



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**BIOMARCADORES PARA LA ESTIMACIÓN DEL
INTERVALO POSTMORTEM Y LA IDENTIFICACIÓN DE
PATOLOGÍAS EN RESTOS ÓSEOS HUMANOS**

D^a Cristina Pérez Martínez

2017



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Tesis Doctoral

BIOMARCADORES PARA LA ESTIMACIÓN DEL INTERVALO POSTMORTEM Y LA IDENTIFICACIÓN DE PATOLOGÍAS EN RESTOS ÓSEOS HUMANOS

Dirigida por:

Prof. Dr. D. Aurelio Luna Maldonado

Prof.^a Dra. Dña. María Dolores Pérez Cárceles

Cristina Pérez Martínez

Murcia 2017

A mis padres, por estar siempre a mi lado

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. D. Aurelio Luna Maldonado, por darme la oportunidad de entrar en este Departamento, poder trabajar con él y por todo lo que me ha enseñado estos años, siempre con alegría y buen humor. Gracias por guiarme en este emocionante camino y por ayudarme a ser una mejor profesional.

A la Dra. Dña. María Dolores Pérez Cárceles, por su trato siempre amable y cariñoso tanto en el ámbito académico como personal, y por su paciencia y reprimendas cuando era necesario. Por su ayuda y esfuerzo aportados en estos años que ha durado la realización de este trabajo.

A la Dra. Dña. Isabel Legaz, por su consejo y ayuda como profesional y como persona y por los momentos de risas que me has dado.

A todos mis compañeros de departamento, en especial a Lucia, Maruja y a la Dra. María Falcón, ya que sin ellos esta experiencia hubiera estado incompleta (desayunos interminables, risas en el laboratorio y fuera de él...), ni me llevaría este gran recuerdo de todos. Gracias.

A la Dra. Dña. Ana Isabel Antón García, responsable del laboratorio de Genómica del IMIB, por brindarme su experiencia y habilidades de laboratorio, y por estar siempre dispuesta a ayudarme en todo lo que estuviera en su mano y al personal Técnico del Laboratorio (SACE-SUIC) por su colaboración en la realización técnica de este trabajo y por su ayuda en mis dilemas instrumentales.

A Gemma, por su amistad, por resistirme durante todo este tiempo que ha durado nuestra andanza en este gran departamento, y por su respaldo personal y académico. A las nuevas adquisiciones y amigas, Ana Cristina, Elena y Marta, por esas cenas de risas y tontunas y por poder compartir mis inquietudes personales y laborales.

A Bea, Juan, María y Teresa, por escucharme siempre que lo he necesitado y por sus consejos, por aguantar mis bucles y mis crisis de locura, y sobre todo por estar ahí siempre animándome, y a Alejandro y Marta, por sus apariciones estelares en mis momentos de agobio.

A Adrián, por su cariño, paciencia y comprensión todo este tiempo y, por último, a toda mi familia (incluida Koka) y principalmente a mis padres, por su amor, por su incondicional ayuda y por su apoyo tanto en ámbito académico como personal.

RESUMEN

La estimación del intervalo postmortem es un objetivo importante en la medicina forense y sigue siendo una de las tareas más difíciles del investigador forense. En realidad, existen pocos métodos precisos para determinar el tiempo transcurrido desde la muerte de los restos humanos esqueletizados debido al gran número de factores intrínsecos que pueden alterar el curso normal del cambio postmortem, como la edad, el sexo, la constitución y los estados fisiológicos y patológicos previos de la enfermedad del sujeto y factores externos.

El primer objetivo de esta investigación es evaluar la utilidad de diversos parámetros bioquímicos como las bases nitrogenadas (adenina, guanina, purinas, citosina, timina, pirimidinas, hipoxantina, xantina, cociente de purinas/pirimidinas y cociente de pirimidinas/purinas), ADN y péptidos de colágeno tipo I en el hueso cortical para la establecimiento del IPM en un total de 80 huesos largos de 80 cadáveres (50 hombres, 27 mujeres y 3 indeterminados) con una edad media de 68.31 años (DE=18.021, rango=20-97). Los huesos fueron retirados de los nichos de cemento de un cementerio de Murcia (sudeste de España), donde habían permanecido entre 5 y 47 años (tiempo medio 23.83 años, DE=10.85).

El procedimiento seguido para la determinación de bases nitrogenadas, ácidos nucleicos y péptidos de colágeno tipo I fue la realización de HPLC-UV, fluorimetría y HPLC-MS/MS, respectivamente.

Nuestros resultados confirman que el hueso es una matriz adecuada para la extracción, identificación y cuantificación, mediante los protocolos y técnicas empleadas, de ADN, bases nitrogenadas y péptidos de colágeno tipo I en un IPM entre 5 y 47 años. Además, nuestra investigación muestra como las concentraciones de adenina respecto a guanina, de timina respecto a citosina y de purinas respecto a pirimidinas son significativamente superiores en este IPM, así como el establecimiento de correlaciones significativas negativas entre las bases nitrogenadas y los péptidos de colágeno tipo I analizados y el IPM, que siguen un modelo de decrecimiento exponencial y logarítmico, respectivamente. En un IPM inferior a 20 años las concentraciones de varias bases nitrogenadas y de los péptidos de colágeno tipo I son significativamente superiores frente a un IPM superior o igual a 20 años, además, existe una correlación significativa negativa entre las biomoléculas y estos intervalos, con una tendencia

exponencial. El uso de forma conjunta de todos los biomarcadores cuantificados en esta investigación permite la correcta clasificación de muestras en grupos de IPM inferior a 20 años y superior o igual a 20 años del 86.7%.

Por otro lado, otro de los problemas que presenta la medicina forense es la identificación de los sujetos, en este caso, la patología forense a menudo utiliza la osteobiografía, que implica perfiles biológicos basados en la determinación de la edad, sexo, constitución, estados patológicos y otras anomalías (paleopatología) de los sujetos con fines de identificación.

El segundo objetivo de esta investigación es analizar las proteínas en restos óseos para buscar biomarcadores patológicos que estén estrechamente relacionados con varias enfermedades. Se utilizaron 45 huesos largos de 45 cadáveres diferentes (29 varones, 16 mujeres) con una edad media de 66.31 años (DE=19.48, rango=20-97). Los huesos se encontraban en nichos de cemento de un cementerio murciano (sudeste de España), donde habían permanecido entre 18 y 45 años (tiempo medio 25.84 años, DE=8.91).

Después de una extracción específica utilizando tampón Tris-Urea, se identificaron usando HPLC-MS/MS. Nuestros resultados muestran que las proteínas resultantes de enfermedades tumorales y patógenos bacterianos y virales pueden ser detectados e identificados en los restos óseos, convirtiéndolos en biomarcadores patológicos útiles para la construcción de perfiles biológicos.

Palabras Clave: Bases nitrogenadas, ADN, Péptidos de colágeno tipo I, Hueso, Intervalo postmortem, Identificación, Biomarcadores patológicos, Perfiles biológicos.

ABSTRACT

Estimation of postmortem interval is an important goal in forensic medicine and continues to be one of the more difficult tasks of the forensic investigator. Actually, few accurate methods exist to determine the time since death of skeletonized human remains due to the great number of intrinsic factors that may alter the normal course of postmortem change, such as the age, sex, constitution and previous physiological and pathological states of the subject, and external factors.

The purpose of this research, is to assess the utility of various biochemical parameters such as the nitrogenous bases (adenine, guanine, purines, cytosine, thymine, pyrimidines, hypoxanthine, xanthine, purine/pyrimidine ratio and pyrimidine/purine ratio), DNA and peptides of collagen type I in cortical bone for the establishment of data in a total of 80 long bones of 80 corpses (50 males, 30 females) with a mean age of 68.31 years (S.D.=18.021, range=20-97) were used. The bones were removed from the cement niches of a cemetery in Murcia (south-eastern Spain), where they had lain for between 5 and 47 years (mean time 23.83 years, S.D.=10.85).

The procedure followed for the determination of nitrogenous bases, nucleic acids and peptides of Collagen Type I was the realization of HPLC-UV, fluorometry and HPLC-MS/MS respectively.

Our results confirm that bone is a suitable matrix for the extraction, identification and quantification, through protocols and techniques used, of DNA, nitrogenous bases and peptides of collagen type I in a PMI between 5 and 47 years. In addition, our research shows how adenine concentrations from guanine, thymine to cytosine and purines to pyrimidines are superior higher in this PMI, as well as the establishment of significant inverse relationships between the nitrogenous bases and the peptides of collagen type I analyzed and the PMI, which follow an exponential and logarithmic decrease model, respectively. In a PMI up to 20 years the concentrations of several nitrogenous bases and the peptides of collagen type I are significantly superior to a PMI superior or equal to 20 years, furthermore, there is a significant inverse relationship between the biomolecules and these intervals, with an exponential trend. The use of the combined form of all biomarkers quantified in this research allows the correct classification of the samples in the PMI groups less than 20 years and superior than or equal to 20 years of 86.7%.

In other hand, other of the problems presents in forensic medicine is the identification of the subjects, in this case forensic anthropology often uses osteobiography, which involves biological profiles based on a determination of the age, sex, constitution, pathological states and other anomalies (paleopathology) of subjects for identification purposes.

The second purpose of this investigation is analyzing proteins in bone remains to search for pathological biomarkers which are closely related to several diseases. A total of 45 long bones from 45 different cadavers (29 males, 16 females) with a mean age of 66.31 years (S.D.=19.48, range 20–97) were used. The bones were in cement niches of a cemetery in Murcia (south- eastern Spain), where they had lain for between 18 and 45 years (mean time 25.84 years, S.D.=8.91).

After a specific extraction using Tris-Urea buffer, were identified using HPLC-MS/MS. Our results show that proteins resulting from tumoral diseases and bacterial and viral pathogens can be detected and identified in the skeletal remains, making them useful pathological biomarkers for constructing biological profiles.

Key Words: Nitrogenous bases, DNA, Peptides of collagen type I, Bone, Postmortem interval, Identification, Pathological biomarkers, Biological profiles.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Data de la muerte	4
1.1.1. Fenómenos principales y cambios en el tejido postmortem	5
1.1.1.1. Autolisis	6
1.1.1.2. Putrefacción	11
1.1.2. Interés médico-legal y validez del establecimiento del intervalo postmortem	13
1.1.3. Revisión de métodos para la estimación del intervalo postmortem	16
1.1.3.1. Criterios extrínsecos	18
1.1.3.2. Criterios morfológicos	18
1.1.3.3. Criterios físicos	20
1.1.3.4. Criterios químicos	22
1.1.3.5. Criterios histológicos	24
1.1.3.6. Criterios biológicos	24
1.1.3.7. Otros criterios empleados por otras especialidades	25
1.2. Tejido óseo	25
1.2.1. Definición de tejido óseo. Generalidades	25
1.2.2. Histología del hueso	27
1.2.2.1. Estructura del hueso	28
1.2.2.1.1. Estructura macroscópica del hueso maduro	28
1.2.2.1.2. Estructura microscópica del hueso maduro	31
1.2.2.2. Composición del hueso	33
1.2.2.2.1. Matriz ósea	33
1.2.2.2.2. Componentes celulares del hueso	36

1.2.3. Diagénesis del hueso	39
1.2.3.1. Mecanismos de degradación ósea	39
1.2.3.1.1. Biodegradación/bioerosión	40
1.2.3.1.2. Deterioro químico de la fracción orgánica	40
1.2.3.1.3. Deterioro químico de la fracción mineral	41
1.2.3.2. Factores que influyen en la diagénesis del hueso	41
1.3. ADN (Ácido desoxirribonucleico)	44
1.3.1. Bioquímica y naturaleza del ADN.....	44
1.3.2. Biosíntesis de nucleótidos.....	49
1.3.2.1. Síntesis de <i>novo</i> de purinas y pirimidinas.....	50
1.3.2.2. Rutas de recuperación de purinas y pirimidinas	52
1.3.3. Degradación de purinas y pirimidinas	53
1.3.4. Diagénesis	55
1.3.5. Degradación del ADN nuclear.....	57
1.3.5.1. La muerte celular y los procesos de degradación de ADN nuclear ..	59
1.3.5.1.1. Degradación enzimática de ADN	60
1.3.5.1.2. Procesos de degradación no enzimática del ADN	62
1.3.6. Factores que influyen en la degradación del ADN	67
1.4. Identificación de patologías previas en restos óseos	68
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	73
3. MATERIAL Y MÉTODOS	79

3.1. Características de las muestras de restos óseos para el estudio del intervalo postmortem	81
3.1.1. Muestras de restos óseos para el estudio del intervalo postmortem	81
3.1.2. Sexo, edad y tipo de hueso de las muestras de restos óseos para el estudio del intervalo postmortem	84
3.1.3. Intervalo postmortem de las muestras de restos óseos para el estudio del intervalo postmortem	86
3.1.4. Localización y estado de las muestras de restos óseos para el estudio del intervalo postmortem	87
3.2. Características de las muestras de restos óseos humanos para el estudio de patologías previas	88
3.2.1. Muestras de restos óseos para el estudio de patologías previas	88
3.2.2. Sexo, edad y tipo de hueso de las muestras de restos óseos para el estudio de patologías previas	89
3.2.3. Intervalo postmortem de las muestras de restos óseos para el estudio de patologías previas.....	91
3.2.4. Localización y estado de las muestras de restos óseos para el estudio de patologías previas	92
3.3. Metodología empleada en el análisis de muestras de restos óseos	92
3.3.1. Protocolo de desmineralización y lisis celular	94
3.3.2. Protocolo de extracción orgánica y purificación ADN	97
3.3.3. Protocolo de extracción de proteínas de muestras de restos óseos	99

3.4. Técnicas analíticas para el análisis cualitativo y cuantitativo de los parámetros de estudio	101
3.4.1. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% para valorar integridad del ADN en muestras de restos óseos	101
3.4.2. Fluorimetría para cuantificación de ADN en muestras de restos óseos ...	103
3.4.2.1. Equipo Fluorímetro	104
3.4.2.2. Protocolo de cuantificación de ADN por fluorimetría	105
3.4.3. HPLC-UV para la cuantificación de bases nitrogenadas en muestras de restos óseos	106
3.4.3.1. Equipo HPLC-UV	107
3.4.3.2. Patrones y preparación	108
3.4.3.3. Condiciones cromatográficas	109
3.4.3.4. Recta de calibrado	110
3.4.4. HPLC - MS/MS para el análisis de péptidos de las muestras de restos óseos	112
3.4.4.1. Equipo HPLC-MS/MS	113
3.4.4.2. Condiciones cromatográficas	114
3.4.4.3. Procesamiento de los datos proteómicos	115
3.5. Método estadístico	116
3.5.1. Análisis descriptivo de los datos	116
3.5.1.1. Valores de tendencia central	116
3.5.1.2. Valores de dispersión	117
3.5.2. Análisis de comparación de medias	118
3.5.3. Análisis de correlación	119
3.5.4. Análisis de regresión	121

3.5.5. Análisis de regresión múltiple	122
3.4.6. Análisis discriminante	124
4. RESULTADOS	127
4.1. Determinación de integridad de ADN de muestras de restos óseos	129
4.2. Análisis descriptivo de las muestras óseas del estudio del intervalo postmortem	131
4.2.1. Sexo, edad y tipo de hueso de los restos óseos	131
4.2.2. Intervalo postmortem	138
4.3. Análisis de la concentración de ADN, bases nitrogenadas y número de péptidos de colágeno tipo I en el total de muestras óseas humanas respecto al intervalo postmortem total	140
4.3.1. Análisis de correlación entre las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas, número de péptidos de colágeno tipo I de las muestras óseas y el intervalo postmortem total	142
4.3.2. Análisis de regresión lineal de las concentraciones de los parámetros bioquímicos de las muestras óseas analizadas respecto al intervalo postmortem	143
4.3.3. Análisis de regresión lineal múltiple de las concentraciones de los parámetros bioquímicos de las muestras óseas analizadas respecto al intervalo postmortem	147
4.4. Análisis descriptivo de medias de las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas y el número de péptidos de colágeno I en las muestras óseas en grupos de intervalo postmortem	149
4.4.1. Análisis descriptivo de las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas y número de péptidos de colágeno I en muestras óseas en dos grupos de intervalo postmortem	149

4.4.2. Análisis descriptivo de las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas y número de péptidos de colágeno I en muestras óseas en cuatro grupos de intervalo postmortem 152

4.5. Análisis de correlación y regresión lineal de las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas y el número de péptidos de colágeno tipo I respecto a grupos de intervalo postmortem 162

4.5.1. Análisis de correlación y regresión lineal de las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas y el número de péptidos de colágeno tipo I en función de 2 grupos de intervalo postmortem 162

4.5.1.1. Análisis de los restos óseos con intervalo postmortem inferior a 20 años 162

4.5.1.2. Análisis de los restos óseos con intervalo postmortem superior o igual a 20 años 165

4.5.2. Análisis de correlación y regresión lineal de las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas y el número de péptidos de colágeno tipo I en función de 4 grupos de intervalo postmortem 169

4.5.2.1. Análisis de los restos óseos con intervalo postmortem entre 5 y 10 años 169

4.5.2.2. Análisis de los restos óseos con intervalo postmortem entre 11 y 19 años 170

4.5.2.3. Análisis de los restos óseos con intervalo postmortem entre 20 y 30 años 171

4.5.2.4. Análisis de los restos óseos con intervalo postmortem superior a 30 años 174

4.6. Análisis discriminante de los parámetros bioquímicos en relación a grupos de intervalo postmortem 175

4.6.1. Análisis discriminante de los parámetros bioquímicos en relación a dos intervalos postmortem 175

4.6.2. Análisis discriminante de los parámetros bioquímicos en relación a cuatro intervalos postmortem 176

4.7. Análisis descriptivo de las muestras óseas del estudio de patologías previas	178
4.7.1. Muestras de restos óseos con historias clínicas	178
4.7.2. Sexo, edad y tipo de hueso de los restos óseos	181
4.7.3. Intervalo postmortem	183
4.7.4. Identificación de biomarcadores asociados a patologías en muestras óseas	183
5. DISCUSIÓN	189
5.1. Restos óseos como fuente de análisis	191
5.1.1. Factores que afectan a los restos óseos	191
5.1.2. Tipos de restos óseos	193
5.2. Tratamiento y análisis de las muestras de restos óseos	195
5.2.1. Determinación de ADN	195
5.2.2. Determinación de bases nitrogenadas	196
5.2.3. Determinación de péptidos de colágeno tipo I	197
5.2.4. Identificación de biomarcadores asociados a patologías en muestras óseas	183
5.3. Determinación del intervalo postmortem mediante el uso de la concentración de ADN y bases nitrogenadas y el número de péptidos de colágeno tipo I	198
5.3.1. Relación de elementos biológicos respecto al intervalo postmortem	199
5.3.2. Relación de los elementos biológicos respecto a grupos de intervalo postmortem	206
5.4. Identificación de patologías previas y biomarcadores de enfermedades	216
6. CONCLUSIONES	221

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 225

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información general sobre los diferentes tipos de daño en el ADN (Pääbo y cols., 2004)	62
Tabla 2. Características principales de las muestras óseas humanas en el estudio del IPM	81
Tabla 3. Características principales de las muestras óseas humanas en el estudio de patologías previas	88
Tabla 4. Composición para preparar un litro de tampón fosfato salino (PBS 10X pH 7.4)	94
Tabla 5. Composición para preparar 500 ml de buffer lisis Tris-HCl con EDTA y SDS 1% pH 9	95
Tabla 6. Composición para preparar un litro de buffer Tris-Urea 1X pH 7.4	99
Tabla 7. Preparación para un volumen final de 120 ml de gel de agarosa al 0.8%	102
Tabla 8. Composición Buffer TAE 10X para un litro de disolución	103
Tabla 9. Tiempo de retención de las bases nitrogenadas de las muestras analizadas	109
Tabla 10. Concentraciones y áreas y rectas de calibrado utilizadas para el cálculo de la recta de calibrado de Adenina (A-B) y Guanina (C-D)	110
Tabla 11. Concentraciones y áreas y rectas de calibrado utilizadas para el cálculo de la recta de calibrado de Citosina (A-B) y Timina (C-D)	111
Tabla 12. Concentraciones y áreas y rectas de calibrado utilizadas para el cálculo de la recta de calibrado de Hipoxantina (A-B) y Xantina (C-D)	111

Tabla 13. Criterios de confianza para la validación de péptidos en el Espectro Mill (Kapp y cols., 2005)	115
Tabla 14. Análisis de las concentraciones mínimas, medias y máximas de ADN analizadas en el total de muestras de hueso (N=80) respecto a los 4 grupos de IPM	129
Tabla 15. Valores descriptivos de la edad distribuidos en función del sexo (N=61) ...	131
Tabla 16. Frecuencias de los distintos restos óseos analizados en función del sexo	132
Tabla 17. Análisis del IPM en el total de muestras de hueso (N=80) respecto al sexo	132
Tabla 18. Análisis de la concentración de ADN y bases nitrogenadas respecto al total de muestras de hueso con sexo conocido (N=77) según hombres y mujeres	133
Tabla 19. Análisis del número de péptidos de colágeno tipo I respecto al total de muestras de hueso con sexo conocido (N=77) según hombres y mujeres	135
Tabla 20. Análisis de la concentración de ADN y bases nitrogenadas según el tipo de hueso (N=80)	135
Tabla 21. Análisis del número de péptidos de colágeno tipo I según el tipo de hueso (N=80)	138
Tabla 22. Valores descriptivos del IPM de los restos óseos analizados (N=80)	138
Tabla 23. Valores descriptivos del IPM distribuidos según 2 grupos de IPM (N=80)	139
Tabla 24. Valores descriptivos del IPM distribuidos según 4 grupos de IPM (N=80)	140

Tabla 25. Análisis de la concentración de ADN y bases nitrogenadas en el total de muestras de hueso (N=80)	141
Tabla 26. Análisis del número de péptidos de proteínas de colágeno tipo I analizados en el total de muestras de hueso (N=80)	142
Tabla 27. Correlaciones entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos y el IPM	142
Tabla 28. Estimación curvilínea de los parámetros bioquímicos respecto al IPM ...	144
Tabla 29. Ecuaciones de los parámetros bioquímicos respecto al IPM	144
Tabla 30. Prueba F de ANOVA para los 3 modelos (N=80)	148
Tabla 31. Tabla resumen del modelo (N=80)	148
Tabla 32. Coeficientes	149
Tabla 33. Análisis de la concentración de ADN y bases nitrogenadas en el total de muestras de hueso (N=80) respecto a 2 grupos de IPM, Grupo 1: IPM inferior a 20 años (n=20) y Grupo 2: IPM superior o igual a 20 años (n=60)	150
Tabla 34. Análisis del número de péptidos de colágeno tipo I en el total de muestras de hueso (N=80) respecto a 2 grupos de IPM, Grupo 1: IPM inferior a 20 años (n=20) y Grupo 2: IPM superior o igual a 20 años (n=60)	152
Tabla 35. Análisis de la concentración de ADN y bases nitrogenadas en el total de muestras de hueso (N=80) en función de 4 grupos de IPM, Grupo 1: IPM 5-10 años (n=10); Grupo 2: IPM 11-19 años (n=10); Grupo 3: IPM 20-30 años (n=40) y Grupo 4: IPM superior a 30 años (n=20)	153
Tabla 36. Análisis del número de péptidos de colágeno tipo I en el total de muestras de hueso (N=80) respecto a 4 grupos de IPM, Grupo 1: IPM 5-10 años (n=10); Grupo 2: IPM 11-19 años (n=10); Grupo 3: IPM 20-30 años (n=40) y Grupo 4: IPM superior a 30 años (n=20)	156

Tabla 37. Análisis de la media de concentración de ADN, bases nitrogenadas y cocientes de purinas/pirimidinas y el cociente de pirimidinas/purinas en hueso mostrando la significación entre los 4 grupos de IPM	159
Tabla 38. Análisis de la media de número de péptidos de colágeno tipo I en hueso mostrando la significación entre los 4 grupos de IPM	161
Tabla 39. Correlaciones entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos y el IPM inferior a 20 años	162
Tabla 40. Estimación curvilínea de los parámetros bioquímicos en los casos con IPM inferior a 20 años (Grupo 1)	164
Tabla 41. Ecuaciones de los parámetros bioquímicos en los casos con IPM inferior a 20 años (Grupo 1)	164
Tabla 42. Correlaciones entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos y el IPM superior o igual a 20 años	166
Tabla 43. Estimación curvilínea de los parámetros bioquímicos en los casos con IPM superior o igual a 20 años (Grupo 2)	167
Tabla 44. Ecuaciones de los parámetros bioquímicos en los casos con IPM superior o igual a 20 años (Grupo 2)	167
Tabla 45. Correlaciones entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos y el IPM 5-10 años	169
Tabla 46. Correlaciones entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos y el IPM 11-19 años	170
Tabla 47. Correlaciones entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos y el IPM 20-30 años	172
Tabla 48. Estimación curvilínea de los parámetros bioquímicos en los casos con IPM entre 20-30 años (Grupo 3)	173

Tabla 49. Ecuaciones de los parámetros bioquímicos en los casos con IPM entre 20-30 años (Grupo 3)	173
Tabla 50. Correlaciones entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos y el IPM > 30 años	174
Tabla 51. Análisis discriminante, resultados de la clasificación	176
Tabla 52. Análisis discriminante, resultados de la clasificación	177
Tabla 53. Características principales de las muestras óseas humanas en estudio de patologías previas	179
Tabla 54. Valores descriptivos de la edad distribuidos en función del sexo (N=45)	181
Tabla 55. Frecuencias de los distintos restos óseos analizados en función del sexo	181
Tabla 56. Valores descriptivos del IPM de los restos óseos analizados (N=80)	182
Tabla 57. Análisis del IPM en el total de muestras de hueso (N=45) respecto al sexo	182
Tabla 58. Frecuencia de los agentes infecciosos identificados en las muestras de restos óseos (N=45)	183
Tabla 59. Agentes infecciosos, marcadores patológicos bacterianos y virales en humanos, casos (%) y muestras en las que se han detectado marcadores	184
Tabla 60. Marcadores de diagnóstico humano, casos (%) y muestras en las que se han detectado marcadores	187
Tabla 61. Concentraciones medias de ADN respecto al IPM según estudios	200

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representativo de los principales eventos autolíticos que se producen con la muerte celular 7
- Figura 2.** Mecanismos y alteraciones principales en una célula dañada. ROS: Especies reactivas de oxígeno (Kumar y cols. (2012). *Robbins basic pathology*. [Figura]) 8
- Figura 3.** Consecuencias funcionales y morfológicas del descenso intracelular de ATP. El agotamiento de ATP resulta en la muerte celular por necrosis (Kumar y cols. (2012). *Robbins basic pathology*. [Figura]) 9
- Figura 4.** Cambios en la lesión celular irreversible (necrosis) (Kumar y cols. (2012). *Robbins basic pathology*. [Figura]) 11
- Figura 5.** Estructura macroscópica de los distintos tipos de hueso 28
- Figura 6.** Estructura de un hueso largo indicando las distintas partes anatómicas (Gartner y Hiatt (2011). *Histología Básica*. [Figura]) 29
- Figura 7.** Diagrama tridimensional de porción longitudinal de un hueso extraído de la diáfisis de un hueso largo (Gartner y Hiatt (2011). *Histología Básica*. [Figura]) 31
- Figura 8.** Esquema representativo de las diferentes estructuras que constituyen un hueso típico desde el punto de vista micro y macroscópico. La microestructura del hueso cortical o compacto consiste en sistemas de Havers (círculos en sección transversal y vista microscópica) con canales osteónicos y laminillas, a nanoescala, el marco estructural está compuesto por fibras de colágeno de haces de fibrillas de la misma proteína, mineralizadas (Sadat-Shojai y cols. (2013). *Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures*. [Figura]) 34
- Figura 9.** Estructura del colágeno. **A.** Hélice de colágeno. **B.** Triple hélice de colágeno; **C.** Triple hélice de colágeno (corte sagital) (Nelson y Cox (2006a). *Lehninger. Principios de Bioquímica*. [Figura]) 35

Figura 10. A. Histología del tejido óseo. B. Precursores de las diferentes células óseas. Célula osteogénica (osteoprogenitora), osteoblasto y osteocito pertenecientes al mismo linaje celular, y osteoclasto proveniente de precursores monocíticos	37
Figura 11. Estructura de general de los nucleótidos con la numeración convencional del anillo de la pentosa (Nelson y Cox (2006b). <i>Lehninger. Principios de Bioquímica.</i> [Figura])	45
Figura 12. Bases púricas y pirimidínicas principales de los ácidos nucleicos (Nelson y Cox (2006b). <i>Lehninger. Principios de Bioquímica.</i> [Figura])	45
Figura 13. Compuestos parentales de los que derivan las bases púricas y pirimidínicas de los nucleótidos y de los ácidos nucleicos, con especificación de las convenciones para la numeración (Nelson y Cox (2006b). <i>Lehninger. Principios de Bioquímica.</i> [Figura])	46
Figura 14. Puentes de hidrógeno de los pares de bases definidos por Watson y Crick. A. Unión T-A por dos puentes de hidrógeno. B. Unión C-G por tres enlaces por puente de hidrógeno (Garret y Grisham (2010a). <i>Biochemistry, Brooks.</i> [Figura])	47
Figura 15. Enlaces fosfodiéster de los pares de bases definidos por Watson y Crick (Garret y Grisham (2010a). <i>Biochemistry, Brooks.</i> [Figura])	48
Figura 16. Ataques en oxígenos y nitrógenos de las bases nitrogenadas por agentes electrófilos	48
Figura 17. Biosíntesis de AMP y GMP a partir de IMP (Nelson y Cox (2006c). <i>Lehninger. Principios de Bioquímica.</i> [Figura])	51
Figura 18. Biosíntesis de <i>ново</i> de los nucleótidos de pirimidina: síntesis de UTP y CTP por la vía del orotidilato (Nelson y Cox (2006c). <i>Lehninger. Principios de Bioquímica.</i> [Figura])	52
Figura 19. Rutas de recuperación de bases púricas y pirimidínicas. AMP: adenosin monofosfato; GMP: guanosín monofosfato; IMP: inosin monofosfato; PP _i : pirofosfato inorgánico; PRPP: fosforribosil pirofosfato	53

Figura 20. Las principales vías para el catabolismo de las purinas (Garret y Grisham (2010b). <i>Biochemistry, Brooks</i> . [Figura])	54
Figura 21. Degradación de pirimidinas (Garret y Grisham (2010a). <i>Biochemistry, Brooks</i> . [Figura])	55
Figura 22. Diagénesis de proteínas colágenas (izquierda) y ADN (derecha) en el periodo postmortem	57
Figura 23. Acción de exonucleasas y endonucleasas. Las exonucleasas digieren secuencialmente en dirección 3'→5' y viceversa, mientras que las endonucleasas escinden en sitios internos (Craig y cols. (2014). <i>Molecular biology: principles of genome function</i> . [Figura])	60
Figura 24. Oxidación y ataques hidrolíticos y enzimáticos asociados a la degradación del ADN (Alaeddini y cols. (2010). <i>Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review</i> . [Figura])	63
Figura 25. Sitiosapurínicos o apirimidínicos producidos por hidrolisis en el ADN (Alberts y cols. (2002). <i>Molecular Biology of the Cell</i> . [Figura])	64
Figura 26. Ejemplo de desaminación hidrolítica de la citosina con generación de uracilo (Alberts y cols. (2002). <i>Molecular Biology of the Cell</i> . [Figura])	65
Figura 27. Causas de daño celular y genómico por estrés oxidativo	66
Figura 28. Frecuencia de los restos óseos en función del sexo	84
Figura 29. Histograma de la distribución de la edad de los sujetos	85
Figura 30. Frecuencia de los restos óseos por tipo de hueso analizado	85
Figura 31. Frecuencia de los restos óseos en función del sexo	90
Figura 32. Histograma de la distribución de la edad de los sujetos	90
Figura 33. Frecuencia de los restos óseos por tipo de hueso analizado	91

Figura 34. Esquema representativo de las diferentes técnicas realizadas sobre las muestras óseas. HPLC-UV: Cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta; HPLC-MS/MS: Cromatografía líquida de alta resolución con detector masas-masas	93
Figura 35. Esquema representativo del proceso de desmineralización y lisis celular para la extracción y purificación de ADN y cuantificación de bases nitrogenadas (Amory y cols., 2012; Loreille y cols, 2007). EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético; HCl: Ácido clorhídrico; PBS: Tampón fosfato salino; r.p.m.: Revoluciones por minuto; RT: Temperatura ambiente; SDS: Dodecil sulfato de sodio	96
Figura 36. Esquema representativo del protocolo de extracción orgánica y purificación de ADN del material óseo (Ghatak y cols., 2013; Jakubowska y cols., 2012; Ausubel y cols., 2002). CH ₃ COONa: Acetato de sodio; r.p.m.: Revoluciones por minuto	98
Figura 37. Esquema representativo del protocolo de extracción de proteínas (Cleland y cols., 2012; Jiang y cols., 2007). PBS: Tampón fosfato salino; r.p.m.: Revoluciones por minuto; RT: Temperatura ambiente	100
Figura 38. Diagrama de Jablonski que ilustra los procesos implicados en la creación de un estado singlete excitado por absorción electrónica óptica y la posterior emisión de fluorescencia. Las etapas etiquetadas como 1, 2 y 3 corresponden a la etapa de absorción, disipación y emisión respectivamente (Johnson y Spence (2010). <i>The Molecular Probes Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies</i> . [Figura]	104
Figura 39. Protocolo a seguir para la cuantificación de ADN por fluorimetría Qubit® 3.0 Fluorometer (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA).	105
Figura 40. Equipo HPLC Agilent 1100 Series con detector UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)	108
Figura 41. Sistema HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) con detector MS-MS Trap XCT Plus G2447A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)	114

Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de extracciones de ADN procedentes de restos óseos. ID muestras 2, 11, 27 y 76 presentan la máxima concentración (ng/g) de ADN; ID muestras 7, 17, 47 y 77 presentan la concentración media (ng/g) de ADN; ID muestras 6, 15, 57 y 62 presentan la menor concentración (ng/g) de ADN según los 4 IPM establecidos en el estudio 130

Figura 43. A. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Adenina total de la muestra respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados. **B.** Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Guanina total de la muestra respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados 145

Figura 44. A. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Purinas total de la muestra respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados. **B.** Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Citosina total de la muestra respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados 146

Figura 45. A. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Timina total de la muestra respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados. **B.** Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Pirimidinas total de la muestra respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados 146

Figura 46. Diagrama de dispersión y regresión logarítmica que representa la variación del número de péptidos de proteínas de colágeno tipo I de la muestra respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados 147

Tabla 47. Análisis de la media de concentración de ADN, bases nitrogenadas y cocientes de purinas/pirimidinas y el cociente de pirimidinas/purinas en hueso mostrando la significación entre los 4 grupos de IPM 159

Tabla 48. Análisis de la media de número de péptidos de colágeno tipo I en hueso mostrando la significación entre los 4 grupos de IPM 161

Figura 49. A. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Guanina total de la muestra respecto al IPM inferior a 20 años de las muestras de huesos humanos analizados. **B.** Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Purinas total de la muestra respecto al IPM inferior a 20 años de las muestras de huesos humanos analizados 165

Figura 50. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Hipoxantina total de la muestra respecto al IPM inferior a 20 años de las muestras de huesos humanos analizados 165

Figura 51. A. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Adenina total de la muestra respecto al IPM superior a 20 años de las muestras de huesos humanos analizados. **B.** Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Guanina total de la muestra respecto al IPM superior a 20 años de las muestras de huesos humanos analizados 168

Figura 52. A. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Purinas total de la muestra respecto al IPM superior a 20 años de las muestras de huesos humanos analizados. **B.** Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Citosina total de la muestra respecto al IPM superior a 20 años de las muestras de huesos humanos analizados 168

Figura 53. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Timina total de la muestra respecto al IPM entre 20 y 30 años de las muestras de huesos humanos analizados 174

Figura 54. Diagrama de dispersión que representa la variación de la concentración de ADN total respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados (N=80) 202

Figura 55. Diagrama de dispersión que representa la variación del número de péptidos de colágeno tipo I respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados (N=80) 203

Figura 56. A. Comparación de concentraciones entre adenina y guanina respecto al IPM (G → A). B. Comparación de concentraciones entre citosina y timina respecto al IPM (C → T)	205
Figura 56. C. Comparación de concentraciones entre purinas y pirimidinas respecto al IPM	206
Figura 57. A. Diagrama de dispersión que representa la variación de la concentración de ADN respecto al IPM < 20 años (n=20). B. Diagrama de dispersión que representa la variación de la concentración de ADN respecto al IPM ≥ 20 años (n=60)	207
Figura 58. A. Diagrama de puntos que representa a distribución de concentración media de ADN respecto a 4 grupos de data. B. Diagrama de puntos que representa la distribución de número de péptidos de colágeno tipo I en 4 grupos de data. (IPM entre 5-10 años; IPM entre 11-19 años; IPM entre 20-30 años; IPM superior a 30 años) ...	208
Figura 59. A. Concentraciones medias de adenina y guanina respecto a 2 grupos de IPM. B. Concentraciones medias de citosina y timina respecto a 2 grupos de IPM. (IPM < 20 años e IPM ≥ 20 años)	211
Figura 59. C. Concentraciones medias de purinas y pirimidinas respecto a 2 grupos de IPM. D. Concentración media del cociente de pirimidinas y purinas respecto a 2 grupos de IPM. (IPM < 20 años e IPM ≥ 20 años)	212
Figura 60. A. Análisis de las concentraciones medias de adenina, guanina y purinas respecto a 4 grupos de IPM. B. Análisis de las concentraciones medias de citosina, pirimidinas e hipoxantina respecto a 4 grupos de IPM. (IPM entre 5-10 años; IPM entre 11-19 años; IPM entre 20-30 años; IPM superior a 30 años)	212
Figura 61. Comportamiento de las bases nitrogenadas respecto 2 grupos de IPM en muestras de restos óseos. (IPM < 20 años e IPM ≥ 20 años)	214
Figura 62. Diagrama de puntos que representa la concentración media de bases nitrogenadas respecto a 4 grupos de IPM en muestras de restos óseos. (IPM entre 5-10 años; IPM entre 11-19 años; IPM entre 20-30 años; IPM superior a 30 años)	215

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

β : Coeficientes estandarizados.

μ l: Microlitros.

μ M: Concentración micromolar.

μ m: Micrometros.

¹³⁷Cs: Isótopo radiactivo del cesio.

¹⁴C: Isótopo radiactivo del carbono.

²¹⁰Pb: Isótopo radiactivo del plomo.

²¹⁰Po: Isótopo radiactivo del polonio.

3'-OH: Extremo 3'-hidroxilo.

⁹⁰Sr: Isótopo radiactivo del estroncio.

A: Adenina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNmt: ADN mitocondrial.

ADNn: ADN nuclear.

AdV-7d: Adenovirus humano 7d.

AGV: Ácidos grasos volátiles.

AMP: Adenosín monofosfato.

ANOVA: Análisis de la Varianza.

APRT: Adenina fosforribosil transferasa.

Ar: Argón.

Arg/R: Arginina.

ARNr: ARN ribosomal.

ARNt: ARN transferente.

Asp/D: Ácido aspártico.

ATD: Análisis térmico diferencial.

ATG: Análisis termogravimétrico.

atm: Unidad de presión, atmósfera.

ATP: Adenosín trifosfato.

B19V: Parvovirus humano B19.

B-CTx: telopéptidos isomerizados B C-terminales.

C: Citosina.

Ca: Calcio.

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂: Hidroxiapatita.

Ca²⁺: Ión calcio.

CaCO₃: Carbonato de calcio.

CH₃COONa: Acetato de sodio.

CH₄: Metano.

CH₄N₂O: Urea.

CID: Disociación inducida por colisión.

CMV: Citomegalovirus humano (HVH-5, Herpesvirus humano 5).

CO₂: Dióxido de carbono.

CO₃²⁻: Carbonato.

CRH: Centro Regional de Hemodonación.

C-terminal: Carboxi-terminal.

CTP: Citidina 5'-trifosfato.

CTx: Telopéptidos isomerizados C-terminales del colágeno de tipo I.

Cu: Cobre.

DAD: Detector de red de fotodiodos.

DE: Desviación estándar (S.D. en inglés, *standard deviation*).

DRX: Difracción de rayos X.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

Enlace C-N: Enlace carbono-nitrógeno.

ESI: Ionización por electrospray.

F: Flúor.

Fe: Hierro.

FLT3: FMS-similar a tirosina quinasa 3.

g: Gramos.

G: Guanina.

gl: Grados de libertad.

Gln/Q: Glutamina.

Glu/E: Ácido glutámico.

Gly/G: Glicina.

GMP: Guanosín monofosfato.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

H₂S: Ácido sulfhídrico.

HCl: Ácido clorhídrico.

HGPRT: Hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa.

His/H: Histidina.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

HPLC-MS/MS: Cromatografía de alta resolución con detector masas-masas.

HPLC-UV: Cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta.

HSV-1: Herpes simple humano 1 (HVH-1, Herpesvirus humano 1).

HVH-6: Herpesvirus humano 6.

Hx: Hipoxantina.

Hyl: Hidroxilisina.

Hyp: Hidroxiprolina.

IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.

IMP: Inosina monofosfato.

IPM: Intervalo postmortem.

IT: Trampa de iones.

K: Potasio.

K⁺: Ión potasio.

K₂HPO₄: Fosfato dipotásico.

kb: Kilobases.

KCl: Cloruro de potasio.

kV: Kilovoltios.

Lys/K: Lisina.

m/z: masa/carga.

M: Concentración molar.

Maquinaria SOS: Mecanismo de reparación del ADN.

Máx.: Valor máximo.

MEB: Microscopia electrónica de barrido.

MET: Microscopia electrónica de transmisión.

Mg: Magnesio.

Mg²⁺: Ión magnesio.

MGP: Proteína Gla Matricial (del inglés *Matrix Gla Protein*).

Micro-TC: Microtomografía computarizada.

Mín.: Valor mínimo.

ml: Mililitro.

mM: Concentración milimolar.

mm: Milímetro.

MS/MS: Espectrómetro de masas en tándem.

MS: Espectrómetro de masas.

N: Nitrógeno.

N: Tamaño muestral total.

n: Tamaño muestral de cada grupo.

n.s.: No significativo.

- N-1:** Nitrógeno de la posición 1.
- N-9:** Nitrógeno de la posición 9.
- Na:** Sodio.
- Na⁺:** Ión sodio.
- Na₂HPO₄:** Fosfato disódico.
- NaCl:** Cloruro de sodio.
- NaH₂PO₄:** Bifosfato de sodio.
- NCBI^{nr}:** National Center for Biotechnology Information.
- Neu5AC:** Ácido n-acetilneuramínico.
- NH₃:** Amoníaco.
- nm:** Nanómetros.
- ng:** Nanogramos.
- N-terminal:** Amino-terminal.
- O₂:** Oxígeno.
- O₂:** Radical libre superóxido.
- OC:** Osteocalcina (*BGP* del inglés *Bone Gla Protein*).
- OH:** Radical hidroxilo reactivo.
- P:** Fósforo.
- p:** Nivel de significación estadística.
- P1NP:** Propéptido amino-terminal del procolágeno tipo 1.
- pb:** Pares de bases.
- Pb:** Plomo.
- PBS 1X:** Tampón fosfato salino en concentración 1X.
- PIV:** Parainfluenza virus 5.
- PM:** Peso molecular.
- PNP:** Purina nucleósido fosforilasa.
- PO₄³⁻:** Fosfato.
- PP_i:** Pirofosfato inorgánico.

Pro/P: Prolina.

PRPP: Fosforribosil pirofosfato.

PTB: Bromuro de N-fenaciltiazol.

PUR: Purinas, adenina y guanina.

PUR/PYR: Cociente de purinas/pirimidinas.

PYR: Pirimidinas, citosina y timina.

PYR/PUR: Cociente de pirimidinas/purinas.

R: Coeficiente de correlación Rho de Spearman.

R²: Coeficiente de determinación.

r.p.m.: Revoluciones por minuto.

RGD: Arginina-Glicina-Aspártico.

ROS: Especies reactivas del oxígeno (del inglés *Reactive oxygen species*).

S: Azufre.

SAI: Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

Ser/S: Serina.

SHB: Sulfohemoglobina.

Sig.: Nivel crítico.

Sitios AP: Sitios apurínicos y apirimidínicos.

SPI%: Pico de intensidad marcado.

T: Timina.

t: Estadístico de contraste.

TAE: Tris-acetato-EDTA.

Thr/T: Treonina.

t_R: Tiempo de retención.

TRAP-5b: Fosfatasa ácida tartrato-resistente 5b.

UTP: Uridina 5'-trifosfato.

UV-Vis: Radiación ultravioleta-visible.

V: Voltio.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VRS: Virus respiratorio sincitial humano.

X: Prolina.

XO: Xantina oxidasa.

Y: Prolina/Hidroxiprolina.

Zn: Zinc.

γ -Gla: Ácido γ -carboxiglutámico.

1. INTRODUCCIÓN

Las disciplinas como la antropología forense, la patología forense y la biología molecular son ciencias complementarias y evolutivas en el campo de las ciencias forenses, las cuales proporcionan evidencias sobre las condiciones previas al fallecimiento, así como sobre la identificación de los restos, las circunstancias y causas de la muerte y cuando se produjo el fallecimiento (Tidball-Binz, 2006).

En la actualidad, son muchos los avances de las técnicas moleculares para identificar y cuantificar biomoléculas (ADN y proteómica) los que permiten la datación, reconstrucción de las condiciones de vida y enfermedades de los sujetos, incluyendo enfermedades infecciosas y adquiridas mediante el estudio de los restos óseos de culturas antiguas. La aplicación de técnicas analíticas modernas proporciona, por tanto, un espectro cada vez mayor de información (Panzer y cols., 2014).

La antropología forense es una rama aplicada de la antropología biológica y una parte activa de la medicina forense, cuyo objetivo principal es el estudio de restos humanos y en particular de la data de restos óseos mediante utilización de diferentes técnicas que permiten su identificación (Cattaneo, 2007) e individualización (Solla e İşcan, 2001).

Respecto a la determinación del intervalo postmortem (IPM) y dentro de las investigaciones actuales, se encuentran la determinación de la data mediante las diferencias morfológicas macroscópicas (Verhoff y cols., 2003) y microscópicas (Yoshino y cols., 1991) del hueso, pero principalmente mediante métodos químicos como el estudio de radioisótopos, oligoelementos (Swift y cols., 2001) y radiocarbono artificial (Ubelaker, 2001). Sin embargo, el problema es que estos métodos no son precisos para establecer el IPM, por lo que es prácticamente imposible, muchas veces, diferenciar entre huesos recientes y antiguos lo cual tiene importantes implicaciones para los procedimientos legales (Cattaneo, 2007).

Por otro lado, otro de los pilares de la investigación antropológica es la construcción de perfiles biológicos basados en la determinación de la edad, el sexo, la raza, la estatura, patologías antemortem y otras anomalías (paleopatología), lo que se denomina la osteobiografía, que es extremadamente útil para abordar casos de restos humanos no identificados (Cattaneo, 2007) y su relación con una posible víctima o una persona desaparecida (Solla e İşcan, 2001).

1.1. Data de la muerte

La definición de muerte y la determinación de cuando ha ocurrido son conceptos interrelacionados. Tradicionalmente, la Medicina primero y la Ley después mantuvieron que la muerte era un evento único en el tiempo; de tal manera que se podía establecer con suma precisión su data, ya que lo marcaba el paro del corazón. Se considera una necesidad social que el momento de la muerte se marque con precisión, puesto que son muchos los intereses civiles y sociales que dependen de la determinación de este evento (Villanueva-Cañadas, 2004).

La determinación de la data de la muerte, es decir, del tiempo transcurrido desde que falleció el sujeto, es uno de los problemas más complicados y difíciles que se pueden presentar en medicina legal, ya manifestado por autores como Ortifa, Thoinot y Corin (Villanueva-Cañadas, 2004).

Por lo tanto, la búsqueda de parámetros que permitan la estimación del IPM es un objetivo importante en la medicina forense y en las ciencias forenses en general. La determinación del IPM es una pregunta que a menudo se plantea a los científicos forenses (Sledzik, 1998), en particular, a los antropólogos forenses (Ubelaker y Houck, 2002), patólogos (Pounder, 1995), entomólogos (Goff y Flynn, 1991), botánicos y palinólogos (Buchan y Anderson, 2001) entre otros muchos. Sin embargo, es necesaria una comprensión del proceso de descomposición postmortem de forma integral para establecer el IPM (Campobasso y cols., 2001).

El establecimiento del IPM presenta una serie de problemas muy complejos debido a la gran cantidad de factores intrínsecos que pueden variar el curso normal de los cambios postmortem, tales como la edad, el sexo, la constitución y el estado fisiológico y patológico del sujeto *in vivo*, así como factores externos, tales como el clima y las características del suelo en el que está enterrado el cuerpo (Prieto-Castelló y cols., 2007). También se encuentran dificultades a causa de las diferentes modificaciones sufridas por los cadáveres, como consecuencia de la influencia de los fenómenos cadavéricos; o incluso es frecuente que el estudio o peritaje a realizar, lo sea sobre restos esqueléticos o restos óseos, aunque dichas circunstancias modificadoras pueden determinar en ocasiones, que restos de una considerable antigüedad, estén bien conservados y tengan apariencia de recientes; y que restos con una data cercana hayan sufrido cambios destructivos que conlleven el tener una apariencia de mayor

antigüedad (Hernández del Rincón, 2001). A pesar de esto, varios métodos han sido descritos para este fin, el más común se basa en las modificaciones estructurales y de composición que tienen lugar en el hueso después de la muerte (Prieto-Castelló y cols., 2007; Berg, 1964, 1963).

La determinación de la fecha de la muerte de los restos óseos es de utilidad para fines investigadores, pero también tiene importantes implicaciones legales, tanto en casos penales como civiles, ya que es de gran ayuda para las autoridades en las investigaciones judiciales, donde en muchos casos, y a veces incluso de manera exclusiva se solicita el examen de restos óseos para el establecimiento del IPM (Verhoff y Kreutz, 2005; Knight y Saukko, 2004b; Introna y cols., 1999; Knight y Lauder, 1969).

1.1.1. Fenómenos principales y cambios en el tejido postmortem

La descomposición comienza inmediatamente después de la muerte (Dent y cols., 2004) produciéndose un cese en las funciones biológicas que mantienen la integridad de las células (Miller, 2002). La descomposición se inicia cuatro minutos después de que los signos vitales cesen (Vass y cols., 2002; Vass, 2001).

Knight y Saukko (2004a), distinguen entre la muerte celular y la somática afirmando que cuando se produce la muerte somática, la muerte celular puede ser incompleta, encontrándose todavía algunas células con actividad biológica. Esto es corroborado por Gill-King (1996), quien explica que, en la cultura occidental, la muerte es vista como un evento, pero en realidad la muerte no es un evento sino un proceso, ya que no todas las células "mueren" a la vez. El autor analiza además las limitaciones físicas y químicas de la descomposición explicando que todos los cuerpos sometidos a la descomposición sufren estos procesos, pero la temperatura del entorno inmediato dicta qué tan rápido o lento se producen estos procesos. Además, explica cómo el agua, el pH y la presión parcial de oxígeno pueden tener un impacto en el proceso de descomposición.

A continuación, se describen los principales fenómenos postmortem que describe la literatura destacando:

1.1.1.1. Autolisis

La autolisis o autodigestión es la primera fase del proceso de descomposición (Vass, 2001), el cual se produce por enzimas endógenas (Tsokos, 2004; Knight y Saukko, 2004a) que se producen de forma natural en el cuerpo y que son liberadas al exterior al disgregarse las membranas celulares (Powers, 2005).

La autolisis, por lo general no es un proceso visualmente evidente hasta pasados unos pocos días. De forma macroscópica lo primero que se observa es la aparición de ampollas llenas de fluido en la piel, además de que ésta comienza a desprenderse del cuerpo, debido a enzimas hidrolíticas liberadas que digieren las células en la unión dermo-epidérmica. Además, el cuerpo se ha aclimatado a la temperatura ambiente (*algor mortis*), la sangre se ha asentado en el cuerpo causando decoloración de la piel (*livideces*) y el citoplasma celular se ha gelificado debido al aumento de la acidez (*rigor mortis*). Internamente, la autolisis puede manifestarse como una masa de consistencia similar a los tejidos blandos. La hemólisis también será evidente debido a la ruptura de las células rojas de la sangre que en consecuencia provoca un aspecto jaspeado en la superficie externa del cuerpo (Clark y cols., 1996).

En la **Figura 1** se muestra un esquema representativo de los principales eventos autolíticos que se producen con la muerte celular.

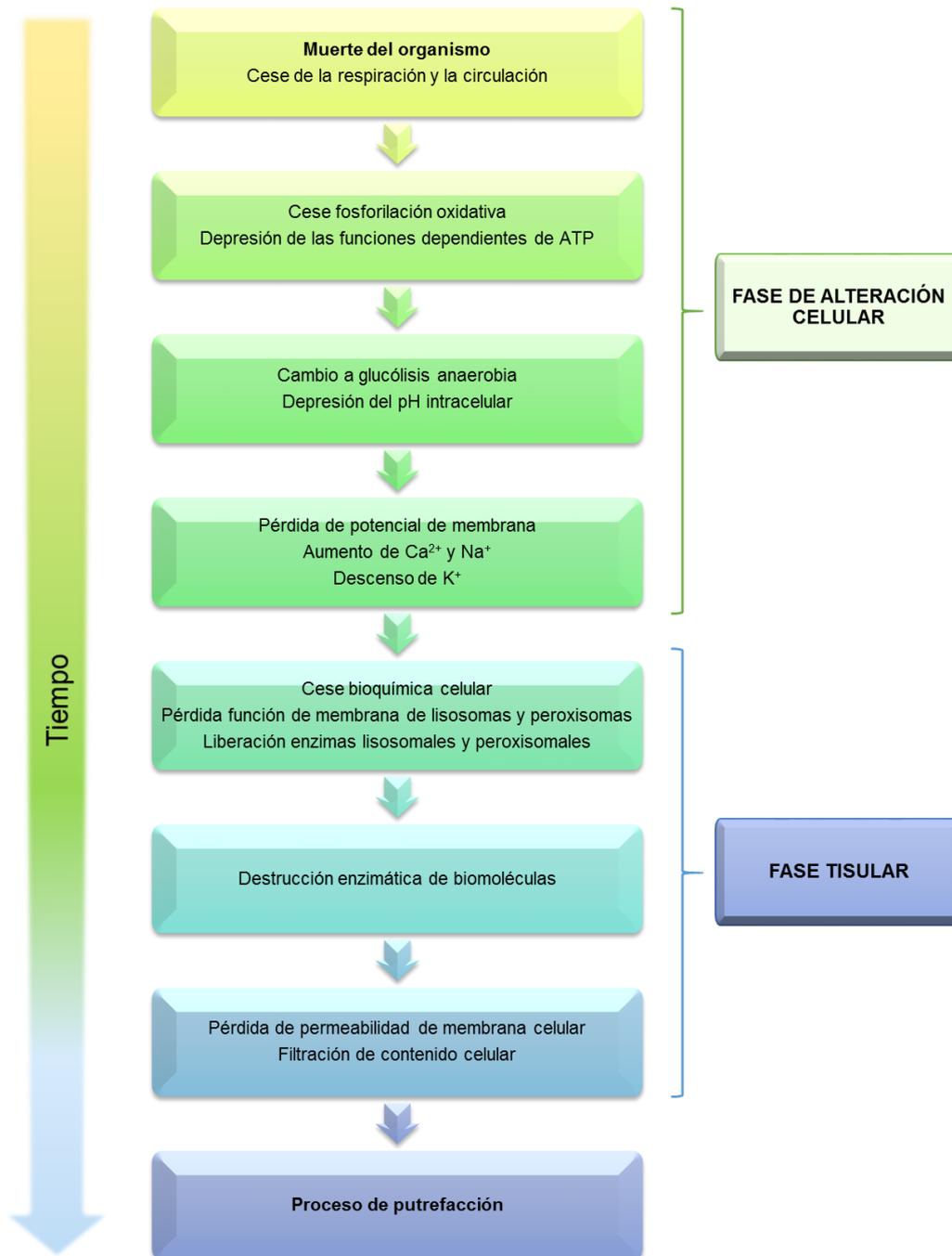


Figura 1. Esquema representativo de los principales eventos autolíticos que se producen con la muerte celular.

A continuación, se muestra en la **Figura 2** los principales mecanismos y principales alteraciones en una célula dañada.

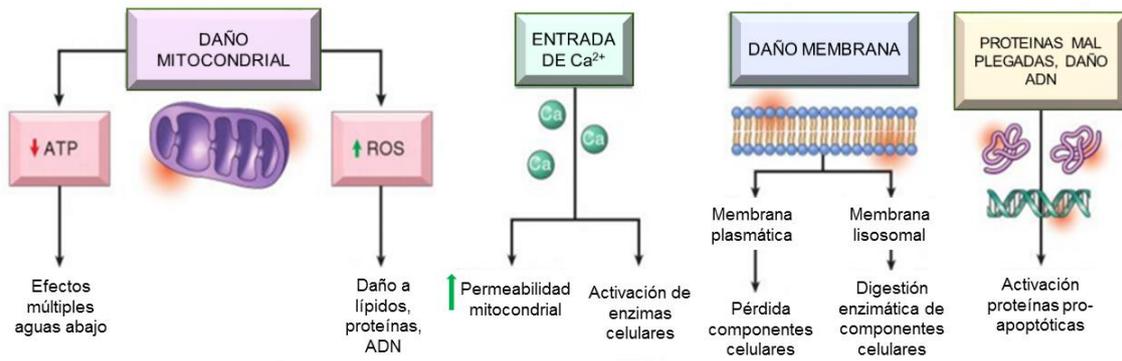


Figura 2. Mecanismos y alteraciones principales en una célula dañada. ROS: Especies reactivas de oxígeno (Kumar y cols. (2013). *Robbins basic pathology*. [Figura]).

1. Fase de alteración celular, donde la privación de oxígeno (O_2) produce una serie de alteraciones en las membranas de la célula y de los orgánulos que la componen, tales como lisosomas, peroxisomas y mitocondrias, así como modificaciones en el potencial de membrana (**Figura 3**) (Powers, 2005).

- ⊕ Cese de la perfusión de sangre al tejido que conduce a la privación de oxígeno celular y tiene como consecuencia una caída de producción de adenosín trifosfato (ATP) (Gill-King, 1996).
- ⊕ Agotamiento de O_2 en la célula, anoxia, lo cual conlleva un aumento y acumulación de dióxido de carbono (CO_2) que se produce como un metabolito natural de los procesos celulares. El incremento de CO_2 provoca un descenso del pH corporal haciendo que éste se convierta en ácido (Gill-King, 1996).
- ⊕ La caída de los niveles de ATP, supone una pérdida de ácidos grasos de la estructura de la membrana celular y una desregulación en el transporte activo a través de las membranas produciéndose una alteración del transporte electrónico mitocondrial (Gill-King, 1996).
- ⊕ El cese de la fosforilación oxidativa por la privación de O_2 que da lugar a la obtención de ATP, favorece la activación de vías fermentativas, la glucólisis anaerobia, que actúa para compensar el déficit de energía. El resultado de la glucólisis anaerobia es la conversión de glucosa a piruvato y, finalmente, a lactato. La elevación de los niveles de ácido láctico y pirúvico en la célula hace que el pH intracelular disminuya, así como la capacidad de amortiguación intracelular (Beattie, 2002).

- ⊕ El potencial de membrana que se mantiene mediante la bomba de iones de sodio-potasio (Na^+/K^+) ATPasa desaparece por el cese en la producción de ATP, por lo que se produce una acumulación intracelular de Na^+ y una difusión de K^+ fuera de la célula a través de los canales iónicos de la membrana (Lodish, 2004).
- ⊕ A medida que el potencial de la membrana desaparece, los iones de calcio (Ca^{2+}) entran en la célula (un indicador clave y quizás contribuyente a la muerte inminente de la célula). La acumulación intracelular de Ca^{2+} ocurre de forma concomitante con la inflamación celular, accionado por la presión osmótica produciendo un aumento en el contenido de agua intracelular (Powers, 2005).
- ⊕ Además, el sistema de síntesis de proteínas se ve comprometido, las nuevas proteínas producidas a menudo se encuentran mal plegadas, y las que se encuentran dentro de la célula se deforman. Esta acumulación de proteínas mal plegadas activa el sistema de la ubiquitina-proteasoma, por lo que se produce una acción proteolítica (Powers, 2005).

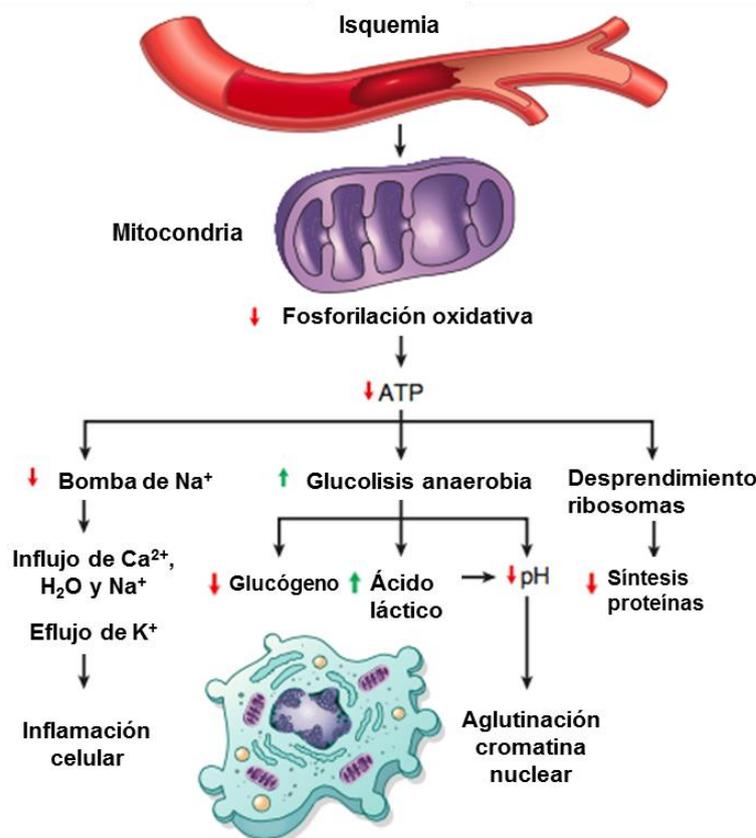


Figura 3. Consecuencias funcionales y morfológicas del descenso intracelular de ATP. El agotamiento de ATP resulta en la muerte celular por necrosis (Kumar y cols. (2013). *Robbins basic pathology*. [Figura]).

- ✦ La reacción de la proteína desplegada destruye las proteínas dentro de la célula desde el interior, por lo que las membranas mitocondriales y lisosomales se dañan de manera irreversible y las enzimas lisosomales y especies reactivas de oxígeno (ROS) desencadenan un proceso de destrucción dentro de la célula (Powers, 2005).
- ✦ Detención de procesos naturales de desintoxicación después de la muerte y por ello se produce una acumulación de los productos de desecho de estas vías (Gill-King, 1996).

2. Fase tisular, ruptura de la membrana lisosomal y peroxisomal como consecuencia de la acidificación intracelular, los cambios iónicos y la liberación de enzimas (**Figura 4**) (Powers, 2005).

- ✦ Cese del funcionamiento de la membrana celular y las enzimas que se encuentran compartimentadas de forma natural se liberan y activan bajo los niveles de pH disminuidos y degradan aún más la membrana celular (Gill-King, 1996).
- ✦ Acción de las enzimas propias (hidrolasas ácidas lisosomales, lipasas, proteasas, amilasas, etc.), que comienzan a lisar la célula. La descomposición enzimática de los componentes celulares y las membranas provoca que el contenido celular rico en nutrientes se libere al exterior (Powers, 2005).
- ✦ Finalmente se produce la necrosis celular (**Figura 4**), pérdida irreversible de la integridad de la membrana. Los primeros tejidos y órganos que la sufren son los que presentan un mayor índice de síntesis de ATP, biosíntesis y transporte de la membrana (Gill-King, 1996).

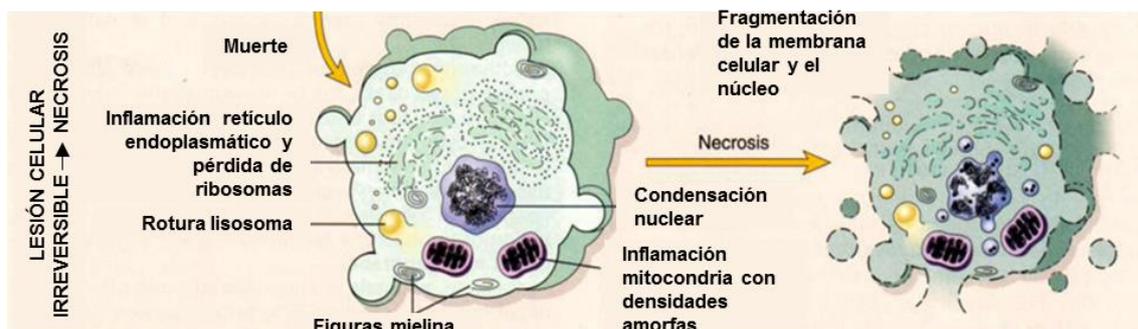


Figura 4. Cambios en la lesión celular irreversible (necrosis) (Kumar y cols. (2013). Robbins basic pathology. [Figura]).

Dependiendo de varios factores internos y externos tales como la naturaleza de la señal de la muerte, las características del tejido y la etapa de desarrollo de los tejidos, las células se someterán a uno de dos patrones diferentes de muerte; apoptosis o necrosis (Zeiss, 2003).

La apoptosis es una muerte celular programada dependiente de la energía, que se caracteriza por la condensación del citoplasma, pérdida de microvellosidades de la membrana plasmática, segmentación del núcleo, y una amplia degradación del ácido desoxirribonucleico (ADN) cromosómico en oligómeros de aproximadamente 180 pares de bases (pb) a través de la activación de endonucleasas endógenas (Lagarkova y cols., 1995; Oberhammer y cols., 1993; Jennings y cols., 1975). Los niveles intracelulares de ATP permanecen inalterados hasta el final del proceso de apoptosis (Shimizu y cols., 1995).

Alternativamente como un colapso metabólico celular con desglose homeostático, la necrosis es un fenómeno degenerativo independiente de energía pasiva. La necrosis se caracteriza por el aumento de volumen de la célula, hinchazón de los orgánulos citoplasmáticos, y, mientras que el núcleo celular aparece intacto, hay condensación de la cromatina. Esto es seguido por la ruptura de las membranas, disrupción de los orgánulos y derrames de enzimas lisosomales. Las células necróticas generan un patrón al azar de degradación del ADN. Los cambios microscópicos de la necrosis ocurren más rápido en temperaturas ambiente superiores (Collan y Salmenperä, 1975). La necrosis se induce típicamente por los extremos en las condiciones ambientales externas de la célula tales como la hipoxia, o por medio de la acción de tóxicos y venenos respiratorios tales como el cianuro (Dive y cols., 1992). A pesar de la existencia de alteraciones microscópicas distintivas y la etiología bioquímica, la discriminación precisa entre la apoptosis y necrosis requiere un enfoque morfológico y bioquímico integrado (Krysko y cols., 2008).

1.1.1.2. Putrefacción

Tras el agotamiento del O₂ en el cuerpo, éste pasa a ser un ambiente anaeróbico, importante para que se dé la putrefacción, la destrucción de los tejidos por microorganismos anaerobios (Statheropoulos y cols., 2005; Vass y cols., 2002; Vass,

2001; Pounder, 1995). En esencia, este proceso implica la ruptura de las moléculas grandes en estructuras más pequeñas y simples (Dent y cols., 2004).

Esta fase requiere la presencia de bacterias, las cuales, en las etapas iniciales, provienen del propio cuerpo, y están localizadas en el tracto intestinal y respiratorio (Dent y cols., 2004; Pounder, 1995). Las especies que participan son anaeróbicas y se componen de bacilos coliformes, micrococcos y differoides (Pounder, 1995). En las etapas posteriores de descomposición, cuando la integridad estructural del cuerpo se ve comprometida y se producen aberturas adicionales, las bacterias pueden emigrar desde el entorno circundante (Campobasso y cols., 2001). Además, los sitios de lesión (traumatismo) pueden actuar como un conducto para los microorganismos (Campobasso y cols., 2001). Esto puede permitir la participación bacteriana externa en el proceso de putrefacción desde el principio, que, en esencia, produce la aceleración de los procesos.

La coloración verde que se encuentra en un cadáver es producto de la reacción de la hemoglobina con el sulfuro de hidrógeno producido por bacterias, de la cual se obtiene la sulfohemoglobina (SHB) que es la que aporta la coloración (Amendt y cols., 2004). El primer punto donde la putrefacción se pone de manifiesto es la fosa ilíaca derecha, que es donde el ciego se encuentra debajo de la dermis superficial (Knight y Saukko, 2004a).

Después de varias semanas, dependiendo de las condiciones ambientales, el color del cuerpo cambiará a verde oscuro, casi negro (Knight y Saukko, 2004a). Ambientes cálidos proporcionan las condiciones adecuadas para el crecimiento bacteriano y por lo tanto acelerará putrefacción de los tejidos corporales (Franke y Spennemann, 1995). En condiciones favorables (con fácil acceso) el cuerpo será el hogar de una gran cantidad de especies de insectos (Matoba y Terazawa, 2008; Campobasso y cols., 2001; Shean y cols., 1993; Goff y Flynn, 1991). Lugnier y cols. (1990), explican que cuando se somete un cuerpo a la putrefacción se convertirá en un objetivo para los insectos necrófagos (atraídos por los olores liberados).

Por otro lado, en esta fase también se produce la acumulación de gases como son nitrógeno (N), metano (CH₄), ácido sulfhídrico (H₂S) y amoníaco (NH₃) (Amendt y cols., 2004; Campobasso y cols., 2001) y CO₂ (Statheropoulos y cols., 2005). Esta formación y acumulación de los mismos se hará evidente en el área de la cavidad

abdominal, además de en la cara, dando como resultado la protrusión de los globos oculares y la lengua (Knight y Saukko, 2004a), y se traducirá también en la purga de los fluidos de varios orificios. La presión que estos gases crean puede causar la separación de la piel, dando como resultado lesiones postmortem como las descritas por Vass (2001).

Finalmente, las cavidades del cuerpo comenzarán a colapsar y los tejidos blandos se comienzan a licuar dejando sólo los componentes biológicos más duraderos, los restos óseos.

El proceso de esqueletización definido por Dent y cols. (2004) es la eliminación de tejido blando del hueso quedando los restos óseos expuestos. Como consecuencia de la degradación de los tejidos blandos, solo los ligamentos y tendones quedaran adheridos en un primer momento a los restos óseos, lo cual quedó documentado en un periodo que oscilaba de 12 a 18 meses en un clima templado según Knight y Saukko (2004b).

A partir de este momento, el hueso puede someterse a una serie de procesos conocidos colectivamente como diagénesis. Los componentes orgánicos y minerales de los huesos son degradados por la acción de agentes microbianos, plantas, el suelo y las aguas subterráneas (Stodder, 2008; Turner-Walker, 2008; Cox y Bell, 1999; Piepenbrink, 1989, 1986; Wedl, 1864). La fracción orgánica compuesta por colágeno principalmente se degrada por la acción de bacterias, en particular las colagenasas bacterianas que producen. Estas enzimas rompen el enlace proteína-mineral para la reducción de los péptidos a aminoácidos (Nawrocki, 1995). La parte inorgánica del hueso se degrada a través de la pérdida de hidroxapatita, por la erosión, que finalmente debilita la integridad del hueso que resulta en la desintegración (Hare, 1976). Además, la hidroxapatita se puede ver alterada estructuralmente (Hedges y Millard, 1995a).

1.1.2. Interés médico-legal y validez del establecimiento del intervalo postmortem

Los especialistas forenses son solicitados con frecuencia para examinar restos óseos humanos. Las autoridades investigadoras normalmente desean conocer la causa y forma de muerte, sólo si los restos son recientes, lo suficiente como para justificar

cualquier consulta. Si los huesos son antiguos, o, de hecho, mayores de 50 a 80 años, pierden en ciertos casos el interés legal y forense (Knight y Lauder, 1969).

El poder establecer la data o cuándo ocurrió la muerte, con la mayor precisión posible, queda totalmente justificado como se mencionó anteriormente, además de por su indudable interés científico, por las repercusiones legales que su determinación conlleva, ya que se considera crucial para la realización de investigaciones criminales y los procesos judiciales (Ferreira y Cunha, 2013; Ahi y Garg, 2011; Henssge y Madea, 2007; Zhou y cols., 2007; Tanaka y cols., 2002; McDowall y cols., 1998). La determinación precisa de este marco de tiempo es necesario para la solución de los asuntos civiles, tales como determinar el beneficiario de la propiedad o si una póliza de seguro estaba vigente (Ahi y Garg, 2011) y lo más importante, para la realización de investigaciones criminales (Ahi y Garg, 2011; Kaliszan y cols., 2009; Pounder, 1995).

Desde el punto de vista del derecho penal, una estimación precisa del IPM ayuda por tanto a establecer un marco temporal de cuándo el individuo en cuestión pudo haber muerto y/o cuándo fue cometido el crimen, confirma o refuta la coartada de un sospechoso por la inclusión o exclusión de los individuos cuyos movimientos son conocidos y sirve para corroborar el testimonio de testigos (Sachdeva y cols., 2011) y evaluar sus declaraciones (Salam y cols., 2012). También es de vital importancia para los investigadores forenses, especialmente cuando se están reuniendo pruebas que puedan apoyar o negar las acciones establecidas de los sospechosos de un crimen (Salam y cols., 2012). Además, la documentación de la época de la muerte es de suma importancia en los formularios oficiales, como certificados de defunción y los formularios de seguros, los detalles administrativos respecto de los procedimientos funerarios, reclamaciones legales relacionados con la propiedad, deudas y propiedades personales (Beaumont, 2007; Burton, 1974).

