

TESIS DOCTORAL

**MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS DE MAMÍFERO
EN MANCHAS DE SANGRE:
ESTUDIO SOBRE MATERIALES LÍTICOS
DE INTERÉS TECNOPREHISTÓRICO**



POLICARP HORTOLÀ I GÓMEZ



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

2001

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS DE MAMÍFERO EN MANCHAS DE SANGRE: ESTUDIO SOBRE MATERIALES
LÍTICOS DE INTERÉS TECNOPREHISTÓRICO
Policarp Hortolà i Gómez
ISBN:978-84-691-1906-8/D.L: T-356-2008

***Morfología de eritrocitos de mamífero
en manchas de sangre:
estudio sobre materiales líticos
de interés tecnoprehistórico***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEPARTAMENT D'HISTÒRIA I GEOGRAFIA
ÀREA DE PREHISTÒRIA
UNIDAT DE RECERCA
ASSOCIADA AL CSIC

MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS DE MAMÍFERO
EN MANCHAS DE SANGRE:
ESTUDIO SOBRE MATERIALES LÍTICOS
DE INTERÉS TECNOPREHISTÓRICO

por

Policarp Hortolà i Gómez
Licenciado en Ciencias Biológicas

Tesis presentada para optar al
grado de Doctor

Programa de Doctorado *Registro sedimentario y evolución paleoambiental*
(Departament d'Estratigrafia i Paleontologia, Universitat de Barcelona)

Tarragona
2001

**Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección
del Prof. Dr. Eudald Carbonell i Roura, Catedrático de
Prehistoria de la Universidad Rovira i Virgili.**

Esta Tesis Doctoral ha sido finalizada dentro del marco de una Acción Especial de Política Científica (APC1999-0177), titulada *Contratos en apoyo a la realización de trabajos científico-técnicos en el proyecto de investigación sobre los yacimientos de Atapuerca*, de la Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica (DGESIC), del Ministerio de Ciencia y Tecnología (anteriormente, Ministerio de Educación y Cultura).

Sikae muyini kewa kitu duni; nangia mweituni haliwa na mngwa.

[Yo no vivo en el poblado para no hacerme allí perezoso; yo me interno en las selvas donde puedo ser devorado por la bestia extraña].

Atribuido a Liyongo Fumo wa Ba-Uriy (*ante 1250-post 1302*).

Canción guerrera swahili.

No hay cosa alguna cuya percepción sea inútil al entendimiento, porque todas concurren a saciar su natural apetito de saber.

Benito Jerónimo Feijoo (1676-1764).

Cartas Eruditas y Curiosas. II, 16.

L'observateur doit être le photographe de la nature, son observation doit représenter exactement la nature. Il faut observer sans idée préconçue; l'esprit de l'observateur doit être passif, c'est-à-dire se taire; il écoute la nature et écrit sous sa dictée.

[El observador debe ser el fotógrafo de la naturaleza, su observación debe representar exactamente la naturaleza. Es necesario observar sin idea preconcebida; el espíritu del observador debe ser pasivo, es decir callarse; escucha la naturaleza y escribe bajo su dictado].

Claude Bernard (1813-1878)

Introduction à l'Étude de la Médecine Expérimentale. I, 6.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS DE MAMÍFERO EN MANCHAS DE SANGRE: ESTUDIO SOBRE MATERIALES
LÍTICOS DE INTERÉS TECNOPREHISTÓRICO
Policarp Hortolà i Gómez
ISBN:978-84-691-1906-8/D.L: T-356-2008

**A mi esposa, *Consol*,
con amor y gratitud**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS DE MAMÍFERO EN MANCHÁS DE SANGRE: ESTUDIO SOBRE MATERIALES
LÍTICOS DE INTERÉS TECNOPREHISTÓRICO
Policarp Hortolà i Gómez
ISBN:978-84-691-1906-8/D.L: T-356-2008

ABSTRACT

Mammalian erythrocyte morphology in bloodstains: a study on lithic materials of techno-prehistoric concern

Policarp Hortolà

Rovira i Virgili University, 2001

Adviser: Prof. Dr. Eudald Carbonell

Several observations of typical mammalian erythrocytes (red blood cells, RBC) in bloodstains on prehistoric stone tools had been reported previously in the scientific literature. These observations led to the candidate to outline the following hypotheses and questions:

1. Initial hypothesis: *In a mammalian blood smear on lithic substrate, the morphological preservation of the erythrocytes is experimentally independent of their age.* In the event that this hypothesis must be refused, it were outlined the following question subordinated to the initial hypothesis: *How long time mammalian erythrocytes can preserve morphologically in a blood smear on lithic substrate?* In the event that this hypothesis might be accepted, it were outlined the following
2. Hypothesis subordinated to the initial hypothesis: *In a mammalian blood smear on lithic substrate, the erythrocytes only display the same morphologies which appear in (either normal or pathological) physiological conditions.* In the event that this hypothesis must be refused, it were outlined the following question subordinated to the subordinate hypothesis: *Which morphologies characterize the mammalian erythrocytes in a blood smear on lithic substrate?*

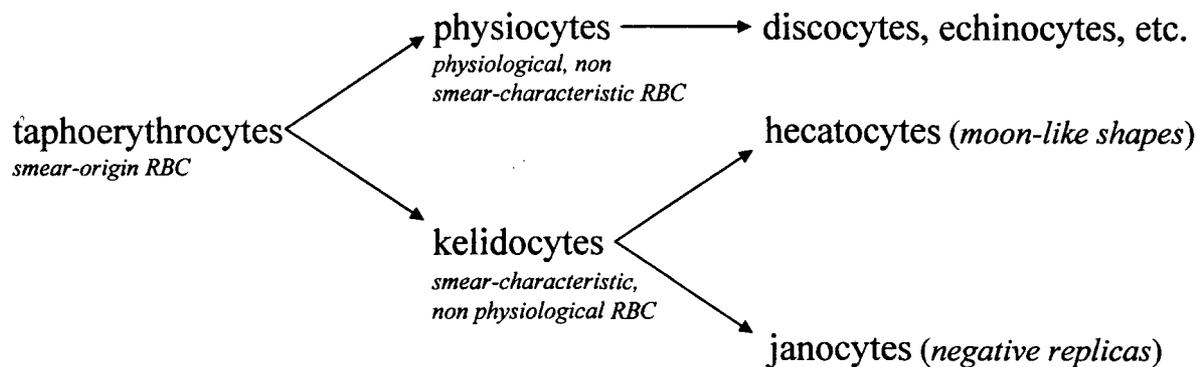
In order to contrast these hypotheses and, if applying, to answer these questions, human, suspected human (forensic type) and non-human (artiodactyl) blood smears on lithic materials of techno-prehistoric concern and on other than lithic materials, of interest to criminalistics, were studied. After an ageing time span ranging from 1 month to 10 years, 2 months, the samples were examined by a scanning electron microscope.

From this work it is inferred that, in a mammalian blood smear on lithic substrate:

1. *The morphological preservation of the erythrocytes is experimentally independent of their age.* This affirmation has a probable, not necessary character, according to the logic-probabilistic principles.
2. *The erythrocytes also display morphologies other than those which appear in (either normal or pathological) physiological conditions.*

3. *The morphologies that characterize the mammalian erythrocytes in a bloodstain on lithic substrate are the moon-like shapes and the negative replicas.*

Finally, a morphological systematics for the smear-origin mammalian erythrocytes -which would be valid for, at least, lithic substrates- is suggested as follows:



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS DE MAMÍFERO EN MANCHAS DE SANGRE: ESTUDIO SOBRE MATERIALES
LÍTICOS DE INTERÉS TECNOPREHISTÓRICO
Policarp Hortolà i Gómez
ISBN:978-84-691-1906-8/D.L: T-356-2008

RESUM

Morfologia d'eritròcits de mamífer en taques de sang: estudi sobre materials lítics d'interès tecno-prehistòric

Policarp Hortolà

Universitat Rovira i Virgili, 2001

Director: Prof. Dr. Eudald Carbonell

Han estat al·ludides en la literatura científica diverses observacions d'eritròcits (glòbuls rojos de la sang, GRS) típics de mamífer en taques de sang damunt d'eines de pedra prehistòriques. Aquestes observacions conduïren al candidat a plantejar les següents hipòtesis i preguntes:

1. Hipòtesi inicial: *En una taca de sang de mamífer damunt de substrat lític, la preservació morfològica dels eritròcits és experimentalment independent de la seva antiguitat.* En el cas d'haver de rebutjar aquesta hipòtesi, es plantejava la següent pregunta subordinada a la hipòtesi inicial: *Quant de temps es poden preservar morfològicament els eritròcits de mamífer en una taca de sang damunt de substrat lític?* En el cas de poder acceptar aquesta hipòtesi, es plantejava la següent

2. Hipòtesi subordinada a la hipòtesi inicial: *En una taca de sang de mamífer damunt de substrat lític, els eritròcits presenten únicament les mateixes morfologies que apareixen en condicions fisiològiques (normals o patològiques).* En el cas d'haver de rebutjar aquesta hipòtesi, es plantejava la següent pregunta subordinada a la hipòtesi subordinada: *Quines morfologies caracteritzen els eritròcits de mamífer en una taca de sang damunt de substrat lític?*

Per a contrastar aquestes hipòtesis i, en el seu cas, contestar aquestes preguntes, s'estudiaren taques de sang humana, suposadament humana (tipus forense) i no humana (artiodàctil) damunt de materials lítics d'interès tecno-prehistòric i damunt d'altres materials diferents dels lítics, d'interès criminalístic. Després d'un envelliment d'entre 1 mes i 10 anys i 2 mesos, les mostres s'examinaren mitjançant un microscopi electrònic de rastreig.

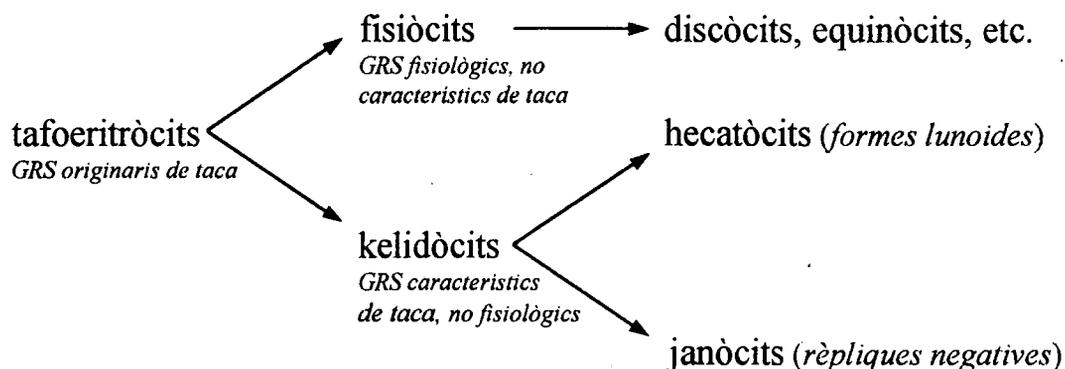
En base a aquest treball s'infereix que, en una taca de sang de mamífer damunt de substrat lític:

1. *La preservació morfològica dels eritròcits és experimentalment independent de la seva antiguitat.* Aquesta afirmació té un caràcter probable i no necessari, d'acord amb els principis lògico-probabilístics.

2. Els eritròcits exhibeixen també altres morfologies diferents de les que apareixen en condicions fisiològiques (normals o patològiques).

3. Les morfologies que caracteritzen els eritròcits de mamífer en una taca de sang damunt de substrat lític són les formes lunoides i les rèpliques negatives.

Finalment, hom suggereix una sistemàtica morfològica per als eritròcits de mamífer originaris de taca -que seria vàlida per a, com a mínim, els substrats lítics- com segueix:



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS DE MAMÍFERO EN MANCHAS DE SANGRE: ESTUDIO SOBRE MATERIALES
LÍTICOS DE INTERÉS TECNOPREHISTÓRICO
Policarp Hortolà i Gómez
ISBN:978-84-691-1906-8/D.L: T-356-2008

AGRADECIMIENTOS

Al director de esta Tesis Doctoral, por su inestimable apoyo tanto a nivel académico como personal.

Al resto de mis compañeros del Área de Prehistoria de la Universidad Rovira i Virgili, por su constante estímulo durante el desarrollo de las investigaciones expuestas en esta Tesis Doctoral.

A los miembros del Tribunal de esta Tesis Doctoral, por su buena disposición a formar parte del mismo.

Al Museo Nacional de Ciencias Naturales en Madrid (CSIC), por proponerme para la adjudicación de la beca que me ha permitido finalizar esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Paul G. Bahn, prehistoriador independiente, por haberme facilitado una parte importante de la bibliografía sobre manchas de sangre prehistóricas.

Al Prof. Dr. Jordi Martinell y la Dra. Rosa Domènech, respectivamente Catedrático y Profesora Titular de Paleontología de la Universidad de Barcelona, por su consejo y ayuda durante la realización bajo sus auspicios del Programa de Doctorado de su Departamento.

Al Prof. Dr. Jaume de Porta, Catedrático de Paleontología de la Universidad de Barcelona (actualmente Profesor Emérito de la misma), por iniciarme en la Tafonomía.

Al Prof. Dr. David Serrat, Catedrático de Geomorfología de la Universidad de Barcelona y actual Director General de Recerca de la Generalitat de Catalunya, por iniciarme en la Paleoecología del Cuaternario.

Al Dr. Rafael Molina, Jefe de la Sección de Radioinmunoensayo del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona, por haberme instruido en la metodología del trabajo experimental.

A todos quienes, citados o no en el texto, han colaborado en una u otra forma en mi trabajo y lo han sabido valorar en su justa medida.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS DE MAMÍFERO EN MANCHAS DE SANGRE: ESTUDIO SOBRE MATERIALES
LÍTICOS DE INTERÉS TECNOPREHISTÓRICO
Policarp Hortolà i Gómez
ISBN:978-84-691-1906-8/D.L: T-356-2008

**ABREVIATURAS, SÍMBOLOS
ELEMENTALES Y FÓRMULAS
MOLECULARES**

Ag	plata (del lat. <i>argentum</i>)
Al	aluminio
ATPasa	adenosina-5'-trifosfatasa
Au	oro (del lat. <i>aurum</i>)
Blumenb.	Blumenbach
C	carbono
ca.	alrededor de (del lat. <i>circa</i>)
cf.	véase (del lat. <i>confer</i>)
CFU-S	unidad colonial en el bazo (del ingl. <i>colony-forming unit in the spleen</i>)
CH ₃ COOH	ácido acético (etanoico)
CH ₄ -N ₂ O	urea
Cl	cloro
CO ₂	anhídrido carbónico
CO ₃ ²⁻	bicarbonato (ion)
com. pers.	comunicación personal
Cu	cobre (del lat. <i>cuprum</i>)
Cuv.	Cuvier
°C	grados Celsius (centígrados)
DNA	ácido desoxirribonucleico (del ingl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
Desm.	Desmarest
EDS	Espectrometría por Separación de Energías (del ingl. <i>energy-dispersive spectrometry</i>)
Erxl.	Erxleben
Fe	hierro (del lat. <i>ferrum</i>)

Fig.	figura
fL	femtolitros (litros·10 ⁻¹⁵)
Ge	germanio
GRS	glóbulo(s) rojo(s) de la sangre
Hb	hemoglobina
HCl	ácido clorhídrico
H ₃ N	amoniaco
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno (agua oxigenada)
IgG	inmunoglobulina G
ingl.	inglés
K	potasio (del lat. <i>kalium</i>)
K ¹⁺	potasio iónico
kDa	kilodaltons (daltons·10 ³)
kV	kilovoltios (voltios·10 ³)
L.	Linneo
lat.	latín
Ma	mega-años (años·10 ⁶)
MEB	microscopio electrónico de barrido
MET	microscopio electrónico de transmisión
mg	miligramos
min.	minutos
mm ²	milímetros cuadrados
Na	sodio (del lat. <i>natrium</i>)
Na ¹⁺	sodio iónico

μm	micrómetros (metros $\cdot 10^{-6}$)
nm	nanómetros (metros $\cdot 10^{-9}$)
O ₂	oxígeno molecular
Osb.	Osbeck
P	fósforo (del lat. <i>phosphorus</i>)
Pa	pascales
PAS	ácido peryódico de Schiff (del ingl. <i>periodic acid-Schiff</i>)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del ingl. <i>polymerase chain reaction</i>)
Pd	paladio
p. ej.	por ejemplo
Pt	platino
S	azufre (del lat. <i>sulphur</i>)
s	segundos
SCT-UB	Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona
SDS	dodecil sulfato de sodio (del ingl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
s.f.	sin fecha de publicación impresa
SRC-URV	Servicio de Recursos Científicos de la Universidad Rovira i Virgili
UV	ultravioleta
VSG	velocidad de sedimentación globular
v/v	concentración en volumen/volumen
W	wolframio (tungsteno)
w/w	concentración en peso/peso (del ingl. <i>weight/weight</i>)
x	aumentos
[(fecha)]	sin fecha de publicación impresa (conocida por otros medios)

%	tanto por ciento
?	dato no confirmado
~	aproximadamente
≈	aproximado a

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS DE MAMÍFERO EN MANCHAS DE SANGRE: ESTUDIO SOBRE MATERIALES
LÍTICOS DE INTERÉS TECNOPREHISTÓRICO
Policarp Hortolà i Gómez
ISBN:978-84-691-1906-8/D.L: T-356-2008

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La sangre de los mamíferos	2
1.1.1. Generalidades	2
1.1.2. Hematología Comparada	2
1.1.3. Función	5
1.1.4. Estructura	6
1.1.4.1. <i>Plasma</i>	6
1.1.4.2. <i>Elementos formes</i>	7
1.1.4.2.1. <i>Hematopoyesis</i>	7
1.1.4.2.2. <i>Trombocitos</i>	8
1.1.4.2.3. <i>Leucocitos</i>	8
1.1.4.2.4. <i>Eritrocitos</i>	10
1.1.4.2.4.1. <i>Generalidades</i>	10
1.1.4.2.4.2. <i>Morfología y concentraciones típicas</i>	15
1.1.4.2.4.3. <i>Agregaciones eritrocitarias</i>	16
1.1.4.2.4.4. <i>Morfologías minoritarias y anormales</i>	16
1.2. Las manchas de sangre	18
1.2.1. Mecanismos de producción	18
1.2.2. Caracteres macroscópicos	19
1.2.2.1. <i>Forma</i>	19
1.2.2.2. <i>Color</i>	20
1.2.3. Origen de las manchas de sangre sobre herramientas líticas prehistóricas	21
1.2.4. Eritrocitos en manchas de sangre	22
1.2.4.1. <i>Interés práctico</i>	22
1.2.4.2. <i>Antecedentes</i>	23
2. OBJETIVOS	28
2.1. Ubicación y alcance de la investigación	29
2.2. Hipótesis y preguntas	29

3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. Materiales	32
3.2. Métodos	33
3.2.1. Obtención de las muestras	33
3.2.2. Determinaciones	34
3.2.2.1. <i>Substrato de la mancha</i>	34
3.2.2.2. <i>Superficie aproximada de la mancha</i>	34
3.2.2.3. <i>Screening in situ</i>	34
3.2.2.3.1. <i>Generalidades</i>	34
3.2.2.3.2. <i>Fundamentos de la determinación de albúmina y hemo-/mioglobina en las tiras Rapignost® Total-Screen L</i>	35
3.2.2.3.3. <i>Determinación de falsos positivos (evaluación de la especificidad) en las tiras Rapignost® Total-Screen L</i>	36
3.2.2.4. <i>Medidas meteorológicas</i>	37
3.2.3. Microscopia Electrónica de Barrido	37
3.2.3.1. <i>Generalidades</i>	37
3.2.3.2. <i>Fundamentos del microscopio electrónico de barrido</i>	38
3.2.4. Fotografía científica	41
3.2.4.1. <i>Obtención de negativos de electromicrografías</i>	41
3.2.4.2. <i>Positivado de negativos de electromicrografías</i>	41
3.2.4.2.1. <i>Soporte</i>	41
3.2.4.2.2. <i>Exposición</i>	42
3.2.4.2.3. <i>Tratamiento del papel expuesto</i>	42
4. ARTÍCULOS PUBLICADOS	44
4.1. SEM analysis of red blood cells in aged human bloodstains	45
4.1.1. Original	46
4.1.2. Traducción del inglés	68
4.2. SEM characterization of blood stains on stone tools	86
4.2.1. Original	87
4.2.2. Traducción del inglés	91

4.3. Application of SEM to the study of red blood cells in forensic bloodstains.....	97
4.3.1. Original.....	98
4.3.2. Traducción del inglés.....	101
5. ARTÍCULOS ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN.....	107
5.1. Experimental SEM determination of game mammalian bloodstains on stone tools.....	108
5.1.1. Original.....	109
5.1.2. Traducción del inglés.....	124
6. ARTÍCULOS SOMETIDOS PARA SU PUBLICACIÓN.....	135
6.1. Morphological characterisation of red blood cells in human bloodstains on stone: a systematical SEM study.....	136
6.1.1. Original.....	137
6.1.2. Traducción del inglés.....	153
6.2. Red blood cell haemotaphonomy of experimental human bloodstains on techno-prehistoric lithic raw materials.....	162
6.2.1. Original.....	163
6.2.2. Traducción del inglés.....	197
7. CONCLUSIONES.....	217
7.1. Observación.....	218
7.2. Hipótesis.....	218
7.3. Experimentación.....	218
7.4. Tesis.....	220
8. REFERENCIAS.....	221
9. TABLAS.....	242
9.1. Características de las muestras estudiadas.....	243
9.2. Determinación de los materiales líticos substrato de las manchas estudiadas.....	244
9.3. Detalles de los materiales no líticos substrato de las manchas estudiadas y descripción de las mismas.....	245

9.4. Determinación de falsos positivos (evaluación de la especificidad) en las tiras reactivas de urianálisis Rapignost® Total-Screen L	246
9.5. Calibración de la estación meteorológica analógica TEM®	247
9.5.1. Generalidades	247
9.5.2. Características técnicas de la estación meteorológica TEM®	247
9.5.3. Características técnicas de la sonda electrónica HMP35AC®	247
9.5.4. Temperatura	248
9.5.5. Humedad relativa.....	248
9.6. Estimación de los valores climatológicos: valores corregidos (y) para las lecturas directas del aparato meteorológico utilizado en la sala de mantenimiento de las muestras de manchas de sangre (x)	249
9.6.1. Temperatura	249
9.6.2. Humedad relativa.....	253
9.7. Medidas meteorológicas de la sala de mantenimiento de las muestras de manchas de sangre	259
9.8. Graduación del papel brillante Brovira-Speed® B 310 PE utilizado en la realización de positivos de electromicrografías	273
10. ADDENDUM	274
10.1. La Ciencia	275
10.2. El conocimiento científico	276
10.2.1. Inferencia deductiva	277
10.2.1.1. Generalidades	277
10.2.1.2. Tipos fundamentales de inferencia deductiva	279
10.2.1.2.1. Silogismo categórico	279
10.2.1.2.2. Silogismo hipotético	280
10.2.1.2.3. Silogismo disyuntivo.....	281
10.2.2. Inferencia incoada	281
10.2.2.1. Generalidades	281
10.2.2.2. Tipos fundamentales de inferencia incoada.....	282

<i>10.2.2.2.1. Analogía sustantiva</i>	282
<i>10.2.2.2.2. Analogía estructural</i>	282
<i>10.2.2.2.3. Inducción de primer grado</i>	283
<i>10.2.2.2.4. Inducción de segundo grado</i>	283
<i>10.2.2.2.5. Generalización estadística</i>	284
<i>10.2.2.2.6. Especificación estadística</i>	284
<i>10.2.2.2.7. Modus Ponens débil</i>	285
<i>10.2.2.2.8. Modus Tollens débil</i>	285
<i>10.2.2.2.9. Reducción fuerte</i>	286
<i>10.2.2.2.10. Reducción débil</i>	286
10.3. El método científico	287
10.4. Referencias	290

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS DE MAMÍFERO EN MANCHAS DE SANGRE: ESTUDIO SOBRE MATERIALES
LÍTICOS DE INTERÉS TECNOPREHISTÓRICO
Policarp Hortolà i Gómez
ISBN:978-84-691-1906-8/D.L: T-356-2008

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La sangre de los mamíferos

1.1.1. Generalidades

La sangre (del lat. *sanguis*) es una forma especializada de tejido conjuntivo compuesta por una suspensión de células en una matriz extracelular fluida, y que constituye el 6-8% w/w del cuerpo (Fawcett & Raviola 1994; Zhang 1999). La mayoría de las características estructurales y funcionales de la sangre de los mamíferos es compartida por el resto del subtipo Vertebrata. La fracción celular está compuesta por los denominados *elementos formes* o *figurados* de la sangre (Fig. 1), y la fracción fluida por el *plasma* sanguíneo, siendo la relación volumétrica entre ambas de aproximadamente 1:1 (Bargmann 1968; Lewis 1970; Schalm 1964; Zhang 1999).

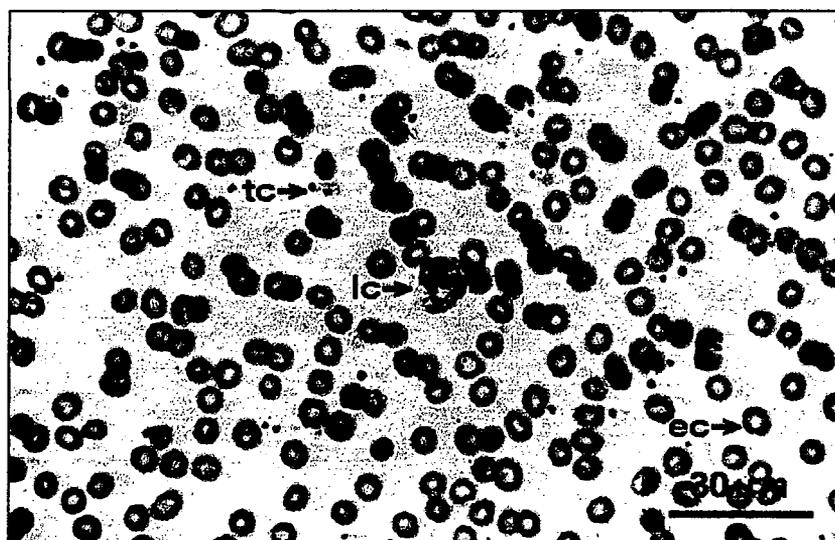


Figura 1. Sangre de mamífero. Ejemplo de una extensión de sangre humana, en la que pueden apreciarse los elementos formes de la sangre: glóbulos rojos de la sangre o eritrocitos (ec), plaquetas o trombocitos (tc) y un glóbulo blanco de la sangre o leucocito (lc). Tinción de May Grünwald-Giemsa automatizada llevada a cabo en el Laboratorio de Urgencias del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona. Observación realizada mediante microscopio óptico Leitz Diaplan (Wetzlar, Alemania) con sistema fotográfico automático Wild MPS 45 (Heerburg, Suiza) en el Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica de la Universidad de Barcelona (Campus Bellvitge).

1.1.2. Hematología Comparada

La composición y funciones de la sangre varía en los distintos taxones animales, dependiendo de la estructura de éstos y de su tipo de vida y requerimientos fisiológicos. Estas variaciones son estudiadas por la Hematología Comparada, cuyos principales puntos podemos resumir como sigue (Erslev & Beutler 1995; Ratcliffe & Millar 1988; Schmidt-Nielsen 1997; Turquier 1993).

En los animales filogenéticamente más primitivos, el medio interno consiste básicamente en agua y sales, estas últimas en concentraciones que difieren en mayor o menor medida de las que aparecen en el medio marino, según el tipo de osmorregulación. En las esponjas y anémonas de mar, todas las células están en contacto con el medio exterior o con un sistema de cavidades muy comunicadas con él. A nivel respiratorio o metabólico, cada célula funciona por cuenta propia o asociada con las que tiene más próximas. Así, en estos animales no existen líquidos sanguíneos: debido al pequeño tamaño del animal y a su estrecho contacto con el medio, el O_2 penetra del exterior por difusión y satisface las necesidades metabólicas. La propia corriente de agua que entra de fuera transporta los elementos nutrientes en el caso de las esponjas y de los celentéreos. En los animales de mayor tamaño y complejidad, el contacto con el entorno es menor, los tejidos internos se hallan separados del mismo por toda clase de membranas y barreras biológicas y el aporte de nutrientes y de oxígeno precisa de la existencia de un sistema circulatorio más o menos desarrollado; en los animales dotados de un sistema circulatorio diferenciado y cerrado, el líquido sanguíneo circula por todo el organismo a través de los conductos vasculares impulsado por las contracciones del corazón. La función principal de los líquidos en circulación (hemolinfa y sangre, como veremos más adelante) es la distribución del oxígeno y de los nutrientes a las diferentes poblaciones celulares del organismo, así como el transporte de sus subproductos metabólicos (CO_2 , H_3N , CH_4-N_2O). En gusanos, el líquido circulante posee también una función de esqueleto líquido o *hidroesqueleto* (platelmintos, nemátodos) o de transmisor de fuerza para la locomoción (anélidos). En los animales pluricelulares en general, este líquido circulante lleva también hacia sus células-diana unos mensajes hormonales sintetizados por los diversos tejidos endocrinos (p. ej., en los vertebrados mamíferos, la tiroides, las glándulas suprarrenales, la hipófisis, etc.).

En su forma más sencilla, la circulación tiene una triple función: aprovisionamiento celular de oxígeno y de nutrientes, y evacuación de los desechos del metabolismo. Con ello, el líquido circulante crea unas relaciones privilegiadas entre poblaciones celulares especializadas y anatómicamente alejadas entre sí. Este sistema circulatorio difiere además según los taxones en lo que se refiere al número y diversidad de los elementos celulares, a la concentración de iones y biomoléculas y a la presencia de pigmentos respiratorios. Tales pigmentos intervienen también muchas veces en el transporte del CO_2 desde los tejidos hasta el aparato respiratorio, aunque este gas es transportado preferentemente en forma de CO_3^{2-} en el líquido circulante.

En los grupos inferiores, estos pigmentos se hallan disueltos directamente en el líquido sanguíneo, como es el caso de muchos gusanos y moluscos. Pero en invertebrados más avanzados ya hallamos el pigmento respiratorio ubicado en células especiales, las cuales serían más bien análogas que homólogas de los eritrocitos de los vertebrados, habiendo aparecido por evolución convergente debido a presiones ambientales similares. Hallamos estas células en algunos anélidos, nemertinos, forónidos, sipuncúlidos, poliquetos, equinodermos, moluscos e insectos.

En el líquido circulante de los invertebrados, numerosos tipos de células fagocitan los desechos celulares y tisulares, así como los microorganismos, y secretan una envoltura quística alrededor de los cuerpos extraños, especialmente los parásitos (*inmunidad no específica*). En poliquetos y gusanos de tierra, hallamos células circulantes que efectúan el transporte de los nutrientes entre la pared digestiva, situada en el centro de cada segmento, y los músculos parietales, o bien están encargadas de la defensa del organismo mediante la fagocitosis de los residuos celulares o el enquistamiento de los cuerpos extraños, por lo que son asimilables a los leucocitos de los vertebrados.

En los animales filogenéticamente más evolucionados (artrópodos, moluscos, vertebrados), el compartimento circulatorio adquiere preeminencia. En la mayoría de los moluscos (gasterópodos, lamelibranquios) y en los artrópodos (límulo, arácnidos, picnogónidos, crustáceos, miriápodos, insectos), este compartimento está completamente cerrado. Los vasos que lo forman se abren a vastas lagunas que rodean los órganos. El líquido del espacio extracelular va alternativamente hacia los vasos, que lo distribuyen por todo el organismo, y hacia las lagunas. Al no ser exactamente comparable a la sangre de los vertebrados -que se halla totalmente circunscrita en un sistema vascular-, a este líquido circulante se le ha dado el nombre de *hemolinfa*; ésta la hallamos también en algunos gusanos y equinodermos. La hemolinfa contiene a menudo Hb -con Fe y de color rojo- en solución o dentro de células y, en ciertas especies, otros pigmentos respiratorios protídicos como hemocianina -con Cu y de color azul- en solución, presente en numerosos crustáceos, hemeritina -con Fe e incolora- dentro de células, presente en sipuncúlidos y algunos priapúlidos, poliquetos, y braquiópodos, o clorocruorina -con Fe y de color verde- en solución, propia de cuatro familias de poliquetos. Un caso aparte lo constituyen los artrópodos con respiración traqueal -insectos, miriápodos (ciempiés), algunos arácnidos (segadores, pseudoescorpiones)-, en los que el aprovisionamiento de oxígeno para sus órganos lo efectúa un sistema de tubos ramificados (*tráqueas*),

que comunican directamente con el medio exterior; el líquido circulatorio de estos animales carece de pigmento respiratorio -excepto en las larvas de quironómidos- y sirve sobre todo de vehículo a los nutrientes y a las hormonas. Por otra parte, las funciones de los líquidos circulatorios se extienden a otras actividades además de la simple distribución de oxígeno y nutrientes (*cf.* 1.1.3.). El líquido circulante adquiere funciones accesorias: para romper el caparazón durante la muda (crustáceos), para el movimiento del sifón (moluscos bivalvos) o para la extensión de las patas (arácnidos) o la trompa (mariposas).

En los vertebrados (ciclóstomos, peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos), el compartimento circulatorio constituye un conjunto muy ramificado y totalmente cerrado. El líquido que circula por él (*sangre*, en sentido estricto) está encerrado en todo su trayecto y, por tanto, queda aislado del líquido percolado en los espacios extracelulares (*linfa*), por la pared de los vasos sanguíneos. La sangre constituye una entidad nueva que se interpone, en la circulación del oxígeno y de las disoluciones, entre el medio exterior y las células. Sin embargo, entre la sangre y la linfa tienen lugar intercambios permanentes, ya sea a través de la pared de los vasos, a nivel de los más finos de todos ellos (capilares), ya sea a nivel de brechas locales de su pared (*capilares fenestrados*). El líquido perdido por la sangre vuelve al compartimento circulatorio mediante un sistema de drenaje nuevo, el aparato linfático, gracias al cual se mantiene estable el volumen sanguíneo. El líquido circulante de los vertebrados (*sangre*) también es el más complejo, tanto por disponer de un mayor número de componentes celulares como por la variedad de biomoléculas que existen en su seno y la perfección de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos puestos en juego en ella, poseyendo un tipo de células (linfocitos) capaces de producir unas proteínas especiales (*anticuerpos*), capaces de fijarse en las moléculas extrañas (antígenos) e inducir contra ellas una reacción inmunitaria (*inmunidad específica*). Como ya se ha dicho, la sangre está constituida por dos componentes fundamentales: el plasma, líquido formado en su mayor parte por agua, y un conjunto de células, por lo general de aspecto ameboide y de función transportadora y fagocítica en los animales inferiores y de una gran complejidad y variedad en los vertebrados.

1.1.3. Función

Las principales funciones de la sangre de los mamíferos son (Routh, Eyman & Burton 1975; Schmidt-Nielsen 1997):

1. Respiratoria. Transporte de gases (O_2 y CO_2) entre los órganos respiratorios (p. ej. pulmones o branquias) y los tejidos, y almacenamiento del oxígeno.
2. Metabólica especializada. Transporte de metabolitos (p. ej. ácido láctico del músculo al hígado) facilitando la especialización metabólica.
3. Nutritiva. Transporte de nutrientes desde el intestino a los tejidos, y desde/a los tejidos de reserva (p. ej. tejido adiposo o hígado).
4. Excretora. Transporte de productos de desecho del metabolismo celular de los tejidos a los órganos de excreción, y de los órganos sintetizadores (p. ej. CH_4 - N_2O en el hígado) al riñón.
5. Inmunitaria. Defensa frente a la infección de los microorganismos, por acción de células de función no respiratoria (leucocitos).
6. Reguladora biomolecular. Transporte de sustancias reguladoras (hormonas, vitaminas y algunos enzimas) desde las glándulas endocrinas a los tejidos en los que ejercen su acción (*tejidos diana*).
7. Esquelética. Conferimiento de rigidez al órgano penetrador del macho.
8. Homeostática. Mantenimiento de la temperatura del cuerpo (*homeotermia*), del equilibrio hídrico, electrolítico, ácido-básico, del volumen sanguíneo (*coagulación*) y de la presión osmótica y arterial.

