heridas es naranja-rosada a amarilla y difusa. Cuando el cadáver está fresco las heridas pueden parecer agujeros/úlcera con bordes ondulados/roídos (Figura 3). Las heridas pueden asemejar heridas ante mortem accidentales o infligidas. Pueden malinterpretarse con abrasiones ante mortem resultado de ácidos fuertes, cigarrillos u otro objeto ofensivo. Las puntas de los dedos pueden producir contusiones o marcas eritematosas similares a las marcas de hormigas. Estas también pueden enmascarar heridas ante mortem, modificándolas o eliminándolas, por ejemplo, heridas de bala o rasguños luego de estrangulación manual o por ligadura (Ventura *et al.*, 2010); o bien cubrir o remover tatuajes, marcas, manchas y cicatrices ocurridas en vida (Celino, 2014). Las heridas pueden ser muy confusas cuando se añegan, secan y oscurecen (color marrón). Algunas veces asociado a las lesiones puede haber hemorragia, particularmente cuando hay remoción superficial de piel en partes congestionadas del cadáver. Se ha observado que las hormigas prefieren labios, párpados, la base de las pestañas (lo que provoca pérdida de las mismas) y nudillos. Moura *et al.* (1997) reportaron pequeñas heridas en labios, orejas, lengua y escroto, durante la etapa fresca de descomposición. En otros trabajos se observaron hormigas principalmente en las regiones mencionadas anteriormente y además en ojos, hocico, ano y cloaca (Moretti y Ribeiro, 2006; Barros *et al.*, 2008; Bonnaci *et al.*, 2011, Maciel *et al.*, 2016). En algunos casos la acción de las hormigas produjo pequeñas lesiones exudativas que fueron elegidas por dípteros (Moretti y Ribeiro, 2006; Barros *et al.*, 2008; Bonnaci *et al.*, 2011, Maciel *et al.*, 2015). Las hormigas también pueden ingerir pelo (Bonacci *et al.*, 2011).



Figura 3. Lesión lineal apergaminada de bordes festoneados localizada en abdomen producida por hormigas. Se pueden observar hormigas. Foto extraída de Pérez Martínez *et al.* (2014).

Hay que tener en cuenta que el ácido fórmico de las hormigas puede contribuir a la corrosión de la capa superficial de piel y provoca un flujo de sangre que al secarse origina abrasiones como lesiones endurecidas y de color castaño en contraste con la piel no afectada. Además dicho compuesto puede producir la muerte en personas alérgicas (Ventura *et al.*, 2010; Celino, 2014; Purkait *et al.*, 2014; Maciel *et al.*, 2015).

Otro efecto tafonómico de las hormigas observado más recientemente es que pueden enterrar o cubrir las heridas con tierra u hojas, excluyendo así a otros artrópodos y cambiando el proceso de descomposición, y además pudiendo ocasionar un segundo efecto tafonómico como lesiones (Lindgren *et al.*, 2011; Celino, 2014).

Algunas de las especies involucradas fueron: *Solenopsis* sp., *S. saevissima* Smith, *S. invicta* Buren, *Cephalotes clypeatus* Fabricius, *Pheidole* sp., *Camponotus* sp., *C. melanoticus* Emery, *Ectatomma* sp.1, *Brachymyrmex* sp.1, *Wasmannia* sp.1, *Crematogaster* sp., *C. scutellaris* Olivier.

Vespidae y Apidae (Hymenoptera)

Hay ciertas avispas y abejas que son carroñeras o pueden comportarse como omnívoras.

Pittoni (2009) observó lesiones osteolíticas en esqueletos humanos de tumbas de alrededor de mil años, con mayor daño en el cráneo, como resultado de la actividad de himenópteros Sphecidae y Halictidae por la construcción de nidos. Estas lesiones simulan patologías degenerativas o infecciosas (periostitis, osteomielitis, sífilis, mielomas múltiples de hueso, etc.) pudiendo resultar en un diagnóstico incorrecto.

En cadáveres de cerdo se encontraron heridas en labio inferior y en menor medida en hocico y ano (Barbosa *et al.*, 2015). Estas se las pudo asemejar a laceraciones, úlceras, quemaduras o abrasiones. En otro trabajo se encontraron túneles pequeños (Gu *et al.*, 2014). También se han encontrado avispas chupando líquidos de los alrededores de cavidades naturales como orificios nasales, boca y ano, agrandando las mismas y permitiendo una mayor salida de olores del cadáver. Esto a su vez aceleró la llegada de insectos de importancia forense, lo que podría ser de interés en la estimación del PMI (Gomes *et al.*, 2007). En otra ocasión, avispas fueron vistas cortando pedacitos de orejas de cerdos vivos en una granja (Edwards, 1980). Szleszkowski *et al.* (2018) reportaron por primera vez la presencia de un nido de *Apis mellifera mellifera* L. y *Vespula vulgaris* L. dentro de un cuerpo momificado en condiciones naturales en una zona del Sud-Oeste de Polonia.

Entre las especies que producen marcas se pueden mencionar: *Agelaia fulvofasciata* Degeer, *A. pallipes* Olivier, *Vespula germanica* Fabricius, *V. vulgaris* L., *V. pensylvanica* Saussure; especies del grupo *Trigona hypogea* Silvestri.

Dermestidae (Coleoptera)

Algunos autores han estudiado marcas encontradas en huesos fósiles de dinosaurio y mamíferos extintos. Britt *et al.* (2008) compararon la mordida de derméstidos con ciertas marcas, hallando coincidencia. Estos autores indicaron que los insectos pueden dañar huesos previamente a su fosilización. Las marcas más comunes de insectos en hueso generalmente son atribuidas a larvas de derméstidos, ya sea por alimentación o excavación de cámaras pupales. Se hallaron tres grandes tipos de cámaras en huesos fósiles que fueron atribuidas a derméstidos por Bader (2008): los «hoyos hemisféricos», que sólo se producen cuando el derméstido horada directamente el hueso; los «hoyos planos», producidos cuando la excavación de la cámara comienza sobre un sustrato de carne seca; y las «rosetas», que constituyen la fase inicial de la formación de un «hoyo plano». Las cámaras pueden dar lugar a confusión con patologías reumáticas, pero pueden caracterizarse porque las de mayor tamaño presentan una localización casi exclusiva en los márgenes interarticulares, y las de menor tamaño se encuentran en zonas anti-declive y en los tubérculos óseos cercanos a la articulación pero no integrantes de ella, nunca se encuentran aisladas ni presentan gran variación de diámetro dentro del mismo hueso, afectan únicamente a la sustancia compacta de las epífisis y presentan lados claramente verticales con sección transversal en forma de U (Figura 4). El reconocimiento de las marcas y su estudio es de importancia en la reconstrucción de eventos pasados, condiciones ambientales del periodo, estimaciones paleoecológicas y tafonómicas (Tobien, 1965; Kitching, 1980; Rogers, 1992; Martin y West, 1995; Hasiotis *et al.*, 1999; Laudet y Antoine, 2004; West y Hasiotis, 2007; Holden *et al.*, 2013). También esto es aplicable con momias, sepulturas, etc. Cuatro especies de derméstidos ya estaban presentes durante el periodo faranoico, *Dermestes ater* Degeer, *D. frischii* Kugelann, *D. leechi* Kalik, y *D. maculatus* Degeer, asociadas a las tumbas (Huchet *et al.*, 2013).

Considerando casos forenses o trabajos experimentales, se halló que los coleópteros son capaces de realizar marcas. Los derméstidos pueden producir distintas modificaciones: túneles superficiales, destrucción de hueso, agujeros, depresiones superficiales de distintos tipos, estriaciones, arañazos y masticación, en distintos tejidos blandos y hueso (Schroeder *et al.*, 2002; Parkinson, 2012; Zanetti *et al.*, 2014) (Figura 4). También se observó que debido a la alimentación la piel parece tornarse translúcida o clara y que utilizan frecuentemente los espacios entre y debajo de las falanges (Zanetti *et al.*, 2014) (Figura 4). Estos autores notaron que cuando los tejidos blandos comenzaron a escasear aparecieron marcas en los huesos. Esto coincidiría con la sugerencia de otros autores de que tal fenómeno puede servir como indicador de un hábitat estresante donde la comida y el substrato para anidar es limitado (Heifti *et al.*, 1980; Roberts *et al.*, 2003). Zanetti *et al.* (2019) observaron que *D. maculatus* también pueden usar hueso para la pupación. En otro trabajo se encontró que *D. maculatus* podría enmascarar heridas post mortem y probablemente ante mortem, y por ende la causa de muerte. Se registraron depresiones, agujeros, destrucción, y mordidas (en los bordes), en las heridas infligidas en extremidades de cerdo. Además, las heridas se deformaron y desaparecieron (luego de 1 mes) producto de la acción de los derméstidos (Zanetti *et al.*, 2015a).

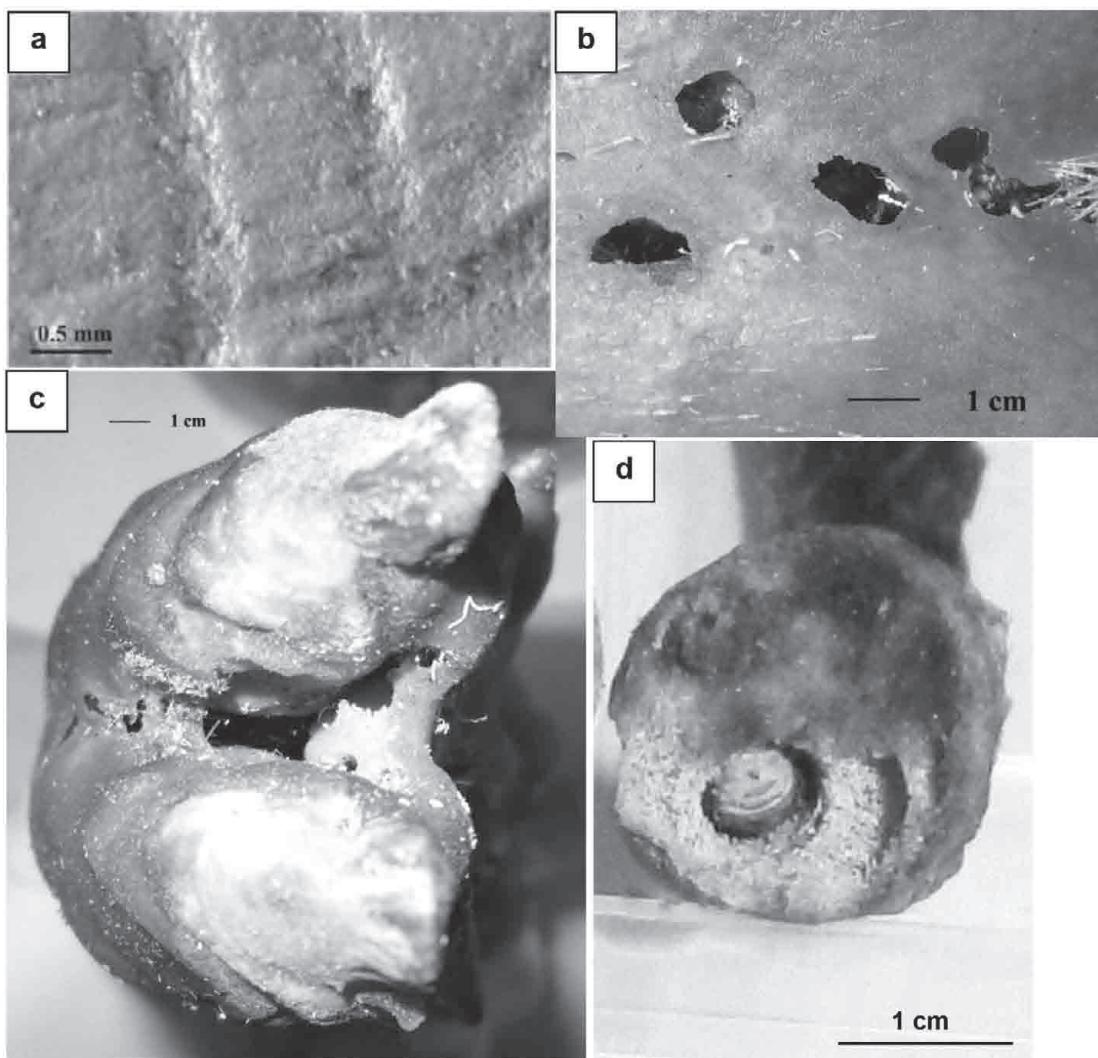


Figura 4. Marcas producidas por *D. maculatus*. a) Depresiones con forma de U en una costilla cervical de un fósil. Foto extraída de Bader (2008); b) Agujeros en tejido porcino. Foto extraída de Zanetti et al. (2014); c) Daño entre y debajo de falanges porcinas. Foto extraída de Zanetti et al. (2014); d) Pupa de *D. maculatus* en hueso. Foto extraída de Zanetti et al. (2019).

Cleridae (Coleoptera)

Similarmente a los derméstidos pero más lentamente, los cléridos como *Necrobia rufipes* Fabricius, tanto en estado adulto como larval, pueden producir marcas tafonómicas (ondulaciones, arañazos, depresiones, agujeros y túneles) en distintos tejidos blandos (Zanetti et al., 2015b) (Figura 5).

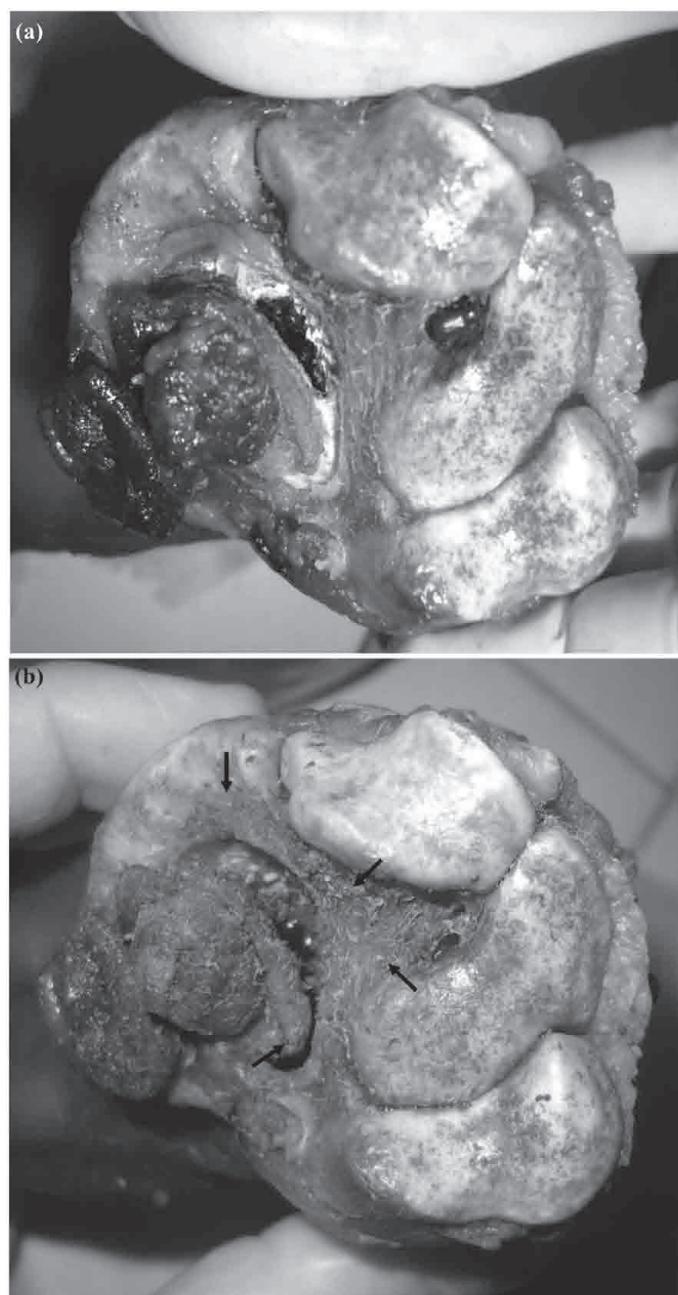


Figura 5. Marcas producidas por *N. rufipes*. (a) Sustrato cadavérico al inicio de la experiencia; (b) Sustrato cadavérico luego de siete meses de actividad adulta (flechas indican el consumo de tejido en áreas de unión). Foto extraída de Zanetti et al. (2015b).

Scarabeidae (Coleoptera)

Haglund (1976) atribuyó a un escarabeido del género *Anoplognathus* Leach, daño en huesos humanos antiguos y enterrados. Ururahy-Rodrigues et al. (2008) mostraron que la actividad de un escarabeido, *Coprophanaeus lancifer* L., puede causar heridas en cadáveres de cerdo, cambiar la posición de los mismos en relación al suelo (180° en 72 h) (modificando los alrededores donde se localiza el cadáver) y causar evisceración en la región abdominal y desmembramiento de las extremidades.

Histeridae y Silphidae (Coleoptera)

Se ha reportado que en bosques de Cologne en Alemania, histéridos y sílfidos, pueden causar lesiones que asemejan heridas de disparo de corto y largo alcance (Benecke, 2005).

Tenebrionidae (Coleoptera)

Zacher (1927), MacFarlane (1971) y Holden *et al.* (2013) observaron que los tenebriónidos eran capaces de consumir hueso, produciendo distintas marcas. Las larvas de *Tenebrio* L. y *Eleodes* Latreille minan principalmente hueso vascular más que tejido blando, produciendo trazas lisas, lineales y superficiales. La remoción de hueso es extensa y la explotación la realizan en estados tempranos y muy tardíos.

Carabidae (Coleoptera)

Los carabidos también pueden dejar artefactos. *Ceroglossus chilensis* Eschscholtz puede profundizar y expandir lesiones realizadas previamente por otros insectos (Ortloff *et al.*, 2016).

Eomeropidae (Mecoptera)

En un trabajo experimental de campo se hallaron artefactos en piel, epidermis y parte de la dermis superficial, causados por *Notiothauma reedi* MacLachlan. El daño causado se caracteriza por lesiones redondas, de 3 a 5 mm de diámetro, con un borde alopécico y el centro ligeramente erosionado y de color marrón-rojizo (Ortloff *et al.*, 2016). Las heridas son similares morfológicamente (tamaño, forma y color) a las producidas ante mortem por quemaduras de cigarrillos descriptas por Faller-Marquardt *et al.* (2008). Los autores sugirieron que podría utilizarse esta información en casos donde se sospecha abuso y en la región estudiada, dado que a la especie debería considerársela como nuevo bioindicador forense en dicha región.

Tineidae (Lepidoptera)

Los tineidos en estado larval pueden consumir materia fecal, pelo y otros materiales queratinosos de cadáveres, y como resultado pueden dejar hoyos elípticos en cuernos (Coe, 1978; Davis y Robinson, 1999). *Tinea deperdella* y *Ceratophaga* Petersen pueden crear depresiones poco profundas y ovoides, excavaciones con forma de canoa de más de 5 mm de ancho y 25 mm de largo en la superficie de cuernos. A simple vista pueden confundirse con una micosis ante mortem (Behrensmeyer, 1978; Rivallain y Van Neer, 1983; Gentry, 1987; González Medina *et al.*, 2013).

Díptera

Las larvas de moscas pueden modificar los tejidos alrededor de heridas, causar la perdida de órganos alrededor de las mismas y producir hoyos redondeados simétricos de tamaño uniforme (Kitching, 1980; Byrd y Castner, 2000; Huchet y Greenberg, 2010). Además la formación de masas larvales y de cadáveres descarnados irregularmente, puede ser indicativo de trauma pre mortem o peri mortem (Byrd y Castner, 2000). También se sugirió que pueden modificar hueso (acción corrosiva de regurgitaciones gástricas) y esto desencadenar patologías, y causar heridas que asemejen hemorragias o hemorragias petequiales correspondientes a múltiples pruebas con el aparato bucal (Haskell *et al.*, 1997, G³adykowska-Rzeczycka y Parafiniuk, 2001; Manfrim *et al.*, 2007).

Amphipoda

Una marca tafonómica común que pueden realizar los amfípodos es destruir varias capas de tejido dérmico dejando el estrato queratinizado de la piel intacto y formando una especie de burbuja sobre el tejido destruido. Los restos de tejido remanente muestran soluciones de continuidad entre dermis y estrato basal, y entre los estratos granuloso y córneo.

Niphargus elegans Garbini (Niphargidae) puede realizar lesiones similares en aspecto y predominancia del lugar afectado, a las ocasionadas por las hormigas en los cadáveres hallados en tierra firme. El diámetro de las lesiones va entre 1-2 mm. Se pueden diferenciar de las producidas por las hormigas porque la unión de las lesiones es menor y el movimiento de los amfípodos es en un plano del cuerpo (el que queda expuesto y con ausencia de contacto con las zonas declives) (Vanin y Zancaner, 2011; González Medina *et al.*, 2013). Debido al comportamiento bentónico de estos organismos su actividad ocurriría durante la sumersión post mortem.

Gammarus pulex L. (Gammaridae) suele evitar los párpados y predomina en el resto de la cara. Las lesiones son de 3-10 mm de longitud (ya que suele haber más coalescencia de heridas) y pueden pasar de ser simples eritemas a lesiones hemorrágicas en las regiones mucosas y cartilaginosas (González Medina *et al.*, 2013).

Cambaridae (Decapoda)

Las marcas de mordida de cangrejos pueden asistir en la identificación de marcas de trauma post mortem en cadáveres sumergidos o flotando. Además estos organismos tienen capacidad de cortar el tejido en tiras, lo cual a su vez tiene efecto en facilitar la descomposición (Wallace y Merrit, 2008). Recientemente se observó daño en la piel y otros tejidos de cadáveres animales y humanos por *Procambarus clarkii* Girard (Vanin y Huchet, 2017).

Ephemeroptera

Las ninfas de efemeroptera construyen excavaciones/madrigueras con forma de U en las orillas de arroyos y madera sumergida para protección y sitios de filtración. Esto llevó a pensar que también podrían hacerlo en hueso no laminar (Scott *et al.*, 1959; Petr, 1970; Edmunds y Allen, 1987; Bae y McCafferty, 1995; De, 2002).

Trichoptera

Los tricópteros pueden causar daño en cadáveres (Holzer, 1939).

ALTERACIÓN DEL PATRÓN DE MANCHAS

La posición del cadáver, la localización de las heridas sangrantes, y el patrón de manchas de sangre (morfología, distribución, cantidad de sangre de las mismas, estado de la sangre, coloración, etc.) aportan gran información y permite en muchas ocasiones reconstruir la secuencia de acontecimientos alrededor de la muerte, como los movimientos de la víctima tras ser herida, movilización del cadáver, etc.

La interpretación del análisis del patrón de sangre de salpicadura de una escena puede verse comprometido o alterado por insectos como coleópteros, dípteros, hormigas, cucarachas y pulgas, simplemente por el movimiento sobre la sangre y luego a otro lugar, llevando a complicaciones en la investigación (Bevel y Gardner, 2008; Ramón y Donoso, 2015).

Las moscas, tanto adultos como larvas, pueden producir artefactos en presencia de varios tipos de fluidos (sangre, saliva, semen, fluidos vaginales, fluidos de descomposición, etc.) (Rivers y Geiman, 2017). Se han detectado artefactos como: regurgitación, manchas de heces, movimiento o transferencia, meconio, etc., que pueden hallarse en distintas superficies (James y Eckert, 1999; Zuha *et al.*, 2008; Durdle *et al.*, 2013 a, b; Rivers y Geiman, 2017). La regurgitación puede ocurrir a partir de distintos tejidos alimenticios o fluidos, excepto orina. Típicamente las manchas de regurgitación pueden ser redondas, elípticas o con forma de lágrima (Durdle *et al.*, 2013b; Rivers y Geiman, 2017). También de manera poco común se han encontrado artefactos tipo cráteres con forma de domo y perímetro oscuro, de 1-2 mm, mayormente en superficies lisas o no porosas y sitios cálidos donde la mosca reposa (James y Sutton, 1998; Benecke y Barksdale, 2007; Bevel y Gardner, 2008; Durdle *et al.*, 2013b). Las manchas de heces son variadas en forma y color dependiendo de la especie, dieta y localidad geográfica. Pueden ser redondas o elípticas (diámetro desde 0,5 mm a 4 mm) y de color cremoso, amarronado u oscuro; a veces cuando las moscas se mueven, pueden tener colas (gota de lágrima, espermatozoide, renacuajo) y otras ser de forma elongada (linear o con forma de salchicha), de color marrón y con una longitud de entre 4,8 mm a 9,2 mm; particularmente sobre superficie lisa (Zuha *et al.*, 2008; Durdle *et al.*, 2013b; Rivers y Geiman, 2017). En la mancha con forma de renacuajo suele haber un cráter con borde notorio (Zuha *et al.*, 2008). En

todos los casos están delineadas por un perímetro irregular y oscuro. Si el artefacto posee cola, la mancha proviene de heces y permite distinguir entre defecación y regurgitación, y entre manchas de sangre y de heces (Rivers y Geiman, 2017). Hay que tener en cuenta para con los dos tipos de artefactos mencionados, que algunas moscas pueden ingresar a la escena del crimen junto con los investigadores o quienes hallaron primeramente el cadáver (Parker *et al.*, 2010), siendo esto posible fuente de contaminación dado que los artefactos pueden provenir de otro individuo.