La data de la muerte enfocada a términos médico-legales y aplicada en el ordenamiento jurídico español, en una causa penal, tiene como función la de la extinción de la responsabilidad criminal, así como, su alcance y consecuencias. Así, en el Código Penal aprobado por la Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre (BOE. Núm. 281, 24 de noviembre de 1995), en el Libro I, Título VII, Capítulo I, bajo la rúbrica "*De las causas que extinguen la responsabilidad criminal*", establece en el artículo 131.1 que los delitos prescriben a los 20 años, cuando la pena máxima señalada para el delito sea la de

prisión de 15 o más años y no constituya un delito de lesa humanidad y genocidio o un delito contra las personas y bienes protegidos en caso de conflicto armado.

De esta forma hay dos supuestos de estudio de restos óseos a valorar cuando la condena es de 15 o más años, el primero de ellos, cuando los huesos tienen una data inferior a 20 años, y el segundo, cuando estos tengan una data superior a 20 años.

En el primer caso, donde los restos óseos datan de un tiempo menor a 20 años, el hecho de establecer con la mayor precisión posible el momento de la muerte es imprescindible ya que ello puede contribuir a los resultados de la investigación forense policial y/o judicial al ayudar en la determinación de una línea de tiempo para los eventos que rodean a la muerte (Ross y Cunningham, 2011; Cunha y cols., 2009; Forbes y Nugent, 2009; Tibbett y Carter, 2009; Forbes, 2008; Megyesi y cols., 2005; Rhine y Dawson, 1998; Meadows y cols., 1990; Rodríguez y Bass, 1985). Del mismo modo que la precisión en el establecimiento de la data puede beneficiar notablemente las investigaciones policiales y/o judiciales; un error en la determinación de dicha cuestión puede complicar o invalidar las correspondientes diligencias.

Si de lo contrario, mediante la ordenación por las autoridades judiciales pertinentes, los restos obtenidos y estudiados pertenecen al segundo grupo, los que datan de un tiempo mayor a 20 años, y cuando la pena máxima señalada al delito sea prisión de 15 o más años, a efectos judiciales, el caso se dará por sobreseído o cerrado, de manera que el procedimiento quedara archivado (BOE. Núm. 281, 24 de noviembre de 1995). No obstante, dicho material, a pesar de fechar de un tiempo superior a 20 años, pese a que no se requiera en investigaciones de índole policial o jurídica si pueden tener una gran importancia desde una perspectiva histórica o arqueológica (Hernández del Rincón, 2001).

Actualmente, el peritaje sobre restos óseos se solicita con frecuencia debido a que son encontrados restos esqueléticos en núcleos urbanos o rurales, en caso de nuevas construcciones o regularizaciones urbanísticas, fosas comunes en supuestos delitos de genocidio, etc., siendo remitidos a la autoridad para su identificación (Hernández del Rincón, 2001). Los problemas médico-legales que se plantean, responden fundamentalmente a tres cuestiones: realizar el diagnóstico de especie, efectuar el diagnóstico individual y establecer la data de la muerte (Villanueva-Cañadas y Castilla-Gonzalo, 2004b).

1.1.3. Revisión de métodos para la estimación del intervalo postmortem

La determinación de la data de muerte sigue siendo uno de los aspectos más difíciles de cualquier investigación de muerte sospechosa (Pinheiro, 2006) ya que plantea una serie de complicaciones debido a los diferentes factores o eventualidades que pueden afectar y/o modificar el curso normal de los fenómenos cadavéricos. Como anteriormente se mencionó, los elementos que influyen en el proceso son tanto de origen exógeno, donde encontramos algunos como la actividad de la fauna, las condiciones de enterramiento, la ubicación geográfica (Tersigni-Tarrant y Shirley, 2013; Marks y cols., 2009; Pokines, 2009; Steadman y Andersen, 2009) o el medio ambiente (clima, agentes atmosféricos, características del terreno de inhumación), el cual comprende los agentes físicos, mecánicos, químicos y biológicos que puedan actuar sobre la superficie de los huesos, lo que los tafonomistas llaman condiciones tafonómicas (Barrio-Caballero, 2013), como de origen intrínseco, aquellas propiedades bioquímicas inherentes a la persona, como son, la causa y la época de la muerte, edad, sexo, constitución del individuo, etc. De esta manera analizando los elementos citados se puede obtener información de los restos óseos.

El estado de los huesos se verá afectado según el tipo de enterramiento en el que se encuentren, ya que los cuerpos expuestos al aire libre, sufren una descomposición mucho más rápida que aquellos que se encuentran enterrados o sumergidos (Işcan y Steyn, 2013; Mant, 1987; Rodríguez y Bass, 1985).

En las primeras etapas de descomposición el establecimiento de la data de la muerte generalmente será determinada por el patólogo forense o el entomólogo forense. Sin embargo, a medida que el IPM progresa y los restos en cuestión se encuentran comprometidos y presenta una complejidad variable, a menudo requerirá la intervención de equipos multidisciplinares, integrados por especialistas en medicina forense, antropología forense (Klepinger, 2006), odontología forense, dactiloscopia y genética forense (BOE. Núm. 32, 6 de febrero de 2009).

Asimismo, se muestra a continuación una breve descripción de la evolución de los cadáveres en los distintos medios según Işcan y Steyn (2013), debiendo tener en consideración la presencia de fauna cadavérica en los restos esqueléticos, la cual nos puede servir para establecer de una forma más precisa el momento la muerte del individuo.

- ✦ **Medio terrestre superficial:** El cadáver puede quedar completamente esqueletizado en el plazo de 1 año (siempre en términos generales y en función de la temperatura, grado de humedad ambiente, etc.), con un margen de variación de 3 a 5 años aproximadamente según el clima (cálido o templado).

Los huesos muestran entonces un tacto untuoso, una superficie grasienta y pueden encontrarse partes de tejidos blandos momificados. Teniendo en cuenta, que la acción de animales predadores puede destruir los tejidos blandos mucho más rápidamente.

Con el paso del tiempo los huesos se erosionan. Las grietas debidas a su exposición comienzan a observarse en el plazo de 1 a 2 años, y se hacen muy marcadas entre los 5 y los 10 años. En climas húmedos los huesos pueden deteriorarse haciéndose frágiles y porosos, en un plazo de 5 a 10 años, mientras que en climas secos y calurosos pueden no deteriorarse nunca.

- ✦ **Medio terrestre enterrado:** La descomposición se ve acelerada en suelos cenagosos y ácidos, y se desarrolla más lentamente en suelos calizos y arenosos. Debido a ello, el período de esqueletización para los que se encuentran en suelos secos es de unos 6-7 años, y de unos 9-10 años para los que están en suelos húmedos.

- ✦ **Medio acuático sumergido:** La descomposición de los cadáveres sumergidos en agua depende de la temperatura de ésta, de la existencia de corrientes y de la acción de los animales. Puede conducir a la esqueletización en un período de 2 años en ríos, 4 años en canales; mientras que en estanques y lagos la adipocera puede permanecer 20 o 30 años, y encontrarse en la cavidad medular de huesos largos transcurridos los 50 o 60 años.

La erosión de la superficie ósea y los cambios observados radiográficamente en la arquitectura interna del hueso trabecular, son también importantes indicadores.

En la última década, ha habido un aumento en el número de estudios que investigan métodos para estimar IPM incluyendo la revisión de casos que contribuyen a una mejor comprensión de la variabilidad en la descomposición relacionada con diferentes condiciones geográficas (McKeown y cols., 2011; Pope, 2011; Breitmeier y

cols., 2005; Komar, 1999; Komar y cols., 1999; Komar, 1998; Galloway, 1996; Galloway y cols., 1989). Sin embargo, en la actualidad no existe una técnica que de forma clara y certera de una solución precisa de esta cuestión (Longato y cols., 2015). Por consiguiente, para tratar de resolver dicho problema se pueden emplear de forma conjunta distintos criterios, obteniendo como resultado una mayor aproximación a lo que sería la solución real del establecimiento de la data (Buchan y Anderson, 2001)

El IPM en restos esqueléticos se determina, por tanto, por diversos métodos, generalmente mediante el análisis de la apariencia morfológica, mediante la estimación del tiempo que ha sido necesario para el deterioro de los restos relacionado con otros elementos recuperados en el sitio del descubrimiento (ropa, objetos personales, etc.) (Giannelli y cols., 2011; Interpol, Disaster Victim Identification (DVI) Guide, 2005) o mediante el uso de métodos químicos y físicos (Işcan y Steyn, 2013; Tidball-Binz, 2006).

1.1.3.1. Criterios extrínsecos

Los criterios extrínsecos consisten en el análisis de la presencia de elementos ajenos al cadáver, los cuales tienen un gran valor cronotanatodiagnóstico, como pueden ser monedas, vestimenta, medallas y otros, los cuales al ser resistentes a la putrefacción pueden aportar información sobre el sujeto sobre el que se está llevando a cabo la investigación. Dichos objetos pueden tener una gran importancia a la hora esclarecer casos de desapariciones de fecha conocida, para lograr realizar una identificación de la persona (Giannelli y cols., 2011; Interpol, Disaster Victim Identification (DVI) Guide, 2005).

1.1.3.2. Criterios morfológicos

Es un método basado en una cronología de los cambios morfológicos que tienen lugar en los huesos según el tiempo, siendo éstos los restos que quedan tras las cuatro etapas definidas de la putrefacción en el cadáver las cuales son, la fase cromática, enfisematosa, colicuativa y por último la etapa de reducción esquelética, cuya duración oscila entre 2 y 3 años, y se completa después de 5 años (Castilla-Gonzalo, 2004).

Los cambios que se pueden presentar son observables en:

- ⊕ Médula ósea, se puede ver modificada o haber desaparecido.
- ⊕ Cavidad medular, la cual, con el avance del tiempo muestra una desaparición de materia orgánica.
- ⊕ Huesos, los cuales manifiestan el paso del tiempo mediante una pérdida de peso (densidad) y un tacto diferente al de los huesos recientes.

Otro esquema cronológico, que supone una recopilación de los conocimientos que había en la materia fue el establecido por Mueller en 1953 y Berg y Specht en 1958, y sigue las siguientes etapas:

1. Formación de una capa de moho en los cadáveres sepultados en tierra, se presenta después de 2 a 4 años postmortem (Mueller, 1953).
2. Desaparición de las partes blandas en los enterramientos en fosas, indica que han transcurrido de 3 a 5 años (Mueller, 1953).
3. Desaparición de ligamentos y cartílagos en los sepultados en tierra, después de 5 o más años (Mueller, 1953).
4. Desaparición de las grasas de los huesos, después de 5 a 10 años postmortem (Mueller, 1953), a partir de este momento comienza la descomposición alveolar en las láminas intersticial y de Havers (Berg y Specht, 1958).
5. Inicio de la destrucción de los huesos, después de 10 a 15 años postmortem (Mueller, 1953). Se aprecian pérdida de contenido orgánico e inorgánico y cambios erosivos identificables inicialmente dentro de los canales de Havers, las laminillas intersticiales (Berg y Specht, 1958), las fibrillas de colágeno y las matrices calcificadas (Yoshino y cols., 1991).
6. Estado quebradizo, frágil y superficie porosa en huesos de más de 50 años postmortem (Mueller, 1953).

Por otra parte, investigaciones más recientes llevadas a cabo por Knight y Saukko (2004b) permiten establecer diferencias morfológicas entre huesos recientes y huesos antiguos:

1. Huesos recientes, en ellos permanecen adheridos restos de tejido blando como ligamentos, tendones y cartílago. Además, presentan mayor densidad y dureza debido a la conservación de la materia orgánica.
2. Huesos antiguos, presentan ausencia completa de tejidos blandos y tienen menos peso, debido a la pérdida de materia orgánica, que se produce inicialmente en la zona más externa y en la que rodea a la cavidad medular.

1.1.3.3. Criterios físicos

Procedimiento fundamentado en la observación de alteraciones físicas, como pérdida de sales, pérdida de materia orgánica y desarrollo de una matriz calcificada con una sustancia porosa, etc. Pero a la hora de la realizar un estudio de la data por estos métodos hay que tener en cuenta variables como el sexo y la edad ya que muestran una relación significativa con el contenido de materia orgánica del hueso.

Este método, que implica la evaluación de los cambios externos en los huesos es bastante fiable, a pesar de que es menos objetivo (Berg, 1963). Los métodos más significativos son:

- ✦ **Examen con luz ultravioleta**, la presencia de materia orgánica en el hueso humano se puede medir como la fluorescencia con luz ultravioleta (Facchini y Pettener, 1977; Knight y Lauder, 1969). La intensidad de la fluorescencia es más fuerte en los huesos recientes y disminuye gradualmente a medida que aumenta el IPM. Debido al hecho de que la intensidad de la fluorescencia puede ser influenciada por factores distintos del paso del tiempo (tales como la suavidad de la superficie recién cortada), este método de datación será de poca utilidad para los investigadores forenses como un estimador preciso del tiempo transcurrido desde la muerte (Buchan y Anderson, 2001).
- ✦ **Reacción del luminol**, basada en la reacción de luminiscencia que se produce entre los grupos hemo de la sangre con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y esto

gracias al carácter duradero de la hemoglobina que permanece protegida por el hueso (Creamer y Buck, 2009). Autores como Introna y cols. (1999), que utilizaron el luminol medir la luminiscencia de los residuos de sangre de restos óseos (fémur), concluyeron que no había una relación cuantitativa entre el aumento del IPM y una disminución en la intensidad de la luminiscencia. Otros investigadores en cambio afirman que se produce una disminución de la luminiscencia con el aumento del IPM (Creamer y Buck 2009; Ramsthaller y cols., 2009), pero a pesar de ser una técnica prometedora, no es adecuada como método único.

- ✦ **Comportamiento térmico**, tales como estudios de procesos de mineralización postmortem del hueso mediante técnicas de análisis térmico diferencial (ATD) y análisis termogravimétrico (ATG), estudios de variaciones de densidad y peso específico, estudios de identificación cualitativa del componente mineral del hueso mediante técnicas de difracción de rayos X (Prieto-Castelló y cols., 2007).
- ✦ **Estudios de equilibrio entre los radioisótopos de polonio (^{210}Po) y plomo (^{210}Pb)** existentes de forma natural, debido a diferencias en sus vidas medias y que permanecen estables durante la vida y que, tras la muerte, la relación se distorsiona. A pesar de todo, hasta la fecha no hay una base de datos completa ni indicación de que este método sea aplicable a las investigaciones forenses (Swift y cols., 2001; Swift, 1998).
- ✦ **Estudio mediante radioisótopos** (método que no depende de los cambios químicos), los cuales se ven menos afectados por la variación del entorno físico donde se encuentren los huesos expuestos (Swift, 1998), estableciendo de esta forma una correlación entre alguno de ellos y el IPM, ya que alguno de estos isótopos se sabe que se acumulan dentro de la matriz calcificada de los huesos. De esta forma se realizaron estimaciones de la data de la muerte mediante investigaciones con el isótopo radiactivo del estroncio (^{90}Sr) (Swift y cols., 2001; Neis y cols., 1999; Maclaughlin-Black y cols., 1992) y con el isótopo radiactivo del cesio (^{137}Cs) (Swift y cols., 2001), sin embargo, no tuvieron éxito debido a la variación de las concentraciones de estos isótopos en el tiempo (Swift y cols., 2001).

1.1.3.4. Criterios químicos

Están basados en los fundamentos de la Tafonomía Forense que se fundamenta en el uso de los procesos asociados a la descomposición del cadáver en la investigación un crimen (Tibbett y Carter, 2009). Entre estos procesos se encuentran las modificaciones mecánicas y químicas que afectan a los restos humanos, ya que son los tejidos más resistentes y manifiestan de forma clara las acciones tafonómicas.

Como resultado de la putrefacción, la materia orgánica sufre procesos de desintegración, esto supone un empobrecimiento de los constituyentes más complejos lo que conduce finalmente a productos químicos más simples, los cuales proporcionan información sobre la fase en que se produjo la interrupción del proceso (Dent y cols., 2004).

La información que aportan los parámetros bioquímicos se obtiene a partir de diferentes procedimientos, citando a continuación algunos de los más relevantes:

- ✦ **Estudios de presencia de materia grasa en hueso** a través de tinciones con sulfato de cobre o ácido ósmico, así como la evolución de los ácidos grasos volátiles (AGV) en restos óseos en función de la data (Buchan y Anderson, 2001) y las tasas de lixiviación de grasas y otra materia orgánica (Behrensmeyer, 1978).
- ✦ **Estudios de degradación de lípidos** con respecto al IPM (Castellano y cols., 1984; Gangl 1936).
- ✦ **Estudios de determinación de contenido de ácidos carboxílicos en hueso.** Inicialmente estos estudios fueron llevados a cabo por Gibbs (1991) con huesos de data superior a 100 años y observo una disminución inferior al 1% del contenido inicial. Posteriormente este experimento fue desarrollado por Schwarcz y cols. (2010) con un mayor número de muestras y en una amplia variedad de entornos y observó una disminución del contenido de citrato que se presentaba de forma regular en una serie de muestras. Estudios recientes muestran que la capa cortical del fémur es la mejor elección para observar la disminución del contenido de citrato (Kanz y cols., 2014).

- ✦ **Estudios de determinación de contenido total de nitrógeno (N) en hueso** mediante el método de Kjeldahl, en los cuales se observó una disminución de los niveles de N en los huesos largos respecto al tiempo (Prieto-Castelló y cols., 2007; Jarvis, 1997; Knight y Lauder, 1969, 1967).
- ✦ **Estudios para la evaluación de contenido de aminoácidos en hueso.** Knight y Lauder (1969) midieron el contenido de aminoácidos de huesos humanos en varios intervalos postmortem en un intento de distinguir entre restos recientes y antiguos. Su trabajo concluyó que la descomposición de la proteína en restos enterrados sigue una velocidad muy lenta durante muchos miles de años, pero hay una tendencia a que ciertos aminoácidos sean "liberados" antes que otros. Mediante el uso de cromatografía en capa fina, los autores demostraron que la presencia de siete o más aminoácidos indica una edad ósea de menos de 100 años, mientras que la presencia de prolina (Pro/P) e hidroxiprolina (Hyp) indican que el hueso tiene menos de 50 años de edad.
- ✦ **Estudios para la evaluación de la pérdida de proteínas óseas, triglicéridos y colesterol en función del tiempo desde la muerte.** Castellano y cols. (1984) obtuvieron como resultados de este estudio que la cantidad de componentes orgánicos óseos (tales como la proteína y el colesterol) situados dentro de la matriz ósea disminuyen respecto al tiempo, que la cantidad de proteínas en el hueso es el indicador más fiable de la edad ósea, y además que este método junto con la medición de triglicéridos y colesterol mejora aún más la estimación del IPM.
- ✦ **Estudios del componente mineral del hueso**, el cual varía con la antigüedad de los mismos mediante espectrofotometría de absorción atómica para la determinación de calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe), zinc (Zn), plomo (Pb) y cobre (Cu), espectrofotometría de emisión para cuantificar sodio (Na) y potasio (K) y la técnica de Fiske-Soubarow para medir fósforo (P) (Castellano y cols., 1976).
- ✦ **Estudios del grado de cristalinidad del componente mineral mediante difracción de rayos X (DRX)**, estudiando los parámetros en hueso cortical y medular siendo estos: potasio (K), fósforo (P), nitrógeno (N), azufre (S), urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) y proteínas totales. Los autores establecen el uso de análisis DRX y

bioquímicos, principalmente S, K y $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ en hueso cortical (Prieto-Castelló y cols., 2007).

1.1.3.5. Criterios histológicos

Apoyados en los cambios que sufre el hueso humano postmortem, estos estudios han sido aplicados recientemente para determinar el IPM y por ello, existe poca investigación en esta área (Buchan y Anderson, 2001).

Los cambios estructurales no sólo dependen del medio ambiente ya que también son causados por microorganismos incluyendo bacterias, hongos y microflora (Bell y cols., 1996).

Para ello se emplea microrradiografía (Dollerup, 1964), microscopía óptica (MO) (Hollund y cols., 2013; Fernández-Jalvo y cols., 2010; Jans y cols., 2002; Gutiérrez, 2001; Hedges y Millard, 1995b), microscopía electrónica de barrido (MEB) (Turner-Walker y Jans, 2008; Turner-Walker y Syversen, 2002; Bell y cols., 1996; Schultz, 1996; Yoshino y cols., 1991), microscopía electrónica de transmisión (MET) (Pesquero y cols., 2010; Ascenzi y Silverstrini, 1984; Hackett, 1981), exámenes de fluorescencia ultravioleta en cortes de hueso, estudios histológicos e histomorfométricos (Yoshino y cols., 1991). También se ha sugerido la meteorización ósea como un método para determinar el IPM (Janjua y Rogers, 2008; Buchan y Anderson, 2001), que es el proceso por el cual los componentes microscópicos orgánicos e inorgánicos del hueso son separados unos de otros y destruidos por agentes físicos y/o químicos en la superficie del suelo (Behrensmeyer, 1978).

1.1.3.6. Criterios biológicos

Están basado en dos estudios fundamentalmente:

- ✦ **Reacciones antígeno-anticuerpo** valorando la intensidad, la cual disminuye con la antigüedad de los restos. Investigaciones pioneras de 1969 estudiaron la reacción inmunológica de proteínas de hueso (polvo de hueso) y un suero antihumano (Knight y Lauder, 1969), donde se obtuvieron reacciones negativas en muestras con un IPM superior a cinco años. Sin embargo, el problema con

este método es que la tecnología ha avanzado de tal manera que las proteínas sanguíneas inmunológicamente activas ahora se pueden detectar en el hueso durante largos períodos de tiempo, haciendo así una reacción positiva o negativa poco fiable (Pollard, 1996).

- ✦ **Entomología Forense**, que se fundamenta en la utilización de los insectos y otros artrópodos como elemento de la investigación, ya que los insectos son los primeros organismos que invaden un cadáver, incluso si se ha tratado de ocultar el cuerpo y porqué los artrópodos aparecen en un cuerpo en descomposición en una secuencia temporal determinable y, por tanto, predecible, aunque es variable en función de la región geográfica y la época del año (Arnaldos y cols., 2001).

1.1.3.7. Otros criterios empleados por otras especialidades

Otros criterios en los últimos tiempos han tenido una notable contribución a la antropología en el ámbito de las ciencias forenses. Un ejemplo de ello son unas técnicas muy destacadas realizadas con radioisótopos, las que ponen de manifiesto la relación de potasio (K)/argón (Ar) y la cantidad de flúor (F) en yacimientos óseos antiguos y la datación mediante radiocarbono (^{14}C), pero esta es insensible cuando se aplica a intervalos cortos de tiempo (Swift, 1998; Suchey y cols., 1989).

1.2. Tejido óseo

El hueso es un material compuesto, una forma de colágeno mineralizado que comparte similitudes con el tendón mineralizado y entender su organización es el primer paso para comprender el deterioro de la materia orgánica y mineral del hueso. A continuación, se procede a la explicación de la estructura ósea.

1.2.1. Definición de tejido óseo. Generalidades

El sistema esquelético está formado por varias formas especializadas de tejido conjuntivo y de sostén. El hueso proporciona una protección rígida y una estructura de sostén a la mayor parte de los tejidos del organismo, es el lugar de inserción de los músculos y permite el movimiento al contraerse éstos, protege al sistema nervioso central y las vísceras torácicas y, al estar en continua remodelación regula el

metabolismo de ciertos elementos, además, la cavidad medular del hueso es el lugar de asiento de la médula ósea, principal órgano hematopoyético (Young y Health, 2000), mientras que el cartílago proporciona un soporte semirrígido en ciertos lugares, como el árbol respiratorio o el conducto auditivo externo. La formación del cartílago actúa también como precursora en el proceso de formación del hueso, tanto membranosa como endocondral (Paniagua y cols., 2007).

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conjuntivo que, como otros tejidos conjuntivos, está compuesto por células y matriz extracelular. La característica que distingue el tejido óseo de los otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz, que produce un tejido muy duro capaz de proveer sostén y protección (Ross y Pawlina, 2010), lo cual da lugar a la porción inorgánica del hueso. Los constituyentes principales que conforman este tejido son carbonato de calcio, fluoruro de calcio, hidróxido de calcio, citrato y el más importante de ellos, el fosfato de calcio, los cuales se combinan formando cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$.

Debido a su contenido mineral también sirve como sitio de depósito de calcio y fosfatos, los cuales pueden ser movilizados de la matriz ósea y captados por la sangre según sea necesario para mantener las concentraciones adecuadas en todo el organismo, a este proceso se le denomina regulación homeostática de la calcemia, regulándose la concentración de calcio en sangre (Ross y Pawlina, 2010). Sin embargo, también puede actuar como sumidero de residuos o elementos redundantes (Armélagos y cols., 1989).

Por el contrario, también encontramos una fracción orgánica en el hueso, la cual es minoritaria, y está representada principalmente por proteínas, siendo la más relevante y mayoritaria el colágeno, cuya función es proporcionar resistencia y flexibilidad al hueso.

Por ello, teóricamente, los componentes orgánicos e inorgánicos pueden ser datados. Sin embargo, la estructura de red abierta de la hidroxiapatita hace que ésta sea altamente contaminada con carbonatos de aguas subterráneas. La extracción de los contaminantes de carbonato a través del lavado con ácidos diluidos no se aplica porque la hidroxiapatita es soluble en ácido, por lo que lo más idóneo es utilizar el componente de proteína de muestras de hueso en la datación debido a que es

relativamente insoluble en ácido y, por lo tanto, puede ser fácilmente aislado del componente de hidroxapatita y de otros carbonatos.

También cabe destacar que, dependiendo del grado de madurez del hueso, el tejido óseo se puede clasificar en fibrilar y laminar (Ross y Pawlina, 2010).

Por ello, el **hueso fibrilar** está considerado como un hueso inmaduro o primitivo y normalmente se encuentra en los embriones y recién nacidos, en los callos formados en el período de remodelación después de una fractura y en la región de la metáfisis de los huesos en crecimiento. Este tipo de huesos tiene fibras gruesas que no están orientadas uniformemente. La celularidad por unidad de volumen es mayor que el hueso laminar, su contenido mineral varía y las células están dispersas al azar. El hecho de que las fibras de colágeno estén desorientadas le confiere a este tipo de hueso fibrilar, isotropía con respecto a las características mecánicas del tejido, es decir, su comportamiento mecánico no depende de la orientación de la fuerza aplicada (Ross y Pawlina, 2010).

El **hueso laminar** se comienza a formar un mes después del nacimiento, por lo que este tipo de hueso es más maduro que el fibrilar y de hecho se forma a partir del proceso de remodelación del hueso inmaduro (Ross y Pawlina, 2010). Al contrario del tipo anterior, en el hueso laminar, material de estudio, las fibras de colágeno están altamente organizadas y orientadas, lo cual le confiere propiedades anisotrópicas, es decir, el comportamiento mecánico de esta clase de hueso varía dependiendo de la orientación de las fuerzas aplicadas, teniendo la mayor resistencia en dirección paralela al eje longitudinal de las fibras de colágeno (Pasteris y cols., 2008; Olszta y cols., 2007; Wopenka y Pasteris, 2005; Bostrom y cols., 2000).

1.2.2. Histología del hueso

Los huesos son los órganos del sistema esquelético, siendo el tejido óseo el componente estructural principal de los huesos junto con los tejidos conjuntivos, incluidos el tejido hematopoyético y el tejido adiposo, junto con vasos sanguíneos y nervios.

1.2.2.1. Estructura del hueso

1.2.2.1.1. Estructura macroscópica del hueso maduro

Los huesos poseen una estructura macroscópica común y están constituidos por tejido óseo esponjoso o trabecular, que representa alrededor del 20% del volumen total del hueso, el cual se encuentra en continuidad con el tejido óseo cortical o compacto, que corresponde aproximadamente al 80%.

El primero de ellos está formado por un entramado de espículas o trabéculas óseas (finas láminas irregulares) que delimitan los espacios ocupados por medula ósea y vasos sanguíneos mientras que el segundo es una masa sólida, una capa densa y compacta (Kierszenbaum y Tres, 2012) que se encuentra cruzada por una red de finos conductos longitudinales y transversales, conocidos como canales de Havers y conductos de Volkmann respectivamente, los cuales alojan vasos sanguíneos y fibras nerviosas (**Figura 5**).

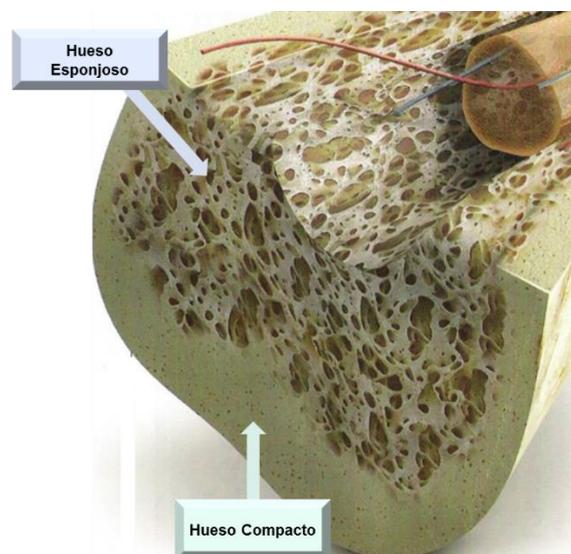


Figura 5. Estructura macroscópica de los distintos tipos de hueso.

En los huesos largos como es el caso de estudio (fémur o tibia), la diáfisis, está compuesta de hueso compacto, que forma un cilindro hueco con un espacio medular central, llamado cavidad medular, éste forma la parte interna del hueso (Kierszenbaum y Tres, 2012).

Los extremos de los huesos largos, llamados epífisis, están constituidos por hueso esponjoso rodeado por una delgada capa de hueso compacto. Una zona de transición en disminución, denominada metáfisis, comunica la epífisis con la diáfisis (Kierszenbaum y Tres, 2012) (**Figura 6**).

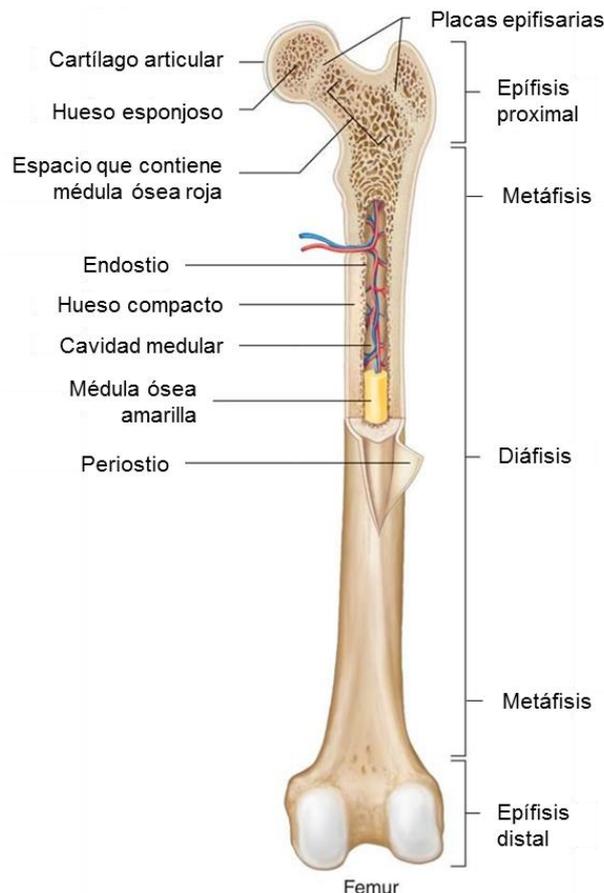


Figura 6. Estructura de un hueso largo indicando las distintas partes anatómicas (Gartner y Hiatt (2011). *Histología Básica*. [Figura]).

Los huesos se encuentran recubiertos de dos capas:

a) Periostio, capa de tejido conjuntivo denso especializado con capacidad osteogénica, el cual recubre la mayoría de los huesos en la superficie externa, a excepción de las regiones donde se articulan otros huesos, en este caso la superficie articular está cubierta de cartílago hialino o articular (Kierszenbaum y Tres, 2012).

La capa superficial que tapiza el hueso en crecimiento activo está compuesta por una capa fibrosa externa (superficial) de tejido conjuntivo colagenoso denso irregular y una capa más celular interna (profunda) que contiene las células

osteoprogenitoras (células osteogénicas), osteoblastos y, a veces, osteoclastos (Gartner y Hiatt, 2011). En el caso de que no se esté formando tejido óseo en la superficie del hueso la capa fibrosa es el componente principal del periostio y la capa interna o profunda no aparece bien definida (Ross y Pawlina, 2010).

Por lo general las fibras colágenas del periostio son paralelas a la superficie del hueso y le forman una cápsula. Las fibras colágenas de estas estructuras se extienden directamente hacia el interior del tejido óseo, forman un ángulo y se continúan con las fibras colágenas de la matriz extracelular ósea, las cuales se conocen como fibras de Sharpey (Ross y Pawlina, 2010).

- b) Endostio,** capa de células de tejido conjuntivo que contiene células osteoprogenitoras, por lo que tiene capacidad osteogénica, la cual reviste la cavidad medular de la diáfisis y los espacios del interior de los huesos esponjosos (Kierszenbaum y Tres, 2012).

El endostio no suele tener más de una capa celular de espesor y consiste en células osteoprogenitoras que pueden diferenciarse en osteoblastos (células secretoras de matriz ósea) y células de revestimiento óseo (células endósticas) (Ross y Pawlina, 2010).

Este revestimiento se encuentra conteniendo a la medula ósea, de la cual hay dos tipos, la medula ósea roja y la amarilla. La primera de ellas, la medula ósea roja, está compuesta por células de las progenies hematopoyéticas en diferentes etapas evolutivas y una red de fibras y células reticulares que funcionan como un almacén de sostén para los vasos y las células en desarrollo. Ésta además no aumenta en proporción con el crecimiento óseo conforme al crecimiento del individuo, ya que a mayor edad en el adulto el ritmo de producción de células sanguíneas disminuye y esta cavidad medular es ocupada en su mayor parte por tejido adiposo, dando lugar al segundo tipo, la medula ósea amarilla (Ross y Pawlina, 2010).

1.2.2.1.2. Estructura microscópica del hueso maduro

El hueso laminar o maduro está integrado por unidades estructurales, las laminillas, las cuales, en función de su disposición en el hueso, dan lugar a patrones diferentes (**Figura 7**):

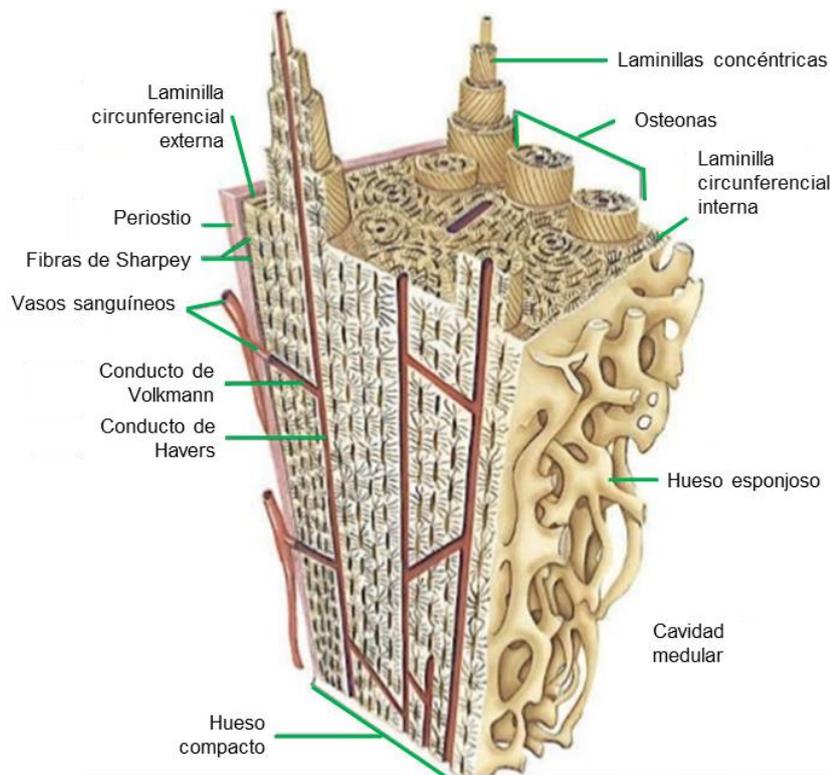


Figura 7. Diagrama tridimensional de porción longitudinal de un hueso extraído de la diáfisis de un hueso largo (Gartner y Hiatt (2011). *Histología Básica*. [Figura]).

1. Osteonas o sistemas de Havers, integrados por laminillas en disposición concéntrica alrededor de un canal vascular longitudinal, las fibras colágenas de cada una de las laminillas concéntricas de una osteona son paralelas entre sí, siguiendo una alineación regular y helicoidal, pero están orientadas en dirección perpendicular a las fibras en las laminillas contiguas. Esta disposición le imparte a la superficie de corte del hueso laminar un aspecto de madera terciada y le confiere una gran resistencia a la osteona (Ross y Pawlina, 2010).

Las osteonas se encuentran conformadas por los siguientes elementos:

- a) Matriz ósea, una sustancia mineralizada que se deposita en capas o en laminillas, alrededor de un conducto central (conducto de Havers).
- b) Conducto de Havers o central (conducto osteónico), que contiene vasos y nervios.
- c) Osteocitos, cada uno ocupa una cavidad o laguna de la que parten los canalículos radiales.
- d) Canalículos radiales o conductillos, que contienen las prolongaciones de los osteocitos, penetran en las laminillas de las lagunas adyacentes. El sistema de canalículos que se abre en el sistema de Havers sirve para el intercambio de sustancias entre los osteocitos y los vasos sanguíneos.

2. Laminillas intersticiales, las cuales son restos de laminillas concéntricas antiguas que se encuentran entre las osteonas. Ambas se encuentran separadas por una delgada capa denominada línea de cementación (Kierszenbaum y Tres, 2012).

3. Laminillas circunferenciales, tanto externa como interna, siendo la primera la capa más calcificada que se encuentra en la superficie externa del hueso compacto por debajo del periostio y en la que se insertan las fibras de Sharpey y, la segunda de ellas es la que se observa en la superficie interna por debajo del endostio.

Respecto a los canales vasculares que se encuentran en el hueso compacto, éstos adoptan dos orientaciones en relación con la estructura laminar:

- 1. Conductos de Havers**, cilindro concéntrico central que se encuentra rodeado por laminillas de hueso calcificado. Este canal recibe inervación e irrigación y está tapizado por células osteoprogenitoras y osteoblastos (Gartner y Hiatt, 2011).
- 2. Conductos de Volkmann** (conductos perforantes), son túneles en el hueso laminar a través de los cuales pasan vasos sanguíneos y nervios desde las superficies perióstica y endóstica para alcanzar el conducto de Havers;

también conectan los conductos de Havers entre sí. Suelen discurrir perpendiculares al eje longitudinal de las osteonas y del hueso. Los conductos de Volkmann no están rodeados por laminillas concéntricas, una característica fundamental para su identificación histológica (Ross y Pawlina, 2010).

Por otro lado, el hueso esponjoso maduro es de estructura similar a la del hueso compacto maduro a excepción del tejido que se distribuye en forma de espículas o trabéculas entre las cuales hay abundantes espacios medulares intercomunicados y de diversos tamaños. La matriz ósea es laminillar y si las trabéculas son lo suficientemente gruesas pueden verse osteonas (Ross y Pawlina, 2010).

1.2.2.2. Composición del hueso

1.2.2.2.1. Matriz ósea

La matriz ósea contiene componentes orgánicos (35%), los cuales dan lugar a la fase orgánica y componentes inorgánicos (65%), los cuales dan lugar a la fase mineral.

En la fase mineral, los iones mayoritarios son el calcio y el fosfato, que forman sales complejas de estequiometría variable, siendo la más importante en este caso la hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, la cual además de los iones mencionados también contiene otros aniones, sobre todo hidroxilo. Este componente es una red iónica compleja que puede considerarse formada por pequeños cristales (Solano-Muñoz y Lozano-Teruel, 1998). Los cristales se distribuyen en los espacios intersticiales que separan las fibras de colágeno de tipo I y se alinean a lo largo de las mismas. Este complejo atrae agua, que crea una cubierta de hidratación que facilita el intercambio iónico con el líquido extracelular (Gartner y Hiatt, 2011).

La fracción orgánica que representa la fase minoritaria de la matriz ósea suele dividirse en dos partes, el colágeno y la fracción no-colagenosa, más heterogénea. El colágeno puede suponer hasta el 90% de la proteína total de los tejidos calcificados (White y cols., 2011). Este colágeno es de tipo I, y la estructura del tropocolágeno unidad es muy similar al de otros tejidos blandos, como piel y tendón. Sin embargo, su fibrilla es más insoluble como consecuencia de su disposición más irregular y sobre todo por

el mayor número de enlaces entrecruzados de residuos de hidroxilisina (Hyl) con lisinal o hidroxilisinal (Solano-Muñoz y Lozano-Teruel, 1998). La hidroxiapatita es una placa de cristal y sigue la morfología que se encuentra dentro de la matriz de colágeno con su eje C alineado paralelo al eje longitudinal de las fibras de colágeno (**Figura 8**) (Turner-Walker, 2008). En consecuencia, el colágeno y la hidroxiapatita se unen mediante potentes enlaces moleculares que ayudan a dar fuerza y garantizar la preservación de los huesos en condiciones ideales (Dent y cols., 2004).

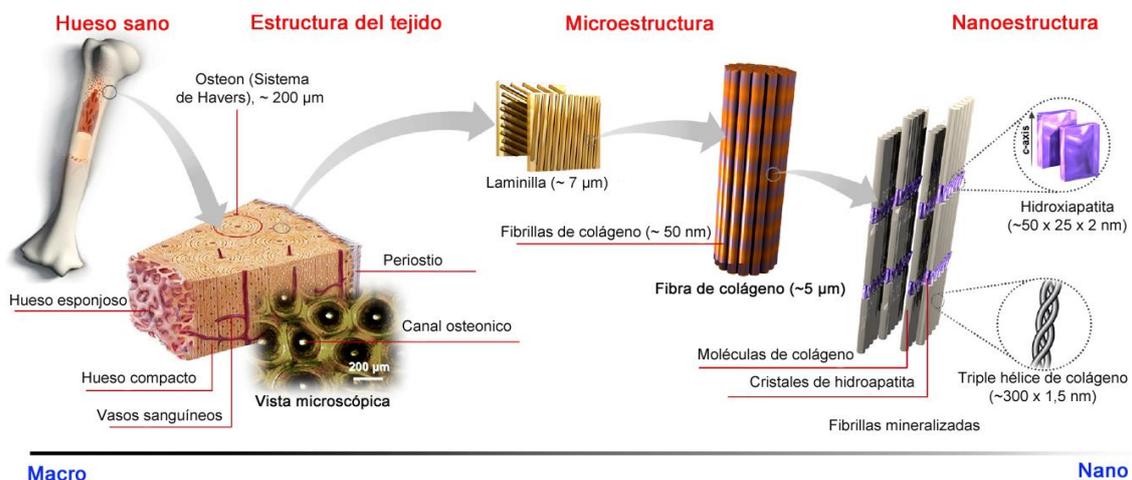


Figura 8. Esquema representativo de las diferentes estructuras que conforman un hueso típico desde el punto de vista micro y macroscópico. La microestructura del hueso cortical o compacto consiste en sistemas de Havers (círculos en sección transversal y vista microscópica) con canales osteónicos y laminillas, a nanoescala, el marco estructural está compuesto por fibras de colágeno de haces de fibrillas de la misma proteína, mineralizadas (Sadat-Shojai y cols. (2013). *Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures*. [Figura]).

En el 10% proteico restante que completa la matriz orgánica se encuentran proteoglicanos y sialoproteínas, las cuales son glicoconjugados, proteínas ácidas ricas en los aminoácidos ácido aspártico (Asp/D) y ácido glutámico (Glu/E) (Lozano-Teruel y cols., 2005), así como albúminas, globulinas y péptidos dializables que parecen quedar atrapados en la matriz al mineralizarse ésta, pero se encuentran en menor cantidad que las primeras (Solano-Muñoz y Lozano-Teruel, 1998).

A continuación, se detallan los componentes más importantes de esta fracción:

- ✦ **Colágeno tipo I**, proteínas estructurales de la matriz extracelular que contienen uno o más dominios que albergan la conformación de una triple hélice del colágeno (Myllyharju y Kivirikko, 2004; Van der Rest y Garrone, 1991). El motivo

de triple hélice se compone de tres cadenas de polipéptido cuya secuencia repetida de aminoácidos que en consiste glicina-prolina-prolina/hidroxi prolina (G-X-Y). Debido a esta secuencia de péptido particular, cada cadena se enrolla en una hélice en sentido levógiro, y las tres cadenas de en una triple hélice en sentido dextrógiro, donde los residuos glicina están en el centro de la triple hélice y donde las cadenas laterales de X y Y son residuos en la superficie de la hélice (Van der Rest y Garrone, 1991) (**Figura 9**).

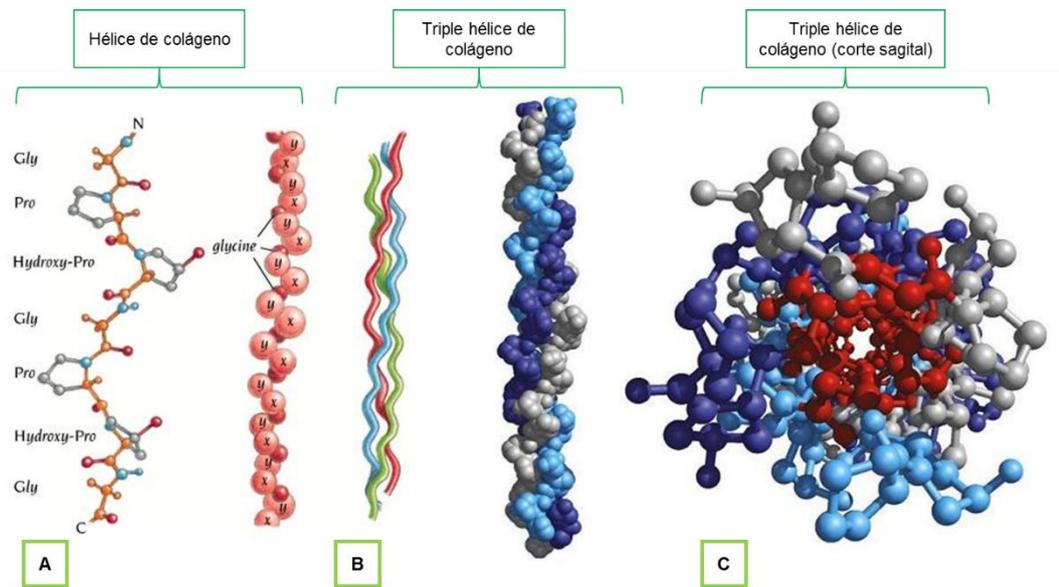


Figura 9. Estructura del colágeno. **A.** Hélice de colágeno. **B.** Triple hélice de colágeno. **C.** Triple hélice de colágeno (corte sagital) (Nelson y Cox (2006a). *Lehninger. Principios de Bioquímica*. [Figura]).

El precursor que da lugar al colágeno que posteriormente formará las fibrillas es el procolágeno. Cada molécula de colágeno tipo I se compone típicamente de dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$ [$\alpha 1(I) 2 - \alpha 2(I)$] en espiral alrededor de la otra en una característica de triple hélice. Tanto la cadena $\alpha 1$ y la cadena $\alpha 2$ consisten en un dominio helicoidal largo precedido por un péptido amino-terminal (N-terminal) corto y seguido de un péptido carboxi-terminal (C-terminal) corto (Myllyharju y Kivirikko, 2004, 2001; Van der Rest y Garrone, 1991).

- ⊕ **Sialoproteína ósea**, es la proteína más abundante después del colágeno. Se encuentra muy ramificada en sus cadenas glicídicas, y es rica en grupos ácidos de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) en la parte glicídica y en Asp y Glu, en la polipeptídica (Lozano-Teruel y cols., 2005).

- ✦ **Osteocalcina (OC o BGP)**, proteína ósea con γ -carboxiglutamato (γ -Gla). Tiene un gran contenido en γ -Gla, que se sitúa en esta proteína a distancias regulares e idénticas a las existentes entre los iones de calcio en el cristal de hidroxiapatita (Lozano-Teruel y cols., 2005). Otra proteína relacionada con esta es la proteína γ -Gla matricial (MGP), que contiene solo 5 restos de γ -Gla por molécula y es menos abundante (Solano-Muñoz y Lozano-Teruel, 1998).
- ✦ **Osteonectina**, es una fosfoproteína ácida muy rica en aminoácidos hidroxilados (serina (Ser/S) y treonina (Thr/T)), y dominios de interacción distintos, tanto para el colágeno, como para la hidroxiapatita (Lozano-Teruel y cols., 2005).
- ✦ **Osteopontina**, es una sialoproteína altamente fosforilada común en los huesos y dientes. Contiene regiones de poliaspartato y motivos arginina-glicina-aspartico (RGD) (que sirven para la interacción con la hidroxiapatita extracelular (las primeras) y con las integrinas del glicocáliz de las membranas celulares (Lozano-Teruel y cols., 2005).

Gran número de otras proteínas han sido reportados mediante su estudio en hueso arqueológico, incluyendo la hemoglobina (Tuross, 1991; Smith y Wilson, 1990; Ascenzi y cols., 1985), albúmina (Cattaneo y cols., 1999a, 1992a, 1992b; Montgelard 1992; Lowenstein y cols., 1981) y fosfatasa alcalina (Weser y cols., 1996). Al igual que el ADN y los lípidos, estas proteínas se asocian con fluidos y componentes celulares en el tejido, y su presencia y persistencia en el hueso es más difícil de predecir que el colágeno y la osteocalcina (Collins y cols., 2002).

1.2.2.2.2. Componentes celulares del hueso

El hueso se compone de cuatro clases de células: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, perteneciendo las tres primeras al mismo linaje celular, mientras que la cuarta proviene de precursores monocíticos (Gartner y Hiatt, 2011) (**Figura 10**).

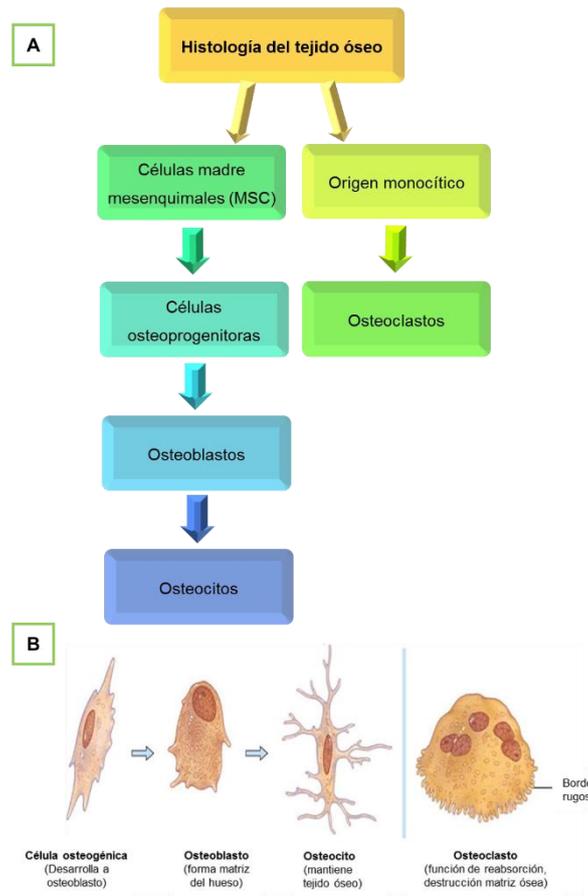


Figura 10. A. Histología del tejido óseo. **B.** Precursores de las diferentes células óseas. Célula osteogénica (osteoprogenitora), osteoblasto y osteocito pertenecientes al mismo linaje celular, y osteoclasto proveniente de precursores monocíticos.

A continuación, se explica:

- ✦ **Células osteoprogenitoras**, son de origen mesenquimatoso y presentan las propiedades de las células madre, como es la capacidad de proliferación y la capacidad de diferenciación. Éstas dan lugar a los osteoblastos a través de un mecanismo regulador y de transcripción, y se localizan en las capas internas del periostio y el endostio (Kierszenbaum y Tres, 2012) revistiendo los canales de Havers y las cavidades medulares (Gartner y Hiatt, 2011).
- ✦ **Osteoblastos**, los cuales se disponen en forma de monocapa revistiendo todas las regiones de formación activa de hueso y se trata de unas células muy polarizadas: depositan osteoide, que es la matriz orgánica no mineralizada del hueso, a lo largo de su superficie de contacto con el hueso. Estas células además

activan y regulan la mineralización ulterior del osteoide (Kierszenbaum y Tres, 2012).

Se conoce de estas células que son muy activas en la síntesis, glicosilación y secreción de proteínas, siendo algunos de sus productos específicos el colágeno tipo I, la osteocalcina, la osteopontina y la sialoproteína ósea. Por otra parte, también sintetizan factores de crecimiento, en especial de la familia de proteínas morfogénicas óseas con actividades inductoras del hueso (Kierszenbaum y Tres, 2012).

Cuando se completa la formación ósea, los osteoblastos se aplanan y se transforman en osteocitos al quedar atrapados en el interior de lagunas en el seno de la matriz mineralizada sintetizada por ellos mismos. La diferenciación de estas células requiere la intervención de dos factores de transcripción *Cbfa1/Runx2* y *osterix* (Kierszenbaum y Tres, 2012).

- ✦ **Osteocitos**, son células con proyecciones osteocíticas (Gartner y Hiatt, 2011) por lo que son muy ramificadas, cuyo cuerpo ocupa unos pequeños espacios entre las laminillas denominados lagunas. Las proyecciones se extienden a través de los canaliculos, unos delgados conductos presentes en la matriz calcificada que atraviesan las laminillas y conectan entre si las lagunas de los osteocitos adyacentes (Kierszenbaum y Tres, 2012). Las prolongaciones de los osteocitos conectan entre sí con los adyacentes mediante uniones comunicantes, forman uniones gap, con el fin de facilitar la comunicación de las células que integran el tejido óseo (Gartner y Hiatt, 2011). El líquido extracelular rellena los espacios periosteocíticos y los canaliculos y aporta nutrientes y moléculas de señalización a las células del hueso, además de eliminar productos de desecho y moléculas de señalización secretadas por estas células (Gartner y Hiatt, 2011).
- ✦ **Osteoclastos**, son células grandes y multinucleadas, que se adosan a la superficie de resorción del hueso en las llamadas lagunas de Howship y causan la destrucción de la matriz ósea del hueso en la remodelación ósea mediante la secreción de enzimas hidrolíticas (colagenasas), que digieren las fibras colágenas y degradan la matriz ósea. También a su vez segregan ácidos (ácido

cítrico y bicarbonato) para acidificar el medio y favorecer la osteólisis enzimática (Paniagua y cols., 2007).

1.2.3. Diagénesis del hueso

La diagénesis en su forma básica, es cualquier modificación natural que ocurre en un hueso postmortem (siendo este una mezcla de bioapatita y colágeno), a pesar de que el proceso de descomposición en condiciones favorables puede tardar miles de años (Collins y cols., 2002; Child, 1995) y puede alterar el tipo de información contenida en el mismo hueso, es decir isotópica, molecular, bioquímica y la información estructural (Hedges, 2002).

1.2.3.1. Mecanismos de degradación ósea

La degradación ósea se considera que se produce principalmente por dos procesos; uno mediado por microorganismos y hongos denominado biodegradación (Bell y cols., 1996; Hackett, 1981) o bioerosión (Hollund y cols., 2014; Turner-Walker, 2012; Turner-Walker y Jans, 2008; Jans, 2008; Nielsen-Marsh y Hedges, 2000a) y el otro proceso mucho más lento, lo forma la degradación química (Berna y cols., 2004; Collins y cols., 2002) que engloba el deterioro químico de la fracción orgánica y el deterioro químico de la fracción mineral.

Se ha observado que la presencia de moléculas orgánicas en la superficie mineral (Putnis y cols., 1995), disminuirá la velocidad de reacción en solución mineral (Kleter y cols., 1994). Por el contrario, la disolución de la fase mineral expondrá al colágeno a la biodegradación (Krane, 1975), aumentando así la tasa de su descomposición (Klont y cols., 1991). Estas tres vías son útiles en términos de la comprensión de las complejas cuestiones relacionadas con la diagénesis hueso.

También debemos tener en cuenta los parámetros del hueso que influyen estrechamente en la diagénesis, como son la porosidad del mismo, la cristalinidad, la pérdida de colágeno y la integridad histológica (Hedges y Millard, 1995b). En la actualidad podemos decir que, como era de esperar, un aumento de estos parámetros se expresa en un mayor grado de diagénesis, aunque los detalles de la correlación tienden a ser algo dependiente del lugar (Hedges, 2002).

1.2.3.1.1. Biodegradación/bioerosión

Se produce la pérdida de la integridad histológica a nivel microestructural y la principal causa es la actividad microbiana (Barrientos y cols., 2016). El deterioro microbiano es probablemente el mecanismo más común de deterioro del hueso (Child, 1995), y puede ocurrir rápidamente después de la muerte (Bell y cols., 1996; Yoshino y cols., 1991). Mientras deterioro químico se acelera en los extremos de pH o por temperatura elevada, la actividad microbiana se optimiza cerca de condiciones de pH neutros, que de otro modo, protege el hueso.

1.2.3.1.2. Deterioro químico de la fracción orgánica

Siendo como mencionamos anteriormente el colágeno, la proteína de la fracción orgánica mayoritaria, el cambio sufrido en éste, será el que más repercusiones tenga en el deterioro de la fracción orgánica, siendo por tanto la descomposición y la pérdida de colágeno los cambios diagenéticos primarios en el hueso (Hedges, 2002; Collins y cols., 1995). El daño al colágeno dará lugar a un cambio en la organización (Miles y cols., 2000) y en última instancia a la gelatinización y a la pérdida de colágeno (Collins y cols., 1995). Los procesos dejan atrás un mineral fantasma que contiene poros muy pequeños interconectados de menos de 30 nm de diámetro (Nielsen-Marsh y Hedges, 1999).

La velocidad a la que el colágeno se pierde, dependerá del tiempo, temperatura y pH del medio ambiente. A altas temperaturas, la tasa de pérdida de colágeno se acelerará y procesos tales como ebulliciones prolongadas (Roberts y cols., 2002) producirán huesos similares a los que han sido químicamente desproteinizados, por ejemplo, con hidrato de hidracina (Nielsen-Marsh y Hedges, 1999).

Los extremos de pH también pueden causar hinchazón del colágeno y acelerar la hidrólisis, siendo particularmente sensible a los álcalis (Rudakova y Zaikov, 1987). En el entorno de entierro, Collins y cols. (1995) asume en su modelo básico de la degradación del colágeno que los extremos de pH serían mitigados por el mineral, que actuaría como un tampón de pH.

1.2.3.1.3. Deterioro químico de la fracción mineral

Todos los huesos vivos contienen pequeños cristales de hidroxiapatita termodinámicamente inestables, por lo tanto, los cambios en la cristalinidad después del entierro son probables. Además, la cristalinidad es un concepto que incluye tamaño de los cristales, el orden cristalino, y el número de defectos en el cristal (Grynpsas, 1976). Las alteraciones minerales que se producen como resultado de la acción del medio ambiente de entierro, se traducen en recristalización, producción de cristales más grandes a través del proceso de maduración de Ostwald (Trueman y cols., 2004), el cual corresponde a la disminución de la energía superficial del sólido, mediante la disolución de los cristales más pequeños, incrementando aún más el tamaño de los cristales (Cazalbou y cols., 2005).

La fase mineral, además, está en profundo desequilibrio con el agua de lluvia, por lo tanto, si los huesos se encuentran por encima o alrededor de una masa de agua, la hidrología del sitio tendrá un papel clave en la supervivencia del mismo (Hedges, 2002; Pike y cols., 2001; Hedges y Millard, 1995a). Sin embargo, las transformaciones minerales a su vez, expondrán el colágeno para acelerar la degradación química y biológica.

1.2.3.2. Factores que influyen en la diagénesis del hueso

El hueso, cuando el entorno que lo rodea se elimina (órganos, músculos, tendones, etc.) se vuelve inestable (Trueman y cols., 2004), ya que pasa de un ambiente relativamente cerrado que forma el propio organismo a uno abierto y desprotegido (Turner-Walker, 2008) y puede romperse con el tiempo a través de numerosos procesos, incluyendo ruptura física, descalcificación, y la disolución debido a suelos ácidos y agua (Dent y cols., 2004).

1. Lugar de enterramiento, estos cambios pueden afectar a la absorción de los materiales de la tierra, el intercambio de iones, la descomposición y la lixiviación de colágeno, ataque microbiológico, la alteración y la lixiviación de la matriz mineral y abundancia de depósitos minerales (Hedges, 2002).

2. La presencia o ausencia de agua en el entorno inmediato al hueso circundante, influirá en su degradación. El agua es el medio de reacciones químicas y apoya la actividad microbiana (Turner-Walker, 2008).

- a) La presencia de agua alrededor de los huesos puede dependiendo del pH, provocar la disolución de sus componentes minerales. Además, la presencia de iones contenidos en el agua (tales como Ca^{2+} , fosfato (PO_4^{3-}) y carbonato (CO_3^{2-})) puede dar lugar a alteraciones en la estructura de la hidroxiapatita (Hedges y Millard, 1995a).

Nicholson (1998) explica que, en suelos con buen drenaje, la degradación del hueso se acelera a medida que se pierden materiales solubles. En este entorno, el hueso entra en un ciclo de mojado y seco, y el agua de los poros que contiene Ca^{2+} y PO_4^{3-} se extrae por un potencial hidráulico. Después de otra sumersión, el agua entrará en los poros del hueso y una vez más se saturará con Ca^{2+} y PO_4^{3-} (Turner-Walker, 2008). Cuando se seca el hueso esta agua se pierde junto con sus iones y el hueso entra en un ciclo seco-húmedo o "bucle de retroalimentación positiva", que se traducirá en una disminución de las tasas de preservación (Turner-Walker, 2008).

- b) En suelos anegados, donde la presencia persistente de agua crea un entorno local tamponado con solutos que se llevan a cabo por el agua subterránea circundante, lo que ralentiza la descomposición. Este fenómeno es explicado por Turner-Walker (2008) que establece que el tamaño de los poros de hueso influirá en la cantidad y la localidad de la infiltración de agua en el hueso. Sin embargo, una vez saturado, el Ca^{2+} y PO_4^{3-} se disolverán. En ambientes anegados esto dará lugar a una disolución localizada y preservación ósea buena de forma general.

3. El pH de las aguas subterráneas, mejorará aún más el efecto del agua sobre el hueso. En los enterramientos ácidos, el hueso pierde su color debido a los iones metálicos de transición y a que los ácidos húmicos se solubilizan e invaden el tejido óseo, del mismo modo que les ocurre a los fosfatos de calcio (incluyendo hidroxiapatita). Por el contrario, en suelos alcalinos, el hueso se vuelve de color crema debido al bloqueo de iones metálicos, carbonatos insolubles y oxihidróxidos (Turner-Walker, 2008; Lindsay, 1979).

4. Tipo de suelo, el pH y la composición elemental del suelo, pueden dar lugar a la formación de vivianita, brushita y calcita dentro del hueso (Child, 1995). Además de la degradación de hidroxiapatita, extremos de pH pueden dar lugar a la hidrólisis de colágeno (Collins y cols., 2002). Una alta presencia de Ca^{2+} en el suelo (en función del pH) puede resultar en la destrucción del hueso tal como explica Piepenbrink (1989) y Child (1995), ya que el carbonato de calcio (CaCO_3) formado en el suelo con alto contenido de calcio ocupa un mayor espacio que los cristales de hidroxiapatita y pueden resultar en la tensión interna dentro del hueso que posteriormente se manifiesta como formación de grietas.

a) En entierros en suelos ácidos, el hueso pierde su color debido a los iones de metales de transición y ácidos húmicos, que pasan a ser soluble e invaden el tejido óseo.

b) En entierros en suelos alcalinos, el hueso se vuelve de color crema debido a la fijación de los iones metálicos, carbonatos insolubles y oxihidróxidos (Turner-Walker, 2008).

5. Actividad microbiana, también dará lugar a la degradación de hueso. Estudios realizados por varios autores como Piepenbrink (1989, 1986), Grupe y Dreses-Werringloer (1993) y Hawksworth y Wiltshire (2011) reportan el crecimiento de diferentes especies de hongos en huesos exhumados en restos óseos humanos. Estos últimos identificaron las siguientes especies de hongos que incluyen: *Botrytis* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium* sp., *Crysosporium pannorum*, *Cyrsosporium* sp., *Penicillium brevi-compactum*, *Penicillium herbarum*, *Phialophora hoffmannii* y *Scytalidium* sp. Y las especies bacterianas encontradas fueron: *Actinomadura madurae*, *Alkaligenes pichaudii*, *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, y, *Streptomyces griseus*.

Los autores encontraron que la colonización era densa después de 4 meses, pero la integridad del hueso no estaba comprometida y no presentaba el efecto túnel descrito por Wedl en 1864, el cual mediante un experimento observó un túnel microscópico realizado por hongos que crecieron en dientes.

Otro estudio llevado a cabo por Hackett (1981) reveló que los microorganismos presentes en el suelo del lugar donde se encontraba enterrado un hueso durante un año progresaban en el hueso a través del endostio y periostio y dedujo que estos microorganismos se alimentaban del colágeno a través de la desmineralización sistemática, por lo que se afirma que dichos microorganismos pueden infiltrarse en el hueso, denominando a estas zonas “zonas de destrucción focal microscópica”. Posteriormente Bell y cols. (1996) y Nicholson (1998) sugirieron que el proceso de destrucción ósea postmortem llevado a cabo por las bacterias del intestino se produce mediante caminos a través de los canales de Havers, arterias de nutrientes y sistema vascular venoso.

Según la arquitectura del hueso, la colonización de las bacterias se verá influida, ya que según Turner-Walker (2008) algunas bacterias pueden desplazarse longitudinalmente a lo largo del hueso y parecen seguir la orientación de las fibras de colágeno. Los microorganismos que penetran, sobrevivirán alimentándose del tejido mineralizado que rodea y excretarán los metabolitos, que variarán según el entorno local (Child, 1995). Bajo condiciones anaeróbicas, la descomposición de las proteínas resultará en una disminución en el pH debido a la liberación de aminoácidos y ácidos grasos (Child, 1995). La presencia de éstos en el hueso dará lugar a la desmineralización de la hidroxiapatita y expondrá el colágeno a las colagenasas (Child, 1995). Es crucial ver que la hidroxiapatita se pierde debido a las bacterias que son capaces de degradar el colágeno mineralizado (Turner-Walker, 2008). También es importante saber que, cuando la hidroxiapatita se pierde, se produce un aumento de la porosidad, lo que permite la acción de colagenasas en el hueso (Nielsen-Marsh y Hedges, 2000a, 2000b). La pérdida de los componentes orgánicos mineralizados deja el hueso poroso y frágil y, si dichos procesos continúan, el hueso en última instancia, se desintegrará y se perderá.

1.3. ADN (Ácido desoxirribonucleico)

1.3.1. Bioquímica y naturaleza del ADN

Los ácidos nucleicos son polinucleótidos, es decir, moléculas poliméricas formadas por la repetición de unidades sencillas, denominados mononucleótidos, los cuales se mantienen unidos entre sí por medio de un enlace característico, el enlace

fosfodiéster (Lozano-Teruel y cols., 2005). Los mononucleótidos (**Figura 11**) están formados por tres tipos de componentes químicos: fosfato, una pentosa de tipo 2'-desoxi-D-ribose en la forma β -furanosa (anillo pentagonal cerrado) (Nelson y Cox, 2006b) y 4 bases nitrogenadas (**Figura 12**): adenina (A) y guanina (G) (purinas) y citosina (C) y timina (T) (pirimidinas) (Griffiths y cols., 2002).

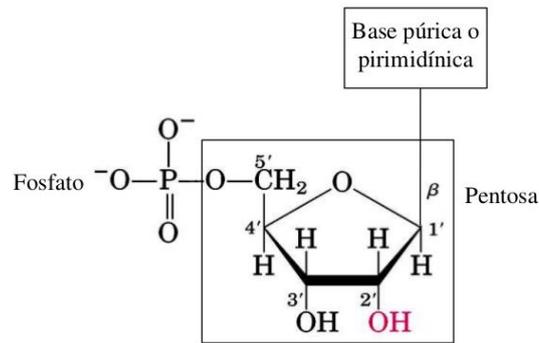


Figura 11. Estructura de general de los nucleótidos con la numeración convencional del anillo de la pentosa (Nelson y Cox (2006b). *Lehninger. Principios de Bioquímica*. [Figura]).

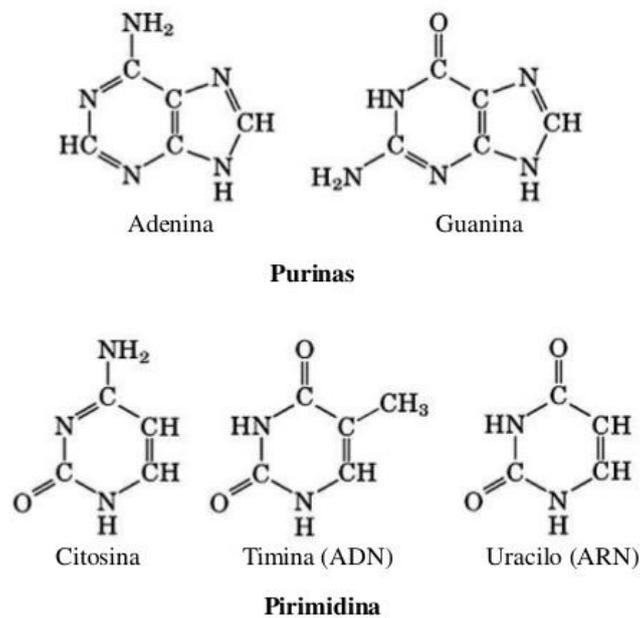


Figura 12. Bases púricas y pirimidínicas principales de los ácidos nucleicos (Nelson y Cox (2006b). *Lehninger. Principios de Bioquímica*. [Figura]).

La molécula sin el grupo fosfato se denomina **nucleósido**. Las bases nitrogenadas derivan de dos compuestos parentales, pirimidina y purina (**Figura 13**). Las bases y las pentosas presentes en los nucleótidos comunes son compuestos

heterocíclicos, y ambas se encuentran unidas de forma covalente (por el nitrógeno de la posición 1 (N-1) en las pirimidinas y el nitrógeno de la posición 9 (N-9) en las purinas) a través de un enlace *N*-β-glucosídico con el carbono 1' de la pentosa, y el fosfato está esterificado en el carbono 5'.

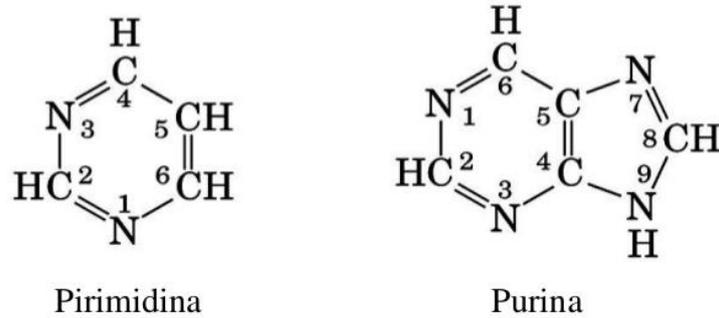


Figura 13. Compuestos parentales de los que derivan las bases púricas y pirimidínicas de los nucleótidos y de los ácidos nucleicos, con especificación de las convenciones para la numeración (Nelson y Cox (2006b). *Lehninger. Principios de Bioquímica*. [Figura]).

El enlace *N*-β-glucosídico se forma por eliminación de agua (un grupo hidroxilo de la pentosa y un hidrógeno de la base, como ocurre en la formación de los enlaces *O*-glucosídico).

También existen otras “bases minoritarias” que se encuentran en los ARN transferentes (ARNt) como la hipoxantina (primera base producida en la vía de síntesis *de novo* de las purinas) y la xantina (producto de la acción de la xantina oxidasa sobre la hipoxantina) (Elliot y Elliot, 2002).

El ADN, como polinucleótido, está cargado negativamente y por lo general existe en forma de doble hélice dextrógira. Las dos hebras se unen mediante enlaces por puente de hidrógeno y corren en direcciones opuestas. La adenina siempre se une a una timina a través de dos enlaces hidrógeno. Por otro lado, la guanina está conectada a la citosina a través de tres enlaces de hidrógeno (**Figura 14**).

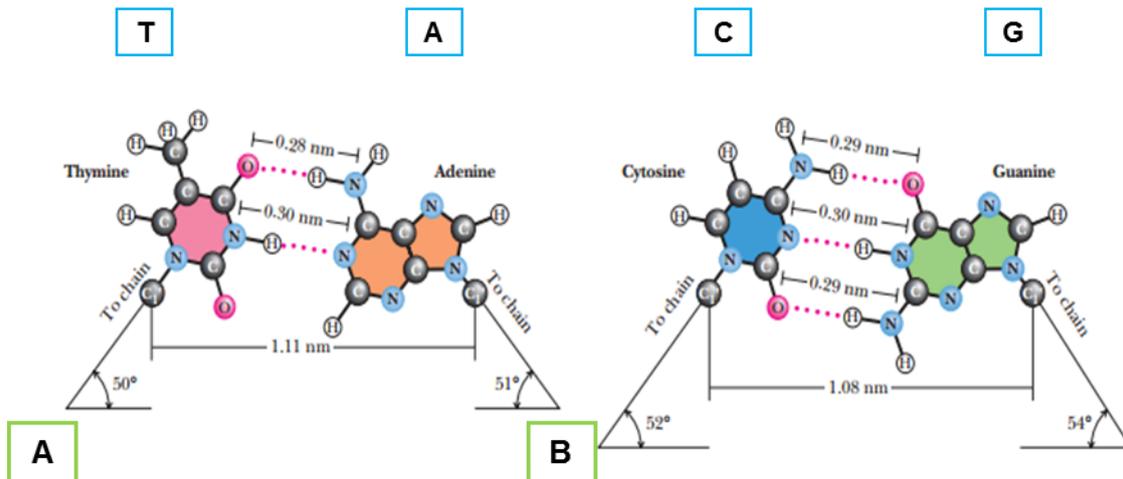


Figura 14. Puentes de hidrógeno de los pares de bases definidos por Watson y Crick. **A.** Unión T-A por dos puentes de hidrógeno; **B.** Unión C-G por tres enlaces por puente de hidrógeno (Garret y Grisham (2010a). *Biochemistry*. [Figura]).

