



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Avances en nuevas matrices para la
determinación del intervalo postmortem

Dña. Gemma Prieto Bonete

2018



AVANCES EN NUEVAS MATRICES PARA LA DETERMINACIÓN DEL INTERVALO POSTMORTEM

Tesis internacional y por compendio de publicaciones
para optar al grado de Doctor

Presentada por:

Dña. Gemma Prieto Bonete

Dirigida por:

Prof. Dra. Dña. María Dolores Pérez-Cárceles

Prof. Dr. D. Aurelio Luna Maldonado

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Escuela Internacional de Doctorado

Murcia 2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecerles a mis directores de tesis el Dr. D. Aurelio Luna Maldonado y la Dra. Dña María Dolores Pérez Cárceles esta oportunidad de trabajar a su lado y aprender cada día un poco más, algo que me encanta. Es difícil dar con gente con tan buen corazón y tan inteligente como ellos y les agradeceré siempre el que me hayan permitido aprender a su lado y junto a ellos. Para mí son un modelo que seguir tanto profesional como personalmente, y me hacen disfrutar con lo que hago.

En especial agradecerle a la Dra. Dña María Dolores Pérez Cárceles su paciencia, sus buenas palabras siempre y su cariño, por entenderme e incentivarme cuando entro en el bucle de la curiosidad a seguir curioseando.

Al Dr. D. Aurelio Luna Maldonado agradecerle especialmente dejarme que enrede lo que quiero, que le pregunte todas mis dudas, por crearme más dudas y por enseñarme a que siempre hay que saber porque uno hace lo que hace. Por su buen humor siempre y esa alegría que transmite.

A toda la gente que me ha ayudado en este largo camino con sus interesantes y precisas aportaciones en esta tesis, como Manuel Avilés, Antonio Maurandi e Isabel Legaz.

A todos mis compañeros del departamento, por mantener durante este largo y a veces difícil camino, el buen humor, la alegría, consejos... en desayunos interminables, comidas, cenas y risas en el laboratorio. Gracias.

A Cristina, su amistad. Que hemos crecido juntas profesionalmente y a todas las risas y llantos que hemos compartido. Gracias por tus aportaciones personales y académicas.

A Lucía, por haber despertado en mí el lado investigador aventurero que la rutina de la tesis me durmió. Gracias por estar siempre ahí y escucharme.

A la gente que he conocido en esta maravillosa etapa, como a Ana, por estar siempre a mí lado y haber vivido momentos tan bonitos y felices juntas y haberme presentado a gente tan maravillosa.

A Marta por ser una de esas personas clasificadas como “difíciles de encontrar”.

A María José por ser esa amiga que conoces en el cole y que siempre ha confiado en ti. Y que antes incluso de matricularme en el doctorado ya me veía leyéndola. Gracias por las veces que me has ayuda con las traducciones y por estar ahí siempre.

A mis mejores amigos por enseñarme que cuando uno tiene unas bases sólidas en la vida, lo demás solo son anécdotas o más azúcar.

En especial a Claudia, por enseñarme desde siempre que en nuestra vida todo lo que hay es bueno y lo que tiene que venir tiene que ser igual de bueno o mejor. Y por enseñarme a ser feliz. Sin ti no sería la misma.

A Carlos, por escucharme y darme siempre sus precisos y sabios consejos. Y por soñar siempre juntos.

A los por regalarme a Carolina.

A mi familia. A mi iaia que siempre apoya todo lo que hago y a mi iaio que desde dónde esté sé que me manda energía para que sea feliz y disfrute con lo que hago. A mi tío Enrique, que siempre me ha apoyado y ayudado en todo.

Pero, en verdad, a quien quiero agradecer TODO lo que soy es a mis padres, que lo son todo para mí. Esta tesis es como sí la hubiéramos hecho entre los tres. Vosotros, mama, papá.... que me habéis enseñado a luchar por lo que uno cree y quiere, siempre, con amor, pasión y sacrificio. Gracias por dejarme volar sin límites y dejar que llegue hasta dónde quiera. Os quiero infinito.