Las marcas por transferencia o movimiento se deben al contacto del díptero con la sangre (u otros fluidos) y luego el traslado a otra superficie (Scientific Working Group on Bloodstain Pattern Analysis, 2008). En general son lineares y asimétricas con la misma coloración que la comida (proveniente del cadáver). En el caso de las huellas tarsales (impresiones de sangre de los tarso o pulvínulos) son generalmente de 0.2 mm de diámetro y redondeadas (Rivers y Geiman, 2017).

El meconio es un fluido cremoso y viscoso liberado del ano de adultos emergidos que consiste en desecho formado durante el desarrollo intrapupal. En general, este producto es indicativo de una asociación larga entre moscas y cadáveres debido a su ciclo de vida (Greenberg y Kunich, 2002). El tamaño de las manchas de meconio varían de acuerdo a la especie pero generalmente son largas, >2 mm en diámetro, redondeadas a elípticas con colas largas. Las marcas de excreciones de las larvas también pueden aportar el mismo indicio que el meconio (Greenberg, 1991; Christopherson y Gibo, 1997). Estas marcas suelen ocurrir en superficies no porosas.

Los métodos de detección son variados: visual, contextual, y químicos. Actualmente se realiza detección principalmente por un criterio morfológico y contextual.

Benecke y Barksdale (2003) describieron y resumieron la alteración de las manchas de sangre por moscas como: aquellas que tienen una proporción cola/cabeza superior a 1; manchas con cola irregular; manchas en las que cabeza y cola prácticamente no se distinguen; conjuntos de manchas que no convergen en un punto concreto; y manchas con aspecto de espermatozoide o renacuajo.

Otro efecto tafonómico estudiado con dípteros en relación con manchas de sangre es que pueden contaminar la evidencia de ADN o bien ser fuente de ADN fresco (hasta 3 días) (esto último principalmente cuando el cadáver se movió o se intentó limpiar la escena del crimen) (Durdle *et al.*, 2013a,b).

Las pulgas que se alimentan sobre los vivos pasan una gran cantidad de sangre no digerida sobre muchas superficies de la casa.

Jayaprakash (2006) determinó que los patrones de mancha de sangre de heridas producidas en piel por hormigas pueden variar de acuerdo al número y distribución de las heridas, la postura del cuerpo, y su relación con el alrededor, considerando que generalmente el movimiento normal es debido a la gravedad. El sangrado post mortem producto de la acción de hormigas puede ser útil para diagnosticar hipostasis, y detectar si el cuerpo fue movido.

VERTEBRADOS CARROÑEROS

La mayoría de los vertebrados carroñeros dependen de la muerte de animales producto de enfermedades, malnutrición, parásitos o accidentes. Además la disponibilidad de alimento para los carroñeros depende de la accesibilidad al mismo (Rossi *et al.*, 1994; Devault *et al.*, 2003). La secuencia de aparición de vertebrados carroñeros dependería de las condiciones en que ocurrió la descomposición (colonización por insectos, etc.) (Syntelien, 2015). Hay que tener en cuenta que la colonización previa de cadáveres por invertebrados tendrá una influencia en la actividad de vertebrados así como en el tiempo y patrón de desarticulación. Cameron y Oxenham (2012) sugirieron que la actividad por vertebrados sería tardía en presencia de actividad intensa por invertebrados. Hay otros factores que influencian el grado de carroñerismo como el tipo de carroñero, la fuerza de mordida, las características de la mandíbulas, estaciones del año, etc. (Haynes, 1982; Lyman, 1989; Murmann *et al.*, 2006; Klippel y Synstelien, 2007; Freeman y Lemen, 2008).

Los vertebrados carroñeros son agentes biológicos modificadores de tejido blando y hueso (Gifford-Gonzalez, 1991). Pueden acelerar el proceso de descomposición, promover desarticulación, dejar marcas de dientes o picos, fracturar, transportar y dispersar partes del cadáver (Morton y Lord, 2002; Morton y Lord, 2006; Reeves, 2009). Es así que al igual que los invertebrados, el trauma asociado a la causa de muerte puede ser modificado u oscurecido (Rothschild y Schneider, 1997; Byard *et al.*, 2002). También como los invertebrados carroñeros, algunos vertebrados son atraídos a distintos días y estados de descomposición. Algunos prefieren el estado fresco (buitres, roedores) y otros más avanzado (zorro rojo) (Rodriguez, 1997; Morton y Lord, 2006; Klippel y Synstelien, 2007). Además la actividad de los carroñeros puede ser afectada por la luz u oscuridad. Los buitres prefieren alimentarse durante el día mientras que los mapaches, zorros y coyotes, lo hacen durante el anochecer.

Los animales carroñeros pueden dañar huesos en distintas formas. Los carnívoros como los canidos generalmente dejan 4 marcas en hueso: depresiones, surcos, perforaciones y hendiduras (Binford, 1981; Haynes, 1983; Haglund *et al.*, 1988; Milner y Smith, 1989; Andrews y Fernandez-Jalvo, 1997; Pickering *et al.*, 2004; Coard, 2007; Delaney-Rivera *et al.*, 2009; Andrés *et al.*, 2012). Las depresiones ocurren cuando el chupeteo o las mordidas pierden poder para atravesar hueso pero aún lo marcan; los surcos son más profundos que las hendiduras o canales en hueso, son causados por molares para llegar a la cavidad medular (con continua actividad mandibular) y son longitudinales al final del asta abierta; las perforaciones ocurren cuando el hueso es atravesado y forma un pequeño agujero; y las hendiduras ocurren cuando el diente arrastra la superficie del hueso, en general su largo es tres veces mayor que su ancho (Binford, 1981; Haynes, 1983; Haglund *et al.*, 1988; Milner y Smith, 1989; Pickering *et al.*, 2004; Coard, 2007; Delaney-Rivera *et al.*, 2009). Wiley y Snyder (1989) reportaron que *Canis lupus* L. destruye los extremos de los huesos porosos más largos que los de los huesos compactos, causando perforaciones. *Vulpes vulpes* L. produce punciones y surcos en hueso animal, principalmente en el esqueleto axial (Cáceres *et al.*, 2009). Mondini (2018) encontró que los félidos pueden dejar marcas en restos animales: de mordida, punciones, depresiones, masticación,

y corrosión por digestión. Al estudiar la acción de *Puma concolor* L. y *Leopardus geoffroyi* d'Orbigny & Gervais en cadáveres o restos animales se encontró daño por masticación (particularmente relacionado con la matanza). Dentro de ese daño lo más común que se encontró fue: ruptura extensa de huesos, punciones, depresiones, y también se reportaron bordes crenulados y surcos (Nasti, 2000; Borrero *et al.*, 2005). Los surcos y punciones aisladas son características de *P. concolor* y otros felidos grandes. También se registró fuerte evidencia de digestión ósea por *P. concolor* y *L. geoffroyi*, (los pumas además produjeron, adelgazamiento, degradación de superficie, pulido de áreas prominentes, y presencia de agujeros) (Montalvo *et al.*, 2007; Mondini, 2018). De manera semejante, *Lontra longicaudis* Olfers produjo modificaciones en huesos animales por acción mecánica de los dientes o durante la ingestión, y en menor medida dejó marcas de dientes (Montalvo *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos con este mamífero fueron similares a la de felinos como puma y leopardo, mustélidos y vivérridos, también mostrando una mejor representación de elementos craneales (principalmente dientes aislados) y elementos proximales de los miembros (Andrews, 1990; Montalvo *et al.*, 2015). Cuando Montalvo *et al.* (2008) estudiaron el comportamiento de *Conepatús chinga* Molina observaron destrucción de huesos animales debido al proceso de masticar, tragar y/o digerir (superficie pulida, bordes redondeados, agujeros y adelgazamiento de paredes).

Además, los carnívoros pueden chupetear las epífisis de los huesos largos y también los herbívoros pueden chupetear huesos (Sutcliffe, 1973; Haynes, 1981, 1982; Johnson, 1989). Otra manera en que los animales pueden dejar marcas post mortem en hueso es por pisoteo o pateo, pudiendo hasta quebrarlo (Andrews y Cook, 1985). El pisoteo humano puede dejar marcas que asemejan marcas de corte (Behrensmeyer *et al.*, 1986). Las marcas infligidas por pisoteo quizás pueden ser confundidas con marcas realizadas con herramientas. Las quebraduras también pueden ocurrir por las mordidas de carnívoros, y las de tipo espiral son de importancia, y consisten en curvas helicoidales de distinto grado respecto a la circunferencia de las diáfisis (Gifford-Gonzalez, 1989; Bright, 2011). Los *V. vulpes* pueden quebrar huesos finos (costillas y procesos vertebrales) pero no tienen capacidad para quebrar huesos largos de grandes animales (Binford, 1981; Haynes, 1983; Cáceres *et al.*, 2009). *Lontra longicaudis* produjo quebraduras de huesos de animales. Esta especie quebró más restos óseos que *P. concolor* y *L. geoffroyi*. Por otro lado, *C. chinga* quebró todos los huesos (Montalvo *et al.*, 2015). Los zorros rara vez producen fracturas de huesos y de causarlas lo hacen principalmente en costillas y apófisis de vértebras (Mondini, 2018).

El tipo de masticado y transporte de huesos (dispersión) puede alterar el record arqueológico. Además, en el ámbito forense aporta distintos datos para la interpretación de la escena del crimen o hallazgo, incluyendo posición del cuerpo o distribución de huesos, estimar el tiempo de muerte, y buscar estrategias para mejorar la recuperación de huesos. También, permite distinguir entre cambios tafonómicos post mortem y trauma peri mortem (Haglund *et al.*, 1988). Por ello es importante caracterizar las marcas de dientes realizadas en hueso por animales (Syntelien, 2015). Murmann *et al.* (2006) sugirieron que podían separarse los patrones de mordida de Canidae y Felidae. Hay 3 categorías: pequeño (gato doméstico y zorro), medio (lince

y coyote) y grande (león de montaña y lobo). El perro doméstico no encaja dentro de estas categorías. Los osos y glotones se agrupan juntos.

Se halló una correlación entre ancho y largo de las depresiones producidas en hueso por dientes de varios carnívoros. Las depresiones largas halladas en las epífisis de huesos largos de menos de 4 mm pueden ser realizadas por carnívoros como el chacal, zorros, chitas o leopardos (Dominguez-Rodrigo y Piqueras, 2003; Pickering *et al.*, 2004; Borrero, 2007; Foust, 2007). Si estas mismas depresiones son entre 4-6 mm, deben ser realizadas por carnívoros como babuinos, osos, perros, y lobos (también por leones y hienas); y si miden más de 6 mm, podrían ser sólo de hienas y leones. Las depresiones en hueso esponjoso con un ancho menor de 2 mm, representan felinos de tamaño medio; las que miden entre 2-4 mm implican solapamientos de carnívoros mayores; y depresiones más largas representan hienas, osos, leones y perros (Dominguez-Rodrigo y Piqueras, 2003; Pickering *et al.*, 2004; Foust, 2007). Por el contrario, depresiones en diáfisis de 2 mm o menos de largo y 1,5 mm o menos de ancho, en epífisis de huesos largos, se asocian a carnívoros de tamaño medio como babuinos, chacales, osos y perros; mientras que depresiones más largas y anchas que 4 mm se asocian a carnívoros mayores como hienas, leones y lobos (Dominguez-Rodrigo y Piqueras, 2003; Pickering *et al.*, 2004; Foust, 2007). Coard (2007) encontró que realizar un puntaje sobre el ancho de las heridas en hueso puede servir para identificar carnívoros y distinguir carnívoros grandes de pequeños. Estos harán marcas proporcionales a su tamaño, los primeros harán marcas de ancho pequeño o grande, y los segundos pueden hacer sólo marcas de ancho pequeño. Hay que tener en cuenta que los pumas si bien pueden producir punciones de >3 a >5 mm en promedio, mostraron gran variación en el tamaño (Mondini, 2018).

Como se mencionó anteriormente la desarticulación y dispersión pueden alterar el sitio de deposición, estados de descomposición, y dificultar la estimación del PMI y otras determinaciones (Haglund *et al.*, 1989). Algunos estudios certificaron que los carroñeros vertebrados desarticulan restos humanos en una secuencia consistente, desarticulando o consumiendo elementos particulares antes que otros, por lo tanto conocer los patrones de desarticulación y dispersión puede ayudar en la localización de los restos y en estrechar las estimaciones del PMI (Haglund *et al.*, 1989; Blumschine, 1995; Haglund, 1997; Cameron y Oxenham, 2012; Spradley *et al.*, 2012). La secuencia propuesta por Haglund *et al.* (1989) consiste en: primero remoción de la piel y músculos de la cara y cuello, y los órganos de este último; continúa la destrucción de la cavidad torácica, incluyendo clavículas, y luego los miembros superiores y escapula; sigue la desarticulación de las extremidades inferiores; y por último la cabeza y columna vertebral. En base a ello Haglund *et al.* (1989) desarrollaron un sistema sobre el carroñerismo en restos humanos utilizando puntuación: 0 indica remoción de tejido blando sin desarticulación; 1 representa restos con destrucción del esqueleto axial y remoción de los miembros superiores; 2 indica remoción de los miembros inferiores; 3 señala desarticulación casi completa; y 4 representa desarticulación y dispersión total con recuperación del cráneo y 13 elementos o fragmentos variados. Además Haglund *et al.* (1989) indicaron que ciertos elementos esqueléticos suelen hallarse en asociación con otro elemento, como ser: cabeza con primera y

segunda vértebra; caja torácica con algunas vértebras cervicales y torácicas, incluyendo esternón; escápula y miembros superiores; y vértebras lumbares, pelvis, y extremidades inferiores, particularmente tibia y fíbula. Steadman y Worne (2007) coinciden con la secuencia anterior, el consumo comienza en la cara, cuello y luego el tórax; sigue la desarticulación de los miembros superiores y luego de los inferiores; y por último el tronco. Por el contrario, de acuerdo a Cameron y Oxenham (2012), la desarticulación ocurre comenzando con las costillas, vértebras cervicales, vertebras torácicas, cráneo con mandíbula, extremidades anteriores y posteriores, coxis, y por último, vértebras lumbares. El trabajo de Bright (2011) tampoco avala el modelo de Haglund, sino que revela que la cabeza es la primera en ser carroñada y desarticulada seguida por miembro superior, miembro inferior, tórax, y columna vertebral. De acuerdo a esta autora, la secuencia propuesta por Haglund *et al.* (1989) está basada en cánidos, por lo que ella sugiere que las diferencias podrían deberse a la especie involucrada. Es así que se encontró que los osos pueden distinguirse de los perros por la presencia o ausencia de restos esqueléticos en o cerca de la escena de hallazgo. Los osos consumen y se llevan los miembros superiores y el esqueleto axial, mientras que los perros y coyotes dejan mayormente el esqueleto axial y prefieren cabeza, cuello, miembros superiores e inferiores (Carson *et al.*, 2000). Willey y Snyder (1989) mencionan que los carnívoros como lobos y perros usualmente comen áreas abdominales y costillas, siguiendo con los huesos de los miembros superiores (desarticulación de hombros del torso) y comen luego cara y cuello. Los lobos pueden transportar restos al azar a 233-500 m del sitio de muerte e incluso en un rango de 1200 m² (Fosse *et al.*, 2004; Esteban *et al.*, 2009; Yravedra Sainz De Los Terreros *et al.*, 2012), prefiriendo elementos apendiculares (Fosse *et al.*, 2004). Los lobos son agentes dispersores más que acumuladores (Gray, 1993; Apollonio *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2008). En otro trabajo se halló que el movimiento de cadáveres por coyotes puede ser reordenado en un patrón lineal, pudiendo localizarse el cráneo en la posición original del cadáver, la mandíbula cerrada en el cráneo y los demás restos esqueléticos localizados lejos del cráneo y mandíbula pero en línea con los dos primeros elementos (Jones, 2009). Los zorros pueden acelerar la desarticulación de restos animales cuando esta ha comenzado por pumas, e implica separación de cabeza, miembros y costillas de vertebrados. Frecuentemente faltan costillas y vértebras así como también partes distales de los miembros (Mondini, 2018). Los pumas pueden desmembrar y despellejar presas en zonas del costillar, escápula, pelvis y miembros superiores. Además pueden transportar carcassas o partes de ellas de más de 50 kg a 400 m (Mondini, 2018). En el caso de hienas y *Lycaon pictus* Temminck, también pueden transportar carcassas a gran distancia pero a diferencia del leopardo, no mueven la carcasa completa (Yravedra Sainz De Los Terreros *et al.*, 2012). Aunque Putman (1977) no evidenció que los patrones de dispersión sean indicativos del PMI, sugirió lo importante de realizar mapas o patrones de desarticulación y dispersión. Cabe mencionar que es de importancia continuar realizando estudios con mamíferos carroñeros y más aún en la Argentina.

En cuanto a los roedores, generalmente mastican los extremos de los huesos largos y otras áreas con fácil acceso al hueso suave cortical (Klippel y Synstelien, 2007). Además roedores como ratas y ratones pueden dejar marcas post mortem

en piel fresca y tejido blando de apariencia circular (Haglund, 1992). Los bordes son aserrados con bordes irregulares y limitados dentro de intervalos de 1-2 mm, mostrando parcialmente hendiduras protúrdas 5 mm o más. Se observan laceraciones distintas, paralelas y cutáneas que derivan del par de incisivos, que si bien son identificatorias cuesta encontrarlas. Las áreas más utilizadas por los roedores son las expuestas y desprotegidas, como párpados, nariz, boca, y dorso de las manos (Tsokos *et al.*, 1999). Según Stewart (1979) y Sledzik (1998), prefieren la cara, manos, pies y el abdomen. Además otra característica notoria de la actividad de roedores es que una vez que comienzan a roer o morder en un punto, deben continuar y así son expuestas las estructuras más robustas como tendones, ligamentos y huesos. También algunas veces pueden transportar pequeños huesos como los carpos (Galloway, 1997). Cabe mencionar que es de importancia continuar realizando estudios y más aún en la Argentina.

Los buitres en general quizás dejan arañazos superficiales o perforaciones en hueso (Reeves, 2009), mientras que los cuervos no dejan marcas en hueso (Bass, 1997; Asumura *et al.*, 2004). Se encontró que los buitres pueden dejar marcas en cráneo y mandíbulas de 2-31 mm, dobles líneas con forma de V o L, y también en la órbita ocular con forma en general triangular, entre otros artefactos (Fetner y So³tysiak, 2013). En un estudio realizado por Zuñiga Bizama (2016) fue posible identificar marcas de picotaje de distinta profundidad, corta longitud, ubicación precisa y con forma transversal en «U», realizadas por *Vultur gryphus* L.. La mayor parte de las huellas (agujeros de diámetro mayor, con bordes cortantes e irregulares) encontradas en el estudio mencionado, se concentraron en zonas con presencia de agujeros y sobre algunas superficies articulares que rodean forámenes de gran tamaño. Como se mencionó arriba, se logró identificar rasguños a nivel del cuerpo mandibular, de diversa longitud, profundidad, disposición grupal y forma, como producto de la manipulación por parte del cóndor al mover los restos. *Vultur gryphus* puede transportar restos de hasta 15 kg de peso, como lo indican Mameli y Estévez (2004). El accionar de *Coragyps atratus* Bechstein mostró similitud en los niveles de corrosión digestiva con ensambles generados por mamíferos carnívoros (adelgazamientos, áreas prominentes pulidas, fracturas, y perforaciones) (Ballejo *et al.*, 2012). Su accionar predomina sobre piezas del autopodio. Existen diferencias en el grado de digestión entre los huesos de los distintos tipos de presa. Una diferencia importante entre los restos óseos acumulados por *C. atratus* y otros mamíferos carnívoros, radica en que éstos últimos ocasionan crenulaciones y orificios en los huesos por la acción masticatoria (Ballejo *et al.*, 2012). De acuerdo a Ballejo (2016) pueden plantearse dos modelos tafonómicos que pueden asistir a los investigadores con el análisis de los restos óseos: el primero de ellos, abarca sitios abiertos, los restos de vertebrados a encontrar son de tamaño grande a mediano y están representados por la mayoría de los elementos del esqueleto, dispersos en un radio medio de c.7 m. Los elementos con mayor dispersión son, la mandíbula, la escápula y el miembro anterior articulado. Las modificaciones óseas esperadas incluyen surcos superficiales y profundos; muescas y muy pocas perforaciones en el cráneo, mandíbulas y escápulas. El segundo modelo, abarca sitios refugiados, y se pueden encontrar acumulaciones óseas de vertebrados de todos los tamaños, pero representados principalmente por elementos

pertenecientes al autopodio (mayormente falanges), aunque también puede haber fragmentos de vértebras y costillas. Todos los elementos presentan signos de una corrosión digestiva fuerte. Al igual que con *C. atratus*, Montalvo y Tallade (2009) observaron que *Caracara plancus* Miller produce quebraduras de huesos y fuerte acción digestiva sobre los restos (de moderadamente a fuertemente modificados). Se encontraron fragmentos de huesos con bordes redondeados y adelgazamiento de las paredes, y en algunos casos agujeros. También se evidenció que *C. plancus* selecciona partes del cuerpo de sus presas para ingerir y que otras son descartadas (particularmente regiones craneales), y que genera acumulación de huesos sin digerir (por ende sin corrosión digestiva) con representación anatómica particular (Montalvo y Tallade, 2009). El hecho que *C. plancus* podría afectar huesos de modo diferente podría causar errores interpretativos como atribuir representaciones esqueléticas a más de un depredador (Montalvo y Tallade, 2009). El estudio tafonómico de Sanchis *et al.* (2014) sobre *Neophron percnopterus* L. determinó que es un ave que prefiere tejido blando pero que es capaz de alterar restos óseos (Kruuk, 1967; König, 1983). Se encontraron marcas como depresiones y en menor medida punciones, causadas por pico o garras durante la alimentación (generalmente ocurren en áreas con hueso de baja densidad como vértebras, costillas, escapula, pelvis y cráneo), y también baja digestión de restos. Además, es un ave que puede transportar y acumular restos. Cabe recordar cómo se mencionó anteriormente en la sección para otros carroñeros, que el patrón tafonómico observado en las aves se relaciona con el tamaño y edad de la presa/predador, el tipo de presa y el comportamiento alimenticio del predador. Es importante continuar realizando estudios con aves carroñeras y más aún en la Argentina.

En base a todo lo expuesto y como se mencionó anteriormente, la tafonomía forense reviste importancia ya que el estudio permite establecer como las variables bióticas y abioticas pueden alterar la evidencia en las investigaciones legales.