Cada cadena de ADN consiste en una cadena principal compuesta de moléculas de azúcar desoxirribosa unidas entre sí en las posiciones 5' y 3' de los grupos de éster de fosfato. Para lograr la estructura de nucleótidos de una base de purina o pirimidina se adjunta como un enlace carbono-nitrógeno (C-N) de las moléculas de azúcar desoxirribosa en la posición 1'.

En condiciones naturales de ADN es una macromolécula hidratada, con 8-10 moléculas de agua fuertemente unidas por un residuo de nucleótido (Lindahl, 1996).

El exterior de la hélice consiste en restos de azúcar desoxirribosa conectados a través de grupos fosfato (**Figura 15**). Los nucleótidos están unidos covalentemente al azúcar, y situado en el interior de la hélice. Estudios de DRX como el de Franklin y Wilkins (Kuriyan y cols., 2012) demuestran que en la hélice de ADN hay un surco mayor y uno menor, los cuales surgen del hecho de que los enlaces glucosídicos de un par de bases no son directamente opuestos entre sí, sino más bien se sitúan en un ángulo con respecto a la otra (Stryer, 2002), siendo estos surcos los sitios de anclaje de numerosos factores de transcripción.

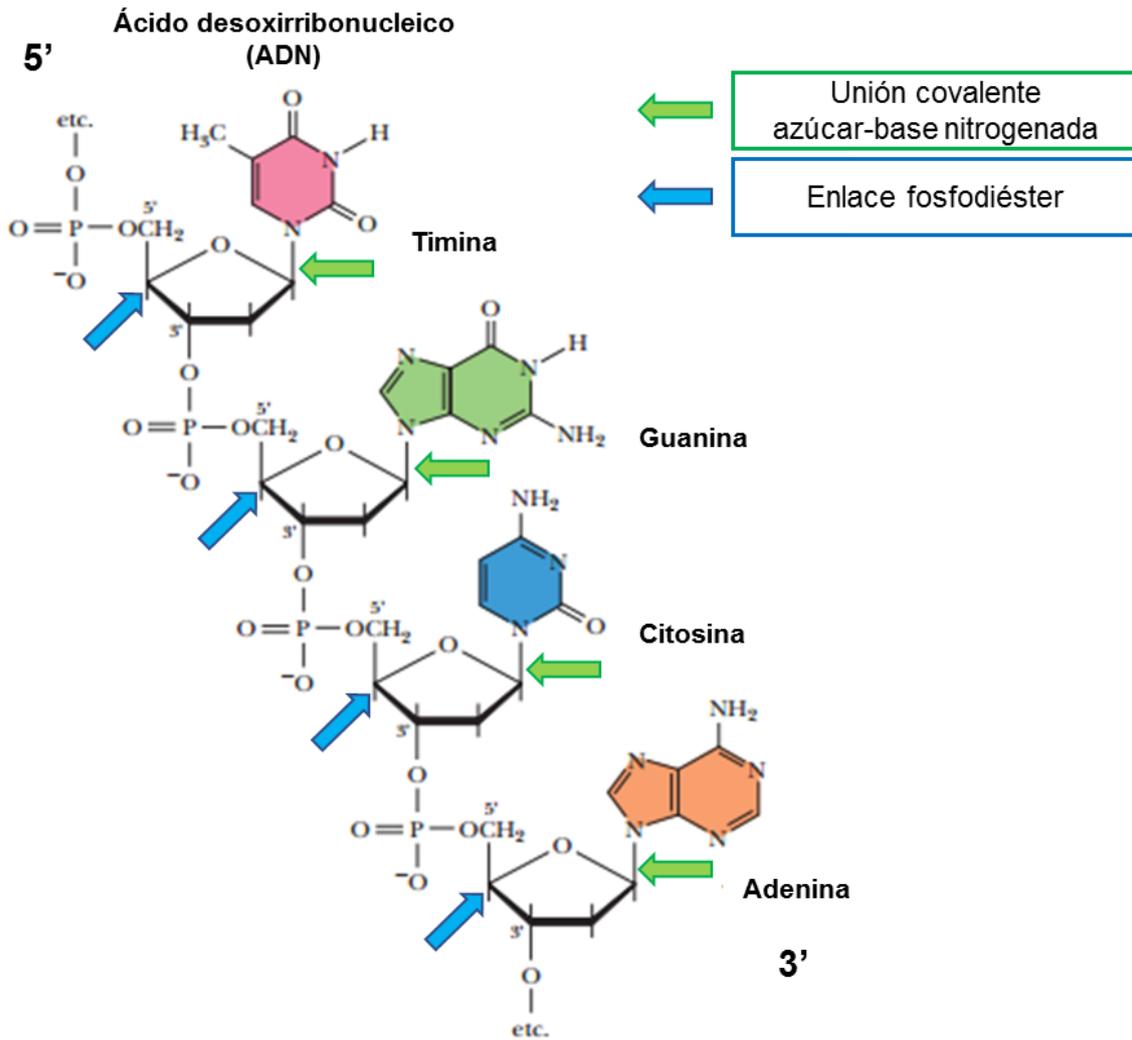


Figura 15. Enlaces fosfodiéster de los pares de bases definidos por Watson y Crick (Garret y Grisham (2010a). *Biochemistry*. [Figura]).

El ADN es una molécula fuertemente nucleófila y rica en electrones lo que le hace ser objeto de ataques en los oxígenos y nitrógenos de las bases nitrogenadas, así como los oxígenos de los grupos fosfato del esqueleto de ADN por agentes con alto déficit electrónico (electrófilos) (**Figura 16**).

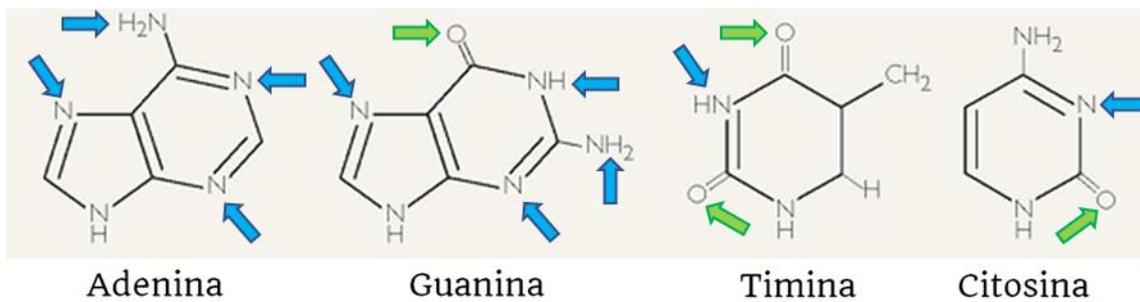


Figura 16. Ataques en oxígenos y nitrógenos de las bases nitrogenadas por agentes electrófilos.

Por otra parte, cabe destacar que en la célula eucariota nos encontramos con 2 tipos de ADN. En primer lugar, el ADN nuclear (ADNn) que es lineal y es donde está contenido la mayor parte del genoma eucariota, organizado en cromosomas y se encuentra altamente condensado. Cada cromosoma está compuesto por una única molécula de ADN empaquetada, portadora de muchos genes. Hay alrededor de seis mil millones de pares de bases por célula humana diploide, divididos en 46 cromosomas en el núcleo. El ADNn se asocia con histonas y otras proteínas estructurales, y se enrolla de forma compacta y densa como se mencionó anteriormente (Griffiths y cols., 2002).

En segundo lugar, encontraríamos el ADN mitocondrial (ADNmt), que se encuentra dentro de las mitocondrias citoplasmáticas como un pequeño genoma circular cerrado de 16.569 pares de bases (Smith y cols., 1981) que codifica 13 proteínas, 2 ARN ribosomal (ARNr), y 22 ARNt y es de herencia materna (Brown, 1985; Giles y cols., 1980). Cada mitocondria puede contener más de una copia de ADNmt (Bogenhagen y Clayton, 1974) y dependiendo del tipo de células huésped de mamíferos, encontramos entre 80-680 mitocondrias y entre 200-1700 copias del genoma de ADNmt (Robin y Wong, 1988).

En ambos tipos de ADN nos podemos encontrar con marcadores que permiten su amplio uso para fines de identificación humana de restos biológicos después de diversos tipos de eventos trágicos tales como crímenes, desastres masivos y ataques terroristas. Su uso está condicionado a la antigüedad de la muestra biológica y a su estado de degradación (Lindahl, 1996), necesitando técnicas especiales que puedan analizar ADN crítico y altamente degradado.

1.3.2. Biosíntesis de nucleótidos

Hay dos tipos de rutas metabólicas que conducen a la formación de los nucleótidos: las rutas de *novo* y las rutas de recuperación. La síntesis de *novo* de los nucleótidos empieza a partir de precursores metabólicos: aminoácidos, ribosa 5-fosfato, CO₂ y NH₃. Las rutas de recuperación reciclan las bases libres y los nucleósidos liberados de la degradación de los ácidos nucleicos (Nelson y Cox, 2006c).

La estructura del anillo de purina se construye añadiendo uno o unos pocos átomos a la vez a la ribosa a lo largo de todo el proceso. El anillo de pirimidina en cambio

se sintetiza como orotato unido a ribosa fosfato y a continuación se convierte en los nucleótidos de pirimidina comunes que se utilizan en la síntesis de los ácidos nucleicos. Aunque las bases libres no son intermediarias en las rutas de síntesis de *novo*, pueden serlo en algunas rutas de recuperación (Nelson y Cox, 2006c).

1.3.2.1. Síntesis de *novo* de purinas y pirimidinas

Purinas y pirimidinas comparten un precursor importante en las vías de síntesis de *novo*, el fosforribosil pirofosfato (PRPP). Además, en cada vía un aminoácido es un precursor esencial: la glicina para las purinas y el aspartato para las pirimidinas. Las fuentes de grupos amino son la glutamina (Gln/Q) como aminoácido principal y también el aspártico (Asp/D) en el caso de las purinas (Nelson y Cox, 2006c).

Los nucleótidos adenosín monofosfato (AMP) y guanosín monofosfato (GMP) tienen un precursor común, inosina monofosfato (IMP). Estos importantes nucleótidos de purina se forman a través de las vías metabólicas de dos pasos distintos que divergen de IMP (**Figura 17**) (Garrett y Grisham, 2010b). Otros derivados de purina presentes en la naturaleza incluyen hipoxantina, xantina y ácido úrico. Hipoxantina y xantina se encuentran sólo en raras ocasiones como constituyentes de los ácidos nucleicos. El ácido úrico, el estado más oxidado para un derivado de purina, nunca se encuentra en los ácidos nucleicos.

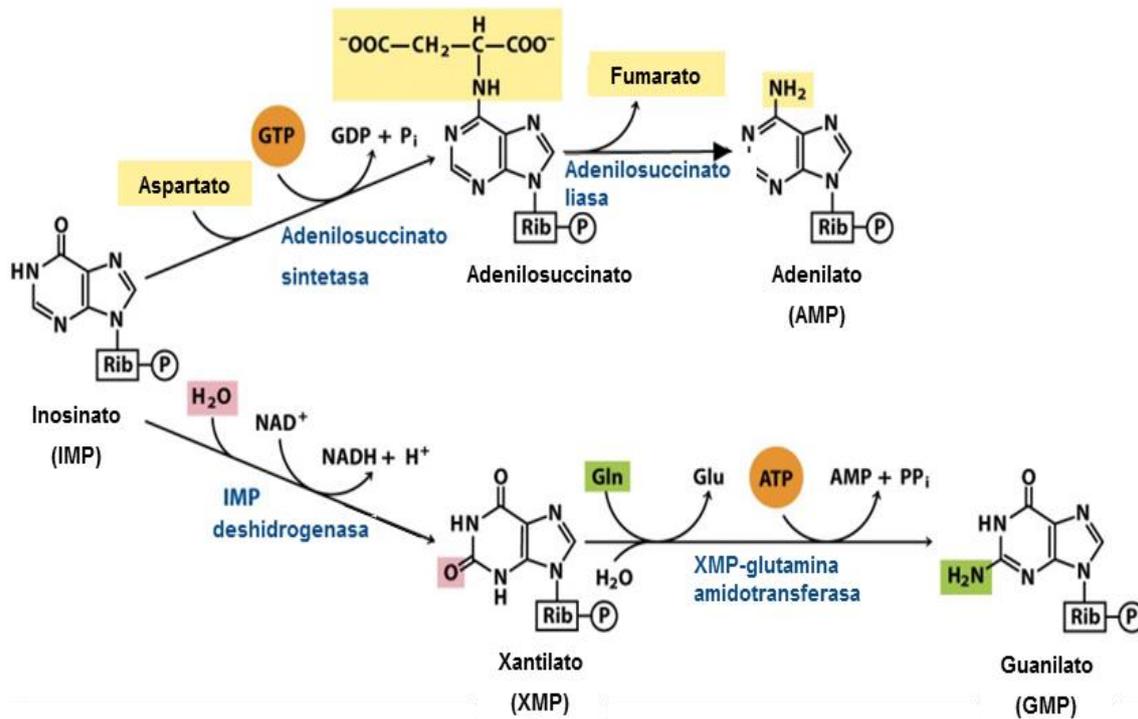


Figura 17. Biosíntesis de AMP y GMP a partir de IMP (Nelson y Cox (2006c). *Lehninger. Principios de Bioquímica*. [Figura]).

En contraste con las purinas, las pirimidinas no son sintetizadas como derivados de nucleótidos. En lugar de ello, el sistema de anillo de pirimidina se ha completado antes de que se adjunte un resto ribosa-5-P. Además, como se muestra en la **Figura 18** sólo encontramos dos precursores, carbamoíl-fosfato y ácido aspártico (Asp/D), que contribuyen a los átomos del anillo de pirimidina de seis miembros, en comparación con los siete precursores para los 9 átomos de purina (Garrett y Grisham, 2010b).

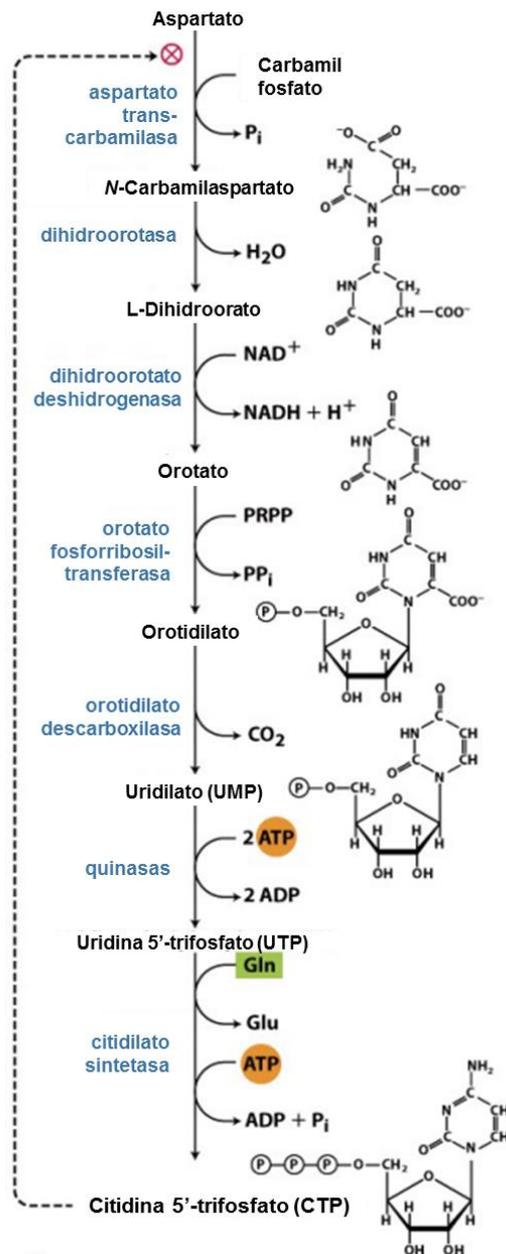


Figura 18. Biosíntesis de novo de los nucleótidos de pirimidina: síntesis de uridina 5'-trifosfato (UTP) y citidina 5'-trifosfato (CTP) por la vía del orotidilato (Nelson y Cox (2006c). *Lehninger. Principios de Bioquímica.* [Figura]).

1.3.2.2. Rutas de recuperación de purinas y pirimidinas

Los procesos de degradación pueden conducir a la liberación de las purinas libres en la forma de adenina, guanina, e hipoxantina (la base en IMP). Estas sustancias representan una inversión metabólica por las células. Las llamadas rutas de rescate existen para recuperarlos en forma útil e implican resíntesis de nucleótidos de las bases a través de fosforribosil transferasas (Garrett y Grisham, 2010b).



Las purinas fosforribosil transferasas son la adenina fosforribosil transferasa (APRT), que media la formación de AMP, y hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT), que puede actuar en cualquiera las dos vías, la de hipoxantina para formar IMP o guanina para formar GMP (Garrett y Grisham, 2010b) (**Figura 19**).

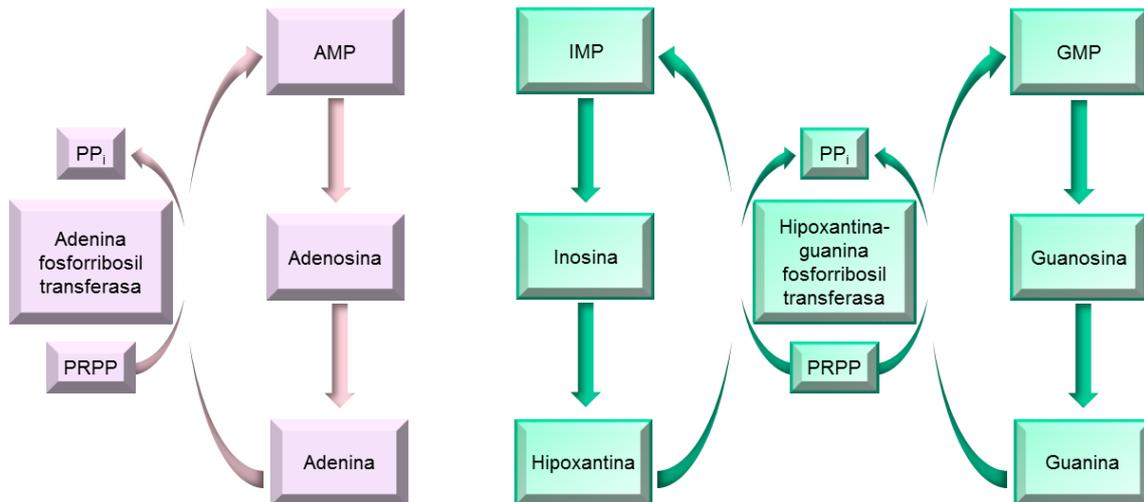


Figura 19. Rutas de recuperación de bases púricas y pirimidínicas. AMP: adenosín monofosfato; GMP: guanósín monofosfato; IMP: inosina monofosfato; PP_i: pirofosfato inorgánico; PRPP: fosforribosil pirofosfato.

1.3.3. Degradación de purinas y pirimidinas

Debido a que los ácidos nucleicos forman parte de los organismos vivos, cabe destacar que cantidades significativas son ingeridas en la dieta. Los ácidos nucleicos procedentes del reino animal y vegetal que forman parte de nuestra dieta se degradan en el tracto digestivo a nucleótidos por diferentes nucleasas y fosfodiesterasas (Garrett y Grisham, 2010b).

Los diversos nucleótidos son primero convertidos a nucleósidos por nucleotidasas intracelulares, y a continuación son degradados a nucleósidos por la enzima purina nucleósido fosforilasa (PNP) para liberar la base de purina y ribosa-1-P (Garrett y Grisham, 2010b).

En primer lugar, los nucleósidos AMP e IMP se convierten primero en inosina por la adenosina desaminasa y por una nucleotidasa respectivamente, para, a continuación,

por acción de PNP pasar a ser hipoxantina. Por otro lado, el nucleósido GMP se convierte en guanina por la acción de la PNP. Tras esto, los productos obtenidos, hipoxantina y guanina sufren una oxidación y una desaminación por parte de la xantina oxidasa y de la guanina desaminasa respectivamente. En última instancia, la xantina se oxida a ácido úrico por la xantina oxidasa (XO), la cual está presente en grandes cantidades en algunos tejidos y órganos y utiliza el oxígeno molecular para oxidar una amplia variedad de purinas, pteridinas, y aldehídos, produciendo H_2O_2 como un producto (Garrett y Grisham, 2010b) (**Figura 20**).

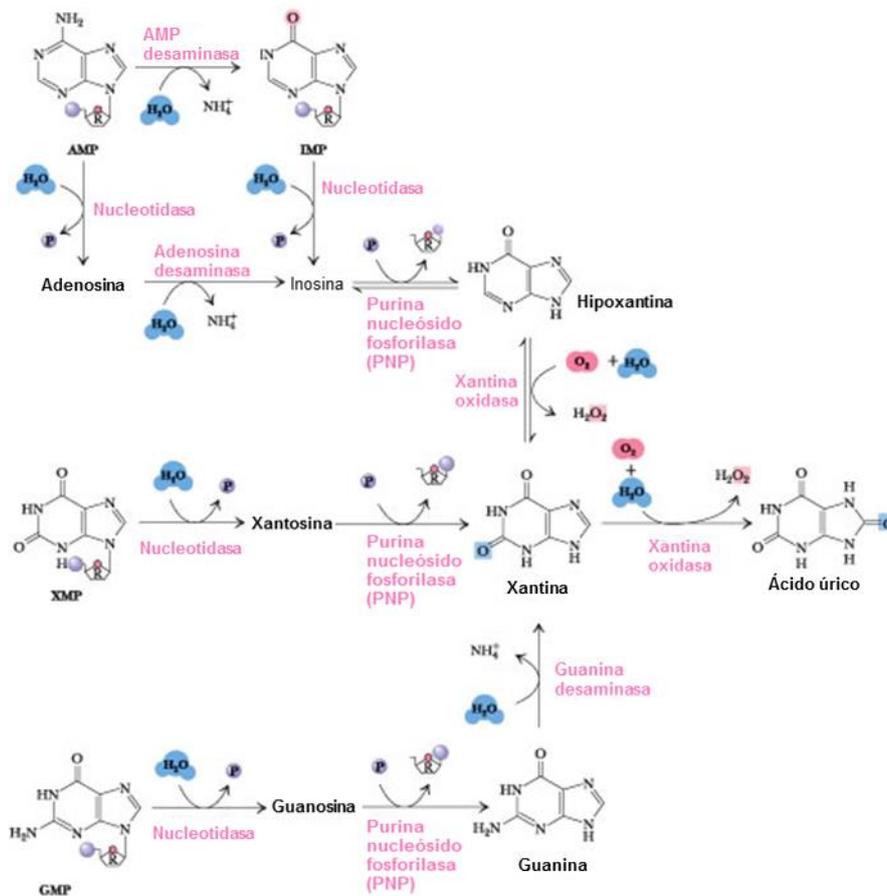


Figura 20. Las principales vías para el catabolismo de las purinas (Garret y Grisham (2010b). *Biochemistry*. [Figura]).

Al igual que las purinas, las pirimidinas libres pueden ser recuperadas y recicladas para formar nucleótidos a través de reacciones mediante la fosforribosil transferasa similares a los discutidos anteriormente. Resultados del catabolismo de las pirimidinas, por la degradación del anillo de pirimidina, da como resultado intermedio β -alanina y finalmente da lugar a productos que recuerdan a los sustratos originales, aspartato, CO_2 y NH_3 . La β -alanina puede ser reciclada en la síntesis de la coenzima A.

En el caso del catabolismo de la base de pirimidina, timina (5-metiluracilo) produce ácido β -amino-isobutírico en lugar de β -alanina (Garrett y Grisham, 2010b) (**Figura 21**).

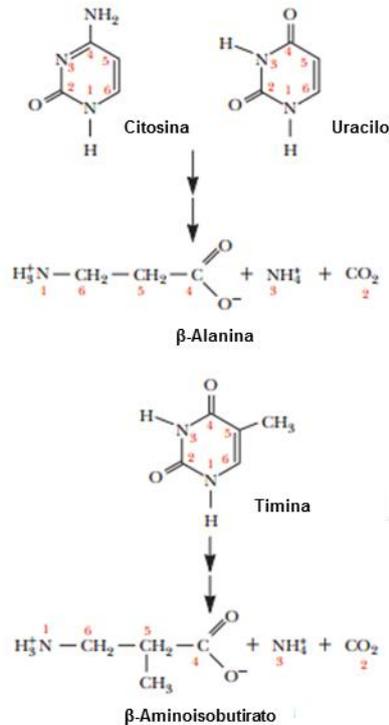


Figura 21. Degradación de pirimidinas (Garret y Grisham (2010b). *Biochemistry*. [Figura]).

1.3.4. Diagénesis

Durante el enterramiento, el hueso se puede sufrir una disolución parcial o total, así como procesos de erosión, precipitación, recristalización, absorción de iones por adsorción y difusión, e incluso hidrólisis que pueden dar lugar a cambios en su composición química y en su estructura (Castaños y cols., 2010).

Durante la diagénesis, cabe destacar cómo las proteínas principales del hueso como son las moléculas de colágeno son eliminadas, lo que da lugar a un cambio en la organización (Miles y cols., 2000) y en última instancia a la gelatinización y la pérdida de colágeno (Collins y cols., 1995), siendo reemplazadas por sustancias inorgánicas (**Figura 22**). Además, la hidroxiapatita está formada por cristales de pequeño tamaño que le hacen ser muy reactivo durante los procesos de diagénesis (Trueman y Tuross, 2002; Trueman, 1999).

Además del deterioro químico del colágeno (fase orgánica) también encontramos otras vías de diagénesis, como son el deterioro de la fase mineral (Castaños y cols., 2010), lo cual implica la exposición del colágeno por lo que se acelera la degradación química y biológica y por último el ataque microbiológico (Collins y cols., 2002), que puede ocurrir rápidamente después de la muerte (Bell y cols., 1996; Yoshino y cols., 1991).

Aunque se ha demostrado que los lípidos e hidratos de carbono pueden permanecer en el hueso antiguo durante millones de años (Evershed y cols., 1995; Logan y cols., 1995) tras los procesos de destrucción ósea anteriormente citados, estas dos clases de biomoléculas podría decirse que poseen poca información sobre el organismo (Schweitzer, 2004), ya que toda la información genética necesaria de un organismo está contenida en las moléculas de ADN, pero la molécula de ADN es más lábil que la mayoría de otras clases de biomoléculas y las que no sobreviven en huesos antiguos ya que a menudo son degradadas o alteradas químicamente (Pääbo y cols., 1989).

Al igual que el ADN, las proteínas contienen información genética fundamental que también es útil para la reconstrucción filogenética y la identificación de especies, existen en cantidades grandes y tienen mucho potencial para la conservación (Robbins y cols., 1993; Logan y cols., 1991; Curry, 1988).

A partir de lo anterior, los mecanismos de deterioro de los huesos pueden ser descritos por tres vías fundamentales, cada uno produciendo una alteración macroscópica y microscópica de la integridad de los huesos, lo cual influye en el deterioro de las biomoléculas debido a la íntima relación que presentan con el hueso. Sin embargo, el deterioro biomolecular todavía sigue siendo un aspecto inexplorado de la diagénesis hueso (Collins y cols., 2002).

Del mismo modo que el colágeno, se cree que la degradación del ADN se produce a través de la reducción en la longitud de la cadena y a la fragmentación en puntos específicos de la molécula (**Figura 22**). A pesar de que la hidrólisis parece ser el paso determinante de la velocidad en ambos casos, la química es ligeramente diferente (Collins y cols., 2002).

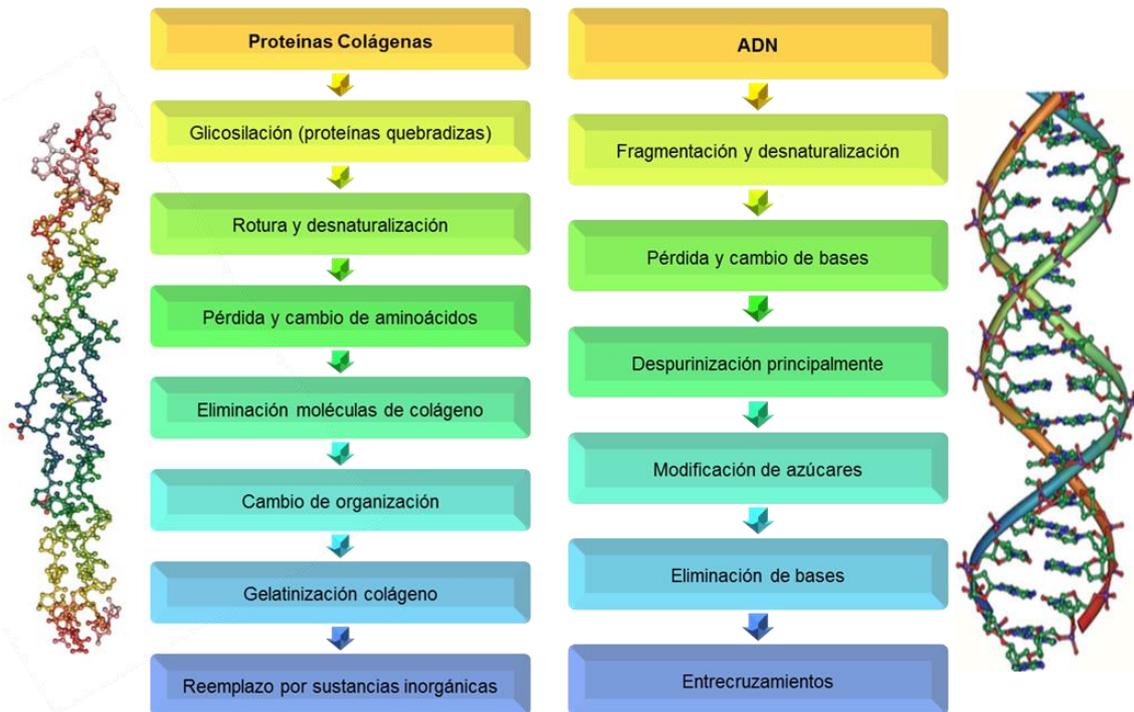


Figura 22. Diagénesis de proteínas colágenas (izquierda) y ADN (derecha) en el periodo postmortem.

1.3.5. Degradación del ADN nuclear

La cinética de degradación postmortem del ADN a largo plazo aún es poco conocida, debido a la falta de datos empíricos sobre los que estimar la tasa de fragmentación del ADN *in situ*. Pero actualmente es un campo, que a pesar de estar sometido a muchas variables tales como la preservación, la naturaleza y la tasa de descomposición del ADN, es necesario su estudio tanto para fines predictivos como de autenticación (Allentoft y cols., 2012).

El ADN nuclear y mitocondrial tiene una estabilidad química limitada y es susceptible al ataque físico-químico y a la acción de microorganismos (Lindahl, 1993). En los organismos vivos los diferentes mecanismos de reparación enzimática protegen nuestro material genético, pero tras la muerte celular, las nucleasas empiezan a escindir el ADN en fragmentos (Darzynkiewicz y cols., 1997) y durante la descomposición, el ADN es degradado por los microorganismos (Lindahl, 1993; Eglinton y cols., 1991).

Los procesos de reparación enzimáticos mantienen la integridad de las moléculas de ADN dentro de las células vivas, y después de la muerte de un organismo

los compartimentos celulares secuestran enzimas catabólicas, de descomposición (Lindahl, 1993).

Estudios de diferentes autores señalan que el material genético se degrada más rápidamente en tejidos blandos que en huesos, debido a la estructura más resistente del último que actúa como barrera física frente a las influencias tafonómicas (Barrio-Caballero, 2013). La densidad del hueso también es un factor importante que influye en su preservación (Galloway y cols., 1996). De este modo, el ADN está normalmente menos degradado en las porciones más densas del esqueleto, como el fémur y la tibia (Barrio-Caballero, 2013) y dientes adultos (excepto en el diente decidual). Algunas publicaciones sugieren que el ADN está mejor preservado en clavículas que en costillas (Sirotkin y cols., 1988), en huesos largos más densos que en elementos menos densos (Miloš y cols., 2007; Edson y cols., 2004) y en hueso compacto que en hueso esponjoso o trabecular (Parsons y Weedn, 1996).

En general, la cantidad y la integridad del ADN tanto nuclear como mitocondrial recuperado es un factor importante limitante en la investigación forense y arqueológica (Krings y cols., 1997; Handt y cols., 1996). Debido a la falta de mecanismos de reparación del ADN tras la muerte, éste se degrada rápidamente en fragmentos cortos a través de la hidrólisis enzimática, la modificación de nucleótidos, daño oxidativo, la acción celular de nucleasas y otras enzimas hidrolíticas generadas de la propia muerte celular, y las enzimas bacterianas (Höss y cols., 1996; Lindahl, 1993; Pääbo y cols., 1989).

En el período postmortem, el ADN se degrada rápidamente por las enzimas lisosomales tales como nucleasas, junto con las nucleasas endógenas, que son los primeros agentes para iniciar el proceso de fragmentación del ADN (Hofreiter y cols., 2001).

Por otra parte, debido a la exposición a agentes exógenos, como microorganismos, la humedad y muchos compuestos orgánicos, la cantidad de ADN informativo disponible se reduce drásticamente. La degradación espontánea por hidrólisis y oxidación modificará adicionalmente la estructura del ADN a una velocidad mucho más lenta (Hofreiter y cols., 2001; Lindahl, 1993) y evadirá la degradación enzimática y microbiana en raras circunstancias, tal como cuando un tejido se deseca rápidamente después de la muerte o las moléculas se incorporan a biominerales

(Eglinton y cols., 1991) como la matriz ósea extracelular (Götherström y cols., 2002). En estos casos, los procesos químicos comienzan a afectar al ADN más lentamente.

Los daños se acumulan progresivamente hasta que el ADN pierde su integridad y se fragmenta, con una pérdida irreversible de la información de secuencia de nucleótidos (Pääbo y cols., 2004).

1.3.5.1. La muerte celular y los procesos de degradación de ADN nuclear

La muerte celular completa se asocia con la activación de diferentes clases de enzimas intracelulares que incluyen lipasas, nucleasas, y diferentes clases de proteasas. Los lisosomas son vacuolas ácidas ubicuas en el interior celular que contienen varias enzimas hidrolíticas.

La mayoría son activas en pH ácido y son capaz de romper biomoléculas (de Duve y Wattiaux, 1966). La eliminación de las proteínas histonas (las mayores proteínas implicadas en la estructura de la cromatina) por proteasas lisosomales facilitarían el proceso de escisión de ADN por endonucleasas. Los fragmentos de ADN postmortem están sujetos a la degradación por nucleasas endógenas liberadas por las células huésped o nucleasas exógenas liberadas por microorganismos ambientales y del suelo, de los cuales, alrededor de un 70% presentan nucleasas que permiten la degradación de biomoléculas (Antheunisse, 1972, 1971) e invertebrados ambientales (Hofreiter y cols., 2001; Lindahl, 1993).

La vía de la apoptosis o muerte celular programada depende principalmente de la activación de un grupo de enzimas proteasas llamado como caspasas (Yuyama y cols., 2003; Donovan y Cotter, 2002). Las caspasas, granzima A y serin proteasas desencadenan las diferentes vías intracelulares que conducen a la activación de nucleasas (Counis y Torriglia, 2006).

El aumento del Ca^{2+} libre citosólico resulta en la activación de las fosfolipasas de membrana, que degradan los fosfolípidos de membrana y causan una alteración generalizada de éstas (Chien y cols., 1978) y por lo tanto la liberación de enzimas.

1.3.5.1.1. Degradación enzimática de ADN

En primer lugar, tiene lugar la autólisis, autodigestión no bacteriana realizada por las propias enzimas lisosomales del organismo (Pääbo y cols., 1989; Bär y cols., 1988). Posteriormente se producirá una invasión de los restos por bacterias, hongos e insectos, donde se producirá la putrefacción bacteriana anaeróbica que es una descomposición de proteínas a menudo acompañada por la producción de gas (Bär y cols., 1988).

Algunas enzimas como las hidrolasas aumentan su actividad debido a la pérdida de regulación de los sistemas enzimáticos y a la acidosis. Dentro de este grupo de enzimas encontramos a las nucleasas que degradan el ADN de las células muertas, que existen en dos formas: como endonucleasas y exonucleasas. Las endonucleasas descomponen el ADN por cizallamiento en fragmentos más pequeños, mientras que las exonucleasas separan un nucleótido tras otro de los extremos terminales, por lo que poco a poco va acortando los fragmentos (Bär y cols., 1988) (**Figura 23**).

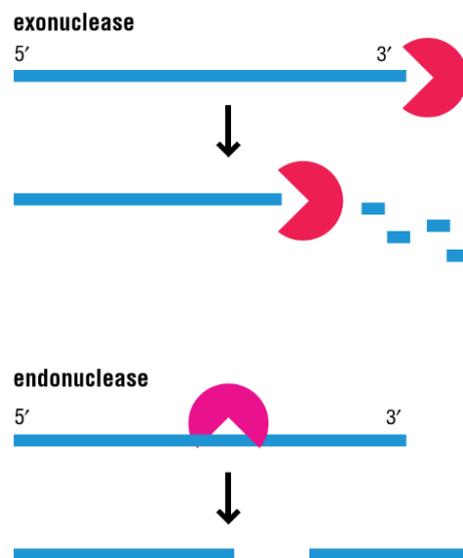


Figura 23. Acción de exonucleasas y endonucleasas. Las exonucleasas digieren secuencialmente en dirección 3'→5' y viceversa, mientras que las endonucleasas escinden en sitios internos (Craig y cols. (2014). *Molecular biology: principles of genome function*. [Figura]).

Las nucleasas endógenas, por tanto, se encuentran de entre los primeros agentes para iniciar el proceso de fragmentación del ADN tras la muerte (Hofreiter y cols., 2001). Sobre la base de las periodicidades de plegamiento del ADN en la estructura de la cromatina (Filipski y cols., 1990), siempre que la estructura de la histona

nucleosomal unida permanece intacta, el ADN puede someterse a una serie de sucesivas etapas de fragmentación.

Por un lado, los fragmentos de alto peso molecular, en torno a 300-500 kilobases (kb) pueden resultar de la escisión endonucleolítica de cromosomas en interfase en los sitios nucleasa-sensible que residen en fibras de cromatina como resultado del plegado de las estructuras en bucle y roseta (tamaño de 50 kb) (tamaño medio de 300 kb), respectivamente (Filipski y cols., 1990).

Por otro, la degradación del ADN en fragmentos de tamaño pequeño-medio, generalmente entre 100 y 200 pb, es el tipo más común de daño en el ADN de restos óseos antiguos (Dixon y cols., 2006). La reducción de tamaño se debe tanto a procesos enzimáticos que se producen poco después de la muerte como a la escisión hidrolítica no enzimática de enlaces fosfodiéster en el esqueleto de fosfato-azúcar (Pääbo y cols., 2004) que generan fragmentos de cadena sencilla.

En última instancia, el patrón de escalera de fragmentos oligonucleótidos perceptibles mediante electroforesis convencional, se produce como un sello de apoptosis (Martelli y cols., 1997; Brown y cols., 1993).

La digestión de las proteínas de la cromatina por proteasas lisosomales, a su vez, facilita el proceso de la digestión aleatoria de ADN por endonucleasas. Hay varios factores que afectan la velocidad de la fragmentación (y por tanto la capacidad de detección del ADN residual) incluyendo el nivel de expresión de las enzimas, la disponibilidad de cationes y una solución para las reacciones, la temperatura y los niveles de pH (Anzai y cols., 1995).

En condiciones favorables, tales como bajas temperaturas o cuando existan medidas de protección naturales dependientes de tejidos, las enzimas nucleasas pueden llegar a ser inactivas antes de romper a fondo largas hebras de ADN en fragmentos más cortos, menos informativos. Los fragmentos de alto peso molecular se producen en la presencia de ión magnesio (Mg^{2+}) como el único catión divalente (Huang y cols., 1997), mientras que los fragmentos de oligonucleótidos se producen cuando ambos, Mg^{2+} y Ca^{2+} , están presentes en el tampón de digestión (Walker y cols., 1995; Sun y Cohen, 1994). En varios tipos de células que carecen de actividad de Ca^{2+} dependiente, se lleva a cabo una fragmentación diferente del ADN a través de la acción

de otros grupos de endonucleasas (Barry y Eastman, 1993). Por otro lado, el ADN de bajo peso molecular se rompe a menudo donde contiene extremos 3'-hidroxilo (3'-OH) en dirección 3'- 5' (Gavrieli y cols., 1992).

1.3.5.1.2. Procesos de degradación no enzimática del ADN

Las reacciones enzimáticas son seguidas por los procesos de degradación de ADN no enzimáticos o espontáneos, mucho más lentos pero persistentes en el tiempo (Pääbo y cols., 2004). Los enlaces fosfodiéster del ADN son altamente resistentes a la hidrólisis no enzimática (Serpensu y cols., 1987).

La **Tabla 1** muestra información general acerca de los diferentes tipos de daños que puede sufrir el ADN.

Tabla 1. Información general sobre los diferentes tipos de daño en el ADN (Pääbo y cols., 2004).

Tipo de daño	Causas	Efecto en el ADN
Roturas de cadena unicatenario bicatenario	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad nucleasa • Degradación por microorganismos 	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción del número total de copias de plantilla • Reducción de tamaño por fragmentación
Lesiones oxidativas	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo bacteriano • Radiación 	<ul style="list-style-type: none"> • Fragmentación de azúcar o base • Modificación de nucleótidos
Entrecruzamiento ADN (Crosslink)	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida hidrolítica de base • Residuos de azúcar reducidos 	<ul style="list-style-type: none"> • Uniones de ADN-ADN o ADN con otras biomoléculas
Lesiones hidrolíticas	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida hidrolítica del grupo amino (desaminación) 	<ul style="list-style-type: none"> • Cambio de potencial de codificación • Despurinización y/o despirimidinación (sitios AP)

En la **Figura 24** se ilustra los sitios más comunes donde se producen los procesos de degradación no enzimática principales, la oxidación, y los ataques hidrolíticos y enzimáticos en fragmentos de ADN.

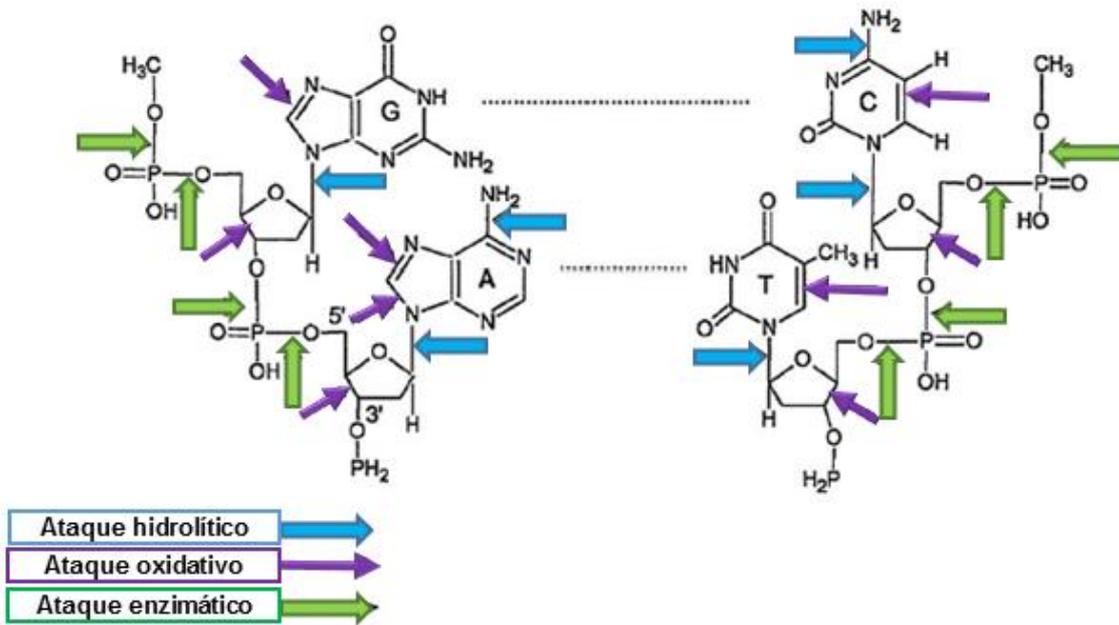


Figura 24. Oxidación y ataques hidrolíticos y enzimáticos asociados a la degradación del ADN (Alaeddini y cols. (2010). *Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review.* [Figura]).

A) Reacciones hidrolíticas

Supone la fragmentación del ADN por rotura directa de los enlaces fosfodiéster que unen los azúcares o de los enlaces N-glucosídicos entre las bases de N y el esqueleto de azúcar es el vínculo más susceptible a la escisión dentro de la cadena de polinucleótidos, produciendo en este último caso una despurinización o despirimidinación de bases, en el caso de la rotura de una base púrica o pirimidínica respectivamente (Valverde-Garnica, 2006), generando sitios apurínicos y apirimidínicos (sitios AP) (**Figura 25**), lo cual conduce a la desestabilización de la doble hélice (Lindahl, 1993), produciéndose la transformación de los ácidos nucleicos en una mezcla de desoxinucleótidos, y estos últimos tras otra degradación hidrolítica pasaran a una mezcla de los tres componentes característicos de los nucleótidos: ácido ortofosfórico, una pentosa y una base nitrogenada (Lozano-Teruel y cols., 2005).

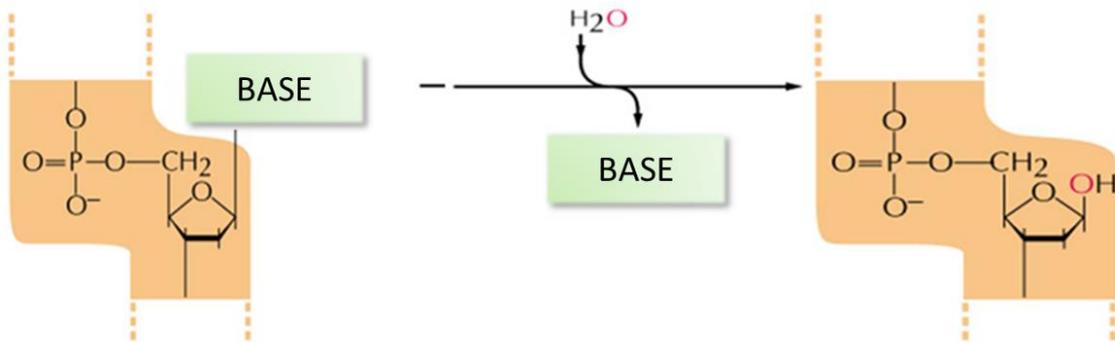


Figura 25. Sitios apurínicos producidos por hidrólisis en el ADN (Alberts y cols. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. [Figura]).

In vivo, una vez que se libera un nucleótido, el sitio abásico puede sufrir un reordenamiento químico que puede conducir a la escisión de cadena, si no es reparado inmediatamente (Lindahl, 1993) por la maquinaria SOS (mecanismo de reparación del ADN) o la polimerasa.

En una hidrólisis alcalina, la reacción de despurinación es seguida por una reacción de eliminación principalmente β que rompe rápidamente la cadena de ADN en 3'- fosfodiéster vínculo del azúcar apurínico. En un medio con concentraciones iónicas similares a la composición intracelular (37°C y pH 7.21), el sitio apurínico tiene una media vida estimada entre 288 y 335 horas (Crine y Verly, 1976).

Se ha observado un aumento en la tasa de fragmentación del ADN cuando se encuentran presentes aminas primarias (tales como glicina (Gly/G), lisina (Lys/K), histidina (His/H) y arginina (Arg/R)) (Tamm y cols., 1953), iones Mg^{2+} , proteínas básicas (McDonald y Kaufmann, 1954) o aldehídos reactivos (Lindahl y Andersson, 1972). Por ejemplo, la putrescina poliamina (un producto de metabolismo bacteriano) a una concentración de 0.01 concentración molar (M) produce un aumento de 25 veces en la tasa de rotura de la cadena en los sitios apurínicos (Lindahl y Andersson, 1972).

Además, la tasa de despurinización disminuye con el aumento de pH y aumenta en disolventes de baja fuerza iónica. Por encima de $pH \geq 6.0$, la dependencia del pH de la reacción disminuye y la despurinación procede principalmente por una reacción que es independiente de pH (Lindahl y Nyberg, 1972).

La velocidad de reacción es también dependiente de la temperatura por lo que puede proceder a un ritmo menor en condiciones de temperaturas fisiológicas aproximadas. Las pirimidinas respecto a los ataques, son más estables, siendo liberadas un 5% menos respecto a la tasa de las purinas (Lindahl, 1993).

Además de estas modificaciones, las bases de ADN con grupos amino secundarios tales como adenina, citosina (**Figura 26**), 5-metilcitosina y la guanina se someten a la pérdida hidrolítica de sus grupos amino (desaminación hidrolítica), resultando en la generación de hipoxantina, uracilo, timina, y xantina, respectivamente. Los residuos de citosina son particularmente propensos a la desaminación y la formación de uracilo; sin embargo, la reacción es lenta a 37°C con cada media vida citosina de alrededor de 30.000 años (Lindahl, 1993).

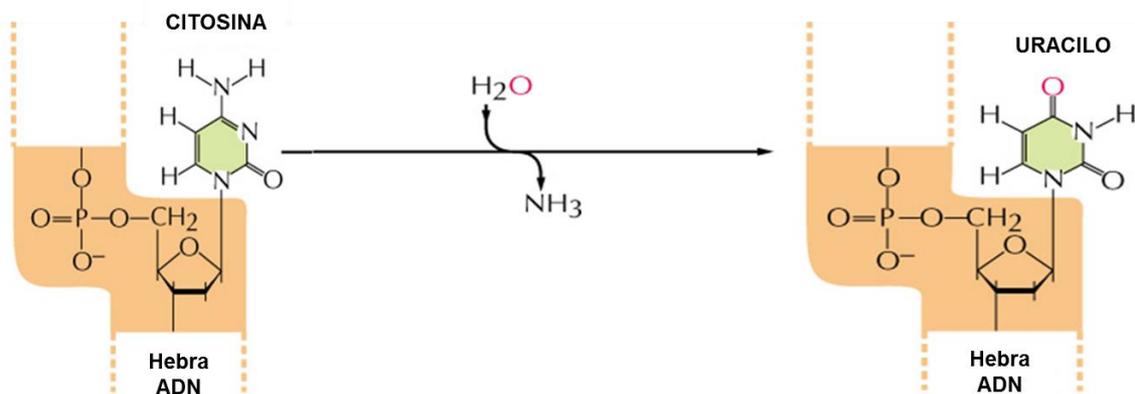


Figura 26. Ejemplo de desaminación hidrolítica de la citosina con generación de uracilo (Alberts y cols. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. [Figura]).

B) Reacciones oxidativas

Especies de oxígeno derivadas tales como el radical libre superóxido ($-O_2$), y H_2O_2 se generan a través de la radiación o las actividades metabólicas del propio organismo y de los microorganismos aerobios que colonizan el tejido postmortem ionizante. La radiación ionizante también puede producir radicales hidroxilo reactivos ($-OH$) en células y tejidos mediante la interacción con agua celular (**Figura 27**).

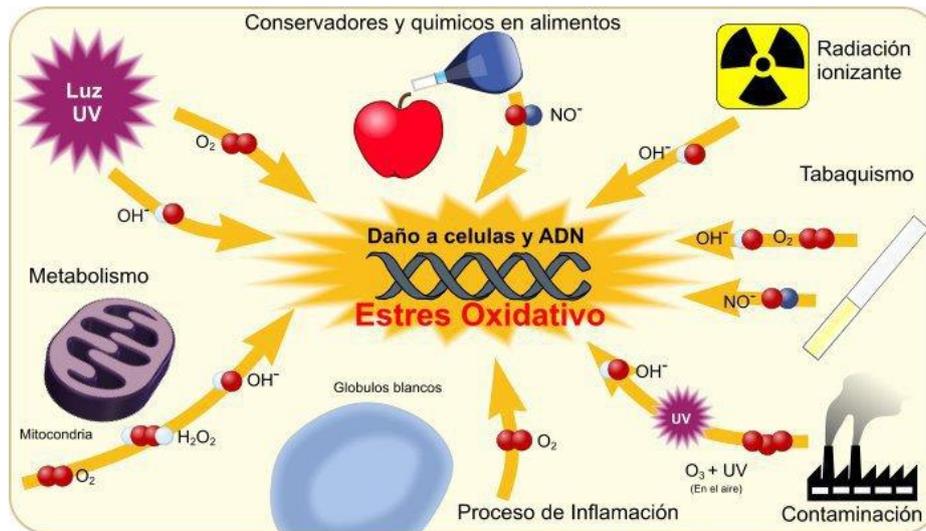


Figura 27. Causas de daño celular y genómico por estrés oxidativo.

Las pirimidinas (en particular la timina) son más sensibles al daño oxidativo que las purinas (Teoule y Cadet, 1978). El daño oxidativo incluye principalmente modificaciones de residuos de azúcar, la conversión de citosina y timina a hidantoínas, la eliminación de las bases y entrecruzamientos (puentes intermoleculares) (Höss y cols., 1996).

C) Entrecruzamientos de ADN

Los sitios abásicos (posiciones sin base) se producen cuando los agentes exógenos o endógenos reaccionan con dos posiciones diferentes en el ADN. Esto puede ocurrir ya sea en la misma cadena (entrecruzamiento intracatenario), en las cadenas opuestas del ADN (entrecruzamiento intercatenario) así como entre el ADN y las proteínas (Butler, 2005; Sancar y cols., 2004).

Las cadenas de ADN también reaccionan a través de sus bases con azúcares reductores en una reacción de glicosilación no enzimática (Dutta y cols., 2005) seguido por la generación de sitios abásicos (Seidel y Pischetsrieder, 1998; Höss y cols., 1996) y de la producción de los productos de Maillard que se forman por reacciones de condensación entre los azúcares y los grupos amino primarios en proteínas y ácidos nucleicos. El tratamiento con un reactivo, bromuro de N-fenaciltiazol (PTB), que rompe productos de Maillard, permite amplificar secuencias de ADN a partir de algunos restos antiguos que de otra manera no son susceptibles de amplificación (Pääbo y cols., 2004).

D) Radiaciones

La radiación puede producir una variedad de lesiones, incluyendo daños oxidativos, roturas intra- o intercatenarias, modificaciones de bases, destrucción de azúcares, lo que puede producir entrecruzamientos intra- e intercatenarios y formación de dímeros entre bases continuas (Hall y Ballantyne, 2004).

1.3.6. Factores que influyen en la degradación del ADN

La velocidad y el grado de descomposición del material genético de un resto van a depender de diversos factores endógenos y exógenos. El éxito en la obtención de información genética a partir de estructuras óseas está condicionado, por el tipo de estructura y por las condiciones del enterramiento. Las características del ambiente en el que se encuentra depositado un resto pueden ralentizar o incluso detener el proceso de degradación. Así, las condiciones que más afectarán a la degradación del ADN serán la temperatura, la humedad, el pH o la presencia de ciertos compuestos en el suelo:

- a) La **temperatura** es el factor que más condiciona la preservación del material genético. Las temperaturas bajas durante el período de deposición de un resto favorecen su conservación óptima (Burger y cols., 1999; Lindahl, 1993) debido a que, a bajas temperaturas, se produce una ralentización de las reacciones químicas responsables de la degradación orgánica (Höss y cols., 1996). En el lado opuesto, la presencia de elevadas temperaturas puede favorecer la deshidratación parcial del ADN, deteniendo los procesos de hidrólisis (Lindahl, 1993).
- b) La **humedad** ejerce un efecto adverso sobre la preservación del material genético. Debido a la porosidad propia del hueso y a la acción disolvente de la humedad, se favorece la penetración de las sustancias orgánicas del sedimento en el interior del resto. Esto incrementa la posibilidad de que el extracto de ADN presente moléculas inhibitoras, además de favorecer la degradación hidrolítica y oxidativa (Burger y cols., 1999).
- c) Un **pH** neutro o ligeramente alcalino en el enterramiento favorece la preservación del ADN (Lindahl, 1993).

d) Los **compuestos del suelo**. Se ha apuntado la posibilidad de que ciertos compuestos minerales del suelo, como la montmorillonita, la caolinita, el feldespató o el cuarzo, podrían asociarse al ADN protegiéndolo frente a la acción endonucleásica (Álvarez y cols., 1998; Romanowski y cols., 1991; Lorenz y Wackernagel, 1987). También se ha documentado la posibilidad de que la unión del ADN con los ácidos húmicos del suelo causaría el mismo efecto protector (Crecchio y Stotzky, 1998).

1.4. Identificación de patologías previas en restos óseos

El establecimiento de la identidad de los fallecidos es una parte esencial del examen postmortem, el cual comprende muchos aspectos (Knight y Saukko, 2004b). A este respecto, el antropólogo forense, al estar familiarizado con el rango de variación normal de los huesos humanos y sus anomalías, así como la manifestación patológica del esqueleto, puede aportar información crucial (Cunha, 2006).

En la práctica forense los casos de identificación pueden corresponder fundamentalmente a tres supuestos diferentes, en primer lugar la identificación de sujetos vivos, por otro lado, la identificación de cadáveres recientes y por último, la identificación de esqueletos y restos cadavéricos, el cual plantea problemas diferentes a los casos anteriores, tanto por la limitación de datos que proporciona el examen del esqueleto o de los restos cadavéricos, así como la esencia misma del problema judicial (Villanueva-Cañadas y Castilla-Gonzalo, 2004a).

Si todos los tejidos blandos están ausentes y solo se dispone de material esquelético, la identidad depende únicamente del examen osteológico y las mediciones y el reconocimiento de cualquier anomalía patológica o anatómica en el hueso (Knight y Saukko, 2004b).

Durante la fase reconstructiva de identificación, los antropólogos forenses, además de generar un perfil biológico de la víctima, tienen que analizar los restos para identificar factores de individualización. Estos factores permiten discriminar a un individuo de otro (Cunha y Pinheiro, 2013), incluso mediante identificación por exclusión, ya que todos los métodos de identificación utilizan el proceso básico de comparación. Esta comparación implica datos antemortem conocidos *versus* datos postmortem

establecidos. La comparación exitosa de estos parámetros, dependiendo de su especificidad, conduce a la identificación. La especificidad del método utilizado depende de la frecuencia de ocurrencia en la población general del factor o característica en cuestión (Sopher, 1972).

El procedimiento para la identificación de las características anatómicas y médicas de los restos óseos comprende dos aspectos principales (Cattaneo, 2007; Knight y Saukko, 2004b; Villanueva-Cañadas y Castilla-Gonzalo, 2004b; Solla e İşcan, 2001):

- ⊕ El establecimiento de datos genéricos que permitan situar los restos óseos dentro de un grupo más o menos amplio de individuos, tales como, el sexo, la estatura, la raza y la edad. Estos pueden determinarse únicamente a partir de los restos corporales disponibles, aunque la corroboración puede obtenerse de otras pruebas.
- ⊕ Estudios comparativos, en los que los restos se comparan con los datos antemortem derivados de aquellas personas que podrían ser víctimas potenciales. En ciertos casos estos datos completan los anteriores mediante el análisis de elementos extrínsecos del cadáver como los caracteres patológicos, naturales o traumáticos, que se asienten sobre el esqueleto; la identidad radiográfica y la identidad dental.

Los estudios comparativos para la identificación implican uno o más de los siguientes medios (ICRC, 2009a; Villanueva-Cañadas y Castilla-Gonzalo, 2004b):

- ⊕ Medios visuales y otros medios habituales de identificación.
- ⊕ Comparación sistemática de datos antemortem y postmortem.
- ⊕ Radiografías dentales postmortem y antemortem.
- ⊕ Huellas postmortem y antemortem.
- ⊕ Muestras de ADN de los restos humanos con muestras de referencia.
- ⊕ Otros identificadores únicos, tales como características físicas o médicas únicas.

✦ Implantes/prótesis quirúrgicas numeradas.

La identificación visual se puede hacer comparando la información del sujeto (físico, características, ropas, artefactos, etc.) con información de personas desaparecidas o que están presuntamente fallecidas (ICRC, 2009b), pero este método es propenso a los errores y puede conducir a la identificación incorrecta, ya que incluso cuando las características físicas son iguales, existe un gran peligro de inespecificidad (Brenner y Weir, 2003), por lo que son necesarias técnicas que apoyen la identificación.

Los progresos de la investigación en el ámbito de la biomedicina han conseguido nuevos hallazgos en distintos campos, los cuales permiten su aplicación a la problemática de la identificación del individuo. La aplicación de técnicas concebidas con otros fines a la resolución de problemas de índole médico-legal es una característica de la Medicina Legal, que aprovecha las posibilidades diagnósticas de éstas para elevarlas a la categoría de pruebas judiciales (Villanueva-Cañadas y Castilla-Gonzalo, 2004b).

La investigación de enfermedades infecciosas postmortem es compleja y se lleva a cabo mediante el análisis de los esqueletos o momias, por medio de exámenes macroscópicos, estudios radiográficos, disecciones y toma de muestras de tejido, donde se llevan a cabo investigaciones histológicas y en los últimos años también por microscopía electrónica (Sandison y Tapp, 1998). Más recientemente, los métodos y las técnicas disponibles para la investigación en paleopatología del esqueleto humano han mejorado significativamente (Ortner, 2011). Estos cambios han consistido en mejorar considerablemente la imagen radiográfica habitual, así como la microtomografía computarizada (micro-TC), el desarrollo de métodos histológicos que aportan nueva información útil en el diagnóstico (Schultz, 2003), el análisis isotópico (Katzenberg, 2007; Katzenberg y Lovell, 1999) y el análisis biomolecular, tanto de las proteínas óseas como de las moléculas de proteínas unidas al hueso (Schmidt-Schultz y Schultz, 2004).

El número de patologías que se pueden analizar en restos óseos generalmente se divide en una serie de categorías amplias. Estas categorías incluyen enfermedades infecciosas, trastornos circulatorios, trastornos hematopoyéticos, trastornos metabólicos, trastornos endocrinos, anomalías congénitas del esqueleto, displasias esqueléticas, enfermedades degenerativas y traumatismos (Ortner, 2003). La prevalencia de algunos de los trastornos incluidos en las categorías mencionadas es

obviamente muy diversa, y esto tiene consecuencias para su potencial en la identificación (Cuhna, 2006).

Diferentes patologías de las mencionadas anteriormente pueden producir alteraciones en la estructura y composición de los huesos, por lo que cualquier información a este respecto puede ser importante para confirmar la presencia de tales enfermedades, ya que las lesiones no específicas pueden iniciarse en el hueso y producir posteriormente alteraciones secundarias en otros segmentos óseos (Sabbatani y Fiorino, 2008; Weston, 2008).

Por otro lado, además de las proteínas asociadas con el osteoide, otras proteínas de la descomposición de las células del cuerpo o presentes en los fluidos corporales relacionadas con traumatismos, deficiencias nutricionales, así como signos secundarios, inducidos por otras patologías (bacterias, virus, tumores, etc.) (Sabbatani y Fiorino, 2008; Weston, 2008) pueden unirse al hueso y persistir para su posterior análisis (Schmidt-Schultz y Schultz, 2004).

Varias proteínas han sido mencionadas como posibles marcadores de patologías en muestras biológicas de pacientes, incluyendo propéptido amino-terminal del procolágeno tipo 1 (P1NP), osteocalcina (OC) y telopéptidos isomerizados B C-terminales (B-CTx), todas ellas marcadores bioquímicos de la resorción ósea para el hipertiroidismo (Yavropoulou y cols., 2011), y marcadores óseos como OC y telopéptidos isomerizados C-terminales del colágeno de tipo I (CTx) para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Focà y cols., 2012), fosfatasa ácida tartrato-resistente 5b (TRAP-5b) como marcador sérico de metástasis ósea en cáncer de mama humano (Capeller y cols., 2002), P1NP y CTx para el cáncer de próstata (Smith y cols., 2011); y FMS-similar a tirosina quinasa 3 (FLT3) para la leucemia amiloide aguda (Shahab y cols., 2012), entre otros.

Además, se han realizado estudios de las proteínas de agentes infecciosos, como *Moraxella catarrhalis* y *Giardia intestinalis* ATCC 50581 en las heces de los niños (Sulikowska y cols., 2004; Newman y cols., 2001) o de *Photorhabdus asymbiotica* en la sangre y tejidos de pacientes afectados (Gerrard y cols., 2004).

El estudio de la enfermedad en poblaciones pasadas (paleopatología), se centra en los análisis de aparición y prevalencia de lesiones patológicas presentes en restos de esqueletos humanos excavados (Anastasiou y Mitchell, 2013).

Las investigaciones realizadas recientemente en restos óseos por Cattaneo y cols. (1999b) desvelan la presencia de marcadores postmortem de enfermedad para el virus de la hepatitis C y para el VIH a través de la detección de antígenos, mientras que los últimos estudios de Bona y cols. (2014) señalan la posibilidad de detectar marcadores tumorales. Por ejemplo, la proteína anexina A10, la proteína similar a BCL-2, la calgizarina, la proteína HSP beta-6, la proteína Rho GAP activadora 7, la transferrina y la vimentina que podrían indicar la presencia de osteosarcoma en restos óseos tumorales de hasta 2000 años.

Por tanto, la identificación de biomoléculas patógenas de ejemplares esqueléticos antiguos y momificados, de coprolitos (heces), dientes y tejidos incluidos en parafina en museos de patología proporciona nuevas perspectivas sobre la relación de coevolución entre un patógeno y su huésped humano. Actualmente, la biotecnología ofrece nuevos medios para abordar las cuestiones paleoepidemiológicas sobre la prevalencia y distribución de enfermedades infecciosas en poblaciones pasadas (Tsangaras y Greenwood, 2012; Drancourt y cols., 2005; Zink y cols., 2005).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La determinación del IPM es un factor importante en los estudios forenses de los restos humanos ya que puede contribuir de manera significativa a la atribución correcta de las circunstancias que rodearon la muerte del individuo (Schwarcz y cols., 2010), además de desempeñar un papel clave en la decisión de si los restos tienen que ser examinados por un forense o si son sólo de interés arqueológico (Kanz y cols., 2014). Por lo que es necesaria una estimación fiable y confiable, proporcionada de forma empírica (Henssge y Madea, 2004).

Debido a la gran importancia médico-legal, se han desarrollado muchos métodos para la estimación del IPM. En general, estos métodos se pueden dividir en dos clases, dependiendo de la etapa de descomposición del cadáver: período temprano, donde los tejidos blandos están todavía presentes y el período tardío cuando sólo están presentes los restos óseos (Schwarcz y cols., 2010).

Las estimaciones del IPM usadas tradicionalmente en el periodo temprano de degradación se basan en que a medida que avanza el fenómeno de la putrefacción, hay una serie de cambios en el cadáver que tienen como resultado final unas variaciones definidas en la naturaleza física y/o la apariencia del cuerpo y cambios producidos por la descomposición reconocibles (Goff, 2009). El establecimiento del IPM tardío es mucho más complicado, ya que solo se dispone de restos óseos para su determinación (Swift, 2006), debido a que existen distintas variaciones intra- e inter-sujetos tales como la edad o el sexo, así como variabilidad en sus características óseas, lo que aumenta la dificultad para establecer el IPM.

Las características especiales del hueso determinan que los procesos postmortem siguen diferente cinética a los tejidos blandos del cadáver, y es el avance de estos procesos los que pueden ser útiles para el establecimiento del IPM (Prieto-Castelló y cols., 2007).

A este respecto, varios métodos analíticos han sido desarrollados para el establecimiento del IPM basado en el análisis de huesos.

Existen numerosos estudios referentes a distintos parámetros respecto al IPM, como investigaciones sobre los cambios en la apariencia histológica (Yoshino y cols., 1991; Berg y Specht, 1958), la variación en las proteínas y aminoácidos que se encuentran en los huesos (Cattaneo y cols., 1992a, 1992b; Knight, 1975; Berg, 1963;

Bayle y de Noyer, 1939), la medición de nitrógeno o contenido de aminoácidos (Knight y Lauder, 1967) mediante la reacción del tejido óseo con luminol (Introna y cols., 1999), las variaciones en la concentración de nitrógeno (Prieto-Castelló y cols., 2007; Jarvis, 1997) y otros componentes, tales como los de hierro, plomo, zinc, fósforo, magnesio y potasio, (Castellano y cols., 1976) así como urea, azufre, potasio y proteínas (Prieto-Castelló y cols., 2007), modificaciones de los lípidos (Castellano y cols., 1984; Castellano y Villanueva, 1978, 1977) y medición de la disminución de actividad del ^{14}C (Hedges y cols., 2007), entre otros.

Actualmente, se han publicado muchas investigaciones acerca de la identificación de sujetos en desastres masivos, personas desaparecidas y análisis de linajes (Lorente y cols., 2001; Rickards y cols., 2001; Cattaneo y cols., 2000; Valenzuela y cols., 1999; Corach y cols., 1997) y la determinación del sexo (Gibbon y cols., 2009; Faerman y cols., 1995) de huesos humanos por medio de análisis de ADN. Sin embargo, existen pocos estudios que utilicen la concentración en huesos de ADN como biomarcador para la estimación del IPM.

Debido al gran interés médico-legal y a la ausencia de métodos precisos para la determinación del IPM, es importante tratar de conocer los procesos de degradación del ADN nuclear con la finalidad de poder desarrollar un nuevo método para el último período postmortem. Tal método sería ampliamente aplicable para distinguir restos óseos antiguos de material humano más reciente y esto podría tener implicaciones forenses, así como legales, ya que podría contribuir a la resolución de casos de muertes sospechosas de violencia y constituir una prueba admisible en procesos judiciales.

Partiendo del hecho de que la muerte es seguida por una serie de modificaciones bioquímicas y estructurales cuyo punto final es la degradación de la materia orgánica, se han seleccionado varios parámetros bioquímicos que se encuentran en cualquier muestra biológica: ADN nuclear, adenina, guanina, citosina, timina, hipoxantina y xantina. El presente estudio, trata de conocer el proceso de degradación de ADN nuclear, las variaciones en las concentraciones de bases nitrogenadas y el número de proteínas de colágeno tipo I en muestras de restos óseos para estimar el IPM en el período de esqueletización.

Por ello, y debido a la necesidad médico-legal de resolver estas incógnitas, el **primer objetivo general** del estudio fue conocer el proceso de degradación en restos óseos de ADN genómico, bases nitrogenadas y proteínas colágenas de tipo I y su relación con el IPM.

Para resolver nuestro objetivo general nos hemos planteado los siguientes **objetivos específicos**:

- ⊕ Comprobar la idoneidad de los protocolos actuales para la extracción de diferentes componentes biológicos de muestras de restos óseos de diferentes intervalos postmortem.
- ⊕ Analizar el grado de integridad del ADN de las muestras de restos óseos en distintos intervalos postmortem conocidos.
- ⊕ Relacionar la concentración de ADN y proteínas de Colágeno tipo I con diferentes datas de los restos óseos.
- ⊕ Establecer un patrón de concentración de ADN y proteínas de Colágeno tipo I en muestras de restos óseos respecto al IPM y a diferentes grupos de data de la muerte para la caracterización de distintos intervalos.
- ⊕ Estudiar el patrón de concentración de adenina, guanina, purinas, citosina, timina, pirimidinas, xantina e hipoxantina respecto al tiempo y su relación con el IPM y distintos intervalos.

Otro de los problemas que se plantean en el ámbito de las ciencias forenses es la identificación de una persona y establecer su individualidad (Vij, 2011: Kumar y cols., 2008). El espectro varía desde restos individuales descompuestos o esqueletizados hasta cuerpos carbonizados o fragmentos de cuerpos resultantes de un desastre (Sopher, 1972). La dificultad del problema de la identificación se incrementa principalmente cuando los cuerpos recuperados se encuentran esqueletizados (Kumar y cols., 2009).

El establecimiento de la identidad e individualidad de cuerpos desconocidos siempre plantea un reto a los expertos forenses, ya que estas cuestiones son de interés legal, tanto en casos civiles como penales (Kumar y cols., 2014; Kumar y cols., 2009). En estos casos la recuperación adecuada y la identificación de los restos humanos es esencial (ICRC, 2004), ya que es necesaria la confirmación absoluta para que la evidencia sea usada para probar o refutar un hecho en un caso (Virkler y Lednev, 2009).

La investigación forense de restos humanos tiene dos objetivos. La primera consiste en recuperar y examinar los restos, incluido el establecimiento de la causa, la etiología de la muerte (ICRC, 2009a) y el establecimiento del IPM y la segunda es identificar los restos (Cattaneo, 2007).

La autopsia médico-legal completa incluyendo el examen de las pertenencias personales, el examen externo, y el examen interno y apoyado por las investigaciones analíticas como el análisis de ADN o la obtención de huellas dactilares son importantes y necesarias para determinar la identidad y la causa de la muerte de un sujeto, pero en muchas ocasiones estas alternativas no arrojan información de la identificación (Waghmare y cols., 2015). En tales casos, la identificación debe ser apoyada por otros métodos científicos (Kumar y cols., 2014), como podría ser la determinación de patologías previas en sujetos fallecidos, la cual sería de gran importancia en la identificación de tales restos.