1.1.4. Estructura

1.1.4.1. Plasma

El plasma es en esencia una solución acuosa que contiene glúcidos (monosacáridos), lípidos (colesterol, triglicéridos, grasas, fosfolípidos), prótidos (seroalbúmina, globulinas, sistema del complemento, fibrinógeno, enzimas), aminoácidos y sales minerales en disociación iónica (electrolitos inorgánicos).

Las proteínas plasmáticas genéticamente polimórficas han sido utilizadas para la individualización de manchas de sangre (Carracedo 1985; Harada *et al.* 1987; Shutler & Tompkins 1988), especialmente antes del desarrollo de la técnica de la PCR (Beroldingen *et al.* 1989). En general, las proteínas plasmáticas de la sangre contribuyen de forma decisiva al mantenimiento del balance hídrico del cuerpo al regular la presión osmótica de la sangre

(*presión oncótica*), y, junto con los electrolitos inorgánicos, al mantenimiento del pH sanguíneo (*efecto tampón*) (Lewis 1970; Voet, Voet & Pratt 1999). Las seroalbúminas son esenciales para el mantenimiento de la presión oncótica y el transporte de pequeñas moléculas insolubles; las α - y β -globulinas transportan diversas moléculas orgánicas (glúcidos, lípidos) y elementos (Fe, Cu), mientras que las γ -globulinas (inmunoglobulinas o *anticuerpos*) son responsables de las reacciones del sistema inmunitario; el sistema del complemento interactúa en una cascada de reacciones (*cascada metabólica*), cuyos productos contribuyen a la respuesta inmune, al inicio de la inflamación y a la lisis de microorganismos invasores; el fibrinógeno es una glucoproteína soluble que polimeriza a fibrina insoluble durante la coagulación de la sangre (Fawcett & Raviola 1994; Routh, Eyman & Burton 1975).

1.1.4.2. Elementos formes

1.1.4.2.1. Hematopoyesis

El desarrollo de los elementos formes de la sangre se denomina hematopoyesis o hemopoyesis. El principal tejido hematopoyético de los mamíferos adultos es la médula ósea (Fawcett & Raviola 1994). La médula ósea roja posee varios tipos celulares (Zhang 1999): células adiposas, megacariocíticas, reticulares y hematopoyéticas. Las células adiposas son las de mayor tamaño de la médula ósea, las cuales con la edad van ocupando mayor volumen de la cavidad de esta médula. Los megacariocitos (células megacariocíticas) son células gigantes con un gran núcleo lobulado; por estrangulación de su citoplasma, dan lugar, en los mamíferos, a las plaquetas (Schumacher 1974; Zhang 1999). Junto con las fibras reticulares, las células reticulares, con núcleo ovoidal, forman una red de tejido reticular en el cual están contenidas las células hematopoyéticas. Éstas se diferencian a partir de células progenitoras (*stem cells*), descubiertas en el bazo y originalmente denominadas CFU-S, que poseen la capacidad de autorrenovarse y de producir una progenie capaz a diferenciarse (Lee & Dang 2000; Rothstein 1993). La diferenciación *in situ* de las células progenitoras da lugar a eritrocitos, plaquetas y leucocitos granulocíticos, tras varios estadios intermedios (*series hematopoyéticas*); por su parte, el tipo leucocitario de las células mononucleadas (linfocitos y monocitos) se origina también a partir de las células progenitoras, que en este caso maduran

fuera de la médula ósea: los linfocitos, en los ganglios linfáticos (linfocitos B) o bien en el timo y después el bazo (linfocitos T), y los monocitos, en el tejido conjuntivo de los órganos (Fawcett & Raviola 1994). Más adelante se tratan con mayor detalle la leucopoyesis granulocítica (*cf.* 1.1.4.2.3.) y la eritropoyesis (*cf.* 1.1.4.2.4.1.).

1.1.4.2.2. Trombocitos

Están implicados en la coagulación de la sangre y en el mantenimiento de la integridad funcional de los vasos sanguíneos (Lewis 1970; Zhang 1999). En los mamíferos, el papel de los trombocitos está representado por las *plaquetas*. En reposo, tienen forma de disco aplanado (Fig. 2); al ser estimuladas, emiten prolongaciones y adoptan una forma estrellada (Fawcett & Raviola 1994; Ware & Collier 1995). Su tamaño en el hombre es de 2-4 μm (Zhang 1999). En la médula ósea, el megacarioblasto aumenta de tamaño dando lugar al promegacariocito; éste aumenta todavía más su tamaño, convirtiéndose en megacariocito, que, por estrangulación, da lugar a las plaquetas (McDonald, Paul & Cruickshank 1989).



Figura 2 (Ware & Collier 1995). Trombocito de mamífero (plaqueta), visto al MEB.

1.1.4.2.3. Leucocitos

Denominados también *glóbulos blancos de la sangre*, son células no pigmentadas que incluyen un gran número de tipos distintos, que pueden agruparse en dos formas básicas: granulocitos y agranulocitos (células mononucleadas). Los leucocitos llevan a cabo sus funciones fuera del torrente sanguíneo. Están constatemente migrando a través de las paredes de los capilares y vénulas para devenir células libres en los diferentes tejidos conjuntivos, donde llevan a cabo sus funciones, completan su ciclo de vida y degeneran. Es decir, que cada

uno de ellos está solo transitoriamente en la sangre, la cual le sirve simplemente de vehículo para su transporte y diseminación (Fawcett & Raviola 1994).

Los granulocitos capturan los microorganismos invasores por el mecanismo de la fagocitosis y luego los digieren, con lo que quedan neutralizados. En base a la afinidad de sus gránulos por los colorantes de la tinción de Romanovsky para Microscopia Óptica, utilizada en frotis de sangre, los granulocitos se dividen en neutrófilos, basófilos y acidófilos (eosinófilos); los más numerosos son los neutrófilos -primeros en actuar en caso de infección- y los minoritarios los basófilos -cuyos gránulos contienen histamina y heparina- (Fawcett & Raviola 1994). Los leucocitos de la serie granulocítica no poseen características de superficie que puedan llevarnos a su diferenciación en neutrófilos, eosinófilos o basófilos mediante el MEB; sin embargo, pueden identificarse como grupo. Su tamaño en el hombre es de 12-15 μm (Zhang 1999). Poseen un contorno muy irregular, que en muchos casos es alargado y presenta protuberancias y apéndices bien definidos; además, la superficie se caracteriza por unas arrugas muy finas e irregulares que separan las depresiones adyacentes que existen sobre la superficie de la membrana celular (Platt 1982). La serie granulocítica se inicia con el mieloblasto, con un gran núcleo esférico u ovoidal, que muestra un diseño de cromatina con 3-5 nucleolos visibles. El mieloblasto da lugar al promielocito, con un tamaño mayor que aquel y de núcleo ovoidal de localización excéntrica, con cromatina periférica densa y 2-3 nucleolos distinguibles. El promielocito experimenta una división mitótica y se diferencia en un mielocito eosinófilo, neutrófilo o basófilo. Estos mielocitos han disminuido de tamaño respecto a su precursor, poseen un núcleo arriñonado, con cromatina condensada y a veces con nucleolos. Tras repetidas mitosis, los mielocitos devienen metamielocitos, los cuales continúan disminuyendo de tamaño. El núcleo tiene forma de herradura gradualmente más indentada, con cromatina condensada y sin nucleolos visibles. Los metamielocitos cesan en su división pero se convierten en formas en banda, que darán finalmente los granulocitos eosinófilos, neutrófilos y basófilos (Zhang 1999).

Los agranulocitos se dividen en monocitos y linfocitos. Los monocitos son fagocitarios, y tienen forma muy irregular, con una superficie replegada con gruesos perfiles lobulados y arrugas (Platt 1982). Su diámetro en el hombre es de 12-20 μm (Zhang 1999). Los monocitos penetran en el tejido conjuntivo y se transforman en *macrófagos*, los cuales fagocitan microorganismos y todo tipo de partículas y de cuerpos extraños ajenos al plasma, segregan complemento y sintetizan interferón (Zangh 1999). Los linfocitos no son fagocitarios,

encargándose de la respuesta inmunitaria humoral, mediante la elaboración de anticuerpos, y de la inmunidad mediada por células. Se clasifican en pequeños, medianos y grandes, siendo su diámetro en el hombre de 6-18 μm (Zhang 1999). La mayoría de linfocitos circulantes son esféricos y tienen un contorno con microvellosidades (Fig. 3) o relativamente liso (Platt 1982). Las dos principales categorías de linfocitos pequeños son los linfocitos B y los T, que difieren en su desarrollo, vida media y funciones; no se distinguen morfológicamente, pero tienen moléculas de superficie diferentes, a diferencia de un tercer grupo heterogéneo de linfocitos pequeños que carecen de marcadores de superficie indentificables (células nulas). Los linfocitos B son los productores de anticuerpos, mientras que los T estimulan la producción de anticuerpos de los anteriores; además, los linfocitos T citotóxicos (*killer cells*) se encargan de la inmunidad célula a célula, destruyendo hongos, parásitos y células infectadas por virus (Fawcett & Raviola 1994).

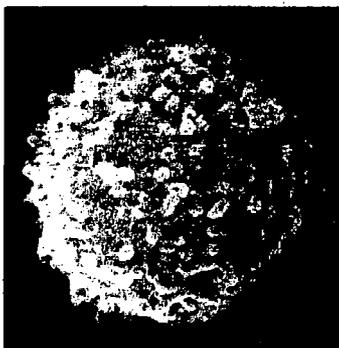


Figura 3 (Fawcett & Raviola 1994). Un tipo de leucocito (linfocito), visto al MEB.

1.1.4.2.4. Eritrocitos

1.1.4.2.4.1. Generalidades

Denominados también *glóbulos rojos de la sangre* o *hematíes*, en los mamíferos expulsan su núcleo antes de pasar a la circulación (Fig. 4) (Almarcha 1990; Jain 1986; Schumacher 1974). En el resto de vertebrados son típicas células nucleadas, aunque su DNA es inerte (Fawcett & Raviola 1994). Son células pigmentarias, al contener Hb, pigmento que le da el color rojo característico a la sangre. Esta heteroproteína o proteido está constituida por cuatro moléculas proteicas, cada una de ellas con un grupo hemo y un átomo de hierro al que

se puede unir el oxígeno para ser transportado así hasta las células. La Hb es la molécula destinada al transporte de gases desde los pulmones a los tejidos y viceversa.

Filogenéticamente, las primeras células respiratorias nucleadas aparecen en los nemertinos y en los forónidos (Scott 1966). Puesto que la viscosidad de la sangre es la misma si las moléculas de Hb están disueltas en el plasma o concentradas en eritrocitos (Schmidt-Nielsen & Taylor 1968), se ha considerado como más probable que la ventaja específica derivada de empaquetar la Hb en eritrocitos esté relacionada con la protección y regulación de la Hb y su afinidad por el O₂, por parte de los compuestos intracelulares eritrocitarios (Erslev & Beutler 1995).



Figura 4 (Barnhart *et al.* 1980; Barnhart, Wallace & Lusher 1983). Típico eritrocito anucleado de mamífero (mamut lanudo, *Elephas primigenius*), visto al MEB.

La ventaja evolutiva derivada de la desnucleación del eritrocito no parece ser muy grande, puesto que mientras que en anélidos ya hallamos las primeras células respiratorias anucleadas (Erslev & Beutler 1995), en todas las clases de vertebrados no mamíferos -tanto poiquiloterms (ciclóstomos, peces, anfibios y reptiles) como homeoterms (aves)- volvemos a hallar eritrocitos nucleados (Andrew 1965; Jain 1986; Schumacher 1974).

Los eritrocitos de mamífero típicos tienen la forma de disco bicóncavo, con un contorno circular que, en el caso del hombre, posee una media de 7,5 μm de diámetro -según LeBlond & Shoucri (1978), 7,49 μm -, 2 μm de espesor en los bordes y 1 μm en el centro, 87 μm^3 (fL) de volumen y 120-140 μm^2 de superficie; en estado maduro, aparte de núcleo tampoco poseen mitocondrias ni otros orgánulos citoplasmáticos (Almarcha 1990). La vida media de los eritrocitos de mamífero es corta, comparada con la de los otros vertebrados. En el hombre, esta vida media es de 100-120 días (Bull & Breton-Gorius 1995), y, en general, en los mamíferos adultos puede ser estimada de acuerdo con la ecuación $T = 68,9 \cdot M^{0,132}$, donde T es el tiempo (días) y M es el peso corporal (kg) (Vacha 1979, citado en Smith 1995).

La serie eritropoyética se inicia con el proeritroblasto, célula de gran tamaño, con un núcleo grande, excéntrico o central que ocupa la mayor parte de la célula, con 2-3 nucleolos y cromatina finamente granulada; en este estadio se inicia la síntesis de Hb. Tras varias divisiones mitóticas, el proeritroblasto da lugar al eritroblasto basófilo, célula redondeada, de diámetro celular y nuclear menor que el del proeritroblasto, sin nucleolo y cromatina nuclear condensada; la cantidad de Hb continúa aumentando. Por mitosis del eritroblasto basófilo se forma el eritroblasto policromatófilo, más pequeño y con la cromatina más condensada, en grupos irregulares. Esta célula sufre una serie de divisiones mitóticas que dan lugar al normoblasto (eritroblasto ortocromático), aún menor de tamaño y cuyo núcleo, de tamaño también reducido, contiene la cromatina más condensada. Después de 3 mitosis, el núcleo es expulsado del citoplasma y el normoblasto entra en el estadio de reticulocito, en el que la Hb ya ocupa todo su citoplasma y cuyo diámetro ha disminuido pero es todavía superior al del eritrocito maduro. En este estadio, ingresa en la sangre periférica y, finalmente, madura hasta dar lugar al eritrocito, disco bicóncavo, oval en los Camelidae (Erslev & Beutler 1995; Hawkey & Dennet 1989; Zhang 1999).

Los eritrocitos se comportan como gotas de fluido de muy baja viscosidad interna (Dintenfass 1976), cuya gran plasticidad (deformabilidad reversible) les permite circular por capilares angostos a expensas de grandes deformaciones, siendo capaces de recobrar su forma normal una vez superado dicho trayecto. Esta plasticidad es debida a las propiedades elásticas de su membrana plasmática, a la viscosidad del interior de la célula y a su relación superficie/volumen (Berga 1980; Bull & Breton-Gorius 1995; Chien 1975). El componente estructural responsable del mantenimiento de las propiedades elásticas de la membrana plasmática -y, por lo tanto, de la morfología típica del eritrocito- es un conjunto de proteínas asociadas a la membrana, que forman su esqueleto celular (*citoesqueleto*) (Bennett 1985; Bennett & Lambert 1991) (Fig. 5). Puede resumirse brevemente la ultraestructura de la membrana plasmática y citoesqueleto del eritrocito humano como sigue (Robertis & Robertis 1986).

La membrana plasmática está compuesta por lípidos y proteínas, contituyendo la denominada *bicapa lipídica* (lípidos, con proteínas en mosaico). Además, se hallan residuos glucídicos formando parte de los lípidos (glucolípidos) y de las proteínas (glucoproteínas). Una de las características principales de la organización molecular de la membrana plasmática es la asimetría de sus moléculas. Esto significa que entre la superficie interna, en contacto con

el citoplasma, y la superficie externa, los componentes se distribuyen asimétricamente. Esta asimetría es absoluta para las proteínas y las fracciones glucídicas de glucolípidos y glucoproteínas, y solo parcial para los lípidos.

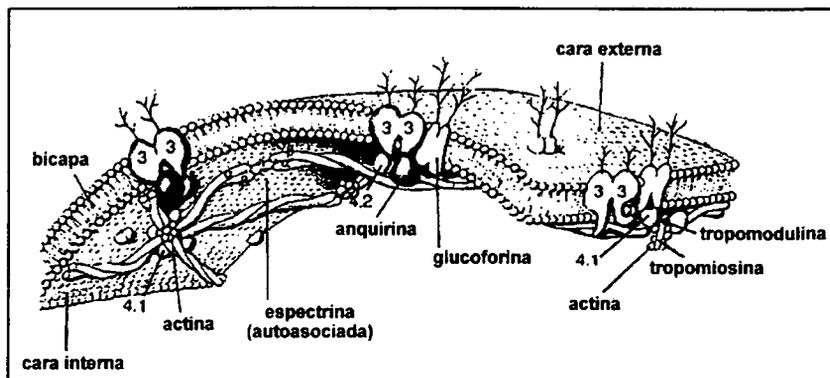


Figura 5 (Chien & Sung 1990, traducido del original en inglés). Esquema de la membrana y citoesqueleto del eritrocito humano. Los números indican diferentes proteínas denominadas según su posición relativa en un electroforetograma (gel de poliacrilamida), tras disolución de la membrana eritrocitaria en detergente iónico (SDS).

Tanto los glucolípidos como los glucoproteínas están situados exclusivamente en la superficie externa de la membrana. En el eritrocito se encuentra hexosa, hexosamina, fucosa y ácido siálico unido a proteínas. El ácido siálico está unido a las proteínas de la superficie externa de la membrana por medio de la N-acetilgalactosamina. A causa principalmente de la presencia de estos residuos de ácido siálico, la superficie externa de la membrana se halla cargada negativamente, provocando la repulsión mútua entre eritrocitos (Lowe 1987). Los lípidos forman una bicapa casi continua en cuya hoja externa predomina la lecitina y la esfingomielina, y en la interna, la fosfatiletanolamina y la fosfatidilserina.

Las proteínas representan el componente fundamental de casi todas las membranas biológicas. Desempeñan un importante papel, no solo en la estructura de la membrana, sino también en la permeabilidad, sea como transportadores o como canales, y en las propiedades de regulación o reconocimiento de ligandos. En las membranas plasmáticas se hallan enzimas y antígenos y varias clases de moléculas receptoras. Hay más de 30 enzimas asociados a la membrana, los cuales, como las otras proteínas, tienen una distribución asimétrica. De todos estos enzimas, la ATPasa es uno de los más importantes por su papel en la transferencia de Na^{1+} y K^{1+} a través de la membrana plasmática (*bomba de sodio*), y cuya actividad depende de la presencia de lípidos.

En la membrana del eritrocito humano existen unas 15 proteínas principales, con pesos moleculares de 15-250 kDa (Marill 1990). Para separar las proteínas de las membranas de los eritrocitos, el método generalmente utilizado consiste en disolverlas en un detergente iónico (SDS), y luego separarlas en bandas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Después se puede colorear el gel para proteínas o para glúcidos (técnica del PAS), y caracterizarlas densitométricamente. Igualmente, es posible observar el citoesqueleto del eritrocito con el MEB, y también con el MET tras fijación con ácido tánico y glutaraldehído.

Algunas proteínas del eritrocito son parte de la membrana plasmática *sensu stricto*, pero otras corresponden al citoesqueleto. Las proteínas de la membrana plasmática *sensu lato* se pueden clasificar en intrínsecas (integrales) y extrínsecas (periféricas), de acuerdo con el grado de asociación con la membrana y los métodos utilizados para solubilizarlas. Las proteínas intrínsecas, propias de la membrana plasmática, se separan mediante tratamientos drásticos. Habitualmente son insolubles en soluciones acuosas, están asociadas con los lípidos y la presencia de detergentes es necesaria para mantenerlas en una forma no agregada; estas proteínas pueden estar unidas a oligosacáridos, con los que forman glucoproteínas. La principal proteína intrínseca es la que corresponde en el electroforetograma a la banda 3 (canal aniónico); es una proteína de transmembrana que atraviesan la bicapa en una conformación plegada o globular, y forma dímeros de 95 kDa (Reithmeier *et al.* 1993), unidos por puentes disulfuro (S-S). Posee poca cantidad de glúcidos en el polo de la superficie externa. La principal glucoproteína es la glucoforina (PAS 1 y 2), que también atraviesa la membrana (proteína de transmembrana). Esta proteína tiene un peso molecular de 55 kDa, y comprende la mayor parte del ácido siálico y los glúcidos presentes en la superficie del eritrocito (sialoglucoproteína), que forman la cubierta celular (*glucocáliz*). Cerca del extremo carboxilo de la molécula existe una región muy hidrófoba que interactúa con los lípidos de la membrana. El extremo amino es más hidrófilo, y está expuesto al medio externo. A éste se unen los oligosacáridos que están en la superficie externa de la membrana. Estas glucoproteínas contienen determinantes antigénicos para los grupos sanguíneos ABO, y otros, como los grupos MN que reaccionan con antiseros de conejo, los que reaccionan con el virus de la influenza, con la fitohemaglutinina y la aglutinina del germen de trigo. Las proteínas extrínsecas, propias del citoesqueleto, se separan mediante tratamientos suaves, son solubles en soluciones acuosas y, habitualmente, no contienen lípidos. La espectrina (bandas 1 y 2) representa la masa más importante del citoesqueleto eritrocitario; está compuesta por dos

cadenas polipeptídicas no idénticas (α , de 240 kDa y β , de 220 kDa) y puede encontrarse tanto en forma de dímero como de tetrámero formando moléculas largas y flexibles. Los microfilamentos de espectrina se unen a la anquirina (banda 2.1) que, a su vez, está asociada a la superficie interna de la membrana por su unión a la proteína intrínseca denominada *canal aniónico* (banda 3). De esta manera la espectrina del citoesqueleto queda anclada a la membrana. La espectrina tiene también sitios de fijación para la banda 4.1 y la 5 (actina), la cual se encuentra formando oligómeros de aproximadamente 10 monómeros. En el citoesqueleto del eritrocito, la función de esta proteína sería limitar su extensión (MacDonald *et al.* 1994).

1.1.4.2.4.2. Morfología y concentraciones típicas

Los eritrocitos de mamífero, debido a la falta de núcleo, tienen típicamente -como se ha dicho anteriormente- la forma de disco bicóncavo (*discocitos*), a excepción de la familia *Camelidae*, en que son ovalados (*ovalocitos*) (Bargmann 1968; Hawkey & Dennet 1989; Schalm 1964; Schumacher 1974). Debido a su volumen individual mucho menor que el de los leucocitos, la cantidad de eritrocitos presente en un volumen dado de sangre de mamífero es extremadamente superior a la de leucocitos. Así, por ejemplo, en 1 mm³ de sangre tenemos en el hombre (*Homo sapiens*, valor hematológico normal para varones) una media \pm desviación estándar de $5,4 \pm 0,8 \cdot 10^6$ eritrocitos frente a $7,78 \pm 1,46 \cdot 10^3$ leucocitos (Lewis 1970); por lo que respecta a otros mamíferos, tenemos, por ejemplo, en el chimpancé (*Pan troglodytes*) $4,57 \pm 0,62 \cdot 10^6$ eritrocitos frente a $12,5 \pm 5,14 \cdot 10^3$ leucocitos, en el bisonte americano (*Bison bison*) $10,1 \pm 1,43 \cdot 10^6$ eritrocitos frente a $8,03 \pm 1,41 \cdot 10^3$ leucocitos, en el rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*) $6,99 \pm 0,56 \cdot 10^6$ eritrocitos frente a $11,0 \pm 4,75 \cdot 10^3$ leucocitos, y en el elefante asiático (*Elephas maximus*) $2,88 \pm 0,59 \cdot 10^6$ eritrocitos frente a $12,7 \pm 1,7 \cdot 10^3$ leucocitos, etc. (Smith 1995). Por otro lado, el tamaño medio de los eritrocitos es característico de cada especie, teniendo, a nivel taxonómico, un valor diagnóstico importante en Hematología Comparada y menor en Criminalística. Por ejemplo, el diámetro para eritrocitos secos promedia en el género humano 7,5 μ m -según micrografías de microscopio electrónico de barrido este valor promedio sería realmente de 7,49 μ m (LeBlond & Shoucri 1978)-, 7,4 μ m en el chimpacé, 6,2 en el bisonte -tanto en la especie americana como en la europea (*Bison bonasus*)-, 6,7 en el rinoceronte indio (*Rhinoceros unicornis*) y 9,2 en el

elefante -tanto en la especie asiática como en la africana (*Loxodonta africana*)-, etc. (Dittmer 1961).

1.1.4.2.4.3. Agregaciones eritrocitarias

Los eritrocitos forman en el plasma, de manera normal, agregados lineales en forma de pilas de monedas (*rouleaux*, cartuchos), que experimentan una agregación secundaria para formar redes o agregados “en masa”, de configuración diferente a la de los *rouleaux*. Esta agregación de los eritrocitos resulta de la acción de largas plasmaglobulinas asimétricas (principalmente, fibrinógeno para las formaciones en cartucho, α_2 -macroglobulina e inmunoglobulinas G y M para los agregados “en masa”) que forman puentes entre eritrocitos adyacentes y vencen su repulsión mutua debida a cargas superficiales negativas resultantes primariamente de los residuos de ácido siálico (Lowe 1987). El tamaño de los agregados eritrocitarios no es permanente en el tiempo, puesto que la agregación-desagregación representa un proceso dinámico en el que los eritrocitos se desagregan cuando el gradiente de velocidad aumenta, y se agregan cuando éste disminuye (Dintenfass 1976).

En los vasos sanguíneos la máxima tasa de flujo es en la pared, mientras que a lo largo del eje es mínima; en consecuencia, los mayores agregados eritrocíticos estarán presentes en la zona a lo largo del eje del vaso, de baja tasa de flujo. El grado más bajo de agregación (o completa desagregación) corresponderá, pues, a la región adyacente a la pared del vaso. El tamaño de los agregados depende también de la geometría del vaso; en capilares, debido a la disminución del espacio, sólo pueden existir agregados de unas pocas docenas de eritrocitos, mientras que *in vitro* los agregados eritrocitarios pueden contener miles o cientos de miles de eritrocitos (Dintenfass 1971).

1.1.4.2.4.4. Morfologías minoritarias y anormales

Mientras que los leucocitos y plaquetas poseen cierta rigidez (Guest, Derrick & Bond 1971), en el flujo capilar los eritrocitos pueden transitoriamente plegarse a lo largo de uno de sus ejes o bien asumir una amplia variedad de formas (Branemark & Lindström 1963), asociadas o no a diversas patologías (Almarcha 1990; Hawkey & Dennet 1989; Schalm 1964).

Basándonos en Rozman *et al.* (1990), podemos clasificar las formas eritrocitarias de los mamíferos de la siguiente manera (Fig. 6):

Discocito (eritrocito es disco).- Eritrocito típico, en forma de disco bicóncavo.

Acantocito (*spur cell*).- Eritrocito esferoidal con escasas espículas (3 a 12) de diferente longitud y dispuestas irregularmente en su superficie.

Astrocito (eritrocito en estrella).- Eritrocito plano, con parte central bicóncava alrededor de la que se disponen de 6 a 8 espículas grandes.

Codocito (*target cell*, eritrocito en forma de campana, eritrocito en sombrero mejicano).- Eritrocito en forma de campana y reducido espesor.

Dacriocito (*tear-drop cell*, eritrocito en lágrima, eritrocito en raqueta de tenis).- Eritrocito con una sola prolongación fina y alargada.

Drepanocito (*sickle cell*, eritrocito falciforme).- Eritrocito deformado por polímeros de Hb S.

Eccentricocito (*hemighost*).- Eritrocito cuya Hb se ha polarizado en una parte de la célula. Su superficie puede estar abultada por los cuerpos de Heinz.

Eliptocito (ovalocito).- Eritrocito de forma elíptica.

Equinocito (*burr cell*, *berry cell*, eritrocito espiculado, eritrocito crenado).- Eritrocitos con espículas cortas en toda la superficie y distribuidas regularmente, con formas que van desde el equinocito I al esferoequinocito II.

Esferocito (microesferocito, esferocito prelítico).- Eritrocito esférico.

Esquizocito (*helmet cell*, eritrocito en casco, eritrocito fragmentado, esquistocito).- Fragmento de eritrocito con forma irregular.

Estomatocito (eritrocito en forma de copa, discocito unicóncavo, eritrocito con boca).- Eritrocito unicóncavo con formas que van desde el estomatocito I al esferoestomatocito II.

Keratocito (*horn cell*).- Eritrocito con uno o más cortes que terminan en forma de cuerno.

Knizocito (kinizocito, eritrocito con pellizco).- Eritrocito con más de dos concavidades.

Leptocito (eritrocito aplanado).- Eritrocito con espesor inferior al normal.

Reticulocito tipo R₁.- Reticulocito inmaduro con grandes invaginaciones en su superficie.

Torocito (*doughnut cell*).- Eritrocito con redistribución periférica de la Hb y parte central muy delgada.

Xerocito (desicocito).- Eritrocito reducido de espesor y en forma de silla de montar.

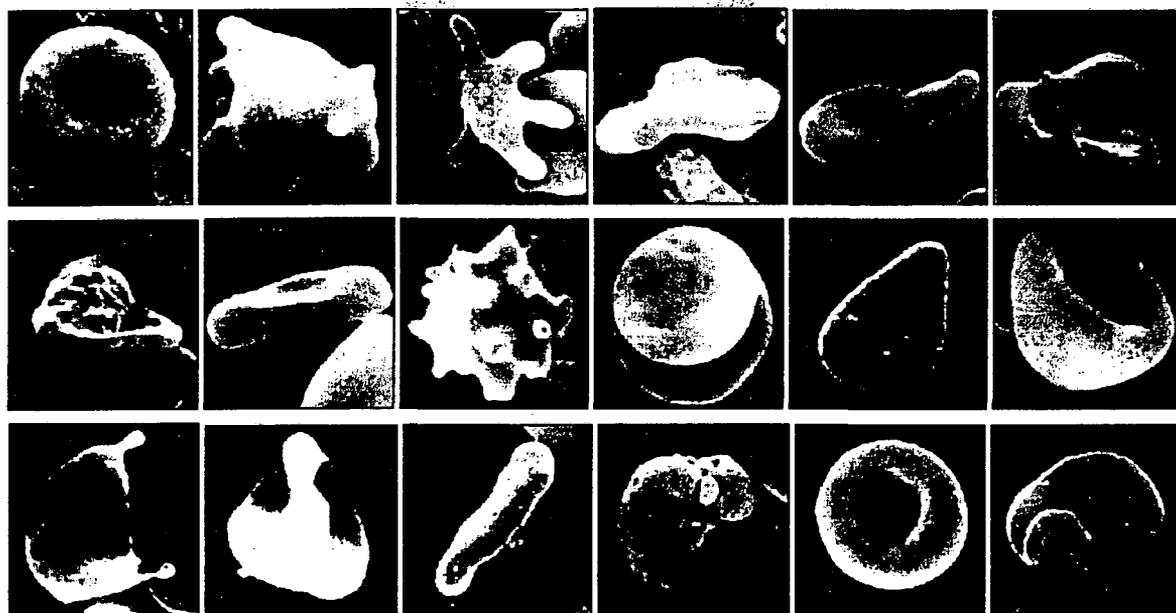


Figura 6 (Rozman *et al.* 1990). Clasificación morfológica de los eritrocitos de mamífero. *De izquierda a derecha*: discocito, acantocito, astrocito, codocito, dacriocito, drepanocito (*primera fila*); eccentrocito, eliptocito, equinocito, esferocito, esquizocito, estomatocito (*segunda fila*); keratocito, kinizocito, leptocito, reticulocito tipo R₁, torocito, xerocito (*tercera fila*).

1.2. Las manchas de sangre

1.2.1. Mecanismos de producción

Desde el punto de vista situacional o estático, una mancha puede definirse como una zona de distinto aspecto y color que el resto, producida por adición de un producto líquido o sólido blando, sobre cualquier superficie (Luis 1990). Desde el punto de vista procesual o dinámico, podemos definir una mancha como el resultado de una relación causal, en la que un contacto físico (causa) produce una traza o huella (efecto), definición que estaría en concordancia con el Principio de Intercambio de Locard. Éste afirma que cuando dos objetos entran en contacto siempre hay una transferencia de material desde cada objeto hacia el otro (Nickolls 1962) y suele sentenciarse como "todo contacto deja huellas" (Gorski 1997).

En la producción de una mancha de sangre, pueden distinguirse los siguientes mecanismos (López 1953; Luis 1990; Simonin 1966; Vargas-Alvarado 1991; Villanueva 1998):

1. **Proyección.** Tiene lugar cuando, o bien la sangre sale proyectada con cierta fuerza viva (por ejemplo, al seccionar una arteria), o bien la sangre cae por goteo al suelo -u otro substrato duro y liso- desde cierta altura. Según el ángulo de incidencia de la proyección

respecto al substrato, este mecanismo puede subdividirse en caída perpendicular y caída oblicua.

2. Esgurrimiento. La sangre babea y, al ir cayendo por acción de la gravedad, se concentra cierta cantidad de aquella.

3. Contacto. Cualquier objeto ensangrentado al contactar con un substrato deja una impresión.

4. Impregnación. Se trata de un mecanismo común a los anteriores, con los que se asocia; consiste en la imbibición del substrato (vestimentas, paños, etc.) por la sangre.

5. Limpieza. Es un mecanismo mixto entre el contacto y la impregnación, cuando se enjuga una mano u objeto ensangrentado en un tejido absorbente.

Una vez formada la mancha de sangre, su estabilización bioquímica estaría relacionada con la desnaturalización terciaria de las moléculas de seroalbúmina, la polimerización del fibrinógeno y mecanismos de coagulación (Loy 1987).

1.2.2. Caracteres macroscópicos

1.2.2.1. Forma

De acuerdo con las descripciones de López (1953), Fiori (1962) y Villanueva (1998), pueden establecerse las siguientes formas de manchas de sangre, correspondientes a sendos mecanismos de producción:

1. Gotas y salpicaduras. Proviene de las manchas de proyección. Si las gotas se precipitan perpendicularmente, forman un disco redondo que, conforme aumenta la altura, muestra dentellones primero y gotas independientes más tarde. Si las gotas son lanzadas oblicuamente, adquieren la forma de signos de admiración, con la parte más ancha hacia el lugar de origen.

2. Charcos, regueros y rebabas. Proviene de las manchas de escurrimiento. Su mayor interés radica en que permiten reconstruir los cambios de posición que haya experimentado el cadáver. El reguero sigue siempre en su dirección la influencia de la gravedad: regueros opuestos, por tanto, indicarán cambios de posición.

3. Impresiones de dedos, manos y pies. Proviene de manchas de contacto. Las dimensiones que alcancen las manchas en los tejidos textiles empapados pueden dar una

idea del tiempo que permanecieron en contacto con la sangre. La existencia de coágulos de sangre en las manchas de contacto indica supervivencia de la víctima.

4. Manchas circulares uniformes y de bordes netos. Proviene de manchas de impregnación, en tejido absorbente que ha sido empapado por sangre, la cual difunde por él. La existencia de coágulos de sangre en las manchas de impregnación indica también la supervivencia de la víctima.

5. Manchas de forma rectangular, con soluciones de continuidad y trazos transversales más densos. Son típicas de las manchas de limpieza, por imbibición de tejidos textiles, por ejemplo sangre en un trapo, a causa de limpiar un arma blanca.

1.2.2.2. Color

Según Vargas-Alvarado (1991), la tonalidad y la forma de las manchas de sangre dependen del soporte, aunque también cita un cambio de variación en función del tiempo: las manchas de sangre reciente serían rojas, luego parduzcas y finalmente negruzcas debido a transformación de la Hb.

Según Villanueva (1998), el aspecto de las manchas varía con la antigüedad y el soporte sobre el que recaen. En los tejidos absorbentes y claros las manchas recientes presentan un color rojo oscuro, que con el tiempo tiende a ennegrecerse más. Si las manchas han sido lavadas con agua el color se hace rosa y el pigmento difunde al tejido, si bien de un modo irregular, con lugares más densos que otros. En tejidos oscuros las manchas se visualizan mal. Cuando la mancha asienta sobre un soporte no absorbente, forma costras con aspecto de escamas brillantes o agujas. Si la sangre es reciente las escamas son rojas, aunque el color depende, con independencia de la edad, del grosor de la costra; a menor espesor el rojo es más acusado. Con la antigüedad las costras se van haciendo más oscuras.

Saforcada (1913) indica que los diferentes aspectos cromáticos que suelen presentar las manchas de sangre, desde el rojo escarlata, cuando son recientes, hasta el achocolatado grisáceo y el gris oscuro de las de remotas fechas, tienen lugar en lapsos de tiempo muy variables según la influencia de los diferentes factores: temperatura, humedad, luz, putrefacción, etc., pudiéndose solamente afirmar que se trata de una mancha reciente o antigua, sin poder precisarse la data de tantos meses o años. Por otra parte, según Cámara y Bayon (1875), cuanto más permeable es un cuerpo o tejido, más brillante es la mancha de sangre.