LITERATURA CITADA

- Andrés, M., Gidna, A. O., Yravedra, J., y Domínguez-Rodrigo, M. (2012). A study of dimensional differences of tooth marks (pits and scores) on bones modified by small and large carnivores. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 4, 209-219.
- Andrews, P. (1990). *Owls, caves and fossils: predation, preservation, and accumulation of small mammal bones in caves, with the analysis of the Pleistocene cave faunas from Westbury-sub-Mendip*. Chicago, E.E.U.U.: University of Chicago Press.
- Andrews, P., y Cook, J. (1985). Natural modifications to bone in a temperate setting. *Man*, 20, 675-691.
- Andrews, P., y Fernandez-Jalvo, Y. (1997). Surface modifications of the Sima de los Huesos fossil humans. *Journal of Human Evolution*, 33, 191-217.
- Apollonio, M., Mattioli, L., Scandura, M., Mauri, L., Gazzola, A., y Avanzinelli, E. (2004). Wolves in the Casentinesi Forests: insights for wolf conservation

- in Italy from a protected area with a rich wild prey community. *Biological Conservation*, 120, 249–260.
- Asamura, H., Takayanagi, K., Ota, M., Kobayashi, K., y Fukushima, H. (2004). Unusual characteristic patterns of postmortem injuries. *Journal of Forensic Science*, 49, 1-3.
- Backwell, L. R., Parkinson, A. H., Roberts, E. M., d'Errico, F., y Huchet, J.-B. (2012). Criteria for identifying bone modification by termites in the fossil record. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 337–338, 72–87.
- Bader, K. S. (2008). *Insect trace fossils on dinosaur bones from the upper Jurassic Morrison formation, northeastern Wyoming, and their use in vertebrate taphonomy*. University of Kansas, Lawrence, Kansas.
- Bader, K. S., Hasiotis, S. T., y Martin, L. D. (2009). Application of forensic science techniques to trace fossils on dinosaur bones from a quarry in the Upper Jurassic Morrison Formation, Northeastern Wyoming. *Palaios*, 24, 140–158.
- Bae, Y. J., y McCafferty, W. P. (1995). Ephemeroptera tusks and their evolution. En: L. D. Corkum, y J. J. H. Abrowski (Eds.), *Current directions in research on Ephemeroptera* (pp. 377-403). Toronto, Canada: Canadian Scholars' Press.
- Ballejo, F. (2016). *Ecología trófica y tafonómica de Jote de cabeza negra, Coragyps atratus (Cathartidae) y su comparación con otros Cathartidae en el noroeste de la Patagonia*. Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP), Patagonia.
- Ballejo, F., Fernández, F. J., y De Santis Luciano, L. J. M. (2012). Tafonomía de restos óseos provenientes de egagrópilas de *Coragyps atratus* (jote de cabeza negra) en el Noroeste de la Patagonia argentina. *Revista del Museo de Antropología*, 5, 213-222.
- Barbosa, R. R., Carric, C., Souto, R. N. P., Andenac, S. R., Ururahy-Rodrigues, A., y Margareth, M. C. (2015). Record of postmortem injuries caused by the Neotropical social wasp *Agelaia fulvofasciata* (Degeer) (Hymenoptera, Vespidae) on pig carcasses in the Eastern Amazon region: implications in forensic taphonomy. *Revista Brasileira de Entomologia*, 59, 257–259.
- Barros, A. S. de Souza, Dutra Kirst, F., y Ferreira Krüger, R. (2008). Insects of forensic importance from Rio Grande do Sul state in southern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 52, 641–646.
- Bass, W. M. (1997). Outdoor decomposition rates in Tennessee. En: W. Haglund, y M. Sorg (Eds.), *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains* (pp. 181–186). Boca Raton, E.E.U.U: CRC Press.
- Behrensmeyer, A. K. (1978). Taphonomic and ecologic information from bone weathering. *Paleobiology*, 4, 150–162.
- Behrensmeyer, A. K., Gordon, K. D., y Yanagi, G. T. (1986). Trampling as a cause of bone surface damage and pseudo-cutmarks. *Nature*, 319, 768–771.
- Benecke, M. (2005). Arthropods on Corpses. En: M. Tsokos (Ed.), *Forensic Pathology Reviews, vol. II* (pp. 207-240). Totowa, E.E.U.U: Humana Press.
- Benecke, M., y Barksdale, L. (2003). Distinction of bloodstain patterns from fly artifacts. *Forensic Science International*, 137, 152-159.
- Benecke, M., y Barksdale, L. (2007). In response to: «Commentary on: Mark Benecke and Larry Barksdale, Distinction of bloodstain patterns from fly artifacts:

- Forensic Science International 137 (2003) 152–159». *Forensic Science International* 149 (2/3) (2005) 293–294]. *Forensic Science International*, 171, 84.
- Bevel, T., y Gardner, R. (2008). *Bloodstain Pattern Analysis: with an introduction to crime scene reconstruction*, 3rd ed. Boca Raton, E.E.U.U.: CRC Press.
- Binford, L. R. (1981). *Bones: ancient men and modern myths*. New York, E.E.U.U.: Academic Press.
- Blumenschine, R. J. (1995). Percussion marks, tooth marks, and experimental determinations of the timing of hominid and carnivore access to long bones at FLK Zinjanthropus, Olduvai Gorge, Tanzania. *Journal of Human Evolution*, 29, 21–51.
- Bonacci, T., Brandmayr, T. Z., Brandmayr, P., Vercillo, V., y Porcelli, F. (2011). Successional patterns of the insect fauna on a pig carcass in southern Italy and the role of *Crematogaster scutellaris* (Hymenoptera: Formicidae) as a carrion invader. *Entomological Science*, 14, 125–132.
- Borrero, L. A. (2007). Longitudinal taphonomic studies in Tierra del Fuego, Argentina. En: M. Gutiérrez, G. Barrientos, M. Salemme, L. Miotti, y G. Mengoni-Goñalons (Eds.), *Taphonomy and archaeozoology in Argentina* (pp. 219–233). Oxford, United Kingdom: International Series 1601.
- Borrero, L. A., Martin, F. M., y Vargas, J. (2005). Tafonomía de la interacción entre pumas y guanacos en el Parque Nacional Torres del Paine, Chile. *Magallania*, 33, 95–114.
- Bright, L. N. (2011). *Taphonomic signatures of animal scavenging in northern California: a forensic anthropological analysis*. Faculty of California State University, Chico.
- Britt, B. B., Scheetz, R. D., y Dangerfield, A. (2008). A suite of dermestid beetle traces on dinosaur bone from the Upper Jurassic Morrison Formation, Wyoming, USA. *Ichnos*, 15, 59–71.
- Byard, R. W. (2005). Autopsy problems associated with post-mortem ant activity. *Forensic Science of Medicine and Pathology*, 1, 37– 40.
- Byard, R. W., James, R. A., y Gilbert, J. D. (2002). Diagnostic problems associated with cadaveric trauma from animal activity. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 23, 238–244.
- Byrd, J. H., y Castner J. L. (2000). Insects of forensic importance. En: J. H. Byrd, y J. L. Castner (Eds.), *Forensic Entomology, the utility of arthropods in legal investigations* (pp. 43-79). Boca Raton, E.E.U.U: CRC press.
- Byrd, J. H., y Castner J. L. (2009). *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*, 2nd ed. Boca Raton, E.E.U.U.: CRC press.
- Cáceres, I., Esteban-Nadal, M., de Lluc Bennàsar, Ma., y Fernández-Jalvo, Y. (2009). Disarticulation and dispersal processes of cervid carcass at the Bosque de Riofrío (Segovia, Spain). *Journal of Taphonomy*, 7, 129-141.
- Cameron, A. C., y Oxenham, M. (2012). Disarticulation sequences and scattering patterns in temperate Southeastern Australia. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 44, 197-211.

- Campobasso, C. P., Marchetti, D., Introna, F., y Colonna, M. F. (2009). Post mortem artifacts made by ants and the effect of ant activity on decompositional rates. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 30, 84-87.
- Carson, E. A., Stefan, V. H., y Powell, J. F. (2000). Skeletal manifestations of bear scavenging. *Journal of Forensic Sciences*, 43, 515-526.
- Cecchi, R. (2010). Estimating wound age: looking into the future. *International Journal of Legal Medicine*, 124, 523-536.
- Celino, T. B. (2014). *Atividade de formigas e suas aplicações forenses em um ecossistema dinâmico – o corpo em decomposição*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Biologia, Seropédica, Rio de Janeiro.
- Christopherson, C., y Gibo, D. L. (1997). Foraging by food deprived larvae of *Neobellieria bullata* (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Forensic Sciences*, 42, 71-73.
- Coard, R. (2007). Ascertaining an agent: using tooth pit data to determine the carnivore/s responsible for predation in cases of suspected big cat kills in an upland area of Britain. *Journal of Archaeological Science*, 34, 1677-1684.
- Coe, M. (1978). The decomposition of elephant carcasses in the Tsavo (East) National Park, Kenya. *Journal of Arid Environments*, 1, 71-86.
- Davis, D. R., y Robinson, G. S. (1999). The Tineodea and Gracillarioidea. En: N. P. Kristensen (Ed.), *Lepidoptera, Moths and Butterflies. Volume 1: Evolution, Systematics, and Biogeography. Handbook of Zoology. A Natural History of the Phyla of the Animal Kingdom Volume IV: Arthropoda: Insecta, Part 35*. (pp. 91-117). Berlin, Germany: Walter de Gruyter.
- De, C. (2002). Continental mayfly burrows within relict-ground in intertidal beach profile of Bay of Bengal coast: a new ichnological evidence of Holocene marine transgression. *Current Science*, 83, 64-67.
- Delaney-Rivera, C., Plummer, T. W., Hodgson, J. A., Forrest, F., Hertel, F., y Oliver, J. S. (2009). Pits and pitfalls: taxonomic variability and patterning in tooth mark dimensions. *Journal of Archaeological Science*, 36, 2597-2608.
- Denic, N., Huyer, D. W., Sinal, S. H., Lantz, P. E., Smith, C. R., y Silver, M. M. (1997). Cockroach: the omnivorous scavenger. Potential misinterpretation of postmortem injuries. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 18, 177-180.
- Derry, D. E. (1911). Damage done to skulls and bones by termites. *Nature*, 86, 245-246.
- DeVault, T. L., Rhodes, O. E., y Shivik, J. A. (2003). Scavenging by vertebrates: behavioral, ecological, and evolutionary perspectives on an important energy transfer pathway in terrestrial ecosystems. *Oikos*, 102, 225-234.
- Domínguez-Rodrigo, M., y Piqueras, A. (2003). The use of tooth pits to identify carnivore taxa in tooth-marked archaeofaunas and their relevance to reconstruct hominid carcass processing behaviours. *Journal of Archaeological Science*, 30, 1385-1391.
- Durdle, A., Mitchell, R. J., y van Oorschot, R. A. (2013a). The human DNA content in artifacts deposited by the blowfly *Lucilia cuprina* fed human blood, semen and saliva. *Forensic Science International*, 233, 212-219.

- Durdle, A., van Oorschot, R. A., y Mitchell, R. J. (2013b). The morphology of fecal and regurgitation artifacts deposited by the blow fly *Lucilia cuprina* fed a diet of human blood. *Journal of Forensic Science*, 58, 897-903.
- Edmunds, G. F. Jr., y Allen, R. K. (1987). Order Ephemeroptera. En: F. W. Stehr (Ed.), *Immature Insects, Volume 1* (pp. 75-94). Dubuque, E.E.U.U.: Kendall/Hunt Publishing Company.
- Edwards, R. (1980). *Social wasps: their biology and control*. East Grinstead, United Kingdom: Rentokil Ltd.
- Esteban, M., Cáceres, I., y Tarazona, C. (2009). Experimentando con lobos; secuencia de acceso, consumo y dispersión de una carcasa de équido en la Sierra de la Culebra, Zamora (Península Ibérica). *Bloque 3, Capítulo, XLII*, 351-356.
- Faller-Marquardt, M., Pollak, S., y Schmidt, U. (2008). Cigarette burns in forensic medicine. *Forensic Science International*, 176, 200-208.
- Fetner, R. A., y So³tysiak, A. (2013). Shape and Distribution of Griffon Vulture (*Gyps fulvus*) scavenging marks on a bovine skull. *Journal of Taphonomy*, 11, 41-47.
- Fiedler, S., y Graw, M. (2003). Decomposition of buried corpses, with special reference to the formation of adipocere. *Naturwissenschaften*, 90, 291-300.
- Foose, P., Laudet, F., Selva, N., y Wajrak, A. (2004). Premières observations néotaphonomiques sur des assemblages osseux de Bialowieza (N. E. Pologne): Intérêts pour les gisements Pleistocenes d'Europe. *Paleo*, 16, 91-116.
- Foust, J. L. (2007). *The use of tooth pit and tooth/jaw measurements to identify carnivore taxa responsible for damage on scavenged bone*. University of Montana, Missoula.
- Freeman, P. W., y Lemen, C. A. (2008). A simple morphological predictor of bite force in rodents. *Journal of Zoology*, 275, 418-422.
- Galloway, A. (1997). The process of decomposition: the model from the Arizona-Sonoran Desert. En: W. D. Hanglund, y M. H. Sorg (Eds.), *Forensic Taphonomy: the postmortem fate of human remains* (pp. 139-150). Boca Raton, E.E.U.U.: CRC Press.
- Garamendi, P. M., López-Alcaraz, M., Mazón, A., y Rodríguez, J. (2008). Lesiones post mortales por fauna cadavérica. La acción de las hormigas sobre el cadáver. *Cuaderno de Medicina Forense*, 52, 155-159.
- Gentry, A. W. (1987). Pliocene bovidae from Laetoli. En: M. D. Leakey, y J. M. Harris (Eds.), *Laetoli: a Pliocene site in northern Tanzania* (pp. 378-408). Oxford, United Kingdom: Clarendon Press.
- Gifford-Gonzalez, D. (1989). Overview - modern analogues: developing an interpretive framework. En: R. Bonnichsen, y M. H. Sorg (Eds.), *Bone modification* (pp. 43-52). Orono, E.E.U.U: Center for the Study of the First Americans.
- Gifford-Gonzalez, D. (1991). Bones are not enough: analogues, knowledge, and interpretive strategies in zooarchaeology. Author links open the author workspace. *Journal of Anthropological Archaeology*, 10, 215-254.
- G³adykowska-Rzeczycka, J. J., y Parafiniuk, M. (2001). Atypical cranial vault and cervical vertebrae lesions caused by insects. *Journal of Paleopathology*, 13, 75-78.

- Gomes, L., Gomes, G., Oliveira, H. G., Morlin, J. J. J., Desuo, I. C., Queiroz-Carvalho, M. M., Giannotti, E., y Von Zuben, C. J. (2007). Occurrence of Hymenoptera on *Sus scrofa* carcasses during summer and winter seasons in southeastern Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 51, 394-396.
- González Medina, A., González Herrera, L., de la Higuera Hidalgo, J., y Jiménez Ríos, G. (2013). Evaluación práctica de las alteraciones post mortem debidas a la actividad de los artrópodos. *Medicina Legal de Costa Rica*, 30, 7-15.
- Gray, D. R. (1993). The use of Muskox kill sites as temporary rendezvous sites by artic wolves with pups in early winter. *Arctic*, 46, 324-330.
- Greenberg, B. (1991). Flies as forensic indicators. *Journal of Medical Entomology*, 28, 565-577.
- Greenberg, B., y Kunich, J. C. (2002). *Entomology and the law*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- Gu, X., Haelewaters, D., Krawczynski, R., Vanpoucke, S., Wagner, H-G., y Wieglob, G. (2014). Carcass ecology – more than just beetles. *Entomologische Berichten*, 74, 68-74.
- Haglund, L. (1976). *An archaeological analysis of the Broadbeach Aboriginal burial ground*. St. Lucia, Australia: University of Queensland Press.
- Haglund, W. D. (1992). Contribution of rodents to post-mortem artifacts of bone and soft tissue. *Journal of Forensic Sciences*, 37, 1459-1465.
- Haglund, W. D. (1997). Scattered skeletal human remains: search strategy considerations for locating missing teeth. En: W. Haglund, y M. Sorg (Eds.), *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains* (pp. 383-394). Boca Raton, E.E.U.U: CRC Press.
- Haglund, W. D., Reay, D. T., y Swindler, D. R. (1988). Tooth mark artifacts and survival of bones in animal scavenged human skeletons. *Journal of Forensic Sciences*, 33, 985-997.
- Haglund, W. D., Reay, D. T., y Swindler, D. R. (1989). Canid scavenging/disarticulation sequence of human remains in the Pacific Northwest. *Journal of Forensic Sciences*, 34, 587-606.
- Hasiotis, S. T., Fiorillo, A. R., y Hanna, R. R. (1999). Preliminary report on borings in Jurassic dinosaur bones: evidence for invertebrate-vertebrate interactions. En: D. D. Gillette (Ed.), *Vertebrate paleontology in Utah* (pp. 193–200). Salt Lake City, E.E.U.U.: Geological Survey Miscellaneous Publication 99.
- Haskell, N. H., Hall, R. D., Cervenka, V. J., y Clark, M. A. (1997). On the Body: insects' life stage presence and their postmortem artifacts. En: W. D. Haglund, y M. H. Sorg (Eds.), *Forensic Taphonomy: the postmortem fate of human remains* (pp. 415-448). Boca Raton, E.E.U.U: CRC Press.
- Haynes, G. (1981). *Bone modifications and skeletal disturbances by natural agencies: studies in North America*. Catholic University of America, Washington, D.C.
- Haynes, G. A. (1982). Utilization and skeletal disturbances of North American prey carcasses. *Arctic*, 35, 266-281.
- Haynes, G. A. (1983). A guide for differentiating mammalian carnivore taxa responsible for gnaw damage to herbivore limb bones. *Paleobiology*, 9, 164-172.

- Hefti, E., Trechsel, U., Rüfenacht, H., y Fleisch, H. (1980). Use of dermestid beetles for cleaning bones. *Calcified Tissue International*, 31, 45–47.
- Hill, A. (1987). Damage to some fossil bones from Laetoli. En: M. D. Leakey, y J. M. Harris (Eds.), *Laetoli: a Pliocene site in Northern Tanzania* (pp. 543–545). Oxford, United Kingdom: Clarendon Press.
- Holden, A. R., Harris, J. M., y Timm, R. M. (2013). Paleoecological and taphonomic implications of insect-damaged Pleistocene vertebrate remains from Rancho La Brea, Southern California. *PLoS ONE*, 8, e67119.
- Holzer, F. J. (1939). Zerstörung an wasserleichen durch larvaen des kocherfliege. *Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin*, 31, 223–228.
- Huchet, J.-B. (2014). Insect remains and their traces: relevant fossil witnesses in the reconstruction of past funerary practices. *Anthropologie*, 52, 329–346.
- Huchet, J.-B., y Greenberg, B. (2010). Flies, Mochicas and burial practices: a case study from Huaca de la Luna, Peru. *Journal of Archaeological Science*, 37, 2846 e 2856.
- Huchet, J.-B., Deverly, D., Gutierrez, B., y Chauchat, C. (2011). Taphonomic evidence of a human skeleton gnawed by termites in a moche-civilisation grave at Huaca de la Luna, Peru. *International Journal of Osteoarchaeology*, 21, 92–102.
- Huchet, J.-B., Le Mort, F., Rabinovich, R., Blau, S., Coqueugniot, H., y Arensburg, B. (2013). Identification of dermestid pupal chambers on Southern Levant human bones: inference for reconstruction of Middle Bronze Age mortuary practices. *Journal of Archaeological Science*, 40, 3793–3803.
- James, S. H., y Sutton, T. P. (1998). Medium- and high-velocity impact blood spatter. En: James S. H., y Eckert W. G. (Eds.), *Interpretation of bloodstain evidence at crime scenes, 2nd ed.* (pp. 59–83). Boca Raton, E.E.U.U.: CRC Press.
- James S. H., y Eckert, W. G. (1999). *Interpretation of bloodstain evidence at crime scenes (2nd Edition)*. Boca Raton, E.E.U.U.: CRC Press.
- Jayaprakash, P. T. (2006). Postmortem skin erosions caused by ants and their significance in crime reconstruction. *Journal of Forensic Identification*, 56, 972–999.
- Johnson, E. (1989). Human modified bones from Early Southern Plains Sites. En: R. Bonnichsen, y M. H. Sorg (Eds.), *Bone Modification* (pp. 431–472). Orono, E.E.U.U.: Center for the Study of the First Americans.
- Jones, A. (2009). *Animal scavengers as agents of decomposition: the postmortem succession of Louisiana wildlife*. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana.
- Kitching, J. W. (1980). On some fossil Arthropoda from the Limeworks, Makapansgat, Potgietersrus. *Palaeontologia Africana*, 23, 63–68.
- Klippel, W. E., y Synstelien, J. A. (2007). Rodents as taphonomic agents: bone gnawing by brown rats and gray squirrels. *Journal of Forensic Sciences*, 52, 765–773.
- Kondo, T., Ohshima, T., y Eisenmenger, W. (1999). Immunohistochemical and morphometrical study on the temporal expression of interleukin-1 α (IL-1 α) in human skin wounds for forensic wound age determination. *International Journal of Legal Medicine*, 112, 249–252.

- König, C. (1983). Interspecific and intraspecific competition for food among old world vultures. En: S. R. Wilbur, y J. A. Jackson (Eds.), *Vulture Biology and Management* (pp. 153-171). Berkeley, E.E.U.U.: Univ. of California Press.
- Kruuk, H. (1967). Competition for food between vultures in East Africa. *Ardea*, 55, 171-193.
- Laudet, F., y Antoine, P. O. (2004). Des chambres de pupation de Dermestidae (Insecta: Coleoptera) sur unos de mammifère Tertiaire (phosphorites du Quercy): implications taphonomiques et paléoenvironnementales. *Geobios*, 37, 376-381.
- Lyman, R. L. (1989). Taphonomy of cervids killed by the May 18, 1980, volcanic eruption of Mount St Helens, Washington, U.S.A. En: R. Bonnichsen, y M. Sorg (Eds.), *Bone Modification* (pp. 149-168). Orono, E.E.U.U.: Center for the Study of the First Americans.
- Lyman, R. L. (1996). Applied Zooarchaeology: The relevance of faunal analysis to wildlife management. *World Archaeology*, 28, 110-125.
- Lindgren, N. K., Bucheli, S. R., Archambeault, A. D., y Bytheway, J. A. (2011). Exclusion of forensically important flies due to burying behavior by the red imported fire ant (*Solenopsis invicta*) in southeast Texas. *Forensic Science International*, 204, e1-e3.
- Maciel, T. T., Castro, M. M., Barbosa, B. C., Fernandes, E. F., Santos-Prezoto, H. H., y Prezoto, F. (2015). Foraging behavior of fire ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera, Formicidae) in *Felis catus* Linnaeus (Carnivora, Felidae) carcass. *Sociobiology*, 62, 610-612.
- Maciel, T. T., Corrêa Barbosa, B., Santos-Prezoto, H. H., y Prezoto, F. (2016). Record and foraging behavior of ants (Hymenoptera, Formicidae) in vertebrate carcasses. *Acta Scientiarum, Biological Sciences Maringá*, 38, 491-494.
- MacFarlane, J. A. (1971). The carnivorous beetles of the Ithundu Caves, Kenya. *Studies in Speleology*, 2, 149-158.
- Mameli, L., y Estévez, J. (1999-2000). Seguimiento tafonómico-arqueológico sobre carcassas de camélidos, ovinos y bovinos en Tierra del Fuego (Argentina). *Xama*, 12-14, 87-106.
- Manfrim, A. M., Cury, A., Demeneghi, P., Jotz, G., y Roithmann, R. (2007). Nasal myiasis: case report and literature review. *International Archives of Otorhinolaryngology*, 11, 74-79.
- Martin, L. D., y West, D. L. (1995). The recognition and use of dermestid (Insecta, Coleoptera) pupation chambers in paleoecology. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 113, 303-310.
- Milner, G. R., y Smith, V. G. (1989). Carnivore alteration of human bone from a late prehistoric site in Illinois. *American Journal of Physical Anthropology*, 79, 43-49.
- Mondini, M. (2018). Carnivore taphonomy in South America: a review of actualistic studies and their implications in the Southern Neotropics. *Historical Biology*, 30, 774-785.