*A mis padres, por ser el amor,
la fuerza y la energía de mi vida.*

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1. Intervalo Postmortem.....	15
2.1.1. Interés médico-legal.....	17
2.1.2. Métodos para la estimación del IPM	18
2.1.2.1. Estimación de la data de la muerte en diferentes matrices y revisión de métodos	20
2.1.3.2. Estimación de la data de la muerte en Ojo	21
2.1.3.3. Estimación de la data de la muerte en Hueso	23
2.2. El globo ocular	25
2.2.1. Generalidades del globo ocular	25
2.2.2. Estructura microscópica del ojo	27
2.2.3. El cristalino	27
A) Anatomía macroscópica.....	27
B) Anatomía microscópica.....	29
C) Tipos celulares.....	33
D) Composición química	35
2.2.1 Cuerpo Vítreo	38
2.2.2. Cambios postmortem del globo ocular	38
2.3. Tejido óseo	39
2.3.1. Generalidades del tejido óseo.....	39
2.3.2. Estructura general de los huesos.....	39
2.3.3. Células del tejido óseo.....	43

2.3.4. Matriz ósea	45
2.3.4.1. Funciones de la matriz ósea	46
2.3.4.2. Componentes de la matriz ósea	46
A) Componente mineral	46
B) Componentes de la fase orgánica u osteoide	46
Proteínas. Clasificación de los tipos de proteínas del tejido óseo....	46
I. Colágenas	47
II. No colágenas	48
III.	
2.3.5. Degradación ósea	51
2.3.5.1. Degradación de los componentes orgánicos	51
A) Degradación proteica	52
2.3.5.2. Degradación de los componentes orgánicos	54
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	57
4. MATERIAL Y MÉTODOS	63
4.1. TIPO DE ESTUDIO.....	65
4.2. OBJETIVO 1→ PRIMER ESTUDIO.....	65
4.2.1. Descripción y toma de la muestra	65
4.2.1.1. Hueso	65
4.2.2. Procedimientos experimentales	66
4.2.2.1. Extracción proteica y proteólisis	66
4.2.3. Cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas.....	67

4.2.4. Análisis de datos.....	68
4.2.5. Análisis, selección y caracterización de proteínas.....	68
4.2.6. Análisis estadístico.	69
4.3. OBJETIVO 2→ SEGUNDO ESTUDIO	70
4.3.1. Descripción y toma de la muestra	70
4.3.1.1. Cristalino	70
4.3.2. Procedimientos experimentales	70
4.3.2.1. Enucleación y medida de la esfericidad y absorbancia.....	70
4.3.3. Estudio histológico.	72
4.3.4. Análisis estadístico.....	72
4.4. OBJETIVO 3→ TERCER ESTUDIO	73
4.4.1. Descripción y toma de la muestra	73
4.4.1.1. Humor vítreo	73
4.4.2. Procedimientos experimentales	73
4.4.3. Análisis estadístico.....	74
5. RESULTADOS	75
6. APORTACIONES DE LA DOCTORANDA A CADA ARTÍCULO	81
7. PUBLICACIONES	85
8. DISCUSIÓN	89
8.1. DISCUSIÓN GENERAL.....	91
8.2. PRIMER OBJETIVO: INTERVALO POSTMORTEM.....	94
8.2.1. Las proteínas como marcadores para la estimación del IPM.....	95