1.2.3. Origen de las manchas de sangre sobre herramientas líticas prehistóricas

La primera fabricación de herramientas líticas y consumo de carne y médula ósea están documentados arqueológicamente en el Miembro Hata de la Formación Bouri (valle medio del río Awash, Etiopía), de 2,5 Ma de antigüedad (Heinzelin *et al.* 1999; Semaw 2000; *cf.* Ambrose 2001 para una visión de conjunto de la tecnología paleolítica y su relación con la evolución humana). Así pues, desde el Plioceno algunos homínidos iniciaron el proceso de fabricación de herramientas con las cuales disminuir la efectividad de sus depredadores y al mismo tiempo expandir sus propios recursos tróficos, inmersos en una presión selectiva a favor de la destreza manual y la socialización avanzada (Stanley 1992). Como proceso, la caza comprende la acumulación sistemática de grandes cantidades de conocimientos sobre el comportamiento animal y sus contextos, y también la enseñanza a los más jóvenes, la inventiva y la resolución de problemas (Laughlin & Harper 1988). Ha sido observado experimentalmente que durante la manufactura de herramientas de piedra simples (olduvaienses o de Modo I), hay una fuerte activación de las áreas corticales y subcorticales del cerebro relacionadas con la cognición espacial compleja, la cual requiere la integración de diversas entradas sensoriales (p. ej. visión, tacto y percepción del movimiento y posición del cuerpo), la expansión de cuyas áreas ha sido particularmente importante durante el curso de la evolución humana (Stout *et al.* 2000). Más allá de estas consideraciones, la estrategia cazadora-recolectora permitió a las poblaciones humanas ocupar virtualmente cualquier hábitat de la Tierra (Newell 1997).

Cuando una herramienta es utilizada sobre un animal o vegetal, esa utilización puede dejar señales en la superficie del artefacto (filo o área de trabajo), en forma de *huellas de uso* y de *residuos orgánicos* (Fullagar 1998; Hayden 1979; Shipman, Fisher & Rose 1984). De esta manera, el implemento utilizado se convierte en un código portador de información sobre la realidad pasada; código que relaciona la tecnología prehistórica con la paleodieta y, por extensión, con las condiciones generales de vida del hombre prehistórico.

El origen más evidente de las manchas de sangre no humana debe buscarse en la caza y manipulación de los animales muertos. Como posibles fuentes de manchas de sangre específicamente humana, Bahn (1987) distingue las siguientes: cortes durante la talla o manipulación de las herramientas, sacrificios humanos, rituales de enterramiento, canibalismo y agresiones. A esta lista podrían añadirse otras fuentes posibles, de tipo ritual, como mutilaciones, escarificaciones y perforaciones.

1.2.4. Eritrocitos en manchas de sangre

1.2.4.1. Interés práctico

Según Hardesty (1979), los artefactos constituyen una aportación importante de datos paleoecológicos; por otra parte, Bernard (1983) califica la sangre de "espejo ecológico". La sangre sobre herramientas de cazadores-recolectores representa una excelente fuente de información sobre las relaciones hombre-entorno, es decir, sobre la Ecología Humana. Si este estudio se aplica a las relaciones hombre-entorno durante la prehistoria, entonces hablaríamos de Paleoeología Humana.

Para poder estudiar sangre antigua, es necesario que ésta se haya podido conservar en todo o en parte hasta nuestros días. Las leyes que regirían una tal preservación de este tejido no mineralizado entrarían dentro del campo de la Tafonomía Microscópica. A nivel de diversos tejidos, se ha informado de la aparición de eritrocitos en dinosaurio fosilizado (Pawlicki & Nowogrodzka-Zagorska 1998), en mamut congelado (Barnhart *et al.* 1980) y en especímenes humanos momificados (Rabino-Massa *et al.* 1967; Riddle *et al.* 1976; Zimmerman 1973).

El análisis de restos de sangre prehistórica se basa esencialmente en la aplicación, a la Arqueología Prehistórica, de técnicas microscópicas y bioquímicas propias de la Criminalística (examen de microrrestos, determinación de Hb de los eritrocitos, amplificación de DNA de los leucocitos, análisis de proteínas del plasma, etc). Este estudio de manchas de sangre puede suponer un valioso complemento a los estudios traceológicos. Siendo la determinación del material sobre el que fueron usadas las herramientas prehistóricas un tema del máximo interés en análisis lítico arqueológico (Hayden 1979), la presencia de sangre no humana representaría una prueba de la utilización de determinado implemento sobre un recurso animal. Además de ello, las manchas de sangre son un material que puede ser directamente datado, tanto por radiocarbono (Loy 1987, Loy *et al.* 1990; Nelson *et al.* 1986) como mediante Espectroscopia de Resonancia Electrónica del *Spin* (Miki, Kai & Ikeya, 1987), técnica no destructiva que sólo requiere 20-250 mg de muestra y cuyo rango de datación podría cubrir todo el Cuaternario (Geyh & Schleicher 1990).

En el diagnóstico criminalístico de la sangre, las técnicas que demuestran la presencia de algún elemento característico de ésta constituyen las llamadas *pruebas de certeza* o *ensayos decisivos* (López 1953; Villanueva 1998). Así, para caracterizar una mancha de sangre como

tal sin lugar a dudas, basta asegurarse de la presencia de alguno de sus elementos formes. Ya indicaba Saforcada (1913) que, si la sangre se seca rápidamente, la forma y volumen de los eritrocitos "suelen conservarse durante mucho tiempo", si bien este autor no especifica un lapso temporal concreto. Según López (1953), en las manchas los leucocitos pierden rápidamente sus características, y sólo los eritrocitos pueden investigarse con alguna esperanza de éxito. De acuerdo con esta opinión, los eritrocitos -más resistentes y numerosos que los leucocitos- serían el elemento forme idóneo para la determinación citomorfológica de manchas de sangre.

1.2.4.2. Antecedentes

Suele atribuirse el descubrimiento de los eritrocitos al microscopista holandés Jan Swammerdam (Amsterdam 1637-Amsterdam 1680), quien en 1658 observó y describió estos elementos formes en sangre de anfibio (Asimov 1990; Bynum 1986; Gwinn 1987). Desde el segundo cuarto del siglo XIX, y durante todo el resto del mismo, el estudio microscópico-criminalístico de elementos formes en manchas de sangre goza de su máximo predicamento (cf. Gaensslen 1983 para una visión de conjunto de la controversia sobre el valor del examen microscópico frente al de las pruebas químicas). En 1827, Dulong afirma la idoneidad del examen microscópico de eritrocitos en manchas de sangre (Mandl 1842, en Gaensslen 1983, pp. 21-27). Se atribuye al médico y químico menorquín Mateu Orfila (Maó 1787-París 1853) el primer intento documentado de utilizar el microscopio en la evaluación de manchas de sangre (Inman & Rudin 2000), si bien el modo de proceder para el examen microscópico de tales manchas lo habría tomado Orfila de una tesis del micrógrafo Mandl (Mata 1912). En 1875, Cámara y Bayon presenta en Madrid una tesis doctoral sobre el examen forense de manchas de sangre (Fig. 7), que concluye considerando el uso del microscopio "como uno de los que pueden proporcionar mayor brevedad, seguridad y precisión" (Cámara y Bayon 1875).

Tras el descubrimiento del sistema sanguíneo ABO por Karl Landsteiner en 1900, y especialmente tras el desarrollo de los métodos inmunológicos (p. ej., Culliford 1971), la determinación microscópica de elementos formes en manchas de sangre va cayendo en desuso a lo largo del siglo XX, reservándose el microscopio para las pruebas microquímicas de los cristales derivados de la Hb, fundamentalmente el clorhidrato de hematina (*cristales de Teichmann*) y el hemocromógeno. Si bien dentro de algunas obras forenses de finales de tal

siglo todavía se cita el estudio microscópico (óptico) de los elementos formes de la sangre en manchas (Lee & Pagliaro 2000; Villanueva 1998), con la invención de la técnica de amplificación génica de la PCR por parte de Kary Mullis y el aislamiento y caracterización de la ADN-polimerasa termoestable (*Taq*-polimerasa) por parte de David Gelfand y Susanne Stoffel a partir de 1985 (Erlich 1989), el estudio microscópico de manchas de sangre, que había quedado ya muy relegado en la literatura criminalística (Fiori 1962) es prácticamente abandonado en favor de la Hemogenética Forense (Geberth 1996). Más allá del aspecto forense, este enfoque hemogenético se extiende a las manchas de sangre en general, independientemente de su antigüedad (Sensabaugh 1994).

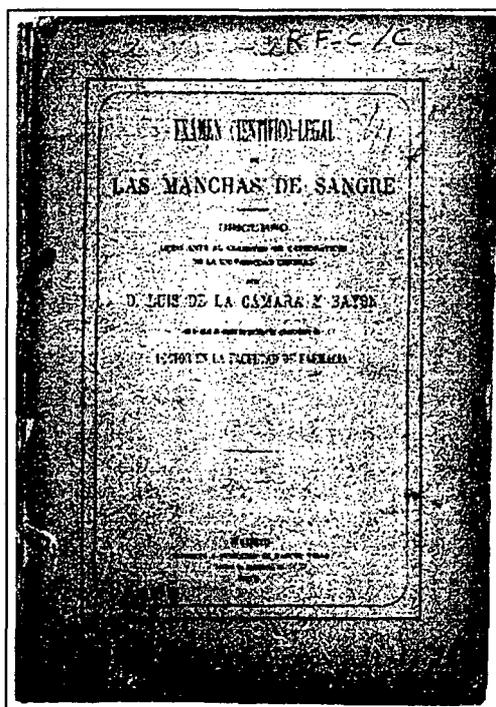


Figura 7. *Examen Científico-Legal de las Manchas de Sangre*. Portada de la disertación doctoral de Cámara y Bayon (1875). Ejemplar de la Biblioteca de Medicina (Universidad de Barcelona).

El primer uso de un MEB en la investigación hematológica de eritrocitos se debe a Clarke & Salsbury (1967). Por su parte, Dixon *et al.* (1976) utilizan por primera vez tal tipo de microscopio para estudiar manchas de sangre, si bien enfatizando la determinación de la composición elemental de la mancha (entendida ésta como un todo), mediante microanálisis de EDS; con tal microanálisis, hallan como elementos mayoritarios de las manchas de sangre el Cl, S, K, Na y P.

Por otra parte, desde los inicios del análisis de huellas de uso (Traceología Lítica), se planteó la posibilidad de inferir la función de los implementos líticos no solo por la presencia de tales huellas en su superficie, sino también por los residuos que se hubiesen podido conservar en las mismas. En su obra publicada en ruso en 1957 y traducida posteriormente al inglés, Semenov (1964) ya planteaba esta posibilidad. Obviamente, para que estos residuos se pudiesen estudiar, era necesario que se hubiesen conservado. La confirmación de esta conservación llegó al identificarse restos de tejido vegetal, hueso, diente y músculo sobre herramientas líticas (Briuer 1976); dentro de este mismo estudio, John Cockerman se ocupó por primera vez de la posible presencia de sangre sobre un útil prehistórico, utilizando la prueba química orientativa de la bencidina. En 1977, en la Conferencia sobre Análisis de Huellas de Huso celebrada en Burnaby (Canadá) (Hayden 1979), aunque sin tratar de los restos sanguíneos, algunos participantes presentan trabajos totalmente centrados en los residuos orgánicos sobre implementos líticos (cromatografía de aminoácidos, en Broderick; microscopia de restos vegetales y pelos animales, en Shafer & Holloway), o bien como complemento a sus estudios sobre huellas de uso, bien sean residuos orgánicos (hueso y cuerno, en Ahler) o inorgánicos pero de origen biológico (fitolitos, en Kamminga). Los primeros trabajos centrados en las manchas de sangre sobre herramientas líticas prehistóricas -con intencionalidad de determinación taxonómica, en base a las propiedades cristalográficas de la Hb- son realizados por Loy (1983), aunque unos meses antes de su publicación aparece una nota sobre los que realiza Richards (1982) basados en las investigaciones de Loy.

La primera observación microscópica de eritrocitos en manchas de sangre sobre herramientas líticas prehistóricas fue publicada Loy (1983), si bien ésta se realizó mediante microscopio óptico tras separación de la placa de sangre de la superficie del implemento (Fig. 8). Otras observaciones microscópicas ópticas de eritrocitos típicos de mamífero en manchas de sangre sobre herramientas líticas prehistóricas, han sido realizadas posteriormente para un amplio rango de ambientes (Loy 1987, 1998; Loy & Dixon 1998; Loy & Hardy 1992; Loy & Wood 1989).

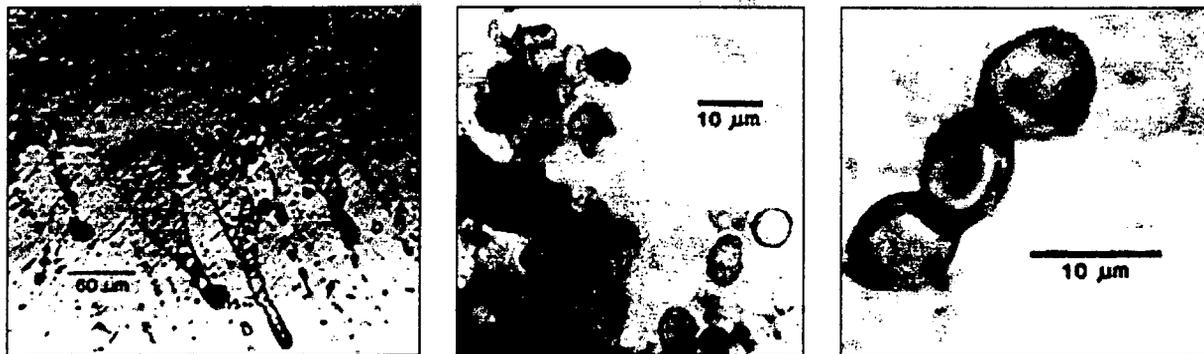


Figura 8 (Loy 1983). Primera observación documentada por microscopio (óptico) de eritrocitos en manchas de sangre sobre herramientas líticas prehistóricas. *Izquierda*: mancha de sangre (a) preservada sobre la superficie lítica (b) de un cuchillo de obsidiana excavado en el yacimiento arqueológico IgSk 7 (Columbia Británica, Canadá), asociado a restos orgánicos datados radiocarbónicamente en 2.830 ± 210 años. *Centro y derecha*: eritrocitos en una placa de sangre seca separada de la superficie de otro cuchillo más moderno, procedente del yacimiento IgSk 8 (Columbia Británica, Canadá).

Por su parte, Peter Bush realiza, dentro del trabajo de Gramly (1991, s.f.), la primera observación por MEB de una mancha de sangre sobre herramienta lítica, procedente de una excavación realizada en 1990 en el yacimiento de cazadores de cultura Clovis de East Wenatchee (Estado de Washington, EE.UU.) (Fig. 9). Como en el caso de Dixon *et al.* (1976), este estudio enfatiza la determinación de la composición elemental de la mancha (entendida ésta como un todo), mediante microanálisis de EDS; con tal microanálisis, los elementos mayoritarios de la mancha resultan ser el Fe y K. Estos resultados no serían, por tanto, coincidentes con los citados de Dixon *et al.*, e indicarían la dificultad de caracterizar una mancha de sangre mediante su composición elemental.

Las manchas de sangre prehistórica han sido aprovechadas a nivel biomolecular para realizar determinaciones taxonómicas utilizando las proteínas plasmáticas, la Hb o el DNA, tanto a nivel práctico (aplicación a yacimientos) como teórico (experimentación) (p. ej., Cattaneo *et al.* 1993; Gurfinkel & Franklin 1988; Hardy, Raman & Raff 1997; Hyland *et al.* 1990; Lowenstein 1993; Loy 1992; Loy & Dixon 1998; Loy & Hardy 1992; Loy & Matthaei 1994; Newman & Julig 1989; Newman, Ceri & Kooyman 1996; Tuross & Dillehay 1995; Tuross, Barnes & Potts 1996), mientras que con anterioridad a los trabajos presentados en esta Tesis Doctoral no había habido un interés arqueológico específico por los eritrocitos en manchas de sangre más allá de su utilidad inmediata para confirmar el origen sanguíneo de las manchas sospechosas de ser sangre y hacer una asignación taxonómica orientativa, de acuerdo con las técnicas de estudio de indicios de manchas de sangre habituales en Medicina Forense Criminalística.

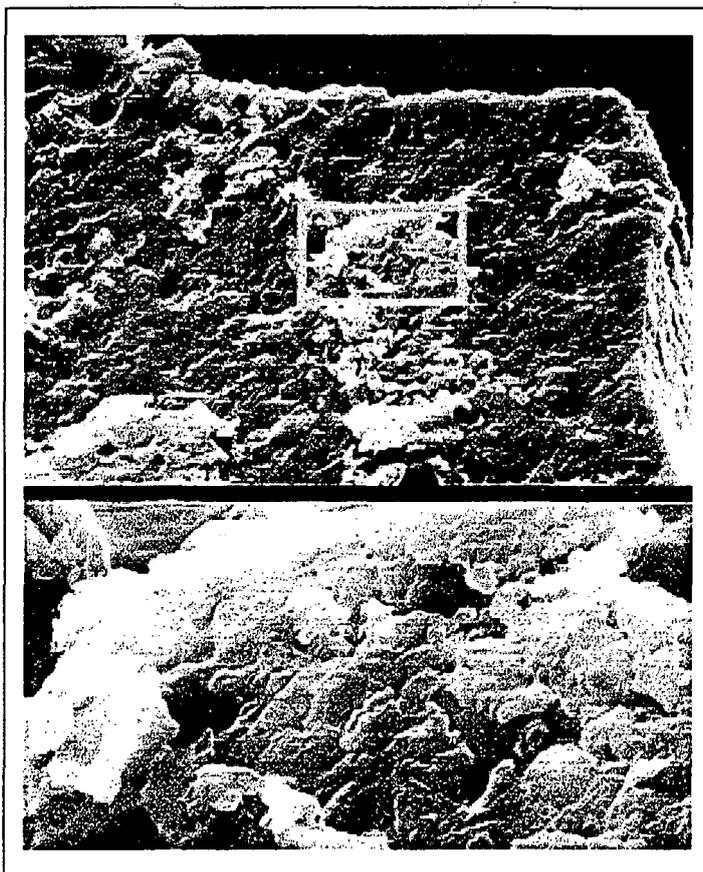


Figura 9 (Gramly 1991, s.f.). Primera observación documentada por MEB de una mancha de sangre en una herramienta lítica prehistórica, realizada a 700x (arriba) y 2.800x (abajo). La muestra corresponde al residuo adherido a un pequeño pedazo que fue separado del cuchillo número 1990.30 (yacimiento de East Wenatchee, Estado de Washington, EE.UU.), asociado a cenizas volcánicas datadas en 11.250 ± 250 años de antigüedad.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS DE MAMÍFERO EN MANCHAS DE SANGRE: ESTUDIO SOBRE MATERIALES
LÍTICOS DE INTERÉS TECNOPREHISTÓRICO
Policarp Hortolà i Gómez
ISBN:978-84-691-1906-8/D.L: T-356-2008

2. OBJETIVOS

2.1. Ubicación y alcance de la investigación

Como parte de los estudios de residuos de sangre sobre herramientas prehistóricas, la presente Tesis Doctoral se enmarca dentro del campo de la Paleoecología Humana (Fig. 10), como una estructura experimental necesaria a toda paleociencia, de acuerdo con el Principio del Actualismo (“el presente es la clave del pasado”).

Con ella, se pretende un doble propósito. Por una parte, contribuir al conocimiento de unos residuos orgánicos de interés en los estudios de determinación de usos de herramientas prehistóricas (Traceología Lítica), mediante el contraste de hipótesis y la respuesta a las preguntas planteadas (cf. 10.). Por otra parte, contribuir a la reversión de los estudios prehistóricos en beneficio del conjunto de la comunidad, mediante el desarrollo de procedimientos de estudio susceptibles de aplicación a las manchas modernas de sangre (Criminalística).

2.2. Hipótesis y preguntas

En base a la previa **observación** de típicos eritrocitos de mamífero (discocitos) en manchas de sangre sobre herramientas líticas prehistóricas, por parte de Loy (1983, 1987) y Loy & Wood (1989), se plantearon las siguientes hipótesis a contrastar y preguntas a responder:

hipótesis inicial: *En una mancha de sangre de mamífero sobre substrato lítico, la preservación morfológica de los eritrocitos es experimentalmente independiente de su antigüedad.*

En caso de tener que rechazar esta hipótesis, se planteaba la siguiente

pregunta subordinada a la hipótesis inicial: *¿Cuánto tiempo pueden preservarse morfológicamente los eritrocitos de mamífero en una mancha de sangre sobre substrato lítico?*

En caso de poder aceptar la hipótesis inicial, se planteaba la siguiente

hipótesis subordinada a la hipótesis inicial: *En una mancha de sangre de mamífero sobre substrato lítico, los eritrocitos presentan únicamente las mismas morfologías que aparecen en condiciones fisiológicas (normales o patológicas).*

En caso de tener que rechazar esta hipótesis, se planteaba la siguiente

pregunta subordinada a la hipótesis subordinada: *¿Qué morfologías caracterizan a los eritrocitos de mamífero en una mancha de sangre sobre substrato lítico?*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS DE MAMÍFERO EN MANCHAS DE SANGRE: ESTUDIO SOBRE MATERIALES
LÍTICOS DE INTERÉS TECNOPREHISTÓRICO
Policarp Hortolà i Gómez
ISBN:978-84-691-1906-8/D.L: T-356-2008

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

La mayoría de las manchas estudiadas fueron de sangre humana (*Homo sapiens*). Se estudiaron también manchas de sangre taxonómicamente indeterminada (supuestamente humana), de pécarí de collar o saíno (*Tayassu tajacu*) y gacela común o dorcas (*Gazella dorcas*) (Fig. 11). En los dos últimos casos, no se realizó una selección taxonómica previa, sino que se atuvo a las especies de mamífero de mayor tamaño disponibles; no obstante, el aprovechamiento de pécaris y gacelas durante el Paleolítico está documentado arqueológicamente (Howard 1935, citado en Rivet 1960: 46-47; Vermeersch, Paulissen & van Peer 1990).

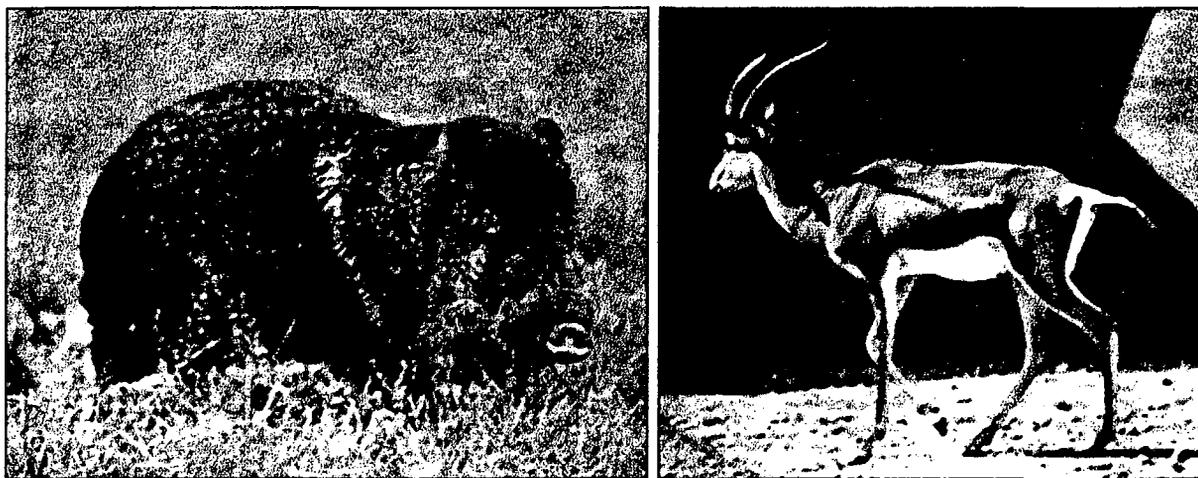


Figura 11 (Parenti 1973). Especies de artiodáctilo cuya sangre ha sido estudiada. *Izquierda*: pécarí de collar (*Tayassu tajacu*), tayasuido distribuido por América, de Texas a Patagonia. *Derecha*: gacela común o dorcas (*Gazella dorcas*), bóvido distribuido por África del Norte y Cercano Oriente.

Estas manchas se obtuvieron principalmente sobre sustratos líticos: sílex, caliza, grauvaca (tipo de arenisca) y obsidiana. A excepción de la obsidiana, de los demás materiales líticos está documentada su utilización como materia prima en los yacimientos en los que participamos en su excavación: sílex y caliza en el Paleolítico Medio del Abric Romaní (Vaquero 1998) y sílex, caliza y arenisca en el Paleolítico Inferior de la Sierra de Atapuerca (Rodríguez 1998). Respecto a la obsidiana, ésta se incluyó en el estudio por ser uno de los materiales utilizados más tempranamente en la fabricación de herramientas prehistóricas (Semenov 1964), siendo además la primera materia prima en la que está documentada microscópicamente la presencia de sangre (Loy 1983; cf. Fig. 8 en la Introducción). Además, como contribución a los estudios criminalísticos, se obtuvieron sobre sustratos no líticos manchas sobre acero inoxidable, y se recolectaron otras supuestamente de sangre sobre sustrato duro (asfalto) y blando (papel) (Tabla 7.1). En los dos últimos casos, tampoco se realizó una selección previa del sustrato de las manchas, sino que

también se atuvo a las muestras disponibles; sin embargo, desde el punto de vista criminalístico opina Aznar (1950) que la relación de localizaciones posibles de las manchas de sangre es interminable.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtención de las muestras

Las superficies de los substratos líticos a manchar de sangre se obtuvieron mediante la técnica de la *talla simple con percutor de piedra* (Bordes 1947) (Fig. 12), excepto en el caso de la obsidiana, que se utilizó directamente tal y como fue adquirida. Estas superficies a manchar no recibieron ningún tratamiento previo.

Las manchas de sangre humana delgadas fueron obtenidas por contacto, tras diversos accidentes menores. Las manchas de sangre humana gruesas se obtuvieron *ex profeso* por el mecanismo de proyección en caída libre, tras punción dactilar mediante una punta de bisturí del nº 8 Swann-Morton B. S. 2982 (W. R. Swann Co. Ltd., Sheffield, Reino Unido), esterilizada de origen. Las manchas de tipo forense fueron recolectadas *a posteriori*, en el caso del papel recogiendo toda la mancha, y en el del asfalto desprendiendo del firme de la calzada dos fragmentos con su correspondiente substrato. Las manchas de sangre de artiodáctilo fueron obtenidas por contacto, en el caso del pécarí de collar por desuello parcial del animal, y en el de la gacela por punción cardíaca directa, tras apertura de la cavidad torácica.

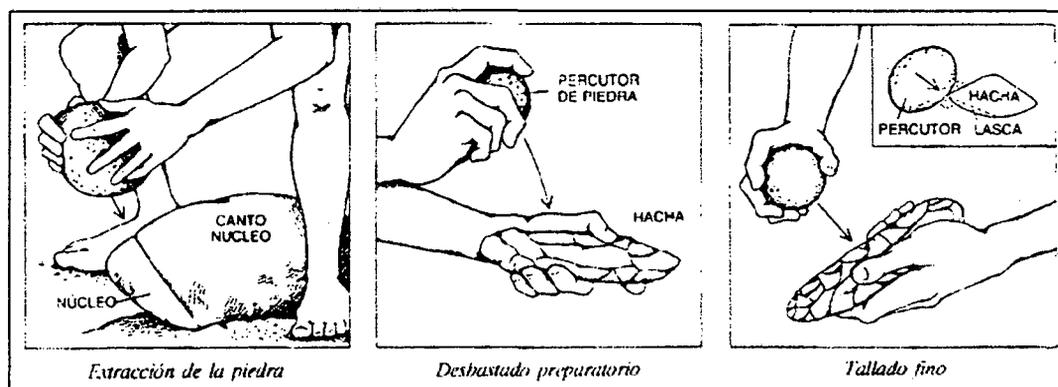


Figura 12 (Toth, Clark & Ligabue 1992). Técnica lítica de la talla simple con percutor de piedra.

3.2.2. Determinaciones

3.2.2.1. *Substrato de la mancha*

La asignación petrográfica de los substratos líticos se confirmó de acuerdo con diferentes propiedades de los mismos (Tabla 7.2). De los materiales no líticos substrato de las manchas, se dan detalles en la Tabla 7.3.

3.2.2.2. *Superficie aproximada de la mancha*

Para el cálculo de la superficie aproximada manchada de sangre, se utilizó una escuadra transparente (límite de error: $\pm 0,5$ mm). La escuadra se colocó aproximadamente a 3 mm por encima de la mancha de sangre. La superficie de ésta se dividió mentalmente en rectángulos, triángulos o círculos, según la distribución de morfologías, tomando como unidad el mm^2 . Se calcularon las áreas de estas figuras geométricas de acuerdo con las siguientes fórmulas (Postigo 1974):

1. Área del rectángulo = base·altura
2. Área del triángulo rectángulo = $\frac{1}{2}$ base·altura
3. Área del triángulo equilátero = $\frac{1}{4}\text{lado}^2 \cdot \sqrt{3}$ (se consideró $\sqrt{3} = 1,73$)
4. Área de la circunferencia = $\pi \cdot \text{radio}^2$ (se consideró $\pi = 3,14$)

Finalmente, las superficies parciales de los diversos rectángulos, círculos o triángulos se sumaron, dando la superficie total aproximada de la mancha.

3.2.2.3. *Screening in situ*

3.2.2.3.1. *Generalidades*

En los casos de manchas de origen desconocido, se llevó a cabo una determinación orientativa de la sangre mediante tiras reactivas de urianálisis Rapignost® Total-Screen L (Behringwerke AG, Marburg, Alemania). Estas tiras de ensayo o cribado (*screening*) se basan en la intensidad de coloración que adquiere una sustancia cromógena por acción directa o indirecta de la sustancia a determinar, siendo, pues, una prueba (*test*) química de tipo colorimétrico, y semicuantitativa. En Criminalística, tales tipos de pruebas no concluyentes se

denominan *pruebas de orientación* (Fiori 1962; López 1953; Luis 1990; Villanueva 1998). En nuestro caso, las sustancias a determinar fueron la albúmina y la hemo-/mioglobina, utilizándose para ello una superficie de mancha de $\sim 16 \text{ mm}^2$ tanto para la asentada sobre papel como para la asentada sobre asfalto.

3.2.2.3.2. Fundamentos de la determinación de albúmina y hemo-/mioglobina en las tiras Rapignost® Total-Screen L

La siguiente descripción de los fundamentos de las tiras está basada en la información suministrada en los propios envases (prospecto nº 198, edición septiembre 1989) y en Behringwerke AG ([1991]).

Las proteínas son aceptores de protones (iones hidrógeno). En presencia de una proteína y especialmente de la albúmina, el 4,5,6,7,3',5',3'',5'''-octabromofenol sulfonftaleína -un indicador de pH de color amarillo- pierde un protón, quedando en forma de anión y virando al color azul (Fig. 13, izquierda). La sensibilidad visual (límite de detección a simple vista) del campo para la albúmina es de $30 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$. Esta prueba es homóloga a la *prueba de Kastle-Mayer* (Fiori 1962; citado en López 1953, Luis 1990 y Villanueva 1998 como Kastle-Meyer), si bien en ésta el indicador de pH utilizado es la fenolftaleína, que vira a rojo.

La hemoglobina y la mioglobina poseen actividad peroxidasa, es decir, pueden descomponer peróxidos. En presencia de alguna de estas moléculas, el hidroperóxido de cumeno -que es un peróxido- pierde un átomo de oxígeno, el cual oxida la tetrametilbencidina que, así, vira al color verde (Fig. 13, derecha). La sensibilidad visual (límite de detección a simple vista) del campo para la hemo-/mioglobina es de $0,03 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$. Esta prueba es homóloga a la *prueba de Adler* (Fiori 1962; López 1953; Luis 1990; Villanueva 1998), si bien en ésta el peróxido es el H_2O_2 .

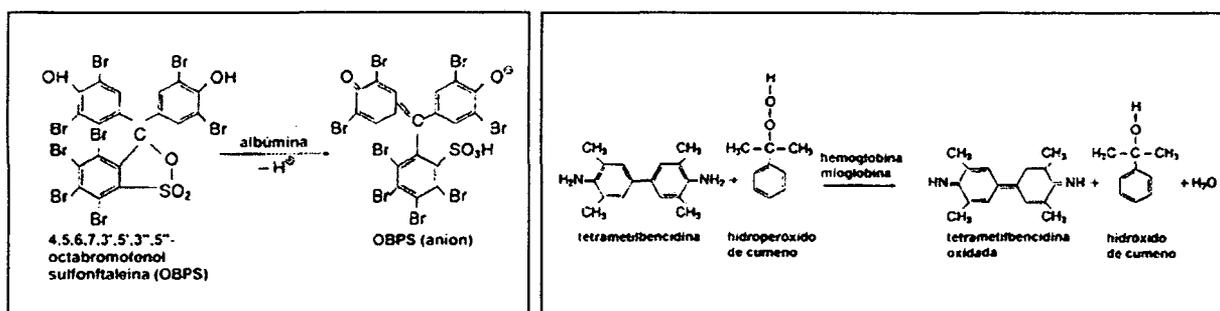


Figura 13 (Behringwerke AG [1991], traducido del original en inglés y modificado). Fundamentos químicos de la determinación de albúmina (izquierda) y hemo-/mioglobina (derecha) en las tiras Rapignost® Total-Screen L.

3.2.2.3.3. Determinación de falsos positivos (evaluación de la especificidad) en las tiras Rapignost® Total-Screen L

Se obtuvieron manchas sobre plástico transparente, de los siguientes materiales: sangre epitelial humana (*Homo sapiens*), sangre muscular bovina (*Bos taurus*), vino tinto (Sangre de Toro®, Miguel Torres™), salsa de chiles (Tabasco®, McIlhenny™), ketchup (Heinz™), tomate frito (Solís™), ciruela roja (*Prunus domestica*, zumo natural), clara de huevo de gallina (*Gallus domesticus*), leche fresca entera bovina (Letona™), acelga (*Beta vulgaris* var. *cycla*, macerado de hojas), suelo vegetal negro saturado de agua ("pasta saturada", según Guitián 1964) y sedimento arcilloso marrón ("pasta saturada", según Guitián 1964).

La sangre se utilizó para comprobar su reactividad frente a las tiras de urianálisis (control positivo). El vino tinto, la salsa de chiles, el ketchup, el tomate frito y la ciruela roja fueron seleccionados por el color rojo de sus manchas, susceptibles macroscópicamente de ser confundidas con sangre. La clara de huevo y la leche fueron seleccionadas por su alto contenido, respectivamente, en ovoalbúmina y lactoalbúmina, y, por lo tanto, potencialmente susceptibles de dar reacción positiva al campo para la albúmina de la sangre (seroalbúmina). Las hojas de acelga fueron seleccionadas por su alto contenido en clorofila, que ha sido reportada en tiras de urianálisis como una fuente de falsos positivos en el campo para la sangre (Loy 1983); de este material, además de la mancha, se realizó un banco de dilución (v/v) a partir del regenerado de la misma, hasta obtener una dilución superior a la primera que ya no exhibiera su color verde; ésta correspondió a 1/4 del regenerado, por lo que se realizó otra dilución hasta 1/8 del mismo.

Las manchas se dejaron secar entre 1 y 3 días, en función de su facilidad de secado, tras cuyo tiempo fueron regeneradas colocando varias gotas de agua destilada desionizada sobre la mancha seca, y se removió con una cucharilla de plástico, para acelerar el proceso. Se esperó a que el líquido obtuviera color -en el caso de la clara de huevo, a que el líquido obtuviera una consistencia filamentososa-, lo cual se consiguió tras 5-15 minutos. Seguidamente, se realizaron dos análisis independientes con diferente observador y tira reactiva, colocando una gota en cada campo correspondiente a *proteína (albúmina)*, *sangre (hemo-/mioglobina)* y *zona de compensación* reactivamente inerte, y leyendo los resultados, a diferentes intervalos de tiempo, de acuerdo con los valores de la escala colorimétrica especificados en el propio envase de las tiras. También se realizaron dos análisis independientes, con diferente observador y tira reactiva, de agua mineral de la red dura (cuenca del río Llobregat; dureza de

CaCO_3 en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$: media = 481, rango = 603-323; datos facilitados por la Sociedad General de Aguas de Barcelona, S.A.) y del agua destilada desionizada utilizada como solvente (control negativo). Los resultados -coincidentes en ambas series de análisis- se hallan expuestos en la Tabla 7.4. De los mismos se desprende que, ante una mancha sospechosa de ser sangre, una reacción a la vez positiva en los campos para la albúmina y la hemo-/mioglobina es un fuerte argumento para considerarla como tal.