Es un hecho que las posibilidades de identificación son inversamente proporcionales al tiempo transcurrido desde la muerte. Cuanto mayor sea el tiempo transcurrido desde la muerte, menor será la probabilidad de una identificación correcta (Kumar y cols., 2014), por lo que el **segundo objetivo principal** de este estudio fue analizar la posibilidad de caracterizar las proteínas presentes en la matriz ósea, utilizando técnicas analíticas que proporcionan información sobre los antecedentes patológicos del sujeto para su identificación e individualización.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Características de las muestras de restos óseos humanos para el estudio del intervalo postmortem

En el presente apartado se han analizado las principales características de las muestras óseas humanas analizadas en este estudio.

3.1.1. Muestras de restos óseos para el estudio del intervalo postmortem

En la **Tabla 2** se muestra el tipo de hueso, sexo del fallecido, edad del fallecido e IPM (años desde el fallecimiento) en un total de 80 muestras óseas humanas.

Para este estudio los restos de huesos largos tales como fémur, tibia y húmero fueron seleccionados ya que ofrecen mucha resistencia al paso del tiempo, un buen grado de conservación y permiten la realización de análisis moleculares (Jaeger y cols., 2013).

Tabla 2. Características principales de las muestras óseas humanas en el estudio del IPM.

ID Muestra	Sexo (H/M)	Tipo de hueso	Edad de fallecimiento (años)	IPM (años)*
1	n.c.	Fémur	n.c.	9
2	H	Fémur	70	5
3	H	Fémur	65	7
4	M	Fémur	84	7
5	H	Fémur	n.c.	10
6	M	Fémur	n.c.	10
7	H	Fémur	n.c.	9
8	H	Fémur	52	7
9	H	Fémur	53	7
10	H	Fémur	67	7
11	n.c.	Fémur	n.c.	13
12	H	Fémur	n.c.	11
13	H	Fémur	n.c.	15
14	H	Fémur	n.c.	15
15	H	Fémur	n.c.	15

Tabla 2. (Continuación).

ID Muestra	Sexo (H/M)	Tipo de hueso	Edad de fallecimiento (años)	IPM (años)*
16	H	Fémur	79	12
17	H	Fémur	75	12
18	H	Fémur	73	12
19	M	Fémur	87	12
20	H	Fémur	85	12
21	H	Fémur	48	20
22	H	Fémur	36	20
23	H	Fémur	59	20
24	M	Fémur	74	20
25	M	Fémur	84	22
26	H	Fémur	47	22
27	M	Fémur	21	22
28	H	Fémur	58	22
29	H	Fémur	67	21
30	H	Fémur	71	21
31	H	Fémur	33	21
32	H	Fémur	20	20
33	H	Fémur	93	20
34	H	Fémur	58	20
35	M	Fémur	92	20
36	H	Fémur	69	20
37	H	Fémur	64	20
38	M	Fémur	68	22
39	H	Fémur	65	22
40	M	Fémur	86	22
41	M	Fémur	84	25
42	H	Fémur	75	25
43	M	Fémur	33	26
44	M	Fémur	97	26
45	H	Tibia	78	26
46	H	Fémur	76	23

Tabla 2. (Continuación).

ID Muestra	Sexo (H/M)	Tipo de hueso	Edad de fallecimiento (años)	IPM (años)*
47	H	Tibia	67	23
48	H	Fémur	79	23
49	H	Fémur	85	23
50	M	Tibia	78	23
51	H	Húmero	39	23
52	H	Fémur	42	24
53	M	Fémur	90	26
54	H	Fémur	67	25
55	M	Fémur	n.c.	26
56	M	Fémur	88	27
57	M	Fémur	n.c.	27
58	M	Fémur	n.c.	26
59	H	Fémur	n.c.	27
60	M	Fémur	n.c.	23
61	H	Fémur	77	37
62	M	Tibia	53	36
63	H	Fémur	76	33
64	M	Fémur	82	33
65	H	Tibia	86	44
66	H	Fémur	57	43
67	H	Fémur	82	42
68	M	Fémur	58	44
69	H	Húmero	48	42
70	M	Fémur	68	47
71	H	Fémur	69	32
72	H	Fémur	78	45
73	M	Fémur	91	41
74	M	Fémur	75	42
75	n.c.	Fémur	n.c.	32
76	M	Fémur	86	32
77	H	Fémur	n.c.	42

Tabla 2. (Continuación).

ID Muestra	Sexo (H/M)	Tipo de hueso	Edad de fallecimiento (años)	IPM (años)*
78	H	Fémur	n.c.	42
79	M	Fémur	n.c.	34
80	H	Fémur	n.c.	42

Edad de fallecimiento (años); ID Muestra: Número de muestra del estudio; IPM (años)* Establecido a fecha de 08/02/16; Sexo: H=hombre, M=mujer; n.c.: no conocido.

3.1.2. Sexo, edad y tipo de hueso de las muestras de restos óseos para el estudio del intervalo postmortem

La muestra está formada por 80 restos óseos, de los cuales, solamente en 77 de ellos (96.25%) disponíamos de información acerca del sexo del sujeto fallecido, de los cuales, 50 eran hombres (62.5%), 27 eran mujeres (33.75%) y en 3 de los casos se desconocía el sexo del sujeto (3.75%) (**Figura 28**).

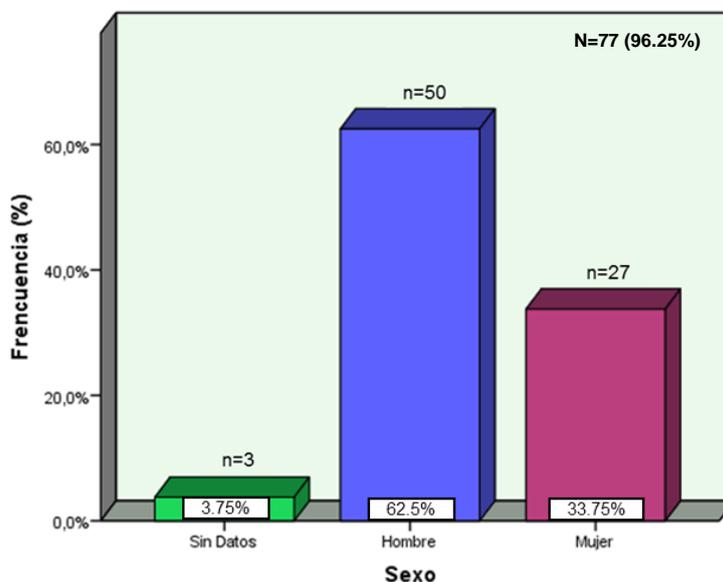


Figura 28. Frecuencia de los restos óseos en función del sexo.

Por otro lado, se analizó la edad de los fallecidos (n=61, 76.3%) siendo su edad media de 68.31 ± 18.02 años (media \pm DE) (con un rango de edad comprendido entre 20-97 años) (**Figura 29**).

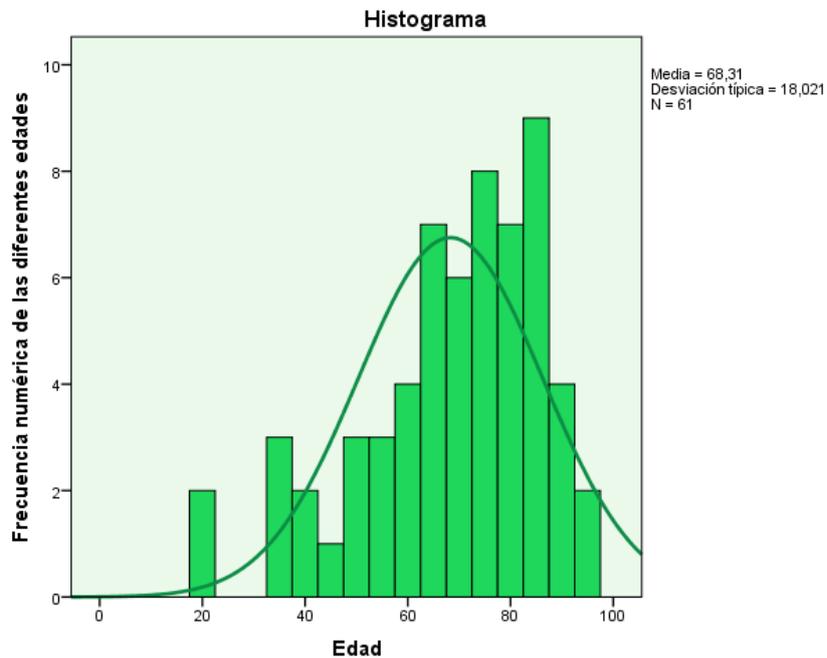


Figura 29. Histograma de la distribución de la edad de los sujetos.

Los huesos largos analizados en este estudio correspondieron mayoritariamente a fémures ($n=73$, 91.25%) y en menor número a tibias ($n=5$, 6.25%) y a húmeros ($n=2$, 2.50%), procedentes de 80 cadáveres humanos (**Figura 30**).

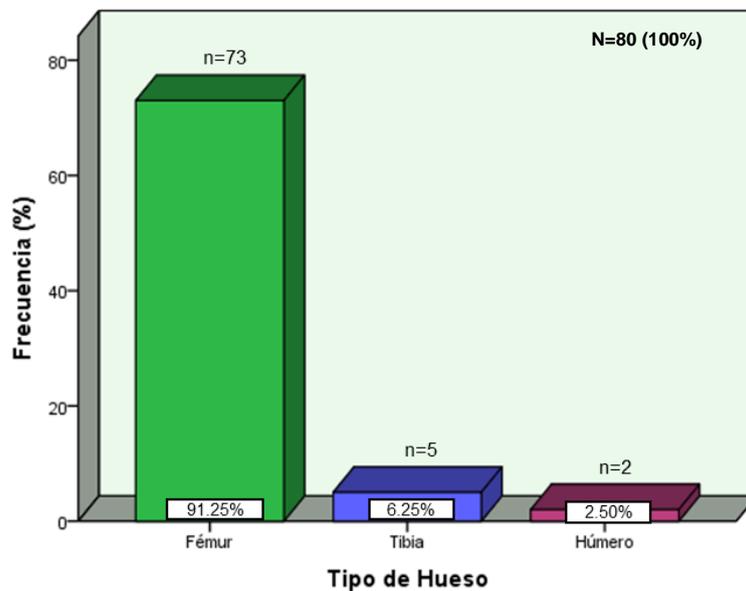


Figura 30. Frecuencia de los restos óseos por tipo de hueso analizado.

3.1.3. Intervalo postmortem de las muestras de restos óseos para el estudio del intervalo postmortem

El IPM de los restos óseos analizados a fecha de 8 de febrero de 2016 oscila entre los 5 y los 47 años con una media de 23.83 ± 10.85 (media años \pm DE) según la fecha de la muerte que se obtuvo de la oficina de Registro del Cementerio y que se comprobó más tarde con los documentos obtenidos del Registro Civil de Murcia.

Teniendo en cuenta que estos huesos han sido correctamente identificados y doblemente validados mediante la documentación oportuna obtenida de ambos Registros, no hemos utilizado ningún hueso de referencia, a pesar de que se han utilizado las normas internas en toda la metodología con el fin de comprobar la fiabilidad y la precisión de los diferentes análisis realizados.

Para el análisis de las muestras, los huesos fueron estudiados en primer lugar respecto al IPM y posteriormente fueron agrupados en diferentes IPM.

1. Análisis de la concentración de ADN total, adenina, guanina, citosina, timina, hipoxantina, xantina y proteínas colágenas tipo I respecto al IPM de cada sujeto.

Posteriormente, se hicieron dos clasificaciones según el IPM, por una parte, atendiendo al contexto médico-legal del Sistema Jurídico Español, el cual establece la prescripción de los delitos a los 20 años (BOE. Núm. 281, 24 de noviembre de 1995).

2. Análisis de la concentración de ADN total, adenina, guanina, citosina, timina, hipoxantina, xantina y proteínas colágenas tipo I respecto a 2 grupos de IPM:
 - a. Grupo 1: IPM < 20 años.
 - b. Grupo 2: IPM \geq 20 años.

Por otro lado, se realizó otra clasificación teniendo en cuenta el proceso de diagénesis que sufren los restos óseos de diferentes IPM, el cual viene respaldado por diversos autores como Bass (1996), Berg y Specht (1958) o Mueller (1953), que exponen la existencia de diferencias macroscópicas y microscópicas en los restos óseos de una década.

3. Análisis de la concentración de ADN total, adenina, guanina, citosina, timina, hipoxantina, xantina y proteínas colágenas tipo I respecto a 4 grupos de IPM:
 - a. Grupo 1: IPM entre 5-10 años.
 - b. Grupo 2: IPM entre 11-19 años.
 - c. Grupo 3: IPM entre 20-30 años.
 - d. Grupo 4: IPM > 30 años.

3.1.4. Localización y estado de las muestras de restos óseos para el estudio del intervalo postmortem

Los restos óseos utilizados en el estudio se encontraban en nichos del Cementerio de Nuestro Padre Jesús (Murcia) y del Cementerio de Totana (Murcia), poblaciones situadas en el sureste español. Estas zonas de enterramiento se encuentran situadas en una región semiárida caracterizada por inviernos suaves, con temperaturas cuyo rango oscila entre 5°C y 19°C y veranos calurosos con temperaturas que oscilan entre los 22°C y los 40°C, con una humedad media de 65%-70%.

Las muestras procedían de nichos aéreos situados en columnas, de forma que los restos no han estado en contacto con el suelo por lo que están minimizados los procesos de transformación y diagénesis de la matriz ósea mineral.

Los restos óseos se encontraban en periodo de esqueletización y no precisaron limpieza previa de residuos carnosos o impurezas.

Una vez trasladados al laboratorio, el manejo de los huesos se llevó a cabo en un ambiente estéril usando instrumentos quirúrgicos previamente esterilizados. Posteriormente se redujo el tamaño de los huesos a fragmentos de 2 cm de espesor mediante el uso de una sierra eléctrica (DREMEL, DSM20). De este modo se obtuvieron 80 muestras óseas procedentes de cada uno de los individuos, cada una de las cuales fue triturada en un molino vibratorio a 50 rpm durante 3 minutos.

3.2. Características de las muestras de restos óseos humanos para el estudio de patologías previas

3.2.1. Muestras de restos óseos para el estudio de patologías previas

En la **Tabla 3** se muestra el ID de la muestra, sexo, tipo de hueso, edad del fallecido e IPM (años desde el fallecimiento) en un total de 45 muestras óseas humanas, de las cuales en 29 estaba disponible la historia clínica del sujeto (n=29, 64,4%).

Tabla 3. Características principales de las muestras óseas humanas en el estudio de patologías previas.

ID Muestra	Sexo (H/M)	Tipo de hueso	Edad de fallecimiento (años)	IPM (años)*
1*	H	Fémur	48	18
2	H	Fémur	36	18
3*	H	Fémur	59	18
4*	M	Fémur	74	18
5*	H	Fémur	20	18
6*	H	Fémur	93	18
7*	H	Fémur	58	18
8*	M	Fémur	92	18
9*	H	Fémur	69	18
10*	H	Fémur	64	18
11*	H	Fémur	67	19
12*	H	Fémur	71	19
13*	H	Fémur	33	19
14	M	Fémur	84	20
15	H	Fémur	47	20
16	M	Fémur	21	20
17*	H	Fémur	58	20
18*	M	Fémur	76	21
19*	H	Tibia	67	21
20	H	Fémur	79	21
21	H	Fémur	85	21
22*	M	Tibia	78	21

Tabla 3. (Continuación).

ID Muestra	Sexo (H/M)	Tipo de hueso	Edad de fallecimiento (años)	IPM (años)*
23	H	Tibia	39	21
24	H	Fémur	42	22
25	M	Fémur	84	23
26*	H	Fémur	75	23
27*	H	Fémur	67	23
28*	H	Fémur	33	24
29	M	Fémur	97	24
30*	H	Tibia	78	24
31	M	Fémur	90	24
32	H	Fémur	69	30
33*	H	Fémur	76	31
34	M	Fémur	82	31
35*	M	Tibia	53	34
36	H	Tibia	77	35
37	M	Fémur	91	39
38*	M	Tibia	82	40
39*	H	Tibia	48	40
40*	M	Tibia	75	40
41*	H	Fémur	57	41
42	H	Tibia	86	42
43*	M	Tibia	58	42
44*	H	Fémur	78	43
45*	M	Tibia	68	45

Edad de fallecimiento (años); ID Muestra: Número de muestra del estudio; IPM (años)* Establecido a fecha de 13/01/14; Sexo: H=hombre, M=mujer.

* Sujetos para quienes el expediente médico está disponible.

3.2.2. Sexo, edad y tipo de hueso de las muestras de restos óseos para el estudio de patologías previas

La muestra está formada por 45 restos óseos de los cuales se disponía información acerca del sexo, edad de fallecimiento y tipo de los restos óseos.

La **Figura 31** muestra la distribución de las muestras del estudio en función del sexo. Se analizaron restos óseos de ambos sexos, siendo mayoritariamente hombres (n=29, 64.4%) y en menor número mujeres (n=16, 35.6%).

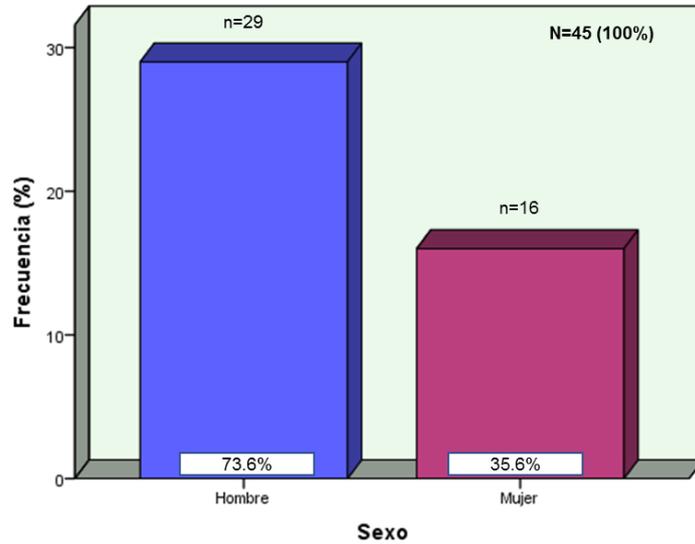


Figura 31. Frecuencia de los restos óseos en función del sexo.

La edad media de los sujetos (\pm DE) fue de 66.31 ± 19.49 años con un rango que oscilaba entre los 20 y los 97 años (**Figura 32**).

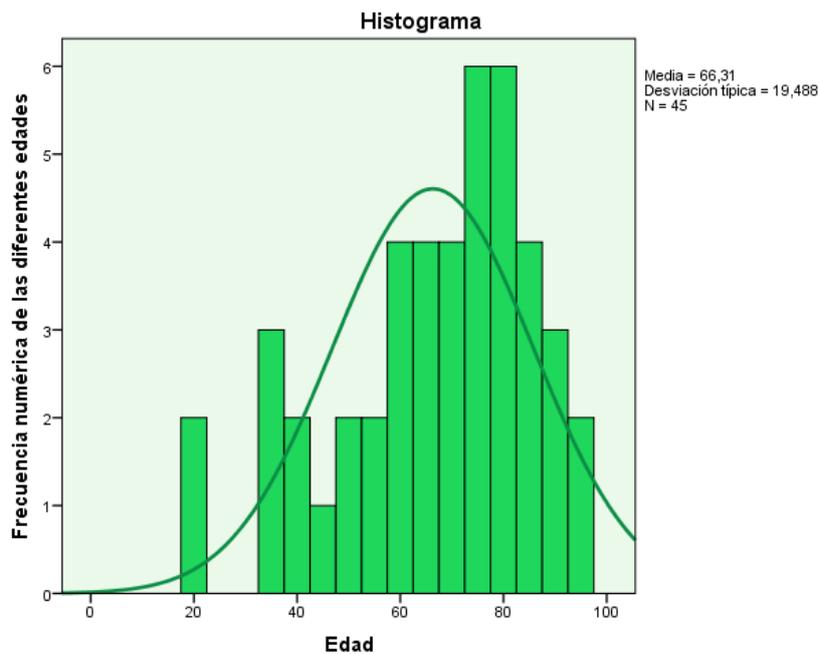


Figura 32. Histograma de la distribución de la edad de los sujetos.

El total de huesos largos del estudio comprendía un total de 45 restos óseos, de los cuales, 33 correspondían a fémures (n=33, 73.3%) y 12 a tibias (n=12, 26.7%) (*Figura 33*).

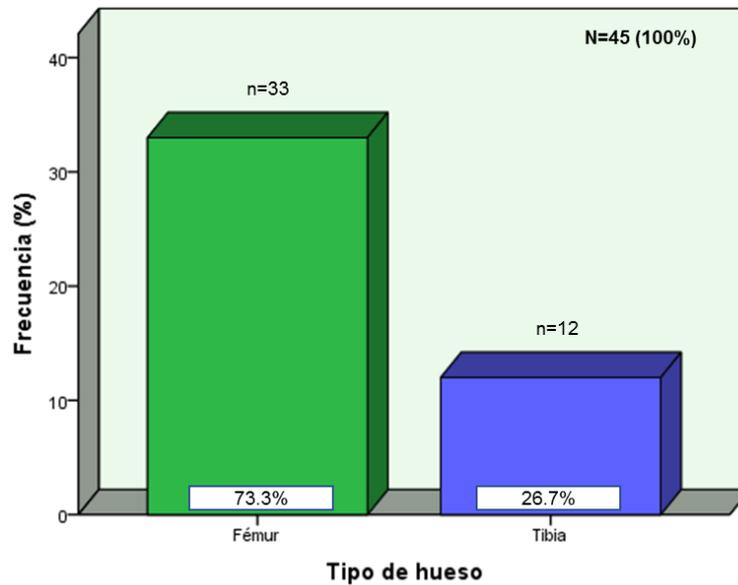


Figura 33. Frecuencia de los restos óseos por tipo de hueso analizado.

3.2.3. Intervalo postmortem de las muestras de restos óseos para el estudio de patologías previas

El IPM de los restos óseos analizados a fecha de 13 de enero de 2014 oscila entre los 18 y los 45 años con una media de 25.84 ± 8.91 (media años \pm DE) según la fecha de la muerte que se obtuvo de la oficina de Registro del Cementerio y que se comprobó más tarde con los documentos obtenidos del Registro Civil de Murcia.

Teniendo en cuenta que estos huesos han sido correctamente identificados y doblemente validados mediante la documentación oportuna obtenida de ambos Registros, no hemos utilizado ningún hueso de referencia, a pesar de que se han utilizado las normas internas en toda la metodología con el fin de comprobar la fiabilidad y la precisión de los diferentes análisis realizados.

3.2.4. Localización y estado de las muestras de restos óseos para el estudio de patologías previas

Los restos óseos utilizados en el estudio se encontraban en nichos del Cementerio de Nuestro Padre Jesús (Murcia) y del Cementerio de Totana (Murcia), poblaciones situadas en el sureste español. Estas zonas de enterramiento se encuentran situadas en una región semiárida caracterizada por inviernos suaves, con temperaturas cuyo rango oscila entre 5°C y 19°C y veranos calurosos con temperaturas que oscilan entre los 22°C y los 40°C, con una humedad media de 65%-70%.

Las muestras procedían de nichos aéreos situados en columnas, de forma que los restos no han estado en contacto con el suelo por lo que están minimizados los procesos de transformación y diagénesis de la matriz ósea mineral.

Los restos óseos se encontraban en periodo de esqueletización y no precisaron limpieza previa de residuos carnosos o impurezas.

Una vez trasladados al laboratorio, el manejo de los huesos se llevó a cabo en un ambiente estéril usando instrumentos quirúrgicos previamente esterilizados. Posteriormente se redujo el tamaño de los huesos a fragmentos de 2 cm de espesor mediante el uso de una sierra eléctrica (DREMEL, DSM20). De este modo se obtuvieron 80 muestras óseas procedentes de cada uno de los individuos, cada una de las cuales fue triturada en un molino vibratorio a 50 rpm durante 3 minutos.

3.3. Metodología empleada en el análisis de muestras de restos óseos

A continuación, se detalla la metodología usada para la determinación de la concentración de ADN de doble cadena y evaluación de su integridad, la cuantificación de bases nitrogenadas, así como para la detección y cuantificación de péptidos de proteínas colágenas tipo I en los restos óseos, así como la detección e identificación de péptidos de proteínas asociados a patologías.

Las muestras de restos óseos fueron tratadas mediante tres protocolos de laboratorio con la finalidad de extraer y purificar ADN, bases nitrogenadas y proteínas

colágenas tipo I y proteínas asociadas a patologías como se puede observar en el siguiente esquema (**Figura 34**).

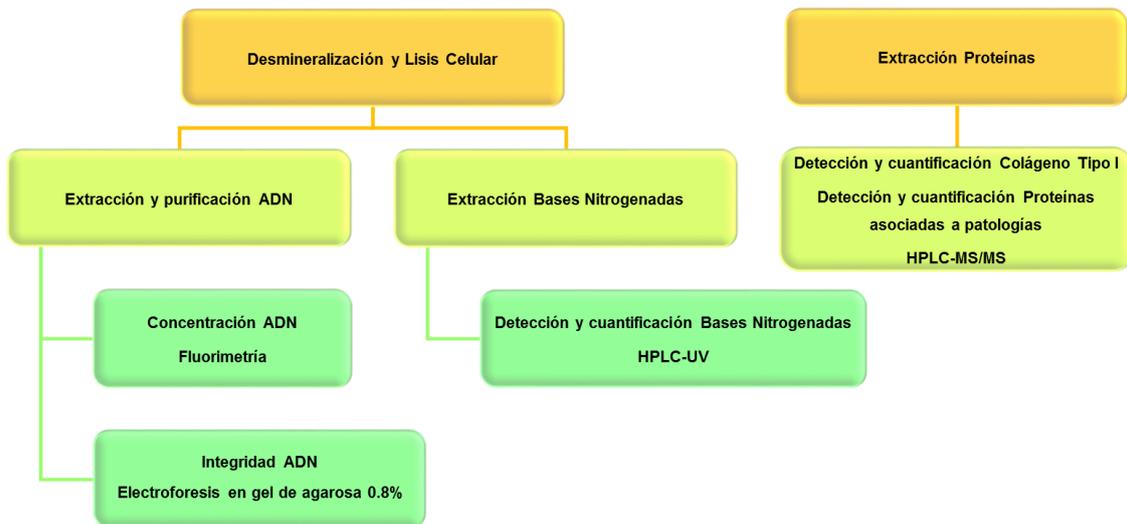


Figura 34. Esquema representativo de las diferentes técnicas de laboratorio realizadas sobre las muestras óseas. HPLC-UV: Cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta; HPLC-MS/MS: Cromatografía líquida de alta resolución con detector masas-masas.

- ✦ Para la **desmineralización y lisis celular** se usaron los protocolos de Amory y cols. (2012) y Loreille y cols. (2007).
 - Para la **extracción y purificación del ADN** se usaron los protocolos de Ghatak y cols. (2013), Jakubowska y cols. (2012) y Ausubel y cols. (2002).
 - Para la **extracción de bases nitrogenadas** se usaron los protocolos de Amory y cols. (2012) y Loreille y cols. (2007).
- ✦ Para la **extracción de proteínas** se usaron los protocolos de Cleland y cols. (2012) y Jiang y cols. (2007).

Posteriormente, se llevaron a cabo 4 técnicas analíticas diferentes según el parámetro a medir:

- ✦ Fluorimetría para la determinación de la concentración de ADN.
- ✦ Electroforesis en gel de agarosa 0.8% para análisis de integridad de ADN.

- ✦ Cromatografía líquida de alta resolución con detector UV (HPLC-UV) para la determinación de la concentración de bases nitrogenadas.
- ✦ Cromatografía de alta resolución con detector masas-masas (HPLC-MS/MS) para la detección y cuantificación de proteínas de colágeno tipo I y biomarcadores de patologías.

Los dos primeros análisis fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Genómica del Centro Regional de Hemodonación de la Región de Murcia (CRH) y los restantes fueron realizados en el Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia.

3.3.1. Protocolo de desmineralización y lisis celular

La preparación de las muestras óseas para obtener las alícuotas que posteriormente se utilizaron para la cuantificación de bases nitrogenadas, se llevaron a cabo según el protocolo de Amory y cols. (2012) y Loreille y cols. (2007).

En primer lugar, se procedió al pesaje en balanza de precisión de 0.35 gramos de hueso cortical de cada muestra. Posteriormente, se realiza un lavado con 3.5 ml de tampón fosfato salino de pH 7.4 (PBS 1X), cuya composición se describe en la **Tabla 4**, en una proporción de 1:5 (peso/volumen).

Tabla 4. Composición para preparar un litro de tampón fosfato salino (PBS 10X pH 7.4).

Compuesto	PM (g/mol)	M	Peso (g)
NaCl	58.44	1.37	80.6
KCl	74.56	0.027	2.01
Na ₂ HPO ₄	141.96	0.1	14.2
K ₂ HPO ₄	174.18	0.018	3.14

g: gramos; KCl: Cloruro de potasio; K₂HPO₄: Fosfato dipotásico; M: molaridad; NaCl: Cloruro de sodio; Na₂HPO₄: Fosfato disódico; PM: Peso molecular.

Posteriormente fueron colocadas en agitador giratorio (SELECTA), permaneciendo en agitación durante 48 horas de forma ininterrumpida a temperatura ambiental constante; posteriormente se sometió al producto resultante a una

centrifugación (CENTRONIC S-577, Selecta) a 4000 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 10 minutos. Luego se procedió a la separación del sobrenadante-precipitado mediante pipetas Pasteur estériles y micropipetas con puntas desechables estériles para coger el máximo volumen posible, siendo el precipitado el extracto sobre el que se trabajó y congelando el sobrenadante a -80°C para posteriores determinaciones.

A continuación, se incorporó al precipitado el buffer de lisis Tris-ácido clorhídrico (HCl) 1M, ácido etilendiaminotetraacético 0.5M (EDTA) y dodecilsulfato sódico 1% (SDS 1%) a pH 9, en proporción 1:5 (**Tabla 5**). Se agitó 48 horas en el agitador giratorio y en última instancia se refrigeró durante 48 horas a 4°C para dar lugar a la actuación del tampón.

Tabla 5. Composición para preparar 500 ml de buffer lisis Tris-HCl con EDTA y SDS 1% pH 9.

Compuesto	PM (g/mol)	M	Peso (g)
Tris-HCl	121.4	1	60.57
EDTA	372.24	0.5	93.06
SDS 1%	288.38		50.00

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; g: gramos; HCl: ácido clorhídrico; M: molaridad; PM: Peso molecular; SDS: Dodecil sulfato de sodio.

Tras esto, se tomó 1 ml de sobrenadante de cada una de las 80 muestras y fueron llevadas a la Sección de Biología Molecular de la Universidad de Murcia para la detección y cuantificación de las distintas bases nitrogenadas y se conservó el precipitado con 2 ml de sobrenadante para aplicar el protocolo de extracción orgánica y purificación de ADN (**Figura 35**).

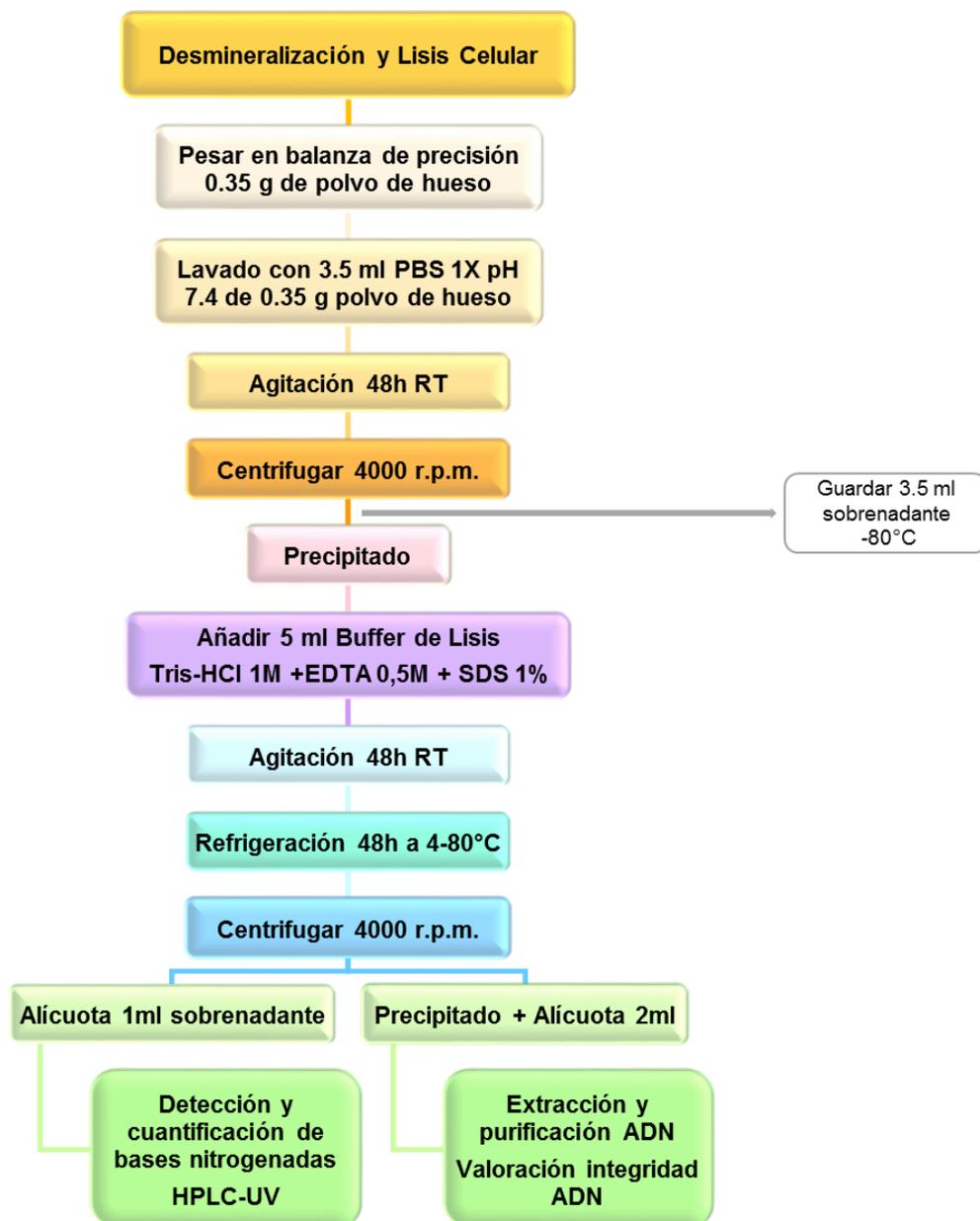


Figura 35. Esquema representativo del proceso de desmineralización y lisis celular para la extracción y purificación de ADN y cuantificación de bases nitrogenadas (Amory y cols., 2012; Loreille y cols, 2007). EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético; HCl: Ácido clorhídrico; PBS: Tampón fosfato salino; r.p.m.: Revoluciones por minuto; RT: Temperatura ambiente; SDS: Dodecil sulfato de sodio.

3.3.2. Protocolo de extracción orgánica y purificación ADN

Para la extracción y purificación del ADN se usaron los protocolos descritos por Ghatak y cols. (2013), Jakubowska y cols. (2012) y Ausubel y cols. (2002).

El tratamiento se realizó sobre las muestras anteriores (**Figura 35**), desechando 2 ml de buffer de lisis celular (extracto congelado a -80°C para otros posibles análisis) y quedándonos con el tubo de centrifuga inicial que contiene 2 ml del sobrenadante del protocolo de lisis celular y el precipitado. De esta forma se obtienen las alícuotas que posteriormente se utilizaron en el procedimiento de cuantificación de ADN.

Seguidamente, se procedió a la purificación del ADN, y a cada una de las 80 muestras con 2 ml de sobrenadante junto con el precipitado, se le añadió 2 ml de fenol/cloroformo/ alcohol isoamílico (25:24:1), en una proporción volumen/volumen de 1:1 y permanecieron 30 minutos en agitación en el agitador giratorio (SELECTA) a temperatura ambiente constante. Posteriormente se sometió al producto resultante a una centrifugación (CENTRONIC S-577, Selecta) a 4000 r.p.m. durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se procedió a la recogida de la fase acuosa (sobrenadante) donde se encuentra el ADN mediante una micropipeta estéril de 200 μl con puntas desechables. Este sobrenadante se transfirió a un eppendorf de 1 ml para seguir con el protocolo, el resto de muestra se congeló a -80°C para posibles análisis posteriores.

A los 200 μl de fase acuosa se le añadió 20 μl de acetato de sodio (CH_3COONa) 3M pH 5.2 (1:10), tras lo cual, se mezcló con un vórtex durante unos 15 segundos. A continuación, se añadió 450 μl de etanol 100% (relación volumen/volumen de 1:2.5) y se mezcló con un vórtex durante 15 segundos, para después permanecer 1 hora a -80°C .

Posteriormente se volvió a mezclar con un vórtex durante 10 segundos y se centrifugaron (CENTRONIC S-577, Selecta) a 4000 r.p.m. durante 10 minutos, tras lo cual se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de etanol 70% para volver a mezclarlo con el vórtex durante 10 segundos y centrifugarlo 10 minutos. A continuación, se volvió a desechar el sobrenadante y se dejó secar 30 minutos el eppendorf con el pellet dentro. Por último, se resuspendió el ADN con 30 μl de agua destilada estéril previamente autoclavada (**Figura 36**).



Figura 36. Esquema representativo del protocolo de extracción orgánica y purificación de ADN del material óseo (Ghatak y cols., 2013; Jakubowska y cols., 2012; Ausubel y cols., 2002). CH₃COONa: Acetato de sodio; r.p.m.: Revoluciones por minuto.

3.3.3. Protocolo de extracción de proteínas de muestras de restos óseos

Para la extracción de proteínas se utilizaron los protocolos de Cleland y cols. (2012) y Jiang y cols. (2007).

En primer lugar, se procedió al pesaje en balanza de precisión (METTLER AE 50) de 0.35 gramos de hueso cortical.

Seguidamente, los 0.35 gramos de cada muestra (80 muestras del estudio del IPM y 45 muestras del estudio de marcadores de patología) son lavados con 3.5 ml de PBS 1X a pH 7.4 en una proporción de 1:10 peso/volumen. Posteriormente fueron colocadas en agitador giratorio (SELECTA), permaneciendo en agitación durante 48 horas de forma ininterrumpida a temperatura ambiente constante; tras lo cual se sometió al producto resultante a una centrifugación (CENTRONIC S-577) a 4000 r.p.m. durante 10 minutos. A continuación, se procedió a la separación del sobrenadante-precipitado mediante pipetas Pasteur y micropipetas con puntas desechables para coger el máximo volumen posible, siendo el precipitado sobre el que se trabajó y congelando el sobrenadante para posteriores investigaciones a -80°C . Al precipitado que se obtuvo se le incorpora el buffer de lisis Tris-Urea 1X pH 7.4 (**Tabla 6**), en una proporción 1:10. Finalmente, se refrigeró durante 48 horas a 4°C para dar lugar a la actuación del tampón y evitar la degradación peptídica (**Figura 37**).

Tabla 6. Composición para preparar un litro de buffer Tris-Urea 1X pH 7.4.

Compuesto	PM (g/mol)	M	Peso (g)
Tris	121.14	0.01	1,21
Urea	60,06	6	360,36
NaH ₂ PO ₄	137,99	0,1	13,8

g: gramos; NaH₂PO₄: Bifosfato de sodio; M: molaridad; PM: Peso molecular.



Figura 37. Esquema representativo del protocolo de extracción de proteínas (Cleland y cols., 2012; Jiang y cols., 2007).
PBS: Tampón fosfato salino; r.p.m.: Revoluciones por minuto; RT: Temperatura ambiente.

3.4. Técnicas analíticas para el análisis cualitativo y cuantitativo de ADN, bases nitrogenadas y proteínas de colágeno tipo I y proteínas asociadas a patologías

A continuación, se explican las técnicas analíticas anteriormente mencionadas para el análisis cualitativo y cuantitativo de ADN, bases nitrogenadas y proteínas de colágeno tipo I.

- ⊕ Electroforesis en gel de agarosa 0.8% para valorar la integridad del ADN nuclear.
- ⊕ Fluorimetría para la cuantificación del ADN nuclear.
- ⊕ HPLC-UV para el análisis cuantitativo de las distintas bases nitrogenadas.
- ⊕ HPLC-MS/MS para el análisis cuantitativo de proteínas de colágeno tipo I y proteínas asociadas a patologías previas.

3.4.1. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% para valorar integridad del ADN en muestras de restos óseos

La concentración relativa e integridad del ADN extraído de los restos óseos pueden ser verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa preparados al 0.8% (Clark y Christopher, 2000).

La electroforesis es una técnica que consiste en la separación de moléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) a través de una matriz tamponada que puede ser agarosa o acrilamida (Kryndushkin y cols., 2003). La agarosa funciona como un filtro en el que la migración de los fragmentos depende del peso molecular y la carga neta que poseen y el campo eléctrico aplicado, donde las moléculas de menor tamaño migran más rápidamente hacia el ánodo que aquellas de mayor tamaño (Sambrook y Russel, 2001). En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable por la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis.

La resolución y velocidad de separación de fragmentos de ADN por electroforesis son reguladas a través de la concentración de agarosa en el gel, oscilando la mayoría

de ellos entre 0.5%-2% (Lee y cols., 2011) y el voltaje aplicado durante la electroforesis. Al aumentar la concentración de agarosa disminuye la velocidad de migración, permitiendo obtener una mayor resolución en los fragmentos de menor longitud. El incremento del voltaje aumenta proporcionalmente la velocidad de migración de los fragmentos en el gel, sin embargo, el aumento excesivo de la tensión está asociado con la resolución más baja de las bandas y la posibilidad elevada de fusión del gel (por encima de 5 a 8 V/cm) (Yilmaz y cols., 2012).

Los ácidos nucleicos separados en geles de agarosa pueden visualizarse mediante tinción con colorantes fluorescentes intercalantes, como el bromuro de etidio o SYBR Green (Yilmaz y cols., 2012), permitiendo evaluar su integridad. Los colorantes fluorescentes actúan mediante inserción entre las pares de bases que conforman el ácido nucleico. El bromuro de etidio es ampliamente utilizado para la visualización de ADN ya que se intercala entre las bases del ADN y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV a 300 nm (Yilmaz y cols., 2012) y se observan las bandas de distintas intensidades y las “colas de degradación”, lo cual permite analizar la integridad y el grado de fragmentación del ADN (Ghatak y cols., 2013).

Protocolo de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%

1. Preparar la bandeja sellando los bordes por presión o con cinta adhesiva (esto depende del modelo de cámara utilizado) y poner los peines correspondientes.
2. Pesar 0.96 gramos de agarosa (Sigma Aldrich, N° de producto A7431) y colocarla dentro de un matraz Erlenmeyer junto con 120 ml de buffer TAE 1X (**Tabla 7**), el cual proviene de una solución stock de TAE 10X (**Tabla 8**) para preparar un gel al 0.8%.

Tabla 7. Preparación para un volumen final de 120 ml de gel de agarosa al 0.8%.

Reactivo	Cantidades
Agarosa	0.96 g
TAE 1X	120 ml

g: gramos; ml: mililitro; TAE: Tris-acetato-EDTA.

Tabla 8. Composición Buffer TAE 10X para un litro de disolución.

Reactivo	Cantidades
Tris Base	48.5 g
Ácido acético glacial	11.4 g
EDTA 0.5 M	20 ml

g: gramos; ml: mililitro; EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético; M: Molaridad.

3. Calentar la solución obtenida en el microondas hasta su completa disolución evitando la formación de burbujas y una evaporación excesiva.
4. Enfriar la solución de agarosa hasta unos 55°C - 60°C, al aire, y añadir 2.5 µl de bromuro de etidio.
5. Mezclar bien, agitando el recipiente en forma circular, evitando que se formen burbujas en la solución.
6. Verter la solución lentamente por uno de los extremos de la cubeta y retirar las burbujas que queden sobre la superficie con una punta limpia y dejar polimerizar la agarosa.
7. Para la electroforesis, llenar el tanque de la cámara de electroforesis con buffer TAE 1X hasta cubrir el gel.
8. Conectar los electrodos de la cámara a la fuente de poder, graduar el voltaje hasta 60V y poner en cada pocillo 8 µl de cada muestra junto con 2 µl de tampón de carga 1X.

3.4.2. Fluorimetría para cuantificación de ADN en muestras de restos óseos

La fluorescencia es el resultado de un proceso de tres etapas que se produce en ciertas moléculas (generalmente hidrocarburos poliaromáticos o heterociclos) llamados fluoróforos o colorantes fluorescentes. Una sonda fluorescente es un fluoróforo diseñado para responder a un estímulo específico o para localizar una región específica de una muestra biológica. El proceso responsable de la fluorescencia de sondas

fluorescentes y otros fluoróforos se ilustra por el diagrama de estado electrónico simple (diagrama de Jablonski) mostrado en la **Figura 38** (Johnson y Spence, 2010).

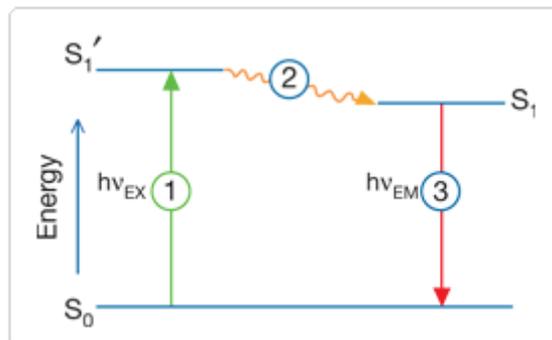


Figura 38. Diagrama de Jablonski que ilustra los procesos implicados en la creación de un estado singlete excitado por absorción electrónica óptica y la posterior emisión de fluorescencia. Las etapas etiquetadas como 1, 2 y 3 corresponden a la etapa de absorción, disipación y emisión respectivamente (Johnson y Spence (2010). *The Molecular Probes Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. [Figura]).

El fluorímetro por tanto es un dispositivo capaz de emitir un haz de luz a una longitud de onda determinada generando que ciertas moléculas emitan fluorescencia, la cual es detectada, amplificada y convertida a una señal que será utilizada para identificar la presencia y cantidad de moléculas específicas, en este caso ácidos nucleicos. Para ello, se utilizan colorantes fluorescentes que emiten señales solamente cuando se unen a las moléculas diana específicas (ADN o ARN), incluso en presencia de los nucleótidos libres, ácidos nucleicos degradados o contaminantes de proteínas, de esta forma permite, mediante la utilización de sondas fluorescentes, cuantificar de forma altamente específica muestras de ADN, ARN o proteínas.

De esta forma, es capaz de cuantificar la concentración de ADN según el nivel de saturación de la señal fluorescente que emite el ADN de la muestra al ser mezclada con un fluorocromo especial.

3.4.2.1. Equipo Fluorímetro

Para la determinación de la concentración de ADN se utilizó el equipo:

- ✦ Qubit® 3.0 Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, Brazil) (Nº catalogo Q33216) (**Figura 39**).

Usando el Kit:

- ✦ Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen Life Technologies, Brazil) (Nº catalogo Q32850) RANGO 100 pg/μl – 1000 ng/μl. Incluye:
 - Fluoróforo (PicoGreen)
 - Buffer de dilución
 - Muestras estándar de ADN de distintas concentraciones, 0 ng/μl y 100 ng/μl.

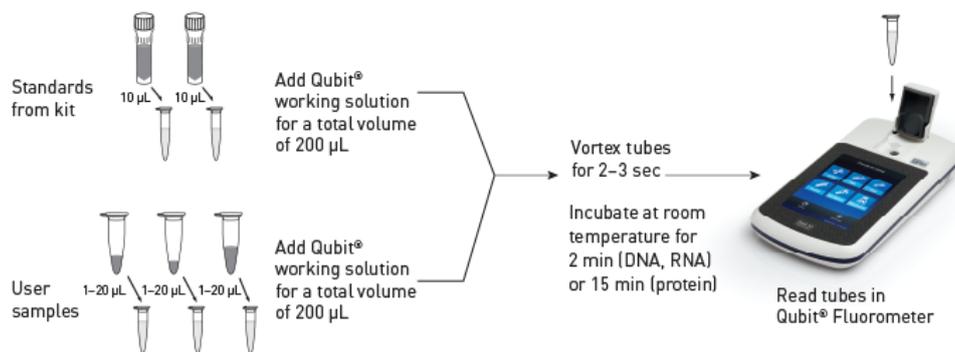


Figura 39. Protocolo a seguir para la cuantificación de ADN por fluorimetría Qubit® 3.0 Fluorometer (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA).

3.4.2.2. Protocolo de cuantificación de ADN por fluorimetría

1. Preparación de solución fluorescente 1/200 del reactivo fluorescente en una solución tampón.
2. Preparación de las 2 soluciones de calibrado: añadir 10 μl de solución de calibrado de concentración conocida (0 ng/μl y 100 ng/μl) a 190 μl de la solución fluorescente.
3. Preparación de las soluciones problema: añadir 2 μl de cada una de las 80 muestras problema a 198 μl de la solución fluorescente.
4. Mezclar con vórtex y transferir a tubo de 600 μl adaptado a la lectura de fluorescencia e incubar 2 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.

5. Calibrado del lector. Seleccionar el ensayo a realizar e introducir una a una las muestras de calibrado del ADN de concentración conocida.
6. Lectura de la concentración de las muestras problema, expresadas en ng/ml.

3.4.3. HPLC-UV para la cuantificación de bases nitrogenadas en muestras de restos óseos

La cromatografía engloba a un conjunto de técnicas de análisis basadas en la separación de componentes de una mezcla compleja y su posterior detección (Goswami, 2015).

En este caso, la cromatografía líquida se combina fácilmente con un detector de red de fotodiodos (DAD), que es el instrumento analítico generalizado para el análisis de mezclas complejas (George, 1993).

La cromatografía es el método potente para la detección y purificación de productos y sustancias biológicas. El principio de separación cromatográfico es la distribución o reparto de moléculas separadas entre dos fases inmiscibles llamadas fase móvil y la fase estacionaria. Los métodos cromatográficos se clasifican por diferentes criterios, entre ellos la forma física de la fase estacionaria, la naturaleza de la fase móvil y/o la fase estacionaria, el mecanismo de separación o las otras propiedades de los sistemas cromatográficos (Sattayasai, 2012).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación que utiliza tiempos de retención y migración para detectar y cuantificar los componentes individuales de una mezcla (Milman y Zhurkovich, 2011). El tiempo de retención es el tiempo que tarda un compuesto concreto en viajar a través de la columna de separación hasta el detector. Este tiempo se mide desde el momento en que se inyecta la muestra hasta el punto en el que la pantalla muestra una altura máxima del pico para ese compuesto. Diferentes compuestos tienen diferentes tiempos de retención (t_R). Los diversos componentes de una mezcla, tales como las bases nitrogenadas, tienen diferentes tiempos de retención y es el área del pico integrada de cada componente que da una indicación de la cantidad presente.

Esta técnica cromatográfica, presenta una fase móvil que consiste en un fluido líquido, eluyente, que arrastra a la muestra con un flujo constante de presión proporcionado por una bomba, hasta llegar al punto donde es introducida la muestra. Siguiendo el flujo de presión la lleva a una columna donde se encuentra la fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. Dependiendo de la retención de los componentes de la muestra por la fase estacionaria y de su solubilidad en el eluyente se provocará su migración diferencial.

Después de haber pasado los componentes por la fase estacionaria y haberse separado, pasan por un detector, en este caso detector UV-Vis, que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo del compuesto. Este tipo de instrumento permite hacer barridos a distintas longitudes de onda de cada uno de los componentes separados. De esta manera, se generan una colección de cromatogramas a diferentes longitudes de onda de cada pico. La presencia de un analito da una respuesta que puede ser proporcional a la concentración. Para resultados precisos, la respuesta del instrumento al analito debe compararse con la respuesta a un estándar, lo que es muy similar al uso de curvas de calibración. La respuesta (por ejemplo, el pico de altura) para una concentración particular se conoce como factor de respuesta.

3.4.3.1. Equipo HPLC-UV

El equipo utilizado para la determinación de la concentración de bases nitrogenadas ha sido el siguiente:

- ✦ HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (**Figura 40**) equipado con:
 - Micro-automuestreador termostatzado G1377A (Agilent Technologies).
 - Bomba capilar G1376A (Agilent Technologies).
 - Compartimento termostatzado para columnas de HPLC G1316A (Agilent Technologies).
 - Detector de diodo array, absorbancia UV-Vis G1365D (Agilent Technologies).
 - Columna específica para la separación y análisis de compuestos polares como las bases nitrogenadas Zorbax SB-Aq (Agilent Technologies (5 μm , 150 \times 2.1 mm).



Figura 40. Equipo HPLC Agilent 1100 Series con detector UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

3.4.3.2. Patrones y preparación

Los patrones de bases nitrogenadas empleados en el análisis son los siguientes:

- ✦ Adenina (Sigma Aldrich, N° de producto A8626).
- ✦ Guanina (Sigma Aldrich, N° de producto G11950).
- ✦ Citosina (Sigma Aldrich, N° de producto C3506).
- ✦ Timina (Sigma Aldrich, N° de producto T0376).
- ✦ Hipoxantina (Sigma Aldrich, N° de producto H9377).
- ✦ Xantina (Sigma Aldrich, N° de producto X7375).

Estos patrones se prepararon a una concentración 1mM en agua mili-Q (Sigma Aldrich, N° de producto W4502) para cada una de las bases nitrogenadas, cuyas señales fueron comparadas con las emitidas por las muestras del presente trabajo.

A partir de la solución de patrón de cada una de ellas, se realizaron disoluciones de trabajo a concentraciones de 0.1 μM ; 1 μM ; 10 μM y 41.67 μM en fase móvil.

3.4.3.3. Condiciones cromatográficas

El análisis se llevó a cabo inyectando 40 μl de estándares de concentración conocida y muestras en un sistema HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies,

Santa Clara, CA, USA), siendo cada una de ellas filtrada a través de 0.22 μm antes de inyectarse. Posteriormente se inyectó en el equipo hasta una columna de HPLC específica para la separación y análisis de compuestos polares como las bases nitrogenadas (Agilent Zorbax SB-Aq (5 μm , 150 \times 2.1 mm), colocada en el compartimento de columnas termostatzado a 40°C. El flujo utilizado fue de 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ y tras la inyección, los compuestos se separaron y analizaron en modo isocrático con tampón A (50 mM acetato sódico pH 4.8 ajustado con ácido acético) durante 60 min. Se adquiere la señal UV-Vis a 254 nm característica de las bases nitrogenadas.

Se analizaron estándares, muestras y blancos (buffer de extracción de las muestras) en las mismas condiciones. Los picos obtenidos en las inyecciones de estándares y blancos sirvieron para definir los intervalos de tiempo para la integración de las señales correspondientes a cada compuesto, según su t_R (**Tabla 9**). Se elaboraron rectas de calibrado con cada compuesto a partir de las cuales se determinó la concentración de los mismos en cada muestra.

Tabla 9. Tiempo de retención de las bases nitrogenadas de las muestras analizadas.

Base Nitrogenada	t_R
Adenina	45 minutos
Guanina	13 minutos
Citosina	5 minutos
Timina	10 minutos
Hipoxantina	11 minutos
Xantina	12 minutos

t_R : Tiempo de retención.

El procesamiento de los datos se realizó con el programa de análisis DataAnalysis para Chemstation y LC/MSD Trap Version 3.3 (Bruker Daltonik, GmbH, Germany).

3.4.3.4. Recta de calibrado

El proceso de identificación y determinación de las sustancias (adenina, guanina, citosina, timina, hipoxantina y xantina) se llevó a cabo a una longitud de onda 254 nm.

3. Material y Métodos

Las rectas de calibrado se calcularon por separado para cada compuesto y para cada una de ellas se han calculado cuatro puntos con las siguientes concentraciones: 41.67 μM ; 10 μM ; 1 μM y 0.1 μM . Se han utilizado dos muestras por punto para cada compuesto, obteniendo de éstas dos áreas de pico y a partir de estos datos se realizó la media aritmética. Para la obtención de las rectas de calibrado de todas las muestras se ha utilizado el área del pico cromatografiado (**Tablas 10-12**).

Tabla 10. Concentraciones y áreas y rectas de calibrado utilizadas para el cálculo de la recta de calibrado de Adenina (A-B) y Guanina (C-D).

A

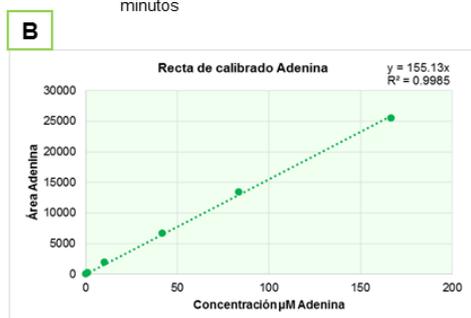
Adenina t_R 45 min	
μM	Área Media
41.67	6726
10	2019
1	259
0.1	103

μM : Concentración micromolar;
 t_R : Tiempo de retención en minutos

C

Guanina t_R 13 min	
μM	Área Media
41.67	1290
10	375
1	67
0.1	45

μM : Concentración micromolar;
 t_R : Tiempo de retención en minutos



x= concentración micromolar de adenina; y= área del pico de adenina



x= concentración micromolar de guanina; y= área del pico de guanina

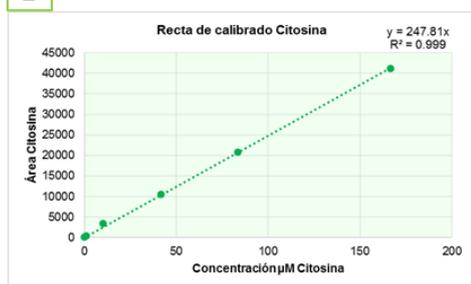
Tabla 11. Concentraciones y áreas y rectas de calibrado utilizadas para el cálculo de la recta de calibrado de Citosina (A-B) y Timina (C-D).

A

Citosina t_R 5 min	
μM	Área Media
41.67	10480
10	3497
1	501
0.1	185

μM : Concentración micromolar;
 t_R : Tiempo de retención en minutos

B



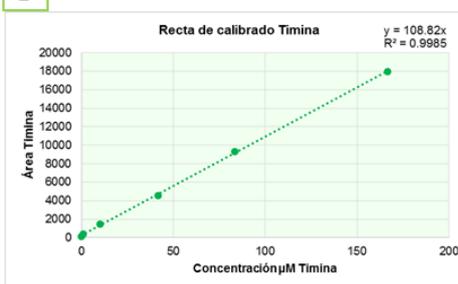
x= concentración micromolar de citosina; y= área del pico de citosina

C

Timina t_R 10 min	
μM	Área Media
41.67	4581
10	1469
1	403
0.1	144

μM : Concentración micromolar;
 t_R : Tiempo de retención en minutos

D



x= concentración micromolar de timina; y= área del pico de timina

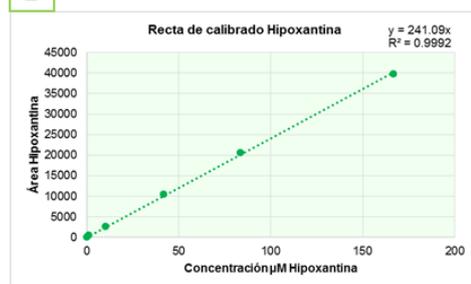
Tabla 12. Concentraciones y áreas y rectas de calibrado utilizadas para el cálculo de la recta de calibrado de Hipoxantina (A-B) y Xantina (C-D).

A

Hipoxantina t_R 11 min	
μM	Área Media
41.67	10520
10	2685
1	536
0.1	74

μM : Concentración micromolar;
 t_R : Tiempo de retención en minutos

B



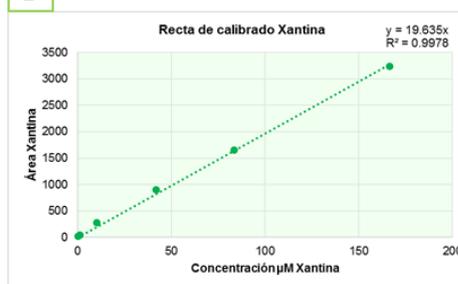
x= concentración micromolar de hipoxantina; y= área del pico de hipoxantina

C

Xantina t_R 12 min	
μM	Área Media
41.67	897
10	286
1	48
0.1	26

μM : Concentración micromolar;
 t_R : Tiempo de retención en minutos

D



x= concentración micromolar de xantina; y= área del pico de xantina

3.4.4. HPLC - MS/MS para el análisis de péptidos de las muestras de restos óseos

Como anteriormente mencionamos, HPLC es una técnica analítica de separación, que en este caso es el sistema de introducción de la muestra que se encuentra acoplado al sistema de espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica analítica en la que los átomos o moléculas de una muestra son ionizados, con mayor frecuencia positivamente, separados por su relación masa/carga (m/z) y posteriormente detectados y registrados (Grebe y Singh, 2011). En combinación con técnicas de separación de alta resolución, es la más cualificada para analizar muestras complejas reales. El análisis por espectrometría de masas se realiza en cuatro etapas básicas:

1. Introducción de la muestra, en este caso por un cromatógrafo acoplado al espectrómetro.
2. Ionización por desorción de la muestra, siendo en el caso que nos ocupa por ionización por electrospray (ESI), en la que se transforman los átomos o moléculas en especies iónicas en fase gaseosa, con la consiguiente pérdida de electrones o protones.

En la ESI, la muestra disuelta en un disolvente adecuado pasa a través de un capilar metálico, en cuya punta se aplica un potencial de 3 a 4 kilovoltios (kV) y una presión de 1 atmósfera (atm). Se produce una fina niebla de gotas de elevada carga y la evaporación del solvente hace que aumente la densidad de carga, produciéndose la desorción en fase gaseosa.

3. Separación y el análisis de los iones moleculares y de los fragmentos cargados producidos según su relación m/z .

Esta etapa es llevada a cabo por el analizador, el cual tiene dos misiones fundamentales: separar los iones en función de su relación m/z y enfocar los iones separados hacia un determinado punto. El movimiento de las partículas cargadas permite distinguir unas de otras en función de la energía cinética de cada ión, de la velocidad o del momento de fuerzas.

En el caso que nos ocupa, este analizador es una trampa de iones (IT) que es un dispositivo en el que los cationes o aniones gaseosos pueden ser formados y confinados durante largos períodos de tiempo por la acción de campos eléctricos y/o magnéticos. Los iones formados en la fuente entran en el analizador donde se aplican diferentes voltajes generando un campo eléctrico tridimensional en la cavidad de la trampa. Este campo atrapa y concentra los iones dada su trayectoria de oscilación estable. La naturaleza de la trayectoria depende del potencial y de la relación m/z de los iones. Durante la detección, los potenciales de los electrodos se alteran para provocar inestabilidad en las trayectorias de los iones y expulsarlos en la dirección axial en función de su relación m/z dando lugar a un espectro de masas.

4. Finalmente, se obtiene el espectro de masas, en el que se presenta la abundancia relativa de los iones y fragmentos separados respecto a la relación masa/carga.

La última fase del proceso se produce en los detectores, los cuales proporcionan información sobre el flujo de iones o la abundancia de iones que salen del analizador de masas. Convierten la corriente de iones en una señal eléctrica que puede ser amplificada, almacenada y presentada mediante el sistema de tratamiento de datos de forma que se pueda interpretar.

En el caso de nuestro estudio éste es un espectrómetro de masas, donde los iones son analizados para dar un nuevo espectro de masas. Este proceso se puede repetir para diferentes iones precursores dentro de una misma sustancia.

3.4.4.1. Equipo HPLC-MS/MS

⊕ HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (**Figura 41**) equipado con:

- Micro-automuestreador termostaticado G1377A (Agilent Technologies).
- Bomba capilar G1376A (Agilent Technologies).
- Compartimento termostaticado para columnas de HPLC G1316A (Agilent Technologies).
- Espectrómetro de masas tipo trampa de iones modelo Trap XCT Plus G2447A (Agilent Technologies).

- Columna específica para la separación y análisis de péptidos BEH300 C18 (Waters Xbridge (5 μm , 150 x 1 mm)).



Figura 41. Sistema HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) con detector MS-MS Trap XCT Plus G2447A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

3.4.4.2. Condiciones cromatográficas

Se inyectó 40 μl de las alícuotas de cada una de las 80 muestras ($n=80$) del estudio del IPM y de las 45 muestras del estudio de patologías previas ($n=45$) en un sistema formado por un HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) con una columna de HPLC específica para la separación y análisis de péptidos (Waters Xbridge BEH300 C18 (5 μm , 150 x 1 mm). El flujo utilizado fue de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ y tras la inyección la columna se lavó con 100% tampón A (agua MilliQ:acetonitrilo:ácido fórmico, 94.9:5:0.1) durante 10 min. A continuación los péptidos se separaron en un gradiente lineal de 0-80% de tampón B (agua MilliQ:acetonitrilo:ácido fórmico, 9.9:90:0.1) de 180 minutos de duración. Finalmente, la columna recuperó las condiciones iniciales durante 15 minutos antes de un nuevo análisis.

El espectrómetro de masas opera en modo positivo con las siguientes condiciones de la fuente electrospray (ESI): voltaje del capilar de 3500 V, presión de 15 psi, flujo de 5 l/min y temperatura de 350°C. Además, mide a una velocidad de 8100 (m/z)/seg en el rango de tamaño de 50-2200 m/z, con una diana óptima de medida de 1000 m/z y un promedio de 3 espectros.

Los datos obtenidos del espectrómetro de masas (MS) y del espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) se recogieron en modo AutoMS, de forma que tras cada *scan* sencillo, los cinco iones más intensos se sometieron a aislamiento y fragmentación por disociación inducida por colisión con helio (CID) con una anchura de aislamiento de 2 m/z y una energía de colisión relativa de 35%.

3.4.4.3. Procesamiento de los datos proteómicos

Los péptidos obtenidos vía HPLC-MS/MS fueron buscados en “National Center for Biotechnology Information (NCBI) database” según coincidencias con secuencias de proteínas primarias utilizando el DataAnalysis para LC/MSD Trap Versión 3.3 (Bruker Daltonik, GmbH, Alemania) y Spectrum Mill MS Proteomics Workbench (Rev A.03.02.060B, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). El criterio de selección y validación que se empleó fue el de Mill (Kapp y cols., 2005) (**Tabla 13**), lo que nos permite conocer con un grado de confianza la presencia del péptido en las muestras de estudio.

En este caso, se incluyeron los péptidos cuya puntuación oscilaba entre 8-10 y superior a 10 y presentaban un pico de intensidad superior al 70% y se excluyeron los péptidos con puntuaciones inferiores.

Tabla 13. Criterios de confianza para la validación de péptidos en el Espectro Mill (Kapp y cols., 2005).

Puntuación del péptido	SPI %	Interpretación	Confianza
> 10	> 70	Muy probablemente sea válida	Excelente
8-10	> 70	Probablemente sea válida	Buena
5-8	> 70	Nuevo examen, validación manual	Moderada
< 5	> 70	Poca o ninguna fragmentación	Mediocre
< 5	< 70	Corriente significativa de iones sin asignar	Pobre

SPI %: Pico de intensidad marcado.

3.5. Método estadístico

El análisis estadístico de los datos de nuestro estudio se llevó a cabo mediante el programa estadístico IBM® SPSS® Statistics 21. Los análisis que se efectuaron se recogen a continuación.

Realizamos un análisis estadístico de las concentraciones de biomarcadores en las muestras de restos óseos y su relación con el IPM que comprendía análisis descriptivo, análisis de comparación de medias, análisis de correlación, análisis de regresión lineal, análisis de regresión múltiple y, por último, análisis discriminante.

Por otro lado, la estadística aplicada al estudio de biomarcadores de restos óseos asociados a enfermedades fue un análisis descriptivo.

3.5.1. Análisis descriptivo de los datos

La primera etapa de un análisis estadístico se basa en la estadística descriptiva, que se ocupa de la recogida, ordenación, simplificación y análisis de los datos procedentes de una muestra y está diseñada para variables cuantitativas continuas. Este análisis nos proporciona una idea de la forma que tienen los datos: su posible distribución de probabilidad con sus valores de tendencia central (media y mediana) y los parámetros de dispersión (desviación típica, rango, mínimo y máximo).

3.5.1.1. Valores de tendencia central

Que consta de los siguientes estadísticos que han sido usados en este estudio son:

- ⊕ **Media:** Muestra el promedio aritmético; siendo la suma de los casos dividida por el número de casos.
- ⊕ **Mediana:** Valor por encima y por debajo del cual se encuentran la mitad de los casos; el percentil 50. Cuando el número de observaciones es par, la mediana es el promedio de las dos observaciones centrales, una vez que han sido ordenadas de manera ascendente o descendente. La mediana es una medida

de tendencia central que no es sensible a los valores atípicos (a diferencia de la media, que puede resultar afectada por unos pocos valores extremadamente altos o bajos).

3.5.1.2. Valores de dispersión

Los estadísticos que miden la dispersión o variación en los datos incluyen la desviación típica, el rango, el mínimo y el máximo.

- ⊕ **Desviación estándar:** Medida de dispersión en torno a la media. Raíz cuadrada de la varianza. Mide el grado en que las puntuaciones de la variable se alejan de su media. En una distribución normal, el 68% de los casos se encuentra dentro de una desviación típica de la media y el 95% queda entre dos desviaciones típicas.
- ⊕ **Rango:** Diferencia entre los valores mayor y menor de una variable numérica; el máximo menos el mínimo.
- ⊕ **Mínimo:** Valor más pequeño de una variable numérica.
- ⊕ **Máximo:** El mayor valor de una variable numérica.

En nuestro estudio se proponen estadísticos descriptivos distintos según las variables en cuestión, tales como medidas de tendencia central y valores de dispersión, todos ellos valores que proporcionan información sobre las diferencias entre la población de estudio.

A continuación, se explica la segunda etapa del análisis estadístico que consiste en la estadística inferencial, que se ocupa de extraer conclusiones de una población desconocida a partir de los datos de una muestra representativa conocida, por medio de la teoría de probabilidades.

3.5.2. Análisis de comparación de medias

Las pruebas de comparación de medias tienen como objetivo comparar las medias de más de dos poblaciones o condiciones experimentales o, dicho de otro modo, comprobar si una o varias variables independientes influyen o afectan a una variable dependiente. En todos los casos, la variable dependiente tiene que ser cuantitativa (medida en una escala de intervalo, al menos), mientras que las variables independientes, o factores, son cualitativas.

Antes de realizar cualquier análisis estadístico se deben tener presentes las condiciones de aplicación del mismo, es decir, que distribución siguen las variables estadísticas. Para ello se aplicará la prueba estadística de Normalidad, prueba de Kolmogorov – Smirnov (la hipótesis nula que se contrasta es que los datos muestrales proceden de poblaciones normales).

- ✦ **Métodos estadísticos paramétricos:** Cuando las variables estudiadas presentan una distribución normal, aquella en la que los datos de las variables se agrupan de forma simétrica alrededor de la media aritmética en forma de campana y es asintótica respecto al eje de abscisas. Presenta dos puntos de inflexión que coinciden con la desviación típica y el área total bajo la curva es igual a uno.
- ✦ **Métodos estadísticos no paramétricos:** Aquellas en las que no existen supuestos sobre la distribución de los parámetros de la población, por lo tanto, se emplean cuando las variables estudiadas no presentan una distribución normal. Para comprobar si las variables estudiadas siguen una distribución normal o no, como se mencionó anteriormente, se realiza el Test de Kolmogorov-Smirnov.

Si los supuestos de normalidad y homocedasticidad requeridos para la realización de tests paramétricos son rechazados, como en nuestra investigación, donde el Test de Kolmogorov-Smirnov confirma que las variables estudiadas no seguían una distribución normal, se procede a la realización de tests no paramétricos que incluyen la prueba de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney, donde se han considerado diferencias estadísticamente significativas para una probabilidad $p \leq 0.05$.

- ✦ **Test U de Mann-Whitney:** Estadístico propuesto para la prueba entre la “dispersión” o “variabilidad” de 2 poblaciones, es decir, es utilizado para comparar las medias de dos poblaciones, asumiendo que se dispone de una muestra de cada población, y los datos contienen una variable cuantitativa (variable dependiente) y una variable de agrupamiento (variable independiente) que pueden tener tamaños distintos. Es la versión no paramétrica de la prueba t de Student. En nuestro estudio se utiliza para comparar los valores obtenidos de los biomarcadores entre los grupos de IPM.
- ✦ **Test de Kruskal-Wallis:** Test no paramétrico utilizado para comparar los valores de variables cuantitativas u ordinales de tres o más muestras independientes. Es una extensión de la prueba de la U de Mann-Whitney para 3 o más grupos. Es la versión no paramétrica del análisis de la varianza simple (ANOVA) y realiza el contraste, de forma simultánea, de si las k muestras proceden de la misma población o de poblaciones idénticas con la misma mediana. El único supuesto necesario es que las distribuciones subyacentes de las variables sean continuas y que éstas hayan sido medidas por lo menos en una escala ordinal. En nuestro estudio se utiliza para comparar los valores obtenidos en los distintos intervalos postmortem.

Como gráfico representativo de estas diferencias entre medias, encontramos, por un lado, los diagramas de caja que muestran los grupos definidos por una variable de factor respecto a una variable dependiente. Esta disposición es particularmente útil cuando las variables representan una misma característica medida en momentos distintos y representan la mediana, los cuartiles 1 y 3, y los valores mínimo y máximo. Por otro lado, disponemos de gráficos de barras, donde se comparan medias entre una o varias variables dependientes respecto a la variable definida por grupos.

3.5.3. Análisis de correlación

El concepto de relación o correlación entre dos variables se refiere al grado de parecido o variación conjunta existente entre las mismas. El procedimiento de correlaciones bivariadas calcula el coeficiente de correlación de Pearson, la rho de Spearman y la tau-b de Kendall con sus niveles de significación. Las correlaciones miden cómo están relacionadas las variables cuantitativas o los órdenes de los rangos.

El grado de relación lineal entre las variables puede estar entre -1 (una relación negativa perfecta) y $+1$ (una relación positiva perfecta). Un valor 0 indica que no existe una relación lineal.