8.2.2. Conservación de las proteínas tras la muerte.....	98
8.2.3. Limitaciones del estudio.....	99
8.3. SEGUNDO OBJETIVO: INTERVALO POSTMORTEM INTERMEDIO.....	101
8.3.1. Características de los cristalinos para la estimación del IPM.....	101
8.3.2. Pérdida de la transparencia.....	102
8.3.3. Descenso en la absorbancia del cristalino.....	102
8.3.4. Hallazgos morfológicos del cristalino.....	103
8.4. TERCER OBJETIVO: INTERVALO POSTMORTEM RECIENTE.....	104
8.4.1. Aplicación de los parámetros bioquímicos del humor vítreo como factores de corrección para la estimación del IPM.....	104
9. CONCLUSIONES.....	107
9. CONCLUSIONS.....	111
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso del período agónico. Adaptada de: Madea (2014). Handbook of Forensic Medicine. [Figura].....	13
Figura 2. Proceso de descomposición en función del IPM. Valores medios (barras negras) y criterios de variación en función del tiempo de la muerte. Rojo: lividez; azul: excitabilidad mecánica del músculo esquelético; amarillo: excitabilidad eléctrica; verde: rigor mortis; naranja: excitabilidad farmacológica o química; orb., orbicularis; musc., muscular. Adaptada de: Madea (2014). Handbook of Forensic Medicine. [Figura].....	15
Figura 3. Principio de determinación del tiempo desde muerte (cálculo de un valor medido a lo largo de una curva hasta volver al valor inicial). Adaptada de: Madea (2014). Handbook of Forensic Medicine. [Figura].....	16
Figura 4. Figura 4. Esquema del globo ocular, morfología y sus partes. Adaptada de: Eynard (2011). Histología e Embriología Humanas: Bases Celulares e Moleculares. [Figura].....	27
Figura 5. Capas del cristalino adulto.	29
Figura 6. Imagen del cristalino, su morfología y sus partes. Adaptada de: Kierszenbaum (2008). Histiología y biología celular: introducción a la anatomía patológica. [Figura].....	30
Figura 7. Disposición de las células y fibras del cristalino. Adaptada de: Ross y Pawlina (2015). Histología: texto y atlas: correlación con biología celular y molecular. [Figura].....	32
Figura 8. Reconstrucción tridimensional de un hueso largo, mostrando la parte compacta y la parte esponjosa.....	40
Figura 9. Diagrama de un bloque de hueso compacto. Adaptada de: Ross y Pawlina (2015). Histología: texto y atlas: correlación con biología celular y molecular. [Figura].....	41

Figura 10. Representación de los componentes de un hueso adulto en un segmento transversal de la diáfisis. Adaptada de: Eynard (2010). Histología y Embriología humanas. [Figura].....	42
Figura 11. . Estructura de un hueso largo. Adaptada de: Ross y Pawlina (2015). Histología: texto y atlas: correlación con biología celular y molecular. [Figura].....	43
Figura 12. Diagrama de una unidad de remodelado óseo. Adaptada de: Ross y Pawlina (2015). Histología: texto y atlas: correlación con biología celular y molecular. [Figura].....	44
Figura 13. Esquema de la descomposición de proteínas postmortem. Adaptada de: Ioan y cols., (2017). The Chemistry Decomposition in Human Corpses. REVISTA DE CHIMIE, 68(6), 1352-1356. [Figura].....	52
Figura 14. Esquema de la descomposición de sulfuro-amino ácidos. Adaptada de: Ioan y cols., (2017). The Chemistry Decomposition in Human Corpses. REVISTA DE CHIMIE, 68(6), 1352-1356. [Figura].....	53
Figura 15. Esquema del proceso de nitrificación y desnitrificación. Adaptada de: Ioan y cols., (2017). The Chemistry Decomposition in Human Corpses. REVISTA DE CHIMIE, 68(6), 1352-1356. [Figura]	53
Figura 16. Esquema de la extracción y proteólisis de proteínas en hueso	67
Figura 17. Cubeta diseñada atendiendo a la estructura y dimensiones del cristalino. Es una cubeta de plástico normal, a la que se le han quitado dos de las cuatro caras y se le ha añadido una base de plastilina donde se ha fijado el material plástico en forma de pinza con una abertura en medio de 0,5 mm donde la lente queda sujeta pinzada por sus laterales y queda despejado su centro por donde inciden los rayos de luz en la lente y donde se realiza la medición de la absorbancia.	71
Figura 18. Esquema de la medición de los diámetros mayor y menor para la esfericidad.	72