3.2.2.4. Medidas meteorológicas

Dado que todas las herramientas sin enterrar manchadas de sangre fueron mantenidas en una misma sala durante el período del estudio, se tomaron *in situ* medidas de la temperatura y humedad relativa del aire de la sala. Estas medidas se realizaron mediante una estación meteorológica analógica TEM[®] (Nova Quartz[™], Barcelona), calibrada con una sonda electrónica de temperatura y humedad relativa HMP35AC[®] (Campbell Scientific, Inc., Logan, EE.UU.) (Tablas 7.5 y 7.6). Los datos originales de las medidas directas fueron corregidos de acuerdo con las correspondientes rectas de regresión estadística obtenidas en la calibración (Tabla 7.7).

3.2.3 Microscopia Electrónica de Barrido

3.2.3.1. Generalidades

La técnica morfoanalítica utilizada ha sido la Microscopia Electrónica de Barrido. El microscopio electrónico de barrido (MEB) ha sido el instrumento preferentemente utilizado en Tafonomía Microscópica (Bermúdez de Castro, Bromage & Fernández Jalvo 1989), y su uso es habitual en los análisis morfológicos de materiales tanto biológicos como no-biológicos; por ejemplo en estudios criminalísticos (fibras vegetales, pelos, etc.) o traceológicos (huellas de uso). Dada su *gran profundidad de campo y poder de resolución*, el microscopio electrónico de barrido permite obtener unos resultados morfoanalíticos muy fiables.

La base teórica de la Microscopia Electrónica de Barrido fue establecida en 1935 por M. Knoll, pero el primer microscopio electrónico no estuvo comercialmente disponible hasta 30 años después (Rozman *et al.* 1990). El MEB presenta las siguientes ventajas (Bignot 1988):

gran poder de resolución, al menos diez veces mayor que el de los microscopios ópticos; gran profundidad de campo, permitiendo una buena visión estereoscópica del objeto; facilidad de preparación del material y no destrucción del mismo; posibilidad de observar objetos de grandes dimensiones, comparadas con las de los objetos a observar en un microscopio óptico; posibilidad de variar el ángulo de observación, utilizando un portaobjetos giroscópico.

Las primeras aplicaciones del MEB al estudio de los eritrocitos se realizaron a finales de la década de 1960 (Clarke & Salsbury 1967; Tokunaga, Fujita & Hattory 1969). La característica más destacada del MEB es que permite observar la muestra en un campo profundo, lo cual nos proporciona una visión tridimensional de las células hemáticas y los detalles ultraestructurales la superficie celular. También permite el estudio las relaciones espaciales y topográficas entre las células hemáticas y diferentes tejidos hemopoyéticos (Berga *et al.* 1982, 1987; Woessner *et al.* 1983).

3.2.3.2. Fundamentos del microscopio electrónico de barrido

Podemos describir resumidamente los fundamentos de la técnica del MEB como sigue (Bignot 1988, Claugher & Taylor 1992; Goldstein *et al.* 1992; Locquin & Langeron 1985; Rozman *et al.* 1990).

Un MEB (Fig. 14) basa su trabajo en la exploración de una superficie mediante un microhaz de electrones, normalmente en un alto vacío para que tal microhaz pueda incidir sin desviaciones. Bajo el impacto del microhaz incidente (*sonda electrónica*), el objeto sometido al bombardeo de electrones emite diversas radiaciones: electrones secundarios, retrodispersados y de Auger, rayos X y fotones de diversas energías. Los electrones incidentes se producen en el *cañón de electrones* por un filamento incandescente de W, al cual se le aplica un voltaje de 1-50 kV. El chorro de electrones así obtenido se focaliza sobre la muestra mediante unas *lentes electrónicas*, que en realidad son unos campos electromagnéticos de intensidad conocida. Para obtener una imagen de la superficie de un objeto, se utilizan los electrones secundarios. Éstos, al no ser característicos en función del elemento químico, permiten formar una imagen completa de la superficie de la muestra y no selectiva según su composición. Para obtener una imagen electrónica de la superficie de un objeto, se barre éste con la sonda. Los electrones secundarios emitidos por la superficie al ser arrancados de sus órbitas por el bombardeo incidente, son recogidos por un detector de centelleo y modulan el

haz del tubo de un osciloscopio con un barrido sincronizado con el del microscopio. En un instante cualquiera hay una correspondencia entre un punto de la superficie del objeto y un punto de la pantalla del osciloscopio. La intensidad de la emisión de electrones del objeto depende en gran parte del ángulo de incidencia de la sonda, de manera que la emisión aumenta cuando el ángulo disminuye. En la pantalla aparecerá un punto o una zona brillante cuando el objeto posea una elevada capacidad de emisión electrónica: las superficies inclinadas, las aristas o los vértices, destacan como zonas claras, dando unos contrastes que sugieren la sensación de relieve. La imagen que aparece en la pantalla es así una representación absolutamente fiel de la superficie del objeto. De este modo, el MEB nos permite obtener imágenes de cualquier superficie, inorgánica u orgánica.

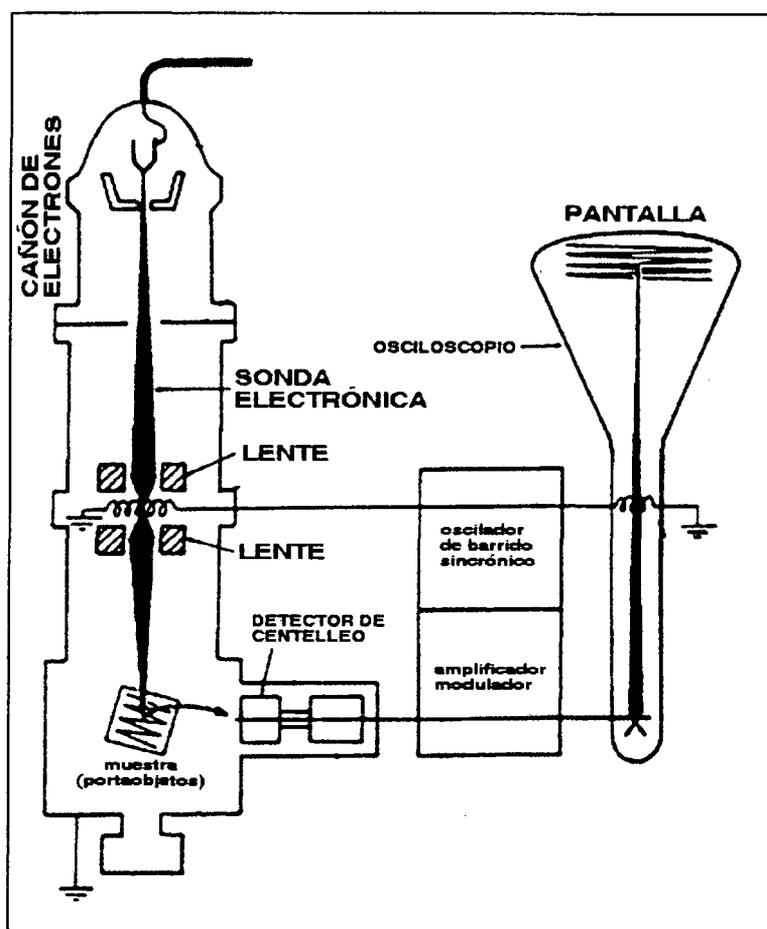


Figura 14 (Bignot 1988, simplificado). Esquema de un microscopio electrónico de barrido.

En los MEB clásicos, en malos conductores de la electricidad (p. ej. muestras orgánicas) se aplica a la superficie a observar una capa (en los SCT-UB, 60 nm por defecto) de un material conductor evaporado al vacío, proceso denominado *metalización*. Su objetivo es que

tales muestras sean buenas conductoras y reflejen los electrones; además, las protege de pérdidas de masa, evita que se sobrecalienten y que exhiban artefactos provocados por carga electrostática, y aumenta su contraste -lo cual equivale a una tinción microscópica óptica-. En los modernos microscopios de cámara ambiental, el vacío necesario no es elevado, y las muestras no necesitan ser recubiertas con una capa conductora de los electrones, puesto que el aire remanente hace la función de conductor. En nuestro caso no se dispuso de este último tipo de microscopios, por lo que todas las muestras fueron metalizadas.

En la metalización, el material conductor es generalmente Au o C (grafito), pero también puede ser Ag, Pt, Al, Cu, Ge o diversas aleaciones metálicas (Au-Pd, Au-Cu, etc.). Esta metalización se puede efectuar directamente sobre la muestra o tras un recubrimiento previo de C; en nuestro caso se realizó este recubrimiento previo en las muestras observadas en el MEB del SRC-URV. Tras fijación a un portamuestras de Cu, Al o C mediante plástico termofusible a pistola, se realiza un puente conductor de la electricidad que ponga en contacto la superficie a metalizar con el portamuestras, aplicando a la muestra, mediante pincel, una cierta cantidad de Ag o C coloidal (Ag en isopropilacetona o C en agua), por ejemplo tintura de plata de secado rápido referencia G302 o grafito coloidal referencia G303, ambos de la casa comercial Agar Scientific Ltd. (Stansted, Reino Unido). Seguidamente, se deja secar la muestra en un desecador -en caso de necesidad imperiosa, puede obviarse este paso- y seguidamente se metaliza mediante una unidad electrónica de recubrimiento. Si la muestra a metalizar es muy pequeña, puede montarse sobre un disco de cinta adhesiva por las dos caras, el cual, a su vez, se adhiere a un portamuestras pequeño de Al; en este caso, el puente conductor no pone en contacto directo el portamuestras con la muestra, sino con el disco adhesivo. En nuestro caso, este último método se ha utilizado para metalizar los fragmentos de asfalto manchado, de un tamaño reducido (*cf.* Tabla 7.1), utilizando portamuestras de Al de 13 mm de diámetro.

El aumento del MEB suele ser oscilar entre 40x-100.000x. Su poder de resolución es igual al área de emisión de los electrones secundarios, y viene a ser el mismo que el de la sonda electrónica. El aumento mínimo, suficiente para mostrar todos los detalles conseguidos por el MEB, viene dado por la ecuación: $G = \varepsilon/\varepsilon_E$, donde G = aumento, ε = poder de resolución del ojo humano ($75 \cdot 10^3$ nm), ε_E = poder de resolución del MEB (diámetro de la sonda). La resolución habitual suele oscilar entre 1-10 nm.

Las muestras orgánicas y los fósiles suelen acumular carga electrostática. Esta carga produce una disminución de la calidad de la imagen, y puede ser debida no solo a la composición de la muestra, sino también a una mala fijación de la misma al portamuestras o a un recubrimiento inadecuado. La carga puede eliminarse mediante una reducción del voltaje. En nuestro caso, para las manchas de sangre más delgadas se trabajó a 15 kV, reduciendo el voltaje a 10 kV para las manchas más gruesas.

3.2.4. Fotografía científica

3.2.4.1. Obtención de negativos de electromicrografías

Los negativos de las electromicrografías de MEB se realizaron sobre película profesional de alta sensibilidad T-Max 400 ISO (KODAK Ltd., Hemel Hempstead, Reino Unido).

En el caso del MEB de los SCT-UB, el revelado de los mismos fue llevado a cabo por el Laboratorio de Electromicrografía de los mismos, y su positivado fue realizado personalmente en el mismo laboratorio, en régimen de autoservicio. En el caso de las electromicrografías del MEB de la Universidad Rovira i Virgili, el proceso de revelado de negativos y positivado de los mismos fue llevado a cabo por el proveedor del SRC-URV.

3.2.4.2. Positivado de negativos de electromicrografías

3.2.4.2.1. Soporte

El positivado se realizó sobre papel brillante PE blanco/negro Brovira-Speed® B 310 PE (Agfa-Gevaert™, Leverkusen, Alemania) graduado según dureza (Tabla 7.8.). Este papel fue manipulado alumbrando la cámara oscura con bombilla amarilla o roja para tratamiento de papel fotosensible. Desde hace unos pocos años, existe en el mercado un papel multigrado único, con el cual lo que se hace variar no es el papel sino unos filtros graduados *ad hoc* colocados en la ampliadora; en nuestro caso no se utilizó este tipo de papel en los positivos realizados personalmente en el Laboratorio de Electromicrografía (SCT-UB) en razón de que aún no estaba disponible en el mercado en el momento de realizar aquellos.

3.2.4.2.2. Exposición

Se realizó con una ampliadora Laborator[®] (Durst Phototechnik AG, Brixen, Italia). Para ampliaciones de todo el negativo ($x < 4$), se utilizaron dos lentes condensadoras de 180 y 182 mm de diámetro respectivamente, y un objetivo de 150 mm de diámetro. Para ampliaciones de parte del negativo sin pérdida sensible de definición ($x = 4$) se utilizaron dos lentes condensadoras de 160 y 132 mm de diámetro respectivamente, y un objetivo de 80 mm de diámetro. En ambos casos, el enfoque se realizó manualmente.

La determinación del grado de papel y tiempo de exposición del mismo se realizó mediante un fotómetro-temporizador Sixtolab[®] (Gossen-Metrawatt GmbH, Nuremberg, Alemania), colocando el negativo en la ampliadora y, bajo foco encendido, procediendo de la siguiente manera:

1. Grado de papel:

- escoger un punto claro con información
- medir (MESS)
- guardar el test en memoria (TM)
- escoger un punto oscuro con información
- volver a medir apretando el botón MESS continuamente (el grado de papel vendrá dado por la cifra que aparece sobre la letra P)

2. Tiempo de exposición

- teclear el valor del índice predeterminado para cada grado de papel
- introducir tal valor (INDEX)
- escoger un punto claro con información
- medir (MESS)
- guardar el test en memoria (TM)

3. Valor promedio del tiempo de exposición

- escoger un punto claro con información
- medir (MESS)
- guardar el test en memoria (TM)
- escoger un punto oscuro con información
- medir (MESS)
- guardar el test en memoria (TM)
- calcular el valor promedio de ambas medidas (m/log)

3.2.4.2.3. Tratamiento del papel expuesto

El tratamiento del papel expuesto se realizó generalmente en cubetas, en los siguientes cinco pasos:

1. Revelado. En solución de Neutol[®] (Agfa-Gevaert[™], Leverkusen, Alemania) en agua corriente (1+9 volúmenes), durante 60 s.
2. Interrupción. En solución de CH₃COOH aproximadamente al 2% v/v (1 tapón de CH₃COOH en 1 litro de agua corriente), durante 10-60 s.
3. Fijación. En solución de Agefix[®] (Agfa-Gevaert[™], Leverkusen, Alemania) en agua corriente (1+9 volúmenes), durante 6 o más min.
4. Lavado. En agua corriente, durante 2-4 min.
5. Secado. Al aire, en posición vertical para favorecer el escurrimiento del agua y evitar así la formación de manchas sobre el papel.

El tratamiento se realizó colocando siempre la cara sensible del papel hacia abajo para evitar cualquier falta de contacto de la emulsión con el líquido de positivado. Se utilizaron pinzas diferentes para cada cubeta, evitando en todos los casos colocar las pinzas de la cubeta de interrupción y las de la de fijación en la cubeta de revelado.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
MORFOLOGÍA DE ERITROCITOS DE MAMÍFERO EN MANCHAS DE SANGRE: ESTUDIO SOBRE MATERIALES
LÍTICOS DE INTERÉS TECNOPREHISTÓRICO
Policarp Hortolà i Gómez
ISBN:978-84-691-1906-8/D.L: T-356-2008

4. ARTÍCULOS PUBLICADOS

4.1. SEM analysis of red blood cells in aged human bloodstains

Policarp Hortolà. 1992. *Forensic Science International* **55**: 139-159

4.1.1. Original

Forensic Science International, 55 (1992) 139–159
Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.

139

SEM ANALYSIS OF RED BLOOD CELLS IN AGED HUMAN BLOODSTAINS

POLICARP HORTOLÀ

*Laboratory of Archaeology of the University of Barcelona at Tarragona (LAUBT), Plaça Imperial
Tàrraco 1, E-43005 Tarragona, Catalonia (Spain)*

(Received November 25th, 1991)
(Revision received May 15th, 1992)
(Accepted June 10th, 1992)

Summary

Mammal red blood cells (RBC) in bloodstains have been previously detected by light microscopy on stone tools from as early as $100\,000 \pm 25\,000$ years ago. In order to evaluate the degree of morphological preservation of erythrocytes in bloodstains, an accidental human blood smear on white chert and several experimental bloodstains on hard substrates (the same stone – white chert; another type of stone – graywacke; a non-stone support – stainless steel), were stored in a room, in non-sterile and fluctuating conditions, for lengths of time ranging from 3 to 18 months. Afterwards, the specimens were coated with gold and examined by a Cambridge Stereoscan 120 scanning electron microscope. Results revealed a high preservation of RBC integrity, with the maintenance of several discocytary shapes, a low tendency to echinocytosis and a frequent appearance of a moon-like erythrocytary shape in the thinner areas of the bloodstains.

Key words: Red blood cells; Bloodstains; Scanning electron microscopy (SEM)

Introduction

Morphological preservation of typical mammalian red blood cells (RBC) in bloodstains has been seen even on prehistoric stone tools from as long as $100\,000 \pm 25\,000$ years ago and in other tools of lesser age, in a wide environmental range [1–3]. Stabilisation of bloodstains as a whole is related to a cross-linking within the unorganized polymer formed by the tertiary denaturation of the serum albumen molecules, fibrinogen polymerisation and clotting mechanisms [1]. The changes in appearance of anucleated RBC under low-flow hemorheological conditions are comparable to those under null-flow during the drying time of the fresh bloodstain. It may be summarized as follows.

First, erythrocytes in plasma form either linear aggregates (rouleaux) which undergo secondary aggregation to form networks, or 'clump' aggregates of con-

Correspondence to: Policarp Hortolà, P.O. Box 37045, E-08080 Barcelona, Catalonia, Spain

0379-0738/92/\$05.00
© 1992 Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.
Printed and Published in Ireland

figuration different from that of rouleaux. This RBC aggregation results from the action of long, asymmetrical plasma globulins (mainly, fibrinogen for rouleaux, α_2 -macroglobulin and G and M immunoglobulins for 'clump' aggregates) which form bridges between adjacent RBC and overcome their mutual repulsion due to negative surface charges resulting primarily from sialic acid residues [4].

Later on, aggregates evanesce and fluid leaves the RBC and the cells shrink due to the hypertonicity of plasma by its water evaporation [5,6]. Characteristic shrinkage or shape change of the typical biconcave disk RBC (discocyte) may involve one of the two following different routes: (i) discocyte \rightarrow stomatocyte (cup-shaped cell) \rightarrow spherostomatocyte (various grades) \rightarrow spherocyte (spherical cell), or (ii) discocyte \rightarrow echinocyte (crenated cell, various grades) \rightarrow sphero-echinocyte (various grades to spherocytosis) [7,8].

Until now, routine microscopic examinations of RBC in either forensic and palaeobiological bloodstains have been made at the light microscopy level in the practical field to confirm the sanguineous origin of suspected smears and to make an orientative taxonomical assignment [1-3,9], but electron microscopy researches dealing with erythrocytary preservation in bloodstains have not been performed.

Because an experimental framework is necessary in all palaeoscience (according to Lyell's well known aphorism 'the present is the key to the past'), as a part of studies on ancient blood residues, the author has initiated a series of investigations using a scanning electron microscope (SEM) in order to observe the degree of general morphological preservation of RBC in aged bloodstains.

The majority of current morphological studies require the use of advanced instrumental techniques such as electron microscopy because of greater resolution and magnification; this allows reviews and new studies dealing with presumably well known materials to be performed.

This paper reports the analysis by SEM of aged human blood smears on several hard substrates.

Materials and Methods

Accidental sample

The material was a bloodstain of about 35 mm², directly collected on knapped white chert (a very fine-grained quartz rock with minor impurities, the word 'chert' including several varieties, such as jasper and flint). During a stone-knapping episode, in order to perform experimental replicas of palaeolithic tools according to the prehistorical technique of simple knapping by stone striker [10], an accidental slice of the left hand provided a thin bloodstain on a knife-like stone tool. The smearing of the substrate was probably made by the mechanism of 'contact'. Because of the slice when stone-knapping (most probably the main source of Stone Age human bloodstains [11]) and because the stone bloodsmear was not detected until several minutes after occurrence, disturbance in the natural staining that could alter characteristics of RBC microenvironment in a

bloodstain (such as thickness of plasma layer or cell aggregation) was not added. After occurrence, the blood smear was dried at about 14 °C, 83% relative humidity (RH), 1016 hPa atmospheric pressure, without direct sunlight or wind, in the open air for a period of about 5 h and then stored for 3 months under non-sterile and unmanipulated microclimatic room conditions in an approximate range of 12–18 °C and 70–83% RH.

Experimental samples

All the experimental samples were obtained by the mechanism of 'contact'.

Four-month-old bloodstains on stainless steel

A Swann-Morton B. S. 2982 stainless steel surgical blade (W. R. Swann & Co. Ltd., Sheffield, UK) was discontinuously smeared with blood from the knuckle of the right hand. The little bloodstains thus obtained, mainly thin but with several thick stains, altogether about 9 mm² of area, were dried at 19 °C, 65% RH and around 1005 hPa in the open air during 20 minutes with a moderate to strong wind and without sunlight. They were then stored for 4 months under nonsterile and unmanipulated microclimatic room conditions in an approximate range of 16–33 °C and 38–78% RH.

Twelve-month-old bloodstain on white chert

A knapped fragment of stone of the same white chert as the accidental specimen was directly smeared in a continuous area of about 35 mm² with blood from the upper lips area. The resultant stain was mainly thin and ultrathin, with a clear thick area. The smear was dried in a room without direct sunlight or wind, at 13 °C, 80% RH, around 1024 hPa, and later stored for 12 months under non-sterile and unmanipulated microclimatic room conditions in an approximate range of 11–34 °C and 40–84% RH.

Eighteen-month-old bloodstain on graywacke

On knapped graywacke (a dark grey sandstone, an arenite rock composed of sand-sized grains of wide-ranging mineralogies with a fine-grained clay matrix), a homogeneously ultrathin neck-blood smear of an area of about 1 cm² was dried in a room without direct sunlight or wind at 30 °C, 47% RH and around 1019 hPa. Later, the sample was stored for 18 months under non-sterile and unmanipulated microclimatic room conditions in an approximate range of 11–34 °C and 38–84% RH.

Sources of meteorological data

The drying conditions of the accidental bloodstain sample were estimated according to the available data for the approximate time and area of chert-knapping, extracted from the climatological summary of the official Zonal Meteorological Headquarters of Barcelona.

For experimental samples, the atmospheric pressures during the drying of the

142

smears were estimated from data provided by the Department of Physics of the Atmosphere (University of Barcelona), while temperature and relative humidity were directly taken 'in situ' during the bloodstaining.

Microclimatic room conditions during the times of storage were estimated according to the results of measurements taken in the room, on an average of every 3 days at different hours.

SEM procedures

After the specified time of storage, all the specimens were coated with gold by a SEM coating unit E 5000 sputter (Polaron Equipment Ltd., Watford, UK) and then examined at an accelerating voltage of 15 kV by a Stereoscan 120 scanning electron microscope (Cambridge Instruments Ltd., Cambridge, UK) at the Scientific-Technical Services of the University of Barcelona. Micrographs were made in an ISO 400 Tmax film (Kodak Ltd., Hemel Hempstead, UK).

Results

Accidental 3-month-old smear on white chert

Figure 1 shows a view, at low magnification, of the bloodstain (BS) in the cutting edge of the chert tool. From experience, the continuity of the smeared layer

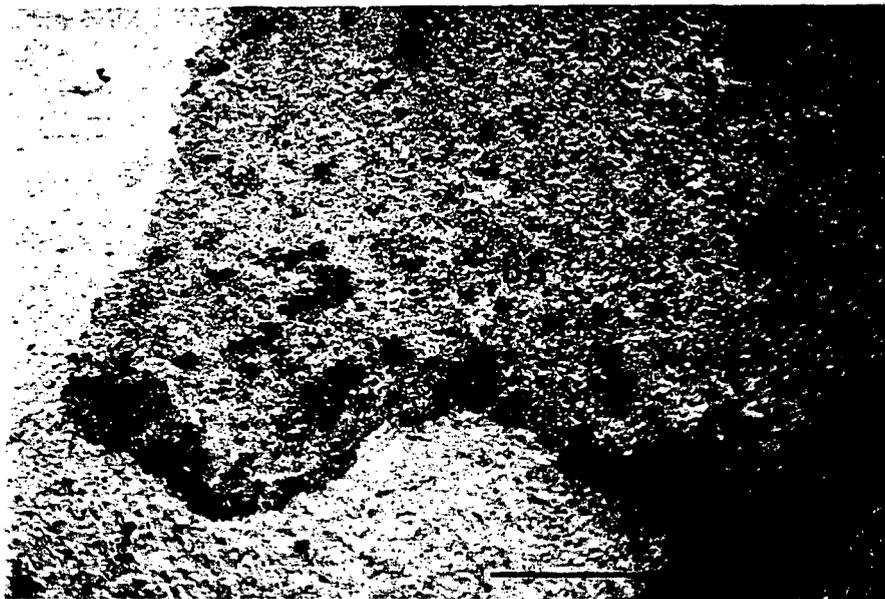


Fig. 1. Aspect at low magnification of the 3-month-old bloodstain (BS). It is localized at the area of the cutting edge of the white chert tool. The lack of a macrofracturation pattern in the smear is an indication of thinness. $\times 24$

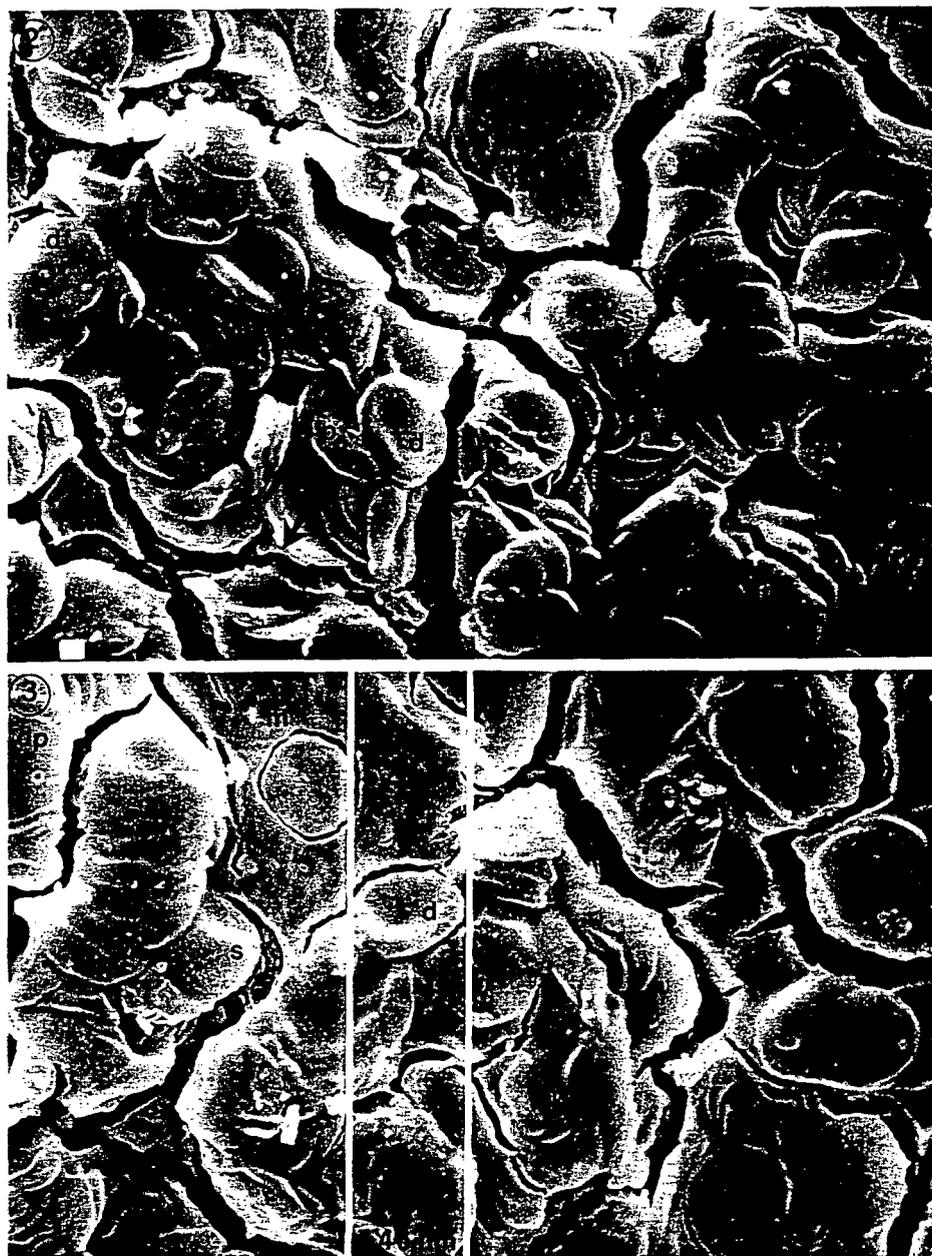


Fig. 2. Free and rouleaux-piled RBC, showing several erythrocytary shapes. Unaltered discocytes (d), free (df) and rouleaux-piled (dp) leptocyte-like and spherostomatocytes (s). Fragments of broken RBC (p and pm) and a RBC (i) with the imprint of the next red cell on its left are also seen. The arrow points to an erythrocyte which shows its true membrane under the plasma layer. $\times 2114$

Fig. 3. A RBC with a visible diameter close to that typical for human normocytes and an area of plasma matrix (m) circularly fractured around a spherostomatocyte. Lettering as Fig. 1. $\times 2016$

(i.e., the lack of a visible desiccation macrocrack pattern at this level) is a sign which corroborates its thinness.

RBC are shown in Figs. 2–4. In all of them, the naturally occurring desiccation microcracks of the bloodstain and the view of the plasma-coated free and rouleaux-piled superficial RBC can be seen. Preservation of cellular concavities in many cases, as well as the appearance of some cell membranes in areas of stain microcrack, indicate that the plasma layer on upper RBC is thin. Besides the morphologically typical RBC (discocytes, d), several erythrocytes of altered shapes are displayed in the bloodstain: free (df) and, at the head of rouleaux, piled (dp) flattened disks with little or no central depression (leptocyte-like), spherostomatocytes (s) and, in one case, a well preserved clear echinocyte (Fig. 4, e). Some fragments of broken erythrocytes (schizocytes) are also visible, mainly in Fig. 2 (p).

In Fig. 2, a RBC shows its true membrane under the cracked plasma layer (arrow), which indicates that the observed erythrocytary morphology is due to an effective preservation of the RBC structure in the plasma matrix and not to a simple plasma replica with a posterior cell destruction. However, negative replicas of the erythrocytary morphology due to the dried plasma prove to be possible, as is shown by the imprint on the left side of a RBC (i). In the same figure is shown a broken RBC (half-moon body) which displays a sectional view of its membrane (pm). In Fig. 3, a relatively extensive area of plasma matrix free of cells can be seen (m), although circularly fractured around an isolated

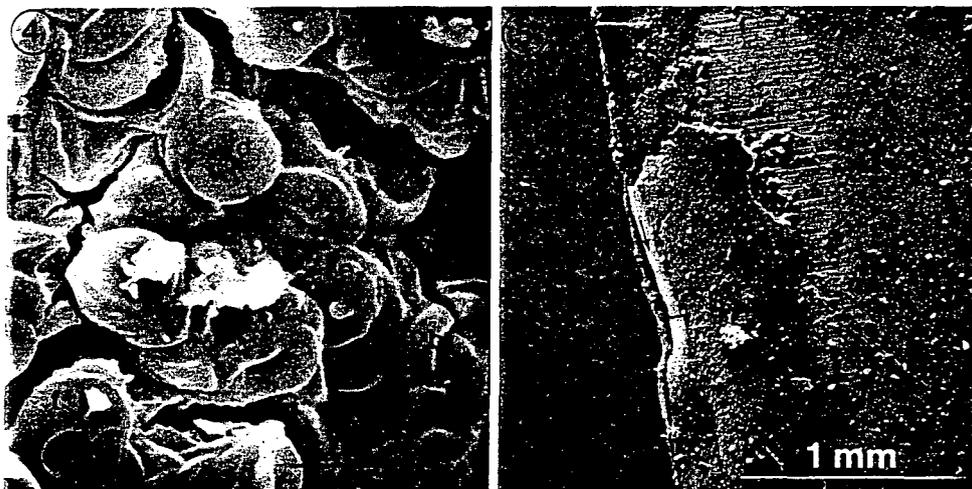


Fig. 4. An echinocyte showing the beginning of crenation (e) and a peripheral fragment of RBC broken prior to plasma fraction. Two unstimulated platelets (t) appear on a RBC. Lettering as in previous figures. $\times 2115$

Fig. 5. Aspect at low magnification of one of the 4-month-old thin bloodstains (BS). It is localized at the area of the blade edge. A view of crust can be seen. The external border of the edge (arrow) is free of superficial RBC. $\times 28$

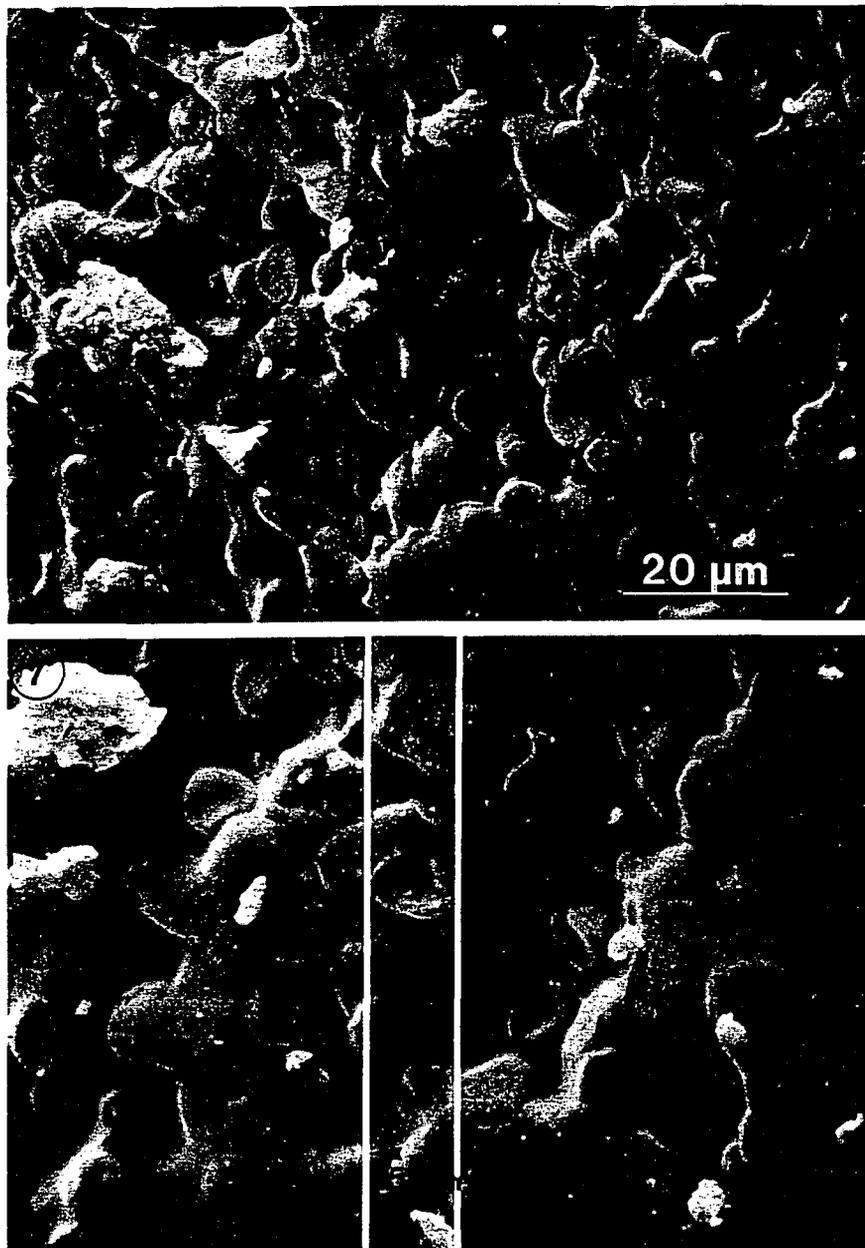


Fig. 6. RBC from the rugous area. Near-discocyte red cells are clearly visible in zones not covered by a thick plasma coating. $\times 1104$

Fig. 7. Two partially superimposed RBC displaying the appearance of one single erythrocyte with the typical size for normocytes, while the true visible diameter of exhibited RBC gave values of around $6.75 \mu\text{m}$. $\times 1531$

spherostomatocyte, in a morphology which might well be called a moon-like shape (a different appearance of a RBC imprint in the bloodstain). Cursor confines an erythrocyte with a visible size close to $7.49 \mu\text{m}$ mean diameter reported from SEM stereo micrographs for typical human RBC (normocytes) [12]. In Fig. 4, a broken schizocyte side by side with a plasma fracture (pb) indicates that the erythrocytary breaking was done prior to fracturation of the plasma. On a RBC, two discoidal and thus unstimulated platelets [13] are also observed (t).