Los dos coeficientes de correlaciones más usados son:

- ✦ **Pearson:** Es una medida de la asociación lineal entre dos variables. Los valores del coeficiente de correlación van de -1 a $+1$. El signo del coeficiente indica la dirección de la relación y su valor absoluto indica la fuerza. Los valores mayores indican que la relación es más estrecha.
- ✦ **Spearman:** Versión no paramétrica del coeficiente de correlación de Pearson, que se basa en los rangos de los datos en lugar de hacerlo en los valores reales. Resulta apropiada para datos ordinales, o los de intervalo que no satisfagan el supuesto de normalidad. Los valores del coeficiente van de -1 a $+1$. El signo del coeficiente indica la dirección de la relación y el valor absoluto del coeficiente de correlación indica la fuerza de la relación entre las variables. Los valores absolutos mayores indican que la relación es mayor.

Las propiedades que presenta el coeficiente de correlaciones son las siguientes:

1. El valor del coeficiente de correlación es independiente de cualquier unidad usada para medir las variables.
2. El valor del coeficiente de correlación se altera de forma importante ante la presencia de un valor extremo, como sucede con la desviación típica. Ante estas situaciones conviene realizar una transformación de los datos que cambia la escala de medición y modera el efecto de los valores extremos (transformación logarítmica).
3. El coeficiente de correlación mide sólo la relación con una línea recta. Dos variables pueden tener una relación curvilínea fuerte a pesar de que su correlación sea pequeña. Por tanto, cuando analizamos las relaciones entre dos variables debemos representarlas gráficamente.

4. El coeficiente de correlación no se debe extrapolar más allá del rango de valores observado de las variables a estudio ya que la relación existente entre X e Y puede cambiar fuera de dicho rango.
5. La correlación no implica causalidad. La causalidad es un juicio de valor que requiere más información que un simple valor cuantitativo de un coeficiente de correlación.

La población de nuestra investigación no seguía una distribución normal como se mencionó anteriormente, además de que las variables no presentaban una relación lineal, por lo que se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman, coeficiente de correlación que estudia la relación entre dos variables aleatorias continuas y que tiene el mismo significado que el coeficiente de Pearson.

En este caso se pretendía estudiar la existencia de correlaciones de tipo positivo o negativo entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos de la investigación y el intervalo de tiempo postmortem.

3.5.4. Análisis de regresión

El análisis de la regresión consiste en encontrar la mejor función o modelo que explica el comportamiento de una variable Y, llamada respuesta o variable dependiente en función de una variable X, llamada explicativa o variable independiente consideradas sobre la misma población de objeto de estudio.

Por tanto, las respuestas a las que trata de contestar el análisis de regresión son:

- ⊕ Si las variables están realmente relacionadas entre sí o si, por el contrario, pueden considerarse independientes.
- ⊕ Si existe dependencia, para ello es necesario conocer el "grado de relación", así como el "tipo" de relación entre ambas.

- ✦ Si puede predecirse la variable que es considerada como dependiente a partir de los valores de la otra, que es considerada independiente, y si es así, con qué precisión.

En el caso que nos ocupa, las muestras no siguen un modelo lineal por lo se usó el procedimiento de estimación curvilínea que genera resultados de regresión y gráficos relacionados para 11 modelos diferentes de estimación curvilínea por regresión y se produce un modelo diferente para cada variable dependiente.

Se puede seleccionar uno o más modelos de estimación curvilínea por regresión. Para determinar qué modelo utilizar y que represente los datos, obteniendo así una ecuación que se ajuste al modelo matemático.

En nuestro estudio se realizó la estimación de los distintos modelos de ajuste (lineal, exponencial, logarítmico, etc.) de las fórmulas de representación gráfica de la regresión, de una variable dependiente, la data, en relación con cada una de las variables definidas como independientes que presentaron correlación entre los parámetros bioquímicos de estudio y el IPM, de forma general y posteriormente de forma agrupada por rangos de IPM.

3.5.5. Análisis de regresión múltiple

El análisis de regresión lineal múltiple es una técnica estadística utilizada para estudiar la relación entre más de dos variables cuantitativas y se utiliza para explorar y cuantificar la relación entre una variable llamada dependiente o criterio (Y) y una o más variables llamadas independientes, predictoras o explicativa (X_1, X_2, \dots, X_p), así como para desarrollar una ecuación con fines predictivos.

Los estadísticos de regresión lineal múltiple que empleamos en el estudio fueron:

- ✦ Coeficientes de regresión: Se obtienen tanto las estimaciones de los coeficientes de regresión, la bondad del ajuste del modelo elegido, los intervalos de confianza de cada coeficiente así como la matriz de covarianzas.
 - Estimaciones: nos muestra coeficientes de regresión y medidas relacionadas. Los coeficientes no estandarizados (no tipificados) son los

coeficientes de regresión parcial que definen la ecuación de regresión en puntuaciones directas. Los coeficientes estandarizados (β) son los coeficientes que definen la ecuación de regresión en puntuaciones típicas. Estos coeficientes estandarizados ayudan a valorar la importancia relativa de cada variable independiente dentro de la ecuación. Muestra las pruebas de significación de cada coeficiente, el estadístico de contraste (t) así como su nivel crítico (Sig.). Una significación pequeña nos permite afirmar que el coeficiente es significativo.

- ⊕ Ajuste del modelo. Muestra el coeficiente de correlación múltiple (R múltiple), y su cuadrado (R^2), coeficiente de determinación, que expresa la proporción de varianza de la variable dependiente que está explicada por la variable o variables independientes), la R^2 corregida y el error típico de la estimación (desviación típica de los residuos). También, una tabla de ANOVA muestra las sumas de cuadrados, los grados de libertad, las medias cuadráticas, el valor del estadístico F y el nivel crítico (Sig.) de la F.
- ⊕ Cambio en R cuadrado. Nos muestra el cambio en el estadístico R cuadrado que se produce al añadir o eliminar una variable independiente. Si el cambio en R cuadrado asociado a una variable es grande, significa que esa variable es un buen predictor de la variable dependiente.
- ⊕ Correlaciones parcial y semiparcial. Muestra las correlaciones de orden cero, semiparcial y parcial. Los valores del coeficiente de correlación van de -1 a 1. El signo del coeficiente indica la dirección de la relación y su valor absoluto indica la fuerza de la relación. Los valores mayores indican que la relación es más estrecha.

En nuestro estudio, realizamos el análisis de regresión lineal múltiple para detectar variables explicativas a partir de la concentración de los elementos biológicos de estudio como variables independientes, que fueron utilizadas para predecir el valor de la variable dependiente, IPM. Este método nos ayuda a crear un modelo donde se seleccionan las variables que pueden influir en la respuesta, descartando aquellas que no aportan información.

3.5.6. Análisis discriminante

El análisis discriminante es un método estadístico a través del cual se busca conocer qué variables, medidas en objetos o individuos, explican mejor la atribución de la diferencia de los grupos a los cuales pertenecen dichos individuos o muestras. Es una técnica que nos permite comprobar hasta qué punto las variables independientes consideradas en la investigación clasifican correctamente a los sujetos u objetos. Estableciendo a priori la pertenencia al grupo de cada sujeto o muestra.

El análisis discriminante es la prueba estadística apropiada para seleccionar qué variables independientes o predictivas permiten diferenciar grupos y cuántas de estas variables son necesarias para alcanzar la mejor clasificación posible. Además permite cuantificar su poder de discriminación en la relación de pertenencia de un sujeto u objeto a un grupo u otro. Por ello esta técnica es considerada, además de una prueba de clasificación, una prueba de dependencia. De hecho, su propósito es similar al análisis de regresión logística; la diferencia radica en que solo admite variables cuantitativas.

Es una técnica multivariante orientada fundamentalmente a lograr dos objetivos básicos:

- ✦ Explicar la influencia de un conjunto de variables cuantitativas sobre una variable cualitativa.
- ✦ Predecir la pertenencia de los sujetos a una de las categorías de la variable criterio a partir de los valores registrados en las variables predictivas.

La variable dependiente es categórica y tiene como categorías la etiqueta de cada uno de los grupos, y las variables independientes son continuas y determinan a qué grupos pertenecen los objetos. Con estos atributos medidos se forma una combinación lineal de variables predictivas para que maximice las diferencias entre los grupos y pueda construir así un modelo predictivo para clasificar nuevos casos al grupo de pertenencia.

Por tanto, el análisis discriminante será usado para:

- ⊕ Determinar si existen diferencias significativas entre los “perfiles” de un conjunto de variables de dos o más grupos definidos a priori.
- ⊕ Seleccionar las variables de predicción que contribuyen en mayor medida a explicar las diferencias entre los grupos.
- ⊕ Establecer un procedimiento para clasificar a un individuo a partir de los valores de un conjunto de variables independientes.

Y tras su aplicación se podrá:

- ⊕ Evaluar la exactitud de la clasificación en una tabla cruzada en la que se compara la pertenencia real de los individuos a un grupo con el pronóstico de pertenencia.
- ⊕ Identificar qué variables independientes tienen mayor poder de discriminación y de predicción en la clasificación de sujetos.
- ⊕ Obtener una ecuación denominada ‘función discriminante’ que exprese la combinación lineal de las variables predictivas (denominadas variables canónicas) y permita construir una regla de decisión que asigne un objeto nuevo a uno de los grupos prefijados con un cierto grado de riesgo.

El análisis discriminante resulta útil por tanto en situaciones en las que se desea construir un modelo predictivo para pronosticar el grupo de pertenencia de un caso a partir de las características observadas de cada caso. Así, ayuda a identificar las características que diferencian a dos o más grupos y a crear una función capaz de distinguir con la mayor precisión posible a los miembros de uno u otro grupo.

En nuestro estudio, realizamos el análisis discriminante, por un lado, con las variables independientes que mejor predecían la pertenencia a uno de los dos grupos de intervalos postmortem. De otro lado, se realizó el análisis discriminante tomando todas las variables independientes juntas, los parámetros bioquímicos del estudio, cuando se trató de dos grupos de IPM y de cuatro intervalos postmortem.

4. RESULTADOS

4.1. Determinación de integridad de ADN de muestras de restos óseos

Para conocer la calidad e integridad del ADN de las muestras se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Cuando se observa el ADN en agarosa y está íntegro y en buen estado, se observa una banda estrecha y nítida que recorre poca distancia desde el punto de aplicación de la muestra por tratarse de ADN de alto peso molecular, es decir, de gran tamaño. Por el contrario, cuando el ADN está fragmentado, aparece en el gel una “cola de degradación” (“smear”) debido a que existen fragmentos de diferentes tamaños con distinta movilidad electroforética.

La **Tabla 14** presenta las concentraciones (ng/g hueso) mínimas, medias y máximas de ADN en las muestras de los restos óseos y el número de muestra en la que se detecta dicha concentración, según los 4 IPM establecidos: IPM entre 5-10 años, IPM entre 11-19 años, IPM entre 20-30 años e IPM superior a 30 años. En ella podemos observar las muestras con mayores concentraciones de ADN (muestras 2, 11, 27 y 76), las muestras con concentraciones medias (7, 17, 47 y 77) y las muestras con menores concentraciones (6, 15, 57 y 62), en los distintos grupos de IPM.

Tabla 14. Análisis de las concentraciones mínimas, medias y máximas de ADN analizadas en el total de muestras de hueso (N=80) respecto a los 4 grupos de IPM.

Grupos de IPM (años) (N=80)	Concentración* mínima ADN (ID muestra)	Concentración* media ADN (ID muestra)	Concentración* máxima ADN (ID muestra)
G1: 5-10 años (n=10)	1.141 (6)	9.581 (7)	26.560 (2)
G2: 11-19 años (n=10)	2.360 (15)	4.351 (17)	10.577 (11)
G3: 20-30 años (n=40)	0.368 (57)	7.259 (47)	14.114 (27)
G4: > 30 años (n=20)	3.017 (62)	6.605 (77)	10.514 (76)

Concentración*: ng ADN/g hueso; ID muestra: Número de identificación de la muestra; n: Tamaño muestral de cada grupo; N: Tamaño muestral total.

En la **Figura 42** se observan las bandas electroforéticas de ADN obtenido de las muestras de restos óseos según los 4 IPM establecidos. En ella se evidencia que las muestras con una buena integridad del ADN presentan bandas bien definidas e intensas

4. Resultados

sin perfil de degradación. Sin embargo, se observan otras muestras más degradadas que presentan cola de degradación.

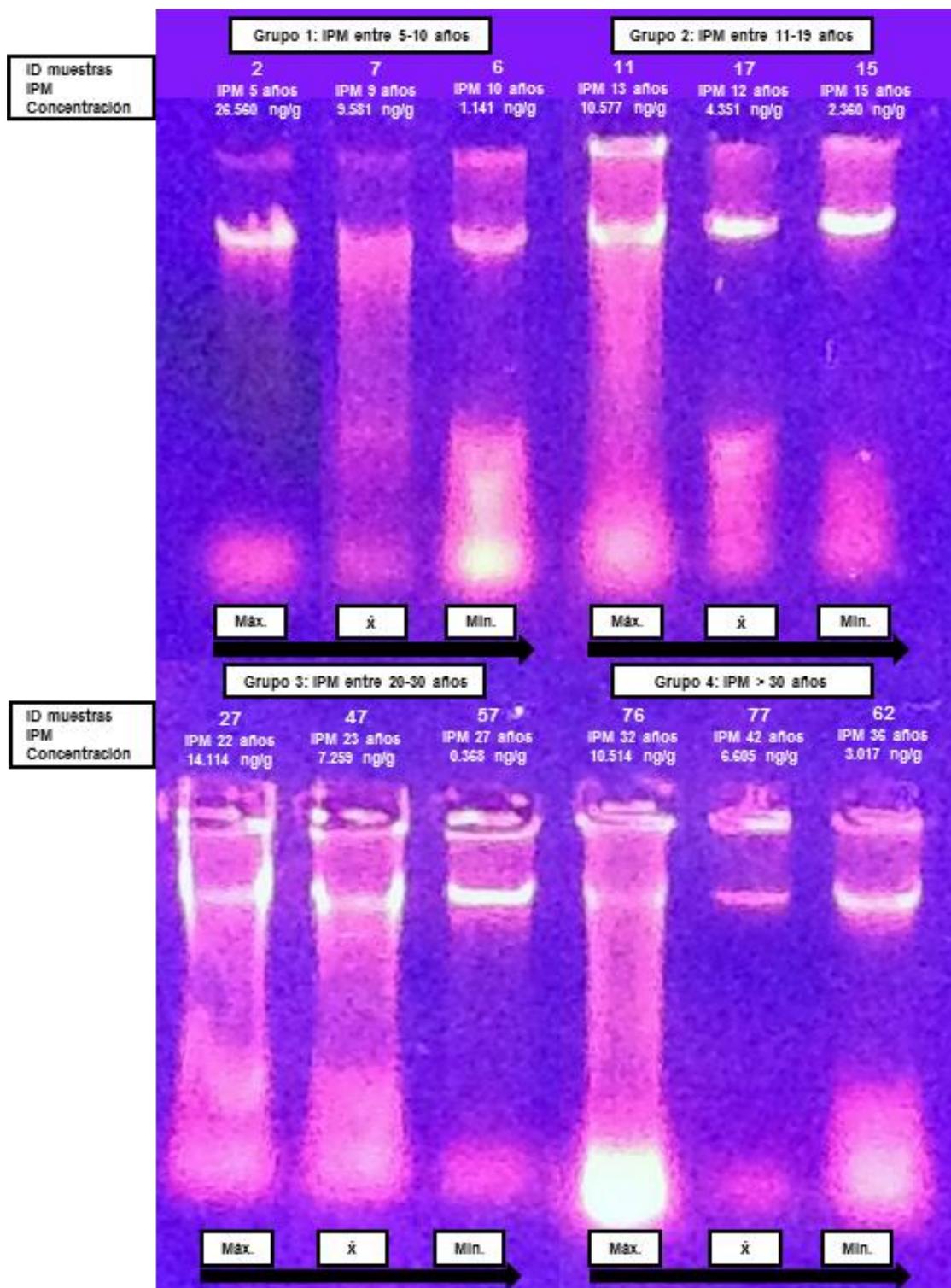


Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de extracciones de ADN procedentes de restos óseos. ID muestras 2, 11, 27 y 76 presentan la máxima concentración (ng/g) de ADN; ID muestras 7, 17, 47 y 77 presentan la concentración media (ng/g) de ADN; ID muestras 6, 15, 57 y 62 presentan la menor concentración (ng/g) de ADN según los 4 IPM establecidos en el estudio.

4.2. Análisis descriptivo de las muestras óseas para el estudio del intervalo postmortem

4.2.1. Sexo, edad y tipo de hueso de los restos óseos

La muestra está formada por 80 restos óseos, de los cuales, solamente en 77 de ellos (96.25%) disponíamos de información acerca del sexo del sujeto fallecido, de los cuales, 50 eran hombres (62.5%), 27 eran mujeres (33.75%) y en 3 de los casos se desconocía el sexo del sujeto (3.75%).

En relación a la edad del fallecido, se obtuvo información de un 76.3% (n=61). La edad media de los sujetos (\pm DE) fue de 68.31 ± 18.02 años (rango: 20-97 años).

La **Tabla 15** recoge los valores descriptivos de la edad (n=61, 76.3%) de los sujetos en función del sexo (hombres (n=40, 50.0%) y mujeres (n=21, 26.3%)). Las mujeres presentan una edad de fallecimiento significativamente superior (75.19 ± 19.57 (media \pm DE)) a la de los varones 64.70 ± 16.26 (media \pm DE)) ($p=0.002$).

Tabla 15. Valores descriptivos de la edad distribuidos en función del sexo (N=61).

	Sexo	Años (Media \pm DE)	p^*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
Edad	Hombre (n=40, 50.0%)	64.70 ± 16.26	0.002	67.00	20	93	59.50	69.90
	Mujer (n=21, 26.3%)	75.19 ± 19.57		84.00	21	97	66.28	84.10
Edad total	61 (76.3%)	68.31 ± 18.02		71.00	20	97	63.70	72.93

DE: Desviación estándar; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total; n: Tamaño muestral de cada grupo; p^* : Nivel de significación inferior a 0.05 (*Test de *Mann-Whitney*).

La **Tabla 16** muestra las frecuencias del tipo de los restos óseos (N=80, 100%) en función del sexo (hombres (n=50, 62.5%) y mujeres (n=27, 33.8%)). En ambos casos el tipo de hueso está igualmente representado en hombres y mujeres, ya que encontramos mayoría de fémures tanto en hombres (n=45, 56.3%) como en mujeres (n=25, 31.3%) y menor número de tibias y húmeros en ambos sexos. Solamente en 3 muestras correspondientes a fémures no se pudo conocer el sexo del fallecido.

4. Resultados

Tabla 16. Frecuencias de los distintos restos óseos analizados en función del sexo.

		Sexo		
		Hombre	Mujer	Sin Datos
		N=77 (96.3%)		
		n=50 (62.5%)	n=27 (33.8%)	n=3 (3.8%)
Tipo de hueso N=80 (100%)	Fémur n=73 (91.3%)	45 (56.3%)	25 (31.3%)	3 (3.8%)
	Tibia n=5 (6.2%)	3 (3.8%)	2 (2.5%)	0 (0.0%)
	Húmero n=2 (2.5%)	2 (2.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

N: Tamaño total de la muestra; n: tamaño muestral correspondiente a cada grupo analizado.

Del total de muestras con sexo conocido (N=77, 96.3%), realizamos un análisis descriptivo de la variable IPM en función del sexo, donde se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos parámetros (**Tabla 17**). El IPM en mujeres (27.38 ± 10.24 (media \pm DE)) fue significativamente superior ($p=0.028$) al de los varones (22.58 ± 10.57 (media \pm DE)).

Tabla 17. Análisis del IPM en el total de muestras de hueso (N=80) respecto al sexo.

	Sexo	Años (Media \pm DE)	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
IPM	Hombre (n=50, 62.5%)	22.58 \pm 10.57	0.028	21.50	5	45	19.20	25.95
	Mujer (n=27, 33.8%)	27.38 \pm 10.24		26.00	7	47	22.72	32.02

DE: Desviación estándar; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total; n: Tamaño muestral de cada grupo; p*: Nivel de significación inferior a 0.05 (*Test de *Mann-Whitney*).

La **Tabla 18** muestra las concentraciones de todos los parámetros bioquímicos en función del sexo en el total de la muestra con sexo conocido, donde no se presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Aunque obtuvimos mayores concentraciones de adenina (7.241 ± 5.079), guanina (4.702 ± 3.923), purinas (11.943 ± 9.607), citosina (4.012 ± 2.906), timina (5.040 ± 3.012) y pirimidinas (9.052 ± 5.218) en varones que en mujeres.

Sin embargo, encontramos mayores concentraciones de ADN (9.077 ± 6.609), hipoxantina (3.712 ± 2.696), xantina (5.279 ± 3.234), cociente entre pirimidinas y purinas (1.461 ± 1.232) y cociente entre pirimidinas y purinas (1.722 ± 1.058) en mujeres que en hombres.

Tabla 18. Análisis de la concentración de ADN y bases nitrogenadas respecto al total de muestras de hueso con sexo conocido (N=77) según hombres y mujeres.

	Sexo	Concentración media* (ng/g hueso)	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
ADN	Hombre (n=50)	5.828 ± 4.521	n.s.	4.514	0.583	23.200	4.039	7.616
	Mujer (n=27)	9.077 ± 6.609		10.000	0.386	26.174	5.555	12.599
Adenina	Hombre (n=50)	7.241 ± 5.079	n.s.	5.932	0.586	18.454	4.232	9.250
	Mujer (n=27)	5.558 ± 5.336		4.129	0.476	16.916	2.714	8.401
Guanina	Hombre (n=50)	4.702 ± 3.923	n.s.	2.538	0.075	23.345	2.358	7.044
	Mujer (n=27)	3.264 ± 2.092		1.817	0.174	21.254	0.551	5.978
PUR	Hombre (n=50)	11.943 ± 9.607	n.s.	8.020	1.393	38.540	8.141	15.743
	Mujer (n=27)	8.822 ± 7.643		5.274	2.658	5.988	3.684	13.960
Citosina	Hombre (n=50)	4.012 ± 2.906	n.s.	2.978	0.608	10.440	2.862	5.161
	Mujer (n=27)	2.340 ± 2.176		1.985	0.256	9.031	1.180	3.499

4. Resultados

Tabla 18. (Continuación).

	Sexo	Concentración media* (ng/g hueso)	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
Timina	Hombre (n=50)	5.040 ± 3.012	n.s.	4.056	0.911	13.162	3.848	6.232
	Mujer (n=27)	4.681 ± 2.722		4.967	0.248	9.075	2.229	6.131
PYR	Hombre (n=50)	9.052 ± 5.218	n.s.	7.675	1.647	19.174	6.987	11.116
	Mujer (n=27)	7.020 ± 4.313		6.455	1.084	18.106	4.172	9.319
HX	Hombre (n=50)	3.468 ± 2.459	n.s.	2.863	0.847	9.816	2.495	4.441
	Mujer (n=27)	3.712 ± 2.696		3.266	0.363	9.172	2.282	5.156
Xantina	Hombre (n=50)	4.538 ± 2.731	n.s.	3.929	0.609	9.727	2.457	5.618
	Mujer (n=27)	5.279 ± 3.234		5.004	0.387	10.603	3.555	7.003
PYR/PUR	Hombre (n=50)	1.043 ± 0.782	n.s.	0.837	0.339	3.731	0.733	1.353
	Mujer (n=27)	1.461 ± 1.232		1.121	0.125	3.780	0.804	2.118
PUR/PYR	Hombre (n=50)	1.406 ± 0.773	n.s.	1.195	0.268	2.952	1.099	1.711
	Mujer (n=27)	1.722 ± 1.058		0.901	0.265	8.027	0.626	2.820

* (Media ± DE); DE: Desviación estándar; HX: Hipoxantina; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total; n: Tamaño muestral de cada grupo; n.s.: No significativo; p*: Nivel de significación inferior a 0.05 (*Test de *Mann-Whitney*); PUR: Purinas (Adenina+Guanina); PYR: Pirimidinas (Citosina+Timina); PUR/PYR: Cociente entre purinas y pirimidinas; PYR/PUR: Cociente entre pirimidinas y purinas.

En el análisis descriptivo del número de péptidos de colágeno tipo I en función del sexo en el total de la muestra con sexo conocido, encontramos la misma cantidad de péptidos de colágeno tipo I indistintamente en hombre y mujeres (0.44 ± 0.351), sin diferencia estadísticamente significativa entre ellos (**Tabla 19**).

Tabla 19. Análisis del número de péptidos de colágeno tipo I respecto al total de muestras de hueso con sexo conocido (N=77) según hombres y mujeres.

	Sexo	Número de péptidos/g hueso*	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
Péptidos Colágeno I	Hombre (n=50)	0.44 ± 0.351	n.s.	0.00	0	3	0.15	0.74
	Mujer (n=27)	0.44 ± 0.351		0.00	0	7	-0.50	1.37

* (Media ± DE); DE: Desviación estándar; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total; n: Tamaño muestral de cada grupo; n.s.: No significativo; p*: Nivel de significación inferior a 0.05 (*Test de *Mann-Whitney*).

A continuación, en las **Tablas 20** y **21** se muestran los valores descriptivos de las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas y número de péptidos de colágeno tipo I respecto al tipo de hueso del que procedían (N=80). En ellas podemos observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el tipo de hueso empleado y las concentraciones de biomoléculas.

Tabla 20. Análisis de la concentración de ADN y bases nitrogenadas según el tipo de hueso (N=80).

	Tipo de hueso	Concentración media* (ng/g hueso)	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
ADN	Fémur (n=73)	6.964 ± 4.587	n.s.	5.046	0.386	26.560	5.200	8.728
	Tibia (n=5)	5.051 ± 4.109		5.051	0.731	9.371	4.984	5.994
	Húmero (n=2)	9.243 ± 0.788		9.243	8.686	9.800	2.164	16.322
Adenina	Fémur (n=73)	6.803 ± 5.075	n.s.	5.602	0.476	18.454	5.201	8.405
	Tibia (n=5)	8.439 ± 7.570		8.439	2.380	14.500	6.855	8.654
	Húmero (n=2)	3.434 ± 2.733		3.434	1.501	5.366	2.112	3.798

4. Resultados

Tabla 20. (Continuación).

	Tipo de hueso	Concentración media* (ng/g hueso)	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
Guanina	Fémur (n=73)	4.101 ± 3.743		1.842	0.075	23.345	2.288	5.914
	Tibia (n=5)	3.802 ± 2.899	n.s.	3.802	1.045	6.559	3.123	3.884
	Húmero (n=2)	3.534 ± 1.407		3.534	2.539	4.530	-9.115	16.183
PUR	Fémur (n=73)	10.904 ± 9.611		7.419	1.393	38.540	7.871	13.938
	Tibia (n=5)	12.243 ± 11.469	n.s.	12.242	3.425	21.059	9.978	12.427
	Húmero (n=2)	6.968 ± 4.141		6.968	4.040	9.896	4.024	7.417
Citosina	Fémur (n=73)	3.539 ± 2.808		2.722	0.256	10.440	2.652	4.426
	Tibia (n=5)	2.706 ± 1.562	n.s.	2.706	1.601	3.811	1.133	3.744
	Húmero (n=2)	1.937 ± 1.426		1.937	0.929	2.946	1.087	4.754
Timina	Fémur (n=73)	5.124 ± 2.964		4.801	0.248	13.162	4.187	6.059
	Tibia (n=5)	5.712 ± 2.341	n.s.	5.712	4.056	7.367	5.324	6.748
	Húmero (n=2)	2.400 ± 0.702		2.400	1.904	2.897	3.910	8.711
PYR	Fémur (n=73)	8.663 ± 5.009		7.544	1.084	19.174	7.082	10.243
	Tibia (n=5)	8.417 ± 3.903	n.s.	8.417	5.657	11.178	6.656	9.435
	Húmero (n=2)	4.338 ± 0.724		4.338	3.826	4.850	2.168	10.844

Tabla 20. (Continuación).

	Sexo	Concentración media* (ng/g hueso)	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
HX	Fémur (n=73)	3.424 ± 2.469		2.863	0.363	9.816	2.644	4.203
	Tibia (n=5)	5.706 ± 3.964	n.s.	5.706	2.903	8.509	4.991	7.413
	Húmero (n=2)	2.924 ± 1.964		2.924	2.903	2.944	2.667	3.179
Xantina	Fémur (n=73)	4.967 ± 2.833		4.482	0.387	10.603	4.073	5.862
	Tibia (n=5)	6.278 ± 4.888	n.s.	6.278	2.822	9.735	5.376	8.501
	Húmero (n=2)	2.268 ± 1.330		2.268	1.328	3.209	1.968	4.221
PUR/PUR	Fémur (n=73)	1.228 ± 0.989		0.878	0.125	3.780	0.916	1.541
	Tibia (n=5)	1.018 ± 0.895	n.s.	1.018	0.385	1.652	0.703	1.907
	Húmero (n=2)	0.718 ± 0.323		0.718	0.490	0.947	0.218	0.632
PUR/PUR	Fémur (n=73)	1.489 ± 1.400		1.138	0.265	8.027	1.047	1.931
	Tibia (n=5)	1.603 ± 1.410	n.s.	1.603	0.605	2.600	1.107	3.271
	Húmero (n=2)	1.548 ± 0.696		1.548	1.056	2.040	1.471	2.780

* (Media ± DE); DE: Desviación estándar; HX: Hipoxantina; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total; n: Tamaño muestral de cada grupo; n.s.: No significativo; p*: Nivel de significación inferior a 0.05 (*Test de *Kruskal-Wallis*); PUR: Purinas (Adenina+Guanina); PYR: Pirimidinas (Citosina+Timina); PUR/PUR: Cociente entre purinas y pirimidinas; PYR/PUR: Cociente entre pirimidinas y purinas.

4. Resultados

Tabla 21. Análisis del número de péptidos de colágeno tipo I según el tipo de hueso (N=80).

	Tipo de hueso	Número de péptidos/g hueso*	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
Péptidos Colágeno I	Fémur (n=73)	0.44 ± 0.226		0.00	0	7	0.05	0.83
	Tibia (n=5)	-	n.s.	-	-	-	-	-
	Húmero (n=2)	0.50 ± 0.407		0.50	0	1	0.58	0.68

* (Media ± DE); DE: Desviación estándar; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total; n: Tamaño muestral de cada grupo; n.s.: No significativo; p*: Nivel de significación inferior a 0.05 (*Test de *Kruskal-Wallis*).

4.2.2. Intervalo postmortem

El rango del IPM de los restos óseos analizados oscilaba entre 5 años y 47 años, con una media de 23.83 ± 10.85 (media años ± DE) (**Tabla 22**).

Tabla 22. Valores descriptivos del IPM de los restos óseos analizados (N=80).

	Años	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
	(Media ± DE)				Inferior	Superior
IPM (N=80)	23.83 ± 10.85	22.50	5	47	21.41	26.24

DE: Desviación estándar; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total.

Se hicieron dos clasificaciones según el IPM, en primer lugar, atendiendo al contexto médico-legal del Sistema Jurídico Español, el cual establece la prescripción de los delitos a los 20 años (BOE. Núm. 281, 24 de noviembre de 1995).

1. Dos grupos de data, donde los distintos parámetros fueron analizados en función de dos grupos de IPM:
 - a. Grupo 1: IPM inferior a 20 años.
 - b. Grupo 2: IPM superior o igual a 20 años.

Como se muestra en la **Tabla 23**, observamos como la mayoría de casos correspondían a muestras con IPM igual o superior a 20 años (n=60, 75.0%) con una

media de IPM en años de 10.35 ± 3.03 (media \pm DE) y un menor número de casos con IPM inferior a 20 años ($n=20$, 25.0%) con una media de IPM en años de 28.32 ± 8.53 (media \pm DE).

Tabla 23. Valores descriptivos del IPM distribuidos según 2 grupos de IPM (N=80).

Grupos de IPM n (%)	Años (Media \pm DE)	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
					Inferior	Superior
G1: < 20 años n=20 (25.0%)	10.35 \pm 3.03	10.50	5	15	8.93	11.77
G2: \geq 20 años n=60 (75.0%)	28.32 \pm 8.53	25.00	20	47	26.11	30.52

DE: Desviación estándar; G1: < 20 años: Grupo 1: IPM inferior a 20 años; G2: \geq 20 años: Grupo 2: IPM superior a 20 años; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total; n: Tamaño muestral de cada grupo.

En segundo lugar, la clasificación se realizó teniendo en cuenta el proceso de diagénesis que sufren los restos óseos de diferentes IPM, el cual viene respaldado por diversos autores como Bass (1996), Berg y Specht, (1958) o Mueller (1953), que observan diferencias macroscópicas y microscópicas en los restos óseos cada diez años aproximadamente.

2. Clasificación en cuatro grupos de data de los restos óseos analizados:
 - a. Grupo 1: IPM entre 5-10 años.
 - b. Grupo 2: IPM entre 11-19 años.
 - c. Grupo 3: IPM entre 20-30 años.
 - d. Grupo 4: IPM superior a 30 años.

La **Tabla 24** muestra los valores descriptivos del IPM según los grupos establecidos. En ella observamos que el 50.0% de casos correspondían a muestras con IPM entre 20-30 años ($n=40$) con una media de IPM en años de 7.80 ± 1.62 (media \pm DE), un 25.0% de los casos pertenecían al grupo de IPM superior a 30 años ($n=20$) con una media de IPM en años de 39.25 ± 5.03 (media \pm DE) y un 12.5% de las muestras analizadas se encontraban entre IPM 5 y 10 años ($n=10$) con una media de años de 7.80 ± 1.62 (media \pm DE) y un cuarto grupo con un IPM entre 11 y 19 años ($n=10$) con una media de IPM en años de 12.90 ± 1.52 (media \pm DE).

Tabla 24. Valores descriptivos del IPM distribuidos según 4 grupos de IPM (N=80).

Grupos de IPM n (%)	Años (Media \pm DE)	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
					Inferior	Superior
G1: 5-10 años n=10 (12.5%)	7.80 \pm 1.62	7.00	5	10	6.64	8.64
G2: 11-19 años n=10 (12.5%)	12.90 \pm 1.52	12.00	11	15	11.81	13.99
G3: 20-30 años n=40 (50.0%)	22.85 \pm 2.39	22.50	20	27	22.09	23.61
G4: > 30 años n=20 (25.0%)	39.25 \pm 5.03	42.00	32	47	36.90	41.60

DE: Desviación estándar; G1: 5-10 años: Grupo 1: IPM entre 5-10 años; G2: 11-19 años: Grupo 2: IPM entre 11-19 años; G3: 20-30 años: Grupo 3: IPM entre 20-30 años; G4: > 30 años: Grupo 4: IPM superior a 30 años; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%, Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total; n: Tamaño muestral de cada grupo.

4. 3. Análisis de la concentración de ADN, bases nitrogenadas y número de péptidos de colágeno tipo I en el total de muestras óseas humanas respecto al intervalo postmortem total

La **Tabla 25** muestra los valores obtenidos (media, desviación estándar, rango e intervalo de confianza al 95% inferior y superior) de las concentraciones de los distintos parámetros bioquímicos medidos en los restos óseos en el total de la muestra.

Los resultados muestran que la concentración media de ADN es de 6.981 ± 5.444 ng/g de hueso (media \pm DE). Cuando analizamos las concentraciones de bases nitrogenadas observamos una mayor concentración de adenina (6.726 ng/g hueso) respecto a guanina (4.063 ng/g hueso) así como de timina (5.029 ng/g hueso) respecto a citosina (3.431 ng/g hueso).

Además, cuando analizamos globalmente la concentración de purinas y pirimidinas, encontramos una mayor concentración de purinas (adenina+guanina) (10.789 ng/g hueso) respecto a pirimidinas (citosina+timina) (8.459 ng/g hueso).

Por último, se analizaron las bases nitrogenadas sintetizadas *de novo*, y se presenta una mayor concentración de xantina (4.906 ng/g hueso) respecto a hipoxantina (3.503 ng/g hueso).

Tabla 25. Análisis de la concentración de ADN y bases nitrogenadas en el total de muestras de hueso (N=80).

N= 80	Concentración				IC 95%	
	media* (ng/g hueso)	Mediana	Mín.	Máx.	Inferior	Superior
ADN	6.981 ± 5.444	6.057	0.386	26.560	5.345	8.616
Adenina	6.726 ± 5.088	5.366	0.476	18.544	2.407	7.719
Guanina	4.063 ± 3.088	5.366	0.075	23.345	3.197	8.254
PUR	10.789 ± 9.416	7.419	1.393	38.540	7.959	13.618
Citosina	3.431 ± 2.721	2.722	0.256	10.440	2.613	4.249
Timina	5.029 ± 2.909	4.801	0.248	13.162	4.154	5.903
PYR	8.459 ± 4.896	7.523	1.084	19.174	6.988	9.930
Hipoxantina	3.503 ± 2.478	2.903	0.363	9.816	2.758	4.248
Xantina	4.906 ± 2.878	4.261	0.387	10.603	4.041	5.771
PYR/PUR	1.197 ± 0.961	0.878	0.125	3.780	0.908	1.485
PUR/PYR	1.497 ± 1.356	1.136	0.125	3.780	1.089	1.904

* (Media ± DE); DE: Desviación estándar; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total; PUR: Purinas (Adenina+Guanina); PYR: Pirimidinas (Citosina+Timina); PYR/PUR: Cociente entre pirimidinas y purinas; PUR/PYR: Cociente entre purinas y pirimidinas.

A continuación, la **Tabla 26** muestra los valores descriptivos del número de péptidos de colágeno tipo I identificados en los restos óseos en el total de la muestra, siendo la media y desviación estándar de 0.42 ± 1.177 n° de péptidos/g hueso.

4. Resultados

Tabla 26. Análisis del número de péptidos de proteínas de colágeno tipo I analizados en el total de muestras de hueso (N=80).

N=80	Número de péptidos/g hueso*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
					Inferior	Superior
Péptidos Colágeno I	0.42 ± 1.177	0.00	0	7	0.07	0.78

* (Media ± DE); DE: Desviación estándar; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total.

4.3.1. Análisis de correlación entre las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas, número de péptidos de colágeno tipo I de las muestras óseas y el intervalo postmortem total

Realizamos un análisis de correlación bivariada (correlación de Spearman) entre el IPM y los distintos parámetros bioquímicos en el total de la muestra (**Tabla 27**).

- Las variables que presentaron una correlación negativa y estadísticamente significativa con el IPM fueron las bases nitrogenadas adenina (R= -0.597), guanina (R= -0.554), citosina (R= -0.638), timina (R= -0.638) y xantina (R= -0.325); la suma de bases púricas (R= -0.661) y la suma de bases pirimidínicas (R= -0.608) y el número de péptidos de colágeno tipo I (R= -0.452), lo que supone, en todos los casos, una disminución en la concentración de estos marcadores con el aumento del IPM.

Tabla 27. Correlaciones entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos y el IPM.

Intervalo Postmortem N=80		
	Coefficiente de correlación Rho de Spearman (R)	p*
ADN	-0.038	n.s
Adenina	-0.597	0.000
Guanina	-0.554	0.000

Tabla 27. (Continuación).

Intervalo Postmortem N=80		
	Coefficiente de correlación Rho de Spearman (R)	<i>p</i> *
PUR	-0.661	0.000
Citosina	-0.638	0.000
Timina	-0.420	0.004
PYR	-0.608	0.000
Hipoxantina	-0.259	n.s
Xantina	-0.325	0.030
PYR/PUR	0.259	n.s
PUR/PYR	-0.259	n.s
Péptidos Colágeno I	-0.452	0.002

*p**: Nivel de significación inferior a 0.05; n.s: No significativo; N: Tamaño muestral total; PUR: Purinas (Adenina+Guanina); PYR: Pirimidinas (Citosina+Timina); PYR/PUR: Cociente entre pirimidinas y purinas; PUR/PYR: Cociente entre purinas y pirimidinas.

4.3.2. Análisis de regresión lineal de las concentraciones de los parámetros bioquímicos de las muestras óseas analizadas respecto al intervalo postmortem

La estimación curvilínea nos determina el modelo matemático (lineal, exponencial, logarítmico) de la fórmula que mejor ajusta la representación gráfica de la regresión de una variable independiente (data de la muerte), en relación con las concentraciones de ADN, adenina, guanina, purinas, citosina, timina, pirimidinas, hipoxantina, xantina, cociente entre pirimidinas y purinas, cociente entre purinas y pirimidinas y el número de péptidos de colágeno tipo I, consideradas como variables dependientes.

A continuación, en la **Tabla 28** se muestran los modelos matemáticos obtenidos a partir de la regresión lineal, R , R^2 , p , coeficientes y las ecuaciones (**Tabla 29**) a las que se ajustan los parámetros bioquímicos (variables dependientes) en relación con el IPM (variable independiente).

4. Resultados

En el caso de las variables dependientes adenina ($F(1,78)= 32.988$), guanina ($F(1,78)= 16.848$), purinas ($F(1,78)=34.994$), citosina ($F(1,78)= 28.251$), timina ($F(1,78)= 5.107$), pirimidinas ($F(1,78)= 14.151$) y número de proteínas de colágeno tipo I ($F(1,78)= 8.783$) obtenemos una $p<0.05$, por lo que concluimos que estas variables están relacionadas con el IPM.

La variable purinas explica el 44.9% de la varianza del IPM, la adenina explica el 43.4% de la varianza del IPM, la citosina explica el 39.6% de la varianza del IPM, la guanina explica el 28.2% de la varianza del IPM, las pirimidinas explican el 24.8% de la varianza del IPM, el número de péptidos de colágeno tipo I explica el 17.0% de la varianza del IPM y la timina explica el 10.6% de la varianza del IPM.

Tabla 28. Estimación curvilínea de los parámetros bioquímicos respecto al IPM.

Intervalo Postmortem (N=80)							
Resumen modelo						Coeficientes	
	Modelo	R	R ²	F	p	B	Beta (b1)
Adenina	Exponencial	0.659	0.434	32.988	0.000	13.514	-0.047
Guanina	Exponencial	0.531	0.282	16.848	0.000	6.437	-0.054
PUR	Exponencial	0.670	0.449	34.994	0.000	20.674	-0.046
Citosina	Exponencial	0.630	0.396	28.251	0.000	6.624	-0.046
Timina	Exponencial	0.326	0.106	5.107	0.029	6.214	-0.020
PYR	Exponencial	0.498	0.248	14.151	0.001	12.617	-0.027
Péptidos Colágeno I	Logarítmico	0.412	0.170	8.783	0.005	2.654	-0.768

N: Tamaño muestral total; PUR: Purinas (Adenina+Guanina); PYR: Pirimidinas (Citosina+Timina).

Tabla 29. Ecuaciones de los parámetros bioquímicos respecto al IPM.

Intervalo Postmortem (N=80)	
Ecuación	
Adenina	$y= 13.514 * \exp(-0.047 * x)$
Guanina	$y= 6.437 * \exp(-0.054 * x)$
PUR	$y= 20.674 * \exp(-0.046 * x)$
Citosina	$y= 6.624 * \exp(-0.046 * x)$
Timina	$y= 6.214 * \exp(-0.020 * x)$

Tabla 29. (Continuación).

Intervalo Postmortem (N=80)	
Ecuación	
PYR	$y = 12.617 * \exp(-0.027 * x)$
Péptidos Colágeno I	$y = 2.654 + -0.768 * \log(x)$

N: Tamaño muestral total; PUR: Purinas (Adenina+Guanina);
PYR: Pirimidinas (Citosina+Timina).

Como se muestra en las **Figuras 43-46** se observa un patrón de concentración decreciente de las bases nitrogenadas, purinas y pirimidinas en función del IPM, siguiendo un modelo exponencial. Por otro lado, el número de péptidos de proteínas de colágeno tipo I disminuye con respecto al IPM según un modelo de tipo logarítmico. Esto pone de manifiesto la existencia de un patrón similar de diferente magnitud entre los distintos parámetros bioquímicos estudiados y el IPM.

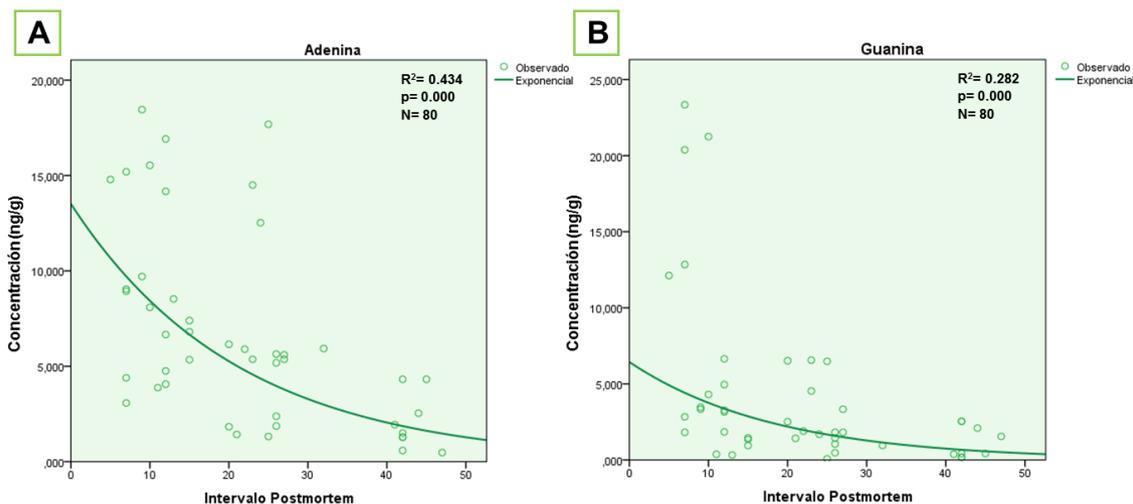


Figura 43. A. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Adenina total de la muestra respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados. **B.** Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Guanina total de la muestra respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados.

4. Resultados

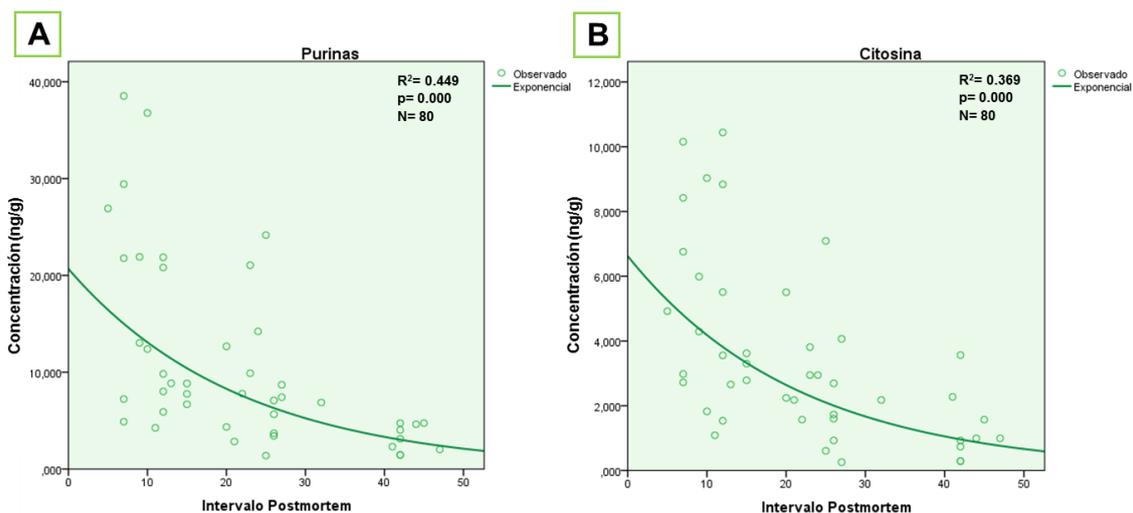


Figura 44. A. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Purinas total de la muestra respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados. **B.** Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Citosina total de la muestra respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados.

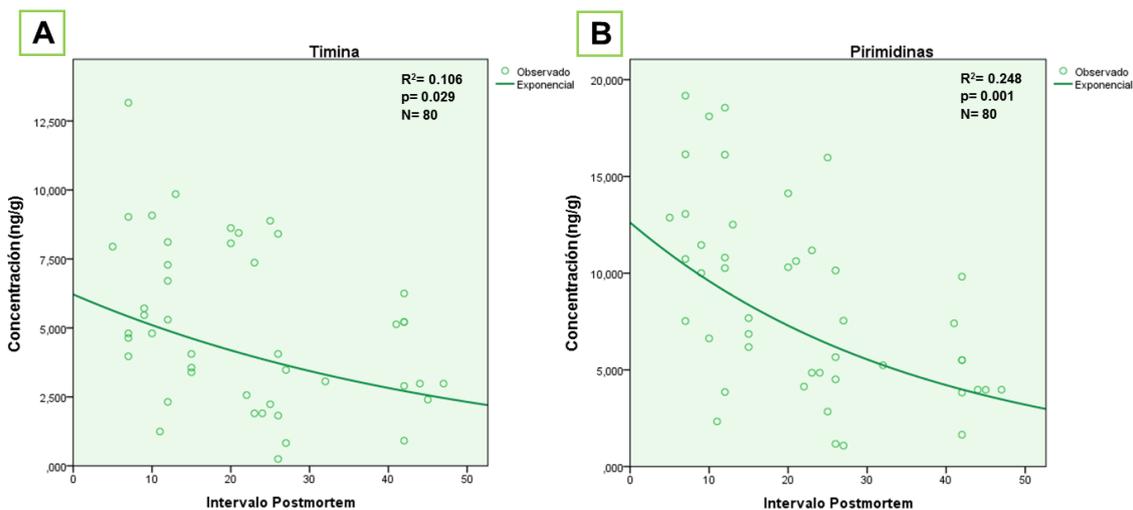


Figura 45. A. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Timina total de la muestra respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados. **B.** Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Pirimidinas total de la muestra respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados.

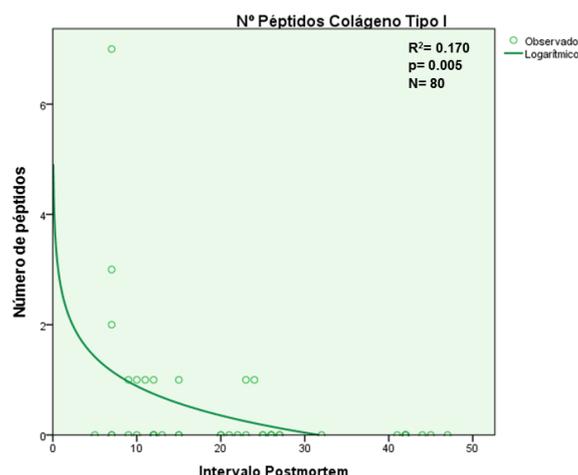


Figura 46. Diagrama de dispersión y regresión logarítmica que representa la variación del número de péptidos de proteínas de colágeno tipo I de la muestra respecto al IPM total de las muestras de huesos humanos analizados.

4.3.3. Análisis de regresión lineal múltiple de las concentraciones de los parámetros bioquímicos de las muestras óseas analizadas respecto al intervalo postmortem

El modelo definitivo que se calculó incluyó 3 predictores: concentración de citosina, número de péptidos de colágeno tipo I y concentración de adenina. Esto implica que los otros predictores inicialmente propuestos quedaron excluidos del modelo por no aportar significación estadística relevante al modelo, una vez que la concentración de citosina, el número de péptidos de colágeno tipo I y la concentración de adenina ya están dentro del modelo.

En este tipo de análisis de selección de subconjuntos de predictores el interés debe centrarse en el último modelo ajustado, que es el definitivo y el más completo. Así, en la **Tabla 30** encontramos el resultado de la prueba F global de ANOVA para el modelo 3, es decir, para el conjunto de los 3 predictores finalmente incluidos, $F(3, 76) = 14.103$, $p = 0.000$.

4. Resultados

Tabla 30. Prueba F de ANOVA para los 3 modelos (N=80).

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
Citosina	Regresión	2343.516	1	2343.516	21.032	0.000
	Residual	4791.284	78	111.425		
	Total	7134.800	79			
Citosina Nº Péptidos de colágeno I	Regresión	3098.803	2	1549.401	16.124	0.000
	Residual	4035.997	77	96.095		
	Total	7134.800	79			
Citosina Nº Péptidos de colágeno I Adenina	Regresión	3623.392	3	1207.797	14.103	0.000
	Residual	3511.408	76	85.644		
	Total	7134.800	79			

gl: Grados de libertad; N: Tamaño muestral total; p: Nivel de significación.

En la **Tabla 31** se muestra el porcentaje de varianza explicada del IPM por estos 3 predictores (R^2 corregido=0.472) que explican de manera conjunta el 47.2% de la varianza.

Tabla 31. Tabla resumen del modelo (N=80).

Variables Predictoras	R	R ²	R ² corr.	Estadísticos de cambio				
				Cambio en R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F
Citosina	0.573	0.328	0.313	0.328	210.032	1	78	0.000
Citosina Nº Péptidos de colágeno I	0.659	0.434	0.407	0.126	7.860	1	77	0.008
Citosina Nº Péptidos de colágeno I Adenina	0.713	0.508	0.472	0.074	6.125	1	76	0.018

gl: Grados de libertad; N: Tamaño muestral total; Sig.: Nivel crítico.

En la **Tabla 32** se observa como los 3 predictores tienen coeficientes de regresión negativos (citosina: B parcial= -1.566; número de péptidos de colágeno tipo I: B parcial= -3.787 y adenina: B parcial= -0.884), lo que indica que la relación entre cada uno de ellos y el IPM es inversa, una vez parcializado el influjo de los otros predictores. También se muestran los resultados de las pruebas T para la significación de cada

coeficiente de regresión parcializado (citosina $T(76) = -2.345$, $p = 0.024$, número de péptidos de colágeno tipo I $T(76) = -3.180$, $p = 0.003$ y adenina $T(76) = -2.475$, $p = 0.018$). Por tanto, concluimos que existe una relación estadísticamente significativa entre cada predictor y el IPM, una vez controlado el influjo de los otros predictores. La correlación semi-parcial entre el IPM y la concentración de citosina es de -0.257, con el número de péptidos de colágeno tipo I es de -0.348 y con la concentración de adenina es de -0.271. Estos resultados demuestran que, una vez incluidas estas variables en el modelo, los 3 parámetros contribuyen de forma similar a explicar la variabilidad del IPM.

Tabla 32. Coeficientes.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	p	Correlaciones		
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial
1	IPM	31.133	2.550		12.211	0.000			
	Citosina	-2.681	0.585	-0.573	-4.586	0.000	-0.573	-0.573	-0.573
2	IPM	32.423	2.412		13.442	0.000			
	Citosina	-2.624	0.543	-0.561	-4.829	0.000	-0.573	-0.597	-0.560
	Nº Péptidos								
	Colágeno Tipo I	-3.522	1.256	-0.326	-2.804	0.008	-0.347	-0.397	-0.325
3	IPM	34.853	2.480		14.055	0.000			
	Citosina	-1.566	0.668	-0.335	-2.345	0.024	-0.573	-0.344	-0.257
	Nº Péptidos								
	Colágeno Tipo I	-3.787	1.191	-0.350	-3.180	0.003	-0.347	-0.445	-0.348
	Adenina	-0.884	0.357	-0.353	-2.475	0.018	-0.551	-0.361	-0.271

t: Estadístico de contraste; p: Nivel de significación.

4.4. Análisis descriptivo de medias de las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas y el número de péptidos de colágeno I en las muestras óseas en grupos de intervalo postmortem

4.4.1. Análisis descriptivo de las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas y número de péptidos de colágeno I en muestras óseas en dos grupos de intervalo postmortem

Con la finalidad de caracterizar los restos óseos con IPM inferior a 20 años y superior o igual a 20 años se analizaron las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas y número de péptidos de colágeno tipo I con respecto a estos 2 grupos de

IPM, en el primer grupo se incluyen restos óseos de IPM inferior a 20 años (n=20), y en el segundo se incluyen restos óseos de IPM superior o igual a 20 años (n=60).

Las **Tablas 33** y **34** muestran los valores obtenidos (media y desviación estándar, mediana, mínimo y máximo e intervalo de confianza al 95% inferior y superior) de los distintos parámetros bioquímicos medidos en los restos óseos, según el grupo de IPM al que pertenecen, así como la significación estadística entre grupos.

En la **Tabla 33** se observan diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones medias de adenina ($p=0.0004$), guanina ($p=0.0001$), purinas ($p=0.0001$), citosina ($p=0.0001$), timina ($p=0.0226$) y pirimidinas ($p=0.0002$), siendo sus concentraciones superiores en los casos de IPM inferior a 20 años. Sin embargo, se observa un aumento de las concentraciones del cociente de pirimidinas y purinas ($p=0.0465$), siendo la concentración mayor en los casos con IPM superior o igual a 20 años.

Tabla 33. Análisis de la concentración de ADN y bases nitrogenadas en el total de muestras de hueso (N=80) respecto a 2 grupos de IPM, Grupo 1: IPM inferior a 20 años (n=20) y Grupo 2: IPM superior o igual a 20 años (n=60).

	Grupos de IPM (años)	Concentración media* (ng/g hueso)	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
ADN	G1: < 20 años	6.966 ± 4.959	n.s.	3.626	1.114	26.560	3.711	10.221
	G2: ≥ 20 años	6.992 ± 4.006		7.486	0.386	14.114	5.338	8.646
Adenina	G1: < 20 años	9.288 ± 4.835	0.0004	8.311	3.076	18.454	7.024	11.551
	G2: ≥ 20 años	4.646 ± 4.370		4.321	0.476	17.682	2.873	6.480
Guanina	G1: < 20 años	6.499 ± 5.362	0.0001	3.297	0.324	23.345	3.054	9.945
	G2: ≥ 20 años	2.114 ± 1.973		1.692	0.075	6.559	1.299	2.928

Tabla 33. (Continuación).

	Grupos de IPM (años)	Concentración media* (ng/g hueso)	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
PUR	G1: < 20 años	15.787 ± 10.724	0.0001	11.111	4.255	38.540	10.768	20.807
	G2: ≥ 20 años	6.790 ± 5.833		4.744	1.393	24.167	4.382	9.198
Citosina	G1: < 20 años	5.021 ± 2.969	0.0001	3.695	1.089	10.440	3.631	6.411
	G2: ≥ 20 años	2.159 ± 1.675		1.729	0.256	6.836	1.467	2.851
Timina	G1: < 20 años	6.021 ± 2.879	0.0226	5.381	1.242	13.162	4.673	7.368
	G2: ≥ 20 años	4.235 ± 2.735		3.063	0.248	8.883	3.106	5.364
PYR	G1: < 20 años	11.041 ± 4.854	0.0002	10.768	2.330	19.174	8.769	13.313
	G2: ≥ 20 años	6.394 ± 3.912		5.240	1.084	15.975	4.779	8.009
HX	G1: < 20 años	3.732 ± 2.594	n.s.	2.984	0.847	9.816	2.517	4.946
	G2: ≥ 20 años	3.320 ± 2.421		2.903	0.363	8.307	2.321	4.312
Xantina	G1: < 20 años	5.337 ± 2.558	n.s.	5.596	0.609	10.603	4.139	6.534
	G2: ≥ 20 años	4.561 ± 3.119		3.209	0.387	9.735	3.273	5.848
PYR/PUR	G1: < 20 años	0.898 ± 0.532	0.0465	0.832	0.339	2.232	0.649	1.147
	G2: ≥ 20 años	1.435 ± 1.115		1.016	0.125	3.780	0.958	1.911
PUR/PYR	G1: < 20 años	1.468 ± 0.727	n.s.	1.203	0.448	2.952	1.127	1.801
	G2: ≥ 20 años	1.520 ± 1.218		0.983	0.265	8.027	0.811	2.229

* (Media ± DE); DE: Desviación estándar; G1: < 20 años: Grupo 1: IPM inferior a 20 años (n= 20); G2: ≥ 20 años: Grupo 2: IPM superior a 20 años (n= 60); HX: Hipoxantina; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total; n: Tamaño muestral de cada grupo; n.s.: No significativo; p*: Nivel de significación inferior a 0.05; PUR: Purinas (Adenina+Guanina); PYR: Pirimidinas (Citosina+Timina); PUR/PYR: Cociente entre purinas y pirimidinas; PYR/PUR: Cociente entre pirimidinas y purinas.

4. Resultados

La diferencia de medias del número de péptidos de proteínas de colágeno tipo I por grupos de IPM presenta diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0053$), siendo sus concentraciones inferiores en los casos de IPM superior (**Tabla 34**).

Tabla 34. Análisis del número de péptidos de colágeno tipo I en el total de muestras de hueso (N=80) respecto a 2 grupos de IPM, Grupo 1: IPM inferior a 20 años (n=20) y Grupo 2: IPM superior o igual a 20 años (n=60).

	Grupos de IPM (años)	Número de péptidos/g hueso*	p^*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
Péptidos Colágeno I	G1: < 20 años	0.85 ± 1.663	0.0053	0.00	0	7	0.07	1.63
	G2: ≥ 20 años	0.08 ± 0.227		0.00	0	1	0.03	0.19

* (Media ± DE); DE: Desviación estándar; G1: < 20 años: Grupo 1: IPM inferior a 20 años (n= 20); G2: ≥ 20 años: Grupo 2: IPM superior a 20 años (n= 60); IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total; n: Tamaño muestral de cada grupo; p^* : Nivel de significación inferior a 0.05.

4.4.2. Análisis descriptivo de las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas y número de péptidos de colágeno I en muestras óseas en cuatro grupos de intervalo postmortem

Con el objeto de caracterizar los restos óseos según el IPM se analizaron las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas y número de péptidos de colágeno tipo I con respecto a 4 grupos de IPM, en el primer grupo se incluyen restos óseos de IPM entre 5-10 años (n=10), en segundo lugar, IPM entre 11-19 años (n=10), IPM entre 20-30 años (n=40) y por último IPM superior a 30 años (n=20).

Las **Tablas 35** y **36** muestran los valores obtenidos (media y desviación estándar, mediana, rango e intervalo de confianza al 95% inferior y superior) de los distintos parámetros bioquímicos medidos en los restos óseos según los 4 grupos de IPM considerados y las diferencias de medias entre grupos.

La **Tabla 35** muestra las variables que presentan una diferencia estadísticamente significativa en sus medias de concentración respecto a los 4 IPM establecidos las cuales son adenina ($p=0.001$), purinas (adenina+guanina) ($p=0.000$), citosina ($p=0.001$), pirimidinas (citosina+timina) ($p=0.003$), y presentan un descenso desde el IMP entre 5 y 10 años hasta el IPM superior a 30 años, lo que supone en estos

casos, una disminución de las concentraciones de estos parámetros respecto al IPM. Sin embargo, las concentraciones medias de timina disminuyen en función de los 4 IPM, pero no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 35. Análisis de la concentración de ADN y bases nitrogenadas en el total de muestras de hueso (N=80) en función de 4 grupos de IPM, Grupo 1: IPM 5-10 años (n=10); Grupo 2: IPM 11-19 años (n=10); Grupo 3: IPM 20-30 años (n=40) y Grupo 4: IPM superior a 30 años (n=20).

	Grupos de IPM (años)	Concentración media* (ng/g hueso)	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
ADN	G1: 5-10 años	9.581 ± 8.936	n.s.	6.649	1.141	26.560	3.191	15.972
	G2: 11-19 años	4.351 ± 2.664		2.664	2.360	10.577	2.445	6.256
	G3: 20-30 años	7.251 ± 4.687		7.486	0.386	14.114	4.655	9.847
	G4: > 30 años	6.605 ± 2.891		6.323	3.017	10.514	4.536	8.673
Adenina	G1: 5-10 años	10.722 ± 5.077	0.001	9.374	3.076	18.454	7.089	14.354
	G2: 11-19 años	7.854 ± 4.361		6.737	3.881	16.916	4.734	10.974
	G3: 20-30 años	6.182 ± 4.949		5.366	1.318	17.682	3.441	8.922
	G4: > 30 años	2.418 ± 1.837		1.721	0.476	5.932	1.104	3.732
Guanina	G1: 5-10 años	10.569 ± 8.561	0.001	8.213	1.817	23.345	4.445	16.695
	G2: 11-19 años	2.774 ± 1.213		1.643	0.324	6.645	0.945	3.913
	G3: 20-30 años	2.429 ± 1.074		1.817	0.075	6.559	1.548	3.999
	G4: > 30 años	1.122 ± 0.971		0.684	0.174	2.539	0.427	1.817

4. Resultados

Tabla 35. (Continuación).

	Grupos de IPM (años)	Concentración media* (ng/g hueso)	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
PUR	G1: 5-10 años	21.292 ± 11.784	0.000	21.845	4.893	38.540	12.862	29.722
	G2: 11-19 años	10.283 ± 6.049		8.430	4.255	21.869	5.955	14.611
	G3: 20-30 años	8.956 ± 6.615		7.419	1.393	24.167	5.293	12.612
	G4: > 30 años	3.540 ± 1.768		3.582	1.456	6.877	2.275	4.805
Citosina	G1: 5-10 años	5.709 ± 2.855	0.001	5.455	1.825	10.151	3.665	7.752
	G2: 11-19 años	4.333 ± 2.067		3.426	1.089	10.440	2.138	6.527
	G3: 20-30 años	2.678 ± 1.847		2.242	0.256	7.092	1.655	3.700
	G4: > 30 años	1.381 ± 1.029		0.993	0.288	3.565	0.645	2.118
Timina	G1: 5-10 años	6.859 ± 2.894	n.s.	5.587	3.973	13.162	4.787	8.931
	G2: 11-19 años	5.182 ± 2.748		5.141	1.242	9.851	3.216	7.147
	G3: 20-30 años	4.588 ± 3.275		3.476	0.248	8.883	2.775	6.402
	G4: > 30 años	3.701 ± 1.656		3.021	0.911	6.251	2.512	4.890
PYR	G1: 5-10 años	12.568 ± 4.207	0.003	12.160	6.627	19.174	9.558	15.578
	G2: 11-19 años	9.515 ± 5.183		8.967	2.330	18.552	5.807	13.222
	G3: 20-30 años	7.266 ± 4.578		5.657	1.084	15.975	4.731	9.802
	G4: > 30 años	5.086 ± 2.242		4.607	1.647	9.816	3.481	6.690

Tabla 35. (Continuación).

	Grupos de IPM (años)	Concentración media* (ng/g hueso)	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
HX	G1: 5-10 años	4.951 ± 2.149	0.041	3.972	1.734	9.816	2.698	7.205
	G2: 11-19 años	2.512 ± 0.991		2.662	0.847	4.073	1.802	3.222
	G3: 20-30 años	4.119 ± 2.833		3.710	0.863	8.670	2.551	5.689
	G4: > 30 años	2.121 ± 0.690		2.077	0.928	2.016	1.627	2.612
Xantina	G1: 5-10 años	6.575 ± 2.582	n.s.	6.972	2.379	10.603	4.728	8.422
	G2: 11-19 años	4.098 ± 1.935		4.095	0.609	6.696	2.713	5.483
	G3: 20-30 años	5.347 ± 3.682		5.525	0.387	9.735	3.337	7.357
	G4: > 30 años	3.381 ± 1.697		3.209	0.609	7.138	2.167	4.595
PYR/PUR	G1: 5-10 años	0.819 ± 0.613	n.s.	0.513	0.339	2.232	0.380	1.259
	G2: 11-19 años	0.977 ± 0.456		0.879	0.469	2.010	0.651	1.304
	G3: 20-30 años	1.143 ± 0.991		1.016	0.125	3.731	0.594	1.692
	G4: > 30 años	1.873 ± 1.294		1.457	0.527	3.780	0.946	2.799

4. Resultados

Tabla 35. (Continuación).

	Grupos de IPM (años)	Concentración media* (ng/g hueso)	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
PUR/PYR	G1: 5-10 años	1.725 ± 0.848	n.s.	1.951	0.448	2.952	1.118	2.332
	G2: 11-19 años	1.211 ± 0.500		1.137	0.497	2.132	0.853	1.568
	G3: 20-30 años	1.969 ± 1.078		0.983	0.268	8.027	0.818	3.121
	G4: > 30 años	0.846 ± 0.557		0.782	0.265	1.897	0.447	1.245

* (Media ± DE); DE: Desviación estándar; G1: IPM entre 5-10 años; G2: IPM entre 11-19 años; G3: IPM entre 20-30 años; G4: IPM superior a 30 años; HX: Hipoxantina; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total; n: Tamaño muestral de cada grupo; n.s.: No significativo; p*: Nivel de significación inferior a 0.05 (*Test de *Kruskal-Wallis*); PUR: Purinas (Adenina+Guanina); PYR: Pirimidinas (Citosina+Timina); PUR/PYR: Cociente entre purinas y pirimidinas; PYR/PUR: Cociente entre pirimidinas y purinas.

La **Tabla 36** muestra que la media del número de péptidos de colágeno tipo I presenta un descenso desde el IMP entre 5 y 10 años hasta el IPM superior a 30 años, donde no se identifica ningún péptido de colágeno tipo I con una diferencia estadísticamente significativa de $p=0.027$.

Tabla 36. Análisis del número de péptidos de colágeno tipo I en el total de muestras de hueso (N=80) respecto a 4 grupos de IPM, Grupo 1: IPM 5-10 años (n=10); Grupo 2: IPM 11-19 años (n=10); Grupo 3: IPM 20-30 años (n=40) y Grupo 4: IPM superior a 30 años (n=20).

	Grupos de IPM (años)	Número de péptidos/g hueso*	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
Péptidos Colágeno I	G1: 5-10 años	1.40 ± 2.221	0.027	0.50	0	7	-0.19	2.99
	G2: 11-19 años	0.30 ± 0.483		0.00	0	1	-0.05	0.65
	G3: 20-30 años	0.13 ± 0.352		0.00	0	1	-0.06	0.33
	G4: > 30 años	-		-	-	-	-	-

* (Media ± DE); DE: Desviación estándar; G1: IPM entre 5-10 años; G2: IPM entre 11-19 años; G3: IPM entre 20-30 años; G4: IPM superior a 30 años; HX: Hipoxantina; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total; n: Tamaño muestral de cada grupo; p*: Nivel de significación inferior a 0.05 (*Test de *Kruskal-Wallis*).

Para evaluar la influencia de la pertenencia a cuatro grupos de IPM, siendo estos, G1: IPM entre 5 y 10 años; G2: IPM entre 11 y 19 años; G3: IPM entre 20 y 30 años y G4: IPM superior a 30 años, en los valores de los parámetros bioquímicos estudiados, aplicamos el *Test de Mann-Whitney*, test no paramétrico, para la comparación de medias de dos muestras independientes. En las **Tablas 37 y 38** se muestran los valores descriptivos de los parámetros (media, DE y rango) así como la significación estadística entre grupos.

G1: IPM 5-10 años vs. G2: IPM 11-19 años

Los resultados, en el caso de comparación entre medias de las concentraciones de las variables de estudio muestran que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones medias de guanina ($p=0.008$), purinas ($p=0.028$), hipoxantina ($p=0.049$) y xantina ($p=0.023$), presentando una importante disminución de las concentraciones de los casos con los niveles de estos parámetros en las muestras con IPM entre 5-10 años al IPM entre 11-19 años. El resto de parámetros, sin embargo, no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones, por lo que no hay diferencias entre las concentraciones medias según el grupo de data.

G1: IPM 5-10 años vs. G3: IPM 20-30 años

Las muestras del IPM entre 5-10 años y las del IPM entre 20-30 años, presentan una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones medias de adenina ($p=0.026$), guanina ($p=0.006$), purinas ($p=0.008$), citosina ($p=0.006$) y pirimidinas ($p=0.011$), así como en el número de péptidos de colágeno tipo I ($p=0.032$), presentando, del mismo modo, un descenso de las concentraciones medias del IPM entre los casos de 5-10 años a los de IPM entre 20-30.

G1: IPM 5-10 años vs. G4: IPM > 30 años

Los datos obtenidos en la comparación de medias entre parámetros biológicos de muestras con IPM entre 5-10 años y el IPM superior a 30 años muestran diferencias significativas en todas las variables de estudio, adenina ($p=0.001$), guanina ($p=0.000$), purinas ($p=0.000$), citosina ($p=0.001$), timina ($p=0.015$), pirimidinas ($p=0.000$), hipoxantina ($p=0.014$), xantina ($p=0.017$), cociente de pirimidinas/purinas ($p=0.028$),

cociente de purinas/pirimidinas ($p=0.028$) y el número de péptidos de colágeno tipo I ($p=0.013$), mostrando una gran reducción de las concentraciones.

G2: IPM 11-19 años vs. G3: IPM 20-30 años

Los resultados, en el caso de comparación entre las medias de las concentraciones de casos con una data entre 11 y 15 años y grupo 3, data entre 20 y 30 años, muestran que hay diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones en los parámetros purinas ($p=0.044$) y citosina ($p=0.039$), presentando una disminución de las concentraciones.

G2: IPM 11-19 años vs. G4: IPM > 30 años

Las medias de las concentraciones de los marcadores analizados en los casos con IPM entre 11 y 19 años y el IPM superior a 30 años presentan diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de adenina ($p=0.001$), purinas ($p=0.001$), citosina ($p=0.004$) y pirimidinas ($p=0.035$), donde se observa como en los casos anteriores una disminución de las concentraciones de los parámetros de un IPM inferior al superior.

G3: IPM 20-30 años vs. G4: IPM > 30 años

Por último, los resultados, en el caso de comparación entre medias de los casos con data entre 20 y 30 años y aquellos con data superior a 30 años, muestran que hay diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones en los parámetros adenina ($p=0.017$) y purinas (adenina+guanina) ($p=0.015$), produciéndose de la misma manera un descenso en las concentraciones.

Tabla 37. Análisis de la media de concentración de ADN, bases nitrogenadas y cocientes de purinas/pirimidinas y el cociente de pirimidinas/purinas en hueso mostrando la significación entre los 4 grupos de IPM.