- Montalvo, C. I., Pessino, M. E. M., y González, V. H. (2007). Taphonomic analysis of remains of mammals eaten by pumas (*Puma concolor*, Carnivora, Felidae) in central Argentina. *Journal of Archaeological Science*, 34, 2151–2160.
- Montalvo, C. I., Pessino, M. E. M., y Bagatto, F. C. (2008). Taphonomy of the bones of rodents consumed by Andean hog-nosed skunks (*Conepatus chinga*, Carnivora, Mephitidae) in central Argentina. *Journal of Archaeological Science*, 35, 1481–1488.
- Montalvo, C. I., y Tallade, P. O. (2009). Taphonomy of the accumulations produced by *Caracara plancus* (Falconidae). Analysis of prey remains and pellets. *Journal of Taphonomy*, 7, 235–248.
- Montalvo, C. I., Vezzosi, R. I., y Kin, M. S. (2015). Taphonomic analysis of rodent bones from *Lontra longicaudis* (Mustelidae, Carnivora) scats in fluvial environments. *Mastozoología Neotropical*, 22, 319–333.
- Moretti, T. de Carvalho, y Ribeiro, O. B. (2006). *Cephalotes clypeatus* Fabricius (Hymenoptera: Formicidae): nesting habits and occurrence in animal carcass. *Neotropical Entomology*, 35, 412–415.
- Morton, R. J., y Lord, W. D. (2002). Detection and recovery of abducted and murdered children: behavioral and taphonomic influences. En: W. D. Haglund, y M. H. Sorg (Eds.), *Advances in Forensic Taphonomy: Method, Theory, and Archaeological Perspectives* (pp. 151–171). Boca Raton, E.E.U.U.: CRC Press.
- Morton, R. J., y Lord, W. D. (2006). Taphonomy of child-sized remains: a study of scattering and scavenging in Virginia, USA. *Journal of Forensic Sciences*, 51, 475–479.
- Moura, M. O., Carvalho, C. J. B. de, y Monteiro-Filho, E. L. A. (1997). A preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, State of Paraná. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92, 269–274.
- Murmann, D. C., Brumit, P. C., Schrader, B. A., y Senn, D. R. (2006). A comparison of animal jaws and bite mark patterns. *Journal of Forensic Sciences*, 51, 846–860.
- Nasti, A. (2000). Modification of vicuña carcasses in high-altitude deserts. *Current Anthropology*, 41, 279–283.
- Ortloff, A., Albornoz, S., Romero, M., y Vivallo, G. (2016). Skin artifacts due to post-mortem damage caused by *Notiothauma reedi*: an insect of forensic importance in forest communities of Chile. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 6, 411–415.
- Parker, M. A., Benecke, M., Byrd, J. H., Hawkes, R., y Brown, R. (2010). Entomological alteration of bloodstain evidence. En: J. H. Byrd, y J. L. Castner (Eds.), *Forensic Entomology: the utility of using arthropods in legal investigations*, 2nd ed. (pp. 539–580). Boca Raton, E.E.U.U.: CRC Press.
- Parkinson, A. H. (2012). *Dermestes maculatus* and *Periplaneta americana*: bone modification criteria and establishing their potential as climatic indicators. Faculty of Science, University of the Witwatersrand, Johannesburg.
- Pérez Martínez, A. L., Delgado Sánchez, J. J., Suárez Solá, M. L., González Delgado, F. J. (2014). Lesiones post mortem debidas a la actividad necrofágica de las hormigas. *Revista Española de Medicina Legal*, 40, 43–44.

- Petr, T. (1970). Macroinvertebrates of flooded trees in the man-made Volta Lake (Ghana) with special reference to the burrowing mayfly *Povilla adusta* Navas. *Hydrobiologia*, 36, 373–398.
- Pickering, T. R., Domínguez-Rodrigo, M., Egeland, C. P., y Brain, C. K. (2004). Beyond leopards: tooth marks and the contribution of multiple carnivore taxa to the accumulation of the Swartkrans Member 3 fossil assemblage. *Journal of Human Evolution*, 46, 595-604.
- Pittoni, E. (2009). Necropoli of Pill'e Matta Quartucciu (Cagliari, Sardinia): wild bee and solitary wasp activity and bone diagenetic factors. *International Journal of Osteoarchaeology*, 19, 386–396.
- Pokines, J., y Symes, S. A. (2013). *Manual of Forensic Taphonomy*. Boca Raton, E.E.U.U.: CRC Press.
- Purkait, R., Das, B., Saha, A., Bhattacharya, S., Mondal, M., y Roy, B. (2014). Fatal anaphylaxis following multiple red fire ant strings. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 13, 46-48.
- Putman, R. J. (1977). Dynamics of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*, within carrion. *Journal of Animal Ecology*, 46, 853”866.
- Queiroz, R. A., Soriano, E. P., Carvalho, M. V. D., Caldas-Junior, A. F., Souza, E. H. A., Coelho-Junior, L. G. T. M., Campello, R. I. C., Almeida, A. C., Farias, R. C. A. P., y Vasconcellos, A. (2017). First forensic records of termite activity on non-fossilized human bones in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 77, 127-131.
- Ramón, G., y Donoso, D. A. (2015). The role of ants (Hymenoptera: Formicidae) in forensic entomology. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 36, 19-26.
- Ratcliffe, B. C. (1996). The carrion beetles (Coleoptera: Silphidae) of Nebraska. *Bulletin of the University of Nebraska State Museum*, 13, 43–54.
- Reeves, N. M. (2009). Taphonomic effects of vulture scavenging. *Journal of Forensic Sciences*, 54, 523-528.
- Rivallain, J., y Van Neer, W. (1983). Les fouilles de Koyom (Sud du Tchad). Etude du matériel archéologique et faunique. *L'Anthropologie (Paris)*, 87, 221–239.
- Rivers, D., y Geiman, T. (2017). Insect artifacts are more than just altered bloodstains. *Insects*, 8, 37.
- Roberts, E. M., Rogers, R. R., y Foreman, B. Z. (2003). An experimental approach to identifying and interpreting dermestid (Insecta, Coleoptera) bone modification. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 23, 89A.
- Robinson, W. H. (2005). *Handbook of Urban Insects and Arachnids*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- Rodriguez, W. C. (1997). Decomposition of buried and submerged bodies. En: W. D. Haglund, y M. H. Sorg (Eds.), *Forensic Taphonomy: the postmortem fate of human remains* (pp. 459-464). Boca Raton, E.E.U.U.: CRC Press.
- Rodriguez, W. C. 3rd, y Bass, W. M. (1985). Decomposition of buried bodies and methods that may aid in their location. *Journal of Forensic Sciences*, 30, 836-852.

- Rogers, R. R. (1992). Non-marine borings in dinosaur bones from the Upper Cretaceous Two Medicine Formation, northwestern Montana. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 12, 528–531.
- Rossi, M. L., Shahrom, A. W., Chapman, R. C., y Vanezis, P. (1994). Postmortem injuries by indoor pets. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 15, 105-109.
- Rothschild, M. A., y Schneider, V. (1997). On the temporal onset of post-mortem animal scavenging «motivation» of the animal. *Forensic Science International*, 89, 57-64.
- Sanchis Serra, A., Real Margalef, C., Morales Pérez, J. B., Pérez Ripoll, M., Tormo Cuñat, C., Carrión Marco, Y., Pérez Jordá, G., Ribera Gómez, A., Bolufer Marqués, J., y Villaverde Bonilla, V. (2014). Towards the identification of a new taphonomic agent: An analysis of bone accumulations obtained from modern *Egyptian vulture* (*Neophron percnopterus*) nests. *Quaternary International*, 330, 136-149.
- Saukko, P., y Knight B. (2004). *Knight's Forensic Pathology*, 3rd ed. London, United Kingdom: CRC Press.
- Schroeder, H., Klotzbach, H., Oesterhelweg, L. L., y Püschel, K. (2002). Larder beetles (Coleoptera, Dermestidae) as an accelerating factor for decomposition of a human corpse. *Forensic Science International*, 127, 231–236.
- Scientific Working Group on Bloodstain Pattern Analysis (SWGSTAIN), (10 February 2017) Recommended Terminology; I.A.B.P.A. Newsletter: 2008. Available online: <http://iabpa.org/uploads/files/iabpa%20publications/June%202008%20News.pdf>
- Schmidt, K., W³odzimierz, J., Drzejewski, J., Theuerkauf, M., Kowalczyk, R., Okarma, H., Bogumi³a, E., y Drzejewska, J. (2008). Reproductive behaviour of wild-living wolves in Bia³owietza Primeval Forest (Poland). *Journal of Ethology*, 26, 69–78.
- Scott, D. C., Berner, L., y Hirsch, A. (1959). The nymph of the mayfly genus *Tropidopterus* (Ephemeroptera; Polymitarcidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 52, 205–213.
- Sledzik, P. S. (1998). Forensic taphonomy: postmortem decomposition and decay. En: K. J. Reichs (Ed.), *Forensic osteology. Advances in identification of human remains* (pp. 109-119). Springfield, E.E.U.U.: C. C. Thomas Publisher.
- Sorg, M. H., y Marden, K. (2013). Developing frameworks for regional taphonomy research and practice: a multi-regional symposium. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Academy of Forensic Sciences*, 19, 454-455.
- Spradley, M. K., Hamilton, M. D., y Giordano, A. (2012). Spatial patterning of vulture scavenged human remains. *Forensic Science International*, 219, 57-63.
- Steadman, D. W., y Worne, H. (2007). Canine scavenging of human remains in an indoor setting. *Forensic Science International*, 173, 78-82.
- Stewart, T. D. (1979). *Essentials of forensic anthropology, especially as developed in the United States*. Springfield, E.E.U.U.: C. C. Thomas Publisher.
- Stokes, K. L., Forbes, S. L., y Tibbett, M. (2009). Freezing skeletal muscle tissue does not affect its decomposition in soil: evidence from temporal changes in

- tissue mass, microbial activity and soil chemistry based on excised samples. *Forensic Science International*, 183, 6–13.
- Sutcliffe, A. J. (1973). Similarity of bones and antlers gnawed by deer to human artifacts. *Nature*, 246, 428-430.
- Synstelien, J. A. (2015). *Studies in taphonomy: bone and soft tissue modifications by postmortem scavengers*. University of Tennessee, Knoxville.
- Szleszkowski, L., Kadej, M., Thannhäuser, A., Tarnawski, D., y Jurek, T. (2018). Ecological aspects of unusual findings of animals nesting inside a mummified human corpse in natural conditions. *Forensic Science International*, 289, 390–396.
- Tappen, M. (1994). Bone weathering in a tropical rain forest. *Journal of Archaeological Science*, 21, 667–673.
- Tobien, H. (1965). Insekten-frasspuren an Tertiären und Pleistozänen. Säugertierknochen. *Senckenbergiana Lethaea*, 46, 441–451.
- Tsokos, M., Matschke, J., Gehl, A., Koops, E., y Puschel, K. (1999). Skin and soft tissue artifacts due to postmortem damage caused by rodents. *Forensic Science International*, 104, 47-57.
- Ururahy-Rodrigues, A., Rafael, J. A., Wanderley, R. F., Marques, H., y Pujol-Luz, J. R. (2008). *Coprophanaeus lancifer* (Linnaeus, 1767) (Coleoptera, Scarabaeidae) activity moves a man-size pig carcass: relevant data for forensic taphonomy. *Forensic Science International*, 182, e19–22.
- Vanin, S., y Zancaner, S. (2011). Post-mortual lesions in freshwater environment. *Forensic Science International*, 212, e18-20.
- Vanin, S., y Huchet, J.-B. (2017). Forensic Entomology and Funerary Archaeoentomology. En: E. M. J. Schotsmans, N. Márquez-Grant, y S. L. Forbes (Eds.), *Taphonomy of human remains: forensic analysis of the dead and the depositional environment* (pp. 167-186). Hoboken, E.E.U.U: Wiley-Blackwell.
- VanLaerhoven, S. L., y Anderson, G. S. (1999). Insect succession on buried carrion in two biogeoclimatic zones of British Columbia. *Journal of Forensic Science*, 44, 32-43.
- Ventura, F., Gallo, M., y de Stefano, F. (2010). Postmortem skin damage due to ants: description of 3 cases. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 31, 120”121.
- Wallace, J. R., y Merritt, R. W. (2008). The use of aquatic insect evidence in criminal investigations. En: N. Haskell, y R. Williams (Eds.), *Entomology and Death, 2nd Edition* (pp. 114-130). North Carolina, E.E.U.U.: Joyce Publishing.
- Watson, J. A. L., y Abbey, H. M. (1986). The effects of termites (Isoptera) on bone: some archaeological implications. *Sociobiology*, 11, 245–254.
- Weigelt, J. (1989). *Recent vertebrate carcasses and their paleobiological implications*. Chicago, E.E.U.U.: University of Chicago Press.
- West, D. J., y Hasiotis, S. T. (2007). Trace fossils in an archaeological context: examples from bison skeletons, Lipscomb County, Texas, U.S.A. The trace fossil record of vertebrates. En: W. Miller (Ed.), *Trace Fossils—Concepts, Problems, Prospects, III ed.* (pp. 545–561). Amsterdam, Germany: Elsevier Press.

- Willey, P., y Snyder, L. M. (1989). Canid modification of human remains: implications for time-since-death estimations. *Journal of Forensic Sciences*, 34, 894-901.
- Xing, L., Roberts, E. M., Harris, J. D., Gingras, M. K., Ran, H., Zhang, J., Xu, X., Burns, M. E., y Dong, Z. (2013). Novel insect traces on a dinosaur skeleton from the Lower Jurassic Lufeng Formation of China. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 388, 58–68.
- Yravedra Sainz de los Terreros, J., y Lagos, L. (2012). The wild wolf (*Canis lupus*) as a dispersal agent of animal carcasses in Northwestern Spain. *Journal of Taphonomy*, 10, 227-248.
- Zacher, F. (1927). *Die Vorrats-, speicher- und materialschälinge unde ihre bekämpfung*. Berlin, Germany: Paul-Parey-Berlag.
- Zanetti, N. I., Visciarelli, E. C., y Centeno, N. D. (2014). Taphonomic marks on pig tissue due to cadaveric Coleoptera activity under controlled conditions. *Journal of Forensic Sciences*, 59, 997–1001.
- Zanetti, N. I., Ferrero, A. A., y Centeno, N. D. (2015a). Modification of postmortem wounds by *Dermestes Maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) activity: a preliminary study. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 36, 22-24.
- Zanetti, N. I., Visciarelli, E. C., y Centeno, N. D. (2015b). Marks caused by the scavenging activity of *Necrobia rufipes* (Coleoptera: Cleridae) under laboratory conditions. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 33, 116–120.
- Zanetti, N. I., Ferrero, A. A., y Centeno, N. D. (2019). Depressions of *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) on bones could be pupation chambers. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 40, 122-124.
- Zuha, R. M., Supriyani, M., y Omar, B. (2008). Fly artifact documentation of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae)—A forensically important blowfly species in Malaysia. *Tropical Biomedicine*, 25, 17–22.
- Zúñiga Bizama, D. C. (2016). *Identificación y descripción morfológica de huellas provocadas por cóndor de los andes (*Vultur gryphus*) sobre cabezas de cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*)*. Universidad de Chile, Santiago.

Genética forense

María Cecilia Miozzo

Laboratorio Regional de Genética Forense, Poder Judicial de Jujuy. Independencia 360, (4600) San Salvador de Jujuy. cmiozzo@justiciajujuy.gov.ar

INTRODUCCIÓN

La genética forense es una de las más recientes incorporaciones que han hecho las ciencias forenses. Este área es muy valiosa para la investigación criminal y también para las pruebas de parentesco biológico, o sea que es una herramienta útil tanto para la justicia penal como para la civil. Se abordan en este capítulo dos tipos de análisis que realiza la Genética Forense. Por un lado la «identificación de vestigios biológicos en evidencias forenses», utilizado en la investigación criminal, la cual consiste en analizar la posibilidad de que un vestigio biológico encontrado en una escena de un crimen o tomado de una víctima (por ejemplo manchas de sangre, de semen, hisopados vaginales tomados en un abuso sexual, etc.), haya sido dejado por un implicado en el hecho. Por otro, el «análisis de filiación», utilizado no sólo en la investigación criminal, cuando se intenta probar un abuso sexual a través de un estudio de paternidad, sino también en los tribunales civiles, y consiste en analizar relaciones de parentesco biológico entre individuos.

Este capítulo intenta, por lo tanto, realizar un acercamiento a la genética forense para aquellos profesionales del área del derecho o de las ciencias biológicas que busquen comprenderla, quienes deseen dedicarse a ella deben lograr un profundo conocimiento del arte.

Muchos autores y genetistas forenses coinciden en definir los inicios de la genética forense con la aparición de los primeros marcadores genéticos polimórficos en el año 1985, con las investigaciones de Alec Jeffreys (Jeffreys, Wilson y Thein, 1985). Este *genetista* inglés descubrió que cada individuo humano posee regiones en su genoma (conjunto de genes contenidos en los cromosomas), que lo distinguen de otros, éstas se conocen como regiones polimórficas y son utilizadas hasta la actualidad en pruebas de identificación humana.

BIOLOGÍA Y GENÉTICA

La célula es la unidad básica de un ser vivo, como tal y de acuerdo a su origen, cumple todas las funciones necesarias para sostener la vida. Está formada por una gran

variedad de componentes como proteínas, lípidos, azúcares y ácido ribonucleico (ARN), entre otros. Las características de cada individuo vivo están contenidas en su genoma, en uno de esos componentes, el ácido desoxirribonucleico (ADN). En los seres humanos, al igual que en otros seres vivos, el núcleo celular es donde se encuentra este material genético, que además es igual en todas sus células (figura 1).

El ADN está compuesto de nucleótidos, que contienen entre otros elementos una secuencia de cuatro bases nitrogenadas (Adenina, Timina, Citosina y Guanina). Es la diversidad en la combinación de estas cuatro bases lo que conforma la variabilidad biológica de los seres vivos. En el ser humano el ADN está compuesto por dos cadenas de polinucleótidos, que se encuentran apareadas o unidas a través de sus bases (figura 1), en algunas circunstancias el ADN puede estar desnaturizado (estado en el que se pierde la estructura nativa) y estas cadenas se encuentran separadas. Es en el núcleo celular donde éstas se organizan en cromosomas.

La especie humana es diploide, lo que significa que la información genética contenida en el ADN está duplicada. De esta manera el genoma humano está compuesto por 23 pares de cromosomas homólogos, los cromosomas de cada par provienen uno de cada progenitor. De los 23 pares, 22 son los llamados autosómicos y uno es el par de cromosomas sexuales, las mujeres poseen 2 cromosomas llamados «X» y los varones en cambio poseen un cromosoma «X» y uno llamado cromosoma «Y» (figura 2).

MARCADORES POLIMÓRFICOS

El ADN posee regiones que son esenciales para la vida, porque codifican genes que caracterizan la especie humana y son iguales entre todos los individuos. Sin embargo hay regiones diferentes de un individuo a otro, estas se conocen como regiones polimórficas. Estas zonas, que en general no codifican genes, son las que utiliza la genética forense para identificar o diferenciar individuos entre sí, sólo los gemelos homocigóticos son prácticamente indistinguibles por su ADN.

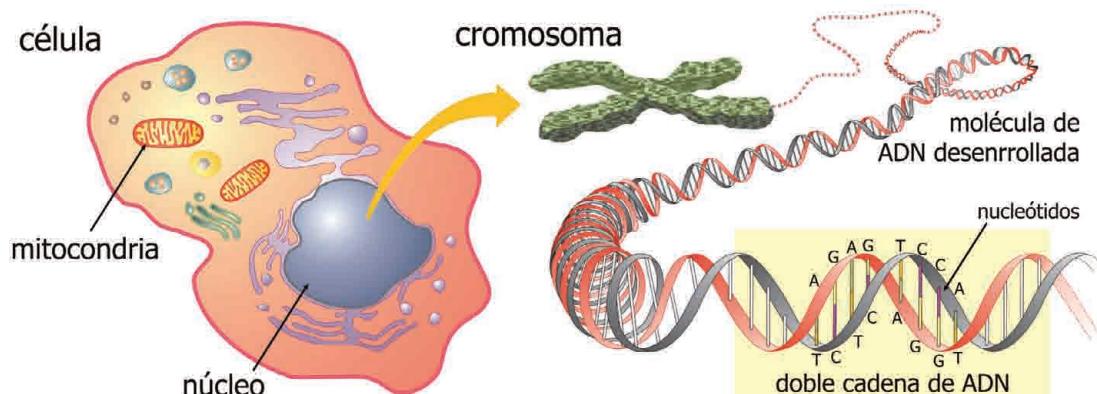


Figura 1. Esquema de las cadenas de ADN nuclear y su localización celular. A: Adenina, T: Timina, C: Citosina y G: Guanina.

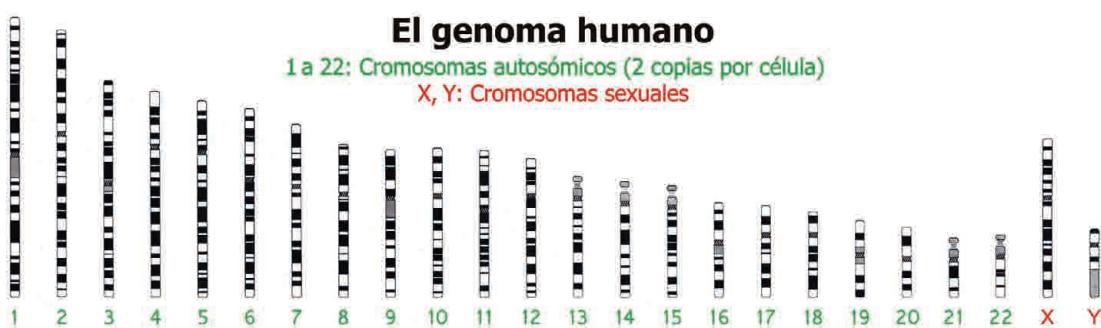


Figura 2. Idiograma de los cromosomas humanos.

La mayoría de los análisis para identificación genética utilizan regiones polimórficas de cromosomas autosómicos, sin embargo el ADN presente en las mitocondrias (organela celular que también contiene ADN, figura 1) y el de los cromosomas sexuales X e Y, también se utilizan en la genética forense (figura 2).

Las posiciones donde se encuentran los genes, que codifican proteínas (regiones codificantes) y las regiones de los polimorfismos (no codificantes) se llaman loci (palabra del latín cuyo singular es locus). Cada cromosoma de un par (uno «homólogo» del otro) heredado de la madre o del padre, de acuerdo a la herencia mendeliana, posee sus loci en la misma posición que el otro (Butler, 2010, 2015). Las diferentes «variantes» o características posibles para un locus se denominan alelos. Si los dos cromosomas homólogos poseen la misma variante alélica en un locus, se dice que es homocigoto, si por el contrario la variante es diferente (se heredó distinto alelo de cada progenitor), el locus es heterocigoto. La existencia de diferentes alelos para un mismo locus es lo que llamamos polimorfismo y es en lo que se basan los estudios de identificación por ADN. O sea un individuo tendrá, en un conjunto de loci determinado, ciertos alelos (esto se denomina «perfil genético»), este conjunto lo distinguirá del resto ya que es característico de cada individuo.

Hay diferentes tipos de polimorfismos del ADN, o marcadores genéticos, el definirlos a todos se escapa al objetivo de este capítulo, por lo cual se describe el más utilizado actualmente en los laboratorios forenses. Se trata de los microsatélites conocidos hoy como STRs, siglas del inglés «Short Tandem Repeats», que significa repeticiones cortas en tandem. Estos loci contienen repeticiones de nucleótidos (entre 3 y 5), flanqueadas por regiones constantes que permiten su detección. La variabilidad del locus viene dada por el número de repeticiones y de este número deriva el nombre de cada alelo (figura 3).

METODOLOGÍA

En esta sección se exponen los métodos más utilizados en la actualidad en las peripecias genéticas. Para una mejor comprensión se sugiere observar la figura 4, donde se sintetizan las etapas del análisis genético forense o de ADN.

Polimorfismo en la longitud en los fragmentos de ADN

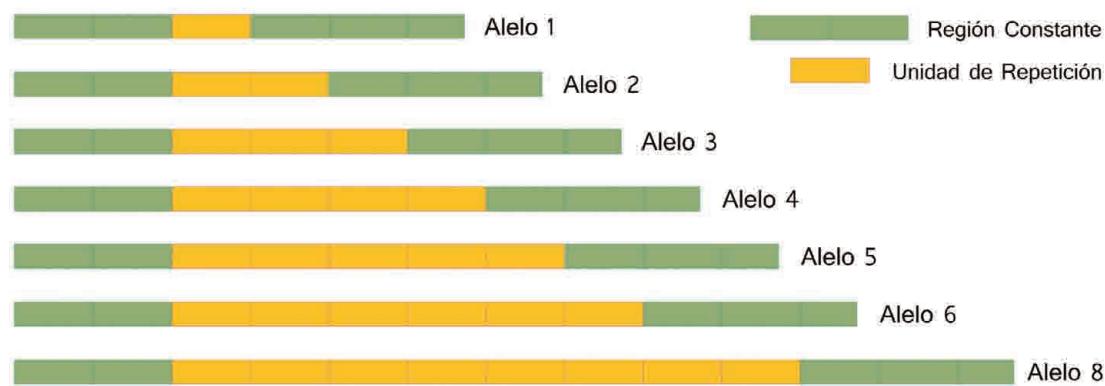


Figura 3. Esquema del polimorfismo de STRs.