RELACIÓN DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

IPM	Intervalo postmortem
BOE	Boletín Oficial del Estado
RD	Real Decreto
UV	Ultravioleta visible
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EPR	Epitelio pigmentario de la tégina
BMP	Proteína morfogénica ósea
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
IGF	Factor de crecimiento insulínico
TFG-beta	Factor de crecimiento transformante beta
HA	Hidroxiapatita
MEC	Matriz extracelular
MB	Membrana basal
kD	kiloDaltons
RGD	tripéptido Arg-Gly-Asp
MAP	Proteína quinasas activada por mitógenos
hpm	horas postmortem
ARN	Ácido ribonucleico
PBS	Tampón fosfato
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	high performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta eficacia)
HPLC-MS/MS	Cromatografía de alta resolución con detector masas-masas

ESI	Fuente de ionización electrospray
MS	masas
CID	Colisión con helio
MS/MS	masas-masas
LC/MSD	Cromatografía líquida con detector masas selectivo
PG	Proteoglicano
MCA	Análisis de correspondencia múltiple
H-E	Hematoxilina-Eosina
SD	Desviación estándar
OP	Presión osmótica
PCA	Análisis de componente principal
COL1A1	Colágeno alfa 1
AHSG	Fetuina-A

1.RESUMEN

La estimación del intervalo postmortem es uno de los problemas más complejo de resolver en las ciencias forenses y tiene grandes repercusiones en el ámbito legal y penal en España. En España, según la ley, 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. Los procedimientos para la estimación del intervalo postmortem contemplados en la ley que se llevan a cabo en una autopsia, se centran en una estimación en restos de data temprana. Las condiciones del sujeto, el estado del cuerpo y la escasez de procedimientos para restos en estados avanzados de descomposición dificulta el cálculo del intervalo postmortem. Algunos de los métodos empleados actualmente están ampliamente discutidos debido a que se basan en cambios de componentes del cuerpo en determinadas matrices que pueden verse alteradas por el mismo proceso de morir, las condiciones previas de la muerte del sujeto y el proceso agónico sufrido ofreciendo por tanto una estimación o cálculo erróneo del intervalo postmortem.

El objetivo de esta tesis es analizar diferentes parámetros en cristalino y humor vítreo, en cuanto a un intervalo postmortem reciente y huesos para un intervalo tardío, con el fin de mejorar la estimación de la muerte en ambos intervalos postmortem.

Para realizar este estudio hemos analizado con un intervalo temprano, los cambios histológicos y morfológicos de 40 cristalinos de conejo entre 24-96 horas postmortem y con el fin de encontrar un factor de corrección para la estimación del intervalo postmortem hemos analizado los electrolitos de 298 humor vítreos procedentes de 298 autopsias con un intervalo de 19.9 ± 13.31 horas postmortem. En un intervalo tardío de descomposición (5 y 20 años postmortem) hemos analizado y estudiado las proteínas de 40 fémures humanos con el fin de establecer un perfil proteico en función del intervalo postmortem para poder ofrecer una nueva herramienta complementaria en la estimación del intervalo postmortem, complementaría a las técnicas actuales.

De los resultados obtenidos de los tres estudios, podemos destacar que entre las 24-96 horas postmortem hemos observado que la absorbancia, la esfericidad y las principales estructuras del cristalino, como sus fibras, el epitelio, las fibras del córtex y del núcleo de los cristalinos se van perdiendo a lo largo del intervalo postmortem. Son las proteínas cristalinas del cristalino las que juegan un papel fundamental en la opacificación y en la pérdida de la estructura del cristalino tras la muerte, siendo una herramienta complementaria en la estimación de la data de la muerte. En cuanto al

humor vítreo, tras realizar un análisis estadístico y ver qué elementos no mostraban cambios con respecto al intervalo postmortem, hemos observado que los elementos que junto con el potasio, ofrecen unos resultados con una mejor aproximación del intervalo postmortem, son el sodio en muertes naturales y sodio o cloro en el caso de muertes violentas.