Concentración media* (ng/g) (Min.-Máx.)	IPM (N=80)				Probabilidad (Test de Mann-Whitney)					
	G1: 5-10 años (n=10)	G2: 11-19 años (n=10)	G3: 20-30 años (n=40)	G4: > 30 años (n=20)	p* 1-2	p* 1-3	p* 1-4	p* 2-3	p* 2-4	p* 3-4
ADN	9.581 ± 8.936 (1.141-26.560)	4.351 ± 2.664 (2.360-10.577)	7.251 ± 4.687 (0.386-14.114)	6.605 ± 2.891 (3.017-10.514)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Adenina	10.722 ± 5.077 (3.076-18.454)	7.854 ± 4.361 (3.881-16.916)	6.182 ± 4.949 (1.318-17.682)	2.418 ± 1.837 (0.476-5.932)	n.s.	0.026	0.001	n.s.	0.001	0.017
Guanina	10.569 ± 8.561 (1.817-23.345)	2.429 ± 1.074 (0.324-6.645)	2.774 ± 1.213 (0.075-6.559)	1.122 ± 0.971 (0.174-2.539)	0.008	0.006	0.000	n.s.	n.s.	n.s.
PUR	21.292 ± 11.784 (4.893-38.540)	10.283 ± 6.049 (4.255-21.869)	8.956 ± 6.615 (1.393-24.167)	3.540 ± 1.768 (1.456-6.877)	0.028	0.008	0.000	0.044	0.001	0.015
Citosina	5.709 ± 2.855 (1.825-10.151)	4.333 ± 2.067 (1.089-10.440)	2.678 ± 1.847 (0.256-7.092)	1.381 ± 1.029 (0.288-3.565)	n.s.	0.006	0.001	0.039	0.004	n.s.
Timina	6.859 ± 2.894 (3.973-13.162)	5.182 ± 2.748 (1.242-9.851)	4.588 ± 3.275 (0.248-8.883)	3.701 ± 1.656 (0.911-6.251)	n.s.	n.s.	0.015	n.s.	n.s.	n.s.
PYR	12.568 ± 4.207 (6.627-19.174)	9.515 ± 5.183 (2.330-18.552)	7.266 ± 4.578 (1.084-15.975)	5.086 ± 2.242 (1.647-9.816)	n.s.	0.011	0.000	n.s.	0.035	n.s.
Hipoxantina	4.951 ± 2.149 (1.734-9.816)	2.512 ± 0.991 (0.847-4.073)	4.119 ± 2.833 (0.863-8.670)	2.121 ± 0.690 (0.928-2.016)	0.049	n.s.	0.014	n.s.	n.s.	n.s.

Tabla 37. (Continuación).

Concentración media* (ng/g) (Min.-Máx.)	IPM (N=80)				Probabilidad (Test de Mann-Whitney)					
	G1: 5-10 años (n=10)	G2: 11-19 años (n=10)	G3: 20-30 años (n=40)	G4: > 30 años (n=20)	p* 1-2	p* 1-3	p* 1-4	p* 2-3	p* 2-4	p* 3-4
Xantina	6.575 ± 2.582 (2.379-10.603)	4.098 ± 1.935 (0.609-6.696)	5.347 ± 3.682 (0.387-9.735)	3.381 ± 1.697 (0.609-7.138)	0.023	n.s.	0.017	n.s.	n.s.	n.s.
PYR/PUR	0.819 ± 0.613 (0.339-2.232)	0.977 ± 0.456 (0.469-2.010)	1.143 ± 0.991 (0.125-3.731)	1.873 ± 1.294 (0.527-3.780)	n.s.	n.s.	0.028	n.s.	n.s.	n.s.
PUR/PYR	1.725 ± 0.848 (0.448-2.952)	1.211 ± 0.500 (0.497-2.132)	1.969 ± 1.078 (0.268-8.027)	0.846 ± 0.557 (0.265-1.897)	n.s.	n.s.	0.028	n.s.	n.s.	n.s.

* (Media ± DE); DE: Desviación estándar; G1: IPM entre 5-10 años; G2: IPM entre 11-19 años; G3: IPM entre 20-30 años; G4: IPM superior a 30 años; HX: Hipoxantina; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Min.: Valor mínimo; Máx.: Valor máximo; N= Tamaño muestral total; n= Tamaño muestral de cada grupo; n.s.: No significativo; **p*1-2**: Probabilidad < 0.05 entre G1 vs. G2; **p*1-3**: Probabilidad < 0.05 entre G1 vs. G3; **p*1-4**: Probabilidad < 0.05 entre G1 vs. G4; **p*2-3**: Probabilidad < 0.05 entre G2 vs. G3; **p*2-4**: Probabilidad < 0.05 entre G2 vs. G4; **p*3-4**: Probabilidad < 0.05 entre G3 vs. G4.

Tabla 38. Análisis de la media de número de péptidos de colágeno tipo I en hueso mostrando la significación entre los 4 grupos de IPM.

N° péptidos colágeno I/g* (Min.-Máx.)	IPM (N=80)				Probabilidad (Test de Mann-Whitney)					
	G1: 5-10 años (n=10)	G2: 11-19 años (n=10)	G3: 20-30 años (n=40)	G4: > 30 años (n=20)	p* 1-2	p* 1-3	p* 1-4	p* 2-3	p* 2-4	p* 3-4
1.40 ± 2.221 (0-7)	0.30 ± 0.483 (0-1)	0.13 ± 0.352 (0-1)	-	n.s.	0.032	0.013	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

* (Media ± DE); DE: Desviación estándar; G1: IPM entre 5-10 años; G2: IPM entre 11-15 años; G3: IPM entre 20-30 años; G4: IPM superior a 30 años; Min.: Valor mínimo; Máx.: Valor máximo; N= Tamaño muestral total; n= Tamaño muestral de cada grupo; n.s.: No significativo; **p*1-2**: Probabilidad < 0.05 entre G1 vs. G2; **p*1-3**: Probabilidad < 0.05 entre G1 vs. G3; **p*1-4**: Probabilidad < 0.05 entre G1 vs. G4; **p*2-3**: Probabilidad < 0.05 entre G2 vs. G3; **p*2-4**: Probabilidad < 0.05 entre G2 vs. G4; **p*3-4**: Probabilidad < 0.05 entre G3 vs. G4.

4.5. Análisis de correlación y regresión lineal de las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas y el número de péptidos de colágeno tipo I respecto a grupos de intervalo postmortem

4.5.1. Análisis de correlación y regresión lineal de las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas y el número de péptidos de colágeno tipo I en función de dos grupos de intervalo postmortem

A continuación, se muestran las correlaciones bivariadas (análisis no paramétrico) de los parámetros bioquímicos respecto a los dos grupos de IPM.

4.5.1.1. Análisis de los restos óseos con intervalo postmortem inferior a 20 años

La **Tabla 39** muestra las correlaciones entre los elementos estudiados y el IPM en los casos con IPM inferior a 20 años (N=20). Existen correlaciones estadísticamente significativas de signo negativo entre el IPM con las concentraciones de:

- ⊕ Guanina (R= -0.611), purinas (R= -0.427) e hipoxantina (R= -0.495).

Hay que destacar de este análisis, que a pesar de que el resto de concentraciones de los parámetros no presentan una correlación estadísticamente significativa, todas las correlaciones son negativas con el IPM.

Tabla 39. Correlaciones entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos y el IPM inferior a 20 años.

IPM inferior a 20 años N=20		
	Coefficiente de correlación Rho de Spearman (R)	p*
ADN	-0.181	n.s
Adenina	-0.227	n.s
Guanina	-0.611	0.004

Tabla 39. (Continuación).

IPM inferior a 20 años N=20		
	Coefficiente de correlación Rho de Spearman (R)	<i>p</i> *
PUR	-0.427	0.027
Citosina	-0.259	n.s
Timina	-0.283	n.s.
PYR	-0.375	n.s
Hipoxantina	-0.495	0.027
Xantina	-0.424	n.s
PYR/PUR	0.277	n.s
PUR/PYR	-0.277	n.s
Péptidos		
Colágeno I	-0.299	n.s

*p**: Nivel de significación inferior a 0.05; n.s: No significativo; N: Tamaño muestral total; PUR: Purinas (Adenina+Guanina); PYR: Pirimidinas (Citosina+Timina); PYR/PUR: Cociente entre pirimidinas y purinas; PUR/PYR: Cociente entre purinas y pirimidinas.

A continuación, en la **Tabla 40** se muestra el modelo matemático obtenido en el análisis de regresión lineal, la *R*, *R*², *p*, los coeficientes de la ecuación y la ecuación (**Tabla 41**) de los parámetros bioquímicos que presentaron una diferencia estadísticamente significativa en el análisis de regresión en restos óseos con una data inferior a 20 años, los cuales fueron guanina, purinas e hipoxantina.

Las variables dependientes guanina ($F(1,18)= 10.587$), purinas ($F(1,18)= 4.551$) e hipoxantina ($F(1,18)= 6.037$) presentan una $p < 0.05$, por lo que concluimos que estas variables están relacionadas con el IPM inferior a 20 años.

El valor de *R*² obtenido en la estimación curvilínea para guanina fue 37.0%, hipoxantina 25.1% y para purinas fue de 20.2%, los cuales explican la varianza del IPM inferior a 20 años.

4. Resultados

Tabla 40. Estimación curvilínea de los parámetros bioquímicos en los casos con IPM inferior a 20 años (Grupo 1).

IPM inferior a 20 años (N=20)							
Resumen modelo						Coeficientes	
	Modelo	R	R ²	F	p	B	Beta (b1)
Guanina	Exponencial	0.609	0.370	10.587	0.004	44.425	-0.247
PUR	Exponencial	0.449	0.202	4.551	0.047	36.316	-0.102
HX	Exponencial	0.501	0.251	6.037	0.024	9.007	-0.104

N: Tamaño muestral total; PUR: Purinas (Adenina+Guanina); HX: Hipoxantina.

Tabla 41. Ecuaciones de los parámetros bioquímicos en los casos con IPM inferior a 20 años (Grupo 1).

IPM inferior a 20 años (N=20)	
Ecuación	
Guanina	$y = 44.425 * \exp(-0.247 * x)$
PUR	$y = 36.316 * \exp(-0.102 * x)$
HX	$y = 9.007 * \exp(-0.104 * x)$

N: Tamaño muestral total; PUR: Purinas (Adenina+Guanina); HX: Hipoxantina.

Como se muestra en las **Figuras 49 y 50** se observa un patrón de concentración decreciente de las bases nitrogenadas que siguen un modelo exponencial, lo cual sugiere que, en el primer grupo, en los restos óseos con IPM inferior a 20 años, se produce una disminución de la concentración de estas bases a medida que aumenta el IPM.

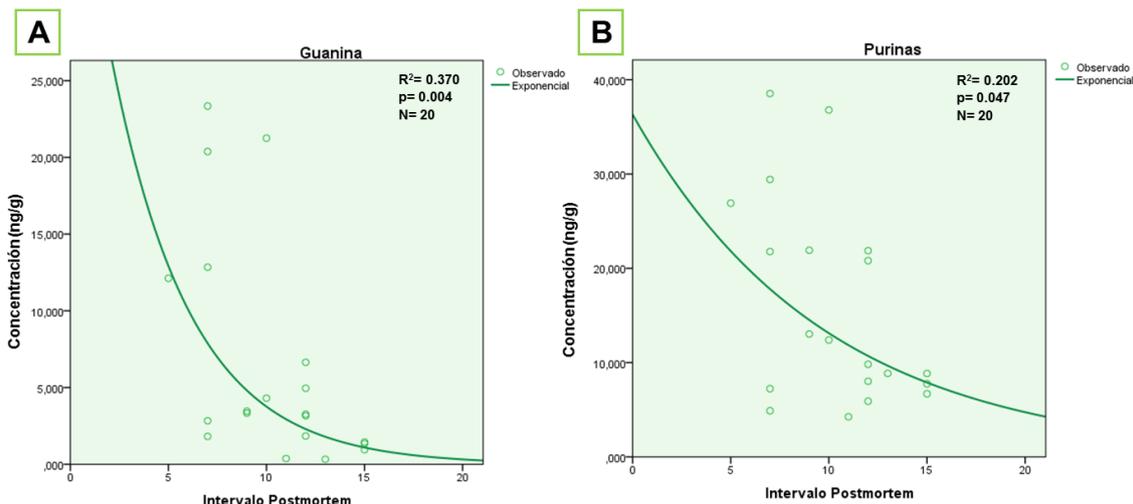


Figura 49. A. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Guanina total de la muestra respecto al IPM inferior a 20 años de las muestras de huesos humanos analizados. **B.** Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Purinas total de la muestra respecto al IPM inferior a 20 años de las muestras de huesos humanos analizados.

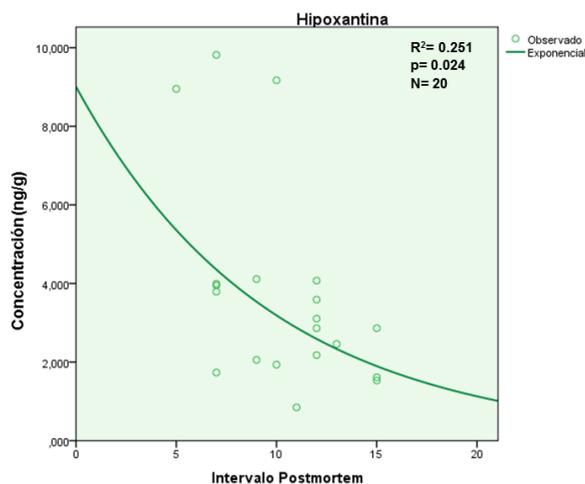


Figura 50. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Hipoxantina total de la muestra respecto al IPM inferior a 20 años de las muestras de huesos humanos analizados.

4.5.1.2. Análisis de los restos óseos con intervalo postmortem superior o igual a 20 años

La **Tabla 42** muestra las correlaciones entre los elementos estudiados y el IPM en el grupo 2, data superior o igual a 20 años (N=60).

- ✦ Se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas de signo negativo entre el IPM y la adenina ($R = -0.466$), guanina ($R = -0.398$), purinas ($R = -0.454$), citosina ($R = -0.481$) y pirimidinas ($R = -0.457$), lo cual indica que a medida que aumenta el IPM la concentración de estos parámetros disminuye.

El resto de parámetros estudiados tales como la concentración de ADN, timina, hipoxantina, xantina, el cociente de purinas y pirimidinas, así como el número péptidos de colágeno tipo I, no presentan una correlación significativa con respecto al IPM, pero siguen un patrón descendente respecto al IPM superior o igual a 20 años, a excepción de la ratio de pirimidinas/purinas que mantienen una correlación positiva.

Tabla 42. Correlaciones entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos y el IPM superior o igual a 20 años.

IPM superior o igual a 20 años N=60		
	Coefficiente de correlación Rho de Spearman (R)	p^*
ADN	-0.024	n.s
Adenina	-0.466	0.019
Guanina	-0.398	0.049
PUR	-0.454	0.023
Citosina	-0.481	0.015
Timina	-0.250	n.s
PYR	-0.457	0.022
Hipoxantina	-0.130	n.s
Xantina	-0.293	n.s
PYR/PUR	0.161	n.s
PUR/PYR	-0.161	n.s
Péptidos		
Colágeno I	-0.278	n.s

p^* : Nivel de significación inferior a 0.05; n.s: No significativo; N: Tamaño muestral total; PUR: Purinas (Adenina+Guanina); PYR: Pirimidinas (Citosina+Timina); PYR/PUR: Cociente entre pirimidinas y purinas; PUR/PYR: Cociente entre purinas y pirimidinas.

A continuación, en la **Tabla 43** se muestra el modelo matemático obtenido en el análisis de regresión lineal, la R , R^2 , p , los coeficientes de la ecuación y la ecuación (**Tabla 44**) que siguen los parámetros bioquímicos que presentaron diferencias estadísticamente significativas con el IPM en el Grupo 2, data superior o igual a 20 años, los cuales fueron adenina, guanina, purinas y citosina.

En el caso de las variables dependientes adenina ($F(1,58)= 8.956$), guanina ($F(1,58)= 4.549$), purinas ($F(1,58)= 9.145$) y citosina ($F(1,58)= 5.612$) obtenemos una $p < 0.05$, por lo que concluimos que estas variables están relacionadas con el IPM.

Interpretando el valor de R^2 podemos decir que la variable purinas explica el 28.4% de la varianza del IPM superior o igual a 20 años, la adenina explica el 28.0% de la varianza del IPM superior o igual a 20 años, las purinas y la citosina explica el 19.6% de la varianza del IPM superior o igual a 20 años y la variable guanina explica el 16.5% de la varianza del IPM superior o igual a 20 años.

Tabla 43. Estimación curvilínea de los parámetros bioquímicos en los casos con IPM superior o igual a 20 años (Grupo 2).

IPM superior o igual 20 años (N=60)							
Resumen modelo						Coeficientes	
	Modelo	R	R ²	F	p	B	Beta
Adenina	Exponencial	0.529	0.280	8.956	0.007	16.313	-0.053
Guanina	Exponencial	0.406	0.165	4.549	0.044	6.226	-0.051
PUR	Exponencial	0.533	0.284	9.145	0.006	20.172	-0.044
Citosina	Exponencial	0.443	0.196	5.612	0.027	5.804	-0.042

N: Tamaño muestral total; PUR: Purinas (Adenina+Guanina).

Tabla 44. Ecuaciones de los parámetros bioquímicos en los casos con IPM superior o igual a 20 años (Grupo 2).

IPM superior o igual 20 años (N=60)	
Ecuación	
Adenina	$y = 16.313 * \exp(-0.053 * x)$
Guanina	$y = 6.2261 * \exp(-0.051 * x)$
PUR	$Y = 20.172 * \exp(-0.044 * x)$
Citosina	$y = 5.804 * \exp(-0.042 * x)$

N: Tamaño muestral total; PUR: Purinas (Adenina+Guanina).

4. Resultados

Como se muestra en las **Figuras 51** y **52** se observa un patrón de concentración decreciente de las variables que presentaban correlación estadísticamente significativa, siguiendo un modelo exponencial, lo cual sugiere que en el IPM superior o igual a 20 años se produce una disminución de la concentración de las bases en relación al aumento del IPM de tipo exponencial.

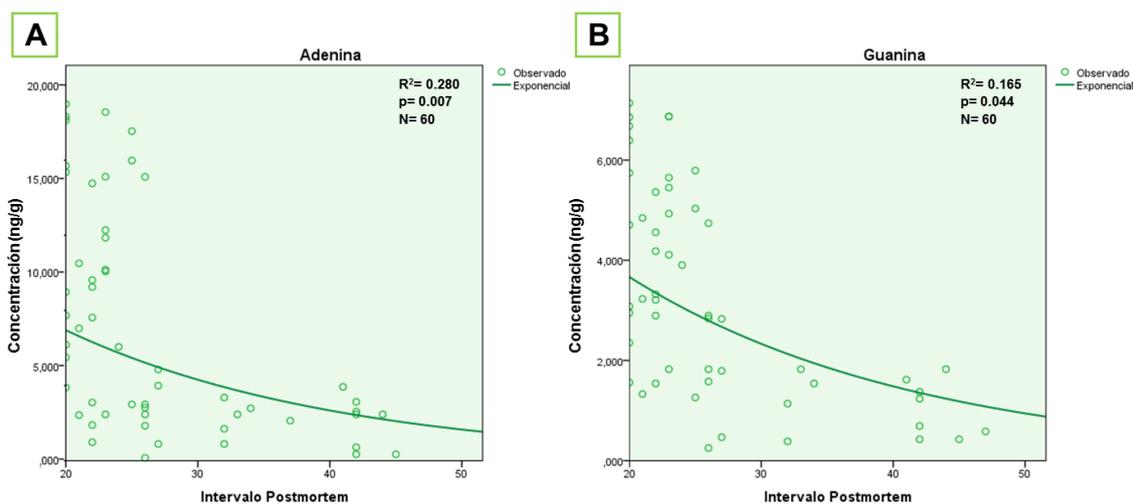


Figura 51. A. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Adenina total de la muestra respecto al IPM superior a 20 años de las muestras de huesos humanos analizados. **B.** Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Guanina total de la muestra respecto al IPM superior a 20 años de las muestras de huesos humanos analizados.

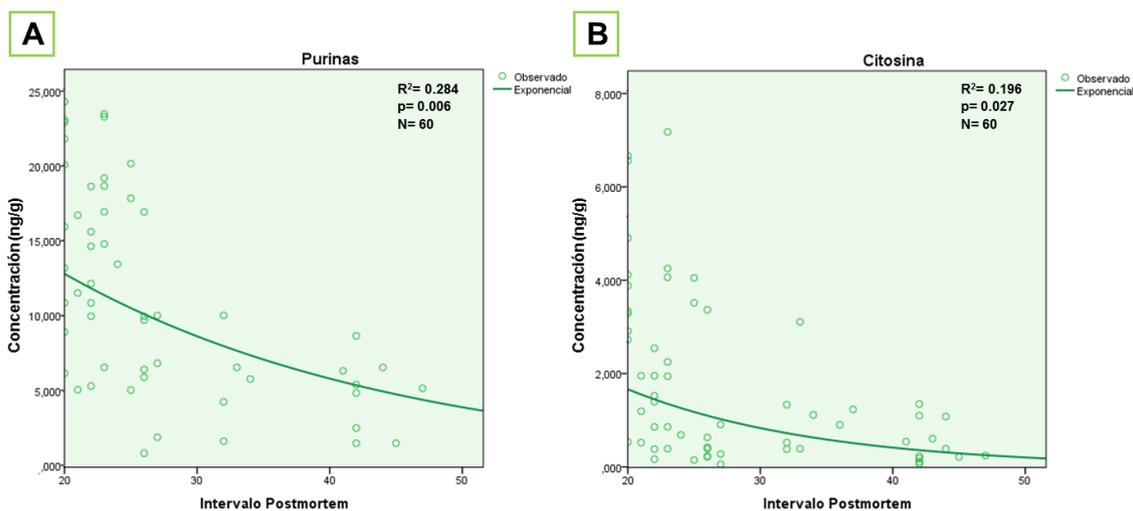


Figura 52. A. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Purinas total de la muestra respecto al IPM superior a 20 años de las muestras de huesos humanos analizados. **B.** Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Citosina total de la muestra respecto al IPM superior a 20 años de las muestras de huesos humanos analizados.

4.5.2. Análisis de correlación y regresión lineal de las concentraciones de ADN y bases nitrogenadas y el número de péptidos de colágeno tipo I en muestras óseas en función de cuatro grupos de intervalo postmortem

A continuación, se muestran las correlaciones bivariadas (no paramétrico) de los parámetros bioquímicos respecto a los cuatro grupos de IPM.

4.5.2.1. Análisis de los restos óseos con intervalo postmortem entre 5 y 10 años

La **Tabla 45** muestra las correlaciones entre los elementos estudiados y el IPM del grupo 1, data entre 5 y 10 años (N=10). Los resultados reflejan que no existe correlación estadísticamente significativa entre el intervalo de 5 a 10 años y los parámetros analizados.

Tabla 45. Correlaciones entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos y el IPM 5-10 años.

IPM 5-10 años N=10		
	Coefficiente de correlación Rho de Spearman (R)	p*
ADN	-0.045	n.s.
Adenina	0.160	n.s.
Guanina	-0.149	n.s.
PUR	-0.033	n.s.
Citosina	-0.098	n.s.
Timina	-0.161	n.s.
PYR	-0.228	n.s.
Hipoxantina	-0.143	n.s.
Xantina	0.066	n.s.
PYR/PUR	0.013	n.s.
PUR/PYR	-0.013	n.s.

Tabla 45. (Continuación).

IPM 5-10 años N=10		
	Coefficiente de correlación Rho de Spearman (R)	<i>p</i> *
Péptidos		
Colágeno I	-0.192	n.s.

*p**: Nivel de significación inferior a 0.05; n.s.: No significativo; N: Tamaño muestral total; PUR: Purinas (Adenina+Guanina); PYR: Pirimidinas (Citosina+Timina); PYR/PUR: Cociente entre pirimidinas y purinas; PUR/PYR: Cociente entre purinas y pirimidinas.

Realizamos un análisis de regresión lineal no encontrando ninguna variable predictora del IPM en este periodo postmortem (IPM entre 5 y 10 años).

4.5.2.2. Análisis de los restos óseos con intervalo postmortem entre 11 y 19 años

La **Tabla 46** muestra las correlaciones entre los elementos estudiados y el IPM del grupo 2, IPM entre 11 y 19 años (N=10). Los resultados reflejan que no existen correlaciones ni diferencias estadísticamente significativas entre el IPM 2, data entre 11 y 19 años y las variables de estudio.

Tabla 46. Correlaciones entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos y el IPM 11-19 años.

IPM 11-19 años N=10		
	Coefficiente de correlación Rho de Spearman (R)	<i>p</i> *
ADN	-0.097	n.s.
Adenina	-0.123	n.s.
Guanina	-0.334	n.s.
PUR	-0.218	n.s.

Tabla 46. (Continuación).

IPM 11-19 años N=10		
	Coefficiente de correlación Rho de Spearman (R)	<i>p</i> *
Citosina	-0.198	n.s.
Timina	-0.133	n.s.
PYR	-0.187	n.s.
Hipoxantina	-0.171	n.s.
Xantina	0.003	n.s.
PYR/PUR	0.243	n.s.
PUR/PYR	-0.243	n.s.
Péptidos		
Colágeno I	-0.205	n.s.

*p**: Nivel de significación inferior a 0.05; n.s.: No significativo; N: Tamaño muestral total; PUR: Purinas (Adenina+Guanina); PYR: Pirimidinas (Citosina+Timina); PYR/PUR: Cociente entre pirimidinas y purinas; PUR/PYR: Cociente entre purinas y pirimidinas.

Realizamos un análisis de regresión lineal no encontrando ninguna variable predictora del IPM en este periodo postmortem (IPM entre 11 y 19 años).

4.5.2.3. Análisis de los restos óseos con intervalo postmortem entre 20 y 30 años

La **Tabla 47** muestra las correlaciones entre los elementos estudiados y el IPM (IPM entre 20 y 30 años, N=40). Los resultados reflejan que existe una correlación con diferencias estadísticamente significas entre el IPM (data entre 20-30 años) y la variable:

- ⊕ Timina (R= -0.519), lo cual indica que a medida que aumenta el IPM la concentración de esta variable disminuye significativamente.

No existen correlaciones significativas entre el IPM y las variables de estudio, pero esta es en la mayoría de los casos negativa y por tanto un patrón de comportamiento similar.

Tabla 47. Correlaciones entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos y el IPM 20-30 años.

IPM 20-30 años N=40		
	Coefficiente de correlación Rho de Spearman (R)	<i>p</i> *
ADN	0.327	n.s.
Adenina	-0.056	n.s.
Guanina	-0.351	n.s.
PUR	-0.134	n.s.
Citosina	-0.292	n.s.
Timina	-0.519	0.047
PYR	-0.479	n.s.
Hipoxantina	0.436	n.s.
Xantina	-0.333	n.s.
PYR/PUR	-0.327	n.s.
PUR/PYR	0.327	n.s.
Péptidos		
Colágeno I	-0.161	n.s.

*p**: Nivel de significación inferior a 0.05; n.s.: No significativo; N: Tamaño muestral total; PUR: Purinas (Adenina+Guanina); PYR: Pirimidinas (Citosina+Timina); PYR/PUR: Cociente entre pirimidinas y purinas; PUR/PYR: Cociente entre purinas y pirimidinas.

En la **Tabla 48** se muestra el modelo matemático obtenido en el análisis de regresión lineal, la *R*, *R*², *p*, los coeficientes de la ecuación y la ecuación (**Tabla 49**) que sigue el parámetro bioquímico que presentó una correlación significativa con el IPM en el Grupo 3, data entre 20 y 30 años, el cual fue la timina.

La variable dependiente timina ($F(1,38)= 4.228$) presenta una $p < 0.05$, por lo que concluimos que esta variable está relacionada con el IPM entre 20-30 años.

El valor de R^2 obtenido en la estimación curvilínea para timina es de 27.6%, el cual explica la varianza del IPM entre 20-30 años.

Tabla 48. Estimación curvilínea de los parámetros bioquímicos en los casos con IPM entre 20-30 años (Grupo 3).

IPM 20-30 años (N=40)							
Resumen modelo						Coeficientes	
	Modelo	R	R ²	F	p	B	Beta (b1)
Timina	Exponencial	0.526	0.276	4.228	0.044	499.623	-0.210

N: Tamaño muestral total.

Tabla 49. Ecuaciones de los parámetros bioquímicos en los casos con IPM entre 20-30 años (Grupo 3).

IPM 20-30 años (N=40)	
Ecuación	
Timina	$y = 499.623 * \exp(-0,210 * x)$

N: Tamaño muestral total.

Como se muestra en la **Figura 53**, se observa un patrón de concentración decreciente de timina, siguiendo un modelo exponencial, lo cual sugiere que en el IPM entre 20 y 30 años se produce una disminución de la concentración de esta base en relación al tiempo de fallecimiento.

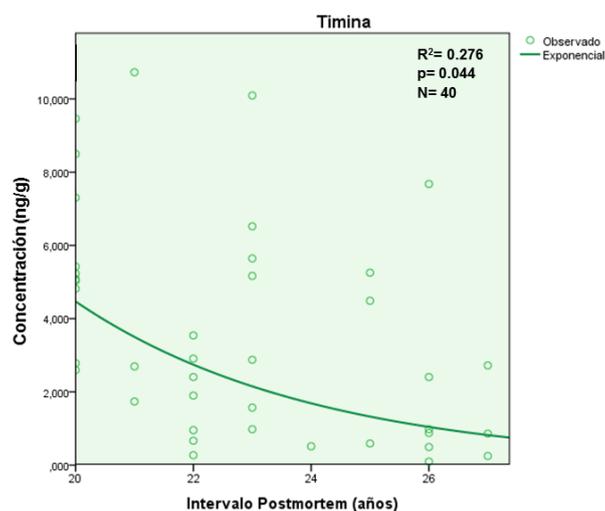


Figura 53. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Timina total de la muestra respecto al IPM entre 20 y 30 años de las muestras de huesos humanos analizados.

4.5.2.4. Análisis de los restos óseos con intervalo postmortem superior a 30 años

La **Tabla 50** muestra las correlaciones entre los elementos estudiados y el IPM superior a 30 años (N=20). Los resultados reflejan que no existen correlaciones estadísticamente significativas entre el IPM (data superior a 30 años) y las variables de estudio.

Tabla 50. Correlaciones entre las concentraciones de los parámetros bioquímicos y el IPM > 30 años.

IPM > 30 años N=20		
	Coefficiente de correlación Rho de Spearman (R)	p*
ADN	0.162	n.s.
Adenina	-0.332	n.s.
Guanina	0.130	n.s.
PUR	-0.124	n.s.
Citosina	-0.189	n.s.
Timina	-0.371	n.s.
PYR	-0.397	n.s.
Hipoxantina	-0.063	n.s.
Xantina	0.072	n.s.
PYR/PUR	-0.071	n.s.
PUR/PYR	0.071	n.s.
Péptidos	-	-
Colágeno I	-	-

p*: Nivel de significación inferior a 0.05; n.s.: No significativo; N: Tamaño muestral total; PUR: Purinas (Adenina+Guanina); PYR: Pirimidinas (Citosina+Timina); PYR/PUR: Cociente entre pirimidinas y purinas; PUR/PYR: Cociente entre purinas y pirimidinas.

Realizamos un análisis de regresión lineal no encontrando ninguna variable predictora del IPM en este periodo postmortem (IPM superior a 30 años).

4.6. Análisis discriminante de los parámetros bioquímicos en relación a grupos de intervalo postmortem

4.6.1. Análisis discriminante de los parámetros bioquímicos en relación a dos intervalos postmortem

Realizamos un análisis discriminante con las concentraciones de los marcadores bioquímicos como variables independientes y con los grupos de IPM (IPM inferior a 20 años (n=20) e IPM superior o igual a 20 años (n=60)) como variable dependiente. En la **Tabla 51** se muestran los porcentajes correctos de clasificación utilizando los parámetros de manera individual, los parámetros de manera individual introducidos por pasos (análisis discriminante secuencial) y de forma conjunta (análisis discriminante simultáneo).

El análisis individual de las variables muestra que las que mejor clasifican entre los 2 grupos de data establecidos son la concentración de adenina (75.6%), la concentración de citosina (71.1%) y la concentración de purinas, pirimidinas y el número de péptidos de colágeno tipo I (68.9%).

Los resultados obtenidos en el análisis discriminante por pasos (secuencial) muestran que las variables con mayor poder de discriminación en los 2 grupos de data estudiados son la concentración adenina, la concentración de purinas, la concentración de citosina, la concentración de pirimidinas y el número de péptidos de colágeno tipo I, clasificando el 77.8% de los casos de forma correcta.

Por otro lado, encontramos que el análisis discriminante conjunto (simultáneo), donde se evalúa la capacidad discriminante de todos los parámetros, clasifica de forma correcta un 86.7% de los casos.

Tabla 51. Análisis discriminante, resultados de la clasificación.

Análisis discriminante	Variables	Grupo de pertenencia pronosticado		Clasificados correctamente (%)
		IPM < 20 años (%)	IPM ≥ 20 años (%)	
Individual	ADN	65.0	52.0	57.8
	Adenina	60.0	88.0	75.6
	Guanina	35.0	84.0	62.2

Tabla 51. (Continuación).

Análisis discriminante	Variables	Grupo de pertenencia pronosticado		Clasificados correctamente (%)
		IPM < 20 años (%)	IPM ≥ 20 años (%)	
Individual	Purinas	50.0	84.0	68.9
	Citosina	55.0	84.0	71.1
	Timina	55.0	60.0	57.8
	Pirimidinas	65.0	72.0	68.9
	Hipoxantina	45.0	68.0	57.8
	Xantina	55.0	64.0	60.0
	PYR/PUR	80.0	44.0	60.0
	PUR/PYR	55.0	32.0	42.2
	Péptidos colágeno I	40.0	92.0	68.9
Secuencial	Adenina Purinas Citosina Pirimidinas Péptidos colágeno I	70.0	84.0	77.8
	Todos los parámetros (independientes juntas)	95.0	80.0	86.7

PYR/PUR: Cociente entre pirimidinas y purinas; PUR/PYR: Cociente entre purinas y pirimidinas.

4.6.2. Análisis discriminante de los parámetros bioquímicos en relación a cuatro intervalos postmortem

Realizamos un análisis discriminante con las concentraciones de los marcadores bioquímicos como variables independientes y con los 4 grupos de IPM (IPM entre 5 y 10 años (n=10); IPM entre 11 y 19 años (n=10); IPM entre 20 y 30 años (n=40) e IPM superior a 30 años (n=20)) como variable dependiente (**Tabla 52**).

El análisis individual de las variables muestra que la que mejor clasifica entre los 4 grupos de IPM establecidos es la concentración de adenina (46.7%) y la concentración de purinas (44.4%).

Los datos obtenidos muestran que, en el análisis discriminante por pasos, las variables con mayor poder de discriminación entre los 4 grupos de data estudiados son

la concentración de adenina y purinas, clasificando el 53.3% de los casos de forma correcta.

El análisis discriminante conjunto, donde se evalúa la capacidad discriminante de todos los parámetros, clasifica de forma correcta un 73.3% de los casos.

Tabla 52. Análisis discriminante, resultados de la clasificación.

Análisis discriminante	Variables	Grupo de pertenencia pronosticado				Clasificados correctamente
		IPM 5-10 años (%)	IPM 11-19 años (%)	IPM 20-30 años (%)	IPM > 30 años (%)	
Individual	ADN	50.0	80.0	10.0	10.0	31.3
	Adenina	50.0	20.0	46.7	70.0	46.7
	Guanina	50.0	10.0	33.3	70.0	40.0
	Purinas	60.0	20.0	26.7	90.0	44.4
	Citosina	50.0	20.0	33.3	70.0	42.2
	Timina	40.0	20.0	0.0	60.0	24.4
	Pirimidinas	60.0	20.0	6.7	80.0	37.8
	Hipoxantina	30.0	40.0	20.0	60.0	35.6
	Xantina	60.0	10.0	6.7	70.0	33.3
	PUR/PUR	80.0	10.0	20.0	50.0	37.8
	PUR/PYR	0.0	30.0	46.7	50.0	33.3
	Péptidos colágeno I	50.0	0.0	0.0	100	33.3
Secuencial	Adenina Purinas	50.0	50.0	46.7	70.0	53.3
Simultáneo	Todos los parámetros (indep juntas)	70.0	90.0	60.0	80.0	73.3

PUR/PUR: Cociente entre pirimidinas y purinas; PUR/PYR: Cociente entre purinas y pirimidinas.

4.7. Análisis descriptivo de las muestras óseas del estudio de patologías previas

4.7.1. Muestras de restos óseos con historias clínicas

La **Tabla 53** se muestra el número de muestra del estudio, sexo, tipo de hueso, edad del fallecido e IPM en un total de 45 muestras óseas humanas.

De los 45 cadáveres utilizados en el estudio, se disponía de 29 historiales clínicos (n=29, 64.4%), de los cuales 14 reflejan los registros médicos de las patologías relacionadas con las proteínas identificadas (n=14, 48.3%). En los casos restantes, no se disponía de información suficiente para corroborar la patología descrita con las proteínas identificadas en este estudio.

Tabla 53. Características principales de las muestras óseas humanas.

ID Muestra	Sexo (H/M)	Tipo de hueso	Edad de fallecimiento (años)	IPM (años)*
1**	H	Fémur	48	18
2	H	Fémur	36	18
3*	H	Fémur	59	18
4**	M	Fémur	74	18
5*	H	Fémur	20	18
6**	H	Fémur	93	18
7*	H	Fémur	58	18
8**	M	Fémur	92	18
9*	H	Fémur	69	18
10*	H	Fémur	64	18
11**	H	Fémur	67	19
12*	H	Fémur	71	19
13*	H	Fémur	33	19
14	M	Fémur	84	20
15	H	Fémur	47	20
16	M	Fémur	21	20
17*	H	Fémur	58	20

Tabla 53. (Continuación).

ID Muestra	Sexo (H/M)	Tipo de hueso	Edad de fallecimiento (años)	IPM (años)*
18*	M	Fémur	76	21
19**	H	Tibia	67	21
20	H	Fémur	79	21
21	H	Fémur	85	21
22**	M	Tibia	78	21
23	H	Tibia	39	21
24	H	Fémur	42	22
25	M	Fémur	84	23
26*	H	Fémur	75	23
27**	H	Fémur	67	23
28**	H	Fémur	33	24
29	M	Fémur	97	24
30*	H	Tibia	78	24
31	M	Fémur	90	24
32	H	Fémur	69	30
33**	H	Fémur	76	31
34	M	Fémur	82	31
35**	M	Tibia	53	34
36	H	Tibia	77	35
37	M	Fémur	91	39
38**	M	Tibia	82	40
39*	H	Tibia	48	40
40**	M	Tibia	75	40
41*	H	Fémur	57	41
42	H	Tibia	86	42
43*	M	Tibia	58	42

Tabla 53. (Continuación).

ID Muestra	Sexo (H/M)	Tipo de hueso	Edad de fallecimiento (años)	IPM (años)*
44*	H	Fémur	78	43
45**	M	Tibia	68	45

Edad de fallecimiento (años); ID Muestra: Número de muestra del estudio; IPM (años)* Establecido a fecha de 13/01/14; Sexo: H=hombre, M=mujer.

* Sujetos para quienes el expediente médico está disponible, pero no proporciona información relacionada con marcadores de patología infecciosa.

** Sujetos cuyos expedientes médicos reflejan patologías que coinciden con las proteínas identificadas. Nótese que en el período cubierto por el registro médico no se detectaron ni caracterizaron los agentes infecciosos. Las infecciones comunes no se incluyen normalmente en los registros.

4.7.2. Sexo, edad y tipo de hueso de los restos óseos

La muestra está formada por 45 restos óseos de los cuales se disponía información acerca del sexo, edad de fallecimiento y tipo de los restos óseos.

Se analizaron restos óseos de ambos sexos, siendo mayoritariamente hombres (n=29, 64.4%) y en menor número mujeres (n=16, 35.6%).

La edad media de los sujetos (\pm DE) fue de 66.31 ± 19.49 años con un rango que oscilaba entre los 20 y los 97 años.

La **Tabla 54** recoge los valores descriptivos de la edad de los sujetos en función del sexo, donde se observa que las mujeres presentan una edad de fallecimiento significativamente superior (74.75 ± 18.84 (media \pm DE)) a la de los varones 61.66 ± 18.53 (media \pm DE)) ($p=0.018$).

Tabla 54. Valores descriptivos de la edad distribuidos en función del sexo (N=45).

	Sexo	Años (Media \pm DE)	p^*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
Edad	Hombre (n=29, 64.4%)	61.66 \pm 18.53	0.018	67.00	20	93	54.61	68.70
	Mujer (n=16, 35.6%)	74.75 \pm 18.84		80.00	21	97	64.71	84.79
Edad total	45 (100%)	66.31 \pm 19.49		69.00	20	97	60.46	72.17

DE: Desviación estándar; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total; n: Tamaño muestral de cada grupo; p^* : Nivel de significación inferior a 0.05 (*Test de *Mann-Whitney*).

En la **Tabla 55** se observan las frecuencias del tipo de los restos óseos en función del sexo. El fémur en el caso de los varones se encuentra más representado (n=24, 53.3%) que las tibias (n=5, 11.1%). Por otro lado, los 2 tipos de huesos, fémur (n=9, 20.0%) y tibia (n=7, 15.6%) se encuentran representados de forma similar en el caso de las mujeres.

Tabla 55. Frecuencias de los distintos restos óseos analizados en función del sexo.

		Sexo	
		N=45 (100%)	
		Hombre n=29 (64.4%)	Mujer n=16 (35.6%)
Tipo de hueso N=45 (100%)	Fémur n=33 (73.3%)	24 (53.3%)	9 (20.0%)
	Tibia n=12 (26.7%)	5 (11.1%)	7 (15.6%)

N: Tamaño total de la muestra; n: tamaño muestral correspondiente a cada grupo analizado.

4.7.3. Intervalo postmortem

La **Tabla 56** muestra los valores descriptivos del parámetro IPM de los restos óseos analizados, el cual oscilaba entre 18 años y 45 años, con una media de 25.84 \pm 8.91 (media años \pm DE).

4. Resultados

Tabla 56. Valores descriptivos del IPM de los restos óseos analizados (N=80).

	Años (Media ± DE)	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
					Inferior	Superior
IPM (N=80)	25.84 ± 8.91	21.00	18	45	23.09	28.55

DE: Desviación estándar; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total.

Del total de muestras, realizamos un análisis descriptivo de la variable IPM en función del sexo, donde no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos parámetros (**Tabla 57**). El IPM en mujeres fue de 28.75 ± 9.71 (media ± DE) fue ligeramente superior al de los varones (24.24 ± 8.18 (media ± DE)).

Tabla 57. Análisis del IPM en el total de muestras de hueso (N=45) respecto al sexo.

	Sexo	Años (Media ± DE)	p*	Mediana	Mín.	Máx.	IC 95%	
							Inferior	Superior
IPM	Hombre (n=29, 64.4%)	24.24 ± 8.18	n.s.	21.00	18	43	21.13	27.35
	Mujer (n=16, 35.6%)	28.75 ± 9.71		24.00	15	45	21.13	27.35

DE: Desviación estándar; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo; N: Tamaño muestral total; n: Tamaño muestral de cada grupo; p*: Nivel de significación inferior a 0.05 (*Test de Mann-Whitney).

4.7.4. Identificación de biomarcadores asociados a patologías en muestras óseas

La siguiente sección describe los resultados obtenidos después de los diferentes análisis, en los que se clasifican los agentes infecciosos y patológicos y se calculan los porcentajes de casos en función del número total de muestras estudiadas.

Los marcadores de patología viral encontrados en el estudio fueron principalmente biomoléculas que son esenciales para la replicación y estructura de virus en células humanas. Como marcadores bacterianos se encontraron proteínas implicadas en la interacción molecular entre las células (Rydén y cols., 1989) y en el metabolismo de las bacterias (Su y cols., 2013; Garbarino y Gibbons, 2002).

Las patologías principales que estaban recogidas en las historias clínicas de estos sujetos fueron el VIH (n=8), el cáncer (n=6), la leucemia (n=2), la anemia (n=3) y

la esclerosis lateral amiotrófica 2 (n=2), aunque no se incluyó la presencia de bacterias y otros virus, y hubo patologías en el momento de la muerte que no fueron identificadas (herpes, parvovirus, etc.).

La **Tabla 58** muestra los agentes infecciosos encontrados en las muestras analizadas (N=45). El análisis de los datos muestra un mayor número de proteínas víricas identificadas en los huesos (n=48, 73.8%) respecto a las proteínas bacterianas (n=17, 26.2%). Además, se observa el Virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH) (n=8, 17.8%) como agente presente en el mayor número de casos con historia clínica conocida. Por otro lado, los resultados muestran una alta frecuencia de Herpesvirus humano tipo 5 (CMV) en las muestras óseas analizadas (n=21, 46.7%) que no pudimos corroborar con el expediente clínico de los sujetos del estudio.

Tabla 58. Frecuencia de los agentes infecciosos identificados en las muestras de restos óseos (N=45).

Agente infeccioso	Tipo de agente etiológico	Casos (%)	Total %
Herpesvirus humano 1 (HSV-1)	Virus	3 (6.7%)	48 (73.8%)
Citomegalovirus humano - Herpesvirus humano 5 (CMV)	Virus	21 (46.7%)	
Herpesvirus humano 6 (HVH-6)	Virus	12 (26.7%)	
Virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH)	Virus	8 (17.8%)	
Parainfluenza virus 5 (PIV-5)	Virus	1 (2.2%)	
Virus respiratorio sincitial humano (VRS)	Virus	1 (2.2%)	
Adenovirus humano 7d (AdV-7d)	Virus	1 (2.2%)	
Parvovirus humano B19 (B19V)	Virus	1 (2.2%)	

4. Resultados

Tabla 58. (Continuación).

Agente infeccioso	Tipo de agente etiológico	Casos (%)	Total (%)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Bacteria	7 (15.6%)	17 (26.2%)
<i>Giardia intestinalis</i> ATCC 50581	Bacteria	3 (6.7%)	
<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	Bacteria	1 (2.2%)	
<i>Staphylococcus warneri</i> I37603	Bacteria	2 (4.4%)	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NIH05001	Bacteria	1 (2.2%)	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> TCH60	Bacteria	1 (2.2%)	
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i> ATCC 33861	Bacteria	1 (2.2%)	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>enteritidis</i> str. 576709	Bacteria	1 (2.2%)	

En la **Tabla 59** se muestra la frecuencia de los marcadores patológicos bacterianos y virales identificados en las muestras óseas con los porcentajes de presencia en cada caso.

Tabla 59. Agentes infecciosos, marcadores patológicos bacterianos y virales en humanos, casos (%) y muestras en las que se han detectado marcadores.

Agente infeccioso	Marcadores patológicos bacterianos y virales	Casos (%)	ID Muestra
HSV-1	DNA polimerasa	1 (2,2 %)	14
	Timidina quinasa	1 (2,2 %)	15
	Anticuerpo monoclonal ACHSV1 = cadena pesada del fragmento Fab D-específico de la glicoproteína de tipo 1 del antígeno de Herpes simplex (clon 1, dominio variable)	1 (2,2 %)	27
CMV	Proteína grande del tegumento	4 (8,9 %)	1, 12, 27, 45
	Glicoproteína de la envuelta US27	2 (4,4 %)	5, 9
	Glicoproteína de la envuelta B	1 (2,2 %)	20
	Glicoproteína de la envuelta L	1 (2,2 %)	1
	Proteína del tegumento UL25	1 (2,2 %)	12

Tabla 59. (Continuación).

Agente infeccioso	Marcadores patológicos bacterianos y virales	Casos (%)	ID Muestra
CMV	Proteína del tegumento UL51	1 (2.2 %)	17
	Proteína del tegumento UL88	1 (2.2 %)	3
	Proteína del tegumento IRS1	1 (2.2 %)	3
	Proteína del tegumento US22	1 (2.2 %)	4
	Proteína del tegumento pp71	1 (2.2 %)	33
	Proteína del tegumento pp150	1 (2.2 %)	38
	Proteína de membrana US20	2 (4.4 %)	5, 14
	Proteína de membrana US30	2 (4.4 %)	28, 42
	Proteína truncada UL140	1 (2.2 %)	35
	Proteína UL29	1 (2.2 %)	42
	Proteína UL148C	1 (2.2 %)	14
	Proteína UL135	1 (2.2 %)	16
	Proteína UL49	1 (2.2 %)	28
	Proteína UL87	1 (2.2 %)	39
	Proteína UL27	2 (4.4 %)	33, 45
	Proteína UL34	1 (2.2 %)	1
	Proteína RL5A	1 (2.2 %)	24
	Proteína del tegumento UL25 (embalaje ADN)	1 (2.2 %)	13
	Subunidad de procesamiento de DNA polimerasa	2 (4.4 %)	22, 33
	Ribonucleotide reductase subunit 1	1 (2.2 %)	39
	Deoxiuridina trifosfatasa	1 (2.2 %)	1
	Fosfotransferasa, parcial	1 (2.2 %)	27
Deoxirribonucleasa	1 (2.2 %)	4	
Subunidad de catalítica de DNA polimerasa	1 (2.2 %)	1	
Subunidad helicasa, helicasa-primasa	1 (2.2 %)	3	
HVH-6	Glicoproteína U20	1 (2.2 %)	1
	Glicoproteína U21	1 (2.2 %)	2
	Ganciclovir quinasa, fosfotransferasa U69	1 (2.2 %)	3
	U86, IE2	1 (2.2 %)	4

4. Resultados

Tabla 59. (Continuación).

Agente infeccioso	Marcadores patológicos bacterianos y virales	Casos (%)	ID Muestra
HVH-6	DR2	1 (2.2 %)	15
	Glicoproteína U23	1 (2.2 %)	12
	U55	1 (2.2 %)	12
	U10	2 (4.4 %)	9, 42
	BHLF2	1 (2.2 %)	8
	Proteína mayor de la cápside, U57	1 (2.2 %)	26
	U89, IE1	1 (2.2 %)	27
	Proteína grande del tegumento U31	1 (2.2 %)	39
	DNA polimerasa U38	1 (2.2 %)	8
VIH	Glicoproteína de la envuelta	8 (17.8 %)	6, 11, 19, 27, 28, 33, 35, 38
PIV-5	Fosfoproteína	1 (2.2 %)	3
VRS	Glicoproteína	1 (2.2 %)	13
AdV-7d	Fibra adenoviral	1 (2.2 %)	12
B19V	Proteína de la cápside, VP1	1 (2.2 %)	26
	Proteína no-estructural, NS1	1 (2.2 %)	26
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Precursor de la proteína de superficie, parcial	7 (15.6 %)	3, 12, 22, 29, 35, 40, 42
<i>Giardia intestinalis</i> ATCC 50581	Midasin	3 (6.7 %)	1, 27, 36
<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	Similar a photopexin a/b de <i>Photorhabdus luminescens</i>	1 (2.2 %)	28
<i>Staphylococcus warneri</i> I37603	Proteína de unión a sialoproteína ósea, parcial	2 (4.4 %)	15, 22
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NIH05001	Supuesta proteína de unión a sialoproteína ósea	1 (2.2 %)	23
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> TCH60	Proteína de unión a sialoproteína ósea	1 (2.2 %)	6
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i> ATCC 33861	ATPasa/histidina quinasa/DNA girasa B/dominio de proteína HSP90	1 (2.2 %)	31
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>enteritidis</i> str. 576709	Aspartil-tRNA ligasa	1 (2.2 %)	42

Los marcadores diagnósticos humanos encontrados fueron indicadores de diferentes tipos de cáncer y anemia (**Tabla 60**).

Tabla 60. Marcadores de diagnóstico humano, casos (%) y muestras en las que se han detectado marcadores.

	Marcadores de diagnóstico	Casos (%)	ID Muestra
Humano (Homo sapiens)	Oncogen SKI	1 (2.2 %)	28
	Proteína tumoral D54, isoforma a	1 (2.2 %)	45
	Linfoma de células B/Leucemia 11A	1 (2.2 %)	1
	Leucemia mieloide/linfocítica 2	1 (2.2 %)	45
	Proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 2	1 (2.2 %)	22
	Proteína B1 del osteosarcoma sensible a PTH	1 (2.2 %)	6
	Supresor tumoral 1 del neuroblastoma, isoforma 1	1 (2.2 %)	32
	Antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por las células T3	1 (2.2 %)	27
	Proteína de anemia Fanconi grupo J	1 (2.2 %)	11
	Proteína de anemia Fanconi grupo I	1 (2.2 %)	38
	Proteína de anemia Fanconi grupo A	1 (2.2 %)	40
	Esclerosis lateral amiotrófica, región cromosómica 2, gen candidato 11, proteína isoforma 1	1 (2.2 %)	38
	Esclerosis lateral amiotrófica región cromosómica 2, gen candidato 11, proteína isoforma 4	1 (2.2 %)	36

5. DISCUSIÓN

En la actualidad, la estimación del IPM reciente cuenta con métodos que proporcionan información relativamente precisa, pero tras periodos más largos de tiempo o cuando solo se dispone de muestras de hueso como material biológico para esta estimación, las técnicas y métodos actuales nos proporcionan información imprecisa.

Por lo tanto, a día de hoy, existe un gran interés y necesidad médico-legal de desarrollar herramientas y métodos que permitan establecer el IPM a partir de restos óseos, ya que son en muchas ocasiones, las únicas muestras biológicas de las que se dispone y las cuales pueden presentar información muy valiosa.

5.1. Restos óseos como fuente de análisis

En los casos en los que no hay restos de tejidos blandos, la única fuente para la extracción de componentes orgánicos tales como proteínas, lípidos y ADN, son los huesos, incluidos los dientes.

El hueso es considerado una matriz adecuada, ya el hidroxapatita actúa potencialmente como una barrera física y química contra el deterioro del ADN (que podría verse afectada por la actividad microbológica y los distintos factores ambientales). Este hecho ha sido ampliamente mencionado en la literatura para explicar la preservación excepcional de ADN en tejidos duros (Collins y cols., 2002; Tuross, 1994; Lindahl, 1993).

5.1.1. Factores que afectan a los restos óseos

Los estudios de restos óseos presentan dificultades como son la variabilidad intra-sujetos, los procesos de degradación que producen una disminución de la matriz celular (Soler y cols., 2011), la erosión de la superficie del hueso debido a las condiciones ambientales (temperatura, humedad, luz solar), las condiciones del suelo (pH, contenido de minerales, etc.) (Janjua y Rogers, 2008; Behrensmeyer, 1978) y la diagénesis del tejido óseo donde se produce la alteración de las proporciones orgánicas (colágeno) e inorgánicas (hidroxapatita, calcio, magnesio) debido a la exposición a los factores anteriores y lo que conlleva a un intercambio de componentes del hueso (Vass, 2001).

La cantidad de ADN y bases nitrogenadas en muestras biológicas pueden verse afectadas por factores exógenos y endógenos, por lo que hay que tenerlos en cuenta ya que influyen de forma directa en el hueso y en el ADN que se encuentra ellos.

Los factores exógenos, las condiciones ambientales como el tipo de suelo, pH o contenido en sales (Prieto-Castelló y cols., 2007), los niveles de humedad, ataque de microorganismos, y el tiempo que los restos han permanecido en ese lugar (Kaestle y Horsburgh, 2002) pueden afectar a la cinética de degradación de los elementos de estudio. En nuestro caso las condiciones de clima seco y algo húmedo, han permitido que la conservación del hueso fuera buena.

Los factores individuales más importantes en nuestra muestra son variables, siendo los más relevantes en este caso la edad, el sexo y la presencia de posibles patologías óseas, encontrándose los tres estrechamente relacionados.

En las tres primeras décadas de la vida, el recambio óseo se ajusta de forma precisa para mantener un estado de equilibrio entre la resorción ósea y la formación ósea. Aunque hay variaciones en las tasas de recambio óseo, en los picos de masa ósea y el tamaño, se consigue alrededor de la edad de 15-20 años en las mujeres y más tarde en los hombres (Raisz y Seeman, 2001).

Antes de que se produzca la deficiencia de esteroides sexuales, la pérdida ósea se hace evidente (Slemenda y cols., 1996). Tras alcanzar el pico de masa ósea, el recambio óseo continúa a un ritmo más lento por una rápida disminución de mediadores bioquímicos de la remodelación ósea con el predominio de la resorción ósea, sobre la formación de hueso (Raisz y Seeman, 2001). Posteriormente, la menopausia en las mujeres aumenta significativamente la resorción ósea sobre la formación debido a los bajos niveles de estrógenos induciendo así la pérdida ósea acelerada, mientras que los hombres tienen varios factores que los protegen, que ayudan a explicar la diferencia en las tasas de incidencia (osteoporosis) entre hombres y mujeres. Los hombres no sufren una disminución en la producción de esteroides sexuales durante la mitad de la vida, como se observa en las mujeres.

A los 80 años de edad, se estima que la masa ósea total del cuerpo es aproximadamente el 50% de su valor máximo (Kloss y Gassner, 2006). Este proceso se

conoce como osteoporosis senil, que describe un proceso de pérdida ósea relacionada con la edad.

El envejecimiento en combinación con factores intrínsecos y extrínsecos acelera la disminución de la masa ósea. Los factores intrínsecos incluyen la genética, el pico de acumulación de masa ósea en la juventud, alteraciones en los componentes celulares, alteraciones hormonales, el estado bioquímico y la vascularización. Los factores extrínsecos incluyen la nutrición, la actividad física, las condiciones médicas comórbidas y los fármacos (Demontiero y cols., 2012).

Las consecuencias generales de estos cambios relacionados con la edad son el adelgazamiento cortical, el aumento de la porosidad cortical, el adelgazamiento de las trabéculas y la pérdida de conectividad trabecular, todo lo cual reduce la calidad del hueso y, en consecuencia, la resistencia ósea (Rosen y cols., 1994).

En nuestro estudio hemos analizado 80 muestras de restos óseos de 80 sujetos diferentes de los cuales en 77 casos se conocía información acerca del sexo, 50 eran hombres (62.5%), 27 eran mujeres (33.75%) y en 3 de los casos se desconocía el sexo del sujeto (3.75%).

De los 77 casos de sexo conocido se disponía de la edad de fallecimiento de 61 sujetos (n=61, 76.25%), que en función del sexo encontramos una mayoría de hombres (n=40, 50.00%) y menor número mujeres (n=21, 26.25%). Las mujeres presentan una edad en el fallecimiento superior (75.19 ± 19.572 (media \pm DE)) a la de los varones (64.70 ± 16.258 (media \pm DE)) con una diferencia estadísticamente significativa.

Sin embargo, y a pesar de las diferencias que se dan en los huesos según el sexo y la edad, nuestros resultados reflejan que no existen diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de los elementos bioquímicos del estudio entre ambos sexos.

5.1.2. Tipos de restos óseos

Para nuestro estudio, utilizamos huesos largos, fémur (n=73, 91.25%), tibia (n=5, 6.25%) y húmero (n=2, 2.5%), los cuales son recomendados actualmente para análisis forenses, principalmente, las zonas densas de hueso cortical (Prinz y cols., 2007).

Varios autores confirman que la toma de muestras de hueso cortical denso a partir de elementos que soportan el peso como, por ejemplo, fémures, tibias y metatarsos es más adecuada (Miloš y cols., 2007; Leney, 2006; Edson y cols., 2004), ya que la densidad de un hueso se correlaciona positivamente con la preservación del ADN, por lo que este tipo de estructuras óseas se recomiendan de forma general para estudios de ADN (Prinz y cols., 2007; Parsons y Weedn, 1996).

Nuestros resultados confirman la idoneidad del uso de huesos largos (fémur, tibia y húmero) como fuente de ADN, bases nitrogenadas y péptidos de colágeno tipo I en un periodo postmortem que oscila entre 5-47 años, consiguiendo, en todos los casos, resultados positivos mediante los protocolos de extracción empleados.

El uso de restos óseos como fuente de biomoléculas es aceptada por distintos autores, sin embargo, no existe unanimidad en cuál es el mejor hueso. Autores como Miloš y cols. (2007) obtuvieron en su investigación un rendimiento en la cantidad ADN en más de 25.000 muestras de esqueletos con un IPM de entre 4 y 11 años que iba desde el 86.9% en el fémur, el 62.5% en tibia hasta el 46.2% en húmero.

La investigación llevada a cabo por Amory y cols. (2008) sobre restos exhumados de fosas comunes en la antigua Yugoslavia, un conjunto de huesos largos de 13-20 años de IPM, mostró un rendimiento de ADN de 14.3 ng/g (DE=10.9, n=11) de la tibia, 11 ng/g (DE=10.6, n=11) del fémur, y 1.85 ng/g (DE=1.65, n=14) del húmero.

Por otro lado, encontramos el estudio llevado a cabo por Mundorff y Davoren (2014) en el que se compara la cantidad media de ADN obtenido en diferentes muestras de restos óseos de individuos recientemente esqueletizados, donde los valores difieren de los anteriores, obteniendo una concentración media de ADN de 51 ng/g (DE=45.0, n=3) en húmero, en segundo lugar en tibia se obtuvieron 47 ng/g (DE=47.0, n=3) y en último lugar, en fémur se cuantificaron 25 ng/g (DE=10.0, n=3) de ADN.

Nuestros resultados muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de ADN según el tipo de hueso largo, por lo que podemos decir que, en nuestro caso, el uso de cualquiera de estos tres huesos largos es adecuado. El húmero presenta una concentración de ADN de 9.243 ± 0.788 ng/g (media \pm DE), a continuación, el fémur con una concentración media de ADN de 6.964

± 4.587 ng/g (media \pm DE) y por último, la tibia con una concentración media de 5.051 ± 4.109 ng/g (media \pm DE).

Se observa el mismo comportamiento en la concentración de bases nitrogenadas y el número péptidos de colágeno tipo I, ya que tampoco existen diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de los elementos bioquímicos según el tipo de hueso.

5.2. Tratamiento y análisis de las muestras de restos óseos

Uno de los objetivos de nuestro estudio era comprobar la idoneidad de los protocolos actuales para la extracción de diferentes componentes biológicos de muestras de restos óseos de diferentes intervalos postmortem.

5.2.1. Determinación de ADN

El procedimiento que se llevó a cabo en nuestra investigación para el tratamiento de las muestras de hueso se realizó conforme a los protocolos de extracción de hueso más utilizados en el ámbito forense, los cuales implican un período de incubación de polvo de hueso en tampón de extracción (EDTA) para la digestión de proteínas y desmineralización, seguido de la recogida del sobrenadante, y la eliminación de polvo de hueso restante (Lee y cols., 2010; Seo y cols., 2010; Loreille y cols., 2007; Rohland y Hofreiter, 2007), por lo cual se puede evidenciar que este sistema es válido para la extracción de ADN y bases nitrogenadas.

La mayoría de los protocolos de extracción de ADN actuales para huesos y dientes se basan en la incubación del material en polvo en el tampón de extracción que contiene EDTA. El EDTA desmineraliza el hueso (dependiendo de la concentración de EDTA y el volumen de tampón de extracción) e inactiva DNAasas, ya que es un quelante de cationes bivalentes tales como Ca^{2+} o Mg^{2+} .

Los métodos comúnmente utilizados para determinar la concentración de ADN, son las mediciones de fluorescencia y mediciones de absorbancia de UV a 260 nm (Shokere y cols., 2009), siendo éste último el más comúnmente usado (Holden y cols., 2007; Georgiou y Papapostolou, 2006). Por el contrario, la espectrofotometría presenta

distintas desventajas como son que la medición de la absorbancia a 260 nm incluye señales de dobles cadenas y de cadena sencilla, oligonucleótidos de ADN y nucleótidos libres, no distingue entre el ADN y el ARN, tiene una sensibilidad baja, llegando a 1 ng/l (Gallagher y Desjardins, 2007; Georgiou y Papapostolou, 2006; Singer y cols., 1997), además de que es susceptible a mediciones erróneas debido a los contaminantes y otros disolventes orgánicos, tales como el fenol, utilizados en la extracción de ADN (Sah y cols., 2013).

En nuestro estudio hemos empleado técnicas fluorimétricas que tienen como ventajas la medición selectiva de ADN de doble cadena, una alta sensibilidad analítica (Gallagher y Desjardins, 2007; Singer y cols., 1997), mayor rendimiento y una mejor tolerancia a los contaminantes, por ello, un gran número de laboratorios han adaptado este enfoque como una buena práctica para aplicaciones en secuenciación masiva (Simbolo y cols., 2013), poniendo de manifiesto de esta manera, que, a pesar de la antigüedad de los huesos, esta técnica es efectiva para la cuantificación del elemento en cuestión.

El método empleado para la estimación de la integridad del ADN de las muestras fue la evaluación de la intensidad de una banda en un gel de agarosa al 0.8% (Shokere y cols., 2009), empleando el protocolo de desmineralización y posteriormente el protocolo para purificación mediante extracción orgánica con fenol/cloroformo/isoamil alcohol, los cuales permitieron obtener un ADN muy íntegro, notándose en todos los casos una banda bien diferenciada, así como en algunos casos algunas colas de degradación (“smear”) en los carriles de las muestras, lo que sugiere por una parte una alta concentración de ADN y por otra parte una fracción de ADN más degradado.

5.2.2. Determinación de bases nitrogenadas

El protocolo empleado para la extracción de bases nitrogenadas fue el mismo que para la extracción de ADN sin llevar a cabo el paso de purificación orgánica, debido a que no hemos encontrado ninguna referencia bibliográfica con la que contrastar procedimientos.

La metodología usada para la detección y cuantificación de los otros parámetros de estudio, las bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina, timina, hipoxantina y

xantina) fue la ya descrita por autores como Markham y Smith (1949), la cual se basa en el empleo de instrumental de cromatografía.

Actualmente, hay una amplia variedad de técnicas de separación, incluyendo cromatografía de papel, cromatografía en capa fina, bioensayos, electroforesis capilar, cromatografía de gases y cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC), los cuales se aplican para la medición de las purinas y pirimidinas (Tavazzi y cols., 2005), pero el método más extendido para la determinación de nucleótidos, nucleósidos, así como de metabolitos en diferentes muestras biológicas es la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Burdett y cols., 2013; Struck y cols., 2011; Takahashi y cols., 2010; Liu y cols., 1995; Smolenski y cols., 1990), por lo que las muestras de nuestro estudio fueron analizadas mediante esta técnica, obteniendo siempre resultados positivos.

5.2.3. Determinación de péptidos de colágeno tipo I

La extracción de proteínas de una forma eficiente es uno de los problemas más críticos para un análisis proteómico, ya que los procedimientos de extracción clásicos para células y tejidos blandos no pueden ser utilizados en tejido óseo. Informes de análisis de proteómica en hueso, emplean el resto óseo molido y la extracción se lleva a cabo mediante la incubación en tampón de lisis (Schreiweis y cols., 2007; Fan y cols., 2005; Pastorelli y cols., 2005).

El protocolo empleado en nuestro estudio para la extracción de proteínas en hueso (Cleland y cols., 2012; Jiang y cols., 2007), permite la extracción de colágeno (elemento más abundante en la fase orgánica del hueso) y proteínas no colágenas de una manera sencilla, usando el polvo de hueso sin desmineralizar incubado en tampón de lisis (Hermansson y cols., 2004).

Para la identificación y cuantificación de proteínas en nuestro estudio se empleó HPLC-MS/MS ya que, los recientes avances en la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (Washburn y cols., 2001) han producido una tecnología capaz de un análisis directo de la composición de mezclas de proteínas tan complejo como los lisados celulares (Aebersold y Mann, 2003). La utilidad de la espectrometría de masas para el análisis de proteínas y péptidos reside en su capacidad para proporcionar información muy precisa del peso molecular sobre

moléculas intactas. La capacidad de generar dicha información precisa puede ser extremadamente útil para la identificación y caracterización de proteínas (Trauger y cols., 2002).

Con este método, mezclas de proteínas se digieren con proteasas, y los péptidos resultantes se separan mediante cromatografía líquida; a continuación, los péptidos separados se analizan secuencialmente por MS/MS. La posterior interpretación de los espectros de péptidos MS/MS mediante el uso de algoritmos tales como el espectro Mill, conduce a la identificación de las proteínas en la mezcla (Wang y cols., 2005) y presentan unas tasas de identificación de falsos positivos estimado inferior al 5%. Por lo que la presencia de al menos un péptido es suficiente para confirmar la presencia de esta proteína en la muestra biológica (Wang y cols., 2005).

Por tanto, después de la bibliografía consultada y tras los resultados positivos de nuestro estudio, coincidimos con los autores anteriormente citados en que los procedimientos empleados para la determinación de bases nitrogenadas, ADN y proteínas de colágeno son adecuados para su identificación y cuantificación en hueso.

5.3. Determinación del intervalo postmortem mediante el uso de la concentración de ADN y bases nitrogenadas y el número de péptidos de colágeno tipo I

Han sido muchas las investigaciones realizadas en restos óseos para la determinación del IPM. Varios autores han desarrollado trabajos con distintos parámetros bioquímicos para llegar a precisar en el cálculo del IPM mediante el uso de huesos, tales como Bayle y de Noyer (1939), Berg (1963), Knight (1975) y posteriormente Cattaneo y cols. (1992a, 1992b) que investigaron sobre la variación de proteínas y aminoácidos que se encuentran en dichas muestras. También se llevaron a cabo estudios de modificaciones en los lípidos de hueso por Castellano y Villanueva (1977, 1978) y por Castellano y cols. (1984). Otras investigaciones se realizaron sobre las variaciones en las concentraciones de componentes inorgánicos de la matriz mineral del hueso tales como hierro, plomo, zinc, fósforo, magnesio y potasio por autores como Castellano y cols., (1976) así como de otros elementos como el nitrógeno por parte de Jarvis (1997) y de forma posterior Prieto-Castelló y cols. (2007) profundizaron en la investigación de estos elementos incluyendo además urea, albúmina, etc. Sin embargo,

son pocos los estudios sobre el ADN y las bases nitrogenadas en la determinación del IPM en nuestro conocimiento, no han sido estudiadas previamente.

5.3.1. Relación de elementos biológicos con el intervalo postmortem

El ADN, se emplea principalmente para la identificación de personas desaparecidas, catástrofes, procedimientos históricos y en investigaciones antropológicas y arqueológicas (Pötsch y cols., 1992), así como en la determinación de parámetros como el sexo (Kumar y cols., 2009), siendo la fuente del material genético fundamentalmente huesos y dientes. Ambas matrices pueden ser los únicos restos biológicos disponibles para los análisis y además cuentan con una matriz mineral que actúa como barrera física y química, la cual obstaculiza el deterioro producido por factores ambientales y por el ataque de microorganismos (Higgins y Austin, 2013).

No obstante, existen escasos estudios que investigan el uso de las concentraciones de ADN para establecer la data de la muerte, a pesar de que distintas investigaciones refieren que el ADN de los huesos humanos puede permanecer estable durante un largo periodo de tiempo (Kaiser y cols., 2008).

Amory y cols. (2008) realizaron una investigación sobre huesos exhumados de fosas comunes en la antigua Yugoslavia, un conjunto de huesos largos con un IPM entre 13 y 20 años, encontrando una concentración media de ADN de 11 ng/g (DE=10.6, n=11) en fémures.

Posteriormente, un estudio llevado a cabo por Lee y cols. (2010) sobre un conjunto de huesos largos en fallecidos de la Guerra de Corea, con un IPM entre 47 y 50 años se obtuvo una media de ADN de 21.9 ng/g (DE = 22.6, n = 10). Además, Kitayama y cols. (2010) evaluaron la eficacia de un nuevo kit experimental para la extracción de ADN en fémures con un IPM entre 1 y 4 años, obteniendo como resultados una concentración media de ADN de 1.75 ng/g (DE=0.87, n=1) en un fémur de data de 1 año, 6.49 ng/g (DE=1.03, n=1) en una muestra de 1.5 años de IPM, 2.90 ng/g (DE=0.39, n=1) en un fémur con un IPM de 2 años y, por último, una cantidad media de ADN de 12.05 ng/g (DE=8.74, n=1) en un resto óseo con un IPM de 4 años.

Mundorff y Davoren (2014) examinaron las tasas de rendimiento de ADN para los diferentes elementos esqueléticos respecto al aumento del IPM, obteniendo en fémur con un IPM de 3 años una concentración de 35.6 ng/g (DE=12.9, n=12), en restos con un IPM de 7 años una concentración media de 7.8 ng/g (DE=4.1, n=12), en un fémur con un IPM entre 13 y 14 años una cantidad media de ADN de 56.6 ng/g (DE=53.6, n=12) y en un resto con un IPM entre 20 y 21 años una concentración media de 9.4 ng/g (DE=4.5, n=12).

La **Tabla 61** compara los resultados de las concentraciones medias de ADN de esta investigación con los estudios de los autores citados anteriormente. En ella se observan concentraciones similares a las de los estudios realizados por Mundorff y Davoren (2014) en los restos óseos con un IPM de 7 años con una concentración media de ADN de 5.28 ng/g (DE=4.10, n=5) y de un periodo entre 20 y 21 años de IPM con una concentración media de ADN de 8.60 ng/g (DE=3.87, n=4) y por Amory y cols. (2008) en restos óseos de IPM que oscila entre 13 y 20 años con una concentración media de ADN de 6.84 ng/g (DE=3.66, n=14)

Tabla 61. Concentraciones medias de ADN respecto al IPM según estudios.

IPM (años)	Concentración		Autor
	media ADN*	n	
	(ng/g)		
1	1.75 ± 0.87	1	Kitayama y cols. (2010)
1.5	6.49 ± 1.03	1	Kitayama y cols. (2010)
2	2.90 ± 0.39	1	Kitayama y cols. (2010)
3	35.6 ± 12.9	12	Mundorff y Davoren (2014)
4	12.05 ± 8.74	1	Kitayama y cols. (2010)
7	7.8 ± 4.1	12	Mundorff y Davoren (2014)
7	5.28 ± 4.10	5	Tesis, Pérez-Martínez (2017)
13-14	56.6 ± 53.6	12	Mundorff y Davoren (2014)
11-15	5.38 ± 3.08	9	Tesis, Pérez-Martínez (2017)
13-20	11 ± 10.6	11	Amory y cols. (2008)
13-20	6.84 ± 3.66	14	Tesis, Pérez-Martínez (2017)

Tabla 61. (Continuación).