Recolección de muestras, conservación y almacenamiento

La correcta recolección de muestras, la generación de documentos que aseguren su trazabilidad (cadena de custodia) y la correcta preservación de las mismas es fundamental para el éxito del análisis y su utilización posterior como elemento de prueba en un juicio.

Se puede hacer una diferenciación entre los tipos de muestras para el análisis de ADN: las dubitadas o evidencias forenses y las indubitadas o de referencia.

Las dubitadas suelen ser muestras recogidas de escenas de un crimen, en búsqueda de vestigios biológicos dejados durante la ejecución de un delito o pueden ser muestras tomadas a víctimas de algún crimen, para encontrar vestigios biológicos dejados por el agresor. O sea que se desconoce el individuo que habría contribuido a estas muestras o evidencias.

Las muestras indubitadas o de referencia, son aquellas que se toman de un individuo conocido, ya sea para el cotejo de su perfil genético con el de otros sujetos, para el establecimiento de vínculos biológicos o para su cotejo con perfiles genéticos de muestras dubitadas (vestigios biológicos de evidencias forenses).

Hay numerosos documentos, nacionales e internacionales para la recolección y correcta conservación de muestras para análisis de ADN, tales como Butler (2010, 2012), documentos de los Ministerios Públicos de la República Argentina y del Ministerio de Justicia y Derechos Humanos de la Nación («Protocolo unificado de los Ministerios», 2017), recomendaciones del Grupo de Habla Española y Portuguesa de la International Society for Forensic Genetics (Aler Gay *et al.*, [GHEP-ISFG] 2000), documento del National Institute of Standards and Technology (Ballou *et al.*, [NIST], 2013), entre otros. A continuación se expone un resumen de lo que se considera principal sobre cada tipo de muestra.



Figura 4. Etapas del análisis de ADN.

Recolección y conservación de evidencias forenses.— Al estar el ADN presente en todas las células nucleadas, puede ser encontrado en la escena del crimen y ser asociado a un individuo o excluirlo de la misma. Algunos ejemplos son:

- El agresor deposita ADN en el cuerpo o en la ropa de la víctima.
- El agresor deposita ADN en un objeto de la escena del crimen.
- El agresor deposita ADN en el lugar de la escena del crimen.
- La víctima deposita ADN en el cuerpo o en la ropa del agresor.
- La víctima deposita ADN en un objeto de la escena del crimen.
- La víctima deposita ADN en el lugar de la escena del crimen.

La recolección de muestras biológicas (evidencias) en una escena debe realizarse de manera adecuada y con el documento de cadena de custodia correspondiente para su posterior validez legal en el juicio. Para ello se debe considerar no contaminar la escena, evitando que el personal que recolecta pruebas transfiera sus propias células a los elementos recogidos (tocándolos, tosiendo o estornudando sobre ellos), para lo cual debe ir equipado con los elementos adecuados, tales como guantes, barbijo,

cofia, bata, etc. Los elementos de prueba deben ser envasados individualmente, considerando en su recolección si se trata de evidencias secas o húmedas y si se encuentran en objetos transportables o no (Ballou *et al.*, [NIST] 2013; «Protocolo unificado de los Ministerios», 2017). Los principales elementos a recoger son manchas de sangre, semen o saliva, pelos, colillas de cigarrillo, etc. Estos deben estar secos o dejarlos secar previo a colocarlos en envases de papel. Si la mancha a recolectar está en un elemento no transportable (como un mueble, piso o pared) se lo puede recoger con la técnica del doble hisopado, pasando primero uno húmedo y a continuación uno seco.

Recolección y conservación de muestras de referencia.— Es ventajoso obtener las muestras de referencia de manera rápida, sin dolor y con el menor riesgo, por lo cual son numerosos los laboratorios que prefieren tomar células bucales en lugar de extraer sangre. Para la toma de estas células existen desde simples hisopos de algodón, hasta diversos colectores diseñados para facilitar la toma y conservación de la muestra. En todos los casos la muestra debe secarse previo a su almacenamiento. La elección de células bucales tiene como ventaja evitar complicaciones, a nivel sanguíneo, con individuos quiméricos (originados por dos cigotos o con dos ADN diferentes), aunque los mismos son muy escasos. Si se recolecta sangre líquida lo recomendado es colocar unas pocas gotas sobre un trozo de papel de filtro y dejarlas secar. Este último método tiene como ventaja que puede observarse la muestra tomada ya que la misma es coloreada. Al igual que en la recolección de evidencias forenses, quienes toman las muestras deben utilizar los elementos apropiados para evitar la contaminación de las muestras.

También son consideradas muestras de referencias las muestras cadavéricas, las cuales son necesarias en aquellas ocasiones en que no fueron tomadas células bucales o sangre al momento de la muerte. Ejemplo de estos casos es cuando se encuentra un cadáver días posteriores al fallecimiento o cuando debe exhumarse un cuerpo para un análisis de identificación o paternidad, en estos casos el cuerpo suele presentarse en estado de putrefacción. De un cadáver pueden tomarse muestras de tejido blando, huesos, o piezas dentales dependiendo del estado del cuerpo (Aler Gay *et al.*, [GHEP-ISFG] 2000).

Almacenamiento de muestras.— Para ambos tipos de muestras la mejor manera de conservarlas es secas, en lugares frescos, ya que así se previene la hidrólisis básica de la molécula de ADN y se evita la degradación por microorganismos y por enzimas como las DNAsas. Si se las va a conservar secas y a temperatura ambiente es importante hacerlo en envases no herméticos, como por ejemplo sobres de papel.

Si se trata de muestras húmedas o cadavéricas frescas, las mismas deben conservarse en frío, a temperaturas de -20 °C o menores. Alternativamente, si se trata de huesos o piezas dentales las mismas pueden limpiarse adecuadamente y conservarse a temperatura ambiente.

Extracción y purificación de ADN

Las muestras biológicas, tanto las de referencias como las evidencias forenses, contienen el ADN dentro de células, podría decirse que está «rodeado» de varios elementos (proteínas, lípidos o grasas, sales, etc.), algunos de los cuales dificultan el estudio genético. Las evidencias forenses (trozo de tela, hisopados de una pared o piso, etc.), pueden contener además otras sustancias que inhiban los análisis. Por lo cual para el estudio es necesario extraer el ADN y purificarlo, es decir separarlo de la mayor cantidad posible de elementos y/o sustancias.

Los métodos para lograr este objetivo incluyen en general un primer paso que libera el ADN de la célula (lisis celular) seguido de diversos pasos de purificación los cuales suelen incluir extracción orgánica, purificación desde diversos tipos de papel o purificación en fase sólida con la utilización de partículas de sílice que retienen diferencialmente el ADN (ejemplos de este último método son los numerosos *kits* que diversas compañías ofrecen en el mercado). Para profundizar sobre este tema se recomienda la lectura del capítulo 2 de Butler (2012).

Una metodología de purificación muy utilizada es la denominada «Extracción Diferencial», empleada principalmente en delitos de abuso sexual para separar células espermáticas (habitualmente semen del agresor), de células epiteliales (habitualmente de la víctima, como células de la vagina, anales, flujo vaginal, etc.). Un resumen del método está esquematizado en la figura 5, se basa en la característica de que la membrana nuclear de los espermatozoides posee puentes disulfuro que solo pueden romperse y liberar el ADN al utilizar el reactivo ditiotreitol (DTT).

Existe una metodología de análisis donde se evita la extracción y purificación del ADN, es la que realiza una «PCR directa» (PCR: reacción en cadena de la polimerasa). Sin embargo presenta una desventaja y es que solo funciona con muestras con una cantidad considerable de ADN, por lo cual se aplica principalmente con muestras de referencia. Existen en el mercado *kits* ofrecidos por diversas compañías para estos análisis.

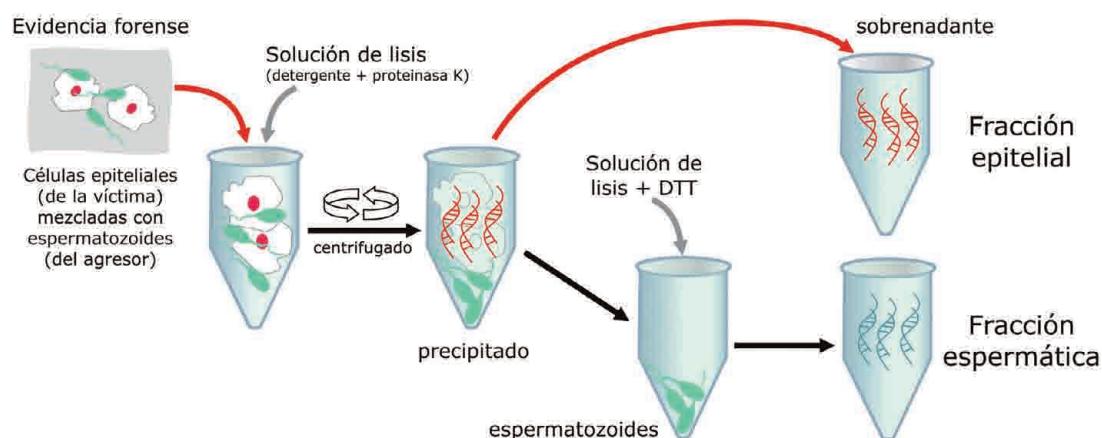


Figura 5. Esquema de la metodología de extracción de ADN diferencial para separar células epiteliales de espermatozoides.

El paso de extracción del ADN es una de las etapas de mayor riesgo de contaminación de una muestra, razón por la cual las evidencias forenses deben ser procesadas separadas físicamente de las muestras de referencia, y el analista debe vestir los elementos de protección ya mencionados.

Cuantificación del ADN

Una vez extraído y purificado, al ADN es importante cuantificarlo, principalmente para verificar en las evidencias forenses la cantidad de ADN humano obtenido. El propósito es evaluar, por un lado, si es posible avanzar con el análisis, y por el otro calcular la cantidad de ADN a utilizar en la reacción de amplificación o PCR. Hay un estrecho margen de ADN que puede ser utilizado en la PCR (aproximadamente entre 0,5 y 2 ng). Con poca cantidad no se obtendrá perfil genético (conjunto de alelos en los STRs de un individuo), o el mismo resultará incompleto. Con un exceso de ADN se obtendrá un electroferograma (gráfico de picos a partir del cual se define el perfil genético) con picos fuera de escala que pueden provocar la aparición de falsos picos.

Aunque hay una amplia variedad de métodos para cuantificar ADN, que incluyen absorbancia con luz UV (Ultra Violeta), siembra en geles de agarosa y posterior tinción con colorantes específicos, *slot blot* (transferencia del ADN a una membrana y posterior tinción con sondas específicas radiactivas o fluorescentes), etc., estos métodos son laboriosos y no tienen la sensibilidad que exigen los *kits* de amplificación de STRs utilizados actualmente. Fueron desarrollados también métodos que utilizan la PCR tradicional (o tiempo final), que es mejor que los mencionados previamente porque mide la «funcionalidad» de la reacción de PCR.

La metodología más utilizada actualmente es la llamada PCR en tiempo real (también conocida como PCR cuantitativa o qPCR), que además de medir la funcionalidad del ADN purificado es más sensible que los otros métodos. Existen una gran variedad de *kits*, ofrecidos por distintas compañías, que pueden utilizarse. Ellos son capaces de establecer si en la muestra hay inhibidores, pueden cuantificar ADN total y masculino, y los más novedosos pueden determinar el grado de degradación del ADN molde. En resumen esta técnica puede arrojar resultados sobre la cantidad y la calidad del ADN.

Obtención de perfiles genéticos: amplificación por PCR de los STRs

Una vez que ha sido cuantificado el ADN obtenido, el mismo se debe «tipificar» (obtener el o los perfiles genéticos presentes), esto comienza amplificando por PCR diversos STRs.

La genética forense, como toda la biología molecular, se ha beneficiado del descubrimiento de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que tiene la capacidad de hacer millones de copias del ADN de interés. Algunas muestras

forenses no podrían ser analizadas si no fuese por esta técnica. En la figura 6 hay un esquema de esta reacción, sintéticamente una PCR tiene tres pasos que se repiten decenas de veces, un primer paso de alta temperatura llamado «desnaturalización», donde se separan las dos cadenas que conforman la molécula de ADN, un segundo paso donde se baja la temperatura de modo de lograr que los cebadores (o *primers*) se unan a las cadenas separadas del ADN en la región específica que flanquea al STR, esta etapa se conoce en inglés como «annealing», y se podría traducir como «alineamiento y unión». El último paso es la «extensión», en el que la temperatura se aumenta a un valor ideal para que la enzima taq polimerasa (polimerasa capaz de funcionar a altas temperaturas) sintetice el ADN de la región de interés (el STR). Luego el ciclo vuelve a comenzar incrementando la temperatura para separar las cadenas de ADN y así sucesivamente.

Otro avance de la biología molecular es la PCR múltiple (en inglés *multiplex*), que permite la amplificación simultánea de un gran número de STRs en un solo paso o PCR (ver figura 7a). Existen actualmente un sinnúmero de *kits* para la amplificación simultánea de los loci de STRs (también llamados marcadores genéticos). Los *kits* están en su mayoría validados por las compañías que los comercializan (validación de desarrollo), sin embargo cada laboratorio debe realizar la validación del *kit* que decide utilizar para determinar perfiles genéticos (validación interna). El número de marcadores que se amplifican en estos *kits* pocas veces está debajo de 9, los más utilizados amplifican 15 loci, actualmente hay algunos con los que se obtienen más de 20 marcadores, casi todos ellos amplifican, además de marcadores autosómicos, un marcador de cromosomas sexuales llamado Amelogenina (útil para la determinación del sexo).

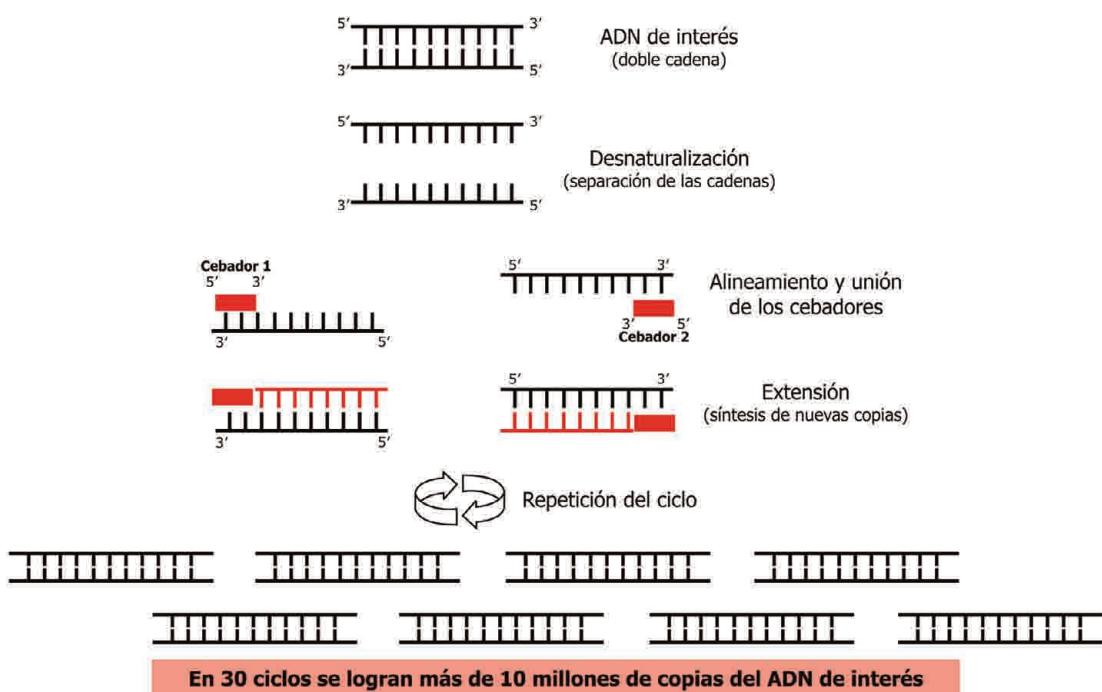


Figura 6. Esquema del proceso de amplificación de una zona de interés del ADN por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En cada ciclo el ADN se duplica.

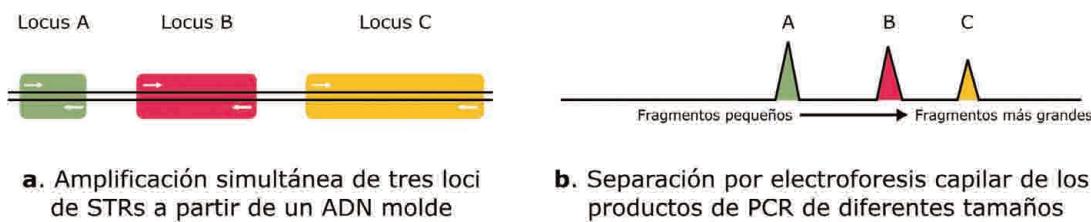


Figura 7. Esquema de una PCR múltiple. (a) amplificación simultánea de tres STRs que se distinguen por sus tamaños y porque cada par de cebadores (representados por flechas) está marcado con diferente fluoróforo. (b) separación por tamaño de los tres STRs amplificados.

La amplificación de un gran número de marcadores genéticos (loci de STRs) simultáneamente, resulta en la obtención de muchos alelos de diferentes marcadores mezclados. La manera en que se resolvió esta situación fue diseñando diferentes tamaños para los productos amplificados de cada locus, sumado a que los cebadores fueron «marcados» con diferentes fluoróforos (o «colores», como se los llama de manera simplificada); para que luego la tecnología de la electroforesis capilar resolviera el resto, separando los alelos de cada locus o marcador genético, por tamaño y por color (ver figura 7b).

Detección de STRs por electroforesis capilar

Este es el paso en que finalmente se revelará el perfil genético que distingue un individuo de otro, objetivo principal de la Genética Forense. Como se mencionó previamente, la amplificación de STRs utilizando los *kits* multiplex, deriva en la obtención de fragmentos de PCR (llamados a menudo amplicones) que no son otra cosa que alelos de cada locus de STR del *kit*, amplificados por PCR. Lo más utilizado en la actualidad para la detección de estos alelos es la electroforesis capilar (EC), que se realiza en un instrumento llamado «Analizador Genético». La técnica debe su nombre a que la separación de los fragmentos de STR ocurre en un tubo capilar, que contiene una solución viscosa de polímero, que actúa como una malla porosa, y que se somete a un campo eléctrico provocando la separación de los amplicones o alelos de acuerdo a su tamaño. El ADN, al pH que se realiza la electroforesis, está cargado negativamente de modo uniforme (o sea con una misma relación de carga/masa), de modo que todos los fragmentos son de alguna manera empujados por la misma fuerza desde el cátodo al ánodo, sin embargo los más pequeños atraviesan el capilar más rápido debido a la naturaleza del polímero dentro del capilar. Así ocurre la separación de los distintos loci que se están analizando y la de los alelos de cada locus. Un esquema de una EC puede observarse en la figura 8. Al final del capilar se realiza la detección, que consiste en la excitación, por medio de un láser, de los diferentes fluoróforos utilizados por el *kit* y la captación de las distintas emisiones de los fluorescentes por medio de un detector. A partir de una calibración espectral un software procesa los datos y permite la obtención de los picos de los amplicones (alelos).

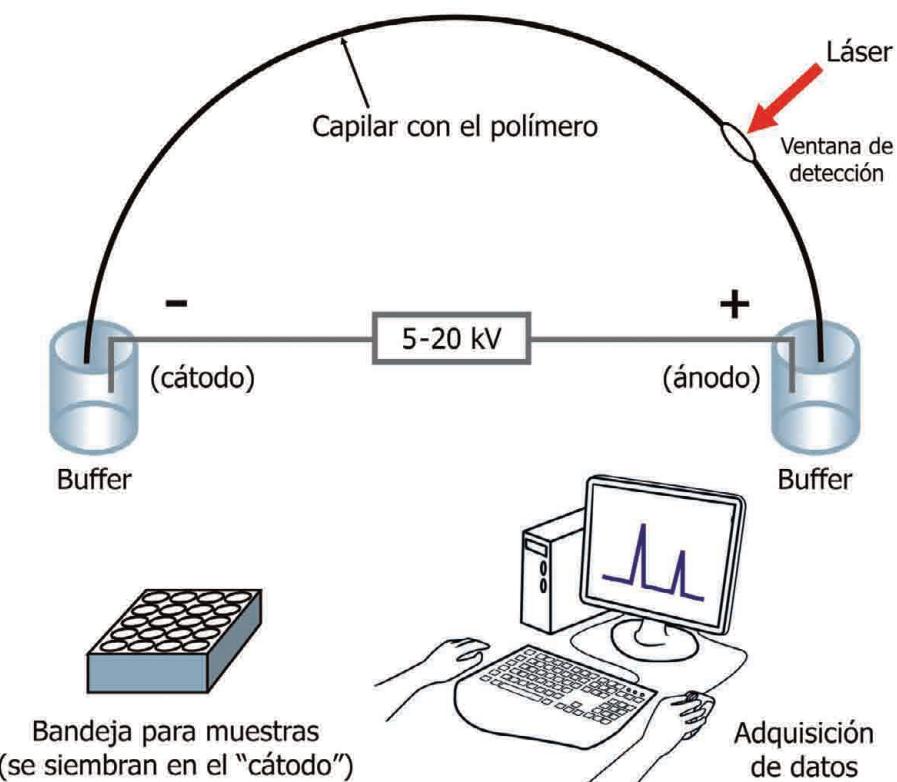


Figura 8. Esquema de la electroforesis capilar, incluyendo la bandeja de siembra y la computadora que recibe y procesa los datos.

Para la obtención de los llamados electroferogramas es necesario en la electroforesis capilar, poner a correr junto a la muestra un estándar de tamaño, que permitirá asignar el mismo a cada pico. En la misma corrida se debe someter a la electroforesis una escalera alélica (*Allelic Ladder*) que contiene los alelos de todos los marcadores genéticos del *kit* con que se realizó la amplificación. Por comparación de los tamaños de los picos de la muestra con los de la escalera, el software asigna los alelos, y se obtiene el perfil genético.

En la figura 9 se observa un electroferograma obtenido a partir de una muestra de referencia de un individuo masculino, o sea es el perfil genético de este individuo. En el electroferograma se observan 15 marcadores de cromosomas autosómicos y el marcador sexual Amelogenina, señalado en rojo, con los picos en las posiciones X e Y, como se espera por tratarse del perfil de un individuo masculino. Se observan 4 marcadores genéticos autosómicos en el color «azul»: D8S1179, D21S11, D7S820 y CSF1PO; cinco en el «verde»: D3S1358, TH01, D13S317, D16S539 y D2S1338; cuatro en el llamado «negro»: D19S433, vWA, TPOX y D18S51; y dos en el color rojo: D5S818 y FGA, colorante que fue utilizado también para el marcador sexual Amelogenina. Aquellos marcadores que se observan con dos «picos» son los llamados heterocigotos, mientras que los que poseen solo uno son loci homocigotos. El conjunto de todos estos marcadores conforman un perfil genético de STRs autosómicos.