Por otro lado, en un intervalo tardío, el hueso es una caja negra que alberga en buen estado de conservación, numerosas moléculas biológicas, entre ellas las proteínas. De las proteínas estudiadas en los 40 fémures hemos observado que entre las proteínas que nos ayudan a discriminar entre huesos menores o mayores de 12 años postmortem, encontramos un 75% de proteínas estructurales y un 25 % de proteínas funcionales

De estos resultados, podemos concluir que las condiciones previas a la muerte suponen una limitación en la estimación del intervalo postmortem debido a las alteraciones que producen en la diferentes matrices biológica ofreciendo resultados erróneos en la estimación de la data muerte, con importantes repercusiones legales. Por otro lado y debido a la complejidad y la gran cantidad de factores, tanto en la metodología de las técnicas como en las condiciones previas del sujeto, de la muerte y del proceso mismo de la muerte, la estimación de la data de la muerte debe hacerse empleando diversas pruebas en diferentes matrices.

Atendiendo a nuestros resultados, en un intervalo temprano, la absorbancia y transparencia de los cristalinos y los factores de corrección identificados en humor vítreo junto a la determinación de la concentración del potasio en humor vítreo, pueden ser una prueba complementaria para ofrecer una mejor aproximación del intervalo postmortem.

En cuanto a data tardía, el estudio del perfil proteico en hueso puede ayudar a discriminar entre huesos de diversas datas atendiendo a los tipos de proteínas encontradas en esos restos.

Actualmente existe la necesidad de desarrollar nuevas técnicas y procedimientos tanto en estados tempranos de descomposición, como tardíos, que nos permitan en unos casos mejorar la estimación de la data de la muerte y en otros, como en el caso de restos en avanzado estado de descomposición, de poder ofrecer una herramienta para el establecimiento del intervalo postmortem.

Resumen

Palabras clave: Estimación data de la muerte; intervalo postmortem; data temprana; data tardía; cristalino; humor vítreo; hueso; perfil proteico; transparencia; factores de corrección.

1.ABSTRACT

Postmortem interval estimation is one of the most complex problems to solve in the forensic sciences and has great repercussions in the legal and criminal ambit in Spain. In Spain, according to the law, crimes expire at 20 years, when the maximum penalty prescribed for the offense is imprisonment of 15 years or more and does not constitute a crime against humanity and genocide or a crime against persons and property protected in case of armed conflict. The procedures that are carried out in an autopsy contemplated in the law, for the estimation of the postmortem interval, focus on an estimation in remains of early data and the scarcity of procedures for remains in advanced stages of decomposition makes it difficult to calculate them in postmortem intervals late. Some of the methods used today are widely discussed because they are based on changes in body components of certain matrices that can be altered by the same process of dying, the pre-conditions of the death of the subject and the agonizing process suffered.

The aim of this doctoral thesis is to analyze different parameters in different matrices, both of early and late data in order to improve the postmortem interval estimation in both data intervals.

To carry out this study, we analyzed the histological and morphological changes of 40 rabbit lens with rely to the date of early death, and analyzed the 298 vitreous humor from 298 autopsies, in order to find a correction factor for the improvement of the estimation of death data. In late data we have used bones, since it is the most common human rest found in corpses of advanced state of decomposition. We have studied the proteins of 40 human femurs in order to establish a protein profile between these proteins and the data of death, in order to offer a new tool that would complement the current techniques for the estimation of death data.

From the results obtained from the three studies, we can point out in early data that crystalline proteins play a fundamental role in the opacification of the lens after death and it can offer a complementary tool in the estimation of death data. As for the vitreous humor, we have observed that the elements that together with potassium, offer results with less error in the estimation of the death data, are sodium in natural deaths and it would be the same to use sodium and chlorine in the case of violent deaths.

On the other hand, in a late interval, the bone is a good reservoir of numerous biological molecules, including proteins, that both their presence and their absence, can help us to offer an approximate date of death, due to its degree of conservation.

From these results, we can conclude that the conditions prior to death can produce alterations in the matrices that are later analyzed offering erroneous results in the estimation of the death data, with important legal repercussions. On the other hand, due to the complexity and the large number of factors, both in the methodology of the techniques and in the previous conditions of the subject, death and the very process of death, the estimate of the death date must be done using different tests in different matrices.