IPM (años)	Concentración		Autor
	media ADN* (ng/g)	n	
20-21	9.4 ± 4.5	12	Mundorff y Davoren (2014)
20-22	8.60 ± 3.87	4	Tesis, Pérez-Martínez (2017)
47-50	21.9 ± 22.6	10	Lee y cols. (2010)
> 30	6.61 ± 2.89	20	Tesis, Pérez-Martínez (2017)

ADN*: Concentración media ADN en fémur (ng/g) ± DE.

Por otra parte, y respecto a la fragmentación del ADN, autores como Johnson y Ferris (2002) mediante análisis cometa (electroforesis en gel de células individuales) analizaron si existían variaciones en el tamaño de los fragmentos de ADN en función del IPM, obteniendo resultados favorecedores a su hipótesis inicial. Los autores revelaron que la fragmentación del ADN es un proceso dependiente del tiempo y llegaron a la conclusión de que esta información puede ser utilizada para determinar el IPM en el período postmortem que oscilaba entre las 0 y 72 horas.

Kaiser y cols. (2008) examinaron la tasa de fragmentación del ADN a través de PCR, llegando a la conclusión de que no existe ninguna correlación entre la cantidad total de ADN y el IPM, pero sí encontraron una correlación inversa entre la longitud de los fragmentos y el IPM. En este caso, después de la muerte, la degradación del ADN en fragmentos cada vez más pequeños revela un proceso dependiente del tiempo.

Nuestros datos revelaron que en un periodo de IPM que oscila entre los 5-47 años, aunque no existe una correlación estadísticamente significativa entre la concentración de ADN total presente en las muestras óseas y el IPM, la relación entre ambas variables es de tipo negativo, ya que se produce un descenso de la concentración de ADN respecto a la data (**Figura 54**).

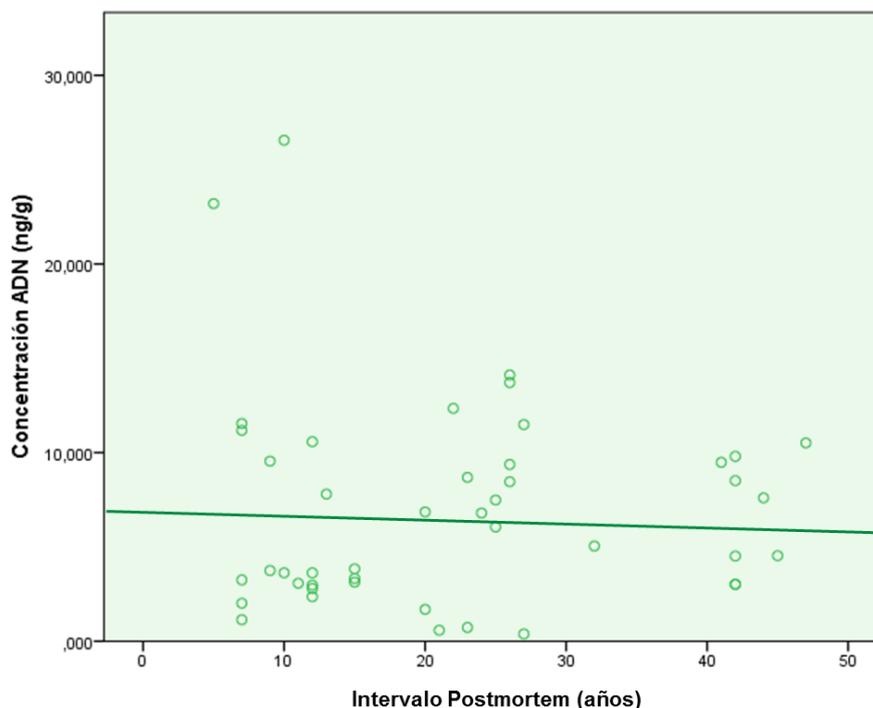


Figura 54. Diagrama de dispersión que representa la variación de la concentración de ADN total respecto al IPM de las muestras de huesos humanos analizados (N=80).

Esto a su vez, se relaciona también con la cantidad de proteínas de colágeno tipo I encontradas en los restos óseos de nuestro estudio, ya que nuestros resultados muestran una correlación negativa entre el IPM y el número de péptidos de colágeno tipo I, lo cual supone una disminución de tipo logarítmico del número de estas proteínas respecto al tiempo (**Figura 55**), lo cual es debido a que el colágeno, que es el principal componente proteínico de hueso, se hidroliza lentamente dando péptidos y aminoácidos, lo que lleva a la ruptura de los lazos de colágeno-mineral y al posterior debilitamiento de la estructura ósea en general (Henderson, 1987).

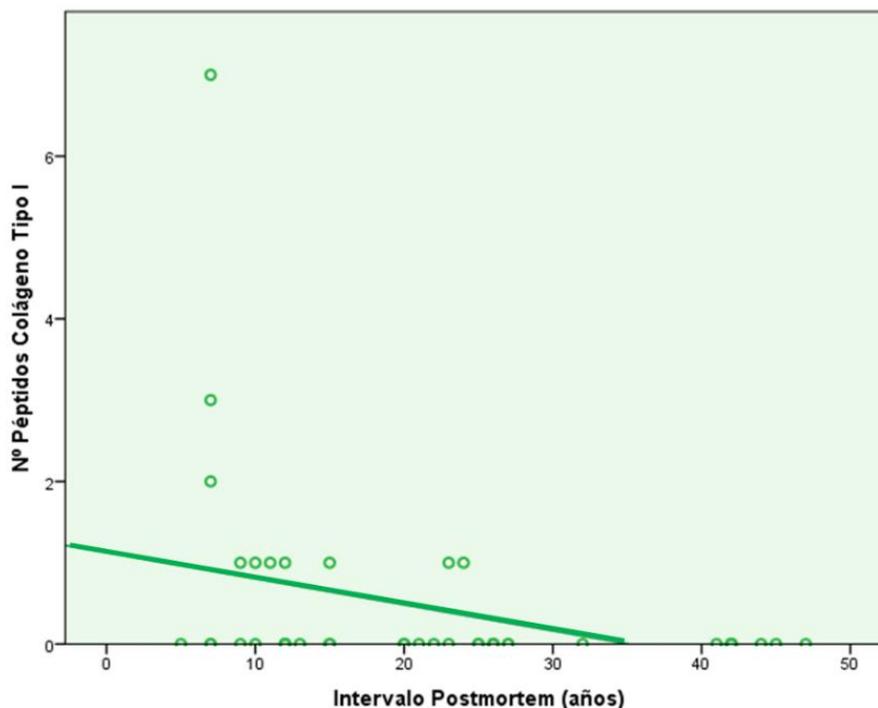


Figura 55. Diagrama de dispersión que representa la variación del número de péptidos de colágeno tipo I respecto al IPM de las muestras de huesos humanos analizados (N=80).

Cualquier ADN extracelular que esté en el osteoide, quedará encapsulado por la apatita ósea y por lo tanto estará protegido de la degradación, y el mineral a su vez, está protegido por el colágeno (que constituye un 23% del peso de un hueso) formando así, una especie de protección mutua (Collins y cols., 2002). De este modo, si un hueso enterrado sufre una pérdida parcial de colágeno a través de la degradación química, con la consiguiente apertura de la microporosidad, la hidroxiapatita expuesta, puede estar sujeta a la disolución parcial y reprecipitación (Collins y cols., 2002; Hedges y Millard, 1995a) y cualquier ADN encapsulado en la bioapatita por lo tanto, también quedará expuesto. Suponiendo que el ADN está distribuido inicialmente de manera uniforme por todo el osteoide, entonces, cuando el hueso se desmineraliza, la mitad del ADN será liberado en la solución de EDTA, dejando la mitad restante unido al colágeno.

Además de la degradación, el ADN extraído a partir de restos óseos se modifica de varias maneras. En particular, se han descrito tres características sobre la degradación del ADN (Briggs y cols., 2007; Brotherton y cols., 2007; Pääbo, 1989): (i) la longitud de los fragmentos se acorta (Paabo, 1989); (ii) antes de la rotura de las cadenas se produce un aumento de purinas (adenina (A) y guanina (G) residuos) (Briggs y cols., 2007), debido a la despurinización del ADN seguido por la hidrólisis del esqueleto de

azúcar fosfato; (iii) un aumento de la conversión de la citosina (C) a timina (T), sustituciones que se producen cerca de los extremos de los fragmentos (Briggs y cols., 2007; Brotherton y cols., 2007), debido a la desaminación de residuos de citosina que se producen principalmente en los salientes monocatenarios de los fragmentos de ADN (Briggs y cols., 2007; Brotherton y cols., 2007).

Uno de los daños en el ADN más estudiado es el cambio de citosina a timina (C → T), que puede ser descrito como un conjunto de sustituciones inducidas por la lesión causada por la desaminación de citosina (Hofreiter y cols., 2001). El análisis detallado de este patrón en muchas muestras antiguas ha puesto de manifiesto que la frecuencia de este daño aumenta, con una variación relativamente grande, probablemente debido a factores adicionales tales como la temperatura (Smith y cols., 2001) y otras condiciones ambientales del enterramiento (Elsner y cols., 2015) o con el aumento de la antigüedad de la muestra (Sawyer y cols., 2012).

La guanina y la adenina (bases púricas) se liberan a partir del ADN en tasas similares, siendo la primera de éstas, la que se libera un poco más rápidamente. Sin embargo, las pirimidinas, citosina y timina se pierden al 5% de la tasa de las purinas. La diferencia en la velocidad de despurinización entre el ADN de una sola hebra y de doble hebra es sólo cuatro veces mayor, por lo que la estructura de doble hélice no proporciona mucha protección (Lindahl, 1993).

Varios métodos, tales como el análisis del contenido de colágeno, el análisis del índice de cristalinidad, la racemización de aminoácidos, los cálculos térmicos de edad, y los patrones de cambios de bases (observado como citosina a timina, C → T, o guanina a adenina, G → A) (Schwarz y cols., 2009; Smith y cols., 2003; Götherström y cols., 2002; Poinar y cols., 1996).

Kaiser y cols. (2008) y Johnson y Ferris (2002) han demostrado que el ADN antiguo se degrada a fragmentos de tamaño medio-pequeño y en la investigación de Pääbo (1989) se utilizaron ensayos enzimáticos para mostrar que los sitios abásicos y los productos de oxidación de pirimidinas estaban presentes en dos muestras de ADN antiguo, por lo que numerosas investigaciones se han llevado a cabo para determinar las tasas de daño en el ADN (Gilbert y cols., 2007; Binladen y cols., 2006; Pääbo y cols., 2004; Gilbert y cols., 2003a, 2003b; Hansen y cols., 2001; Hofreiter y cols., 2001).

Por otro lado, no se ha encontrado ningún estudio sobre los patrones de concentración que siguen las bases nitrogenadas que conforman el ADN postmortem para la estimación del IPM.

Además, y como detallan estos estudios citados anteriormente (Schwarz y cols., 2009; Götherström y cols., 2002; Smith y cols., 2003; Poinar y cols., 1996), en nuestro estudio encontramos una mayor concentración de adenina ((media \pm DE) 6.726 \pm 5.088) respecto a guanina ((media \pm DE) 4.063 \pm 3.088) y de timina ((media \pm DE) 5.029 \pm 2.909) respecto a citosina ((media \pm DE) 3.431 \pm 2.721) (**Figura 56. A.** y **56. B.**), lo cual podría sugerir que se han producido transiciones de tipo I (G \rightarrow A y C \rightarrow T) que son las más frecuentes tanto en el ADNmt como en el ADNn (Binladen y cols., 2006; Gilbert y cols., 2003a; Hansen y cols., 2001; Hofreiter y cols., 2001).

Como se muestra en la **Figura 56. C.** también encontramos una mayor concentración de purinas ((media \pm DE) 10.789 \pm 9.416) respecto a pirimidinas ((media \pm DE) 8.459 \pm 4.896), por lo que podemos afirmar que la tasa de despurinización es mayor que la despirimidinización (Lindahl, 1993).

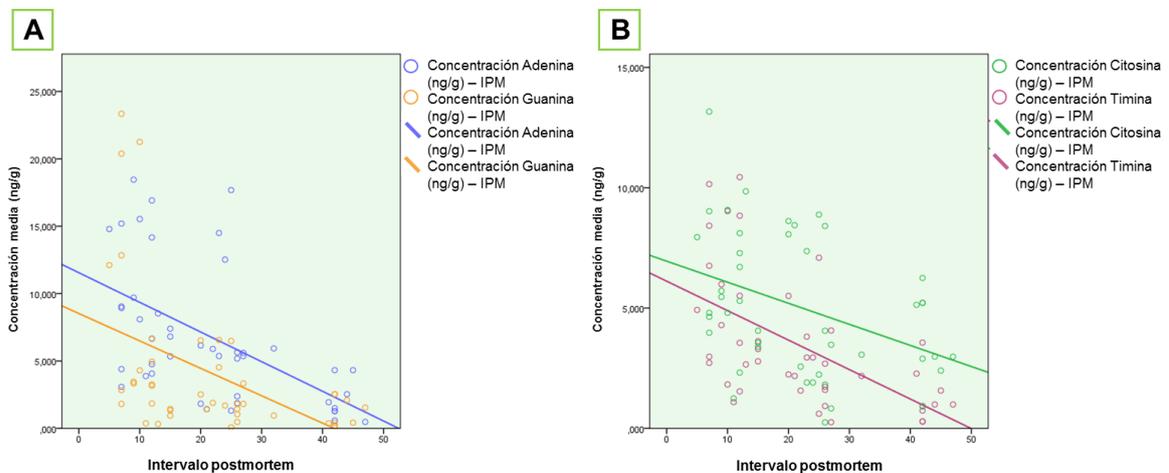


Figura 56. A. Comparación de concentraciones entre adenina y guanina según el IPM (G \rightarrow A). B. Comparación de concentraciones entre citosina y timina respecto al IPM (C \rightarrow T).

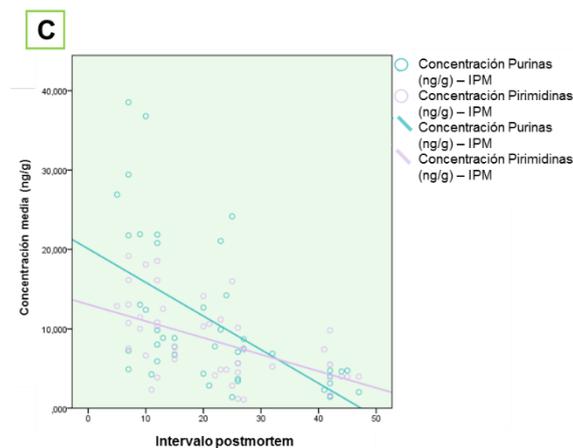


Figura 56. C. Comparación de concentraciones entre purinas y pirimidinas respecto al IPM.

Los datos de nuestra investigación, muestran que existe una correlación negativa entre la concentración de adenina, guanina, purinas (suma de adenina y guanina), citosina, timina, pirimidinas (suma de citosina y timina) y xantina, respecto al IPM total, que oscila entre los 5 y los 47 años, y se ajustan a un modelo de decrecimiento exponencial.

El modelo definitivo del análisis de regresión lineal múltiple que se calculó incluyó la concentración de adenina, citosina y el número de péptidos de colágeno tipo I (47.2%) entre las variables que mejor explican la varianza del IPM.

5.3.2. Relación de los elementos biológicos respecto a grupos de intervalo postmortem

Como anteriormente mencionamos, se ha demostrado que el ADN se conserva asociado con los minerales óseos, en los agregados de hidroxiapatita, y en la fracción orgánica, dentro de las fibrillas de colágeno (Campos y cols., 2012; Schwarz y cols., 2009), por lo que el ADN nuclear probablemente se encuentra más protegido dentro de micronichos del hueso (Ginolhac y cols., 2012). Durante la descomposición de la estructura ósea, aumenta el área de la porosidad y la superficie total del hueso (Campos y cols., 2012; Jans, 2008), haciendo así que el ADN adsorbido quede más expuesto a los procesos de degradación que causan la escisión en fragmentos y la liberación de las bases nitrogenadas.

Nosotros tratamos de observar este comportamiento en el análisis de la concentración de ADN, de bases nitrogenadas y en el número de péptidos de colágeno tipo I clasificando las muestras en distintos grupos de IPM. No hallamos otras investigaciones anteriores similares por los que no hemos podido contrastar nuestros resultados.

Realizamos una comparación entre las concentraciones medias de ADN de las muestras del estudio según el IPM inferior a 20 años e IPM superior o igual a 20 años. Los datos mostraron que no existen diferencias estadísticamente significativas, entre las concentraciones medias de ADN de las muestras con IPM inferior a 20 años y las muestras con IPM superior o igual a 20 años, y tampoco entre las concentraciones medias de ADN de las muestras pertenecientes a 4 grupos de IPM (data entre 5 y 10 años, IPM entre 11 y 19 años, IPM entre 20 y 30 años y el IPM superior a 30 años).

El análisis de correlaciones entre las concentraciones de ADN y el IPM en los distintos casos de IPM inferior a 20 años ($n=20$) y en los casos con un IPM superior o igual a 20 años ($n=60$) mostró en ambos casos la existencia de correlación negativa, pero sin significación estadística. Las **Figuras 57. A.** y **57. B.** muestran el diagrama de dispersión de la concentración de ADN en función del IPM, donde se observa que en un periodo de IPM que oscila entre 5-19 años, la concentración de ADN disminuye con respecto a la data **(A)**, y la estabilidad en la concentración de ADN con respecto al tiempo en un intervalo de 20-47 años de IPM **(B)**.

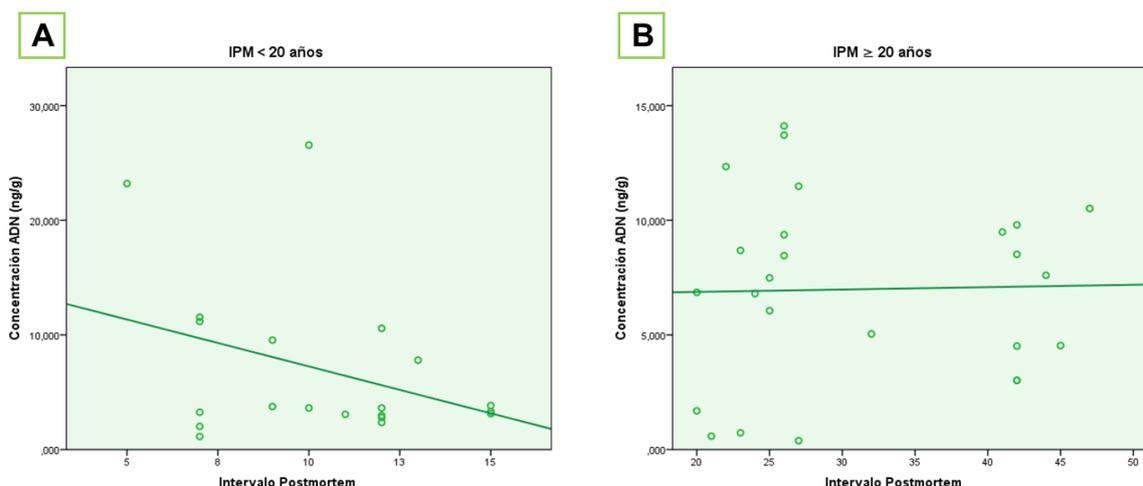


Figura 57. A. Diagrama de dispersión que representa la variación de la concentración de ADN respecto al IPM < 20 años ($n=20$). **B.** Diagrama de dispersión que representa la variación de la concentración de ADN respecto al IPM ≥ 20 años ($n=60$).

A continuación, realizamos las correlaciones de las concentraciones en los 4 casos de pertenencia a un grupo, IPM entre 5 y 10 años (n=10), IPM entre 11 y 19 años (n=10), IPM entre 20 y 30 años (n=40) e IPM superior a 30 años (n=20). Los resultados muestran que no existen correlaciones estadísticamente significativas entre la concentración de ADN y el IPM. Sin embargo, y según muestran las **Figuras 58. A.** y **58. B.** se observa un patrón con tendencia decreciente (**A**), lo cual se asocia a la pérdida de proteínas de colágeno de las muestras de restos óseos (**B**).

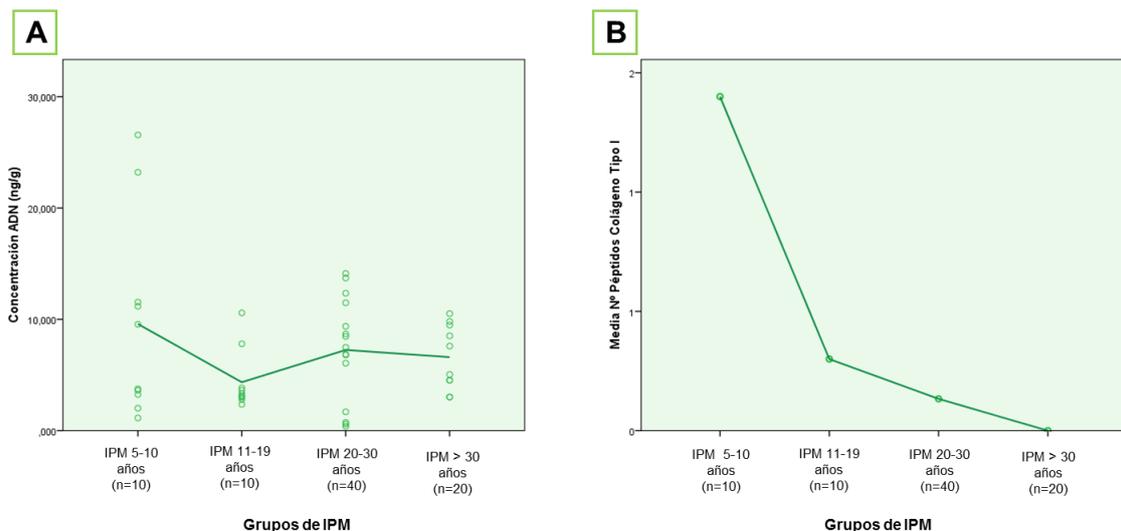


Figura 58. A. Diagrama de puntos que representa la distribución de concentraciones medias de ADN en 4 grupos de data. **B.** Diagrama de puntos que representa la distribución de número de péptidos de colágeno tipo I en 4 grupos de data. (IPM entre 5-10 años; IPM entre 11-19 años; IPM entre 20-30 años; IPM superior a 30 años).

Según numerosos estudios, el ADN en los huesos humanos puede permanecer estable durante un largo periodo de tiempo. Incluso después de décadas, se ha demostrado que los restos óseos pueden contener suficiente ADN para el análisis molecular (Hofreiter y cols., 2001; Haack y cols., 2000; Cattaneo y cols., 1997; Krings, 1997; Hagelberg y cols., 1989; Pääbo, 1986, 1984).

En general, parece razonable suponer que las características del hueso que se relacionan, con la supervivencia a largo plazo, es decir, su resistencia a la degradación morfológica a nivel macroscópico y microscópico, sería lo que contribuye a la protección de la degradación de ADN. La densidad ósea, es decir, la extensión de la mineralización, es uno de los factores intrínsecos más importantes en la supervivencia de material óseo (Miloš y cols., 2007).

Nuestros datos muestran unos valores similares en la concentración de ADN en los casos de data inferior a 20 años y superior o igual a 20 años, lo cual, podría ser explicado por la adsorción del ADN en la fracción mineral del hueso (Collins y cols., 1995; Lindahl, 1993; Hagelberg y cols., 1989), ya que las áreas de mineralización extensa dentro del hueso pueden presentar una barrera física a la extracción, lo que impide la liberación de ADN (Pagan y cols., 2012; Loreille y cols., 2007; Hoff-Olsen y cols., 1999).

Por lo tanto, además de los cambios en la cristalinidad, la degradación del ADN también puede estar vinculada a pérdidas de colágeno. Varios estudios han demostrado la existencia al menos, de una correlación débil entre la amplificación de ADN y el contenido de proteínas (Poinar y Stankiewicz, 1999; Colson y cols., 1997; Cooper y cols., 1997; Poinar y cols., 1996). El colágeno es una molécula helicoidal triple y los procesos de degradación pueden ser similares a los del ADN (Götherström y cols., 2002).

Esto podría sugerir que, en los casos de data inferior a 20 años donde la degradación del hueso todavía no es muy marcada y éstos presentan una mayor densidad y dureza debido a la conservación de la materia orgánica (Knight y Saukko, 2004b), el ADN se encontraría adsorbido a la hidroxiapatita, la cual se conservaría en un buen estado, lo que viene indicado por la cantidad de proteínas de colágeno tipo I encontradas en los restos óseos, ya que la presencia de moléculas orgánicas evidencia una reacción de disolución mineral ralentizada (Putnis y cols., 1995; Kleter y cols., 1994). La densidad de la hidroxiapatita de las muestras de nuestro estudio con un IPM inferior a 20 años supondría por tanto una barrera física para la extracción de ADN total, lo que conlleva a una menor concentración de ADN en este periodo de IPM.

En este sentido, la escasa cantidad de ADN en el IPM inferior a 20 años se podría relacionar con la presencia de proteínas colágenas en la muestra (0.85 ± 1.663 n° péptidos de colágeno tipo I/g (media \pm DE)), ya que apoyándonos en modelos teóricos (Mrevlishvili y Svintradze, 2005) y experimentos in vitro (Kitamura y cols., 1997) que sugieren que el ADN no solo se une al colágeno, sino que también puede actuar como matriz o andamio en la agregación de las moléculas de colágeno en fibrillas (fibrillogénesis) (Salamon y cols., 2005), este ADN podría encontrarse unido al colágeno o formando parte de la agregación de fibrillas de colágeno.

En muestras con IPM superior o igual a 20 años encontramos, sin embargo, huesos con una densidad menor y que muestran el inicio de la destrucción (Berg y Specht, 1958; Mueller, 1953), lo que viene indicado por la ausencia prácticamente de proteínas de colágeno tipo I, con una media de péptidos/g (\pm DE) de 0.08 ± 0.227 . La disolución de la fase mineral expondrá al colágeno a la degradación (Krane, 1975), aumentando así la velocidad de descomposición (Klont y cols., 1991), de esta forma, por tanto, se producirá la desorción del ADN de los cristales, lo cual llevaría a una mayor extracción de ADN total mediante el mismo protocolo de extracción.

Nuestros datos confirman, que existen diferencias estadísticamente significativas en la media del número de péptidos de colágeno tipo I entre ambos periodos, encontrando una disminución en la cantidad de péptidos a medida que aumenta el IPM.

Estos resultados nos permiten afirmar que en periodos de data inferiores a 20 años (cuando el hueso esta mejor conservado) el ADN se encuentra adsorbido a la hidroxiapatita y unido al colágeno presente en las muestras y por ello la cantidad de ADN extraído es similar a la cantidad de ADN en muestras con un IPM superior o igual a 20 años.

En la comparación de medias de péptidos de colágeno tipo I en muestras de 4 grupos de IPM, encontramos diferencias estadísticamente significativas. Como se muestra en la **Figura 58. B.** se produce una disminución del número de péptidos en función del aumento del IPM. Además, las concentraciones medias de péptidos comparadas en los 4 grupos de IPM muestran diferencias estadísticamente significativas entre aquellas muestras, por un lado, con IPM de 5 a 10 años y muestras con IPM que oscila entre los 20 y los 30 años ($p=0.012$), y por otro, muestras con IPM de 5 a 10 años y muestras con IPM superior a 30 años ($p=0.017$).

Respecto al análisis de las bases nitrogenadas, tras la muerte se desencadenan procesos de hidrólisis y de oxidación que causan la degradación del ADN cromosómico en fragmentos cada vez más pequeños y como consecuencia de este acortamiento, las bases nitrogenadas que lo conforman, así como el ácido ortofosfórico y el azúcar quedan libres (Kaiser y cols., 2008).

Con la finalidad de conocer el comportamiento de las diferentes bases en función del tiempo transcurrido postmortem se analizaron las diferencias entre las concentraciones de muestras con un IPM inferior a 20 años (n=20) y un IPM superior o igual a 20 años (n=60).

La **Figura 59** representan los diagramas de cajas (media, desviación estándar y rango) de las concentraciones de los distintos parámetros bioquímicos entre los que existen diferencias estadísticamente significativas entre los casos con IPM inferior a 20 años e IPM superior o igual a 20 años, siendo estos la concentración de adenina, guanina, purinas (adenina+guanina), citosina, timina, pirimidinas (citosina+timina) y el cociente entre pirimidinas y purinas. En ella podemos observar, que, en todos los casos, presentan mayor concentración en el IPM inferior a 20 años y una posterior disminución en la concentración en el IPM superior o igual a 20 años.

Por otro lado, encontramos como excepción el cociente de pirimidinas/ purinas lo cual es debido a la mayor concentración de purinas en las muestras que se liberan en mayores cantidades que las pirimidinas, las cuales son más estables y se liberan a una velocidad más lenta (Alaeddini y cols., 2010; Lindahl, 1993). Además, las mayores cantidades de bases púricas también se deben a que dentro de los daños que sufren las bases nitrogenadas, la desaminación de las purinas figura como una reacción menor en comparación con las conversiones hidrolíticas y las reacciones de oxidación, la cual representa una fuente importante de daño endógeno en el genoma que sufren las pirimidinas (Lindahl, 1993)

5. Discusión

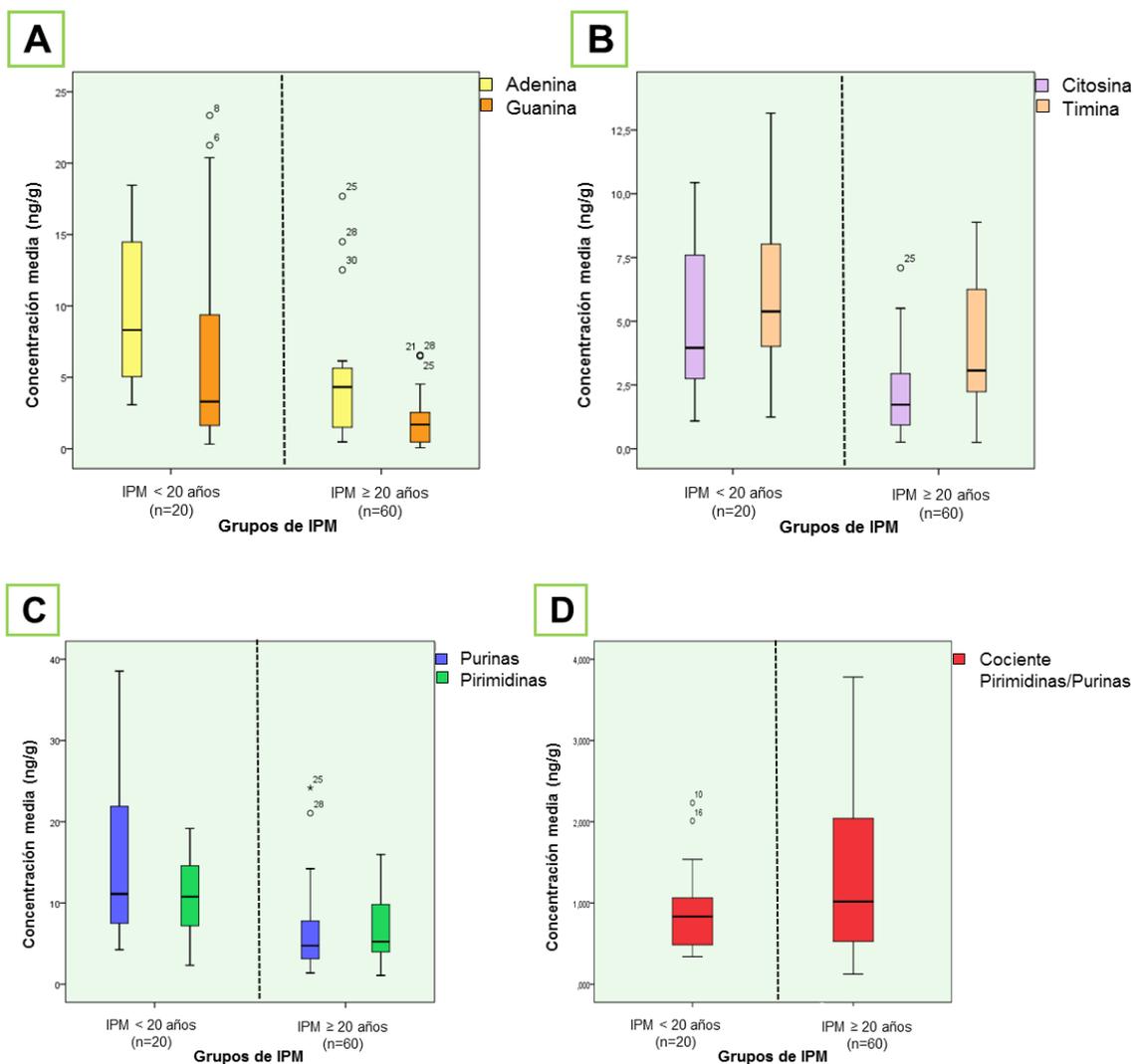


Figura 59. A. Concentraciones medias de adenina y guanina respecto a 2 grupos de IPM. B. Concentraciones medias de citosina y timina respecto a 2 grupos de IPM. C. Concentraciones medias de purinas y pirimidinas respecto a 2 grupos de IPM. D. Concentración media del cociente de pirimidinas y purinas respecto a 2 grupos de IPM. ($IPM < 20\text{ años}$ e $IPM \ge 20\text{ años}$).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de adenina, guanina, purinas (adenina+guanina), citosina, pirimidinas (citosina+timina) e hipoxantina entre los 4 grupos de IPM (**Figura 60**). Las bases que presentaban una tendencia de disminución de sus concentraciones con respecto a los IPM establecidos fueron la adenina, purinas (adenina+guanina), citosina y pirimidinas (citosina+timina).

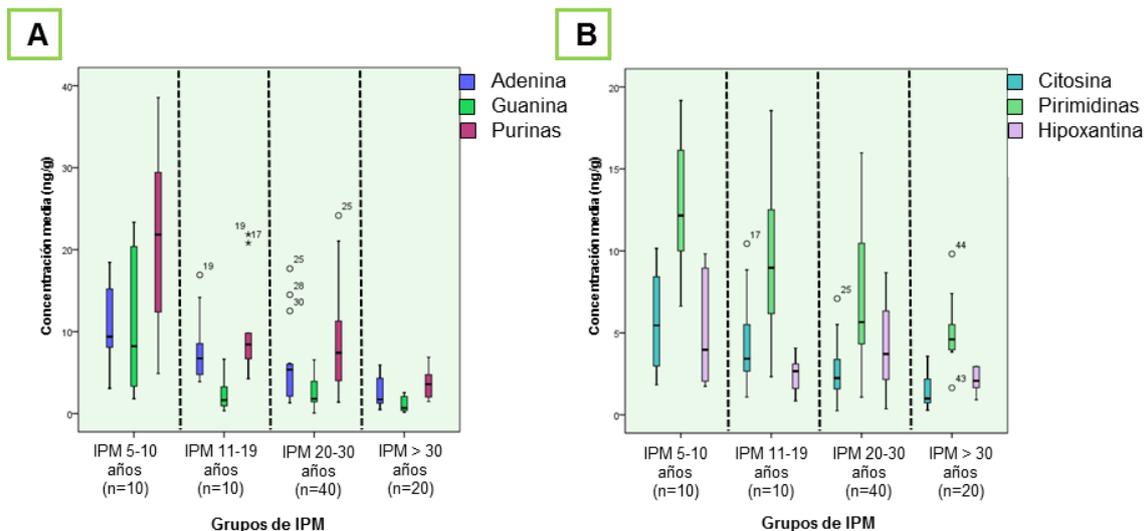


Figura 60. A. Análisis de las concentraciones medias de adenina, guanina y purinas respecto a 4 grupos de IPM. **B.** Análisis de las concentraciones medias de citosina, pirimidinas e hipoxantina respecto a 4 grupos de IPM. (IPM entre 5-10 años; IPM entre 11-19 años; IPM entre 20-30 años; IPM superior a 30 años).

Por otro lado, el análisis para 2 muestras independientes de las concentraciones medias de los elementos biológicos de las muestras pertenecientes a 4 grupos de IPM, mostró que la variable que diferencia a todos los grupos con diferencias estadísticamente significativas fue la concentración de purinas.

El análisis de correlaciones entre las concentraciones de los elementos biológicos y los 2 grupos de IPM (IPM inferior a 20 años (n=20); IPM superior o igual a 20 años (n=60)) mostró en el primer caso una correlación negativa significativa entre el IPM y la concentración de guanina, la concentración de purinas y la concentración de hipoxantina, lo cual refleja patrones de concentración decreciente de estas bases nitrogenadas con respecto a la data de tipo exponencial. Además, cabe mencionar que el resto de las variables de estudio presentaban un patrón de disminución en función al IPM pero no hallamos correlaciones significativas.

Del mismo modo ocurre en el IPM superior o igual a 20 años, el cual, presenta correlaciones negativas significativas entre las concentraciones de adenina, guanina, purinas (adenina+guanina), citosina y pirimidinas (citosina+timina) y el IPM, mostrando una tendencia decreciente en todos los casos de tipo exponencial.

La **Figura 61** muestra la tendencia de las bases nitrogenadas de estudio respecto al IPM inferior a 20 años e IPM superior o igual a 20 años, donde se puede

observar un comportamiento de disminución de la concentración media de bases nitrogenadas respecto a los IPM establecidos.

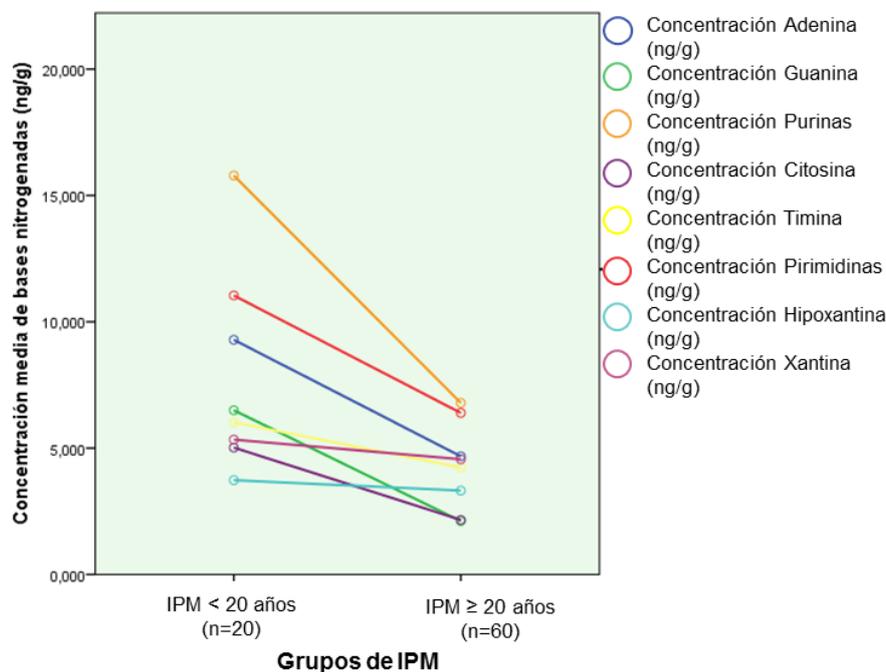


Figura 61. Comportamiento de las bases nitrogenadas respecto 2 grupos de IPM en muestras de restos óseos. (IPM < 20 años e IPM ≥ 20 años).

Como resultado del análisis de correlaciones que realizamos en 4 grupos de IPM (IPM entre 5 y 10 años (n=10); IPM entre 11 y 19 años (n=10); IPM entre 20 y 30 años (n=40) e IPM superior a 30 años (n=20)) se obtuvo en el grupo de IPM entre 20 y 30 años una correlación significativa de tipo negativa entre el IPM y la concentración de timina que seguían un modelo de ajuste exponencial. No hallamos más correlaciones significativas, a pesar de que la mayoría de bases en ambos grupos presentaba una correlación negativa respecto a la data.

Lo cual sugiere, que el comportamiento de las bases es similar entre ellas, ya que siguen una cinética de decrecimiento en su concentración con respecto al IPM (**Figura 62**).

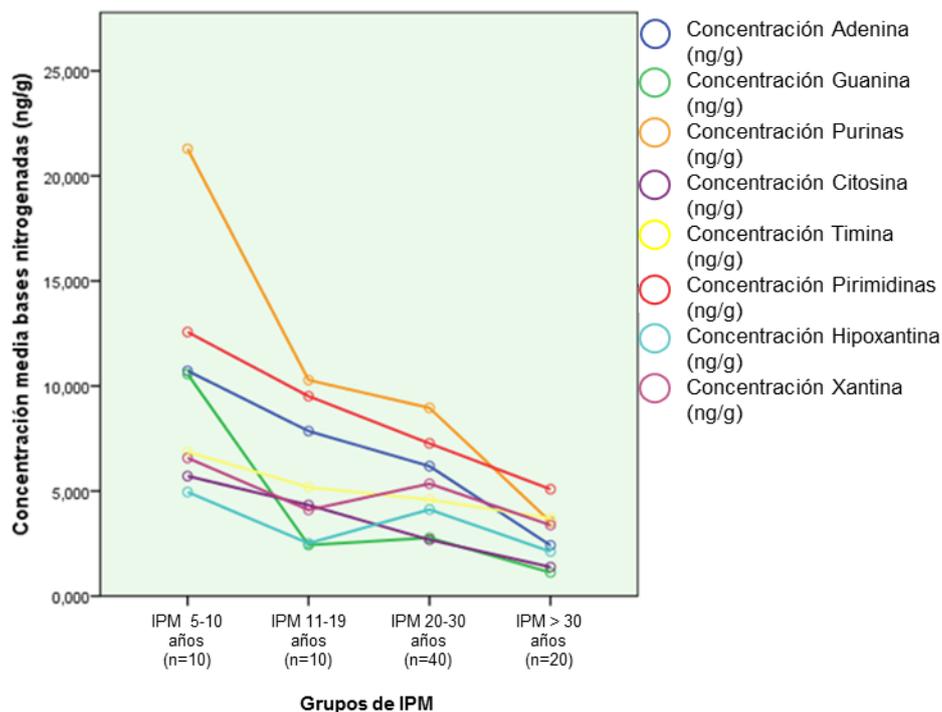


Figura 62. Diagrama de puntos que representa la concentración media de bases nitrogenadas respecto a 4 grupos de IPM en muestras de restos óseos. (IPM entre 5-10 años; IPM entre 11-19 años; IPM entre 20-30 años; IPM superior a 30 años).

Los datos que obtuvimos del análisis discriminante fueron que los parámetros que mejor clasifican entre los 2 grupos de data establecidos son la concentración de adenina (75.6%), la concentración de citosina (71.1%) y la concentración de purinas, pirimidinas y el número de péptidos de colágeno tipo I (68.9%). La clasificación secuencial utilizando estos parámetros permitieron una correcta identificación en el 77.8% del total de los casos, mientras que la capacidad de predicción de todas las variables independientes fue de un 86.7% de los casos, porcentaje que nos permitiría su aplicación para un diagnóstico orientativo con relación al IPM.

Por otro lado, y teniendo en cuenta 4 grupos de IPM, las variables con mayor poder de discriminación son la concentración de adenina (46.7%) y la concentración de purinas (44.4%). El análisis discriminante secuencial permitió una correcta identificación en el 53.3% de los casos empleando la concentración de estos 2 parámetros, mientras que la diferencia en las concentraciones de todas las variables independientes permitió una identificación correcta del 73.3% de los casos, mejorando así la capacidad diagnóstica del IPM en estos casos que cuando sólo se utiliza la determinación de los parámetros bioquímicos de forma individual.

5.4. Identificación de patologías previas y biomarcadores de enfermedades

Uno de los objetivos de esta investigación ha sido la identificación de posibles patologías y biomarcadores de enfermedades para su uso como herramienta en la identificación y elaboración de perfiles biológicos de sujetos.

Nuestro estudio seleccionó un grupo de muestras en las que ni los factores ambientales ni constitucionales eran suficientemente importantes para modificar los procesos postmortem. Los huesos procedían de nichos aéreos para que las condiciones de preservación fueran homogéneas y la interacción con el medio ambiente mínima. Además, contrariamente a los estudios arqueológicos sobre huesos humanos, en nuestro caso el IPM no superó los 100 años (Prieto-Castelló y cols., 2007).

El estudio más reciente que hemos encontrado en la literatura que analiza los marcadores de patología en los huesos se refiere a los huesos que tenían 2000 años de edad (Bona, 2014). Encontramos otras referencias sobre el uso de biomarcadores para detectar procesos patológicos en diferentes muestras biológicas de pacientes, incluyendo suero (Mishra y cols., 2012; Pierer y cols., 2012; Obeid y Alzahrani, 2009), sangre (Andre-Garnier y cols., 2004; Gerrard y cols., 2004), plasma (Wibmer y cols., 2013), líquido cefalorraquídeo (Poissy y cols., 2012), piel, úlceras y abscesos (Gerrard y cols., 2004), heces (Sulikowzka y cols., 2004; Newman y cols., 2001) y células humanas in vitro (Minamino y cols., 2003).

El desarrollo de la proteómica hace posible el análisis de marcadores bioquímicos asociados a procesos patológicos, que pueden ser útiles para construir el perfil biológico de las personas y, en algunos casos, para dar peso a las conclusiones alcanzadas en los estudios forenses.

En los 45 individuos analizados en el presente estudio, obtuvimos 2 marcadores de Parvovirus humano B19 (B19V) en una muestra (2.2% del total) y 1 marcador de Parainfluenza virus 5 (PIV-5), de Virus respiratorio sincitial humano (VRS) y de Adenovirus humano 7d (AdV-7d) en una muestra (2.2%), para el cual no se encontraron referencias en otra matriz biológica.

Por el contrario, encontramos 30 marcadores del Virus del herpes humano 5 (CMV) en 38 de las 45 muestras de hueso analizadas (84.4%). Otros estudios se refieren a la presencia de CMV en el suero de pacientes con hemofagocitosis (familiar o secundaria a infecciones incluyendo virus) (Mishra y cols., 2012) o con artritis reumatoide (Pierer y cols., 2012) y en pacientes receptores de trasplantes renales (Obeid y Alzahrani, 2010).

En el caso del Virus del herpes humano 6 (HVH-6), identificamos 13 marcadores en 14 muestras (31.1%), existiendo referencias sobre su presencia en sangre periférica de pacientes seropositivos (Andre-Garnier y cols., 2004).

Para el Virus del herpes humano 1 (HSV-1) hallamos 2 marcadores de patogenicidad en 2 muestras (4.4%), identificándose los mismos marcadores en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con meningoencefalitis (Poissy y cols., 2012). La proteína gp120 del Virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH) se detectó en 8 muestras de los restos analizados (17.8%).

La misma proteína fue identificada previamente en el plasma (Wibmer y cols., 2013), en células mononucleares de sangre periférica de sujetos con infección aguda y temprana por VIH (Rychert y cols., 2010) y en plasma y órganos linfoides secundarios, incluyendo el bazo y los ganglios linfáticos, obtenidos en la autopsia de pacientes con infección crónica por el VIH que murieron de causas no relacionadas con el VIH (Santosuosso y cols., 2009). Además, su presencia se ha asociado con diversas patologías relacionadas con el VIH, interaccionando con múltiples tipos de células no infectadas y deteriorando su función, incluyendo las células T (Corbeil y Richman, 1995), las células dendríticas (Williams y cols., 2002) y las neuronas (Mattson y cols., 2005) y la inducción a la formación de moco y metaplasia en las células de la mucosa e hiperplasia en células epiteliales bronquiales humanas (NHBE) (Gundavarapu y cols., 2013).

Por otro lado, también identificamos un marcador para *Moraxella catarrhalis* y *Giardia intestinalis* ATCC 50581 en 7 muestras (15.6%) y 3 (6.7%), respectivamente. Ambos fueron aislados previamente por Sulikowzka y cols. (2004) y Newman y cols. (2001) en heces de niños para estudios de serotipado y epidemiología.

Las infecciones causadas por *Staphylococcus* y *Salmonella* se diseminan vía hematológica y acceden a la cavidad articular ocasionando inflamación, destrucción del cartílago articular y consecuentemente del tejido óseo (Ross, 2005). Detectamos en nuestra investigación un marcador del género *Staphylococcus* en 4 muestras (8.9%) y un marcador de *Salmonella enterica* en 1 muestra (2.2%).

Identificamos en una muestra (2.2%) un marcador de *Photorhabdus asymbiotica*, previamente identificado en sangre, piel, úlceras y abscesos de pacientes infectados (Gerrard y cols., 2004) y, finalmente, en el grupo de marcadores de agentes infecciosos, encontramos un marcador de *Sphingobacterium spiritivorum* ATCC 33861 en una muestra (2.2%). Este marcador es característico y principal de la apoptosis y fue previamente aislado en estudios *in vitro* con pacientes con leucemia mieloide HL-60 (Minamino y cols., 2003).

En 13 de las 45 muestras analizadas encontramos proteínas relacionadas con enfermedades cancerígenas como leucemia, cáncer de mama, osteosarcoma, neuroblastoma, carcinoma, anemia de Fanconi y esclerosis.

Estas proteínas se identificaron como skioncogene, proteína de tumor D54 isoforma a, linfoma de células B / leucemia 11A, leucemia mieloide / linfocítica 2, proteína de susceptibilidad de tipo de cáncer de mama 2, proteína B1 de osteosarcoma sensible a PTH, supresor de tumores neuroblastoma 1 isoforma 1, antígeno de carcinoma celular escamoso reconocido por células T 3, proteína de anemia de Fanconi grupo J, proteína de anemia de Fanconi grupo I, proteína de anemia Fanconi grupo A y proteína isoforma 1 y 4 de esclerosis lateral amiotrófica 2, cada uno de los cuales se identificó en una muestra (2.2%).

Los resultados del presente estudio sugieren que los biomarcadores de ciertas patologías humanas y proteínas relacionadas con diferentes agentes infecciosos pueden ser identificados en muestras de hueso cortical en sujetos de diferentes edades y un IPM que oscila entre los 18 y los 45 años.

Como lo sugiere Lindahl (1993), esto se debe a que los componentes celulares están adsorbidos en la fracción inorgánica del hueso, constituida principalmente por hidroxiapatita, que es más abundante en el hueso cortical que en el medular. Además, el método propuesto es económicamente aceptable (25 euros por muestra) en lo que

respecta a: (i) el coste de los materiales, (ii) el tiempo de procesamiento y (iii) los recursos humanos necesarios.

6. CONCLUSIONES

1. El hueso es una matriz útil como fuente de ADN, bases nitrogenadas y péptidos de colágeno tipo I para la estimación de un intervalo postmortem entre 5-47 años. Los resultados de nuestra investigación apoyan los datos obtenidos previamente por otros autores, que confirman la idoneidad del uso de huesos largos como matriz de uso forense, sin hallar diferencias significativas entre las concentraciones de los biomarcadores analizados según el tipo de hueso.
2. Los protocolos de extracción empleados y las técnicas utilizadas: fluorimetría, cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta y cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas acoplado son eficaces para la identificación y cuantificación de ADN, bases nitrogenadas y péptidos de colágeno tipo I, respectivamente.
3. En un periodo de intervalo postmortem que oscila entre los 5-47 años, encontramos un patrón común a todas las biomoléculas analizadas, encontrando una correlación negativa entre el intervalo postmortem y las concentraciones de ADN, bases nitrogenadas y péptidos de colágeno tipo I, ajustándose a un modelo de decrecimiento exponencial para las bases y a un modelo logarítmico para los péptidos.
4. En el periodo de intervalo postmortem analizado entre 5 y 47 años existe una mayor concentración de adenina respecto a guanina y de timina respecto a citosina, que podría sugerir que se han producido transiciones de tipo I ($G \rightarrow A$ y $C \rightarrow T$) que son las más frecuentes tanto en el ADNmt como en el ADNn lo cual confirman varias investigaciones anteriores. La tasa de despurinización es mayor que la despirimidinización, de acuerdo con otros autores, debido a su menor estabilidad y mayor velocidad de liberación.
5. Las concentraciones de adenina, guanina, purinas, citosina, timina, pirimidinas y péptidos de colágeno tipo I son significativamente inferiores en un intervalo de tiempo superior a 20 años frente a un intervalo postmortem inferior a 20 años. El cociente de pirimidinas/purinas, sin embargo, es significativamente superior en un intervalo postmortem superior a 20 años frente a un intervalo postmortem inferior a 20 años, consecuencia de la mayor concentración de purinas respecto a las pirimidinas. En el intervalo postmortem inferior a 20 años las concentraciones de las

biomoléculas guanina, purinas e hipoxantina presentan un patrón de disminución de tipo exponencial respecto al tiempo, mostrando una correlación negativa estadísticamente significativa. En el intervalo postmortem superior a 20 años las concentraciones de adenina, guanina, purinas, citosina y pirimidinas, presentan una correlación negativa, donde el decrecimiento de las concentraciones con el aumento del intervalo postmortem se ajusta también a un modelo exponencial.

6. El uso de las concentraciones de adenina, purinas, citosina, pirimidinas y péptidos de colágeno tipo I permite una identificación correcta en el 77.8% de los casos, siendo en un intervalo postmortem inferior a 20 años el 70% y en un intervalo postmortem superior a 20 años del 84%. La determinación conjunta de las concentraciones de ADN, adenina, guanina, purinas, citosina, timina, pirimidinas, hipoxantina, xantina, cociente de pirimidinas/purinas, cociente de purinas/pirimidinas y péptidos de colágeno tipo I permite un porcentaje correcto de clasificación del 86.7%, siendo en un intervalo postmortem inferior a 20 años el 95% y en un intervalo postmortem superior a 20 años del 80%, mejorando así la capacidad diagnóstica de los marcadores cuando se analizan de forma independiente y secuencial.
7. Los biomarcadores de ciertas patologías humanas y proteínas relacionadas con diferentes agentes infecciosos pueden ser identificados en muestras de hueso cortical en sujetos de diferentes edades y un intervalo postmortem que oscila entre los 18 y los 45 años. Obtuvimos una alta proporción de proteínas identificadas en relación a la historia clínica de los sujetos, principalmente patologías de tipo vírico (VIH), canceroso, genético (anemia de Fanconi) y autoinmune.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aebersold, R., y Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198-207.
2. Ahi, R. S., y Garg, V. (2011). Role of vitreous potassium level in estimating postmortem interval and the factors affecting it. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 5(1), 13-15.
3. Alaeddini, R., Walsh, S. J., y Abbas, A. (2010). Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review. *Forensic Science International: Genetics*, 4(3), 148-157.
4. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., y Grimstone, A. V. (2002). DNA Repair. *En: Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., y Grimstone, A. V. (Eds.), Molecular Biology of the Cell (4th Ed.)*. Garland Science, New York: Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26879/>
5. Allentoft, M. E., Collins, M., Harker, D., Haile, J., Oskam, C. L., Hale, M. L., Campos, P. F., Samaniego, J. A., Thomas, M., Gilbert, P., Willerslev, E., Scofield, R. P., Holdaway, R. N., Bunce, M. y Zhang, G. (2012). The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 279(1748), 4724-4733.
6. Álvarez, A. J., Khanna, M., Toranzos, G. A., y Stotzky, G. (1998). Amplification of DNA bound on clay minerals. *Molecular Ecology*, 7(6), 775-778.
7. Amendt, J., Krettek, R., y Zehner, R. (2004). Forensic entomology. *Naturwissenschaften*, 91(2), 51-65.
8. Amory, S., Huel, R., Bilić, A., Loreille, O., y Parsons, T. J. (2012). Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 398-406.

9. Anastasiou, E., y Mitchell, P. D. (2013). Palaeopathology and genes: investigating the genetics of infectious diseases in excavated human skeletal remains and mummies from past populations. *Gene*, 528(1), 33-40.
10. Andre-Garnier, E., Milpied, N., Boutolleau, D., Saiagh, S., Billaudel, S., ee Imbert-Marcille, B. M. (2004). Reactivation of human herpesvirus 6 during ex vivo expansion of circulating CD34+ haematopoietic stem cells. *Journal of General Virology*, 85(11), 3333-3336.
11. Antheunisse, J. (1971). DNA decomposition by soil microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 37(1), 258-259.
12. Antheunisse, J. (1972). Decomposition of nucleic acids and some of their degradation products by microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 38(1), 311-327.
13. Anzai, N., Kawabata, H., Hiramata, T., Masutani, H., Ueda, Y., Yoshida, Y., y Okuma, M. (1995). Types of nuclear endonuclease activity capable of inducing internucleosomal DNA fragmentation are completely different between human CD34+ cells and their granulocytic descendants. *Blood*, 86(3), 917-923.
14. Armelagos, G. J., Alcom, M., Martin, D., y Vangreven, D. P. (1989). Factors affecting elemental and isotopic variation in prehistoric human skeletons. *En: Price, T. D. (Ed.), The Chemistry of Prehistoric Human Bone* (1st Ed.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 230 – 244.
15. Arnaldos, M. I., Romera, E., García, M. D., y Luna, A. (2001). Protocolo para la recogida, conservación y remisión de muestras entomológicas en casos forenses. *Cuadernos de Medicina Forense*, 25, 65-73.
16. Ascenzi, A., Brunori, M., Citro, G., y Zito, R. (1985). Immunological detection of hemoglobin in bones of ancient Roman times and of Iron and Eneolithic Ages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(21), 7170-7172.
17. Ascenzi, A., y Silvestrini, G. (1984). Bone-boring marine micro-organisms: an experimental investigation. *Journal of Human Evolution*, 13(6), 531-536.

18. Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J.G., Smith, J., y Struhl, K. (2002). Unit 2.1A. Purification and Concentration of DNA from Aqueous Solutions. *En: Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J.G., Smith, J., y Struhl, K. (Eds.), Short Protocols in Molecular Biology (5th Ed.)*. John Wiley & Sons, New York, pp. 2.1.1 – 2.1.10
19. Bär, W., Kratzer, A., Mächler, M., y Schmid, W. (1988). Postmortem stability of DNA. *Forensic Science International*, 39(1), 59-70.
20. Barrientos, G., Sarmiento, P. L., y Galligani, P. E. (2016). Evaluación de la diagénesis ósea mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (MEB): aproximaciones analíticas aplicables a muestras arqueológicas. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 18(2), 0-0.
21. Barrio-Caballero, P. A. (2013). Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Revista Española de Medicina Legal*, 39(2), 54-62.
22. Barry, M. A., y Eastman, A. (1993). Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(1), 440-450.
23. Bass, W. M. (1996). Outdoor Decomposition Rates in Tennessee. *En: Haglund, W. D., y Sorg, M. S. (Eds.), Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains (1st Ed.)*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 181 – 186.
24. Bayle, A., y de Noyer, R. (1939). Estudio de la materia orgánica y del flúor en restos óseos. *Bulletin de la Société Chimique de France*, 5, 1011-1041.
25. Beattie, D. S. (2002). Bioenergetics and oxidative metabolism *En: Devlin, T. M. (Ed.) Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations (5th Ed.)*. Wiley-Liss, New York, pp. 1021 – 1027.
26. Beaumont, G. (2007). Body on the beach... a case of foot and mouth?. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 14(1), 54-57.

27. Behrensmeyer, A. K. (1978). Taphonomic and ecologic information from bone weathering. *Paleobiology*, 4(02), 150-162.
28. Bell, L. S., Skinner, M. F., y Jones, S. J. (1996). The speed of post mortem change to the human skeleton and its taphonomic significance. *Forensic Science International*, 82(2), 129-140.
29. Berg, S. (1963). The determination of bone age. *En: Lundquist, F., (Ed.), Methods of forensic science (Vol. 2) (1st Ed.)*. Interscience. Wiley and Sons, New York, pp. 231 – 252.
30. Berg, S. (1964). Die Altersbestimmung von Skelettfunden als forensische und archäologische Aufgabe. *Munchener medizinische Wochenschrift*, 106, 989-995.
31. Berg, S., y Specht, W. (1958). Untersuchungen zur Bestimmung der Liegezeit von Skeletteilen. *Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin*, 47(2), 209-241.
32. Berna, F., Matthews, A., y Weiner, S. (2004). Solubilities of bone mineral from archaeological sites: the recrystallization window. *Journal of Archaeological Science*, 31(7), 867-882.
33. Binladen, J., Wiuf, C., Gilbert, M. T. P., Bunce, M., Barnett, R., Larson, G., Greenwood, A. D., Haile, J., Ho, S. Y. M., Hansen, A. J., y Willerslev, E. (2006). Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes. *Genetics*, 172(2), 733-741.
34. BOE. (1995). Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre, del Código Penal. Boletín Oficial del Estado, 24 de noviembre de 1995, núm. 281, p. 33987 – 34058.
35. BOE. (2009). Real Decreto 32/2009, de 16 de enero, por el que se aprueba el Protocolo nacional de actuación Médico-forense y de Policía Científica en sucesos con víctimas múltiples. Boletín Oficial del Estado, 6 de febrero de 2009, núm. 32, p. 12630 – 12673.

36. Bogenhagen, D., y Clayton, D. A. (1974). The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 249(24), 7991-7995.
37. Bona, A., Papai, Z., Maasz, G., Toth, G. A., Jambor, E., Schmidt, J., y Mark, L. (2014). Mass spectrometric identification of ancient proteins as potential molecular biomarkers for a 2000-year-old osteogenic sarcoma. *PloS One*, 9(1), e87215.
38. Bostrom, M., Boskey, A., Kaufman, J., y Einhorn, T. A. (2000). Form and Function of Bone. *En: Buckwalter, J. A., Einhorn, T. A., y Simon, S. R. (Eds.), Orthopaedic Basic Science, Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System (2nd Ed.)*. American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, Illinois, pp. 320 – 369.
39. Breitmeier, D., Graefe-Kirci, U., Albrecht, K., Weber, M., Tröger, H. D., y Kleemann, W. J. (2005). Evaluation of the correlation between time corpses spent in in-ground graves and findings at exhumation. *Forensic Science International*, 154(2), 218-223.
40. Brenner, C. H., y Weir, B. S. (2003). Issues and strategies in the DNA identification of World Trade Center victims. *Theoretical Population Biology*, 63(3), 173-178.
41. Briggs, A. W., Stenzel, U., Johnson, P. L., Green, R. E., Kelso, J., Prüfer, K., Meyer, M., Krause, J., Ronan, M. T., Lachmann, M., y Pääbo, S. (2007). Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37), 14616-14621.
42. Brotherton, P., Endicott, P., Sanchez, J. J., Beaumont, M., Barnett, R., Austin, J., y Cooper, A. (2007). Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C>U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions. *Nucleic Acids Research*, 35(17), 5717-5728.
43. Brown, D. G., Sun, X. M., y Cohen, G. M. (1993). Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *Journal of Biological Chemistry*, 268(5), 3037-3039.

44. Brown, W. M. (1985). The Mitochondrial Genome of Animals. *En: MacIntyre, R. J. (Ed.), Molecular Evolutionary Genetics (1st Ed.)*. Plenum Press, New York, pp. 95 – 130.
45. Buchan, M. J., y Anderson, G. S. (2001). Time Since Death: A Review of the Current Status of Methods Used in the Later Postmortem Interval. *Canadian Society of Forensic Science, 34(1)*, 1-22.
46. Burdett, T. C., Desjardins, C. A., Logan, R., McFarland, N. R., Chen, X., y Schwarzschild, M. A. (2013). Efficient determination of purine metabolites in brain tissue and serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical and UV detection. *Biomedical Chromatography, 27(1)*, 122-129.
47. Burger, J., Hummel, S., Herrmann, B., y Henke, W. (1999). DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis, 20*, 1722-1728.
48. Burton, J. F. (1974). Fallacies in the Signs of Death. *Journal of Forensic Science, 19(3)*, 529-534.
49. Butler, J. M. (2005). Sample collection, DNA extraction and DNA quantitation. *En: Butler, J. M. (Ed.), Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers (2nd Ed.)*. Elsevier Academic Press, New York, pp. 49 – 50.
50. Campobasso, C.P., Vella, G.D., y Introna, F. (2001). Factors Affecting Decomposition and Diptera Colonisation. *Forensic Science International, 120*, 18-27.
51. Campos, P. F., Craig, O. E., Turner-Walker, G., Peacock, E., Willerslev, E., y Gilbert, M. T. P. (2012). DNA in ancient bone—Where is it located and how should we extract it?. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger, 194(1)*, 7-16.
52. Capeller, B., Caffier, H., Sütterlin, M. W., y Dietl, J. (2002). Evaluation of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 5b as serum marker of bone metastases in human breast cancer. *Anticancer Research, 23(2A)*, 1011-1015.

53. Castaños, J., Murelaga, X., Castellanos, I., Alonso Olazabal, A., Zuluaga, M. C., y Ortega, L. A. (2010). Evaluación del grado de diagénesis en huesos fósiles mediante espectroscopía de infrarrojos. *Geogaceta*, 49, 11-14.
54. Castellano, M., Rodrigo, M., Villanueva, E., y Luna, A. (1976). Evolution de la composition minerale de l'os avec le vieillissement. L'application a la data des restes osseux. *Acta Medicinae Legalis et Socialis*, 27, 21-23.
55. Castellano, M., Villanueva, E., y von Frenkel, R. (1984). Estimating the date of bone remains: a multivariate study. *Journal of Forensic Sciences*, 29, 527-534.
56. Castellano, M., y Villanueva, E. (1977). Estudio sobre la evolución de los lípidos en restos óseos en función de la data. I.-Lípidos totales. *Zacchia*, 13(3), 3.
57. Castellano, M., y Villanueva, E. (1978). Estudio sobre la evolución de los lípidos en restos óseos en función de la data. II.-Colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres. *Zacchia*, 14(3), 1.
58. Castilla-Gonzalo, J. (2004). 18. Procesos Conservadores del Cadáver. *En*: Gisbert-Calabuig, J. A. (Ed.), *Medicina Legal y Toxicología* (6ª Ed.). Elsevier-Masson, Barcelona, pp. 191 – 224.
59. Cattaneo, C. (2007). Forensic anthropology: developments of a classical discipline in the new millennium. *Forensic Science International*, 165(2), 185-193.
60. Cattaneo, C., Craig, O. E., James, N. T., y Sokol, R. J. (1997). Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences. *Journal of Forensic Science*, 42(6), 1126-1135.
61. Cattaneo, C., DiMartino, S., Scali, S., Craig, O. E., Grandi, M., y Sokol, R. J. (1999a). Determining the human origin of fragments of burnt bone: a comparative study of histological, immunological and DNA techniques. *Forensic Science International*, 102(2), 181-191.

62. Cattaneo, C., Gelsthorpe, K., Phillips, P., y Sokol, R. J. (1992a). Detection of blood proteins in ancient human bone using ELISA: a comparative study of the survival of IgG and albumin. *International Journal of Osteoarchaeology*, 2(2), 103-107.
63. Cattaneo, C., Gelsthorpe, K., Phillips, P., y Sokol, R. J. (1992b). Reliable identification of human albumin in ancient bone using ELISA and monoclonal antibodies. *American Journal of Physical Anthropology*, 87(3), 365-372.
64. Cattaneo, C., Nuttall, P. A., Molendini, L. O., Pellegrinelli, M., Grandi, M., y Sokol, R. J. (1999b). Prevalence of HIV and hepatitis C markers among a cadaver population in Milan. *Journal of Clinical Pathology*, 52(4), 267-270.
65. Cattaneo, C., Ritz-Timme, S., Schutz, H. W., Collins, M., Waite, E., Boormann, H., y Kaatsch, H. J. (2000). Unidentified cadavers and human remains in the EU: an unknown issue. *International Journal of Legal Medicine*, 113(3), 2-3.
66. Cazalbou, S., Eichert, D., Ranz, X., Drouet, C., Combes, C., Harmand, M. F., y Rey, C. (2005). Ion exchanges in apatites for biomedical application. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16(5), 405-409.
67. Chien, K. R., Abrams, J., Serroni, A., Martin, J. T., y Farber, J. L. (1978). Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *Journal of Biological Chemistry*, 253(13), 4809-4817.
68. Child, A. M. (1995). Microbial taphonomy of archaeological bone. *Studies in Conservation*, 40(1), 19-30.
69. Clark, M. A., Worrell, M. B., y Pless, J. E. (1996). Postmortem Changes in Soft Tissue. *En: Haglund, W. D., y Sorg, M. H. (Eds.), Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains* (1st Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 151 – 164.
70. Clark, W., y Christopher, K. (2000). An Introduction to DNA: Spectrophotometry, degradation, and the 'Frankengel' experiment. *En: Karcher, S. J. (Ed.), Tested studies for laboratory reaching* (Vol 22). Proceedings of the 22nd

Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), pp. 81 – 99.

71. Cleland, T. P., Voegelé, K., y Schweitzer, M. H. (2012). Empirical evaluation of bone extraction protocols. *PloS One*, 7(2), e31443.
72. Collan, Y., y Salmenperä, M. (1975). Electron microscopy of postmortem autolysis of rat muscle tissue. *Acta Neuropathologica*, 35(3), 219-233.
73. Collins, M. J., Nielsen–Marsh, C. M., Hiller, J., Smith, C. I., Roberts, J. P., Prigodich, R. V., Wess, T. J., Csapò, J., Millard, A. R., y Turner–Walker, G. (2002). The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry*, 44(3), 383-394.
74. Collins, M. J., Riley, M. S., Child, A. M., y Turner-Walker, G. (1995). A basic mathematical simulation of the chemical degradation of ancient collagen. *Journal of Archaeological Science*, 22(2), 175-183.
75. Colson, I. B., Bailey, J. F., Vercauteren, M., Sykes, B. C., y Hedges, R. E. M. (1997). The preservation of ancient DNA and bone diagenesis. *Ancient Biomolecules*, 1(2), 109-117.
76. Cooper, A., Poinar, H. N., Pääbo, S., Radovčić, J., Debenath, A., Caparros, M., Barroso-Ruiz, C., Bertranpetit, J., Nielsen-Marsh, C., Hedges, R. E. M., y Sykes, B. (1997). Neandertal genetics. *Science*, 277(5329), 1021-1025.
77. Corach, D., Sala, A., Penacino, G., Iannucci, N., Bernardi, P., Doretti, M., y Turner, S. (1997). Additional approaches to DNA typing of skeletal remains: the search for “missing” persons killed during the last dictatorship in Argentina. *Electrophoresis*, 18(9), 1608-1612.
78. Corbeil, J., y Richman, D. D. (1995). Productive infection and subsequent interaction of CD4-gp120 at the cellular membrane is required for HIV-induced apoptosis of CD4+ T cells. *Journal of General Virology*, 76(3), 681-690.
79. Counis, M. F., y Torriglia, A. (2006). Acid DNases and their interest among apoptotic endonucleases. *Biochimie*, 88(12), 1851-1858.

80. Cox, M., y Bell, L. (1999). Recovery of human skeletal elements from a recent UK murder inquiry: preservation signatures. *Journal of Forensic Sciences*, 44(5), 945-950.
81. Craig, N., Green, R., Greider, C., Cohen-Fix, O., Storz, G., y Wolberger, C. (2014). RNA processing. *En: Craig, N., Green, R., Greider, C., Cohen-Fix, O., Storz, G., y Wolberger, C. (Eds.), Molecular biology: principles of genome function (2nd Ed.)*. Oxford University Press, Oxford, pp. 378.
82. Creamer, J. I., y Buck, A. M. (2009). The assaying of haemoglobin using luminol chemiluminescence and its application to the dating of human skeletal remains. *Luminescence*, 24(5), 311-316.
83. Crecchio, C., y Stotzky, G. (1998). Binding of DNA on humic acids: effect on transformation of *Bacillus subtilis* and resistance to DNase. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8), 1061-1067.
84. Crine, P., y Verly, W. G. (1976). A study of DNA spontaneous degradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 442(1), 50-57.
85. Cunha, E. (2006). Pathology as a factor of personal identity in forensic anthropology. *En: Schmitt, A., Cunha, E., y Pineiro, J. (Eds.), Forensic anthropology and medicine: complementary sciences from recovery to cause of death (1st Ed.)*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 333 – 358.
86. Cunha, E., Cattaneo, C., Martrille, L., Gibelli, D., Taborelli, A., y Baccino, E. (2009). How long ago? The difficult issue of post mortem interval. *En: Proceedings of XXIth Congress of International Academy of Legal Medicine, Lisbon, 28 – 30 May*.
87. Cunha, E., y Pinheiro, J. (2013). Bone Pathology and Antemortem Trauma. *En: Siegel, J. A., y Saukko, P. J. (Eds.), Encyclopedia of Forensic Sciences (Vol. 1) (2nd Ed.)*. Academic Press, Waltham, Massachusetts, pp. 76 – 82.
88. Curry, G. B. (1988). Amino acids and proteins from fossils. *En: Eglinton, G., y Curry, G. B. (Eds.), Molecular Evolution and the Fossil Record (1st Ed.)*. The Paleontological Society, Tulsa, Oklahoma, pp. 20–33.

89. Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., y Traganos, F. (1997). Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, 27(1), 1-20.
90. de Duve, C., y Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annual Review of Physiology*, 28(1), 435-492.
91. Demontiero, O., Vidal, C., y Duque, G. (2012). Aging and bone loss: new insights for the clinician. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 4(2), 61-76.
92. Dent, B. B., Forbes, S. L., y Stuart, B. H. (2004). Review of Human Decomposition Processes in Soil. *Environmental Geology*, 45, 576-585.
93. Dive, C., Gregory, C. D., Phipps, D. J., Evans, D. L., Milner, A. E., y Wyllie, A. H. (1992). Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1133(3), 275-285.
94. Dixon, L. A., Dobbins, A. E., Pulker, H. K., Butler, J. M., Vallone, P. M., Coble, M. D., Parson, W., Berger, B., Grubwieser, P., Mogensen, H.S., Nielsen, K., Sanchez, J.J., Petkovski, E., Carracedo, A., Sanchez-Diz, P., Ramos-Luis, E., Brion, M., Irwin, J.A., Just, R.S., Loreille, O., Parsons, T.J., Syndercombe-Court, D., Schmitte, H., Stradmann-Bellinghausen, B., Bender, K., Gill, P., y Morling, N. (2006). Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs—results of a collaborative European (EDNAP) exercise. *Forensic Science International*, 164(1), 33-44.
95. Dollerup, E. (1964). Chemical analysis and microradiographic investigations on bone biopsies from cases of osteoporosis and osteomalacia as compared with normal. I. Calcium, phosphorus, and nitrogen content of normal and osteoporotic human bone. En: Blackwood, H. J. J. (Ed.), *Bone and tooth* (1st Ed.). Pergamon Press, Oxford, pp. 283 – 287.
96. Donovan, M., y Cotter, T. G. (2002). Caspase-independent photoreceptor apoptosis in vivo and differential expression of apoptotic protease activating factor-1 and caspase-3 during retinal development. *Cell Death & Differentiation*, 9(11), 1220-1231.