Since the size of either free or aggregated RBC particles influence their erythrocytary sedimentation rate (ESR) [6], the view of (higher ESR) rouleaux aggregates in the surface of the bloodstain (Figs. 2 and 3), as well as a cell-free area (Fig. 3, m) might corroborate the thinness of the smear as a whole. Although under plasma hyperviscosity (as in the case of plasma water evaporation during the blood drying process) the increased plasma density decreases the sedimentation of aggregates, this high viscosity tends at the same time to decrease cell aggregation, since cells have to move into apposition through the suspending plasma [4]. Thus, the rouleaux displayed in micrographs would correspond to the first occurrences of aggregation. Provided that circulating RBC in vessels take the stomatocytary shape when blood contains CO_2 [5], the lack of a large amount of genuine stomatocytes in the bloodstain might be due to a mainly arterial (oxygenated) origin of the blood. On the other hand, the lack of a significant presence of echinocytes may indicate a quick drying of the bloodstain,



Fig. 8. View at low magnification of the thicker 4-month-old bloodstain. A smear macrocracking leads to a scale-like appearance. $\times 19$

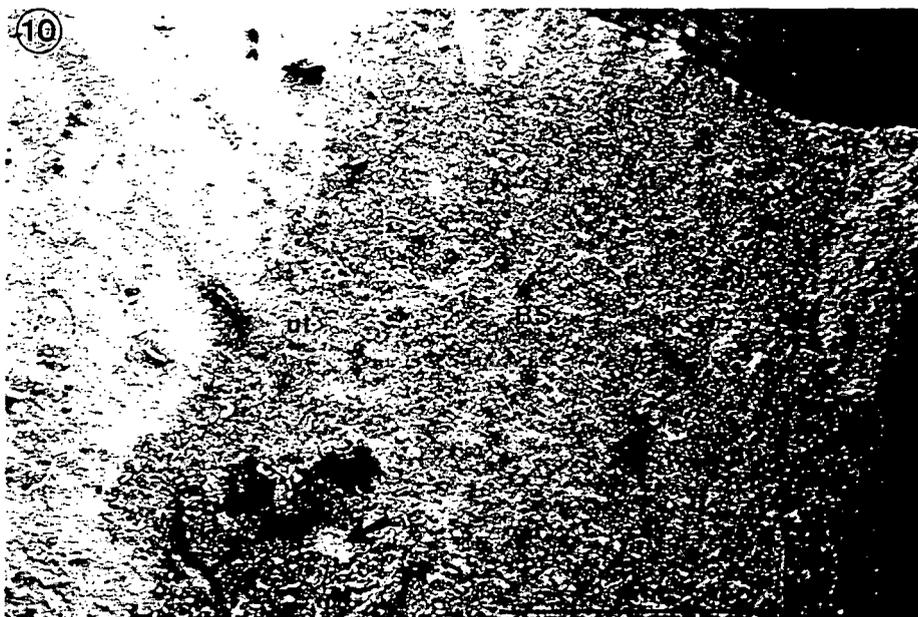
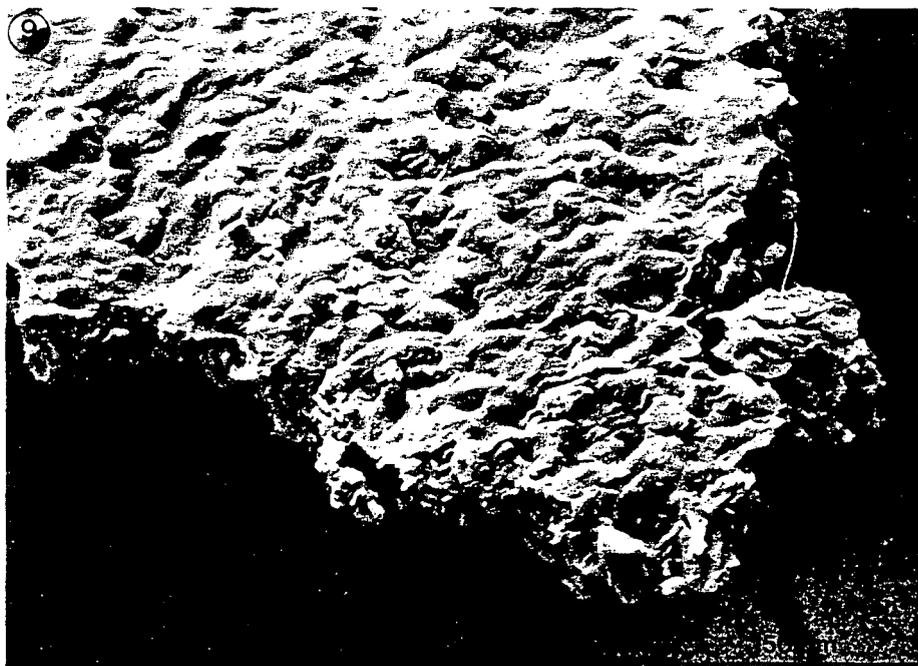


Fig. 9. RBC of the extreme area of a scale-like form from the center of the thicker bloodstain. Preservation of erythrocytes arose not only on the surface, but also in lower levels (arrow). Several near-rouleau structures appear at the surface. $\times 625$

Fig. 10. Aspect at low magnification of the 12-month-old bloodstain (BS). A wide thin (tn) plus an ultrathin (ut) area, and a smaller thick smeared zone (tk) can be seen. A little scale from the thicker area has fallen off (arrow). $\times 17$

since these crenated RBC are produced in a blood smear when it dries slowly [6] and occasionally may also be present in circulating blood [14]. The lack of a visible fibrin network in the bloodstain may also be related to this rapid drying of the bloodstain. On the other hand, rouleaux by themselves mainly sequester fibrinogen in its occurrence [4].

Experimental smears

The view of the aged experimental bloodstains is shown in Figs. 5–20.

Four-month-old bloodstains on stainless steel

For the same degree of smear thickness, the results of the different stains on the blade were similar.

In the area of the cutting edge of the stainless steel blade, one of the thin blood smears is shown in Figs. 5–7. In Fig. 5, the appearance of crust (BS) may be seen at low magnification. The smooth plasma area in the external border of the cutting edge (arrow) was found to be free of superficial RBC, while in the remainder, rugous zone distant from the edge, the smear upper erythrocytes were visible. In Fig. 6, the RBC from this rugous area are shown. In some zones, they are covered by a thick coating of plasma, while in other red cells a near-discocyte shape is clearly visible. In Fig. 7, one may see an example of two partially superimposed RBC which seem, at first view, to be one single erythrocyte with the typical normocytical size. As a whole, the visible true diameter of the better preserved RBC gave values approximated to $6.75 \mu\text{m}$.

The thicker smear of the series is shown in Figs. 8 and 9. In Fig. 8, the smear is exhibited at low magnification. A macrocracking of the smear appears, leading to the typical scale-like formation. In Fig. 9, the RBC of the peripheral area of a scale-like form from the center of the bloodstain may be seen. It is evident that the preservation of RBC occurs not only on the surface of the smear, but also on lower levels too (e.g., in the area pointed to by the arrow). The preservation of several near-rouleau structures is clearly shown on the surface.

Twelve-month-old bloodstain on white chert

Figure 10 shows the bloodstain at low magnification (BS). One may differentiate a wide bloodstained thin (tn) plus ultrathin (ut) area without macrocracking from a smaller macrocracked zone of thick smear (tk). A little scale from the counterfort of the thick area has fallen off, leaving the chert substrate in the open (arrow).

RBC from the thin and ultrathin areas may be seen in Figs. 11–15. In Fig. 11, an ultrathin area with RBC of moon-like shapes is displayed. Despite the thinness of the area shown, several erythrocytes rest one over another (E). At least one clearly echinocytic shape is shown (e). Other possible echinocytic-way shapes also appear (e?), as well as a folded RBC (f). Throughout the area, holes may be seen which may be due to bubbles derived from the emission by the blood of the respiratory gases during the smear drying process. Cursor confines a moon-like erythrocytary shape to a size close to the normocytical size. In Fig. 12,

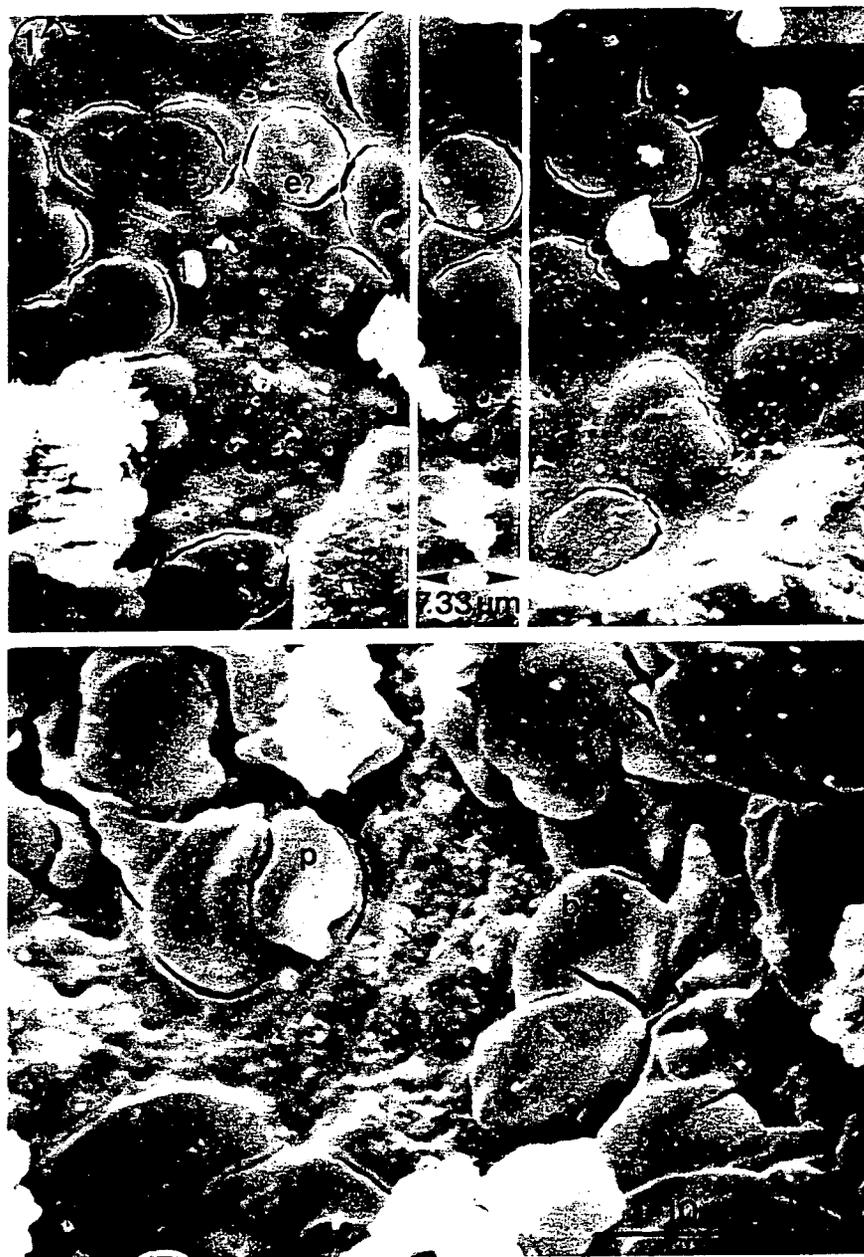


Fig. 11. Ultrathin area. RBC in the form of moon-like shapes are displayed, with several erythrocytes one over another (E), an echinocytic shape (e) and other possible echinocytary-route shapes (e?). Over the entire area little holes can be seen. Cursor confines a moon-like shape sized close to the normocytic value. $\times 1861$

Fig. 12. Thin area. A broken RBC keeps its shape (be). A probable schizocyte (p) gives a codocyte-like shape to an adjoining red cell. $\times 3276$

150

RBC from the thin area of the bloodstain are shown. An erythrocyte, in spite of being broken, keeps its shape (be). A RBC may be observed which, at first view, appears as a bell-shaped cell (codocyte), but with detailed examination of the curvature of the circular plasma cracking, however, indicates that it is really a

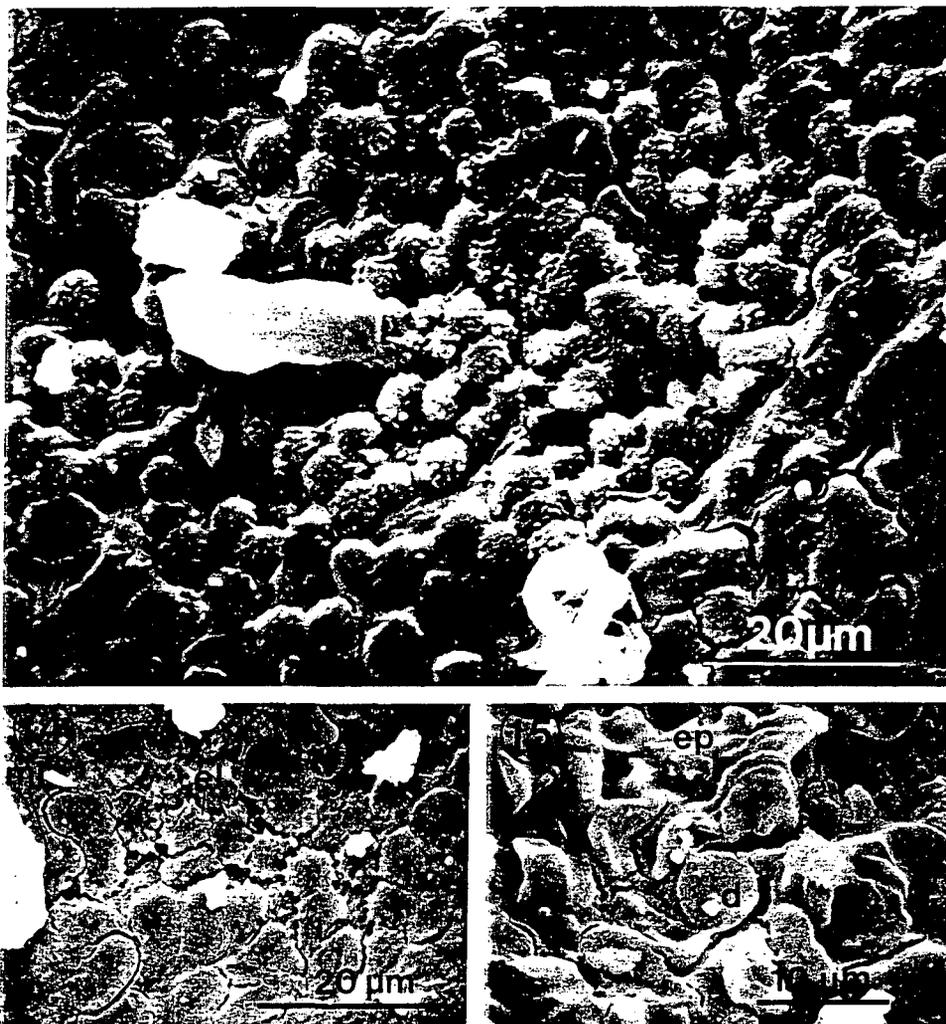


Fig. 13. Thin area from a depression of the substrate. A large accumulation of echinocytes, from moderate to very advanced forms, can be seen. $\times 1300$

Fig. 14. Thin area. Echinocyte-like structures (el) which might be derived from the plasma. Left side structure (arrow) may correspond to an echinocytosis in only a portion of the RBC or may be a consequence of two moon-like shapes (ml) plus an echinocyte (e). Altogether, exhibited shapes seem to be an artefact of blood smearing. $\times 1475$.

Fig. 15. Thin-ultrathin area. Two rouleaux with a near-echinocyte at the head (e), echinocytary schizocytes (ep) and a near-discocyte RBC are shown. In the entire area, little holes may be observed, as exhibited in Fig. 11. $\times 1750$

doubled RBC, under the pressure of a schizocyte (p). In Fig. 13, a thin smeared area from a depression of the substrate relief displays a large accumulation of echinocytes, with a degree of shrinkage/echinocytosis that varies from moderate forms, at the periphery of the figure, to very advanced forms in the center. The wide appearance of these echinocytes might be due to a slow drying in this topographically depressed area and/or to the accumulation of some facial sweat during smearing. In Fig. 14, another thin area may be seen containing some echinocytary-like structures (el), which, rather than from RBC, may be derived from the plasma (at least the displayed spines). The shape of the structure of the left side (arrow), may have originated from an echinocytosis in only a portion of the erythrocyte, or it may really be a consequence of two moon-like shapes (ml) plus an echinocyte, through an incomplete cracking of the plasma-matrix around them creating the appearance of a single structure. Altogether, the shapes exhibited in this figure seem to correspond in fact to an artefact of bloodstaining, similar to those which may be observed by light microscope in peripheric areas of blood extensions by any hematologist. Figure 15 shows a thin-ultrathin area with two rouleaux structures initiated by a near-echinocyte (e), echinocytary schizocytes (ep) and a well preserved near-discocyte RBC (d). Along the whole area little holes may be observed which are similar to those exhibited in the

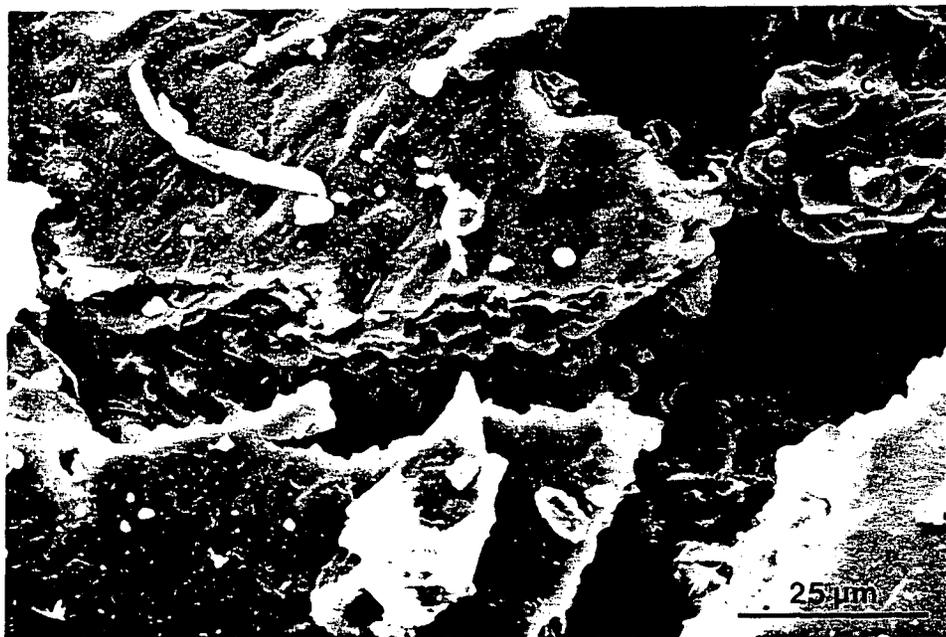


Fig. 16. Thick area. A relatively large smoothness of the surface is clearly visible. In area A, several upper RBC are suggested. A plasma-free erythrocyte keeps its central concavity (arrow). In a crack, probable negative replicas of non-superficial RBC (n) and some partially exhibited circular shapes are displayed. In area B, a plasma-free heterogeneous ensemble of RBC shapes may be seen, as well as a possible codocyte (c). Moon-like shapes appear in the bottom of the converging cracks. $\times 1003$

152

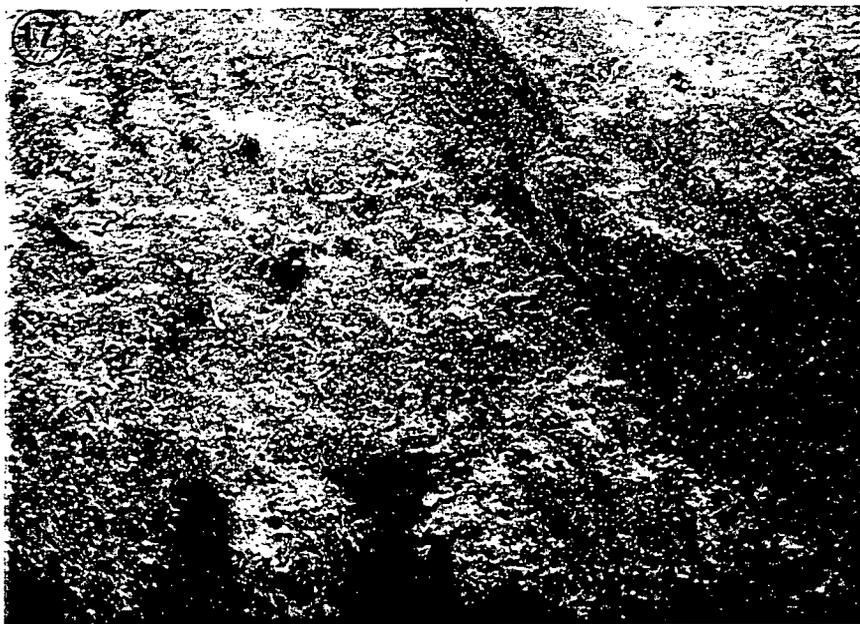


Fig. 17. Aspect at low magnification of the 18-month-old bloodstained area. A lack of difference in tonality between the smeared area, and the non-smeared area, and of a macrocracking pattern of the bloodstain do not permit, at this low magnification, the discrimination of the smeared area from that of unstained. $\times 16$

Fig. 18. RBC-shaped and not shaped as moon-like forms. A red cell with a crack at its concavity is shown (bc). Some folded erythrocytes (f) appear in the area. $\times 2320$

ultrathin area of Fig. 11. RBC from the thick smeared area are shown in Fig. 16. In comparison with the thinner areas, this thick area displays a large degree of smoothness of the bloodstain surface, as a consequence of the larger amount of plasma covering the sedimented RBC. Within the superficies of area A, several RBC under the plasma may be deciphered. A plasma-free erythrocyte, only tangentially supported by the matrix, appears to have kept its central concavity (arrow). At the cracking of the same area, concavities (n) which probably pertain to negative replicas of non-superficial RBC are displayed. Also, in the same cracked area some circular shapes which probably have the same leptocyte-like quality as those in the surface, are partially evidenced. In area B, a largely heterogeneous erythrocytary ensemble of shapes free of superficial plasma coating may be seen. A possible bell-shaped cell (codocyte, c) appears at the head of the cluster. At the bottom of the converging cracks, the moon-like shapes observed at the ultrathin areas of the bloodstain may be distinguished (which indicates that, on the one hand, this is the first sedimented RBC and, on the other hand, that at least part of the cracking shown has occurred in the last moments — but not after — the smear drying).

Eighteen-month-old bloodstain on graywacke

Figure 17 displays, at low magnification, the bloodstained area. The lack, unlike the other samples, of a clear difference in tonality between the smeared area and the substrate (undoubtedly due to the darkness of the latter), and of a macrocracking of the bloodstain (due to its poor thickness) does not permit discrimination, at this low magnification level, of the smeared area from the unsmeared area. Topographical irregularity of the substrate is evident.

RBC are displayed in Figs. 18–20. In Fig. 18, RBC both with and without the moon-like shape may be seen, exhibiting a wide range of sizes. An erythrocyte (bc) with a light crack at its concavity is shown. Also, some folded shapes (f and contiguous cells) appear in this area. In Fig. 19, the unique and clear case of the appearance of a triconcave RBC (knizocyte, k) amongst all the samples examined is shown. In the same figure, other erythrocytic morphologies are also displayed, such as those of discocyte (d), spherostomatocyte (s) and shapes from the echinocytical way, among them a crenated-like morphology (cr). Cell-free plasma matrix (m) appears at a partial smear crack. Enclosed in plasma, several poikilocytary forms may be observed in the lower shown area. Figure 20 displays an area with erythrocytes exhibiting different degrees of morphological degradation, from well preserved RBC (pf) to, in one case, a practically total destruction of the cell (arrow). Many RBC exhibit surface pits. This area pertains to an area with a strong topographical slope of the stone substrate, so that really it is as though the cells were suspended. For greater distinction, the micrograph is shown turned over with respect to how it was made. High RBC degradation at this point (not general in this bloodstain) may be due to the suspended-like condition in the topographical slope, because probably here, the main amount of plasma has remained next to the substrate and has thus exercised a low or non-existent protection, via coating, of the erythrocytes.

154

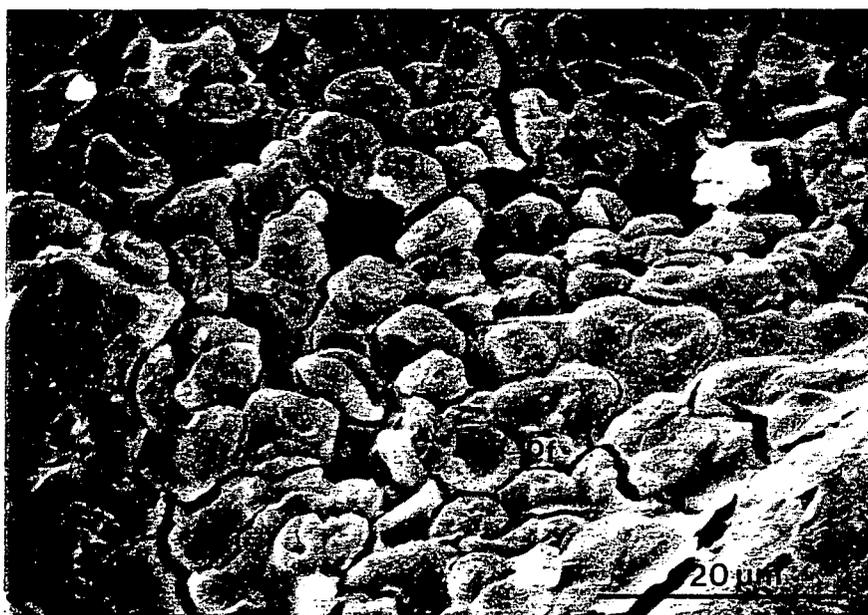
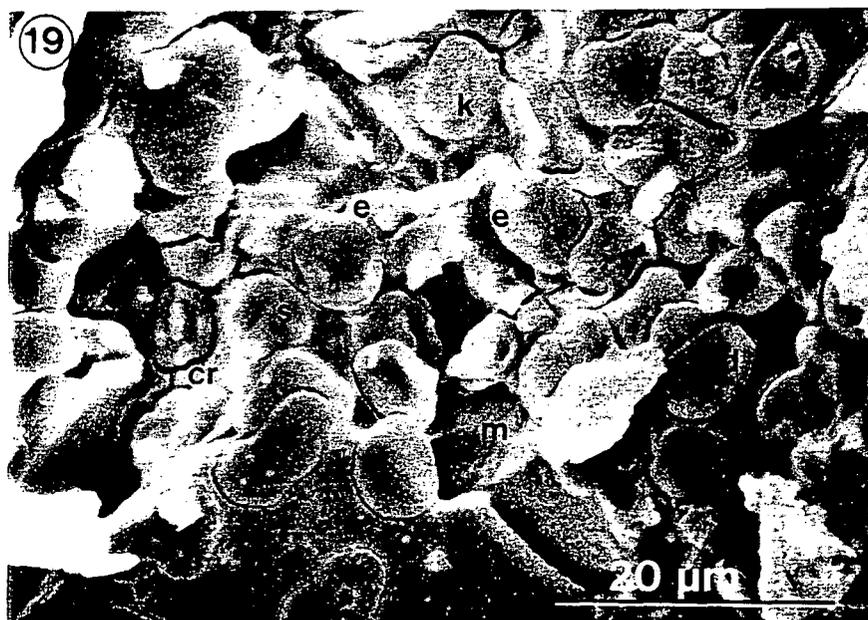


Fig. 19. RBC with the aspects of knizocyte (k), discocyte (d), spherostomatocyte (s) and shapes in the echinocytical range, such as the crenated-like shape (cr). At a partial smear crack, cell-free plasma matrix appears (m). Enclosed in the plasma, several poikilocytary forms may be observed at the bottom of the figure. $\times 1843$

Fig. 20. Strongly sloped area, with erythrocytes displaying different degrees of morphological degradation, from a well preserved RBC (pf) to a practically destroyed RBC (arrow). Surface pits are exhibited by many red cells. The micrograph is shown turned over with respect to how it was made. $\times 1638$

Discussion

In spite of the fact that the cell clustering, the plasma coating, or both, do not permit in some cases a clear evaluation of the morphology of the RBC in the bloodstains, the frequent appearance of preserved whole erythrocytes is evident in the smears. The main trends observed in the RBC and in the bloodstains as a whole, in this study, may be summarized as follows.

(i) Depending on the origin of the smear, a greater uniformity is shown — at both the low magnification level of the smear and the high magnification of the RBC — in the accidental sample than in the experimental samples.

(ii) Depending on the thickness of the bloodstain, the presence of a clear macrocracking in the thick areas, but not in the thin and ultrathin areas, may be detected. *Apriori* discrimination between the thin and ultrathin bloodstained areas was made, at the time of smearing, on the basis of their (respectively) strong or slight reddish colour, in cases of the samples on the light substrate as on the dark graywacke substrate. Likewise, the presence of scales and/or protuberances in recently dried smears was used first to characterize the thick smeared zones. In those thick smears, the larger plasma layer which covers the sedimented erythrocytes may represent an additional obstacle for the correct interpretation of SEM results, although the occurrence of macrocracks in thick bloodstains seems in part to avoid that problem. Microcracking is present in the thin areas, appearing only around the RBC (e.g., in the moon-like shapes) in the ultrathin zones and is absent in the thick areas. The frequency of a display of the erythrocytary morphology is high in the thin areas, moderate (tending towards moon-like shapes) in ultrathin areas and lower (except in the cracks) in the thick zones.

(iii) Concerning the general preservation of RBC integrity and independently of the clear schizocytes displayed, erythrocytes seem to retain their integrity, even in some cases of membrane cracking. No sample was observed with a general degradation of its RBC and only a limited strongly inclined area in the sample on graywacke, where the cells were quasi-suspended, exhibited unquestionably degraded erythrocytes.

(iv) Concerning the RBC shape, in all the samples some discocytary or near morphology (leptocyte-like) is evidenced, shape-changed RBC appear, at random, mainly as echinocytes and spherostomatocytes, but in one case as a codocyte and as a knizocyte. The moon-like shape seems to be a characteristic and very common trend of ultrathin bloodstained areas.

(v) Concerning the RBC size, a sporadic preservation in diameter is observed in some discocytes or leptocyte-like shapes and in some moon-like shapes, although a more common tendency to shrinkage may be verified, in general of a magnitude approximating to $0.75 \mu\text{m}$ under the normocytary size.

(vi) Concerning the type of substrate, there does not appear to be any significant differences between them, other than a slightly lesser adherence of the blood to the metallic support, mainly in the thin smear. This fact would seem to be related to the greater smoothness of the steel in comparison to the fine-grained substrate of knapped stone, as well as to the wind during the open-air drying of the samples on stainless steel.

Although subtle distinctions between closely shape-changed RBC may be made, classification of RBC shapes in this paper follows the more current nomenclature [7,8].

The term 'experimental' is used here in the sense of non-accidental but *ex profeso* blood smearing of the substrate, because, while in an accidental bloodstain the researcher does not determine the characteristics of the smear, in a non-accidental bloodstain an external variable (the researcher) is added, which may result in less uniformity of smear thinning and in the appearance of artefacts in the shapes exhibited by the RBC.

Even though the number of bloodstains presented in this paper is small, the existence of a great number of erythrocytes (these blood cells being the subject of this work, and thus one RBC being the unit of study) in all mammal blood, provides the appropriate replicas for each type of bloodstain. An important fact in the morphological study and characterization of original bloodstain RBC is not the number of examined smears, but the extension of each smear, as well as the thinness of the smear, which provides different low and high magnification trends.

Non-controlled room conditions are intended as a 'natural-like' environment, similar to those which would exist for a current, non-experimental bloodstain. Although these fluctuating microclimatic conditions cannot be used to separately evaluate the effects of ageing, temperature and humidity on the preservation of the RBC, it may be stated that the wide ranges of smear ageing, temperature and relative humidity exhibited in the room during the time of storage have not obstructed the general preservation of the integrity of the RBC. However, at the molecular level, studies carried out dealing with the effect of temperature, humidity and its related bacterial growth on serological reactivity (and thus on biochemical structural preservation) of human haemoglobin in bloodstains have revealed the great influence of humidity alone, rather than of temperature or bacterial contamination, on the reactivity of this erythrocytic molecule [15]. Intuitively, on the other hand, it seems logical that, especially during the blood drying, other environmental variables such as extreme atmospheric pressures or several fluctuating either cosmic or tellurian agents such as strong radiation from solar spots or geomagnetic changes [16,17], might influence slender cytomorphological and/or biochemical changes in bloodstains. The high preservation of RBC exhibited by the samples in this study seems to indicate that dried blood tissue is either analogous or homologous to a mummified tissue, so that it is not expected that the time factor alone be determinant in the preservation of a bloodstain. Nevertheless, especially for unburied and in a wider sense, 'unaltered' smears, further developments of the subject might allow us to state the environmental conditions in which an unknown bloodstain was dried, and thus give an idea of its place of origin. That is to say, it might be possible for SEM analysis to be a useful tool in spatial (more than in temporal) evaluation of a bloodstain.

Although in forensic analysis the presence of blood cells is considered as a test of evidence for blood, direct microscopical examinations of bloodstains on their supports are infrequent in the criminological laboratory. It has been stated that

frequently blood cells lyse in bloodstains, so that a direct microscopical analysis is not possible [9]. However, at least under both the temporal and environmental conditions of this study, SEM reveals that bloodstain-original RBC can largely preserve their morphological integrity, can occasionally display a size similar to that typical for normocytes and can generally exhibit well other sizes in the normal discocytary range for the human species. In this sense, this work may be an example of a study with philosophical implications for both palaeo- and forensic biology. As far as is known works such as that presented here have not been reported to date.

By the same token, there is a clear methodological relationship between forensic science and palaeobiology, since both attempt to reconstruct the past from the present. Thus, such fields sometimes have common points of interest and findings in one area may have positive repercussions in the other field. This is the case in the study of blood cells in dried smears. Such a study of bloodstains on a hard substrate such as chert or graywacke (the first with wide application in the manufacture of tools by Stone Age man, the later in playing a secondary but not insignificant role in the technology of prehistoric man [18]) may be of clear interest for palaeobiologists, especially if the support is a (surface-unaltered) knapped and not surface-erosionated native stone. At the same time, the examination of blood smears on stainless steel is of special interest to forensic scientists, as well as those on stone substrates.

It is known that bloodstains can be regenerated and thus whole blood cells extracted, by AB blood group serum or by many suitable isotonic solutions, such as those based on iodized serum, on mercury bichloride in physiologic serum or on ethyl alcohol and sodium carbonate in water. Thus, after rehydration, erythrocytes may be adequately stained and then examined using a transmitted light microscope [9,19]. Also, such RBC rehydration has been successfully carried out with Egyptian and American human mummies of around 2000 years old [20,21]. However, the present SEM work concerning erythrocytes does not have such a serological scope. From the hemorheological view of the topic of the 'in situ' erythrocytary morphology, the degree of shrinkage and the characteristics of display of the 'RBC-plasma matrix complex' into a blood smear must be understood. To summarize, this is a morphological study concerned mainly with the shape and size of aged RBC in dried bloodstains; that is to say, in the hemorheological aspect of stereotypical changes in 'in situ RBC' (i.e., in unaltered whole blood smears) with ageing. Obviously, this sort of study is not possible if erythrocytes are removed from the bloodstain by reconstitution of the dried smear. Although in a serological research of bloodstains, light microscopy after reconstitution of the smear would be the appropriate tool for cellular examination, for hemorheological researches on RBC morphologies such as those discussed here scanning electron microscopy is the universally used tool.