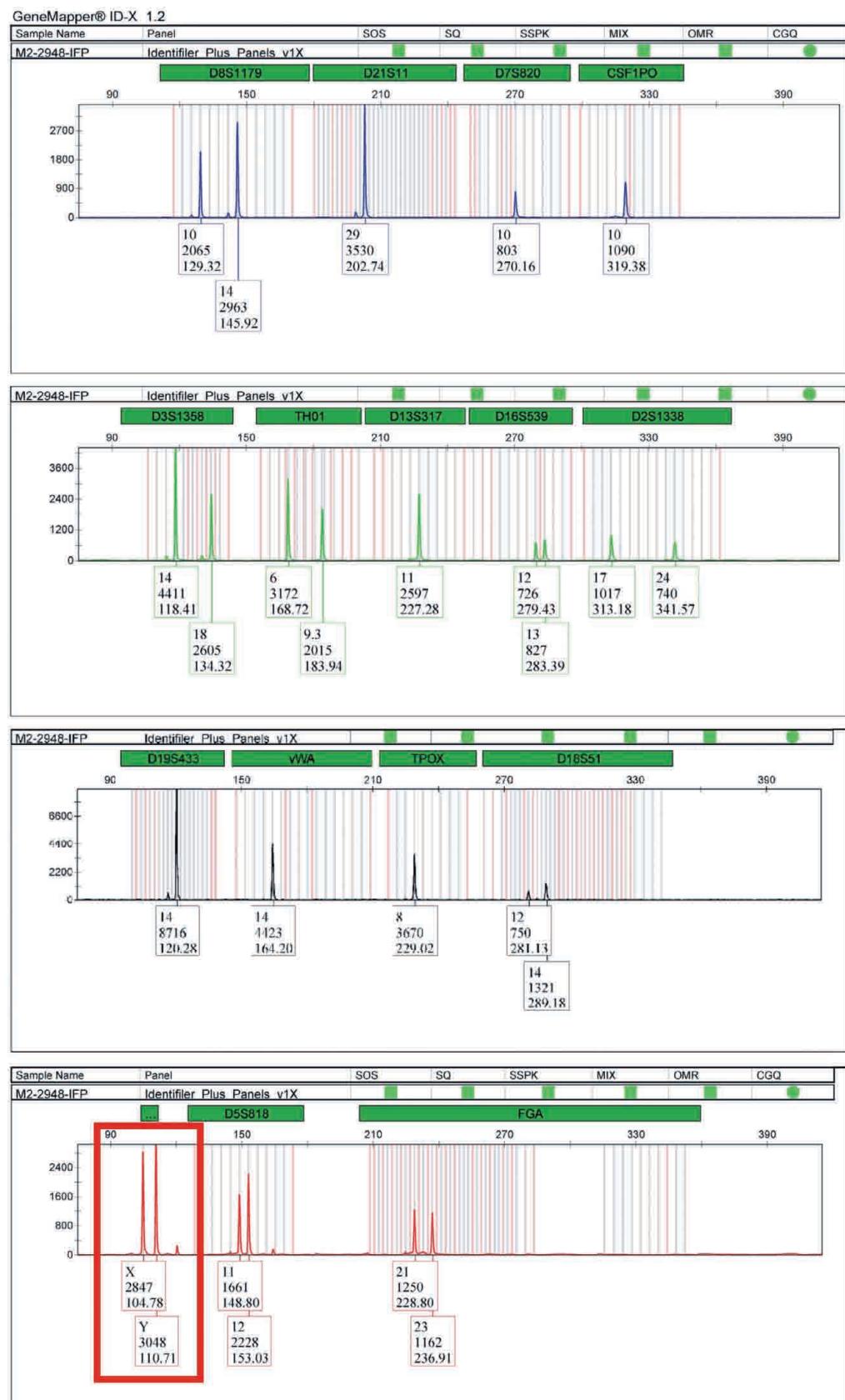


Figura 9. Electroferograma obtenido a partir de una muestra biológica de un individuo masculino. Se observan 15 loci o marcadores autosómicos y el marcador de sexo Amelogenina (en el cuadro rojo).

Calidad de los resultados

Como en cualquier prueba científica que puede culminar en el esclarecimiento de un crimen, en que un individuo pierda la libertad, o en establecer una paternidad, la calidad del resultado no es un tema menor, sobre todo teniendo en cuenta que es un proceso de muchos pasos técnicos. A continuación se mencionan algunas consideraciones para lograr resultados de calidad y evitar contaminaciones, una de las principales preocupaciones de los laboratorios forenses:

- El personal debe ser calificado y estar entrenado específicamente para este tipo de análisis. Debe utilizar además los elementos adecuados para prevenir contaminaciones con su propio material biológico (bata, barbijo, cofia, guantes, etc.).
- Los ensayos que se realizan deben estar validados con el instrumental y el personal propio del laboratorio (validación interna).
 - Se debe contar con procedimientos de ensayo escritos y guías de interpretación, basados en recomendaciones de organizaciones internacionales de reconocido prestigio científico en el área, tales como la ISFG (isfg.org), el SWGDAM (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, swgdam.org), o la ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes, enfsi.eu).
- Se debe participar en ejercicios de intercomparación o controles de calidad inter laboratorio, específicos de genética forense, nacionales y/o internacionales, y que abarquen todos los ensayos que realice la entidad.
- Los laboratorios deben poseer la infraestructura y el equipamiento necesario. Debido a que la metodología utilizada involucra un paso de gran amplificación del material de estudio (ADN humano), e implica la comparación de muestras de referencia con evidencias forenses, los laboratorios necesitan áreas separadas físicamente sin intercambio de material y equipos (área de procesamiento de muestras de referencia separada del área de procesamiento de evidencias, y luego área de pre-PCR, de PCR y de pos-PCR).
- Se debe contar con los perfiles genéticos del personal del laboratorio y de todo aquel que haya participado en la toma de muestras o manipulado las evidencias forenses, para poder descartar contaminaciones involuntarias por parte de este personal.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Como se mencionaba anteriormente, luego de la electroforesis capilar obtenemos los electroferogramas, sin embargo allí no finaliza el análisis de ADN, es necesaria la revisión de los expertos para establecer los perfiles genéticos y a continuación estos deben ser cotejados para arribar a las conclusiones del estudio. Esta última etapa del proceso será abordada desde los dos tipos de análisis ya planteados, ya que cada uno responde diferentes preguntas.

Identificación genética de vestigios biológicos en evidencias forenses

La identificación genética de un vestigio biológico recolectado en el marco de un delito se basa en la comparación del perfil obtenido de esa evidencia con uno o más perfiles de referencia (que pueden ser en estos casos un imputado, una víctima, etc.). Para poder decir que un individuo de referencia aportó material biológico a una evidencia debe existir una coincidencia de alelos en todos los loci que se estudiaron. La dificultad suele estar en la obtención del perfil genético de STR en estas evidencias forenses y su interpretación. Hay importantes publicaciones sobre el tema (Clayton, Whitaker, Sparkes, Gill, 1998; Gill *et al.*, 2006, 2012; SWGDAM, 2010), y se recomienda su lectura a los expertos en genética forense, sin embargo, en este capítulo intentaremos dar cuenta de este proceso a grandes rasgos.

Definición de perfiles de STR.— El paso que sigue a la electroforesis capilar, explicada anteriormente, es la genotipificación o definición del perfil genético, que si bien suele realizarse con un software específico (en la mayoría de los casos se usa Gene Mapper), la interpretación o revisión de los perfiles por parte de expertos es indispensable.

La definición de un perfil consiste en distinguir aquellos picos que son alelos de aquellos que no lo son (como por ejemplo picos que son el ruido de base del instrumento analítico, o picos llamados «artefactos»: productos de errores en la PCR, en la electroforesis, etc.).

Como en cualquier técnica analítica existen umbrales que deben establecerse para su aplicación en el análisis y la asignación alélica (ver figura 10). Los mismos se definen mediante una validación interna y son los que a continuación se mencionan:

- **Umbral analítico:** es el que permite distinguir picos reales o alelos del ruido, una vez introducido este valor, el software de análisis solo asignará como picos (posibles alelos) aquellos por encima de este valor.
- **Umbral estocástico:** es el valor por encima del cual es razonable admitir que no ha existido pérdida alélica en heterocigosis y por tanto se asume que la presencia de un solo alelo en un marcador genético debe considerarse como un genotipo homocigoto para ese locus, en un perfil de fuente única.
- **Umbral *stutter*:** es el valor porcentual, respecto del alelo principal, de un pico en posición *stutter* (artefacto de la PCR que genera un pico en una posición por delante o por detrás de un alelo real) por encima del cual es razonable categorizar al mismo como alelo. En caso contrario, un valor de pico en posición *stutter* por debajo del umbral, no será asignado por el programa de análisis de perfiles genéticos.
- **Umbral de desbalance de heterocigotos:** es el valor porcentual de relación, de área o altura, entre el pico menor y el mayor en un marcador heterocigoto, en una muestra de fuente única, por debajo del cual se considera que hay desbalance entre los alelos.

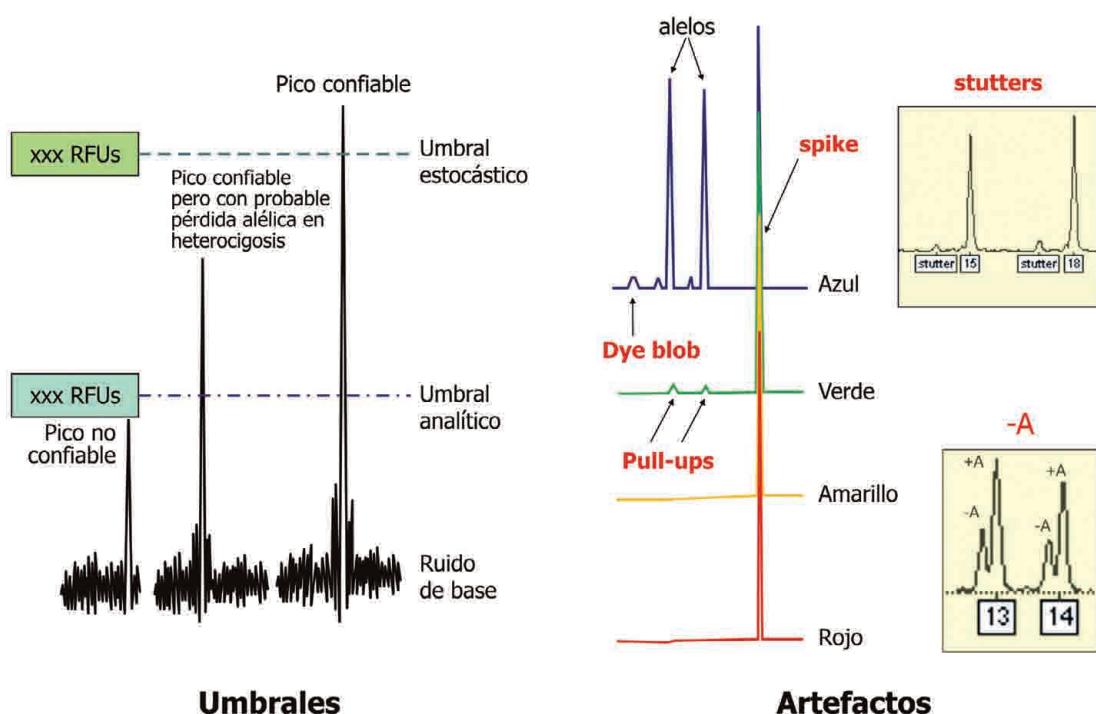


Figura 10. Representación en la electroforesis capilar del umbral analítico y del estocástico (RFU: Unidades Relativas de Fluorescencia), y de algunos de los artefactos más comunes del análisis.

Una vez definidos y aplicados los umbrales al análisis, hay que descartar los artefactos. Entre estos podemos mencionar los que están relacionados con la utilización de una cantidad inadecuada de ADN en la PCR y los relacionados con problemas en la electroforesis capilar, los principales son:

- Los «pull-ups», que se podría traducir como «levantamiento», son artefactos que se producen en la EC, generalmente, cuando hay demasiado ADN en la PCR. Un pico real en un color resulta demasiado alto y esto provoca la aparición de un falso pico en otros colores.
- Aumento de *stutters*, esto puede ocurrir cuando hay poco o demasiado ADN en la PCR, y el resultado es que la proporción de los picos *stutter* aumenta y el umbral *stutter* que se utiliza deja de funcionar adecuadamente en la EC y se asigna como alelo un pico que no lo es.
- Adición incompleta de Adeninas en los amplicones (efecto llamado -A), este artefacto aparece cuando hay un exceso de ADN en la PCR, tanto que la taq polimerasa no llega a colocar la Adenina que suele poner al final en cada amplicón que fue generado, provocando la aparición de picos con un nucleótido menos y en el electroferograma se observa al alelo como un pico desdoblado.
- Los «Dye Blobs», que podrían traducirse como «manchas de colorante», son debidos generalmente a la existencia de colorante fluorescente libre. Estos migran en la electroforesis capilar separados de los cebadores o «primers» y de los amplicones, y generan picos que suelen tener formas anómalas.

- Los «Spikes» son falsos picos, que aparecen aleatoriamente en la electroforesis, son muy finos, están en casi todos los colores en la misma posición y desaparecen en una segunda corrida electroforética.

Un esquema de estos artefactos puede observarse en la figura 10, y la mayoría de ellos pueden evitarse si el examen es realizado por un analista experto.

Mezclas de perfiles genéticos.— La mezcla de dos o más perfiles genéticos en una muestra (o sea que hay en ella más de un individuo), es un hallazgo común en genética forense. Por ende la interpretación del resultado de una muestra, una vez especificados los alelos, debe incluir la definición acerca de si se trata de una muestra con ADN de uno o varios individuos.

En las recomendaciones internacionales (Clayton *et al.*, 1998; Gill *et al.*, 2006, 2012), están los pasos para evaluar muestras con mezclas, algunos de ellos son descriptos a continuación.

- El primer paso consiste en evaluar si en la muestra hay una mezcla de perfiles: si se observan algunos loci con más de dos alelos, sumado a desbalance alélico y/o aumento de la altura de picos en posición *stutters* (que podrían ser alelos), entonces se trata de un perfil mezcla. En este punto es necesario mencionar que si en un único locus se observan tres alelos puede tratarse de una anomalía ampliamente descripta, donde lo que ocurre es la duplicación en el cromosoma de la región del locus en estudio, y esto no debe ser confundido con la existencia de una mezcla de perfiles genéticos.

- El siguiente paso en la interpretación de mezclas es la identificación del número potencial de contribuyentes a la mezcla. Si un individuo posee por marcador dos alelos como máximo, se concluye que si hay tres o hasta cuatro alelos en varios marcadores, entonces en la mezcla hay al menos dos contribuyentes. Si en cambio hay marcadores con cinco o más alelos, hay tres o más contribuyentes. Debe considerarse el caso especial en que la mezcla sea de individuos emparentados, en esta circunstancia podría darse que haya una mezcla de una pareja y un hijo de ellos (3 individuos), sin embargo no se observará en este caso ningún locus con más de 4 alelos, debido a que el hijo comparte todos sus alelos con uno o el otro progenitor.

- Por último el análisis de una mezcla incluye también la estimación de la proporción relativa de los contribuyentes y la deducción de los posibles genotipos de los mismos.

Mezclas complejas y perfiles de baja cantidad de ADN.— Si el ADN purificado de una muestra está muy degradado, es escaso o no pudo separarse de inhibidores de la PCR, se obtienen perfiles parciales de STRs. Se logran alelos en los loci de STRs más pequeños y no en los más grandes y esta circunstancia baja la significancia o certeza de una coincidencia. Sin embargo existen alternativas para mejorar o completar los perfiles, como la utilización de los llamados mini STRs, que son STRs de los mismos loci pero con productos de PCR de menor tamaño.

Cuando se combinan dos escenarios como los mencionados previamente (la presencia de una mezcla y baja cantidad de ADN en la muestra), entonces la definición del perfil se convierte en un desafío. Es necesario, para estas circunstancias, que el laboratorio forense desarrolle su propia guía de interpretación de perfiles de STR, basada principalmente en sus estudios de validación, en información publicada sobre los *kits*, en el equipamiento que utiliza y en su propia experiencia práctica para la obtención de resultados en su casuística. Debe ser capaz además de reconocer, en base a los puntos anteriores, si la muestra puede ser resuelta o no; o si para resolverla se debe recurrir a una nueva purificación de ADN, un nuevo PCR u otra estrategia. Si hay dudas acerca de si el resultado de una muestra es correcto o no, la muestra debe ser ensayada nuevamente. Esto puede significar inyectar la muestra nuevamente en la EC, repetir la amplificación o incluso volver a la evidencia o muestra de referencia y volver a purificar el ADN.

El laboratorio de genética forense debe decidir, luego de determinar el perfil genético de una evidencia, si el mismo es apto o no para su cotejo.

Cotejo de perfiles genéticos de las evidencias con las muestras de referencia.— Una vez determinados los perfiles genéticos de las evidencias, se obtienen los de las muestras de referencia y recién en esa etapa se procede a la comparación de los mismos, siempre que, como se mencionó antes, los perfiles de las muestras dubitadas sean *aptas* para su cotejo.

Los autores de diversos trabajos sobre el tema y los expertos coinciden en que para evitar parcialidad no se debe cotejar el perfil de una evidencia con las referencias hasta que no haya sido perfectamente definido el primero.

Las muestra de referencia o indubitadas pueden ser de la víctima (o víctimas), del imputado (o imputados), o de otras personas que se relacionen con el lugar del hecho o el hecho en sí mismo (habitantes del lugar del hecho, la pareja de una víctima de abuso, etc.).

Al realizar la comparación o cotejo existen tres posibles escenarios:

- **Inclusión** (o coincidencia): el perfil genético de la muestra o evidencia coincide con el de la o las muestras de referencia. Si este es el caso se debe realizar una valoración estadística -que se abordará más adelante en este capítulo-.
- **Exclusión** (o no coincidencia): el perfil genético de la muestra o evidencia no puede ser explicado por la contribución de los individuos de referencia aportados.
- **No concluyente**: es aquella situación donde no se puede afirmar una inclusión ni una exclusión. La información obtenida de la evidencia es insuficiente para llegar a una conclusión, un ejemplo de este escenario podría ser la obtención de un perfil parcial.

Investigación de la paternidad y otros vínculos biológicos

La obtención de perfiles genéticos de STR para muestras de referencia (titulares o hijos, madres biológicas, supuestos padres, supuestos abuelos, etc.), es más sencilla

que la obtención de perfiles en muestras dubitadas o evidencias y posee los mismos fundamentos que los explicados en la sección previa. La definición de perfiles en estas muestras no debe ser una dificultad para profesionales expertos en genética forense, salvo excepciones (como por ejemplo algunas muestras cadavéricas). La Comisión de Análisis de Paternidad de la ISFG ha realizado dos publicaciones con recomendaciones que debieran seguir los laboratorios que realizan análisis de paternidad (Morling *et al.*, 2002; Gjertson *et al.*, 2007).

La pregunta que se debe responder en una paternidad clásica (con un hijo o titular, una madre biológica indubitable y un supuesto padre), es: «¿es este individuo (supuesto padre) que se está analizando el padre biológico del titular (hijo)?». En la figura 11 puede verse una representación gráfica de esta pregunta, también se ven a modo de ejemplo tres electroferogramas con unos pocos loci de un supuesto padre, un titular y su madre biológica indubitable. En un informe los electroferogramas se transcriben en forma de tabla, como se observa en la figura a la derecha.

El caso graficado en la figura 11 es una representación en un caso de «**no exclusión**» o «**inclusión**» de la paternidad. Se puede observar que el titular comparte en los 4 marcadores un alelo con su madre, el alelo restante (llamado alelo paterno) está siempre presente en el supuesto padre, son alelos idénticos por descendencia. Más adelante se discutirá sobre la valoración estadística que debe realizarse en estos casos.

En un caso de «**exclusión**» el alelo paterno del titular no está en el supuesto padre, o puede estar «casualmente» y sólo en algunos marcadores. O sea, al analizar todos los marcadores estudiados, se observa que en varios de ellos el alelo paterno no está en el supuesto padre, si esto ocurre en 3 o más marcadores, estamos en presencia de una exclusión de la paternidad. Si hay solo uno o dos marcadores donde el supuesto padre no comparte alelos con el titular, se puede estar en presencia de mutaciones, que están ampliamente descriptas en la bibliografía (Butler, 2015) y debe ser valorado por el analista. Lo recomendado para estos casos es que cada laboratorio establezca sus criterios de «exclusión» de la paternidad (Gjertson *et al.*, 2007).

Estos análisis de vínculos biológicos permiten también la investigación de otras relaciones de parentesco, por ejemplo la maternidad, que se la estudia de una manera similar a la paternidad. También es muy útil cuando se quiere investigar una paternidad en ausencia del supuesto padre o madre; por ejemplo para el caso en

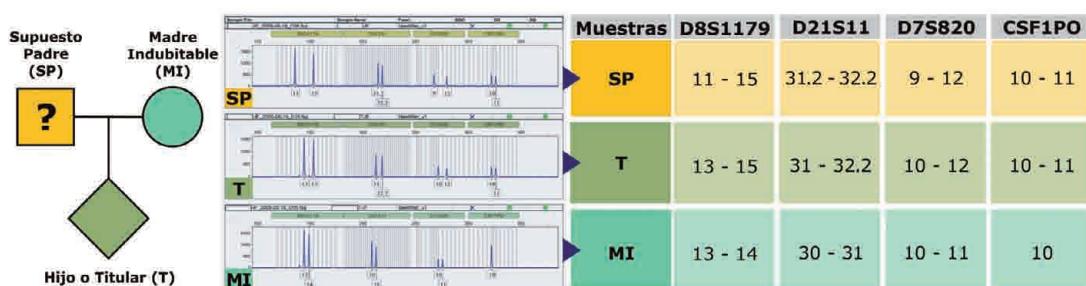


Figura 11. Representación de la investigación de una paternidad clásica. De izquierda a derecha: pedigree, electroferograma parcial de los tres individuos y tabla de resultados.

que el individuo que se quiere ensayar haya fallecido. En estos casos existen dos posibilidades. Puede exhumarse el cadáver, ya que con las nuevas tecnologías el reto de obtener un perfil a partir de material cadavérico ha quedado casi resuelto. O una segunda posibilidad es investigar la paternidad con perfiles genéticos de parientes biológicos indubitados y lo más directos posibles del supuesto padre fallecido. Las mejores opciones son padres, hijos y/o hermanos del supuesto padre. A partir de los perfiles genéticos de estos parientes se puede de alguna manera «reconstruir» el perfil del individuo ausente.

ESTADÍSTICA Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Métodos estadísticos

Si los resultados arrojaron una inclusión, ya sea en un análisis de identificación genética o de paternidad, es necesario averiguar si en la población existe algún otro individuo que también podría poseer ese perfil detectado o que podría ser el padre biológico que se busca. El análisis de ADN tiene una incertidumbre y esta debe ser valorada. Para ello es necesario hacer uso de la estadística. Existe cierto temor o recelo al uso de esta herramienta, pero no es una opción para los científicos forenses de hoy ignorarla. Un experto en un informe, o en una sala de audiencias, no puede presentar la prueba de la manera que le resulte más fácil de explicar, sino que debe presentarla de la manera más correcta, y esta involucra los cálculos estadísticos (Butler, 2015).

En cuanto al método para la realización de esta valoración, la ISFG recomienda la utilización del «likelihood ratio», cuya traducción sería «razón de máxima verosimilitud» y conocido también por su abreviatura «LR» (Gill *et al.*, 2006, 2012). El LR es la comparación de dos probabilidades mediante un cociente que valora la probabilidad del dato genético (perfiles genéticos obtenidos), bajo dos hipótesis diferentes o alternativas y mutuamente excluyentes. Las hipótesis que se evalúan son diferentes de acuerdo a los dos tipos de análisis que se realizan en la genética forense y serán expuestos en esta sección.

Para profundizar conceptos utilizados en estadística en general (como teoría de las probabilidades) y en estadística aplicada a la genética forense en particular, se recomienda la lectura de Evett y Weir (1998) y otros trabajos sobre el tema citados en este capítulo.