97. Drancourt, M., Tran-Hung, L., Courtin, J., de Lumley, H., y Raoult, D. (2005). Bartonella quintana in a 4000-year-old human tooth. *Journal of Infectious Diseases*, 191(4), 607-611.
98. Dutta, U., Cohenford, M. A., y Dain, J. A. (2005). Nonenzymatic glycation of DNA nucleosides with reducing sugars. *Analytical Biochemistry*, 345(2), 171-180.
99. Edson, S. M., Ross, J. P., Coble, M. D., Parson, T. J., y Barritt, S. M. (2004). Naming the Dead-Confronting the Realities of the Rapid Identification of Degraded Skeletal Remains. *Forensic Science Review*, 16(1), 63-88.
100. Eglinton, G., Logan, G. A., Ambler, R. P., Boon, J. J., y Perizonius, W. R. K. (1991). Molecular preservation [and discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 333(1268), 315-328.
101. Elliot, W. H. y Elliot, D. C. (2002). Metabolismo de Nucleótidos. En: Elliot, W. H., y Elliot, D. C. (Eds.). *Bioquímica y Biología Molecular* (1ª Ed.). Editorial Ariel, Barcelona, pp. 369 – 384.
102. Elsner, J., Schibler, J., Hofreiter, M., y Schlumbaum, A. (2015). Burial condition is the most important factor for mtDNA PCR amplification success in Palaeolithic equid remains from the Alpine foreland. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 7(4), 505-515.
103. Evershed, R. P., Turner-Walker, G., Hedges, R. E., Tuross, N., y Leyden, A. (1995). Preliminary results for the analysis of lipids in ancient bone. *Journal of Archaeological Science*, 22(2), 277-290.
104. Facchini, F., y Pettener, D. (1977). Chemical and physical methods in dating human skeletal remains. *American Journal of Physical Anthropology*, 47(1), 65-70.
105. Faerman, M., Filon, D., Kahila, G., Greenblatt, C. L., Smith, P., y Oppenheim, A. (1995). Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Gene*, 167(1), 327-332.

- 106.** Fan, Y., Liu, J., Wang, S., Wang, H., Shi, F., Xiong, L., y Peng, X. (2005). Functional proteome of bones in rats with osteoporosis following ovariectomy. *Life Sciences*, 76(25), 2893-2901.
- 107.** Fernández-Jalvo, Y., Andrews, P., Pesquero, D., Smith, C., Marín-Monfort, D., Sánchez, B., y Alonso, A. (2010). Early bone diagenesis in temperate environments: Part I: Surface features and histology. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 288(1), 62-81.
- 108.** Ferreira, M. T., y Cunha, E. (2013). Can we infer post mortem interval on the basis of decomposition rate? A case from a Portuguese cemetery. *Forensic Science International*, 226(1), 298-e1.
- 109.** Filipski, J., Leblanc, J., Youdale, T., Sikorska, M., y Walker, P. R. (1990). Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. *The EMBO Journal*, 9(4), 1319 – 1327.
- 110.** Focà, E., Motta, D., Borderi, M., Gotti, D., Albini, L., Calabresi, A., y Clò, A. (2012). Prospective evaluation of bone markers, parathormone and 1, 25-(OH) 2 vitamin D in HIV-positive patients after the initiation of tenofovir/emtricitabine with atazanavir/ritonavir or efavirenz. *BMC Infectious Diseases*, 12(1), 1.
- 111.** Forbes, S. L. (2008). Potential determinants of postmortem and postburial interval of buried remains. *En: Tibbett, M., y Carter, D.O. (Eds.), Soil analysis in forensic taphonomy: Chemical and biological effects of buried human remains (1st Ed.)*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 225 – 246.
- 112.** Forbes, S. L., y Nugent, K. (2009). Dating of anthropological skeletal remains of forensic interest. *En: Blau, S. (Ed.), Handbook of Forensic Anthropology and Archaeology (2nd Ed.)*. Left Coast Press, Walnut Creek, pp. 164 – 173.
- 113.** Franke, B., y Spennemann, D. H. (1995). Decomposition of buried human bodies and associated death scene materials on coral atolls in the tropical Pacific. *Journal of Forensic Science*, 40(3), 356-367.

114. Gallagher, S. R., y Desjardins, P. R. (2007). Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *En: Dracopoli, N.C. (Ed.), Current Protocols in Human Genetics (1st Ed.)*. John Wiley & Sons, New York, pp. A. 3D. 1 – A. 3D. 21.
115. Galloway, A. (1996). The process of decomposition: a model from the Arizona-Sonoran Desert. *En: Haglund, W. D., y Sorg, M. H. (Eds.), Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains (1st Ed.)*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 139 – 150.
116. Galloway, A., Birkby, W. H., Jones, A. M., Henry, T. E., y Parks, B. O. (1989). Decay rates of human remains in an arid environment. *Journal of Forensic Science*, 34(3), 607-616.
117. Galloway, A., Willy, P., y Snyder, L. (1996). Human bone mineral densities and survival of bone elements: a contemporary sample. *En: Haglund, W. D., y Sorg, M. H. (Eds.), Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains (1st Ed.)*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 295 – 317.
118. Gangl, J. (1936). Altersbestimmung fossiler Knochenfunde auf chemischem Wege. Ponencia en la Reunión Anual de la Asociación de Químicos Oesterreichischer en Viena. *Österr. Chemiker-Zeitung*, 39, 79–82.
119. Garbarino, J. E., y Gibbons, I. R. (2002). Expression and genomic analysis of midasin, a novel and highly conserved AAA protein distantly related to dynein. *BMC Genomics*, 3(1), 18.
120. Garrett, R. H., y Grisham, C. M. (2010a). Structure of nucleic acid. *En: Garrett, R. H., y Grisham, C. M. (Eds.), Biochemistry (5th Ed.)*. Cole, Cengage learning, Belmont, California, pp. 353 – 398.
121. Garrett, R. H., y Grisham, C. M. (2010b). Synthesis and degradation of nucleotides. *En: Garrett, R. H., y Grisham, C. M. (Eds.), Biochemistry (5th Ed.)*. Cole, Cengage learning, Belmont, California, pp. 927 – 956.

122. Gartner, L. P. y Hiatt, J. L. (2011). Cartílago y Hueso. *En*: Gartner, L. P., y Hiatt, J. L. (Eds.), *Histología Básica* (5ª Ed.). Elsevier Saunders, Madrid, pp. 74 – 93.
123. Gavrieli, Y., Sherman, Y., y Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, 119(3), 493-501.
124. George, S. A. (1993). Chapter 3. Diode Array Detection Advantages for the Chromatographer. *En*: Huber, L., y George, S. A. (Eds.), *Application of diode-array detection in HPLC* (1st Ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 41 – 50.
125. Georgiou, C. D., y Papapostolou, I. (2006). Assay for the quantification of intact/fragmented genomic DNA. *Analytical Biochemistry*, 358(2), 247-256.
126. Gerrard, J., Waterfield, N., y Vohra, R. (2004). Human infection with *Photobacterium* *asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen. *Microbes and Infection*, 6(2), 229-237.
127. Ghatak, S., Muthukumar, R. B., y Nachimuthu, S. K. (2013). A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP analysis. *Journal of Biomolecular Techniques*, 24(4), 224-31.
128. Giannelli, P. C., Imwinkelried, E. J., y Peterson, J. L. (2011). Reference guide on forensic identification expertise. *En*: Federal Judicial Center (Ed.), *Reference manual on scientific evidence* (3rd Ed.). National Academies Press, Washington, D.C., pp. 55 – 128.
129. Gibbon, V., Paximadis, M., Štrkalj, G., Ruff, P., y Penny, C. (2009). Novel methods of molecular sex identification from skeletal tissue using the amelogenin gene. *Forensic Science International: Genetics*, 3(2), 74-79.
130. Gibbs, M. L. (1991). What's Sex in the East is Not Necessary Sex in the West: Citrate, Sex and Human Skeletal Remains. Hamilton, Ontario: McMaster University, Doctoral dissertation.

- 131.** Gilbert, M. T. P., Binladen, J., Miller, W., Wiuf, C., Willerslev, E., Poinar, H., Carlson, J. E., Leebens-Mack, J. H., y Schuster, S. C. (2007). Recharacterization of ancient DNA miscoding lesions: insights in the era of sequencing-by-synthesis. *Nucleic Acids Research*, 35(1), 1-10.
- 132.** Gilbert, M. T. P., Hansen, A. J., Willerslev, E., Rudbeck, L., Barnes, I., Lynnerup, N., y Cooper, A. (2003a). Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. *The American Journal of Human Genetics*, 72(1), 48-61.
- 133.** Gilbert, M. T. P., Willerslev, E., Hansen, A. J., Barnes, I., Rudbeck, L., Lynnerup, N., y Cooper, A. (2003b). Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. *The American Journal of Human Genetics*, 72(1), 32-47.
- 134.** Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., y Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(11), 6715-6719.
- 135.** Gill-King, H. (1996). Chemical and ultrastructural aspects of decomposition. En: Haglund, W.D., y Sorg, M.H (Eds.), *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains* (1st Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 93 – 108.
- 136.** Ginolhac, A., Vilstrup, J., Stenderup, J., Rasmussen, M., Stiller, M., Shapiro, B., Zazula, G., Froese, D., Steinmann, K. E., Thompson, J. F., Al-Rasheid, K. A., Gilbert, T. M. P., Willerslev, E., y Orlando, L. (2012). Improving the performance of true single molecule sequencing for ancient DNA. *BMC Genomics*, 13(1), 1.
- 137.** Goff, M. L. (2009). Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers. *Experimental and Applied Acarology*, 49(1-2), 21-36.
- 138.** Goff, M.L., y Flynn, M.M. (1991). Determination of postmortem interval by arthropod succession: A case study from the Hawaiian Islands. *Journal of Forensic Sciences*, 36(2), 607 – 614.
- 139.** Goswami, J. (2015). Different Separation or Experimental Techniques for Clinical Chromatography: Small Review. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, 6(7), 1.

140. Götherström, A., Collins, M. J., Angerbjörn, A., y Lidén, K. (2002). Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry*, 44(3), 395-404.
141. Grebe, S. K., y Singh, R. J. (2011). LC-MS/MS in the clinical laboratory-where to from here. *The Clinical Biochemist Reviews*, 32(1), 5-31.
142. Griffiths, A. J. F., Gerlbart, W. M., Miller, J. H. y Lewontin, R. C. (2002). La Estructura de los Genes y de los Genomas. En: Griffiths, A. J. F., Gerlbart, W. M., Miller, J. H., y Lewontin, R. C. (Eds.), *Genética Moderna* (1ª Ed.). McGraw-Hill Interamericana de España S. L, Madrid, pp. 23 – 50.
143. Grupe, G., y Dreses-Werringloer, U. (1993). Decomposition phenomena in thin sections of excavated human bones. En: Grupe, G., y Garland, A.N. (Eds.), *Histology of ancient human bone: methods and diagnosis* (1st Ed.). Springer, Berlin, pp. 27 – 36.
144. Grynpas, M. (1976). The crystallinity of bone mineral. *Journal of Materials Science*, 11(9), 1691-1696.
145. Gundavarapu, S., Mishra, N. C., Singh, S. P., Langley, R. J., Saeed, A. I., Feghali-Bostwick, C. A., y Sopori, M. L. (2013). HIV gp120 induces mucus formation in human bronchial epithelial cells through CXCR4/ α 7-nicotinic acetylcholine receptors. *PLoS One*, 8(10), e77160.
146. Gutiérrez, M. A. (2001). Bone diagenesis and taphonomic history of the Paso Otero 1 bone bed, Pampas of Argentina. *Journal of Archaeological Science*, 28(12), 1277-1290.
147. Haack, K., Hummel, S., Hummel, B., y Herrmann, B. (2000). Ancient DNA fragments longer than 300 bp. *Anthropologischer Anzeiger*, 51-56.
148. Hackett, C. J. (1981). Microscopical focal destruction (tunnels) in exhumed human bones. *Medicine, Science and the Law*, 21(4), 243-265.
149. Hagelberg, E., Sykes, B., y Hedges, R. (1989). Ancient bone DNA amplified. *Nature*, 342(6249), 485.

- 150.** Hall, A., y Ballantyne, J. (2004). Characterization of UVC-induced DNA damage in bloodstains: forensic implications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380(1), 72-83.
- 151.** Handt, O., Krings, M., Ward, R. H., y Pääbo, S. (1996). The retrieval of ancient human DNA sequences. *American Journal of Human Genetics*, 59(2), 368.
- 152.** Hansen, A. J., Willerslev, E., Wiuf, C., Mourier, T., y Arctander, P. (2001). Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates. *Molecular Biology and Evolution*, 18(2), 262-265.
- 153.** Hare, P. E. (1976). Organic geochemistry of bone and its relation to the survival of bone in the natural environment. *En: Behrensmeyer, A. K., y Hill, A. P. (Eds.), Fossils in the Making: Vertebrate Taphonomy and Paleoecology* (1st Ed.). University of Chicago Press, Chicago, pp. 208 – 219.
- 154.** Hawksworth, D. L., y Wiltshire, P. E. (2011). Forensic mycology: the use of fungi in criminal investigations. *Forensic Science International*, 206(1), 1-11.
- 155.** Hedges, R. E. (2002). Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry*, 44(3), 319-328.
- 156.** Hedges, R. E., Clement, J. G., Thomas, C. D. L., y O'connell, T. C. (2007). Collagen turnover in the adult femoral mid-shaft: Modeled from anthropogenic radiocarbon tracer measurements. *American Journal of Physical Anthropology*, 133(2), 808-816.
- 157.** Hedges, R. E., y Millard, A. R. (1995a). Bones and groundwater: towards the modelling of diagenetic processes. *Journal of Archaeological Science*, 22(2), 155-164.
- 158.** Hedges, R. E., y Millard, A. R. (1995b). Measurements and relationships of diagenetic alteration of bone from three archaeological sites. *Journal of Archaeological Science*, 22(2), 201-209.

- 159.** Henderson, J. (1987). Factors determining the state of preservation of human remains. *En: Boddington, A., Garland, A.N., y Janaway, R.C. (Eds.), Death, decay and reconstruction: approaches to archaeology and forensic science* (1st Ed.). Manchester University Press, Manchester, pp. 43 – 54.
- 160.** Henssge, C., y Madea, B. (2004). Estimation of the time since death in the early post-mortem period. *Forensic Science International*, 144(2), 167-175.
- 161.** Henssge, C., y Madea, B. (2007). Estimation of the time since death. *Forensic Science International*, 165(2), 182-184.
- 162.** Hermansson, M., Sawaji, Y., Bolton, M., Alexander, S., Wallace, A., Begum, S., Wait, R., y Saklatvala, J. (2004). Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin β A (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43514-43521.
- 163.** Hernández del Rincón, J. P. (2001). Aplicación de Análisis Bioquímicos y de Difracción de Rayos X al Cálculo de la Data de Restos Óseos. Murcia: Universidad de Murcia. Tesis Doctoral.
- 164.** Higgins, D., y Austin, J. J. (2013). Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. *Science & Justice*, 53(4), 433-441.
- 165.** Hoff-Olsen, P., Mevåg, B., Staalstrøm, E., Hovde, B., Egeland, T., y Olaisen, B. (1999). Extraction of DNA from decomposed human tissue: an evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. *Forensic Science International*, 105(3), 171-183.
- 166.** Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., von Haeseler, A., y Pääbo, S. (2001). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research*, 29(23), 4793-4799.
- 167.** Holden, M. J., Rabb, S. A., Tewari, Y. B., y Winchester, M. R. (2007). Traceable phosphorus measurements by ICP-OES and HPLC for the quantitation of DNA. *Analytical Chemistry*, 79(4), 1536-1541.

- 168.** Hollund, H. I., Ariese, F., Fernandes, R., Jans, M. M. E., y Kars, H. (2013). Testing an alternative high-throughput tool for investigating bone diagenesis: FTIR in attenuated total reflection (ATR) mode. *Archaeometry*, 55(3), 507-532.
- 169.** Hollund, H. I., Jans, M. M. E., y Kars, H. (2014). How are teeth better than bone? An investigation of dental tissue diagenesis and state of preservation at a histological scale (with photo catalogue). *Internet Archaeology*, 36.
- 170.** Höss, M., Jaruga, P., Zastawny, T. H., Dizdaroglu, M., y Pääbo, S. (1996). DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research*, 24(7), 1304-1307.
- 171.** Huang, P., Ballal, K., y Plunkett, W. (1997). Biochemical characterization of the protein activity responsible for high molecular weight DNA fragmentation during drug-induced apoptosis. *Cancer Research*, 57(16), 3407-3414.
- 172.** ICRC. (2004). The Missing and their Families: Documents of Reference. International Committee of the Red Cross, Ginebra [consultado 5 Jul 2016]. Disponible en: <https://www.icrc.org/en/publication/0857-missing-and-their-families-documents-reference>
- 173.** ICRC. (2009a). Missing people, DNA analysis and identification of human remains. A guide to best practice in armed conflicts and other situations of armed violence (2nd Ed.). International Committee of the Red Cross, Ginebra [consultado 5 Jul 2016]. Disponible en: <https://www.icrc.org/en/publication/4010-missing-people-dna-analysis-and-identification-human-remains-guide-best-practice>
- 174.** ICRC. (2009b). Management of Dead Bodies after Disasters: A Field Manual for First Responders. International Committee of the Red Cross, Ginebra [consultado 5 Jul 2016]. Disponible en: <https://www.icrc.org/en/publication/0880-management-dead-bodies-after-disasters-field-manual-first-responders>
- 175.** Interpol. (2005). Disaster Victim Identification (DVI) Guide. 2009 [consultado 2 Mar 2016]. Disponible en: <http://www.interpol.com/Public/DisasterVictim/guide/>

- 176.** Introna, F., Di Vella, G., y Campobasso, C. P. (1999). Determination of postmortem interval from old skeletal remains by image analysis of luminol test results. *Journal of Forensic Sciences*, *44*, 535-538.
- 177.** Işcan, M. Y. y Steyn, M. (2013). Forensic archaeology and taphonomy. En: Işcan, M. Y., y Steyn, M. (Eds.), *The human skeleton in forensic medicine* (3rd Ed.). Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, pp. 11 – 58.
- 178.** Jaeger, L. H., de Souza, S. M., Dias, O. F., e Iñiguez, A. M. (2013). Mycobacterium tuberculosis Complex in Remains of 18th–19th Century Slaves, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(5), 837.
- 179.** Jakubowska, J., Maciejewska, A., y Pawłowski, R. (2012). Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation. *International Journal of Legal Medicine*, *126*(1), 173-178.
- 180.** Janjua, M. A., y Rogers, T. L. (2008). Bone weathering patterns of metatarsal v. femur and the postmortem interval in Southern Ontario. *Forensic Science International*, *178*(1), 16-23.
- 181.** Jans, M. M. (2008). Microbial bioerosion of bone—a review. En: Wisshak, M., y Tapanila, L. (Eds.), *Current developments in bioerosion* (1st Ed.). Springer Science & Business Media, Berlin, Heidelberg, pp. 397 – 413.
- 182.** Jans, M. M. E., Kars, H., Nielsen–Marsh, C. M., Smith, C. I., Nord, A. G., Arthur, P., y Earl, N. (2002). In situ preservation of archaeological bone: a histological study within a multidisciplinary approach. *Archaeometry*, *44*(3), 343-352.
- 183.** Jarvis, D. R. (1997). Nitrogen levels in long bones from coffin burials interred for periods of 26–90 years. *Forensic Science International*, *85*(3), 199-208.
- 184.** Jennings, R. B., Ganote, C. E., y Reimer, K. A. (1975). Ischemic tissue injury. *The American Journal of Pathology*, *81*(1), 179.

- 185.** Jiang, X., Ye, M., Jiang, X., Liu, G., Feng, S., Cui, L., y Zou, H. (2007). Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis. *Journal of Proteome Research*, 6(6), 2287-2294.
- 186.** Johnson, I., y Spence, M. (2010). Introduction to Fluorescence Techniques. *En: Johnson, I., y Spence, M. (Eds.), The molecular probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies (11th Ed.)*. Life Technologies, Carlsbad, California, pp. 3 – 9.
- 187.** Johnson, L. A., y Ferris, J. A. (2002). Analysis of postmortem DNA degradation by single-cell gel electrophoresis. *Forensic Science International*, 126(1), 43-47.
- 188.** Kaestle, F. A., y Horsburgh, K. (2002). Ancient DNA in anthropology: methods, applications, and ethics. *American Journal of Physical Anthropology*, 119(S35), 92-130.
- 189.** Kaiser, C., Bachmeier, B., Conrad, C., Nerlich, A., Bratzke, H., Eisenmenger, W., y Peschel, O. (2008). Molecular study of time dependent changes in DNA stability in soil buried skeletal residues. *Forensic Science International*, 177(1), 32-36.
- 190.** Kaliszan, M., Hauser, R., y Kernbach-Wightton, G. (2009). Estimation of the time of death based on the assessment of post mortem processes with emphasis on body cooling. *Legal Medicine*, 11(3), 111-117.
- 191.** Kanz, F., Reiter, C., y Risser, D. U. (2014). Citrate content of bone for time since death estimation: results from burials with different physical characteristics and known PMI. *Journal of Forensic Sciences*, 59(3), 613-620.
- 192.** Kapp, E. A., Schütz, F., Connolly, L. M., Chakel, J. A., Meza, J. E., Miller, C. A., y Simpson, R. J. (2005). An evaluation, comparison, and accurate benchmarking of several publicly available MS/MS search algorithms: sensitivity and specificity analysis. *Proteomics*, 5(13), 3475-3490.
- 193.** Katzenberg, M. A. (2007). Stable isotope analysis: a tool for studying past diet, demography, and life history. *En: Katzenberg, M.A., y Saunders, S.R.*

- (Eds.), *Biological Anthropology of the Human Skeleton* (2nd Ed.). Wiley-Liss, Hoboken, New Jersey, pp. 411 – 441.
- 194.** Katzenberg, M. A., y Lovell, N. C. (1999). Stable isotope variation in pathological bone. *International Journal of Osteoarchaeology*, 9(5), 316-324.
- 195.** Kierszenbaum, A.L. y Tres, L.L. (2012). Tejido Conjuntivo. *En: Kierszenbaum, A.L., y Tres, L.L. (Eds.), Histología y Biología celular: Introducción a la Anatomía Patológica* (3^a Ed.). Elsevier Saunders, Barcelona, pp. 119 – 149.
- 196.** Kitamura, H., Iwamoto, C., Sakairi, N., Tokura, S., y Nishi, N. (1997). Marked effect of DNA on collagen fibrillogenesis in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 20(3), 241-244.
- 197.** Kitayama, T., Ogawa, Y., Fujii, K., Nakahara, H., Mizuno, N., Sekiguchi, K., Kasai, K., Yurino, N., Yokoi, T., Fukuma, Y., Oki, T., Asamura, H., Fukushima, H., y Yamamoto, K. (2010). Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method. *Legal Medicine*, 12(2), 84-89.
- 198.** Klepinger, L. L. (2006). The postmortem period. *En: Cartmill, M., y Brown, K. (Eds.), Fundamentals of forensic anthropology (Vol. 1)* (1st Ed.). John Wiley & Sons, New Jersey, pp. 117 – 131.
- 199.** Kleter, G. A., Damen, J. J. M., Everts, V., Niehof, J., y Ten Cate, J. M. (1994). The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. *Journal of Dental Research*, 73(9), 1523-1529.
- 200.** Klont, B., Damen, J. J. M., y Ten Cate, J. M. (1991). Degradation of bovine incisor root collagen in an in vitro caries model. *Archives of Oral Biology*, 36(4), 299-304.
- 201.** Kloss, F. R., y Gassner, R. (2006). Bone and aging: effects on the maxillofacial skeleton. *Experimental Gerontology*, 41(2), 123-129.
- 202.** Knight, B. (1975). Recent advances in bone pathology. *Welsh National School of Medicine Cardiff Police Surgery*, 7, 8–12.

- 203.** Knight, B., y Lauder, I. (1967). Proceedings of the British Association in Forensic Medicine Practical Methods of Dating Skeletal Remains: A Preliminary Study. *Medicine, Science and the Law*, 7(4), 205-208.
- 204.** Knight, B., y Lauder, I. (1969). Methods of dating skeletal remains. *Human Biology*, 41(3), 322-341.
- 205.** Knight, B., y Saukko, P. (2004a). The pathophysiology of death. *En: Knight, B., y Saukko, P. (Eds.), Knight's Forensic Pathology (3rd Ed.)*. Hodder Arnold, London, pp. 52 – 97.
- 206.** Knight, B., y Saukko, P. (2004b). The establishment of identity of human remains. *En: Knight, B., y Saukko, P. (Eds.), Knight's Forensic Pathology (3rd Ed.)*. Hodder Arnold, London, pp. 98 – 135.
- 207.** Komar, D. A. (1998). Decay rates in a cold climate region: a review of cases involving advanced decomposition from the Medical Examiner's Office in Edmonton, Alberta. *Journal of Forensic Science*, 43(1), 57-61.
- 208.** Komar, D. A. (1999). Forensic taphonomy in a cold climate region: a field study in central Alberta and a potential new method of determining time since death. Edmonton: University of Alberta. Doctoral dissertation.
- 209.** Komar, D. A., Beattie, O., Dowling, G., y Bannach, B. (1999). Hangings in Alberta, with special reference to outdoor hangings with decomposition. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, 32(2-3), 85-96.
- 210.** Krane, S. M. (1975). Degradation of collagen in connective tissue diseases. Rheumatoid arthritis. *En: Burleigh, P. M. C., y Poolem A. R. (Eds.), Dynamics of connective tissue macromolecules (1st Ed.)*. North Holland Publishing Company, Amsterdam, pp. 309 – 326.
- 211.** Krings, M., Stone, A., Schmitz, R. W., Krainitzki, H., Stoneking, M., y Pääbo, S. (1997). Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, 90(1), 19-30.

212. Kryndushkin, D. S., Alexandrov, I. M., Ter-Avanesyan, M. D., y Kushnirov, V. V. (2003). Yeast [PSI⁺] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. *Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 49636-49643.
213. Krysko, D. V., Berghe, T. V., D'Herde, K., y Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), 205-221.
214. Kumar, A., Harish, D., Singh, A., y Kumar, G. A. (2014). Unknown Dead Bodies: Problems and Solutions. *Journal of Indian Academy of Forensic Medicine*, 36(1), 76-80.
215. Kumar, A., Kumar, G. A., Tyagi, A., y Aggar, N. K. (2009). Sex determination using discriminant function analysis in adult talus and calcaneum bones. *International Journal of Medical Toxicology & Legal Medicine*, 12(1), 4-12.
216. Kumar, A., Tyagi, A., y Aggarwal, N. K. (2008). Sex determination by morphology of talus bone. *Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 25(1), 54-57.
217. Kumar, V., Abbas, A. K., y Aster, J. C. (2013). Cell injuries, cell death and adaptations. *En: Kumar, V., Abbas, A. K., y Aster, J. C. (Eds.), Robbins basic pathology* (9th Ed.). Elsevier Health Sciences, Philadelphia, Pennsylvania, pp. 1 – 29.
218. Kuriyan, J., Konforti, B., y Wemmer, D. (2012). From genes to RNA and proteins. *En: Kuriyan, J., Konforti, B., y Wemmer, D. (Eds.), The molecules of life: Physical and chemical principles* (1st Ed.). Garland Science, New York, pp. 15 – 35.
219. Lagarkova, M. A., Iarovaia, O. V., y Razin, S. V. (1995). Large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers. *Journal of Biological Chemistry*, 270(35), 20239-20241.
220. Lee, H. Y., Park, M. J., Kim, N. Y., Sim, J. E., Yang, W. I., y Shin, K. J. (2010). Simple and highly effective DNA extraction methods from old skeletal remains using silica columns. *Forensic Science International: Genetics*, 4(5), 275-280.

221. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., y Kim, Y. H. (2011). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (62), 9400-9405.
222. Leney, M. D. (2006). Sampling skeletal remains for ancient DNA (aDNA): a measure of success. *Historical Archaeology*, 31-49.
223. Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709-715.
224. Lindahl, T. (1996). The Croonian Lecture, 1996: endogenous damage to DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 351(1347), 1529-1538.
225. Lindahl, T., y Andersson, A. (1972). Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 11(19), 3618-3623.
226. Lindahl, T., y Nyberg, B. (1972). Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 11(19), 3610-3618.
227. Lindsay, W. L. (1979). *Chemical equilibria in soils* (1st Ed.). John Wiley & Sons, New York, pp. 1 – 9.
228. Liu, Z., Li, T., y Wang, E. (1995). Simultaneous determination of guanine, uric acid, hypoxanthine and xanthine in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *Analyst*, 120(8), 2181-2184.
229. Lodish, H., (2004). Transport of ions and small molecules across cell membranes. *En: Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L. y Darnell, J. (Eds.), Molecular Cell Biology* (5th Ed.). WH Freeman and Company, New York, pp. 252 – 258.
230. Logan, G. A., Collins, M., y Eglinton, G. (1991). Preservation of organic biomolecules. *En: Allison, P. A., y Briggs, D. E. G. (Eds.), Taphonomy: releasing the data locked in the fossil record* (1st Ed.). Plenum, New York, pp. 1 – 24.

231. Logan, G. A., Smiley, C. J., y Eglinton, G. (1995). Preservation of fossil leaf waxes in association with their source tissues, Clarkia, northern Idaho, USA. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(4), 751-763.
232. Longato, S., Wöss, C., Hatzler-Grubwieser, P., Bauer, C., Parson, W., Unterberger, S. H., y Lackner, R. (2015). Post-mortem interval estimation of human skeletal remains by micro-computed tomography, mid-infrared microscopic imaging and energy dispersive X-ray mapping. *Analytical Methods*, 7(7), 2917-2927.
233. Loreille, O. M., Diegoli, T. M., Irwin, J. A., Coble, M. D., y Parsons, T. J. (2007). High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Science International: Genetics*, 1(2), 191-195.
234. Lorente, J. A., Entrala, C., Alvarez, J. C., Arce, B., Heinrichs, B., Lorente, M., y Villanueva, E. (2001). Identification of missing persons: The Spanish "phoenix" program. *Croatian Medical Journal*, 42(3), 267-270.
235. Lorenz, M. G., y Wackernagel, W. (1987). Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(12), 2948-2952.
236. Lowenstein, J. M., Sarich, V. M., y Richardson, B. J. (1981). Albumin systematics of the extinct mammoth and Tasmanian wolf. *Nature*, 291, 1409-14011.
237. Lozano-Teruel, J. A., Galindo, J. D., García-Borrón, J. C., Martínez-Liarte, J. H., Peñafiel, R. y Solano-Muñoz, F. (2005). Tejidos Calcificados. *En: Lozano, J. A., Galindo, J. D., García-Borrón, J. C., Martínez-Liarte, J. H., Peñafiel, R., y Solano, F. (Eds.), Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud (3ª Ed.)*. McGraw-Hill Interamericana de España S. L, Madrid, pp. 637 – 652.
238. Lugnier, A. A., Chaumont, A. J., Tracqui, A., Godelar, B., Kintz, P., y Mangin, P. (1990). Fly larvae: a new toxicological method of investigation in forensic medicine. *Journal of Forensic Science*, 35(1), 204-207.

- 239.** Maclaughlin-Black, S. M., Herd, R. J., Willson, K., Myers, M., y West, I. E. (1992). Strontium-90 as an indicator of time since death: a pilot investigation. *Forensic Science International*, 57(1), 51-56.
- 240.** Mant, A. K. (1987). Knowledge acquired from post-war exhumations. *En: Boddington, A., Garland, A.N., y Janaway, R.C. (Eds.), Death, decay and reconstruction: Approaches to archaeology and forensic science (1st Ed.)*. Manchester University Press, Manchester, pp. 65 – 78.
- 241.** Markham, R., y Smith, J. D. (1949). Chromatographic studies of nucleic acids. 1. A technique for the identification and estimation of purine and pyrimidine bases, nucleosides and related substances. *Biochemical Journal*, 45(3), 294.
- 242.** Marks, M., Love, J. y Dadour, I. R. (2009). Taphonomy and time: estimating the post-mortem interval. *En: Steadman, D. W. (Ed.), Hard evidence: case studies in forensic anthropology (2nd Ed.)*. Prentice Hall, New Jersey, pp. 165 – 178.
- 243.** Martelli, A. M., Bareggi, R., Bortul, R., Grill, V., Narducci, P., y Zwyer, M. (1997). The nuclear matrix and apoptosis. *Histochemistry and Cell Biology*, 108(1), 1-10.
- 244.** Matoba, K., y Terazawa, K. (2008). Estimation of the time of death of decomposed or skeletonized bodies found outdoors in cold season in Sapporo city, located in the northern district of Japan. *Legal Medicine*, 10(2), 78-82.
- 245.** Mattson, M. P., Haughey, N. J., y Nath, A. (2005). Cell death in HIV dementia. *Cell Death & Differentiation*, 12, 893-904.
- 246.** McDonald, M. R., y Kaufmann, B. P. (1954). The degradation by ribonuclease of substrates other than ribonucleic acid. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2(5), 387-394.
- 247.** McDowall, K. L., Lenihan, D. V., Busuttil, A., y Glasby, M. A. (1998). The use of absolute refractory period in the estimation of early postmortem interval. *Forensic Science International*, 91(3), 163-170.

248. McKeown, A. H., Kemp, W. L., y Dudzik, B. (2011). Scavenging and its relations to decomposition in the Northern Rockies. *En: Proceedings of American Academy of Forensic Sciences Annual Scientific Meeting*, Chicago, IL, February 21 – 26.
249. Meadows, L., Mann, R. W., y Bass, W. M. (1990). Time since death and decomposition of the human body: variables and observations in case and experimental field studies. *Journal of Forensic Science*, 35(1), 103-111.
250. Megyesi, M. S., Nawrocki, S. P., y Haskell, N. H. (2005). Using accumulated degree-days to estimate the postmortem interval from decomposed human remains. *Journal of Forensic Science*, 50(3), 1-9.
251. Miles, C. A., Sionkowska, A., Hulin, S. L., Sims, T. J., Avery, N. C., y Bailey, A. J. (2000). Identification of an intermediate state in the helix-coil degradation of collagen by ultraviolet light. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 33014-33020.
252. Miller, M. L. (2002). Coupling Ground Penetrating Radar Applications with Continually Changing Decomposing Human Targets: An Effort to Enhance Search Strategies of Buried Human Remains. Knoxville: University of Tennessee. Doctoral dissertation.
253. Milman, B. L., y Zhurkovich, I. K. (2011). Towards a full reference library of MSn spectra. II: A perspective from the library of pesticide spectra extracted from the literature/Internet. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(24), 3697-3705.
254. Miloš, A., Selmanović, A., Smajlović, L., Huel, R., Katzmarzyk, C., Rizvić, A., y Parsons, T. J. (2007). Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croatian Medical Journal*, 48, 486-493.
255. Minamino, M., Sakaguchi, I., Naka, T., Ikeda, N., Kato, Y., Tomiyasu, I., y Kobayashi, K. (2003). Bacterial ceramides and sphingophospholipids induce apoptosis of human leukaemic cells. *Microbiology*, 149(8), 2071-2081.
256. Mishra, B., Varma, N., Appannanavar, S., Malhotra, P., Sharma, M., Bhatnagar, A., y Varma, S. (2012). Viral markers in patients with hemophagocytosis: A

- prospective study in a tertiary care hospital. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 55(2), 215.
257. Montgelard, C. (1992). Albumin preserved in fossil bones and systematics of *Malpaisolys insularis* (Muridae, Rodentia), an extinct rodent of the Canary Islands. *Historical Biology*, 6, 293–302.
258. Mrevlishvili, G. M., y Svintradze, D. V. (2005). DNA as a matrix of collagen fibrils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 36(5), 324-326.
259. Mueller, B. (1953). *Gerichtliche Medizin* (1st Ed.). Springer-Verlag, Berlin.
260. Mundorff, A., y Davoren, J. M. (2014). Examination of DNA yield rates for different skeletal elements at increasing post mortem intervals. *Forensic Science International: Genetics*, 8(1), 55-63.
261. Myllyharju, J., y Kivirikko, K. I. (2001). Collagens and collagen-related diseases. *Annals of Medicine*, 33(1), 7-21.
262. Myllyharju, J., y Kivirikko, K. I. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *TRENDS in Genetics*, 20(1), 33-43.
263. Nawrocki, S. P. (1995). Taphonomic processes in historic cemeteries. *En: Grauer, A. L. (Ed.), Bodies of evidence: reconstructing history through skeletal analysis* (1st Ed.). Wiley-Liss, New York, pp. 49 – 66.
264. Neis, P., Hille, R., Paschke, M., Pilwat, G., Schnabel, A., Niess, C., y Bratzke, H. (1999). Strontium90 for determination of time since death. *Forensic Science International*, 99(1), 47-51.
265. Nelson, D. L. L., y Cox, M. M. (2006a). Estructura tridimensional de las proteínas. *En: Nelson, D. L. L., y Cox, M. M. (Eds.), Lehninger. Principios de Bioquímica* (4^a Ed.). Ediciones Omega, Barcelona, pp. 116 – 157.

- 266.** Nelson, D. L. L., y Cox, M. M. (2006b). Nucleótidos y ácidos nucleicos. *En:* Nelson, D. L. L., y Cox, M. M. (Eds.), *Lehninger. Principios de Bioquímica* (4ª Ed.). Ediciones Omega, Barcelona, pp. 273 – 305.
- 267.** Nelson, D. L. L., y Cox, M. M. (2006c). Biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y moléculas relacionadas. *En:* Nelson, D. L. L., y Cox, M. M. (Eds.), *Lehninger. Principios de Bioquímica* (4ª Ed.). Ediciones Omega, Barcelona, pp. 833 – 880.
- 268.** Newman, R. D., Moore, S. R., Lima, A. A., Nataro, J. P., Guerrant, R. L., y Sears, C. L. (2001). A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. *Tropical Medicine & International Health*, 6(8), 624-634.
- 269.** Nicholson, R. A. (1998). Bone degradation in a compost heap. *Journal of Archaeological Science*, 25(5), 393-403.
- 270.** Nielsen-Marsh, C. M., y Hedges, R. E. (1999). Bone porosity and the use of mercury intrusion porosimetry in bone diagenesis studies, *Archaeometry*, 41(1), 165–74.
- 271.** Nielsen-Marsh, C. M., y Hedges, R. E. (2000a). Patterns of diagenesis in bone I: the effects of site environments. *Journal of Archaeological Science*, 27(12), 1139-1150.
- 272.** Nielsen-Marsh, C. M., y Hedges, R. E. (2000b). Patterns of diagenesis in bone II: effects of acetic acid treatment and the removal of diagenetic CO_3^{2-} . *Journal of Archaeological Science*, 27(12), 1151-1159.
- 273.** Obeid, O. E., y Alzahrani, A. J. (2009). Analysis of chemokines and soluble adhesion molecules in cytomegalovirus-positive renal transplant recipients. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 4(02), 110-113.
- 274.** Oberhammer, F., Wilson, J. W., Dive, C., Morris, I. D., Hickman, J. A., Wakeling, A. E., Walker, P. R., y Sikorska, M. (1993). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *The EMBO Journal*, 12(9), 3679

- 275.** Olszta, M. J., Cheng, X., Jee, S. S., Kumar, R., Kim, Y. Y., Kaufman, M. J., Douglas, E. y Gower, L. B. (2007). Bone structure and formation: a new perspective. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 58(3), 77-116.
- 276.** Ortner, D. J. (2003). *Identification of pathological conditions in human skeletal remains* (2nd Ed.). Academic Press, San Diego, California.
- 277.** Ortner, D. J. (2011). Human skeletal paleopathology. *International Journal of Paleopathology*, 1(1), 4-11.
- 278.** Pääbo, S. (1984). Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*, 314(6012), 644-645.
- 279.** Pääbo, S. (1986, January). Molecular genetic investigations of ancient human remains. *En: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 51,). Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 441 – 446.
- 280.** Pääbo, S. (1989). Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(6), 1939-1943.
- 281.** Pääbo, S., Higuchi, R. G., y Wilson, A. C. (1989). Ancient DNA and the polymerase chain reaction: The emerging field of molecular archaeology (Minireview). *The Journal of Biological Chemistry*, 264(17), 9709-9712.
- 282.** Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Després, V., Hebler, J., Rohland, N., y Hofreiter, M. (2004). Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics*, 38, 645-679.
- 283.** Pagan, F., Lim, C., Keglovic, M., y McNevin, D. (2012). Comparison of DNA extraction methods for identification of human remains. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 44(2), 117-127.
- 284.** Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R. y Sáez, F. J. (2007). Tejidos Conjuntivo, Adiposo, Cartílago y Hueso. *En: Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R., y Sáez, F. J. (Eds.),*

- Citología e histología vegetal y animal. Volumen II, Histología vegetal y animal* (4ª Ed.). McGraw-Hill Interamericana de España S. L., Madrid, pp. 589 – 640.
- 285.** Panzer, S., Peschel, O., Haas-Gebhard, B., Bachmeier, B. E., Pusch, C. M., y Nerlich, A. G. (2014). Reconstructing the life of an unknown (ca. 500 years-old South American Inca) mummy—multidisciplinary study of a Peruvian Inca mummy suggests severe chagas disease and ritual homicide. *PloS One*, 9(2), e89528.
- 286.** Parsons, T. J., y Weedn, V. W. (1996). Preservation and recovery of DNA in post-mortem specimens and trace samples. *En: Haglund, W. D., y Sorg, M. S. (Eds.), Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains* (1st Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 109 – 138.
- 287.** Pasteris, J. D., Wopenka, B., y Valsami-Jones, E. (2008). Bone and tooth mineralization: Why apatite?. *Elements*, 4(2), 97-104.
- 288.** Pastorelli, R., Carpi, D., Airoldi, L., Chiabrando, C., Bagnati, R., Fanelli, R., y Ohlsson, C. (2005). Proteome analysis for the identification of in vivo estrogen-regulated proteins in bone. *Proteomics*, 5(18), 4936-4945.
- 289.** Pesquero, M. D., Ascaso, C., Alcalá, L., y Fernández-Jalvo, Y. (2010). A new taphonomic bioerosion in a Miocene lakeshore environment. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 295(1), 192-198.
- 290.** Piepenbrink, H. (1986). Two examples of biogenous dead bone decomposition and their consequences for taphonomic interpretation. *Journal of Archaeological Science*, 13(5), 417-430.
- 291.** Piepenbrink, H. (1989). Examples of chemical changes during fossilisation. *Applied Geochemistry*, 4(3), 273-280.
- 292.** Pierer, M., Rothe, K., Quandt, D., Schulz, A., Rossol, M., Scholz, R., y Wagner, U. (2012). Association of anticytomegalovirus seropositivity with more severe joint destruction and more frequent joint surgery in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 64(6), 1740-1749.

- 293.** Pike, A. W. G., Nielsen-Marsh, C., y Hedges, R. E. M. (2001). Modelling bone dissolution under different hydrological regimes. *BAR International Series*, 939, 127-132.
- 294.** Pinheiro, J. (2006). Decay process of a cadaver. *En: Schmitt, A., Cunha, E., y Pinheiro, J. (Eds.), Forensic anthropology and medicine: complementary sciences from recovery to cause of death* (1st Ed.). Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 85 – 116.
- 295.** Poinar, H. N., Hoss, M., Bada, J. L., y Pääbo, S. (1996). Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science*, 272(5263), 864.
- 296.** Poinar, H. N., y Stankiewicz, B. A. (1999). Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), 8426-8431.
- 297.** Poissy, J., Champenois, K., Dewilde, A., Melliez, H., Georges, H., Senneville, E., y Yazdanpanah, Y. (2012). Impact of Herpes simplex virus load and red blood cells in cerebrospinal fluid upon herpes simplex meningo-encephalitis outcome. *BMC Infectious Diseases*, 12(1), 356.
- 298.** Pokines, J. T. (2009). Forensic recoveries of U.S. war dead and the effects of taphonomy and other site-altering processes. *En: Steadman, D. W. (Ed.), Hard evidence: case studies in forensic anthropology* (2nd Ed.). Prentice Hall, New Jersey, pp. 141 – 153.
- 299.** Pollard, A. M. (1996). Dating the time of death. *En: Hunter, J., Roberts, C., y Martin, A. (Eds.), Studies in crime: an introduction to forensic archaeology*. Routledge, London, pp. 139 – 155.
- 300.** Pope, M. A. (2011). Decomposition patterns of human remains within enclosed environments: a comparative analysis of the Midwest and Southeast. *En: Proceedings of American Academy of Forensic Sciences Annual Scientific Meeting*, Chicago, Illinois, February 21–26.

- 301.** Pötsch, L., Meyer, U., Rothschild, S., Schneider, P. M., y Rittner, C. H. (1992). Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. *International Journal of Legal Medicine*, 105(3), 139-143.
- 302.** Pounder, D.J. (1995) Postmortem Changes and the Time of Death. Department of Forensic Science, University of Dundee. Lecture Notes. Unpublished.
- 303.** Powers, R. H. (2005). The decomposition of human remains, a biochemical perspective. En: Rich, J., Dean, D. E., y Powers, R. H. (Eds.), *Forensic medicine of the lower extremity: human identification and trauma analysis of the thigh, leg and foot* (1st Ed.). Humana press, New Jersey, pp. 3 – 15.
- 304.** Prieto-Castelló, M.J., Hernández del Rincón, J.P., Pérez-Sirvent, C., Álvarez-Jiménez, P., Pérez-Cárceles, M.D., Osuna, E., y Luna, A. (2007). Application of biochemical and X-ray diffraction analyses to establish the postmortem interval. *Forensic Science International*, 172, 112–118.
- 305.** Prinz, M., Carracedo, A., Mayr, W. R., Morling, N., Parsons, T. J., Sajantila, A., y Schneider, P. M. (2007). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Science International: Genetics*, 1(1), 3-12.
- 306.** Putnis, A., Putnis, C. V., y Paul, J. M. (1995, January). The efficiency of a DTPA-based solvent in the dissolution of barium sulfate scale deposits. En: *SPE International Symposium on Oilfield Chemistry*, Society of Petroleum Engineers, January, pp. 773–785.
- 307.** Raisz, L. G., y Seeman, E. (2001). Causes of age-related bone loss and bone fragility: an alternative view. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(11), 1948-1952.
- 308.** Ramsthaler, F., Kreutz, K., Zipp, K., y Verhoff, M. A. (2009). Dating skeletal remains with luminol-chemiluminescence. Validity, intra-and interobserver error. *Forensic Science International*, 187(1), 47-50.

- 309.** Rhine, S., y Dawson, J. E. (1998). Estimation of time since death in the southwestern United States. *En: Reichs, K.J. (Ed.), Forensic osteology: Advances in the identification of human remains (2nd Ed.)*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, pp. 145 – 159.
- 310.** Rickards, O., Martinez-Labarga, C., Favaro, M., Frezza, D., y Mallegni, F. (2001). DNA analyses of the remains of the Prince Branciforte Barresi family. *International Journal of Legal Medicine*, 114(3), 141-146.
- 311.** Robbins, L. L., Muyzer, G., y Brew, K. (1993). Macromolecules from living and fossil biominerals: implications for the establishment of molecular phylogenies. *En: Engel, M. H., y Macko, S. A. (Eds.), Organic geochemistry: Principles and applications (1st Ed.)*. Plenum Press, New York, pp. 799 – 816.
- 312.** Roberts, S. J., Smith, C. I., Millard, A., y Collins, M. J. (2002). The taphonomy of cooked bone: characterizing boiling and its physico-chemical effects. *Archaeometry*, 44(3), 485-494.
- 313.** Robin, E. D., y Wong, R. (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology*, 136(3), 507-513.
- 314.** Rodríguez, W. C., y Bass, W. M. (1985). Decomposition of buried bodies and methods that may aid in their location. *Journal of Forensic Science*, 30(3), 836-852.
- 315.** Rohland, N., y Hofreiter, M. (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, 2(7), 1756-1762.
- 316.** Romanowski, G., Lorenz, M. G., y Wackernagel, W. (1991). Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1057-1061.
- 317.** Rosen, C. J., Donahue, L. R., y Hunter, S. J. (1994). Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection. *Experimental Biology and Medicine*, 206(2), 83-102.

- 318.** Ross, A. H., y Cunningham, S. L. (2011). Time-since-death and bone weathering in a tropical environment. *Forensic Science International*, 204(1), 126-133.
- 319.** Ross, J. J. (2005). Septic arthritis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 19(4), 799-817.
- 320.** Ross, M. H. y Pawlina, W. (2010). Tejido Óseo. En: Ross, M. H., y Pawlina, W. (Eds.), *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular* (5ª Ed.). Editorial Médica Panamericana, Madrid, pp. 218 – 246.
- 321.** Rudakova, T. E., y Zaikov, G. E. (1987). Degradation of collagen and its possible applications in medicine. *Polymer Degradation and Stability*, 18(4), 271-291.
- 322.** Rychert, J., Strick, D., Bazner, S., Robinson, J., y Rosenberg, E. (2010). Detection of HIV gp120 in plasma during early HIV infection is associated with increased proinflammatory and immunoregulatory cytokines. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 26(10), 1139-1145.
- 323.** Rydén, C., Yacoub, A. I., Maxe, I., Heinegård, D., Oldberg, Å., Franzén, A., y Rubin, K. (1989). Specific binding of bone sialoprotein to *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis. *The FEBS Journal*, 184(2), 331-336.
- 324.** Sabbatani, S., y Fiorino, S. (2008). [Contribution of paleopathology to defining the pathocoenosis of infectious diseases (Part one)]. *Le Infezioni in Medicina: Rivista Periodica di Eziologia, Epidemiologia, Diagnostica, Clinica e Terapia delle Patologie Infettive*, 16(4), 236-250.
- 325.** Sachdeva, N., Rani, Y., Singh, R., y Murari, A. (2011). Estimation of post-mortem interval from the changes in vitreous biochemistry. *Journal of Indian Academy of Forensic Medicine*, 33(2), 171-174.
- 326.** Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., y Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, 9(8), 7591-7621.

- 327.** Sah, S., Chen, L., Houghton, J., Kemppainen, J., Marko, A. C., Zeigler, R., y Latham, G. J. (2013). Functional DNA quantification guides accurate next-generation sequencing mutation detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor biopsies. *Genome Medicine*, 5(8), 1.
- 328.** Salam, H. A., Shaat, E. A., Aziz, M. H. A., MoneimSheta, A. A., y Hussein, H. A. S. M. (2012). Estimation of postmortem interval using thanatochemistry and postmortem changes. *Alexandria Journal of Medicine*, 48(4), 335-344.
- 329.** Salamon, M., Tuross, N., Arensburg, B., y Weiner, S. (2005). Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13783-13788.
- 330.** Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). Chapter 2. Analysis of DNA. *En: Sambrook, J., y Russell, D. W. (Eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 82 – 86.
- 331.** Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., y Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 39-85.
- 332.** Sandison, A. T., y Tapp, E. (1998). Disease in ancient Egypt. *En: Cockburn, A., Cockburn, E., y Reyman, T. A. (Eds.), Mummies, disease and ancient cultures (2nd Ed.)*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 38 – 58.
- 333.** Santosuosso, M., Righi, E., Lindstrom, V., Leblanc, P. R., y Poznansky, M. C. (2009). HIV-1 envelope protein gp120 is present at high concentrations in secondary lymphoid organs of individuals with chronic HIV-1 infection. *Journal of Infectious Diseases*, 200(7), 1050-1053.
- 334.** Sattayasai, N. (2012). Protein purification. *Chemical Biology*, 1-18.
- 335.** Sawyer, S., Krause, J., Guschanski, K., Savolainen, V., y Pääbo, S. (2012). Temporal patterns of nucleotide misincorporations and DNA fragmentation in ancient DNA. *PLoS One*, 7(3), e34131.

- 336.** Schmidt-Schultz, T. H., y Schultz, M. (2004). Bone protects proteins over thousands of years: extraction, analysis, and interpretation of extracellular matrix proteins in archeological skeletal remains. *American Journal of Physical Anthropology*, 123(1), 30-39.
- 337.** Schreiweis, M. A., Butler, J. P., Kulkarni, N. H., Knierman, M. D., Higgs, R. E., Halladay, D. L., y Hale, J. E. (2007). A proteomic analysis of adult rat bone reveals the presence of cartilage/chondrocyte markers. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(2), 466-476.
- 338.** Schultz, M. (1996). Microscopic investigation of excavated skeletal remains: a contribution to paleopathology and forensic medicine. *En*: Haglund, W. D., y Sorg, M. H. (Eds.), *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains* (1st Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 201 – 222.
- 339.** Schultz, M. (2003). Light microscopic analysis in skeletal paleopathology. *En*: Ortner, D.J. (Ed.), *Identification of pathological conditions in human skeletal remains* (2nd Ed.). Academic Press, Amsterdam, pp. 73 – 107.
- 340.** Schwarcz, H. P., Agur, K., y Jantz, L. M. (2010). A new method for determination of postmortem interval: citrate content of bone. *Journal of Forensic Sciences*, 55(6), 1516-1522.
- 341.** Schwarz, C., Debruyne, R., Kuch, M., McNally, E., Schwarcz, H., Aubrey, A. D., Bada, J., y Poinar, H. (2009). New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic Acids Research*, 1-15.
- 342.** Schweitzer, M. H. (2004). Molecular paleontology: some current advances and problems. *Annales de Paléontologie*, 90(2), 81-102.
- 343.** Seidel, W., y Pischetsrieder, M. (1998). DNA-glycation leads to depurination by the loss of N2-carboxyethylguanine in vitro. *Cellular and Molecular Biology*, 44(7), 1165-1170.

- 344.** Seo, S. B., Zhang, A., Kim, H. Y., Yi, J. A., Lee, H. Y., Shin, D. H., y Lee, S. D. (2010). Technical note: Efficiency of total demineralization and ion-exchange column for DNA extraction from bone. *American Journal of Physical Anthropology*, *141*(1), 158-162.
- 345.** Serpersu, E. H., Shortle, D., y Mildvan, A. S. (1987). Kinetic and magnetic resonance studies of active-site mutants of staphylococcal nuclease: factors contributing to catalysis. *Biochemistry*, *26*(5), 1289-1300.
- 346.** Shahab, S., Shamsi, T. S., y Ahmed, N. (2012). Molecular involvement and prognostic importance of Fms-like tyrosine kinase 3 in acute myeloid leukemia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *13*(9), 4215-4220.
- 347.** Shean, B. S., Messinger, L., y Papworth, M. (1993). Observations of differential decomposition on sun exposed v. shaded pig carrion in coastal Washington State. *Journal of Forensic Science*, *38*(4), 938-949.
- 348.** Shimizu, S., Eguchi, Y., Kosaka, H., Kamiike, W., Matsuda, H., y Tsujimoto, Y. (1995). Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature*, *374*(6525), 811-813.
- 349.** Shokere, L. A., Holden, M. J., y Jenkins, G. R. (2009). Comparison of fluorometric and spectrophotometric DNA quantification for real-time quantitative PCR of degraded DNA. *Food Control*, *20*(4), 391-401.
- 350.** Simbolo, M., Gottardi, M., Corbo, V., Fassan, M., Mafficini, A., Malpeli, G., y Scarpa, A. (2013). DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples. *PLoS One*, *8*(6), e62692.
- 351.** Singer, V. L., Jones, L. J., Yue, S. T., y Haugland, R. P. (1997). Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Analytical Biochemistry*, *249*(2), 228-238.
- 352.** Sirotkin, K., Riggsby, W. S., Perry, W. L., y Bass, W. M. (1988). The autodegradation of deoxyribonucleic acid (DNA) in human rib bone and its

- relationship to the time interval since death. *Journal of Forensic Science*, 33(1), 144-153.
- 353.** Sledzik, P.S. (1998) Forensic taphonomy: postmortem decomposition and decay. *En: Reichs, K.J. (Ed.), Forensic osteology: Advances in the identification of human remains* (2nd Ed.). Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, pp. 109 – 119.
- 354.** Slemenda, C., Longcope, C., Peacock, M., Hui, S., y Johnston, C. C. (1996). Sex steroids, bone mass, and bone loss. A prospective study of pre-, peri-, and postmenopausal women. *Journal of Clinical Investigation*, 97(1), 14.
- 355.** Smith, A. J. H., Staden, R., y Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457-465.
- 356.** Smith, C. I., Chamberlain, A. T., Riley, M. S., Cooper, A., Stringer, C. B., y Collins, M. J. (2001). Neanderthal DNA: not just old but old and cold?. *Nature*, 410(6830), 771-772.
- 357.** Smith, C. I., Chamberlain, A. T., Riley, M. S., Stringer, C., y Collins, M. J. (2003). The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *Journal of Human Evolution*, 45(3), 203-217.
- 358.** Smith, M. R., Saad, F., Egerdie, B., Sieber, P., Tammela, T. L., Leder, B. Z., y Goessl, C. (2011). Denosumab and changes in bone turnover markers during androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(12), 2827-2833.
- 359.** Smith, P. R., y Wilson, M. T. (1990). Detection of haemoglobin in human skeletal remains by ELISA. *Journal of Archaeological Science*, 17(3), 255-268.
- 360.** Smolenski, R. T., Lachno, D. R., Ledingham, S. J. M., y Yacoub, M. H. (1990). Determination of sixteen nucleotides, nucleosides and bases using high-performance liquid chromatography and its application to the study of purine metabolism in hearts for transplantation. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 527, 414-420.

- 361.** Solano-Muñoz, F. y Lozano-Teruel, J. A. (1998). Bioquímica del Tejido Dental: Composición y Mineralización. *En*: Bascones-Martínez, A. (Ed.), *Tratado de Odontología. Tomo I* (1ª Ed.). Smithkline Beecham S. A., Trigo Ediciones S. L., Madrid, pp. 499 – 511.
- 362.** Soler, M. P., Alves, M. T. S., Silva, M. S., Guimarães, M. A., Sousa, M. L. A. P. O., Almeida, J. S., e Iwamura, E. S. M. (2011). Morphological and DNA analysis in human skeletal remains exposed to environmental conditions in Brazil. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3(1), 339-340.
- 363.** Solla, H. E., e Işcan, M. Y. (2001). Skeletal remains of Dr. Eugenio Antonio Berríos Sagredo. *Forensic Science International*, 116(2), 201-211.
- 364.** Sopher, I. M. (1972). The dentist, the forensic pathologist, and the identification of human remains. *The Journal of the American Dental Association*, 85(6), 1324-1329.
- 365.** Statheropoulos, M., Spiliopoulou, C., y Agapiou, A. (2005). A study of volatile organic compounds evolved from the decaying human body. *Forensic Science International*, 153(2), 147-155.
- 366.** Steadman, D. W., y Andersen, S. A. (2009). The Marty Miller Case: Introducing Forensic Anthropology. *En*: Steadman, D. (Ed.), *Hard evidence: case studies in forensic anthropology* (2nd Ed.). Prentice Hall, New Jersey, pp. 8 – 28.
- 367.** Stodder, A.L.W. (2008). Taphonomy and the nature of archaeological assemblages. *En*: Katzenberg, M.A., y Saunders, S.R. (Eds.), *Biological Anthropology of the Human Skeleton* (2nd Ed.). John Wiley & Sons, New Jersey, pp. 71 – 114.
- 368.** Struck, W., Waszczuk-Jankowska, M., Kaliszan, R., y Markuszewski, M. J. (2011). The state-of-the-art determination of urinary nucleosides using chromatographic techniques “hyphenated” with advanced bioinformatic methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(7), 2039-2050.

- 369.** Stryer, L. (2002). DNA, RNA, and the Flow of Genetic Information. *En:* Berg J.M, Tymoczko, J. L., y Stryer, L. (Eds.), *Biochemistry* (5th Ed.). Freeman and Company, New York, pp. 110 – 142.
- 370.** Su, Y. C., Hallström, B. M., Bernhard, S., Singh, B., y Riesbeck, K. (2013). Impact of sequence diversity in the *Moraxella catarrhalis* UspA2/UspA2H head domain on vitronectin binding and antigenic variation. *Microbes and Infection*, 15(5), 375-387.
- 371.** Suchey, J. M., Payen, L. A., Slota, P. J., y Taylor, R. E. (1989). The use of radiocarbon (¹⁴C) to identify human skeletal materials of forensic science interest. *Journal of Forensic Science*, 34(5), 1196-1205.
- 372.** Sulikowska, A., Grzesiowski, P., Sadowy, E., Fiett, J., y Hryniewicz, W. (2004). Characteristics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from the nasopharynges of asymptomatic children and molecular analysis of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* strain replacement in the nasopharynx. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), 3942-3949.
- 373.** Sun, X. M., y Cohen, G. M. (1994). Mg (2+)-dependent cleavage of DNA into kilobase pair fragments is responsible for the initial degradation of DNA in apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 269(21), 14857-14860.
- 374.** Swift, B. (1998). Dating human skeletal remains: Investigating the viability of measuring the equilibrium between ²¹⁰Po and ²¹⁰Pb as a means of estimating the post-mortem interval. *Forensic Science International*, 98(1), 119-126.
- 375.** Swift, B., Lauder, I., Black, S., y Norris, J. (2001). An estimation of the post-mortem interval in human skeletal remains: a radionuclide and trace element approach. *Forensic Science International*, 117(1), 73-87.
- 376.** Takahashi, T., Otsuguro, K., Ohta, T., e Ito, S. (2010). Adenosine and inosine release during hypoxia in the isolated spinal cord of neonatal rats. *British Journal of Pharmacology*, 161(8), 1806-1816.

- 377.** Tamm, C., Shapiro, H. S., Lipshitz, R., y Chargaff, E. (1953). Distribution density of nucleotides within a desoxyribonucleic acid chain. *Journal of Biological Chemistry*, 203(2), 673-688.
- 378.** Tanaka, E., Oikawa, H., Aita, K., Tanno, K., Yamazaki, K., y Misawa, S. (2002). No significant differences in the postmortem interval in Myanmar and Japanese using vitreous potassium levels. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, 9(2), 70-73.
- 379.** Tavazzi, B., Lazzarino, G., Leone, P., Amorini, A. M., Bellia, F., Janson, C. G., y Giardina, B. (2005). Simultaneous high performance liquid chromatographic separation of purines, pyrimidines, N-acetylated amino acids, and dicarboxylic acids for the chemical diagnosis of inborn errors of metabolism. *Clinical Biochemistry*, 38(11), 997-1008.
- 380.** Teoule, R., y Cadet, J. (1978). Effects of ionizing radiation on DNA. *En: Bertinchamps, A. J., Hüttermann, J., Köhnlein, W., Teoule, R., Ahnström, G., y Commission of the European Communities. (Eds.), Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics. Volume 27 (1st Ed.). Springer-Verlag, New York, pp. 171 – 203.*
- 381.** Tersigni-Tarrant, M. A. y Shirley, N. R. (2013). Forensic anthropology today. *En: Tersigni-Tarrant, M. A., y Shirley, N. R. (Eds.), Forensic anthropology: An introduction (1st Ed.). CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, pp. 25 – 32.*
- 382.** Tibbett, M., y Carter, D. O. (2009). Research in forensic taphonomy: a soil-based perspective. *En: Ritz, K., Dawson, L., y Miller, D. (Eds.), Criminal and environmental soil forensics (1st Ed.). Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 317 – 331.*
- 383.** Tidball-Binz, M. (2006). Forensic investigations into the missing. *En: Schmitt, A., Cunha, E., y Pineiro, J. (Eds.), Forensic anthropology and medicine: Complementary sciences from recovery to cause of death (1st Ed.). Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 383 – 407.*
- 384.** Trauger, S. A., Webb, W., y Siuzdak, G. (2002). Peptide and protein analysis with mass spectrometry. *Journal of Spectroscopy*, 16(1), 15-28.

- 385.** Trueman, C. N. (1999). Rare earth element geochemistry and taphonomy of terrestrial vertebrate assemblages. *Palaios*, 14(6), 555-568.
- 386.** Trueman, C. N., Behrensmeyer, A. K., Tuross, N., y Weiner, S. (2004). Mineralogical and compositional changes in bones exposed on soil surfaces in Amboseli National Park, Kenya: diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids. *Journal of Archaeological Science*, 31(6), 721-739.
- 387.** Trueman, C. N., y Tuross, N. (2002). Trace elements in recent and fossil bone apatite. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 48(1), 489-521.
- 388.** Tsangaras, K., y Greenwood, A. D. (2012). Museums and disease: using tissue archive and museum samples to study pathogens. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 194(1), 58-73.
- 389.** Tsokos M. (2004). Postmortem changes and artifacts occurring during the early post-mortem interval. *En: Tsokos, M. (ed.), Forensic pathology reviews. Volume 1 (1st Ed.)*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 183 – 237.
- 390.** Turner-Walker, G. (2008). The chemical and microbial degradation of bones and teeth. *En: Pinhasi, R., y Mays, S. (Eds.), Advances in human paleopathology (1st Ed.)*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 3 – 31.
- 391.** Turner-Walker, G. (2012). Early bioerosion in skeletal tissues: persistence through deep time. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie-Abhandlungen*, 265(2), 165-183.
- 392.** Turner-Walker, G., y Jans, M. (2008). Reconstructing taphonomic histories using histological analysis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 266(3), 227-235.
- 393.** Turner-Walker, G., y Syversen, U. (2002). Quantifying histological changes in archaeological bones using BSE-SEM image analysis. *Archaeometry*, 44(3), 461-468.

- 394.** Tuross, N. (1991). Recovery of bone and serum proteins from human skeletal tissue: IgG, osteonectin, and albumin. *En: Hayes, M. B. H., MacCarthy, P., Malcolm, R. L., y Swift R. S. (Eds.), Human paleopathology: Current syntheses and future options* (1st Ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., pp. 51 – 54.
- 395.** Tuross, N. (1994). The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia*, 50(6), 530-535.
- 396.** Ubelaker, D. H. (2001). Artificial radiocarbon as an indicator of recent origin of organic remains in forensic cases. *Journal of Forensic Science*, 46(6), 1285-1287.
- 397.** Ubelaker, D. H., y Houck, M. M. (2002). Using radiocarbon dating and paleontological extraction techniques in the analysis of a human skull in an unusual context. *Forensic Science Communications*, 4(4), 234.
- 398.** Valenzuela, A., Villanueva, E., Bohoyo, J. M., Exposito, N., Martin-de las Heras, S., y Marques, T. (1999). Methods for identification of 28 burn victims following a 1996 bus accident in Spain. *Journal of Forensic Science*, 44(2), 428-431.
- 399.** Valverde-Garnica, G. M. (2006). Aplicación y perspectivas del análisis molecular de ADN Antiguo (ADNa) y ADN Mitocondrial (ADNmt) en las Ciencias Forenses y la Antropología Molecular. Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. Tesis Doctoral.
- 400.** Van der Rest, M., y Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *The FASEB Journal*, 5(13), 2814-2823.
- 401.** Vass, A. A. (2001). Beyond the grave-understanding human decomposition. *Microbiology Today*, 28, 190-193.
- 402.** Vass, A. A., Barshick, S. A., Sega, G., Caton, J., Skeen, J. T., Love, J. C., y Synstelién, J. A. (2002). Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the postmortem interval. *Journal of Forensic Sciences*, 47(3), 542 – 553.

- 403.** Verhoff, M. A., Wiesbrock, U. O., y Kreutz, K. (2003). Macroscopic findings for the exclusion of a forensic relevant soil embedded resting period in skeletal remains--an approach based upon literature. *Archiv fur Kriminologie*, 213(1-2), 1-14.
- 404.** Verhoff, M. A., y Kreutz, K. (2005). Macroscopical findings on soil-embedded skeletal remains allowing the exclusion of a forensically relevant lay time. *En: Tsokos, M. (Ed.) Forensic pathology reviews. Volume 3 (1st Ed.)*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 239 – 250.
- 405.** Vij, K. (2011). Identification. *En: Vij, K. (Ed.), Textbook of forensic medicine and toxicology principles and practice (5th Ed.)*. Elsevier, New Delhi, pp. 35 – 37.
- 406.** Villanueva-Cañadas, E. (2004). 20. Data de la Muerte y otros Problemas Tanatológicos Médico-Legales. *En: Gisbert-Calabuig, J.A. (Ed.) Medicina Legal y Toxicología (6^a Ed.)*. Elsevier-Masson, Barcelona, pp. 242 – 252.
- 407.** Villanueva-Cañadas, E. y Castilla-Gonzalo, J. (2004a). 93. Identificación en el sujeto vivo. *En: Gisbert-Calabuig, J.A. (Ed.) Medicina Legal y Toxicología (6^a Ed.)*. Elsevier-Masson, Barcelona, pp. 1289 – 1299.
- 408.** Villanueva-Cañadas, E. y Castilla-Gonzalo, J. (2004b). 94. Identificación en el cadáver. *En: Gisbert-Calabuig, J.A. (Ed.) Medicina Legal y Toxicología (6^a Ed.)*. Elsevier-Masson, Barcelona, pp. 1300 – 1309.
- 409.** Virkler, K., y Lednev, I. K. (2009). Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International*, 188(1), 1-17.
- 410.** Waghmare, P. B., Chikhalkar, B. G., y Nanandkar, S. D. (2015). Establishing identity and cause of death in mutilated and unidentifiable corpses: A challenging task for medico legal expert. *Journal of Forensic Biomechanics*, 4(120), 2.
- 411.** Walker, P. R., Pandey, S., y Sikorska, M. (1995). Degradation of chromatin in apoptotic cells. *Cell Death & Differentiation*, 2(2), 97-104.

- 412.** Wang, R., Prince, J. T., y Marcotte, E. M. (2005). Mass spectrometry of the *M. smegmatis* proteome: protein expression levels correlate with function, operons, and codon bias. *Genome Research*, 15(8), 1118-1126.
- 413.** Washburn, M. P., Wolters, D., y Yates, J. R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology*, 19(3), 242-247.
- 414.** Wedl, C. (1864). Über einen im Zahnbein und Knochen keimenden Pilz. Akademie der Wissenschaften in Wien. Sitzungsberichte Naturwissenschaftliche Klasse ABI. *Mineralogie, Biologi Erdkunde*, 50(1), 171 -193.
- 415.** Weser, U., Kaup, Y., Etspüler, H., Kenward, N., y Hedges, R. E. (1996). Biochemically and immunologically active alkaline phosphatase in archaeologically important bone samples. *Journal of Archaeological Science*, 23(5), 723-730.
- 416.** Weston, D. A. (2008). Investigating the specificity of periosteal reactions in pathology museum specimens. *American Journal of Physical Anthropology*, 137(1), 48-59.
- 417.** White, T. D., Black, M. T., y Folkens, P. A. (2011). Bone biology and variation. *En: White, T.D., Black, M. T., y Folkens, P.A. (Eds.) Human Osteology (3rd Ed.)*. Academic Press, San Diego, pp. 25 – 42.
- 418.** Wibmer, C. K., Bhiman, J. N., Gray, E. S., Tumba, N., Karim, S. S. A., Williamson, C., y Moore, P. L. (2013). Viral escape from HIV-1 neutralizing antibodies drives increased plasma neutralization breadth through sequential recognition of multiple epitopes and immunotypes. *PLoS Pathogens*, 9(10), e1003738.
- 419.** Williams, M. A., Trout, R., y Spector, S. A. (2002). HIV-1 gp120 modulates the immunological function and expression of accessory and co-stimulatory molecules of monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 11(5), 829-847.
- 420.** Wopenka, B., y Pasteris, J. D. (2005). A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering: C*, 25(2), 131-143.

421. Yavropoulou, M. P., Tomos, K., Tsekmekidou, X., Anastasiou, O., Zebekakis, P., Karamouzis, M., y Yovos, J. G. (2011). Response of biochemical markers of bone turnover to oral glucose load in diseases that affect bone metabolism. *European Journal of Endocrinology*, 164(6), 1035-1041.
422. Yilmaz, M., Ozic, C., y Gok, İ. (2012). Chapter 3. Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis. *En: Magdeldin, S. (Ed.), Gel Electrophoresis: Principles and Basics* (1st Ed.). InTech. Rijeka, Croatia, pp. 33 – 40.
423. Yoshino, M., Kimijima, T., Miyasaka, S., Sato, H., y Seta, S. (1991). Microscopical study on estimation of time since death in skeletal remains. *Forensic Science International*, 49(2), 143-158.
424. Young, B. y Health, J. W. (2000). Tejidos Esqueléticos. *En: Young, B., y Health, J. W. (Eds.), Wheater's. Histología Funcional. Texto y Atlas en color* (4^a Ed.). Elsevier, Barcelona, pp. 172 – 192.
425. Yuyama, K., Yamamoto, H., Nishizaki, I., Kato, T., Sora, I., y Yamamoto, T. (2003). Caspase-independent cell death by low concentrations of nitric oxide in PC12 cells: Involvement of cytochrome C oxidase inhibition and the production of reactive oxygen species in mitochondria. *Journal of Neuroscience Research*, 73(3), 351-363.
426. Zeiss, C. J. (2003). The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Veterinary Pathology Online*, 40(5), 481-495.
427. Zhou, B., Zhang, L., Zhang, G., Zhang, X., y Jiang, X. (2007). The determination of potassium concentration in vitreous humor by low pressure ion chromatography and its application in the estimation of postmortem interval. *Journal of Chromatography B*, 852(1), 278-281.
428. Zink, A. R., Grabner, W., y Nerlich, A. G. (2005). Molecular identification of human tuberculosis in recent and historic bone tissue samples: the role of molecular techniques for the study of historic tuberculosis. *American Journal of Physical Anthropology*, 126(1), 32-47.