The interest of the research in RBC in bloodstains has been mainly directed towards the molecular level of genetic markers such as haemoglobin [1-3,15,22], which certainly have much more practical applications in the characterization of blood smears than microscopical examination, but this may also represent a complementary test of obvious value.

In the same way that in palaeobiology the term taphonomy was proposed to denominate 'the study of the transition (in all details) of organic remains from the biosphere into the lithosphere' [23], we might speak of an hemotaphonomy to refer to the study of bloodstains, and especially of the changes in appearance and size of the cellular components, as well as the characteristics of their cell position and appearance in function of the superficial topography and composition of the substrate. In fact, in a smear these cells are equivalent to deposited soft-bodied microfossils in a clay-like sedimentary matrix. In this sense, scanning microscopy offers many possibilities for morphological research dealing with bloodstains to both forensic scientists and palaeobiologists.

Acknowledgements

Grateful acknowledgement to Ramon Fontarnau, Head of the Section of Characterization of Materials, for instruction in the techniques of scanning microscopy and to Antonio Jerez, responsible for the Laboratory of Electromicrography, for instruction in the correct techniques for taking the positive of scanning micrograph negatives. Both work for the Scientific-Technical Services of the University of Barcelona.

References

- 1 T.H. Loy, Recent advances in blood residue analysis. In W.R. Ambrose and J.M.J. Mummery (eds.), *Archaeometry: Further Australasian Studies*, Australian National University, Canberra, 1987, pp. 7-65.
- 2 T.H. Loy, Prehistoric blood residues: detection on tool surfaces and identification of species of origin. *Science*, 220 (1983) 1269-1271.
- 3 T.H. Loy and A.R. Wood, Blood residue analysis at Çayönü Tepesi, Turkey. *J. Field Archaeol.*, 16 (1989) 451-460.
- 4 G.D.O. Lowe, Blood rheology in vitro and in vivo. In G.D.O. Lowe (guest ed.), *Blood Rheology and Hyperviscosity Syndromes. Baillière's Clinical Haematology*, Vol. 1, No. 3, Baillière Tindall, London, 1987, pp. 597-636.
- 5 S.v. Schumacher, *Compendio de Histologia humana*, 7th edn., Labor, Barcelona, 1974, pp. 98-102. Original edn., *Schumacher, Grundriss der Histologie des Menschen*, 10th edn., Selbstverlag, Innsbruck, 1967.
- 6 C.E. Seiverd, *Hematology For Medical Technologists*, 5th edn., Lea & Febiger, Philadelphia, 1983, pp. 269-322.
- 7 G.L. Castoldi, Erythrocytes. In D. Zucker-Franklin, M.F. Greaves, C.E. Grossi and A.M. Marmont (eds.), *Atlas of Blood Cells. Function and Pathology*, Ermes/Lea & Febiger, Milano/Philadelphia, 1981, pp. 35-145.
- 8 M.I. Barnhart, W.A. Wallace and J.M. Lusher, Red blood cells. In G.M. Hodges and K.E. Carr (eds.), *Biomedical Research Applications of Scanning Electron Microscopy*, Vol. 3, Academic Press, London, 1983, pp. 171-243.
- 9 E. Villanueva, Los indicios en Medicina legal. In J.A. Gisbert (ed.), *Medicina Legal y Toxicología*, 4th edn., Salvat, Barcelona, 1991, pp. 971-997.
- 10 F. Bordes, Étude comparative des différentes techniques de taille du silex et des roches dures, *Anthropologie*, 51 (1947) 1-29.
- 11 P.G. Bahn, Getting blood from stone tools. *Nature*, 330 (1987) 14.
- 12 P.F. LeBlond and R. Shoucri, Calculation of surface area and volume of human erythrocytes from scanning electron micrographs. *J. Microsc.*, 113 (1978) 161-170.

- 13 T. Fujita, K. Tanaka and J. Tokunaga, *SEM Atlas of Cells and Tissues*, Igaku-Shoin, Tokyo, 1981, pp. 94-95.
- 14 N. Maclean, *Haemoglobin. Collection Studies in Biology*, E. Arnold, London, 1978, pp. 58-67.
- 15 L. Quarino and L. Kobilinsky, Development of a radioimmunoassay technique for the detection of human hemoglobin in dried bloodstains. *J. Forensic Sci.*, 33(6) (1988) 1369-1378.
- 16 G. Piccardi, *The Chemical Basis of Medical Climatology*, Charles C Thomas, Springfield, IL, 1962, pp. 86-95.
- 17 M. Gauquelin, *The Cosmic Clocks*, P Owen, London, 1969, pp. 160-182.
- 18 S.A. Semenov, *Prehistoric Technology*, Cory, Adams and Mackay, London, 1964, pp. 33-35. First published in Russian in the USSR in 1957.
- 19 L. López, *Técnica Médico-Legal. I. Criminalística*, Saber, Valencia, 1953, pp. 23-24.
- 20 E. Rabino-Massa, B. Chiarelli, M. Sacerdote and C. Foscale, Presenza di globuli rossi nei tessuti di mummie Egiziane. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 43 (1967) 1333-1334.
- 21 M.R. Zimmerman, Blood cells preserved in a mummy 2000 years old. *Science*, 180 (1973) 303-304.
- 22 M. Oshima, T. Inoue and M. Hara, Identification of species specific hemoglobin by isoelectric focusing. *Forensic Sci. Int.*, 20 (1982) 277-286.
- 23 I.A. Efremov, Taphonomy: A new branch of paleontology. *Pan Am. Geol.*, 74 (1940) 81-93.

4.1.2. Traducción del inglés

Análisis por MEB de glóbulos rojos de la sangre en manchas viejas de sangre humana

Resumen

Han sido previamente detectados glóbulos rojos de la sangre (GRS) de mamífero en manchas de sangre mediante Microscopia óptica en herramientas de piedra de hasta 100.000 ± 25.000 años atrás. Con el objeto de evaluar el grado de conservación morfológica de eritrocitos en manchas de sangre, una mancha accidental de sangre sobre sílex blanco y varias manchas de sangre experimentales sobre sustratos duros (la misma piedra -sílex blanco; otro tipo de piedra -grauvaca; un soporte no pétreo -acero inoxidable), fueron mantenidas en una sala, en condiciones inestériles y fluctuantes, abarcando tiempos desde 3 a 18 meses. Luego, los especímenes fueron recubiertos con oro y examinados mediante un microscopio electrónico de barrido Cambridge Stereoscan. Los resultados revelaron una alta conservación de la integridad de los GRS, con el mantenimiento de varias formas discocitarias, una baja tendencia a la equinocitosis y una frecuente aparición de una forma eritrocitaria parecida a lunas en las áreas más delgadas de las manchas de sangre.

Palabras clave: Glóbulos rojos de la sangre; Manchas de sangre; Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

Introducción

La conservación morfológica de glóbulos rojos de la sangre (GRS) típicos de mamífero en manchas de sangre ha sido vista incluso sobre herramientas de piedra prehistóricas de hace hasta 100.000 ± 25.000 años y en otras herramientas de menor edad, en un amplio rango ambiental [1-3]. La estabilización de las manchas de sangre como un conjunto está relacionada con un entrelazamiento dentro del polímero desorganizado formado por la desnaturalización terciaria de las moléculas de seroalbúmina, la polimerización del fibrinógeno y mecanismos de coagulación [1]. Los cambios en apariencia de los GRS anucleados bajo condiciones hemorreológicas de flujo bajo son comparables a aquellas bajo flujo nulo durante el tiempo de secado de la mancha de sangre fresca. Ello puede ser resumido como sigue.

Primero, los eritrocitos en el plasma forman agregados lineales (formaciones en pilas de monedas) que experimentan agregación secundaria para formar redes, o agregados 'en masa' de configuración diferente de la de las formaciones en pilas de monedas. Esta agregación de los GRS resulta de la acción de largas y asimétricas plasmaglobulinas (principalmente, fibrinógeno para las formaciones en pilas de monedas, α_2 -macroglobulina e inmunoglobulinas G y M para los agregados en 'masa') que forman puentes entre GRS adyacentes y vencen su repulsión mutua debida a cargas superficiales negativas resultantes primariamente de los residuos de ácido siálico [4].

Más tarde, los agregados se desvanecen y el fluido sale de los GRS y las células encogen debido a la hipertonicidad del plasma por su evaporación del agua [5, 6]. El encogimiento o cambio de forma característico del típico GRS en disco bicóncavo (discocito) puede comprender una de las dos rutas diferentes siguientes: (i) discocito \rightarrow estomatocito (célula en forma de copa) \rightarrow esferoestomatocito (varios grados) \rightarrow esferocito (célula esférica), o (ii) discocito \rightarrow equinocito (célula festoneada, varios grados) \rightarrow esferoequinocito (varios grados hacia la esferocitosis) [7, 8].

Hasta ahora, los exámenes microscópicos rutinarios de GRS en manchas de sangre forenses y paleobiológicas han sido hechos al nivel de Microscopia óptica en el campo práctico de confirmar el origen presuntamente sanguíneo de manchas y hacer una asignación taxonómica orientativa [1-3, 9], pero no han sido realizadas investigaciones de Microscopia electrónica que traten de la conservación eritrocitaria en manchas de sangre.

Puesto que es necesario un armazón experimental en toda paleociencia (de acuerdo con el famoso aforismo de Lyell "el presente es la clave del pasado"), como parte de los estudios sobre residuos de sangre antigua, el autor ha iniciado una serie de investigaciones utilizando un microscopio electrónico de barrido (MEB) en orden a observar el grado de conservación morfológica general de GRS en manchas de sangre viejas.

La mayoría de los actuales estudios morfológicos requiere el uso de técnicas instrumentales avanzadas tales como la Microscopia electrónica debido a la mayor resolución y aumento; ello permite realizar revisiones y nuevos estudios sobre materiales presumiblemente bien conocidos.

Este artículo da cuenta del análisis por MEB de manchas viejas de sangre humana sobre varios substratos duros.

Materiales y Métodos

Muestra accidental

El material fue una mancha de sangre de alrededor de 35 mm², directamente recogida sobre sílex blanco (roca de cuarzo de grano muy fino con impurezas menores, incluyendo la voz sílex diversas variedades, tales como el jaspe y el pedernal) tallado. Durante un episodio de talla de piedra, en orden a realizar réplicas experimentales de herramientas paleolíticas de acuerdo con la técnica prehistórica de la talla simple con percutor de piedra [10], un corte accidental de la mano izquierda proporcionó una delgada mancha de sangre sobre una herramienta de piedra como un cuchillo. El manchado del substrato fue probablemente hecho por el mecanismo de "contacto". Debido a que el corte cuando la talla de piedra (muy probablemente la principal fuente de manchas de sangre humana de la Edad de la Piedra [11]) y la mancha de sangre de la piedra no fueron detectados hasta varios minutos después de la ocurrencia, no se añadió perturbación al manchado natural que pudiera alterar características del microambiente de los GRS en una mancha de sangre (tales como el grosor de la capa de plasma o la agregación celular). Después de la ocurrencia, la mancha de sangre fue secada a alrededor de 14°C, 83% de humedad relativa (HR) y 1016 hPa de presión atmosférica, sin luz del sol directa o viento, al aire libre durante un período de cerca de 5 h y entonces mantenida 3 meses bajo condiciones microclimáticas de la sala no estériles y no manipuladas en un rango aproximado de 12-18°C y 70-83% HR.

Muestras experimentales

Todas las muestras experimentales fueron obtenidas por el mecanismo de "contacto".

Manchas de sangre de cuatro meses sobre acero inoxidable

Una cuchilla quirúrgica Swann-Morton B. S. 2982 de acero inoxidable (W. R. Swann & Co. Ltd., Sheffield, Reino Unido) fue manchada discontinuamente con sangre de nudillo de la mano derecha. Las pequeñas manchas de sangre así obtenidas, principalmente delgadas pero con varias manchas gruesas, en conjunto alrededor de 9 mm² de área, fueron secadas a 19°C, 65% HR y alrededor de 1005 hPa al aire libre durante 20 minutos con un viento de moderado a

fuerte y sin luz del sol. Fueron entonces mantenidas 4 meses bajo condiciones microclimáticas de la sala no estériles y no manipuladas en un rango aproximado de 16-33°C y 38-78% HR.

Mancha de sangre de doce meses sobre sílex blanco

Un fragmento de piedra tallada del mismo sílex blanco que el espécimen accidental fue directamente manchado en un área continua de alrededor de 35 mm² con sangre del área del labio superior. La mancha resultante fue principalmente delgada y ultradelgada, con una clara área gruesa. La mancha fue secada en una sala sin luz del sol directa o viento, a 13°C, 80% HR y alrededor de 1024 hPa, y después mantenida 12 meses bajo condiciones microclimáticas de la sala no estériles y no manipuladas en un rango aproximado de 11-34°C y 40-84% HR.

Mancha de sangre de dieciocho meses sobre grauvaca

Sobre grauvaca (una arenisca gris oscura, roca arenítica compuesta de granos del tamaño de la arena de un amplio rango de mineralogías, con una matriz de arcilla de grano fino) tallada, una homogéneamente ultradelgada mancha de sangre de la garganta de un área de alrededor de 1 cm² fue secada en una sala sin luz del sol directa o viento, a 30°C, 47% HR y alrededor de 1019 hPa. Después, la muestra fue mantenida 18 meses bajo condiciones microclimáticas de la sala no estériles y no manipuladas en un rango aproximado de 11-34°C y 38-84% HR.

Fuentes de los datos meteorológicos

Las condiciones de secado de la muestra de mancha de sangre accidental fueron estimadas de acuerdo con los datos obtenibles para el tiempo y zona aproximados de la talla de sílex, extraídos del resumen climatológico del Centro Meteorológico oficial de la zona de Barcelona.

Para las muestras experimentales, las presiones atmosféricas durante el secado de las manchas fueron estimadas a partir de los datos facilitados por el Departamento de Física de la Atmósfera (Universidad de Barcelona), mientras que la temperatura y la humedad relativas fueron directamente tomadas "in situ" durante el manchado de sangre.

Las condiciones microclimáticas de la sala durante los tiempos de mantenimiento fueron estimadas de acuerdo con los resultados de medidas tomadas en la sala, sobre un promedio de cada 3 días a diferentes horas.

Procedimientos de MEB

Después del tiempo de mantenimiento especificado, todos los especímenes fueron cubiertos con oro mediante una difusión de la unidad E 5000 de recubrimiento de MEB (Polaron Equipment Ltd., Watford, Reino Unido) y examinados a un voltaje de aceleración de 15 kV mediante un microscopio electrónico de barrido Stereoscan 120 (Cambridge Instruments Ltd., Cambridge, Reino Unido) en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona. Las micrografías se hicieron en una película Tmax de 400 ISO (Kodak Ltd., Hemel Hempstead, Reino Unido).

Resultados

Mancha de sangre accidental de tres meses sobre sílex blanco

La Figura 1 muestra una vista, a bajo aumento, de la mancha de sangre (BS) en el filo de la herramienta de sílex. Desde la experiencia, la continuidad de la capa manchada (es decir, la falta a este nivel de un patrón visible de macrofractura de desecación) es una señal que corrobora su delgadez.

Los GRS son mostrados en las Figs. 2-4. En todas ellas, pueden ser vistos las microfracturas de desecación de la mancha de sangre que ocurren naturalmente y los GRS superficiales libres cubiertos de plasma y apilados en formaciones en pilas de monedas. La conservación de las concavidades celulares en muchos casos, así como la aparición de algunas membranas de la célula en áreas de microfractura de la mancha, indican que la capa de plasma sobre los GRS superiores es delgada. Además de los GRS morfológicamente típicos (discocitos, d), varios eritrocitos de formas alteradas son mostrados en la mancha de sangre: discos aplanados libres (df) y, a la cabeza de las formaciones en pilas de monedas, apilados (dp), con poca o ninguna depresión central (leptocitoides), esferoestomatocitos (s) y, en un caso, un claro equinocito bien conservado (Fig. 4, e). También son visibles algunos fragmentos de eritrocitos rotos (esquizocitos), principalmente en la Fig. 2 (p).

En la Fig. 2, un GRS muestra su verdadera membrana bajo la capa de plasma rota (flecha), lo cual indica que la morfología eritrocitaria observada es debida a una efectiva preservación de la estructura del GRS en la matriz de plasma y no a una simple réplica de plasma con una posterior destrucción celular. Sin embargo, réplicas negativas de la morfología

eritrocitaria debidas al plasma seco demuestran ser posibles, como es mostrado por la huella en el lado izquierdo de un GRS (i). En la misma figura se muestra un GRS roto (cuerpo en media luna) que exhibe una vista en sección de su membrana (pm). En la Fig. 3, puede ser vista una relativamente extensa área de matriz de plasma libre de células (m), aunque circularmente fracturada alrededor de un esferoestomatocito aislado, en una morfología que bien podría ser llamada una forma lunoide (una diferente apariencia de una huella de GRS en la mancha de sangre). El cursor confina un eritrocito con un tamaño visible de cerca de $7.49 \mu\text{m}$ de diámetro medio dictaminados según estereomicrografías de MEB para los GRS humanos típicos (normocitos) [12]. En la Fig. 4, un esquizocito roto a ambos lados de una fractura del plasma (pb) indica que la rotura eritrocitaria se dio con anterioridad a la fractura del plasma. Sobre un GRS, dos plaquetas discoidales y por ello no estimuladas [13] son también observadas (t).

Puesto que el tamaño de las partículas libres o agregadas de GRS influencia su velocidad de sedimentación globular (VSG) [6], la visión de agregados en formación en pila de monedas (de más alta VSG) en la superficie de la mancha de sangre (Figs. 2 y 3), así como una área libre de células (Fig. 3, m) podría corroborar la delgadez de la mancha en conjunto. Aunque bajo hiperviscosidad del plasma (como en el caso de la evaporación del agua plasmática durante el proceso de secado de la sangre) la densidad aumentada del plasma disminuye la sedimentación de agregados, esta alta viscosidad tiende al mismo tiempo a disminuir la agregación celular, puesto que las células tienen que moverse en yuxtaposición a través del plasma suspendiente [4]. Así, las formaciones en pilas de monedas mostradas en las micrografías corresponderían a los primeros sucesos de agregación. Estipulado que los GRS circulantes en los vasos toman la forma estomatocitaria cuando la sangre contiene CO_2 [5], la falta de una gran cantidad de estomatocitos genuinos en la mancha de sangre podría ser debido a un origen de la sangre principalmente arterial (oxigenada). Por otro lado, la falta de una presencia significativa de equinocitos puede indicar un rápido secado de la mancha de sangre, puesto que estos GRS crenados son producidos en una mancha de sangre cuando se seca lentamente [6] y ocasionalmente puede también estar presente en la sangre circulante [14]. La falta de una red de fibrina visible en la mancha de sangre puede también estar relacionada con este rápido secado de la mancha de sangre. Por otro lado, en su ocurrencia las pilas de monedas secuentran ellas mismas fibrinógeno principalmente [4].

Manchas experimentales

La vista de las manchas de sangre viejas experimentales se muestra en las Figs. 5-20.

Manchas de sangre de cuatro meses sobre acero inoxidable

Para el mismo grado de grosor de la mancha, los resultados de las diferentes manchas sobre la hoja fueron similares.

En el área del filo de la hoja de acero inoxidable, una de las manchas de sangre delgadas es mostrada en las Figs. 5-7. En la Fig. 5, el aspecto de costra (BS) puede ser visto a bajo aumento. El área de plasma lisa en el borde externo del filo (flecha) se halló libre de GRS superficiales, mientras que en la zona restante rugosa, distante del filo, fueron visibles los eritrocitos más elevados de la mancha. En la Fig. 6, se muestran los GRS de esta área rugosa. En algunas zonas, están cubiertos por una gruesa capa de plasma, mientras que en otros glóbulos rojos de la sangre es claramente visible una forma cercana a la discocitaria. En la Fig. 7, puede verse un ejemplo de dos GRS parcialmente superpuestos que parecen ser, a primera vista, un solo eritrocito con el típico tamaño normocítico. En conjunto, el diámetro verdadero visible de los GRS mejor conservados da valores aproximados a 6.75 μm .

La mancha más gruesa de la serie es mostrada en las Figs. 8 y 9. En la Fig. 8, la mancha es exhibida a bajo aumento. Aparece un macroagrietamiento de la mancha, conduciendo a la típica formación escamoide. En la Fig. 9, los GRS del área periférica de una forma escamoide del centro de la mancha de sangre pueden ser vistos. Es evidente que la preservación de GRS ocurre no solamente en la superficie de la mancha, sino también en niveles más bajos (por ejemplo, en el área a la que apunta la flecha). La preservación de varias estructuras muy parecidas a pilas de monedas es claramente mostrada en la superficie.

Mancha de sangre de doce meses sobre sílex blanco

La Figura 10 muestra la mancha de sangre a bajo aumento (BS). Una área ancha delgada (tn) más ultradelgada (ut) manchada de sangre sin macroagrietamiento se puede diferenciar de una zona más pequeña de mancha gruesa (tk) macroagrietada. Una pequeña escama del contrafuerte del área gruesa se ha desprendido, dejando al descubierto el substrato de sílex (flecha).

Pueden ser vistos GRS de las áreas delgada y ultradelgada en las Figs. 11-15. En la Fig. 11, es expuesta un área ultradelgada con GRS de formas lunoides. A pesar de la delgadez del área mostrada, varios eritrocitos quedan uno sobre el otro (E). Por lo menos una forma claramente equinocítica es mostrada (e). También aparecen otras posibles formas de la ruta equinocítica (e?), así como un GRS plegado (f). En toda el área, pueden ser vistas cavidades que pueden ser debidos a burbujas derivadas de la emisión por la sangre de los gases respiratorios durante el proceso de secado de la mancha. El cursor confina una forma eritrocitaria lunoide de un tamaño cerca del normocítico. En la Fig. 12, son mostrados GRS del área delgada de la mancha de sangre. Un eritrocito, a pesar de estar roto, mantiene su forma (be). Puede ser observado un GRS que, a primera vista, aparece como una célula en forma de campana (codocito), pero que con el examen detallado de la curvatura del agrietamiento circular del plasma, sin embargo, indica que es realmente un GRS plegado, bajo la presión de un esquizocito (p). En la Fig. 13, una delgada área manchada de una depresión del relieve del substrato exhibe una gran acumulación de equinocitos, con un grado de contracción/equinocitosis que varia desde formas moderadas, en la periferia de la figura, a formas muy avanzadas en el centro. La amplia aparición de estos equinocitos podría ser debida a un secado lento en esta área topográficamente deprimida y/o a la acumulación de algo de sudor facial durante el manchado. En la Fig. 14, otra área delgada puede ser vista conteniendo algunas estructuras equinocitoides (el), las cuales, más que de GRS, pueden ser derivadas del plasma (por lo menos las espinas puestas de manifiesto). La forma de la estructura del lado izquierdo (flecha), se puede haber originado de una equinocitosis en sólo una porción del eritrocito, o puede realmente ser una consecuencia de dos formas lunoides (ml) más un equinocito, por un agrietamiento incompleto del plasma-matriz alrededor de ellos creando la apariencia de una sola estructura. En conjunto, las formas exhibidas en esta figura parecen corresponder de hecho a un artefacto del manchado de sangre, similar a los que pueden ser observados con microscopio óptico en áreas periféricas de extensiones de sangre por cualquier hematólogo. La Figura 15 muestra una área delgada-ultradelgada con dos estructuras en pilas de monedas iniciadas con un GRS muy similar a un discocito (d). A lo largo del área entera pueden ser observadas pequeñas cavidades que son similares a las exhibidas en el área ultradelgada de la Fig. 11. GRS del área manchada gruesa son mostrados en la Fig. 16. En comparación con áreas más delgadas, esta área gruesa manifiesta un gran grado de lisura de la superficie de la mancha de sangre, como consecuencia de la cantidad más grande de plasma recubriendo los GRS sedimentados. Dentro de la superficie

del área A, pueden ser descrifrados varios GRS bajo el plasma. Un eritrocito libre de plasma, solo sostenido tangencialmente por la matriz, parece haber mantenido su concavidad central (flecha). En el agrietamiento de la misma área, concavidades (n) que probablemente pertenecen a réplicas negativas de GRS no superficiales son exhibidas. También, en la misma área agrietada algunas formas circulares que probablemente tienen la misma cualidad leptocitoide que las de la superficie, son parcialmente evidenciadas. En el área B, un grandemente heterogéneo conjunto eritrocitario de formas libres de capa superficial de plasma puede ser visto. Una posible célula en forma de campana (codocito, c) aparece a la cabeza del agregado. Al fondo de las grietas convergentes, las formas lunoide observadas en las áreas ultradelgadas de la mancha de sangre pueden ser distinguidas (lo que indica que, por un lado, éste es el primer GRS sedimentado y, por otro lado, que al menos parte del agrietamiento mostrado ha ocurrido en los últimos momentos -pero no después- del secado de la mancha.

Mancha de sangre de dieciocho meses sobre grauwaca

La Fig. 17 muestra, a bajo aumento, el área manchada de sangre. La falta, a diferencia de las otras muestras, de una clara diferencia en tonalidad entre el área manchada y el substrato (indudablemente debida a la obscuridad de este último), y de un agrietamiento de la mancha de sangre (debido a su débil grosor) no permite la discriminación, a este bajo nivel de aumento, del área manchada de la no manchada. La irregularidad topográfica del substrato es evidente.

Los GRS son mostrados en las Figs. 18-20. En la Fig. 18, pueden ser vistos GRS con y sin la forma lunoide, exhibiendo un amplio rango de tamaños. Un eritrocito (bc) con una ligera grieta en su concavidad es mostrado. También, algunas formas plegadas (f y células contiguas) aparecen en esta área. En la Fig. 19, se muestra el único y claro caso de la aparición de un GRS tricóncavo (cnizocito, k) entre todas las muestras examinadas. En la misma figura, otras morfologías eritrocíticas son también exhibidas, tales como las de discocito (d), esferoestomatocito (s) y formas de la ruta equinocítica, entre ellas una morfología como crenada (cr). En una grieta parcial de la mancha aparece matriz de plasma libre de células (m). Incluidas en plasma, varias formas poiquilocitarias pueden ser observadas en el área más baja mostrada. La Figura 20 exhibe un área con eritrocitos mostrando diferentes grados de degradación morfológica, desde GRS bien conservados (pf) a, en un caso, una destrucción prácticamente total de la célula (flecha). Muchos GRS exhiben hoyos de superficie. Esta área pertenece a un

área con una fuerte pendiente topográfica del substrato de piedra, de modo que en realidad es como si las células estuviesen suspendidas. Para mayor discernimiento, la micrografía es mostrada invertida con respecto a cómo fue hecha. La alta degradación de GRS en este punto (no general en esta muestra) puede ser debida a las condiciones de como suspendidos en la inclinación topográfica, puesto que probablemente aquí, la principal cantidad de plasma ha permanecido próxima al substrato y ha así ejercido una baja o inexistente protección, vía revestimiento, de los eritrocitos.

Discusión

A pesar del hecho que la agregación celular, el recubrimiento de plasma, o ambos, no permite en algunos casos una clara evaluación de la morfología de los GRS en las manchas de sangre, es evidente en las manchas la frecuente aparición de eritrocitos enteros conservados. Los principales rasgos observados en los GRS y en las manchas de sangre en su conjunto, en este estudio, pueden ser resumidos como sigue:

- (i) Dependiendo del origen de la mancha, es mostrada una mayor uniformidad -tanto al nivel de bajo aumento de la mancha como al aumento alto de los GRS- en la muestra accidental que en las muestras experimentales.
- (ii) Dependiendo del grosor de la mancha de sangre, puede ser detectada la presencia de un claro macroagrietamiento en las áreas gruesas, pero no en las delgadas y ultradelgadas. La discriminación apriorística entre las áreas manchadas de sangre delgadas y ultradelgadas fue realizada, al tiempo del manchado, sobre la base de su (respectivamente) fuerte o leve color rojizo, en los casos de las muestras sobre el substrato claro como sobre el substrato oscuro de grauvaca. Asimismo, la presencia de escamas y/o protuberancias en manchas recientemente secadas fue usado primero para caracterizar las zonas manchadas gruesas. En aquellas manchas gruesas, la mayor capa de plasma que cubre los eritrocitos sedimentados puede representar un obstáculo adicional para la correcta interpretación de los resultados de MEB, aunque la ocurrencia de macrogrietas en manchas de sangre gruesas parece eludir en parte aquel problema. El microagrietamiento está presente en las áreas delgadas, apareciendo solamente alrededor del GRS (por ejemplo, en las formas lunoides) en las zonas ultradelgadas y está ausente en las áreas gruesas. La frecuencia de manifestación de la morfología eritrocitaria es alta

en las áreas delgadas, moderada (tendiendo hacia formas lunoides) en áreas ultradelgadas y más baja (excepto en las grietas) en las zonas gruesas.

- (iii) Respecto a la conservación general de la integridad del GRS e independientemente de los claros esquizocitos exhibidos, los eritrocitos parecen retener su integridad, incluso en algunos casos de rotura de la membrana. No fue observada ninguna muestra con una degradación general de sus GRS y sólo una limitada área fuertemente inclinada en la muestra sobre grauvaca, donde las células estaban cuasi-suspendidas, exhibió incuestionablemente eritrocitos degradados.
- (iv) Respecto a la forma del GRS, en todas las muestras es evidenciada alguna morfología discocitaria o cercana a ella (leptocitoide), aparecen, al azar, GRS cambiados de forma, principalmente como equinocitos y esferoestomatocitos, pero en un caso como codocito y como knizocito. La forma lunoide parece ser un rasgo característico y muy común de las áreas manchadas de sangre ultradelgadas.
- (v) Respecto al tamaño del GRS, se observa una esporádica preservación en el diámetro en algunos discocitos o formas leptocitoides y en algunas formas lunoides, aunque una tendencia más común hacia el encogimiento puede ser verificada, en general de una magnitud que se aproxima a $0.75 \mu\text{m}$ por debajo del tamaño normocitario.
- (vi) Respecto al tipo de substrato, no parece haber otras diferencias significativas entre ellos que una ligeramente menor adherencia de la sangre al soporte metálico, principalmente en la mancha delgada. Este hecho parecería estar relacionado con la mayor lisura del acero en comparación con el substrato de grano fino de la piedra tallada, así como al viento durante el secado al aire libre de las muestras sobre acero inoxidable.

Aunque pueden hacerse sutiles distinciones entre GRS de forma estrechamente cambiada, la clasificación de formas de GRS en este artículo sigue la nomenclatura más común [7, 8].

El término “experimental” se utiliza aquí en el sentido de manchado de sangre del substrato no accidental sino *ex profeso*, puesto que, mientras que en una mancha de sangre accidental el investigador no determina las características de la mancha, en una mancha de sangre no accidental se añade una variable externa (el investigador), lo que puede resultar en menos uniformidad del grosor de la mancha y en la aparición de artefactos en las formas exhibidas por los GRS.

Aunque el número de manchas de sangre presentado en este artículo es pequeño, la existencia de un gran número de eritrocitos (siendo estas células sanguíneas el tema de este

trabajo, y siendo así un GRS la unidad de estudio) en toda sangre de mamífero, provee las apropiadas réplicas para cada tipo de mancha de sangre. Un hecho importante en el estudio y caracterización morfológica de GRS de manchas de sangre originales no es el número de manchas examinadas, sino la extensión de cada mancha, así como el grosor de la mancha, que provee diferentes sesgos de bajo y alto aumento.

Las condiciones de sala no controladas se entienden como un ambiente “parecido al natural”, similar a las que existirían para una mancha de sangre no experimental, común. Aunque estas condiciones microclimáticas fluctuantes no pueden ser usadas para evaluar separadamente los efectos de envejecimiento, temperatura y humedad sobre la preservación de los GRS, puede ser formulado que los amplios rangos de envejecimiento, temperatura y humedad relativa exhibidos en la sala durante el tiempo de almacenamiento no han entorpecido la preservación general de la integridad de los GRS. Sin embargo, al nivel molecular estudios llevados a cabo sobre el efecto de la temperatura, humedad y su crecimiento bacteriano relacionado sobre la reactividad serológica (y así sobre la preservación estructural bioquímica) de la hemoglobina humana en manchas de sangre han revelado la gran influencia de la humedad sola, más que la temperatura o la contaminación bacteriana, sobre la reactividad de esta molécula eritrocítica [15]. Intuitivamente, por otro lado, parece lógico que, especialmente durante el secado de la sangre, otras variables ambientales tales como presiones atmosféricas extremas o varios agentes cósmicos o telúricos fluctuantes tales como fuerte radiación de manchas solares o cambios geomagnéticos [16, 17], podrían influenciar leves cambios citomorfológicos y/o bioquímicos en las manchas de sangre. La alta preservación de GRS exhibida por las muestras en este estudio parece indicar que el tejido sanguíneo seco es análogo o homólogo a un tejido momificado, por lo que no se espera que el factor tiempo solo sea determinante en la preservación de una mancha de sangre. No obstante, especialmente para machas no sepultadas y en un sentido más amplio “inalteradas”, ulteriores desarrollos sobre el tema podrían permitirnos determinar las condiciones ambientales en que una mancha de sangre desconocida se secó, y así dar una idea de su lugar de origen. Es decir, podría ser posible para el análisis por MEB ser una herramienta útil en la evaluación espacial (más que en la temporal) de una mancha de sangre.

Aunque en análisis forense la presencia de células sanguíneas es considerada como una prueba de evidencia para la sangre, los exámenes microscópicos directos de manchas de sangre en sus soportes no son frecuentes en el laboratorio criminalístico. Ha sido expuesto que

frecuentemente las células sanguíneas se lisan en las manchas de sangre, por lo que no es posible un análisis microscópico directo [9]. Sin embargo, por lo menos bajo las condiciones temporales y ambientales de este estudio, el MEB revela que los GRS originales de mancha de sangre pueden conservar ampliamente su integridad morfológica, pueden ocasionalmente mostrar un tamaño parecido al típico para normocitos y pueden generalmente exhibir bien otros tamaños en el rango discocitario normal para la especie humana. En este sentido, este trabajo puede ser un ejemplo de un estudio con implicaciones filosóficas para la Biología Forense y la Paleobiología. Hasta donde se conoce, trabajos como el presentado aquí no han sido informados hasta la fecha.

Por el mismo lado, hay una clara relación metodológica entre la Ciencia Forense y la Paleobiología, puesto que ambas intentan reconstruir el pasado desde el presente. Así tales campos tienen a veces puntos comunes de interés y hallazgos en un área pueden tener repercusiones positivas en el otro campo. Este es el caso en el estudio de células sanguíneas en manchas secas. Tal estudio de manchas de sangre sobre un substrato duro tal como sílex o grauvaca (el primero con amplia aplicación en la manufactura de herramientas por el hombre de la Edad de la Piedra, la última jugando un papel secundario pero no insignificante en la tecnología del hombre prehistórico [18]) puede ser de claro interés para paleobiólogos, especialmente si el soporte es una piedra nativa tallada (de superficie inalterada) y de superficie no erosionada. Al mismo tiempo, el examen de manchas de sangre sobre acero inoxidable es de especial interés para los científicos forenses, así como aquellas sobre substratos de piedra.