Para el cálculo de LRs es necesario conocer los datos de las frecuencias alélicas de STRs autosómicos de la población a la cual pertenecen los individuos de referencia. Estas frecuencias alélicas en los loci que se utilizan en los estudios, es lo que se suele llamar Base de Datos Poblacional de frecuencias alélicas de STRs. Estos datos pueden ser generados por los propios laboratorios de genética forense. Para hacerlo deben tomarse algunas decisiones, como el número de individuos que conformarán la base, cómo se reunirán y seleccionarán los mismos, etc. Luego de genotipificar el conjunto de individuos seleccionados, deben realizarse los cálculos de frecuencias alélicas (cuántas veces aparece un determinado alelo en esa población) y analizar

diferentes parámetros de interés forense (heterocigosidad, poder de discriminación y de exclusión, etc.) y algunos parámetros poblacionales (cumplimiento del equilibrio de Hardy Weinberg, desequilibrio de ligamiento entre loci, etc.), estos últimos para decidir si la base de datos es adecuada. Desde el año 2016 la ISFG recomienda a los laboratorios que construyeron sus propias bases de datos poblacionales de marcadores autosómicos de STRs, controlar la calidad de las mismas. Para ello sugiere la utilización de la plataforma STRidER (Bodner *et al.*, 2016).

Valoración estadística en la investigación de la paternidad y otros vínculos biológicos.— En una paternidad sencilla, en ausencia de la madre biológica, la valoración estadística consiste en plantearse las siguientes dos hipótesis (H):

- H1: El supuesto padre (SP) es el padre biológico del titular (T) o hijo.
- H2: El SP es otra persona, no relacionada biológicamente con SP.

La hipótesis 2 (H2) puede también redactarse como «SP y T no están relacionados genéticamente».

Una vez planteadas las hipótesis a evaluar, se calcula el LR, que en los casos de paternidad se lo suele llamar Índice de Paternidad (IP). Se valora, como se expuso antes, la probabilidad de los perfiles genéticos obtenidos bajo cada hipótesis, lo cual se representa matemáticamente con la siguiente fórmula:

$$IP = \frac{Pr(E/H 1)}{Pr(E/H 2)}$$

El numerador significa calcular la probabilidad de la evidencia (E), que son los datos genéticos, suponiendo la hipótesis 1, mientras que el denominador de la ecuación implica calcular la probabilidad de la evidencia suponiendo la hipótesis 2.

Esta fórmula general podría ser planteada de modo más específico:

$$IP = \frac{Pr(G_T/G_{SP}, H1)}{Pr(G_T/H 2)}$$

Donde en el numerador se calcula la probabilidad del genotipo (perfil genético) del titular suponiendo que SP es su padre (hipótesis 1), mientras que el denominador de la ecuación, que asume que el padre es otro individuo de la población, implica calcular la probabilidad del genotipo del titular. Hay que mencionar que este resultado se debe a que el análisis fue realizado sin la madre biológica, si la misma estuviese genotipificada, el denominador sería la frecuencia en la población del alelo paterno, y seguramente mejoraría el índice de paternidad y la certeza del estudio.

A continuación se presenta un ejemplo concreto, supongamos estar analizando cualquier marcador, por ejemplo el conocido como FGA. El SP tiene el genotipo 19-25, y el titular o hijo el 25-26, la frecuencia del alelo 25 (f_{25}) en la población a la que pertenecen es 0,21 y la del alelo 26 (f_{26}) es 0,10. El IP para este marcador genético sería:

$$IP = \frac{0,5f_{26}}{(f_{25}f_{26})(f_{26}f_{25})} = \frac{0,5f_{26}}{2f_{25}f_{26}} = 1,19$$

La fórmula que se observa en el numerador ($0,5f_{26}$) tiene dos términos, el $0,5$ y la f_{26} . El $0,5$ se debe a que el padre es heterocigoto y comparte un alelo con el hijo, el 25, si él es el padre (hecho sostenido por la H1), entonces le ha dado ese alelo con una probabilidad de 50 % ó 0,5 (el otro 50 %, que completa la probabilidad del 100 %, es la probabilidad de dar a su descendencia el alelo 19). La fórmula se completa con la frecuencia del alelo 26 (f_{26}), que como se desconoce el genotipo de la madre se supone que esta probabilidad es la frecuencia de aparición en la población de este segundo alelo del hijo, el 26. Como se mencionó anteriormente el denominador es la probabilidad del genotipo del titular ($2f_{25}f_{26}$), esta es la probabilidad bajo la H2, que supone que el padre es otro individuo de la población.

En un estudio de paternidad con la madre biológica, que suelen ser los casos más abundantes en los laboratorios, las hipótesis H1 y H2 siguen siendo las ya planteadas y el cálculo del LR o IP, que valora la probabilidad de los tres perfiles genéticos obtenidos (el del titular o hijo «T», el de su madre biológica «M» y el del supuesto padre «SP»), bajo cada hipótesis, se plantearía del siguiente modo:

$$IP = \frac{Pr(G_T/G_M, G_{SP}, H1)}{Pr(G_T/G_M, G_{SP}, H2)}$$

Donde en el numerador se calcula la probabilidad del genotipo (perfil genético) del titular asumiendo que M es su madre y suponiendo que SP es su padre (hipótesis 1), mientras que el denominador de la ecuación implica calcular la probabilidad del genotipo del titular asumiendo que M es su madre biológica, y suponiendo que su padre es un individuo cualquiera de la población, esta probabilidad sería la frecuencia en la población del alelo paterno del titular.

Supongamos como antes estar analizando el marcador FGA. El SP tiene el genotipo 19-25, la madre el genotipo 24-26 y el titular o hijo el 25-26. El IP para este marcador genético, dada la misma frecuencia del alelo 25 del ejemplo anterior ($f_{25}=0,21$), sería ahora:

$$IP = \frac{0,50,5}{0,5f_{25}} = \frac{0,5}{f_{25}} = 2,38$$

La fórmula que se observa en el numerador tiene que ver con que el padre y la madre son ambos heterocigotos y comparten cada uno, un alelo con el hijo (el padre el 25 y la madre el 26), entonces bajo la H1 cada uno de ellos le ha dado un alelo con una probabilidad de 0,5. El denominador es la probabilidad de que la madre le haya dado el alelo 24 y al igual que en el numerador esta probabilidad es 0,5 por ser ella heterocigota, y la probabilidad de que el alelo 25 haya sido aportado por un individuo de la población es la frecuencia de aparición de este alelo en esta

población, o sea f_{25} . Este IP (2,38) es mayor que el IP calculado en ausencia de la madre (1,19) como era previsible.

Se puede decir que valores de IP por encima de 1 van a favor de la H1, o sea de la hipótesis de la paternidad, mientras que valores por debajo de 1 van a favor de la H2, que es la hipótesis de la no paternidad.

Una vez calculados los IP de cada locus (llamados a menudo IP parciales), debe calcularse el IP total o acumulado, que por la tercera ley de la probabilidad es la multiplicación de los IP parciales, siempre que cada locus se herede de manera independiente de los otros.

Calculado el IP total puede surgir la pregunta ¿cuál es un buen IP para probar una paternidad?, no hay una única respuesta a este cuestionamiento, aunque algunos autores arriesgan números como 10.000 y otros 100.000. Lo cierto es que los valores de IP no dependen únicamente de la veracidad del vínculo sino que dependen también de cuántos loci fueron estudiados, si el estudio se hace en ausencia de la madre biológica, si se estudia un vínculo de paternidad a través de parientes del supuesto padre, si el hijo en estudio comparte con su padre alelos muy comunes o por el contrario alelos raros en la población, etc. Sin embargo los valores antes mencionados son una referencia utilizada por los profesionales de esta área.

No es el objetivo de este capítulo mostrar todas las fórmulas que se utilizan en los innumerables estudios de vínculos biológicos que puedan presentarse en un laboratorio, sin embargo los ejemplos expuestos son un acercamiento a la comprensión de esta parte de la genética forense que a menudo es considerada la más compleja.

La valoración estadística puede realizarse utilizando programas informáticos, existe gran cantidad de ellos, sin embargo, la comprensión conceptual de estos cálculos y la práctica manual de los mismos es indispensable para la correcta utilización de los softwares. Suele recomendarse además la aplicación de dos métodos, realizados por dos personas diferentes, para estas valoraciones.

Valoración estadística en la identificación de vestigios biológicos en evidencias forenses.— En estos estudios, cuando hay una coincidencia, por ejemplo entre el perfil de una evidencia y el de un imputado, el cálculo del LR consiste en la valoración de las siguientes hipótesis:

- H1: A la evidencia contribuyó el imputado.
- H2: A la evidencia contribuyó otra persona de la población, no relacionada biológicamente con el imputado.

Estas hipótesis, o también llamadas proposiciones, son mutuamente excluyentes, como ya se mencionó y representan las posiciones de la fiscalía o acusación (H1) y de la defensa (H2). También puede interesarle a la acusación probar que en la evidencia ha contribuido la víctima (porque se trate por ejemplo de un elemento del imputado), y como los escenarios pueden ser variados, a este individuo de la H1, cuyo perfil coincide con el de la evidencia, se lo suele llamar «persona de interés».

El LR calcula, como ya se viene planteando, la probabilidad del dato genético (o perfil genético), dada cada hipótesis. En términos matemáticos se expresaría de la siguiente manera:

$$LR = \frac{Pr(E/H 1)}{Pr(E/H 2)}$$

Como la hipótesis de la acusación es que la evidencia (E) procede de la persona de interés (imputado o víctima), que recordemos es una coincidencia con la evidencia, entonces el numerador, en casos de perfiles únicos (o de fuente única), es 1 (que equivale a 100 % de probabilidad de coincidencia), mientras que en el denominador, donde se valora la hipótesis de la defensa, que sostiene que a la evidencia (E) contribuyó otro individuo de la población, la probabilidad dependerá de la frecuencia en la población del genotipo detectado. Si se trata de un locus homocigoto, entonces la probabilidad de ese genotipo en la población será la frecuencia del alelo al cuadrado y si se trata de un locus heterocigoto entonces la probabilidad será dos veces la frecuencia de uno de los alelos multiplicada por la frecuencia del segundo alelo (para recordar estas fórmulas se recomienda refrescar conocimientos sobre la Ley de Hardy-Weinberg).

Supongamos que en unos pocos loci se obtienen los resultados de la Tabla 1. El LR para el STR D8S1179, si $f_{12}=0,18$ y $f_{14}=0,21$, sería:

$$IP = \frac{1}{2f_{12}f_{14}} = 13,23$$

Para el STR D21S11, siendo la $f_{32.2}=0,22$, el LR sería:

$$IP = \frac{1}{f_{32.2}^2} = 20,66$$

Una vez calculados los LR de cada locus (LR parciales), debe calcularse el LR total o acumulado, que por la tercera ley de la probabilidad es la multiplicación de los LR parciales.

Se puede decir que valores de LRs por encima de 1 van a favor de la hipótesis de la acusación (H1), mientras que valores por debajo de 1 van a favor de la hipótesis de la defensa (H2).

Tabla 1. Resultados de los loci D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441 y D19S433 en un estudio de identificación genética.

STR Locus	D8S1179	D21S11	D18S51	D2S441	D19S433
Evidencia	12-14	32.2	13-14	10-14	15
Persona de interés	12-14	32.2	13-14	10-14	15

Se ha presentado la valoración del caso más sencillo de este tipo de análisis, que es cuando en la evidencia se detecta un perfil único de ADN o de fuente única. Pero cuando la evidencia presenta una mezcla de perfiles genéticos la elaboración de las hipótesis y los cálculos estadísticos son más complejos.

Al igual que para los cálculos en filiaciones, existen numerosos programas informáticos que realizan estas operaciones, sin embargo, como fue ya mencionado, la comprensión de lo que realizan los mismos es fundamental para los peritos y ayudan a la explicación de los conceptos en un juicio o en un informe pericial.

Lo que se acaba de presentar es lo que se conoce en genética forense como «método binario», que puede aplicarse solo cuando el perfil genético de la evidencia coincide completamente con el de una muestra de referencia. Cuando una evidencia tiene poco ADN o existe una mezcla de perfiles genéticos donde uno de ellos es mayoritario y el otro minoritario ocurre lo que se conoce como pérdida alélica o en inglés *Drop out* alélico, y aparece un falso homocigoto, o incluso un *Drop out* de locus, o sea la pérdida completa de alelos en un locus de STR. Un ejemplo podría ser que en la evidencia de la Tabla 1, se obtenga en el STR D18S51 solo el alelo 13, existió entonces la pérdida del alelo 14. Si se aplica en la valoración estadística el método binario el LR de ese locus sería cero (ya que no coincide con la persona de interés que es 13-14). Sin embargo las recomendaciones para este tipo de situaciones es hacer la valoración estadística considerando la posibilidad de existencia de *Drop outs* e incluso de *Drop in*, que son ganancias alélicas (aparición en algún locus de un alelo que no está en el individuo de interés [Gill *et al.*, 2006, 2012]). Para la realización de estos cálculos existen dos tipos de métodos en la actualidad, los métodos llamados «semi-continuos» y los «continuos». Estos cálculos son tan complejos que resulta difícil realizarlos manualmente y se recomienda la utilización de programas informáticos. Ejemplos de programas que utilizan el método semi-continuo son el LR MixStudio, Lab Retrievery likeLTD, entre otros software de fuente abierta. Entre los programas que utilizan el método continuo (método que tiene en cuenta la altura de los picos o alelos y otros parámetros), el más conocido de fuente abierta es el EuroForMix (Bleka, Storvik, Gill, 2016).

Expresión de resultados

La interpretación de los resultados y la expresión de los mismos dependen de la experiencia y la pericia de los profesionales a cargo de los análisis de ADN.

Cuando en los análisis de ADN los expertos interpretaron que se trata de una exclusión, esto debe ser mencionado en las conclusiones y en los estudios de paternidad es recomendable mencionar aquellos marcadores genéticos donde se observaron las inconsistencias o exclusiones que llevaron a esta conclusión.

Cuando un resultado es no concluyente, situación que puede ocurrir en ambos tipos de análisis («identificación de vestigios biológicos en evidencias forenses» e «investigación de la paternidad y otros vínculos biológicos»), el experto debe mencionarlo en su informe y, en aquellos casos que sea posible, puede sugerir alguna alternativa que aporte a la resolución del caso. Un ejemplo de esto sería, en un caso

de investigación de paternidad en ausencia del supuesto padre, la realización de análisis con más parientes biológicos del supuesto padre.

En los casos de Inclusión, donde se han realizado los cálculos estadísticos y se ha obtenido un IP o LR, es muy importante comprender su significado y expresarlos correctamente.

Lo que expresa un LR es cuántas veces son más probable los datos (o perfiles genéticos) obtenidos dada una hipótesis (H1) que dada la otra (H2). Entre las formas de expresión puede mencionarse:

Para un caso de paternidad se podría expresar un valor xxxx de IP como:

- Es xxxx veces más probable obtener esos perfiles genéticos si el «Sr. (supuesto padre)» es el padre del «titular», que si el padre es otro individuo de la población.
- Es xxxx veces más probable los datos obtenidos si el «Sr. (supuesto padre)» es el padre del «titular», que si el «Sr. (supuesto padre)» y «titular» no están relacionados.

Para un caso de identificación genética de una mancha se podría expresar un valor xxxx de LR como:

- Es xxxx veces más probable obtener esos perfiles genéticos si «el sospechoso» aportó marial biológico a la evidencia, que si el material lo hubiese aportado otro individuo de la población.
- La evidencia es xxx veces más probable dada la primera hipótesis que la segunda.

Uno de los errores más comunes al transmitir el significado del LR es la llamada «transposición del condicional». Supongamos un LR de 10.000 en un estudio, lo que significa es que es 10.000 veces más probable el dato genético (los perfiles obtenidos) si se cumple la H1 (hipótesis de la fiscalía) que si se cumple la H2 (hipótesis de la defensa); si decimos en cambio que es 10.000 veces más probable la hipótesis de la fiscalía que la de la defensa, dados esos datos genéticos, entonces estamos cometiendo la transposición del condicional. Este error de transponer el condicional suele cometerse en los dos tipos de análisis que se están discutiendo.

Aunque ya no es recomendada la utilización de la Probabilidad de Paternidad posterior (W o PP), hay laboratorios que aún la utilizan, debido principalmente a que los funcionarios judiciales están habituados a su lectura y la requieren en los informes. Esta probabilidad deriva del Teorema de Bayes:

$$\frac{Pr(H\ 1/E, I)}{Pr(H\ 2/E, I)} = \frac{Pr(E/H\ 1, I)}{Pr(E/H\ 2, I)} \times \frac{Pr(H\ 1/I)}{Pr(H\ 2/I)}$$

Donde «I» es la evidencia no genética, podría decirse que es información que se posee en el caso previo al análisis genético, mientras que «E» es la evidencia genética, como se dijo previamente.

Esta ecuación puede traducirse en:

$$\frac{\text{Probabilidad de paternidad posterior}}{\text{Probabilidad de no paternidad posterior}} = LR \times \frac{\text{Probabilidad de paternidad anterior}}{\text{Probabilidad de no paternidad anterior}}$$

De donde se puede deducir que para calcular la Probabilidad de Paternidad posterior, se necesita conocer la Probabilidad de Paternidad anterior (o *a priori*), que depende de «I», dato no genético y que debiera ser aportado por el Juez o Fiscal de un caso. Por muchos años los laboratorios utilizaron para calcular PP un valor de 0,5 para la Probabilidad de Paternidad anterior, que significa que es tan probable que el padre sea el individuo que se está analizando como que sea otro, cualquiera de la población, llegando a la fórmula:

$$PP = Pr(H | E, I) = \frac{LR}{LR + 1}$$

Sin embargo asumir 0,5 para la Probabilidad de Paternidad *a priori*, no debería ser decisión del laboratorio, en todo caso se podría hacer el cálculo de distintas PP para diversas probabilidades *a priori*.

Es importante saber que muchos de los cálculos estadísticos que se realizan en los laboratorios se basan en modelos y suposiciones, como que la población está en equilibrio; que los loci se heredan de modo completamente independiente; que no hay subestructura poblacional; que cuando en la hipótesis alternativa (H2) el sujeto de interés es reemplazado por un individuo al azar, este no está emparentado con el individuo de interés; que en los cálculos de perfiles mezcla se asume un número de contribuyentes, etc. Sin estos modelos o suposiciones no sería posible realizar la valoración estadística, por eso son utilizados, pero se debe tener conocimiento de los mismos y transmitir los más importantes en el informe pericial.

Informe pericial

El informe pericial es el modo en que los laboratorios forenses transmiten los resultados a los Órganos Judiciales. Esta comunicación debe ser exacta, clara, objetiva y evitar ambigüedades.

La forma que actualmente se considera más adecuada para la presentación de resultados está plasmada en la norma ISO/IEC 17025, que establece requisitos generales relativos a la competencia técnica de los laboratorios de ensayo y calibración. Concretamente el punto 5.10 recoge las exigencias relativas al informe de resultados.

A continuación se enumeran los principales contenidos que debiera tener el informe, tomando como base el documento «Recomendaciones sobre el informe pericial y la expresión de resultados en materia de análisis genéticos forenses» (Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN de España, 2015):

- Título (por ejemplo: «Informe pericial de genética forense...»).
- Identificación del laboratorio incluyendo su dirección.
- Identificación única del informe (por ej.: número de informe), una identificación en cada página con el objeto de asegurar que la misma sea reconocida como una parte del informe, y una clara identificación del final del informe.
- Identificación del órgano judicial que solicita el análisis así como número de expediente o similar.
- Descripción del objetivo del análisis (por ej.: determinación de perfiles genéticos y cotejo entre los mismos para identificación genética o determinación de vínculos de parentesco).
- Identificación y descripción de las evidencias recibidas para su análisis, así como también de las muestras de referencia, indicando la fecha de recepción de las mismas en laboratorio y por quien fueron remitidas.
- Registro de la fecha de ejecución y finalización de los análisis realizados.
- Identificación y descripción de la metodología utilizada, haciendo referencia a la bibliografía científica donde se describe cada método empleado si corresponde.
- Los resultados obtenidos de manera sencilla y clara. Se recomienda utilizar para ello una tabla que contenga los resultados en cada marcador genético analizado (como la de la figura 11) y utilizando la nomenclatura propuesta por la ISFG.
- Cuando corresponda, los resultados serán valorados y evaluados estadísticamente, especificando el procedimiento realizado y mencionando si se ha utilizado una herramienta (como podría ser un software) y la base de datos poblacional a la que se acudió.
- Conclusiones sobre los resultados obtenidos.
- Referencias y/o bibliografía empleada.
- Destino de las evidencias y muestras de referencia; conservación y custodia de las mismas.
- Si corresponde, se incluirá la posibilidad de realización de análisis adicionales sobre las muestras analizadas.
- Incluirá el/los nombre/s, función/es y firma/s, o identificación equivalente de la/s persona/s que han participado de acuerdo a cómo la institución emisora lo tenga acordado.
- Fecha y lugar de emisión del informe.
- Se recomienda incluir una declaración donde se indique que no se debe reproducir el informe, excepto en su totalidad, sin la aprobación escrita del laboratorio.

El documento mencionado desaconseja el empleo de predicados verbales a partir de valores de LR o IP, para evitar interpretaciones subjetivas que podrían hacer las distintas partes implicadas en el proceso judicial.

Se aconseja la descripción de la/s pareja/s de hipótesis planteada/s para el cálculo estadístico. Si para la valoración estadística se requiriera el empleo de parámetros de corrección debido a subestructura poblacional, aparición de mutaciones, alelos silentes, o se utilizan probabilidades de *Drop out* o *Drop in*, se recomienda mencionarlo y hacer referencia a las fórmulas utilizadas. También deben mencionarse

los valores de los parámetros utilizados (tasas de mutación o alelos nulos, factor de corrección por subestructura poblacional, etc.).

Por último es recomendable mencionar aquellas muestras en las que la calidad del perfil genético, según los procedimientos internos del laboratorio, no permita la emisión de conclusiones.

MARCADORES SEXUALES Y ADN MITOCONDRIAL

La Genética Forense no solo utiliza marcadores autosómicos, que son a los que principalmente se ha dedicado hasta ahora este capítulo, sino que la tipificación de marcadores de los cromosomas sexuales X e Y, así como la de marcadores del ADN mitocondrial, son también muy valiosos para esta área forense.

Mientras que los marcadores de cromosomas autosómicos de un individuo son heredados uno de su madre y otro de su padre, los marcadores genéticos de cromosoma Y y del ADN mitocondrial son marcadores de linaje (paterno y materno respectivamente), como se verá en esta parte y son transmitidos de generación en generación sin cambios (excepto que ocurran mutaciones), ver figura 12. Estos marcadores se heredan en general «ligados», por lo cual se hace referencia a ellos como «haplotipo» (conjunto de marcadores que se heredan juntos y unidos) y no como «genotipo».

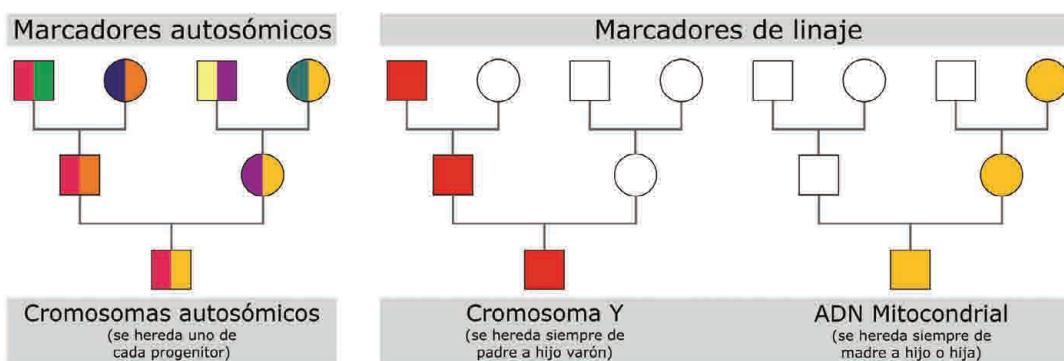


Figura 12. Esquema sobre la diferencia en la herencia de marcadores autosómicos y de marcadores de linaje.

Marcadores del cromosoma Y

El cromosoma Y es uno de los más pequeños de los cromosomas humanos, y lo poseen solo los varones. Una parte de él sufre recombinación con una parte homóloga del cromosoma X, pero otra (más del 90 %), no recombina y es transferida intacta a la descendencia.

Los marcadores polimórficos que se estudian de este cromosoma están situados sobre la parte que no recombina, se heredan como «haplotipo», y excepto mutaciones, permanecen idénticos a lo largo de su descendencia masculina. Por lo expuesto se los conoce como marcadores de linaje paterno.