Es sabido que las manchas de sangre pueden ser regeneradas y así extraídas las células sanguíneas enteras, por suero del grupo sanguíneo AB o por muchas soluciones isotónicas apropiadas, tales como las basadas en suero yodado, en bicloruro de mercurio en suero fisiológico o en alcohol etílico y carbonato sódico en agua. Así, tras rehidratación, los eritrocitos pueden ser adecuadamente teñidos y entonces examinados utilizando un microscopio de luz transmitida [9, 19]. También, tal rehidratación de los GRS ha sido llevada a cabo con éxito con momias humanas egipcias y americanas de unos 2.000 años [20, 21]. Sin embargo, el presente trabajo de MEB sobre eritrocitos no tiene tales miras serológicas. Debe ser comprendido desde la visión hemorreológica del tema de la morfología eritrocitaria *in situ*, el grado de encogimiento y las características de manifestación del “complejo GRS-matriz de plasma” en una mancha de sangre. Resumiendo, éste es un estudio morfológico preocupado principalmente de la forma y tamaño de GRS envejecidos en manchas de sangre secas; es decir, del aspecto hemorreológico

de los cambios estereotípicos en “GRS in situ” (es decir, en manchas de sangre enteras inalteradas) con el envejecimiento. Obviamente, esta clase de estudio no es posible si los eritrocitos son removidos de la mancha de sangre por reconstitución de la mancha seca. Si bien en una investigación serológica de manchas de sangre, la microscopía óptica tras reconstitución de la mancha sería la herramienta adecuada para el examen celular, para investigaciones hemorreológicas sobre morfologías de GRS tales como las discutidas aquí la microscopía electrónica de barrido es la herramienta universalmente utilizada.

El interés de la investigación en GRS en manchas de sangre ha sido principalmente dirigido hacia el nivel molecular de marcadores genéticos tales como la hemoglobina [1-3, 15, 22], que ciertamente tienen muchas más aplicaciones prácticas en la caracterización de manchas de sangre que el examen microscópico, pero éste puede también representar una prueba complementaria de valor obvio.

De la misma manera que en Paleobiología se propuso el término Tafonomía para denominar “el estudio de la transición (en todos los detalles) de los restos orgánicos desde la biosfera a la litosfera” [23], podríamos hablar de una Hemotafonomía para referir el estudio de las manchas de sangre, y especialmente de los cambios en apariencia y tamaño de los componentes celulares, así como las características de su posición celular y apariencia en función de la topografía superficial y composición del substrato. De hecho, en una mancha estas células son equivalentes a microfósiles de cuerpo blando depositados en una matriz sedimentaria similar a la arcilla. En este sentido, la Microscopía de Barrido ofrece muchas posibilidades para la investigación morfológica sobre manchas de sangre a los científicos forenses y los paleobiólogos.

Agradecimientos

Agradecido reconocimiento a Ramon Fontarnau, Jefe de la Sección de Caracterización de Materiales, por la enseñanza en las técnicas de la Microscopía de Barrido y a Antonio Jerez, responsable del Laboratorio de Electromicrografía, por la enseñanza en las correctas técnicas de positivado de negativos de micrografías de barrido. Ambos trabajan para los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

Texto de las figuras

Fig. 1. Aspecto a bajo aumento de la mancha de sangre de 3 meses (BS). Está localizada en el área del filo de la herramienta de sílex blanco. La ausencia de un patrón de macrofracturación en la mancha es una indicación de delgadez. x24

Fig. 2. GRS libres y apilados en rouleaux, mostrando varias formas eritrocitarias. Discocitos inalterados (d), leptocitoides libres (df) y apilados en rouleaux (dp) y esferoestomatocitos (s). También se observan fragmentos de GRS rotos (p y pm) y un GRS (i) con la huella del glóbulo rojo contiguo a su izquierda. La flecha señala un eritrocito que muestra su verdadera membrana bajo la capa de plasma. x2.114

Fig. 3. Un GRS con un diámetro visible cercano al típico de los normocitos humanos y una área de matriz plasmática (m) fracturada circularmente alrededor de un esferoestomatocito. Rotulación como en la Fig. 2. x2.016

Fig. 4. Un equinocito mostrando el inicio de crenación (e) y un fragmento periférico de GRS roto previo a la rotura del plasma. Sobre un GRS aparecen dos plaquetas no estimuladas (t). Rotulación como en figuras previas. x2.115

Fig. 5. Aspecto a bajo aumento de una de las manchas de sangre delgadas de 4 meses (BS). Está localizada en el área del filo de la hoja. Puede verse una visión de la costra. El borde externo del filo (flecha) está libre de GRS superficiales. x28

Fig. 6. GRS del área rugosa. Son claramente visibles células rojas cercanas a discocito en zonas no recubiertas por una capa gruesa de plasma. x1.104

Fig. 7. Dos GRS parcialmente superpuestos mostrando la apariencia de un solo eritrocito con el tamaño típico para los normocitos, mientras el verdadero diámetro visible de los GRS exhibidos dio valores de alrededor de 6,75 μm . x1.531

Fig. 8. Vista a bajo aumento de la mancha de sangre de 4 meses más gruesa. Un macroagrietamiento de la mancha lleva a una apariencia escamoide. x19

Fig. 9. GRS del área extrema de una forma escamoide del centro de la mancha de sangre más gruesa. La preservación de los eritrocitos se presentó no sólo en la superficie, sino también en niveles más bajos (flecha). Aparecen en la superficie varias estructuras cercanas a rouleau. x625

Fig. 10. Aspecto a bajo aumento de la mancha de sangre de 12 meses (BS). Pueden verse una amplia área delgada (tn) más una de ultradelgada (ut) y una pequeña zona manchada gruesa (tk). Una pequeña escama del área más gruesa se ha desprendido (flecha). x17

Fig. 11. Área ultradelgada. Se muestran GRS en la forma lunoide, con varios eritrocitos uno sobre otro (E), una forma equinocítica (e) y otras posibles formas de la ruta equinocitaria (e?). Pueden verse pequeños agujeros sobre el área entera. El cursor confina una forma lunoide de tamaño cercano al valor normocítico. x1.861

Fig. 12. Área delgada. Un GRS roto mantiene su forma (be). Un probable esquizocito (p) da una forma codocitoide a una célula roja contigua. x3.276

Fig. 13. Área delgada de una depresión del sustrato. Puede verse una gran acumulación de equinocitos, desde formas moderadas a muy avanzadas. x1,300

Fig. 14. Área delgada. Estructuras equinocitoides (el) que podrían ser derivadas del plasma. La estructura del lado izquierda (flecha) puede corresponder a una equinocitosis en solo una porción del GRS o puede ser consecuencia de dos formas lunoideas (ml) más un equinocito (e). En conjunto, las formas exhibidas parecen ser un artefacto del manchado de la sangre. x1.475

Fig. 15. Área delgada-ultradelgada. Se muestran dos rouleaux con un cercano a equinocito a la cabeza (e), esquizocitos equinocitarios (ep) y un GRS cercano a discocito. En el área entera, pueden observarse pequeños agujeros, como lo exhibido en la Fig. 11. x1.750

Fig. 16. Área gruesa. Es claramente visible una relativamente amplia lisura de la superficie. En el área A, se sugieren varios GRS superiores. Un eritrocito libre de plasma mantiene su concavidad central (flecha). En una grieta, se muestran probables réplicas negativas de GRS no superficiales (n) y algunas formas circulares exhibidas parcialmente. En el área B, puede verse un conjunto de formas heterogéneas de GRS libres de plasma, así como un posible codocito (c). Aparecen formas lunoides en el fondo de las grietas convergentes. x1.003

Fig. 17. Aspecto a bajo aumento del área manchada de 18 meses. Una falta de diferencia en tonalidad entre el área manchada y la no manchada, y de un patrón de macrogrietamiento de la mancha no permite, a este bajo aumento, la discriminación del área manchada de la no manchada. x16

Fig. 18. GRS con y sin la forma lunoide. Se muestra una célula roja con una grieta en su concavidad (bc). Aparecen en el área algunos eritrocitos plegados (f). x2.320

Fig. 19. GRS con los aspectos de kinizocito (k), discocito (d), esferoestomatocito (s) y formas en el rango equinocítico, tales como la forma como crenada (cr). En una grieta parcial de la mancha, aparece la matriz plasmática libre de células (m). Incluidas en el plasma, pueden observarse varias formas poiquilocitarias en la parte inferior de la figura. x1.843

Fig. 20. Área fuertemente inclinada, con eritrocitos mostrando diferentes grados de degradación morfológica, desde un GRS bien conservado (pf) a un GRS prácticamente destruido (flecha). Muchos GRS exhiben oquedades superficiales. La micrografía se muestra girada respecto a cómo se hizo. x1.638

4.2. SEM characterization of blood stains on stone tools

Policarp Hortolà. 1992. *The Microscope* **40**: 111-113

4.2.1. Original*

*Las barras de la escala de aumento han sido corregidas *a posteriori* sobre las figuras, de acuerdo con la fe de erratas editorial aparecida en *The Microscope* **40** (3): vi (1992). La referencia (7) hace alusión al título del manuscrito sometido para su publicación, cuya versión revisada fue publicada tal y como aparece en el epígrafe 4.1.1.

SEM Characterization of Blood Stains on Stone Tools

Policarp Hortolà*

Laboratory of Archaeology of the University of Barcelona at Tarragona (LAUBT)

Keywords: Red blood cells, bloodstains, scanning electron microscopy, archeology.

ABSTRACT

Mammalian red blood cells (RBC) in bloodstains have been previously detected by light microscopy on stone tools *circa* 100,000 years old. To observe and characterize the bloodstain-original RBC, a modern replica of ancient blood residues was examined by scanning electron microscopy (SEM). To simulate a Stone Age process a collared peccary (*Tayassu tajacu*) cadaver was skinned using a paleolithic-like white chert knife, which was then smeared with blood plus serous liquid. After drying in the open air for one week, the tool was stored at unsterile and fluctuant room conditions. After six months, a detached fragment of the bloodstain on an SEM stud was coated with gold and examined at an accelerating voltage of 15 kV using a Cambridge STEREOSCAN 120 scanning electron microscope. Results reveal protuberant *moon-like shapes* which are interpreted to be characteristic of RBC.

INTRODUCTION

Morphological preservation of mammalian red blood cells (RBC) in bloodstains has been previously revealed even in prehistoric stone tools 100,000 \pm 25,000 years old (1-3).

The changes in RBC appearance under null-flow drying conditions may be similar to those seen in the low-flow rheological state. Plasma hypertonicity due to blood smear drying leads to stereotypical morphological changes in RBC. These involve various grades of either stomatocytary or echinocytary changes, enroute towards a spherocytary shape (4,5).

*Author correspondence: PO Box 37045, E-08080 Barcelona, Catalonia, Spain

To date, routine microscopical examinations of RBC morphology in either forensic and palaeobiological studies have been carried out using light microscopy (1-3,6). Similar studies utilizing scanning electron microscopy (SEM) have not been reported.

As part of my palaeobiological studies on ancient blood residues, I have started a series of experimental observations using SEM to observe changes in RBC morphology during ageing. In a previous analysis, I examined (by SEM) a three-month-old human blood smear on white chert. I observed well preserved RBC integrity, along with the appearance of a moon-like erythrocytary shape (7). In the present paper, I report the SEM analysis and subsequent characterization of a non-human bloodstain made on the cutting edge of an experimental paleolithic tool replica, with a special emphasis on this moon-like RBC aspect.

MATERIALS AND METHODS

A simulation of the Stone Age process of skinning a cadaver was performed using a modern white chert replica of a paleolithic knife. The knife was smeared with a thin film of blood, naturally mixed with serous liquid, from under the rib-cage of a female collared peccary (*Tayassu tajacu*). The specimen was approximately 10 years old and had deceased three weeks prior to the exercise. The cadaver had been stored at 0°C in a closed container during the intervening period. After use, the tool was dried in the open air for the first week. Exposure to sunlight was approximately one hour per day. Following this week, the tool was stored at fluctuant and unsterile room conditions (mean temperature 19°C, range 30-12°C; mean relative humidity 68%, range 83-37%). After six months, a fragment of blood residue from the cutting edge of the tool was detached and sputter-coated with gold using a POLARON SEM Coating Unit (Model E 5000, POLARON Equipment Ltd., Watford, U.K.). The fragment was examined at an accelerating voltage of 15 kV using a STERE-

OSCAN 120 scanning electron microscope (Cambridge Instruments Ltd., Cambridge, U.K.). Photomicrographs were made using TMY 120 film (Kodak Ltd., Hemel Hempstead, U.K.).

RESULTS AND DISCUSSION

Results are shown in Figures 1-3. In all of them, plasma-coated free RBC appear within the dried plasma matrix and microfractures of this dried plasma can be seen. In Figure 1, RBCs appear with shapes of leptocyte (l), echinocyte (e) and a (non-leptocyte) flat disk which occurs under matrix in the boundary of a plasma fracture (d). The lack of a significant presence of echinocyte forms may indicate quick drying of the bloodsmear in this area, since the echinocyte shape is produced when blood dries slowly (9).

Figure 2 shows RBCs showing a circular or semi-circular aspect (*moon-like shapes*). The manipulation of the dried sample prior to coating produced slight surface alteration of the plasma, as the notches denote (see arrows). In spite of the fact that this manipulation could have contributed to the highly flattened look of the area as a whole, moon-like RBC shapes have been observed in the thinner areas of the majority of bloodstains examined.

Figure 3 displays an unaltered area similar to the former one. The cursor defines a moon-shaped RBC with a size close to the mean diameter for the species, on the basis of the similarity in cellular composition of *Tayassuidae* to that of the domestic pig (8, 341). In that, the RBC diameter averages $6.0 \mu\text{m}$, with a range from $4.0\text{-}8.0 \mu\text{m}$ (8, p. 240).

On the other hand, the wide morphological variations exhibited by the RBC in the sample confirms the fact that the slight differences in mammalian RBC shape and size do not permit a taxonomical discrimination (2,6). An exception would be the well-known characteristic elliptical shape of *Camellidae* RBC (8, pp. 6, 527-528).

Within the plasma microfractures in Figure 3, the light structure (c) is white chert. Fracture of the plasma matrix about this point might denote that it is an outcrop of the stone support due to the extreme thinness of the bloodstain in the edge of the tool, and not a white chert particle deposited after bloodstaining.

The larger visible depth of the plasma matrix fracture in Figure 1, compared with the microfractures shown in the remaining figures, probably indicates that the first area is thicker than those shown in Figure 2 and 3. The moon-like shapes would therefore correspond to thin areas of the bloodstain. In



Figure 1. Several RBC shapes in a thicker area of the bloodstain. Leptocyte (l), echinocyte (e) and (non-leptocyte) flat disk (d) ($10 \mu\text{m} = \text{—}$).

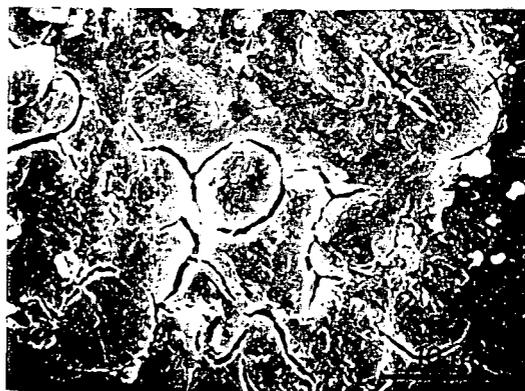


Figure 2. RBC as moon-like shapes, in a surface-altered thinner area. This alteration is clearly visible by the superficial notches (arrows) ($10 \mu\text{m} = \text{—}$).



Figure 3. RBC exhibiting the same moon-like morphology as Figure 2, in a surface-unaltered thinner area. Cursor confines an erythrocytary moon-like shape close to the mean diameter for the species. The white chert raw-material of the tool is seen (c) ($10 \mu\text{m} = \text{—}$).

my experience, these circular (moon-like) shapes are found only in extremely thin areas of the smears.

Although the subject is out of the scope of this work, it is of interest to remark on the lack of a visible fibrine network in the bloodstain. None of the smears I have examined (including freshly made stains) have shown such a network. Rapid drying of smears may prevent formation of the fibrine network.

In my experience, fluctuating room conditions (at least under a Mediterranean climate) do not interfere in the morphological preservation of erythrocytes in bloodstains. Extrinsic microenvironmental factors such as the hardness of the support do affect this preservation; while intrinsic microenvironmental parameters such as the thickness of the blood film may give characteristically appearing RBC. The passage of time between the specimen's death and the bloodstaining do not seem to have affected the preservation of RBCs farther than, perhaps, in the occurrence of leptocytary shapes.

In spite of the fact that the majority of RBC morphologies in stains are common to those displayed in non-smear RBC studies, some others are bloodstain-dependent because of the presence of plasma. In particular, the moon-like shapes appear to be indicative of a thinner film area of a bloodstain on a non-porous surface.

To my knowledge, works such as the present one have not have previously reported. Interest in bloodstain examination has been mainly directed towards the molecular level of genetic markers such as hemoglobin (1-3, 10,11). SEM offers many possibilities to both forensic scientists and paleobiologists for morphological examination of bloodstains.

ACKNOWLEDGEMENTS

I gratefully acknowledge the Zoological Garden of Barcelona for supplying the animal specimen and the Scientific-Technical Services of the University of Barcelona for the use of its Electron Microscopy facility.

References

1. Loy, T.H. "Prehistoric Blood Residues: Detection on Tool Surfaces and Identification of Species of Origin", *Science* 220, 1269-1271 (1983).
2. Loy, T.H. "Recent Advances in Blood Residue Analysis", In: Ambrose, W.R. and J.M.J. Mummery,

eds., *Archaeometry: Further Australasian Studies*. Canberra: Australian National University, 7-65 (1987).

3. Loy, T.H. and A.R. Wood. "Blood Residue Analysis at Çayönü Tepesi, Turkey", *Journal of Field Archaeology* 16, 451-460 (1989).

4. Castoldi, G.L. "Erythrocytes", In: Zucker-Franklin, D., Greaves, M.F. Grossi, C.E. and A.M. Marmont, eds., *Atlas of Blood Cells. Function and Pathology*. Milano/Philadelphia: Ermes/Lea and Febiger, pp. 35-145 (1981).

5. Barnhart, M.I., Wallace, M.A. and J.M. Lusher. "Red Blood Cells", In: Hodges, G.M. and K.E. Carr, eds., *Biomedical Research Applications of Scanning Electron Microscopy*, Vol. 3, London-New York: Academic Press, 171-243 (1983).

6. Villanueva, E. "Los Indicios en Medicina Legal", In: Gisbert, J.A. *Medicina Legal y Toxicología*, 4th ed. Barcelona: Salvat, pp. 971-997 (1991).

7. Hortolà, P. "SEM Analysis of RBC in a Three-Month-Aged Bloodstain" (submitted for publication).

8. Jain, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*, 4th ed. Philadelphia: Lea and Febiger (1986).

9. Seiverd, C.E. *Hematology for Medical Technologists*, 5th ed., Philadelphia: Lea and Febiger, pp. 269-322 (1983).

10. Quarino, L. and L. Kobilinsky. "Development of a Radioimmuniassay Technique for the Detection of Human Hemoglobin in Dried Bloodstains". *Journal of Forensic Sciences* 33, 1369-1378 (1988).

11. Oshima, M., Inoué, T. and M. Hara. "Identification of Species Specific Hemoglobin by Isoelectric Focusing", *Forensic Science International* 20, 277-286 (1982).

4.2.2. Traducción del inglés

Caracterización por MEB de manchas de sangre sobre herramientas de piedra

Palabras clave: Glóbulos rojos de la sangre, manchas de sangre, Microscopia Electrónica de Barrido, Arqueología.

Resumen

Han sido previamente detectados por Microscopia óptica glóbulos rojos de la sangre (GRS) de mamífero en manchas de sangre sobre herramientas de piedra de alrededor de 100.000 años de antigüedad. Para observar y caracterizar los GRS originarios de mancha de sangre, una réplica moderna de restos de sangre antigua fue examinada por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB). Para simular un proceso de la Edad de la Piedra, un cadáver de pécarí de collar (*Tayassu tajacu*) fue desollado utilizando un cuchillo como paleolítico de sílex blanco, que fue entonces manchado con sangre más líquido seroso. Después de secarla al aire libre durante una semana, la herramienta fue mantenida en condiciones de sala inestériles y fluctuantes. Después de seis meses, un fragmento, desprendido de la mancha, fue cubierto con oro sobre un portamuestras de MEB y examinado a un voltaje de aceleración de 15 kV utilizando un microscopio electrónico de barrido Stereoscan 120 Cambridge. Los resultados revelan prominentes *formas lunoides* que se interpretan característicos de los GRS.

Introducción

La preservación morfológica de glóbulos rojos de la sangre (GRS) de mamífero en manchas de sangre ha sido previamente revelada incluso en herramientas de piedra prehistóricas de 100.000 ± 25.000 años de antigüedad (1-3).

Los cambios en apariencia de los GRS bajo condiciones de secado de flujo nulo pueden ser similares a las vistas en el estado reológico de bajo flujo. La hipertonocidad del plasma debida al secado de la mancha de sangre conduce a cambios morfológicos estereotípicos en los GRS. Éstos comprenden varios grados de cambios estomatocitarios o equinocitarios, en la vía hacia una forma esferocitaria (4,5).

Hasta la fecha, los exámenes microscópicos de rutina de la morfología de GRS en estudios forenses y paleobiológicos han sido llevados a cabo utilizando la Microscopia óptica

(1-3,6). No han sido informados estudios similares utilizando la Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

Como parte de mis estudios paleobiológicos sobre residuos antiguos de sangre, he iniciado una serie de observaciones experimentales utilizando el MEB para observar cambios en la morfología de los GRS durante el envejecimiento. En un análisis previo, examiné (por MEB) una mancha humana de tres meses sobre sílex blanco. Observé bien conservada la integridad de los GRS, junto con la aparición de una forma eritrocitaria lunoide (7, véase nota al pie del epígrafe 4.2.1.). En el presente artículo, informo del análisis y subsiguiente caracterización por MEB de una mancha de sangre no humana hecha en el filo de una réplica experimental de herramienta paleolítica, con un énfasis especial en este aspecto lunoide de los GRS.

Materiales y métodos

Se realizó una simulación de un proceso de la Edad de la Piedra de desuello de un cadaver utilizando una réplica moderna de sílex blanco de un cuchillo paleolítico. El cuchillo fue manchado con una capa delgada de sangre, mezclada de forma natural con líquido seroso, de bajo la caja torácica de una hembra de pécarí de collar (*Tayassu tajacu*). El espécimen tenía aproximadamente 10 años de edad y había muerto tres semanas antes del ejercicio. El cadaver había sido mantenido a 0°C en un contenedor cerrado durante el período que medió. Tras su uso, la herramienta fue secada al aire libre durante la primera semana. La exposición al sol fue aproximadamente de una hora por día. Después de esta semana, la herramienta fue mantenida en condiciones de sala fluctuantes e inestériles (temperatura media 19°C, rango 30-12°C; humedad relativa media 68%, rango 83-37%). Tras seis meses, un fragmento de residuo de sangre del filo de la herramienta fue separado y recubierto por difusión con oro usando una unidad de recubrimiento de MEB Polaron (Modelo E 5000, Polaron Equipment Ltd., Watford, Reino Unido). El fragmento fue examinado a un voltaje de aceleración de 15 kV utilizando un microscopio electrónico de barrido Stereoscan 120 (Cambridge Instruments Ltd., Cambridge, Reino Unido). Las fotomicrografías se hicieron utilizando película TMY 120 (Kodak Ltd., Hemel Hempstead, Reino Unido).

Resultados y discusión

Los resultados se muestran en las Figuras 1-3. En todas ellas, aparecen GRS dentro de la matriz de plasma seco libres de recubrimiento de plasma y pueden verse microfracturas de este plasma seco. En la Figura 1, aparecen GRS con formas de leptocito (l), equinocito (e) y un disco plano (no leptocito) que se da bajo la matriz en la frontera de una fractura de plasma (d). La falta de una presencia significativa de formas de equinocito puede indicar un secado rápido de la mancha en esta área, puesto que la forma de equinocito se produce cuando la sangre se seca lentamente (9).

La Figura 2 muestra GRS mostrando un aspecto circular o semicircular (*formas lunoides*). La manipulación de la muestra seca previa al recubrimiento produjo una ligera alteración superficial del plasma, como denotan las muescas (ver flechas). A pesar del hecho que esta manipulación pudiese haber contribuido al aspecto altamente aplanado del conjunto del área, las formas lunoides de GRS han sido observadas en las áreas más delgadas de la mayor parte de las manchas de sangre examinadas.

La Figura 3 muestra una área inalterada similar a la anterior. El cursor define un GRS alunoidado con un tamaño cercano al diámetro medio para la especie, sobre la base de la similaridad en composición celular de los *Tayassuidae* con la del cerdo doméstico (8, p. 341). En aquel, el diámetro del GRS promedia 6,0 μm , con un rango de 4,0-8,0 μm (8, p. 240).

Por otra parte, la amplia variación morfológica exhibida por los GRS en la muestra confirma el hecho que las ligeras diferencias en forma y tamaño del GRS de mamífero no permiten una discriminación taxonómica (2,6). Una excepción sería la conocida forma elíptica característica del GRS de los *Camellidae* (8, pp. 6, 527-528).

Dentro de las microfracturas del plasma en la Figura 3, la estructura clara (c) es sílex blanco. La fractura de la matriz plasmática en torno de este punto denotaría que es un afloramiento del soporte de piedra debido a la extrema delgadez de la mancha de sangre en el filo de la herramienta, y no una partícula de sílex blanco depositada después del manchado de sangre.

La mayor profundidad visible de la fractura de la matriz de plasma en la Figura 1, comparada con las microfracturas mostradas en las restantes figuras, indica probablemente que la primera área es más gruesa que las mostradas en la Figura 2 y 3. Las formas lunoides corresponderían por consiguiente a áreas delgadas de la mancha de sangre. En mi experiencia,

estas formas (lunoides) circulares se hallan solamente en áreas extremadamente delgadas de las manchas.

Aunque el tema está fuera de las miras de este trabajo, es interesante hacer notar la falta de una malla visible de fibrina en la mancha de sangre. Ninguna de las manchas que he examinado (incluyendo manchas frescas) han mostrado tal malla. El secado rápido de las manchas puede evitar la formación de la malla de fibrina.

En mi experiencia, las condiciones de sala fluctuantes (por lo menos bajo un clima mediterráneo) no interfieren en la preservación morfológica de los eritrocitos en manchas de sangre. factores microambientales extrínsecos, tales como la dureza del soporte no afectan esta preservación; mientras que parámetros microambientales intrínsecos tales como el grosor de la capa de sangre pueden dar GRS de apariencia característica. El tiempo transcurrido entre la muerte del espécimen y el manchado de sangre no parece haber afectado la preservación de los GRS más allá de, tal vez, la ocurrencia de formas leptocitarias.

A pesar del hecho que la mayoría de morfologías de GRS en manchas son comunes a las mostradas en estudios de GRS no de manchas, otras son dependientes de mancha de sangre debido a la presencia de plasma. En particular, las formas lunoides parecen ser indicativas de una área de mancha de sangre de capa más delgada sobre una superficie no porosa.

En mi conocimiento, no se ha informado anteriormente de trabajos como el presente. El interés en el examen de manchas de sangre ha sido principalmente dirigido al nivel molecular de marcadores genéticos tales como la hemoglobina (1-3,10,11). El MEB ofrece muchas posibilidades a los científicos forenses y paleobiólogos para el examen morfológico de manchas de sangre.

Agradecimientos

Agradezco al Parque Zoológico de Barcelona el suministro del espécimen animal y a los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona el uso de su instalación de Microscopía Electrónica.

Texto de las figuras

Figura 1. Varias formas de GRS en una área más delgada de la mancha de sangre. Leptocito (l), equinocito (e) y disco plano (no leptocito) (d).

Figura 2. GRS como *formas lunoides*, en una área más delgada de superficie alterada. Esta alteración es claramente visible por las muescas superficiales (flechas).

Figura 3. GRS exhibiendo la misma morfología lunoide que la Figura 2, en una área más delgada de superficie inalterada. El cursor confina una *forma lunoide* eritrocitaria cercana al diámetro medio para la especie. Se ve la materia prima de sílex blanco de la herramienta (c).

4.3. Application of SEM to the study of red blood cells in forensic bloodstains

Policarp Hortolà. 1994. *Microscopy & Analysis (United Kingdom Edition)* **40**: 19/21 &
Microscopy & Analysis (European Edition) **28**: 21/23

4.3.1. Original*

*Paginado del ejemplar de la edición británica.

APPLICATION OF SEM TO THE STUDY OF RED BLOOD CELLS IN FORENSIC BLOODSTAINS

Policarp Hortolà, Department of Cell Biology and Pathological Anatomy, University of Barcelona

Keywords: Scanning electron microscopy, red blood cells, bloodstains, hemotaphonomy

Introduction

Although in forensic analysis the presence of red blood cells (RBC) in a smear is considered to be a confirmation of blood (1,2), to date morphological researches using electron microscopy dealing with superficial preservation or imprints characterisation of erythrocytes in bloodstains have not been carried out. On the other hand, morphological preservation of bloodstain-original RBC has been previously reported even in prehistoric stone implements up to around 100,000 years old (3).

Short-time preservation of specimens is a "sine qua non" precondition to bioarchaeological or palaeobiological preservation. So a part of my researches on ancient blood residues has been focused on developing a methodology to study forensic suspected bloodstains - considering as 'forensic' all modern blood smears of unknown origin - covering substrates from hard to (absorbent) soft ones.

In a previous paper (4), I proposed the term *hemotaphonomy* to designate 'the study of bloodstains, and especially of the changes in appearance and size of the cellular components, as well as the characteristics of their cell position and appearance as related to the superficial topography and composition of the substrate'. In this article, I report a method used by me, as well as showing examples of achieved results on either soft or hard smear substrates, in the course of SEM studies dealing with 'urban' forensic hemotaphonomy.

Methodology and equipment

Field procedures

An "in-situ screening" of the smears (i.e., an orientative test for generical diagnostic of the bloodstain as such) is performed by both: a) its projected-staining shape (if little smears), pasty, dense look and (when lighter substrate) dark red colour, and b) its positive reaction to both *blood* and *protein (albumin)* fields (being compared with *compensation area*) in a *Rapignost Total-Screen I* colorimetric test strip for rapid determination in urine (Behring, Marburg, Germany). This is used by me for an "in-situ screening" according to the following protocol: a fragment of the suspected smear is macerated by 3 drops of distilled-deionised water into an Eppendorf microtube; after at least 1 minute of strong agitation - followed by several minutes of decantation, if suspended particles are present - 1 drop of the macerate is deposited on each of the appropriate fields of the test strip.

When the smear substrate is a soft one (such as paper or cloth), the sample is cut away by ethyl alcohol cleaned scissors. If the smear lies on a hard support (asphalt, cement, etc.), the stain fragment is removed from that using a sterile surgical blade.

A positive reaction to both *blood* and *protein*

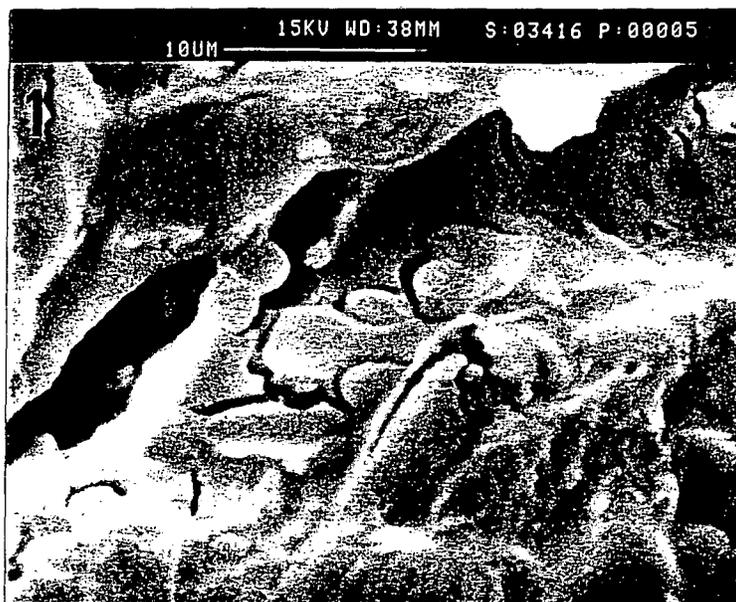


Fig. 1. A 2-month-old sample of forensic bloodstain on a paper handkerchief. RBC are mainly seen in the form described by me as moon-like shapes.

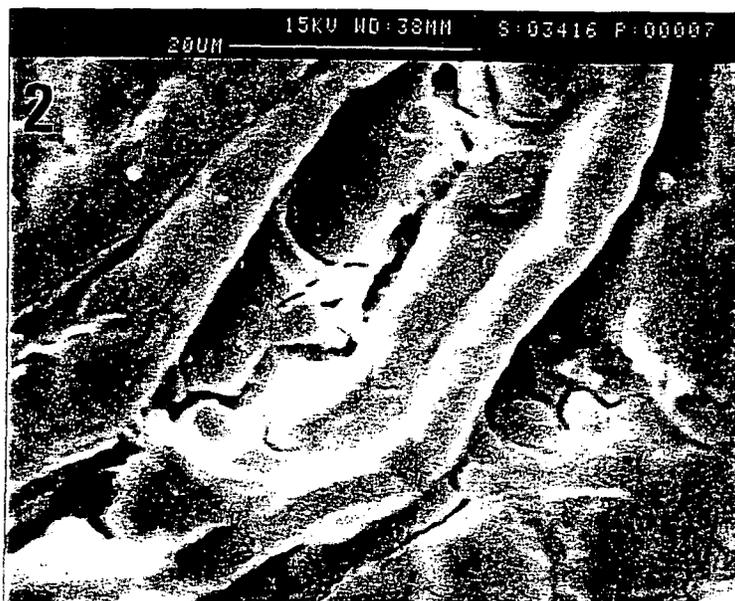


Fig. 2. Another area of the same blood smear, showing several erythrocytes between the fibres of paper.

(albumin) fields is, according to my previous laboratory experimental evaluations; a strong argument for the stain to be considered as blood; if at least a positive reaction is made in the hemo-/myoglobin area, the sample is selected to be SEM analysed. A negative reaction to blood field results in exclusion of the sample from electron microscope study.

SEM procedures

Selected specimens are first coated with gold in an SEM sputter-coater (Polaron E 5000, Watford, UK), and then examined at an accelerating voltage of 15 kV in a Stereoscan 120 scanning electron microscope (Cambridge Instruments Ltd., Cambridge, U.K.), at the Scientific-Technical Services of the University of Barcelona.

Detection of RBC on the monitor is made primarily by placing the cursor so that a visible width of around 1cm is equivalent to 7.50µm. Thus, the morphology of the (RBC candidates) bodies may be confined with a sufficient power of detail discrimination. Bodies more than 0.50 µm over this width are excluded from consideration as erythrocytes, but – due to the environmental stress conditions that forensic erythrocytes may have undergone – not the ones sized under this range.

Micrographs are made using T-MAX 400 ISO professional film (Kodak Ltd., Hemel Hempstead, U.K.).

Examples of application of the field/SEM procedures on suspected bloodstains

A smeared paper handkerchief – part of a suspected little bloodstain trickle, and thus assumed to be very recent – was 'in situ' tested by an as-described strip. Positive results for blood (+++, 1 mg Hb/dL; maximum) and protein (albumin) (≥ 500 mg Alb/dL; maximum) fields were given at instant 0 and 15 sec, respectively. Then, the sample was stored in unsterile and fluctuating room conditions during 2 months prior to gold coating and SEM examination. RBC, mainly seen as moon-like shapes (4,5), were easily detected (Figs. 1 and 2), on both sides of the handkerchief.

The case of an about 8-month-old smear on asphalt in a street's crossing-walk is illustrative of the field screening/SEM analysis of a suspected bloodstain on a hard substrate. This smear was reported to me as blood about 8 months after the first detection by the eye-witness. Screened by me using the colorimetric strip, results were of + (3x10⁻² mg Hb/dL; minimum specified in the company prospectus) at 60 sec-2 min for blood and negative at 2 min for protein (albumin). If the smear corresponded really to blood, this failure in the test strip reactivity might be related to the ageing of the sample. In spite of the very heavy conditions undergone during that time (sunshine, wind and rain, moreover the watering by the municipal services and overlapping by both walkers and vehicles), it was still possible to detect in the surface of the stain a typical RBC (Fig. 3). Although some erythrocyte-like bodies, found in human mummies, have been largely assigned to be in fact fungi (6), further both light and electron microscopy (SEM) findings (7,8) have stated the preservation of RBC from mummies ranging in diameter from 3.4 to 4.3 µm; and, thus, even more separated from the mean typical human erythrocyte size of 7.49 µm reported from SEM stereo micrographs (9) than the 4.86 visible diameter of

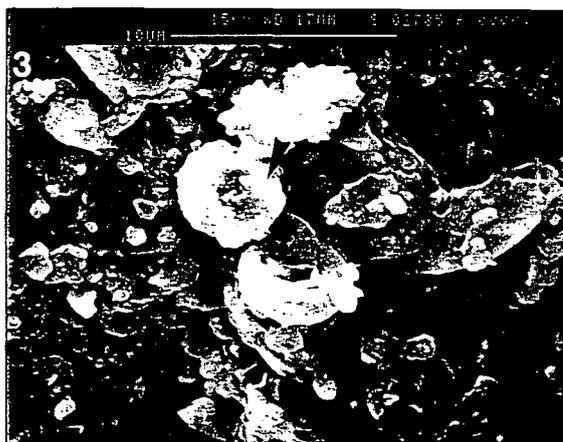


Fig.3. Suspected bloodstain about 8 months old. A typical erythrocyte-like body is clearly seen; the arrow points to a structure over the RBC that would correspond to dried plasma elevated from the surface of the erythrocyte (i.e., a negative replica), and in this way permitting the true discocytary morphology of the red cell to be seen.

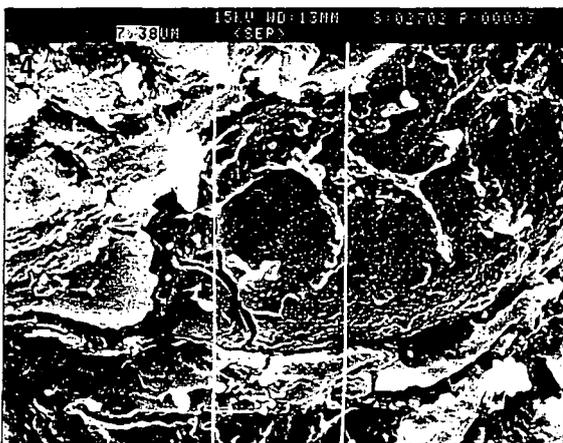


Fig.4. In the same smear, supposed RBC moulds (that is to say, negative replicas due to plasma-matrix) left by missing RBC that have sprung from the surface of the smear. Cursor encloses a mould with a size close to the 7.49 µm mean diameter of typical human RBC (normocytes).

the displayed structure of Fig. 3. Also, other levels of erythrocyte-dependent bloodstain identification have been evidenced in the displayed smear, such as plasma moulds (Fig.4). This showed moulds are similar to those previously observed by me in experimental bloodstains aged under room conditions.

Conclusion

A long time ago, urinalysis colorimetric teststrips have been used successfully in the screening of prehistoric blood residues (10). In the presented forensic work, these test strips have been revealed also as a useful tool for the "in situ screening" of suspected bloodstains, although easier to employ in (easy to smear solubilize) soft substrates than in (difficult to stain solubilize) hard urban supports.

On the other hand, better SEM results in detailed discrimination of the erythrocyte morphology have been attained, in general, for samples on hard supports, while on (absorbent) soft supports, they were not as good. This fact might be related to the strong topographical irregularity of these latter substrates, which would influence the settling of the RBC when the blood stain is drying.

As far as is known, field/SEM works such as those presented here have not been reported previously. However, SEM offers many possibilities to both forensic and palaeo-biologists for morphological studies dealing with either old or ancient blood.

References

1. López, L., *Técnica Médico-Legal. I, Criminalística*. Saber, Valencia, 19, 1953.
2. Villanueva, E. In Gisbert, J. A., *Medicina Legal y Toxicología*. Salvat, Barcelona, 975, 1991 (4th ed.).
3. Loy, T. H., Recent advances in blood residue analysis. In Ambrose W. R. and Mummy J. M. J., (eds) *Archaeometry: Further Australasian Studies*. Australian National University, Canberra, 7-65, 1987.
4. Hortolà, P., SEM Analysis of Red Blood Cells in Aged Human Bloodstains. *Forensic Sci. Int.*, 55 (2), 139-159, 1992.
5. Hortolà, P., SEM Characterization of Blood Stains on Stone Tools. *The Microscope*, 40 (2), 111-113, 1992 ("Errata" in vol. 40 (3), vi, 1992).
6. Sandison, A. T., In Brothwell, D., and Higgs E., (eds) *Science in Archaeology*, Praeger, New York, 494, 1970.
7. Zimmerman, M. R., Blood Cells Preserved in a Mummy 2000 Years Old. *Science*, 180, 303-304, 1973.
8. Riddle, J. M. et al, Peripheral Blood Elements Found in an Egyptian Mummy: A Three-Dimensional View. *Science*, 192, 374-375, 1976.
9. LeBlond, P. F., and Shoucri, R., Calculation of surface area and volume of human erythrocytes from scanning electron micrographs. *J. Microsc.*, 113, 161-170, 1978.
10. Loy, T. H., Prehistoric Blood Residues: Detection on Tool Surfaces and Identification of Species of Origin. *Science*, 220, 1269-1271, 1983.

Author's details: Policarp Hortolà, Department of Cell Biology and Pathological Anatomy; Faculty of Medicine, University of Barcelona; Avinyuda Diagonal s/n, E-08028 Barcelona; Catalonia, Spain.

MICROSCOPY AND ANALYSIS, MARCH 1994 21

4.3.2. Traducción del inglés

Aplicación del MEB al estudio de glóbulos rojos de la sangre en manchas de sangre forenses

Palabras clave: Microscopia Electrónica de Barrido, glóbulos rojos de la sangre, manchas de sangre, Hemotafonomía.

Introducción

Aunque en análisis forense la presencia de glóbulos rojos de la sangre (GRS) en una mancha es considerada ser una confirmación de sangre (1,2), hasta la fecha no se han llevado a cabo investigaciones morfológicas utilizando la Microscopia Electrónica sobre la preservación superficial o caracterización de huellas de eritrocitos en manchas de sangre. Por otra parte, se ha informado previamente de la preservación morfológica de GRS originarios de mancha de sangre incluso en implementos prehistóricos de piedra de alrededor de hasta 100.000 años de antigüedad (3).

La preservación a corto plazo de especímenes es una condición previa "sine qua non" para la preservación bioarqueológica o paleobiológica. Por lo tanto una parte de mis investigaciones sobre residuos antiguos de sangre se ha enfocado en desarrollar una metodología para estudiar manchas forenses sospechosas de ser sangre -considerando como 'forenses' toda mancha moderna de sangre de origen desconocido- abarcando substratos desde duros a blandos (absorbentes).

En un artículo previo (4), propuse el término *hemotafonomía* para designar 'el estudio de las manchas de sangre, y especialmente de los cambios en apariencia y tamaño de los componentes celulares, así como las características de su posición celular y apariencia en función de la topografía superficial y composición del substrato'. En este artículo, informo de un método utilizado por mi, así como muestro ejemplos de resultados conseguidos sobre substratos blandos o duros, en el transcurso de los estudios por MEB sobre hemotafonomía 'urbana' forense.

Metodología y equipo

Procedimientos de campo

Se realiza un "cribado in situ" de las manchas (es decir, una prueba orientativa para el diagnóstico genérico de la mancha de sangre como tal) por: a) su forma de mancha proyectada

(caso de manchas pequeñas), aspecto denso, pastoso y (cuando el substrato es más claro) color rojo oscuro, y b) su reacción positiva a ambos campos de la *sangre* y *proteína (albúmina)* (siendo comparados con el *área de compensación*) en una tira de prueba colorimétrica para la determinación rápida en orina *Rapignost Total-Sreen L* (Behring, Marburg, Alemania). Ésta es utilizada por mi para un "cribado in situ" de acuerdo con el siguiente protocolo: un fragmento de la mancha sospechosa se macera en un microtubo Eppendorf con 3 gotas de agua destilada desionizada; después de al menos 1 minuto de agitación fuerte -seguida de varios minutos de decantación, si se hallan presentes partículas suspendidas- se deposita 1 gota del macerado sobre cada campo apropiado de la tira de prueba.

Cuando el substrato de la mancha es blando (tal como papel o vestimenta), la muestra se corta con tijeras limpiadas con alcohol etílico. Si la mancha yace sobre un soporte duro (asfalto, cemento, etc.), el fragmento de mancha se remueve de él utilizando una cuchilla quirúrgica estéril.

Una reacción positiva a los campos de *sangre* y *proteína (albúmina)* es, de acuerdo con mis previas evaluaciones experimentales de laboratorio, un fuerte argumento para que la mancha sea considerada como sangre; si por lo menos el área de la hemo-mioglobina hace una reacción positiva, la muestra es seleccionada para ser analizada por MEB. Una reacción negativa al campo *sangre* da por resultado la exclusión de la muestra del estudio por microscopio electrónico.

Procedimientos de MEB

Los especímenes seleccionados son primero recubiertos con oro en un recubridor por difusión de MEB (Polaron E 5000, Watford, Reino Unido), y entonces examinados a un voltaje de aceleración de 15kV en un microscopio electrónico de barrido Stereoscan 120 (Cambridge Instruments Ltd., Cambridge, Reino Unido), en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

La detección en el monitor de los GRS se hace primariamente colocando el cursor de tal modo que una anchura visible de alrededor de 1 cm equivale a 7,50 μm . Así, la morfología de los cuerpos (candidatos a GRS) puede confinarse con un poder de discriminación de los detalles suficiente. Los cuerpos de más de 0,50 μm sobre este ancho se excluyen de ser considerados como eritrocitos, pero -debido a las condiciones de tensión ambiental que pueden haber sufrido los eritrocitos forenses- no las de tamaño bajo este rango.

Las microfografías son hechas utilizando película profesional T-MAX 400 ISO (Kodak Ltd., Hemel Hempstead, Reino Unido).

Ejemplos de aplicación de los procedimientos de campo/MEB sobre presuntas manchas de sangre

Un pañuelo de papel manchado -parte de un pequeño reguero sospechoso de ser de manchas de sangre., y así asumido ser muy reciente- fue probado 'in situ' por una tira de las descritas. Se dieron resultados positivos para los campos *sangre* (+++, 1 mg Hb/dL; máximo) y *proteína (albúmina)* (\geq 500 mg Alb/dL; máximo) al instante 0 y 15 s, respectivamente. Entonces, la muestra fue mantenida en condiciones de sala inestériles y fluctuantes durante 2 meses antes del recubrimiento con oro y examen por MEB. Los GRS, vistos principalmente como *formas lunoides* (4,5), fueron fácilmente detectados (figs. 1 y 2), en ambos lados del pañuelo.

El caso de una mancha de unos 8 meses sobre asfalto en un paso de cebra es ilustrativo del *cribado de campo/análisis por MEB* de una presunta mancha de sangre sobre un substrato duro. Esta mancha se me informó como sangre alrededor de 8 meses después de la primera detección por el testigo. Cribada por mi utilizando la tira colorimétrica, los resultados fueron de + (3×10^{-2} mg Hb/dL; mínimo especificado en el prospecto de la compañía) a los 60 s-2 min. para *sangre* y negativo a los 2 min. para *proteína (albúmina)*. Si la mancha correspondía realmente a sangre, esta falta de reactividad en la tira de prueba podría estar relacionada con el envejecimiento de la muestra. A pesar de las muy duras condiciones sufridas durante aquel tiempo (sol, viento y lluvia, además del riego por los servicios municipales y el cruce por encima de peatones y vehículos), aún fue posible detectar en la superficie de la mancha un GRS típico (Fig. 3). Aunque algunos cuerpos eritrocitoides, hallados en momias humanas, han sido asignados en gran medida ser de hecho hongos (6), posteriores hallazgos por Microscopia Óptica y Electrónica (MEB) (7,8) han determinado la preservación de GRS de momias que se fluctúan en diámetro desde 3,4 hasta 4,3 μm ; y, así, incluso más alejados del tamaño eritrocitario típico humano de 7,49 μm informado a partir de estereomicrografías (9) que el diámetro visible de 4,86 de la estructura de la Fig. 3. También, han sido evidenciados en la mancha mostrada otros niveles de identificación, de manchas de sangre, dependientes de los eritrocitos, tales como moldes de plasma (Fig. 4). Estos moldes que se muestran son similares a los previamente observados por mi en manchas experimentales envejecidas bajo condiciones de sala.

Conclusión

Hace mucho tiempo que las tiras colorimétricas de urianálisis han sido utilizadas con éxito en el cribado de residuos prehistóricos de sangre (10). En el trabajo forense presentado, estas tiras de prueba se han revelado también como una herramienta útil para el "cribado in situ" de presumibles manchas de sangre, si bien más fáciles de emplear en sustratos blandos (fáciles de solubilizar la mancha) que en soportes urbanos duros (difíciles de solubilizar la mancha).

Por otro lado, los mejores resultados de MEB en la discriminación detallada de la morfología del eritrocito se han obtenido, en general, para muestras sobre soportes duros, mientras que en soportes blandos (absorbentes), no fueron tan buenos. Este hecho podría estar relacionado con la fuerte irregularidad topográfica de estos últimos sustratos, que influenciarían el asentamiento de los GRS cuando la mancha de sangre se está secando.

Hasta donde se conoce, no se ha informado anteriormente de trabajos de campo/MEB como los presentados aquí. Sin embargo, el MEB ofrece a biólogos forenses y paleobiólogos muchas posibilidades de estudios morfológicos sobre sangre vieja o antigua.

Texto de las figuras

Fig. 1. Una muestra de 2 meses de mancha de sangre forense sobre un pañuelo de papel. Los GRS se ven principalmente en la forma descrita por mi como *formas lunoides*.

Fig. 2. Otra área de la misma mancha de sangre, mostrando varios eritrocitos entre las fibras de papel.

Fig. 3. Presumible mancha de sangre de unos 8 meses. Se ve claramente un cuerpo como un eritrocito típico; la flecha señala una estructura sobre el GRS que correspondería a plasma seco elevado de la superficie del eritrocito (esto es, una réplica negativa), y permitiendo de este modo que sea vista la verdadera morfología discocitaria.

Fig. 4. En la misma mancha, supuestos moldes de GRS (es decir, réplicas negativas debidas a la matriz de plasma) dejados por GRS perdidos que se han desprendido de la superficie de la mancha. El cursor incluye un molde con un tamaño cercano a los 7.49 μm de diámetro medio de los GRS humanos típicos (normocitos).

**5. ARTÍCULOS ACEPTADOS
PARA SU PUBLICACIÓN**

5.1. Experimental SEM determination of game mammalian bloodstains on stone tools

Policarp Hortolà

Environmental Archaeology

5.1.1. Original

Abstract

The presence of morphologically complete mammalian erythrocytes (red blood cells, RBC) from bloodstains has been previously evidenced in prehistoric implements. While the presence of ancient non-human blood on a prehistoric tool is evidence of the real use of this on an animal resource, the presence of RBC in a smear is evidence of blood. In a simulation of a prehistoric predation human operative chain, mammalian bloodstains on palaeolithic-like chert implements were obtained from two specimens belonging to the order Artiodactyla: collared peccary (*Tayassu tajacu*, family Tayassuidae) and Dorcas gazelle (*Gazella dorcas*, family Bovidae). After one year, the unburied peccary blood smear and the buried gazelle smear were coated with gold and then examined by a scanning electron microscope. Results revealed the presence of preserved RBC with several shapes like those found in haematological studies, as well as curved plasma fractures and negative imprints, two bloodstain-characteristic morphologies which are interpreted as due, respectively, to erythrocyte-plasma interaction when drying and to imprinting by dried plasma matrix.

Keywords: Red blood cells, bloodstains, scanning electron microscopy, haemotaphonomy, palaeolithic, experimental archaeology.

Introduction

The presence of morphologically complete mammalian erythrocytes (red blood cells, RBC) from bloodstains has been previously evidenced in prehistoric implements (e.g. Loy 1983; Loy and Dixon 1998). The study of bloodstains may be a valuable complement to human palaeoecological researches. An integration of use-wear, residues and lithic technology is essential for interpretations of how stone tools were used (Fullagar 1998) and, in this sense, the presence of ancient non-human blood on an implement represents a strong clue to the use of this implement on an animal resource. At the same time, in forensic analysis the presence of RBC in a smear is evidence for the presence of blood (López 1953; Fiori 1962; Villanueva 1998). An appropriate instrument for the examination of the microstructural characteristics of bloodstains is the scanning electron microscope (SEM). The main features of SEM are its high resolution for bulk objects, and its large depth of field and electron contrast (shadow-relief

effect) which results in a three-dimensional appearance of the specimen image. Because of its capability of examining objects at very low magnification, SEM results in a very useful tool in either forensic and archaeological studies (Goldstein *et al.* 1992). Furthermore, from the point of view of blood confirmation in ancient smears, SEM facilities are usually more available than molecular biology laboratories to either palaeobiologists and bioarchaeologists.

The investigation of modern organisms directed towards the understanding of fossil analogues is one branch of palaeontology termed *actuopalaeontology* (Stiegeler 1976). This is based upon the Principle of Actualism ('the present is the key to the past'), which in turn is the basis of experimental archaeology. Thus, the experimental approach is used as in palaeontology (e.g. Briggs and Kear 1993) as in archaeology (e.g. Charters *et al.* 1997). In the case of bloodstains, (modern) experimental samples are relevant to the study of (ancient) prehistoric smears not only in order to determine the potential erythrocyte shape changes in bloodstains on stone, but also because short-time preservation of the RBC integrity is a *sine qua non* precondition for longer-term preservation.

In a study dealing with RBC morphology in bloodstains on stone tools, a simulation of a prehistoric predation human operative chain was performed, from stone knapping to using the manufactured tools on game mammals. An accidental slice during the stone-knapping episode, provided a human bloodstain on one of those tools, which was SEM analysed after three months of storage (Hortolà 1992a). A fragment detached from another tool smeared with game mammalian blood was SEM characterised after six months of storage (Hortolà 1992b), and the remainder part of that sample was kept for a further SEM study. A third tool smeared with blood from other mammalian game species was also kept to be SEM examined after the same time lapse as the remaining part. In this paper, I report the SEM determination of these last bloodstains.

Materials and methods

Two mammalian blood smears from specimens belonging to the order Artiodactyla, deceased at a zoological garden, were obtained on palaeolithic-like white chert tools. After death, the animal corpses had been stored at 0°C in a cold chamber; no cause of death was determined on gross examination. Both smears were obtained at the same experimental session after leaving the cadavers out of the chamber to acquire ambient temperature. A bloodstain was obtained by skinning a collared peccary [*Tayassu tajacu* (L.), family

Tayassuidae] with a knife replica, and the other one by piercing a Dorcas gazelle [*Gazella dorcas* (L.), family Bovidae] with a projectile point replica.

The knife was smeared with a thin film of blood, naturally mixed with serous liquid, from under the rib-cage of the specimen, which was a female about 10 years old which had died three weeks prior to the exercise. After use, the tool was dried in the open air for the first week; exposure to sunlight was approximately one hour per day. Following this week, the knife was left unburied under fluctuating and unsterile conditions indoors. Microclimatic room conditions during the storage time span were estimated according to the results of measurements taken *in situ* (mean temperature 21°C, range from ≤ 12 to ≥ 32.5 °C; mean relative humidity 65.5%, range from ≤ 37 to ≥ 83 %). After one year, the knife was directly recovered without brushing the bloodstained area.

The projectile point was smeared with a thick film of blood, directly from the heart of the specimen, which was a female about 3 years old which had died two weeks prior to the exercise. The heart blood was fluid, not clotted. After use, the tool was dried without direct sunlight for one day. Following this period, the tool was buried to 7.5 cm depth in vegetal soil, in the open-air under natural conditions in a undisturbed area. Previously, that vegetal soil was determined by the saturated mash method (Gutián 1964) as being $6 < \text{pH} < 7$, which agrees with the range of $6 \leq \text{pH} \leq 8$ of typical archaeological soils (Loy 1983). The environmental conditions of the open-air area during the burial period were estimated to be, approximately, 16.5°C mean air temperature (range from ≤ 2 °C to ≥ 34.5 °C), 61.5% mean air relative humidity (range from ≤ 55 % to ≥ 70 %), and 545 mm absolute rain; these estimates were done according to data for the locality of burial from the climatological summary of the official Zonal Meteorological Headquarters of Barcelona. After one year, this projectile point was recovered at 10.5 cm depth by excavating first a clayey bed and then the palaeosoil-like layer, having thus, in one year, gained 3 cm of sediment above the original soil surface. The implement exhibited an adhered soil area on one of the projectile arris. In accordance with reported experiments (Loy 1983), this area was assumed to retain the blood smear, the greater adherence of soil particles being due to electrostatic interactions with the blood residue. About half of this area was brushed gently with a soft brush under a low-power stereobinocular microscope; a reddish colour, lighter than at the time of bloodstaining, appeared under this adhered soil area. In some cases, up to 50% of the original blood residue may be sequestered in the first 0.1 mm of soil (Loy 1983). Thus, in order to test the presence of RBC in the adhered soil, the remaining

part of the area was left without brushing, though some of the most superficial adhered soil had already been removed during the excavation process of the sample.

Afterwards, the visibly (*circa* 7 cm² for the knife) or suspected (*circa* 3.5 cm² for the projectile point) bloodstained faces of the implements were coated with gold by a SEM Coating Unit E 5000 sputter coater (Polaron Equipment Ltd., Watford, U.K.), and then examined at an accelerating voltage of 15 kV by a Stereoscan 120 scanning electron microscope (Cambridge Instruments Ltd., Cambridge, U.K.). Micrographs were made using a (high-sensibility) T-Max 400 ISO professional film (Kodak Ltd., Hemel Hempstead, U.K.).

Results and discussion

Figs. 1-4 show some RBC of the unburied peccary bloodstain. In Fig. 1, RBC in an area near to that of the 6-month-old bloodstain fragment (Hortolà 1992b) are shown. A broken erythrocyte (**b**) next to an intact one, a plasma fracture outlining a flattened erythrocyte (**m**), and a flattened disc with no central depression (leptocyte, **l**) may be clearly seen. Fig. 2 shows some RBC near the knife cutting-edge area. A sloping mutilated flattened disc with a slight central depression (leptocyte, **l**) may be seen; its detached fragment appears above it (arrow). The white lines confine a curved plasma fracture with a visible size of 6.71 µm, similar to a previously found 6.60 µm one in the 6-month-old bloodstain fragment (Hortolà 1992b, Fig. 3). This is greater than the mean diameter (6.0 µm) for the *Tayassu* sp. females, assuming that their blood cell composition is similar to that of the domestic pig (*Sus scrofa* L.), as claimed by Jain (1986). In Fig. 3, RBC near the cutting-edge area are shown, with an aspect similar to those exhibited by the 6 month-old bloodstain fragment (Hortolà 1992b). Several curved plasma fractures (e.g. **m**), a folded erythrocyte or saddle cell (xerocyte, **x**), and a burr cell (echinocyte, **e**) may be seen. Two rouleaux-like piled leptocytes (**pl**) are also exhibited. Both the linear (rouleaux) and non-linear ('clump') erythrocyte aggregates result from the action of long, asymmetrical plasma globulins (mainly, α₂-macroglobulin and G and M immunoglobulins), which form bridges between adjacent RBC and overcome their mutual repulsion due to negative surface charges resulting primarily from sialic acid residues (Lowe 1987). Fig. 4 displays some RBC in another area near to that of the 6-month-old bloodstain fragment (Hortolà 1992b). A typical biconcave-disk erythrocyte (discocyte, **d**), an apparently broken RBC (**b**) which maintains its erythrocyte morphology, and a plasma-original negative replica of either this or another RBC (**n**) are shown.

Figs. 5-8 show some RBC of the buried gazelle bloodstain. In Fig. 5, the following may be seen along the exhibited area: a suspected echinocyte (e), a partially plasma-covered either biconcave (discocyte) or spherical (spherocyte) RBC (ds), as well as some shapes which may be a mixture of negative imprints and curved plasma fractures (e.g. m). Fig. 6 shows some suspected RBC in the adhered soil. A near-discocyte RBC (d) is visible on a topographical slope of the soil bed. In a foreground, the white lines confine another near-discocyte, which seems to be quasi-detached from a plaque (P), with a visible size of 4.52 μm . Such a size is below the 5.72 μm mean diameter of erythrocytes determined in Dorcas gazelle females from the same zoological garden stock (Peinado *et al.* 1990). This difference in diameter as revealed by SEM might be due to shrinkage by blood drying. In a SEM study on an Egyptian female mummy, a minimum erythrocyte diameter of 3.4 μm was found (Riddle *et al.* 1976), whereas a mean human erythrocyte size of 7.49 μm was reported from SEM stereo micrographs (LeBlond and Shoucri 1978). This difference in magnitude is more than three times the size difference found in the displayed near-discocyte. The plaque is suspected to be a smooth plasma fragment from the peripheral, non-central area of the smear; and this and the discocyte to be in secondary position due to their removal from the implement during the excavation or post-burial processing. In Fig. 7, a near-spherocyte (s), which is quasi-detached from suspected plasma (P), is exhibited; for a better interpretation, the micrograph is shown turned over with respect to the position in which it was made. Fig. 8 displays a non-pollen, non-spore, RBC suspected 'clump' aggregate. The most conspicuous bodies exhibit a diameter range from 3.71 μm (e.g. a) to 6.41 μm (e.g. z). This wide apparent erythrocyte size variability (anisocytosis) might be due to the 'clump' aggregation process.

Although, as far as is known, the differences in mammalian RBC diameter range from 2.1 μm in chevrotain [*Tragulus javanicus* (Osb.)] to 9.2 μm in giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla* L.) and elephants [*Elephas maximus* L. and *Loxodonta africana* (Blumenb.)], values between these extremes may be represented by one or more species. For example, for the erythrocyte diameter of 7.0 μm , we may find at the same time the sand badger (*Arctonyx collaris* Cuv.), big-eared fox [*Otocyon megalotis* (Desm.)], marmoset [*Callithrix jacchus* (L.)], brush-tailed opossum [*Trichosurus vulpecula* (Kerr)], domestic rabbit [*Oryctolagus cuniculus* (L.)] and giant squirrel [*Ratufa indica* (Erxl.)] (Handley and Ponder 1961). Also, within a species we may find a RBC range that agrees with the mean erythrocyte diameter of another species; for example, the range of 4.0-8.0 μm in normal RBC in peccary (*Tayassu* sp.)

and swine (*Sus scrofa*) (Jain 1986) agrees with the typical erythrocyte diameter for most of mammalian species (Handley and Ponder 1961). These similarities in diameter, together with the anisocytosis exhibited by the RBC in the examined samples, support the previous statement that the very slight differences in erythrocyte diameter in mammals do not permit a taxonomic discrimination on the basis of size (e.g. López 1953). RBC shape variability (poikilocytosis) would be useful for taxonomic purposes only to determine the well-known characteristic elliptical erythrocytes of family Camelidae (e.g. Banks 1981; Jain 1986). Moreover, sex differences and, mainly, the observed erythrocyte shrinkage in bloodstains would make this RBC taxonomic determination even more ambiguous, especially if such a determination is attempted with a few erythrocytes.

Even though the number of bloodstains presented in this paper is small, the existence of a large number of RBC in mammalian blood provides the appropriate replicas for each type of blood smear; for example, in two *Tayassu* sp. females the mean erythrocyte count was $8.22 \cdot 10^6 \cdot \text{mm}^{-3}$ (Jain 1986), and in fifteen *Gazella dorcas* females was $12.85 \cdot 10^6 \cdot \text{mm}^{-3}$ (Peinado *et al.* 1990). An important fact in the morphological study of bloodstain-original erythrocytes is not the number of examined smears, but the extent and thickness of each, the last providing different low and high magnification trends (Hortolà 1992a).

Whereas the burial of a sample provides a greater similitude to final taphonomical conditions, the unburied storage permits a more accurate experimental determination of the possible influence of meteorological variables on the diagenetical changes in a biological sample. Moreover, non-controlled room conditions are intended to simulate an initial cave environment, with climatic conditions similar to those which would affect a pre-buried bloodstain.

Given that erythrocytes are characteristic of blood (e.g. Fiori 1962), knowing the shapes that RBC acquire in a bloodstain enables us to characterise morphologically these kinds of smears, and thus to confirm, simply by using a SEM, the blood origin of a smear.

Conclusion

Plasma fractures outlining flattened erythrocytes and negative imprints of erythrocytes are found to be the morphologies most characteristic of bloodstains in this study, and agree with previous SEM analyses (Hortolà 1992a; Hortolà 1992b; Hortolà 1994). These plasma

fractures and negative imprints would be due, respectively, to erythrocyte-plasma interaction when drying and to imprinting by dried plasma matrix. Obviously, these RBC morphologies due to smear-drying phenomena are not found under physiological conditions. Other smear-origin RBC share morphologies with those found in haematological studies (e.g. Bessis 1974; Castoldi 1981; Barnhart *et al.* 1983; Jain 1986).

Previously, the term *haemotaphonomy* was proposed to refer to 'the study of bloodstains, and specially of the changes in appearance and size of the cellular components, as well as the characteristics of their cell position and appearance in function of the superficial topography and composition of the substrate' (Hortolà 1992a). The study of the different RBC and plasma-matrix morphologies exhibited in bloodstains represents a developing field with both palaeobiological and forensic implications.

Acknowledgements

I gratefully thank the Zoological Garden of Barcelona for supplying the game specimens, the Botanical Institute of Barcelona for the burial facility in a marginal area of its open-air vivarium, and the Scientific-Technical Services of the University of Barcelona for the use of its electron microscopy facility. This paper has been drawn up while the support of a fellowship (DGESIC No. ACP1999-0177) and a project grant (DIGICYT No. PB-96-1026-C03-02) from the Spanish Government, and a grant (CIRIT No. 1999SGR00181) from the Catalan Government.

References

- Banks, W. J. 1981. *Applied Veterinary Histology*. Baltimore-London: Williams and Wilkins.
- Barnhart, M. I., Wallace, M. A. and Lusher, J. M. 1983. Red Blood Cells, pp. 171-243 in Hodges, G. M. and Carr, K. E. (eds.), *Biomedical Research Applications of Scanning Electron Microscopy* (vol. 3). London-New York: Academic Press.
- Bessis, M. 1974. *Corpuscles. Atlas of red blood cell shapes*. Berlin-New York: Springer.

Briggs, D. E. G. and Kear, A. J. 1993. Fossilization of soft tissue in the laboratory. *Science* **259**: 1439-1442.

Castoldi, G. L. 1981. Erythrocytes, pp. 35-145 in Zucker-Franklin, D., Greaves, M. F., Grossi, C. E. and Marmont, A. M. (eds.), *Atlas of Blood Cells. Function and pathology*. Milano/Philadelphia: Ermes/Lea and Febiger.

Charters, S., Evershed, R. P., Quye, A, Blinkhorn, P. W. and Reeves, V. 1997. Simulation experiments for determining the use of ancient pottery vessels: the behaviour of epicuticular leaf wax during boiling of a leafy vegetable. *Journal of Archaeological Science* **24**: 1-7.

Fiori, A. 1962. Detection and identification of bloodstains, pp. 243-290 in Lundquist, F. (ed.), *Methods of Forensic Science* (vol. 1). New York-London: John Wiley & Sons.

Fullagar, R. 1998. Use-wear, residues and lithic technology, pp. 14-17 in Fullagar, R. (ed.), *A Closer Look. Recent Australian studies of stone tools* (Sydney University Archaeological Methods Series, 6). Sydney: Archaeological Computing Laboratory, School of Archaeology, University of Sydney.

Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Echlin, P., Joy, D. C., Romig, Jr., A. D., Lyman, C. E., Fiori, C. and Lifshin, E. 1992. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. A text for biologists, materials scientists, and geologists* (2nd. edition). New York-London: Plenum Press.

Gutián, F. 1964. *Técnicas de Análisis de Suelos. Experiencias de campo* (Monografías de Ciencia Moderna, 70). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Handley, C. O., Jr. and Ponder, E. 1961. Erythrocyte diameters: mammals, pp. 119-120 in Dittmer, D. S. (ed.), *Blood and Other Body Fluids*. Washington, D.C.: Federation of American Societies for Experimental Biology.

Hortolà, P. 1992a. SEM Analysis of Red Blood Cells in Aged Human Bloodstains. *Forensic Science International* **55**, 139-159.

Hortolà, P. 1992b. SEM Characterization of Blood Stains on Stone Tools. *The Microscope* **40** (2), 111-3. 'Errata' in *The Microscope* **40** (3), vi.

Hortolà, P. 1994. Application of SEM to the Study of Red Blood Cells in Forensic Bloodstains. *Microscopy & Analysis* (U.K. Edition) **40**, 19 & 21 - *Microscopy & Analysis* (European Edition) **28**, 21 & 23.

Jain, N. C. 1986. *Schalm's Veterinary Hematology* (4th. edition). Philadelphia, PA: Lea and Febiger.

LeBlond, P. F. and Shoucri, R. 1978. Calculation of surface area and volume of human erythrocytes from scanning electron micrographs. *Journal of Microscopy* **113**, 161-170.

López L. 1953. *Técnica Médico-Legal* (vol. 1). Valencia: Saber.

Lowe, G. D. O. 1987. Blood rheology in vitro and in vivo, pp. 597-636 in Lowe, G. D. O. (guest ed.), *Blood Rheology and Hyperviscosity Syndromes* (Baillière's Clinical Haematology, 1, No. 3). London, etc.: Baillière Tindall.

Loy, T. H. 1983. Prehistoric blood residues: detection on tool surfaces and identification of species of origin. *Science* **220**, 1269-1271.

Loy, T. H. and Dixon, E. J. 1998. Blood residues on fluted points from eastern Beringia. *American Antiquity* **63**, 21-46.

Peinado, V., Viscor, G. and Palomeque, J. 1990. Hematology and blood chemistry in captive Dorcas gazelles and blackbucks. *Comparative Biochemistry and Physiology* **97A**, 595-599.

Riddle, J. M., Ho, K.-L., Chason, J. L. and Schwyn, R. C. 1976. Peripheral blood elements found in an Egyptian mummy: a three-dimensional view. *Science* **192**, 374-375.

Stiegeler, S. E. (ed.). 1976. *A Dictionary of Earth Sciences*. London-Basingstoke: Macmillan.

Villanueva, E. 1998. Los indicios en Medicina legal, pp 1103-1128 in Gisbert, J. A. (ed.),
Medicina Legal y Toxicología (5th edition). Barcelona, etc.: Masson.

Captions for figures

Figure 1. Unburied collared peccary bloodstain. RBC in an area near to that of the 6-month-old bloodstain fragment. A broken erythrocyte (**b**) next to an intact one, a plasma fracture outlining a flattened erythrocyte (**m**), and a leptocyte (**l**) may be clearly seen. Magnification bar = 20 μm .

Figure 2. Unburied collared peccary bloodstain. RBC near the cutting edge area. A sloping mutilated leptocyte (**l**) may be seen; its detached fragment appears above from it (arrow). The white lines confine a curved plasma fracture with a visible size close to the previously found in the 6-month-old bloodstain fragment. White line separation = 6.71 μm .

Figure 3. Unburied collared peccary bloodstain. RBC near the cutting edge area, with an aspect similar to those exhibited by the 6 month-old bloodstain fragment, are shown. Curved plasma fractures (e.g. **m**), a xerocyte (**x**), and an echinocyte (**e**) may be seen. Two rouleaux-like piled leptocytes (**pl**) are also exhibited. Magnification bar = 10 μm .

Figure 4. Unburied collared peccary bloodstain. RBC in an area near to that of the 6-month-old bloodstain fragment. A discocyte (**d**), an apparently broken RBC (**b**) which maintains its erythrocyte morphology, and a negative replica of either this or another RBC (**n**) are shown. Magnification bar = 10 μm .

Figure 5. Buried Dorcas gazelle bloodstain. Along with the exhibited area, a suspected echinocyte (**e**), a partially plasma-covered either discocyte or spherocyte (**ds**), as well as some shapes which may be a mixture of negative imprints and curved plasma fractures (e.g. **m**). Magnification bar = 20 μm .

Figure 6. Buried Dorcas gazelle bloodstain, adhered soil. A suspected near-discocyte RBC (**d**) is visible on a topographical slope of the soil bed. Another near-discocyte, as forming part of a suspected smooth plasma fragment (**P**), is shown; they could be in secondary position. White line separation = 4.52 μm .

Figure 7. Buried Dorcas gazelle bloodstain. A near-spherocyte (s), which is quasi-detached from suspected plasma (P), is exhibited. For a better interpretation, the micrograph is shown turned over with respect to how it was made. Magnification bar = 10 μm .

Figure 8. Buried Dorcas gazelle bloodstain. A non-pollen, non-spore, RBC suspected 'clump' aggregate is shown. The most visible bodies exhibit a range in diameter from 3.71 μm (e.g. a) to 6.41 μm (e.g. z). This wide apparent anisocytosis might be due to the 'clump' aggregation process. Magnification bar = 10 μm .