Estos marcadores se utilizan en los dos tipos de estudios forenses que se han mencionado: estudios de vínculos biológicos de parentesco y en identificación de vestigios biológicos.

En estos últimos, los marcadores Y tienen la ventaja de estar presentes solo en varones y se utilizan en los delitos contra la integridad sexual, o en general cuando la víctima es mujer, el agresor varón y en las evidencias hay poco material o ADN masculino comparado con el femenino. Lo que sucede en estos casos es que en los marcadores genéticos autosómicos se detectará solo el perfil mayoritario (el femenino), sin embargo en los marcadores de cromosoma Y esta competencia desaparece y quedará expuesto el haplotipo Y del agresor.

Estos marcadores no suelen utilizarse en los estudios de paternidad sencillos (cuando se tiene al supuesto padre), sin embargo son de gran utilidad en estudios de parentesco biológico en ausencia del supuesto padre, en casos de investigación de personas perdidas, en casos de identificación en desastres en masa, etc., donde complementan en general los estudios de los STR autosómicos.

Son empleados también en investigaciones antropológicas, históricas y genealógicas. Por ejemplo son muy utilizados como trazadores de migraciones humanas a través del linaje masculino.

Así como tiene ventajas, la utilización del cromosoma Y en genética forense tiene desventajas o limitaciones. La determinación de un perfil genético autosómico individualiza una persona, sin embargo la de un haplotipo de cromosoma Y individualiza un linaje paterno. Cuando se lo detecte puede ser del imputado en un delito penal, pero también puede ser de su padre, abuelo, hermano, o de cualquier individuo de su mismo linaje paterno. De modo que en un juicio no tendrá el mismo valor probatorio que un perfil autosómico y necesitará seguramente de otras pruebas para ser de utilidad.

La metodología con que se estudian los marcadores de STR de cromosoma Y es similar a la utilizada con cromosomas autosómicos, y existen varios *kits* ofrecidos por distintas compañías.

Al igual que en marcadores autosómicos, cuando se encuentra una coincidencia entre dos individuos en un estudio de parentesco, o entre una evidencia y un individuo, la misma debe ser valorada. Para ello existe una base de datos mundial de haplotipos de STRs de cromosoma Y llamada YHRD (Y-STR Haplotype Reference Database; yhrd.org), que es la más utilizada para estas valoraciones de frecuencias de haplotipos Y. Sin embargo, este tratamiento estadístico es complejo y excede el objetivo de este capítulo. Por otro lado se aclara que no todos los expertos coinciden en cómo realizar esta valoración.

Cuando se trata de una exclusión estos marcadores son tan útiles como los marcadores autosómicos.

Marcadores del cromosoma X

La forma particular de herencia del cromosoma sexual X es lo que lo hace interesante para la genética forense. Mientras que las mujeres poseen dos cromosomas X, los varones poseen solo una copia y el cromosoma Y.

Los varones le transfieren su copia única de este cromosoma a sus hijas mujeres, mientras que a sus hijos varones le transfieren el cromosoma Y. Esto determina, entre otras cosas, que sea muy útil en algunos estudios complejos de paternidad, por ejemplo en una paternidad en ausencia de madre, donde los alelos de STRs del cromosoma X del padre deben estar obligadamente en la hija.

Existe en la actualidad una considerable cantidad de marcadores polimórficos (principalmente STRs) del cromosoma X, y aunque no se han desarrollado aún muchos *kits* comerciales, su utilización en Genética Forense va en aumento. Algunos de estos STRs están ligados, lo que significa que no se heredan independientemente unos de otros. Este hecho hace que el tratamiento estadístico en las coincidencias sea complejo y a esta dificultad se suma que no existen muchas bases de datos poblacionales para este cromosoma.

Al igual que con los marcadores del cromosoma Y, la metodología con que se estudian es similar a la utilizada con los STRs de cromosomas autosómicos y una exclusión en los marcadores del X es tan útil como con la de marcadores de otros cromosomas.

ADN mitocondrial

El núcleo no es el único elemento celular que contiene ADN, aunque la mayoría del genoma se localiza en él y este capítulo se refiere principalmente al ADN nuclear. Las mitocondrias, organelas del citoplasma celular (figura 1), también contienen ADN y la Genética Forense lo utiliza en sus estudios.

El ADN mitocondrial es circular y doble cadena, y a diferencia del ADN nuclear (que es diploide), el mitocondrial es haploide (un solo juego de este ADN en cada célula). La principal ventaja sobre el ADN nuclear es la gran cantidad de copias que hay dentro de una célula. Mientras que en el primero se tienen solo dos copias por célula (una materna y una paterna), del mitocondrial se pueden encontrar cientos y hasta miles de copias. Esto provoca que sea la metodología de elección en muestras con baja cantidad de ADN nuclear (muy degradadas o dañadas, especímenes antiguos, huesos, pelos, etc.). A pesar de la mayor cantidad de copias, el tamaño de este ADN es muy pequeño frente al nuclear y representa solo el 0,25 % del ADN celular.

El ADN mitocondrial es un marcador de linaje porque solo es transmitido por la madre. En la concepción el espermatozoide solo transfiere al óvulo su núcleo, de modo que todo los elementos citoplasmáticos que se transfieren a la descendencia son aportados por el óvulo, incluidas las mitocondrias. Esta transferencia de mitocondrias maternas, ocurre tanto para hijos varones como para hijas mujeres, pero solo estas últimas se las heredarán a sus hijos (figura 12).

A diferencia de los polimorfismos de STRs que se definieron en el ADN nuclear, en el ADN mitocondrial los polimorfismos tienen su origen en pequeñas mutaciones que consisten en inserciones o delecciones de nucleótidos. Estas mutaciones, que son diferencias puntuales entre un individuo y otro, se encuentran en una reducida región no codificante de este ADN, llamada a menudo región control o D-loop. Dentro de esta región se definieron inicialmente tres zonas hipervariables que fueron las más estudiadas hace unos años: HV1, HV2 y HV3. En la actualidad es posible la secuenciación completa de la región control para encontrar los polimorfismos. Al igual que con el cromosoma Y, estos polimorfismos se heredan como «haplotipos».

La metodología en estos estudios difiere de la descripta en este capítulo debido a la naturaleza diversa de estos polimorfismos. La técnica que se utiliza es la secuenciación del ADN. Los estudios incluyen el cotejo de la secuencia de la región en estudio del ADN mitocondrial con una secuencia de referencia, que actualmente es la llamada rCRS (revised Cambridge Reference Sequence), que posee solo pequeñas diferencias con la secuencia de Anderson (utilizada anteriormente), y ninguna en la parte control. Al igual que con otros polimorfismos este análisis incluye el cotejo de evidencias con individuos de referencia, o el cotejo de individuos entre sí en un estudio de parentesco.

Para las coincidencias debe realizarse una valoración estadística y se recomienda para ello la utilización de la base de datos de EMPOP (European DNA Profiling Group Mitochondrial DNA Population database Project; empop.online/).

Estos marcadores suelen utilizarse en estudios complejos de parentesco biológico, en casos de investigación de personas perdidas, en casos de identificación en desastres en masa, etc., donde pueden complementar los estudios de los STR autosómicos. También son utilizados en investigaciones antropológicas, históricas y genealógicas, como el haplotipo de cromosoma Y, pero como trazadores de migraciones humanas a través del linaje materno.

Al igual que con el haplotipo del cromosoma Y, la determinación del haplotipo mitocondrial no individualiza una persona, sino un linaje materno, de modo que serán necesarias otras pruebas en una causa para tener valor probatorio.

BASES DE DATOS DE ADN

Una base de datos de ADN (llamada a veces con otros nombres como banco o registro de datos genéticos o perfiles genéticos), es un almacenamiento informático de perfiles genéticos y se realiza dividiendo los datos en distintas categorías o índices. Por ejemplo: individuos condenados por algún delito, evidencias forenses con perfiles no identificados (casos abiertos), etc. Luego se realizan cotejos entre las distintas categorías y así ayudan en la investigación criminal. También suelen volcarse allí perfiles de personas fallecidas no identificadas (conocidas a menudo como NN) y de grupos de familiares que buscan un pariente desaparecido (Butler, 2010, 2012).

Las bases de datos son muy efectivas porque muchos de los crímenes son cometidos por autores reincidentes, y estas bases los exponen.

El grupo de trabajo de ADN del ENFSI ha escrito algunas recomendaciones para estas bases de datos y se encuentran en el documento llamado «DNA Database Management Review and Recommendations» (ENFSI DNA Working Group, 2017). En el mismo se discute que los objetivos principales de la creación de estas bases de datos de ADN es apoyar la investigación criminal, incrementar el número de casos criminales que se puedan resolver, aumentar la velocidad de resolución de los mismos, ahorrar tiempo de investigación, unir casos no resueltos y descubrir falsas identificaciones.

La primera base de datos de ADN que se creó fue en el año 1995 en Reino Unido (Inglaterra), en 1996 se crea la de Irlanda del Norte y Escocia y en 1997 la de Holanda y Austria. La conocida base de datos del FBI (USA), llamada CODIS por las siglas en inglés de «Combined DNA Index System», comenzó en 1998, y en ese año también se lanzó la de Alemania. A la creación de estas bases siguieron las de muchos otros países del mundo, inclusive algunos de América Latina.

Para que puedan ser utilizadas estas bases de datos genéticos es necesario que exista legislación al respecto. En la Argentina está aprobada y se está implementando la Ley nacional N° 26.879. Sería la primera vez que se pondría en marcha un Registro Nacional de Datos Genéticos. La Ley es exclusiva para delitos contra la integridad sexual, y a pesar de esta limitación, es un primer paso para la implementación de esta importante herramienta para la investigación en la justicia penal. Es importante mencionar que muchas provincias argentinas poseen ya sus leyes de bases o registros de ADN y están avanzadas en su implementación.

Estos registros necesitan para su funcionamiento un software, responsable de cotejar las muestras de las distintas categorías o índices. Mientras muchos países desarrollan programas propios, algunos han adoptado el CODIS. La Argentina tiene un convenio para el uso de CODIS y también un desarrollo de software propio, llamado GENis. Mientras aún no se ha comenzado con el registro de datos genéticos nacional, las provincias están implementando los suyos, algunas con el software nacional, y otras tienen convenios con CODIS.

Hay aspectos importantes para la implementación, a partir de una legislación, de una base de datos de ADN nacional:

- Un acuerdo entre las provincias que proveerán los datos para la base de datos nacional.
- Un conjunto común de marcadores o loci, que se van a utilizar para la genotipificación de las muestras, de modo que puedan ser cotejadas con las de las distintas bases de datos provinciales.
- Un software común o compatible, para que los perfiles genéticos puedan ser transferidos mediante una red segura, desde los laboratorios a las bases de datos locales o provinciales y a la nacional.
- Estándares de calidad iguales o parecidos para que sea confiable el dato generado en cada laboratorio.

Algunos de estos aspectos son discutidos brevemente a continuación.

Criterios de inclusión

Fuente de perfiles de ADN.— Los países o provincias regulan qué perfiles estarán contenidos en la base de datos. A veces es necesaria la autorización de funcionarios judiciales para la introducción de estos perfiles.

Pueden incluirse:

- Vestigios en evidencias forenses: perfiles que se presumen están directamente relacionados con un crimen (generalmente con el perpetrador del mismo). Ejemplo de estos pueden ser: manchas de sangre, de saliva (en vasos, botellas), colillas de cigarrillo, goma de mascar, etc. Si el lugar del crimen es una casa de familia debe asegurarse de que los elementos secuestrados no pertenezcan a sus integrantes. Cuando el origen de los vestigios recolectados no es claro, es necesario tomar algunas muestras de referencia (de la víctima, de testigos o los de la familia), y realizar un cotejo, para estar seguros de introducir a la base una evidencia conectada al agresor y no introducir a la misma personas inocentes no relacionadas con el crimen.
- Personas: varias categorías de individuos pueden ser introducidas:
 - Condenados: individuos encontrados culpables por un delito en un juicio con condena firme o no (distintos países poseen distintos criterios al respecto).
 - Sospechosos o imputados: personas que aún no han sido juzgados por el delito.
 - Arrestados: individuos que aún no fueron imputados.
 - Voluntarios: personas que dan su consentimiento para estar en la base de datos genética con propósitos de investigación. Un ejemplo podría ser el esposo de una víctima que tuvo relaciones justo antes del hecho delictivo y en la evidencia puede estar entonces su perfil genético y necesita ser «descontado».
 - Víctimas: algunos países permiten la inclusión de estos perfiles cuando el hecho no ha sido resuelto. Podría por ejemplo aparecer en otra escena del crimen un cuchillo con un perfil genético que si coincide con el de una víctima de homicidio, y podría ser esta arma blanca aquella del homicidio.
 - Personas perdidas.
 - Familiares de personas perdidas.
 - Perfiles de eliminación: las bases de datos locales, o de laboratorios, suelen tener datos genéticos de individuos que por su tarea pueden haber involuntariamente contaminado una evidencia, se cuenta con estos perfiles con la finalidad de descartar los mismos de la base de datos.

Elección de Loci.— El número de loci que deben tener los perfiles a ser introducidos en las bases ha ido cambiando con los años. CODIS utilizó 13 marcadores hasta hace poco, y ahora los aumentó a 20. El estándar europeo comenzó con 7 loci (distintos a los de CODIS), pero ahora recomiendan extenderlo a 5 loci más. A pesar de esta exigencia, en general se acepta la introducción de perfiles parciales, y se lo hace con la condición de un número mínimo de marcadores o una cantidad máxima de «random match probability» (valor estadístico comparable al LR).

Proveedores de perfiles.— Los laboratorios que aporten datos genéticos a la base deben cumplir con cierto nivel de calidad si se pretende que los resultados de búsqueda sean confiables y que la misma funcione de manera apropiada. Es por eso que cada país o provincia debe establecer los requisitos para sus laboratorios. Internacionalmente se requiere en general la acreditación de la norma ISO 17.025.

Otros criterios.— Lo cierto es que cada base de datos debe establecer los requisitos mínimos de aceptación para la introducción en ella de perfiles genéticos. Algunas otras variables que se deben considerar para esta incorporación son: perfiles obtenidos a partir de muestras con baja cantidad de ADN, perfiles «consenso», perfiles con alelos raros o anomalías cromosómicas, introducción de perfiles donde un nucleótido no es seguro (uso de comodines), perfiles mezcla, marcadores no autosómicos (como de cromosoma X e Y).

Otros aspectos

Además de los criterios de Inclusión, que fueron expuestos aquí con mayor detalle, existen también para considerar otros aspectos, de los cuales mencionaremos: CRITERIOS DE ELIMINACIÓN, o sea aquellos que deben considerarse cuando un perfil genético debe ser removido de la base de datos; REGLAS DE COINCIDENCIA, que determinan los criterios sobre cuándo dos perfiles se consideran una coincidencia, DISPOSICIÓN, que son las acciones que siguen a una coincidencia, y suelen incluir la verificación de la misma.

Privacidad

Uno de los mayores desafíos para el mantenimiento de una base de datos es la privacidad y seguridad de la información almacenada en la misma.

Al respecto se puede decir por un lado, que los marcadores de STR utilizados en la identificación genética, y en las bases de datos, están en regiones no codificantes y por lo tanto no están asociados a enfermedades genéticas o a predisposiciones genéticas. Por otro lado, no debiera haber nombres ni otras individualizaciones almacenados con los datos genéticos. Sin embargo este tipo de temas debe estar resguardado por las leyes de bases de datos que surjan.

PERSPECTIVAS FUTURAS

En este capítulo se ha desarrollado de manera resumida una de las principales metodologías de la Genética Forense, aquella utilizada para la detección de STRs autosómicos, mencionando algunas otras temáticas de la ciencia de manera superficial.

Como toda ciencia, la Genética Forense avanza rápidamente hacia nuevas tecnologías, siendo difícil prever *a priori* cuál de las que están actualmente siendo usadas será la que ganará espacio en la Genética Forense del futuro. Sin embargo, a criterio de esta profesional, y dado el estado del arte, pareciera verse un avance hacia la

tecnología conocida como «Next-generation DNA sequencing» o «Massive parallel sequencing», que se suele traducir como secuenciación masiva o de nueva generación y utiliza las siglas «NGS». Esta tecnología utiliza plataformas muy pequeñas para secuenciar paralelamente y de una sola vez, millones de pequeñas porciones de ADN (una única corrida o análisis). Esto posibilita que se detecten simultáneamente STRs autosómicos, de cromosomas X e Y, secuencias polimórficas del ADN Mitocondrial, SNPs (otro polimorfismo distinto al STR) autosómicos y sexuales, etc. Esto que en principio entusiasma no se utiliza aún en el campo de modo rutinario, porque debe ser validado para su utilización forense y porque genera algunos problemas que deben resolverse, como el de la nomenclatura de STRs, debido a que no analiza los STRs solo por su tamaño, como hasta ahora, sino que los secuencia y esto provoca la aparición de nuevos alelos donde antes había sólo uno.

La ventaja de esta metodología es que en una sola «reacción», «corrida» o PCR, se tendrá resuelta una muestra con muchísimos marcadores genéticos polimórficos, la desventaja es que se deben cambiar algunos de los equipos que actualmente se utilizan, que resulta más caro el análisis y que para su aprovechamiento, en general, debe trabajarse con una alta casuística.

Es difícil predecir si es hacia allí donde se dirige la nueva metodología, sin embargo, los profesionales de la Genética Forense deben seguir trabajando en los casos forenses que su rutina les exige todos los días, sin dejar de estudiar los avances de la ciencia, para poder acompañar ese giro cuando les sea requerido.

LITERATURA CITADA

- Aler Gay, M., Carrasco Lozano, F., Lorente Acosta, J. A., Prieto Ruiz-Canela, M. V., Rivas San Martín, E. y Fernández de Simón L. (2000). Recomendaciones para la recogida y envío de muestras con fines de Identificación Genética. Grupo de Habla Española y Portuguesa de la ISFG. Recuperado el 15 de agosto 2019 de http://ghep-isfg.org/wp-content/uploads/medios/Recogida_de_evidencias.pdf
- Ballou, S., Bamberger, P. S., Brown, L., Brown, R., Burney, Y., Davenport, D., De-Palma L., Jones, C., Keaton R., Kiley W., Kline M., Lanning, K., LaPorte, G., Latta, J., Ledray, L. E., Nagy, R., Ostrom, B. E., Schwind, L., Stoiloff, S., Stolorow, M., Taylor, M., y Williams, S. (2013). The Biological Evidence, Preservation Handbook: Best Practices for Evidence Handlers. National Institute of Standards and Technology. Recuperado el 15 de agosto 2019 de <https://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/ir/2013/NIST.IR.7928.pdf>
- Bleka, Ø., Storvik, G. y Gill, P. (2016). EuroForMix: An open source software based on a continuous model to evaluate STR DNA profiles from a mixture of contributors with artefacts. *Forensic Science International Genetics*, 21, 35-44.
- Bodner, M., Bastisch, I., Butler, J. M., Fimmers, R., Gill, P., Gusmão, L., Morling, N., Phillips, C., Prinz, M., Schneider, P. M. y Parson, W. (2016). Recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG) on quality control of autosomal Short Tandem Repeat allele frequency databasing (STRidER). *Forensic Science International Genetics*, 24, 97-102.

- Butler, J. M. (2010). Fundamentals of Forensic DNA Typing. USA: Elsevier, Academic Press.
- Butler, J. M. (2012). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. USA-UK: Elsevier, Academic Press.
- Butler, J. M. (2015). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation. USA: Elsevier, Academic Press.
- Clayton, T. M., Whitaker, J. P., Sparkes, R. L. y Gill, P. (1998). Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. *Forensic Science International*, 91, 55-70.
- Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN. (2015). Recomendaciones sobre el informe pericial y la expresión de resultados en materia de análisis genéticos forenses. Ministerio de Justicia de España. Recuperado el 15 de agosto 2019 de https://www.mjusticia.gob.es/cs/Satellite/Portal/1292428320825?blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-Disposition&blobheadername2=Grupo&blobheadervalue1=attachment%3B+filename%3DRecomendaciones_sobre_el_informe_pericial_y_la_expcion_de_resultados_en_materia_de_analisis_genet.PDF&blobheadervalue2=INTCF
- ENFSI DNA Working Group. (2017). DNA Database Management Review and Recommendations. European Network of Forensic Science Institutes. Recuperado el 15 de agosto 2019 de <http://enfsi.eu/wp-content/uploads/2017/09/DNA-databasemanagement-review-and-recommendations-april-2017.pdf>
- Evett, I. W. y Weir, B. S. (1998). Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists. Massachusetts, USA: Sinauer Associates.
- Gill, P., Brenner, C. H., Buckleton, J. S., Carracedo, A., Krawczak, M., Mayr, W. R., Morling, N., Prinz, M., Schneider, P. M., Weir, B. S. (2006). DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Science International*, 160, 90-101.
- Gill, P., Gusmão, L., Haned, H., Mayr, W. R., Morling, N., Parson, W., Prieto, L., Prinz, M., Schneider, H., Schneider, P. M., Weir, B. S. (2012). DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods. *Forensic Science International Genetics*, 6, 679-688.
- Gjertson, D. W., Brenner, C. H., Baur, M. P., Carracedo, A., Guidet, F., Luque, J. A., Lessig, R., Wolfgang, R. M., Pascali, V. L., Prinz, M., Schneider, P. M., y Morling, N. (2007). ISFG: Recommendations on biostatistics in paternity testing. *Forensic Science International Genetics*, 1, 223-231.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. y Thein, S. L. (1985). Hypervariable «minisatellite» regions in human DNA. *Nature*, 314, 67-73.
- Morling, N., Allen, R. W., Carracedo, A., Geada, H., Guidet, F., Hallenberg, C., Martin, W., Mayr, W. R., Olaisen, B., Pascali, V. L. y Schneider, P. M. (2002). Paternity Testing Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on genetic investigations in paternity cases. *Forensic Science International*, 129, 148-157.

Protocolo unificado de los Ministerios Pùblicos de la Repùblica Argentina: Guía para el levantamiento y conservación de la evidencia. Ministerio de Justicia y Derechos Humanos de la Nación. (2017). Recuperado el 15 de agosto 2019 de <http://www.jus.gob.ar/media/3262247/Protocolo%20unificado.pdf>

SWGDAM. (2010). Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. Recuperado el 15 de agosto 2019 de http://www.forensicdna.com/assets/swgdam_2010.pdf

— Primer libro sobre la especialidad escrita en Argentina —

Biología Forense

Botánica, fisiología, micología, entomología, tafonomía
y genética aplicadas a la criminalística

Hasta el siglo XIX, la Biología Forense solo se desarrollaba en el ámbito de la medicina legal y la antropología forense; a partir del siglo XX se sumó la genética en la identificación de personas a través de estudios de ADN. En la actualidad, a partir del desarrollo de nuevas disciplinas y según la clasificación de los pronunciamientos periciales, se divide la Biología Forense en diferentes ramas: genética forense, hematología forense, espermatología o seminología forense, tricología forense, microbiología e inmunología forense, entomología forense, micología forense, fisiología forense y botánica forense. De estas ramas no todas se aplican de modo habitual en el sistema judicial argentino ya sea por falta de divulgación o especialistas en cada área.

El objetivo de este libro —el primero escrito en el país sobre la especialidad— es establecer una guía de las disciplinas vinculadas a la Biología Forense, tanto para quienes tienen la responsabilidad en la investigación legal (peritos, biólogos, bioquímicos, criminalistas, médicos etc.) como para quienes desde el ámbito judicial deben realizar los requerimientos periciales de cada hecho delictivo. Cada capítulo describe las disciplinas que se investigan en el país y fueron elaborados por especialistas en cada área. Teniendo en cuenta que la investigación del hecho delictivo se trata de un trabajo en equipo y multidisciplinario, se consideró de suma importancia incorporar un capítulo sobre Criminalística, que aborde el trabajo en la escena del hecho y la importancia de la búsqueda y preservación de indicios, ya que la Biología Forense no solo se desarrolla en el laboratorio sino desde la escena misma. También en la presente obra se incorporó un capítulo sobre patología forense y otro sobre tafonomía forense, los cuales describen la vinculación de distintos organismos vertebrados e invertebrados y las variables abiotícas, con la presencia o modificación de lesiones en un cadáver. La hematología y seminología forense se tratan en el capítulo de indicios biológicos.