Based on our results, the elements that we have studied that can serve as correction factors, can be used together with the determination of the potassium concentration of the vitreous, a complementary test that mitigates the factors that can alter potassium.

The analysis of lens opacity can complement other techniques and help estimate the death data. As well as establishing a protein profile of the different data of death in late data, they can serve as a complementary technique in estimating the data of death in skeletal remains.

Key words: Estimation dates from death; postmortem interval; early data; late data, lens, vitreous humor; bone; protein profile; electrolytes; correction factors.

2.INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

La muerte hay que entenderla como un proceso que dependiendo de la intensidad y cualidad de la agresión que la desencadena, tendrá una duración diferente, pero que está constituido por una sucesión evolutiva de fases de desestructuración progresiva del funcionamiento integrado del organismo como unidad biológica. Estas fases no van a estar definidas claramente en sus límites, sino que se solapan entre sí, sin solución de continuidad, por lo que no se puede precisar cuando acaba una fase y comienza otra. La muerte y la agonía son procesos caracterizados por la pérdida de la función de los grandes sistemas de órganos (sistema cardiovascular, respiratorio sistema, sistema nervioso) y su coordinación. El período agónico puede ser iniciado por enfermedad o trauma y en algunos casos puede no existir. La crisis final conduce a un estado de vida mínimo en el que no se aprecian signos vitales y a un estado de muerte caracterizado por el cese irreversible de circulación o paro respiratorio (Figura 1) (Hostiuc, 2017; Madea, 2014).

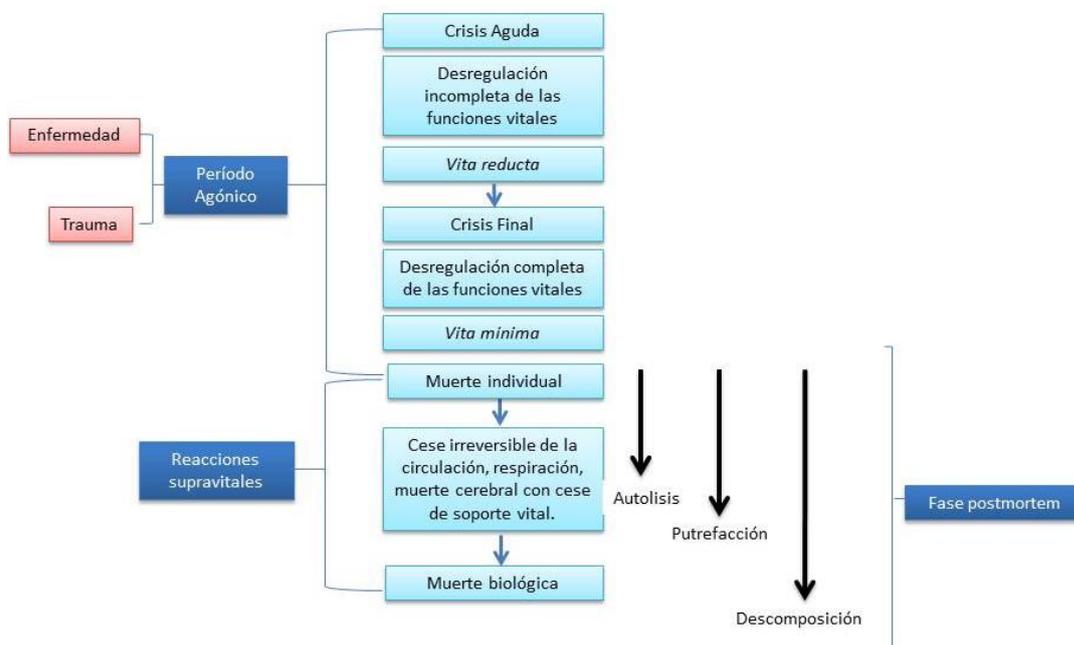


Figura 1. Esquema del proceso del período agónico. Adaptada de: Madea (2014). Handbook of Forensic Medicine. [Figura]

En cuanto a la muerte, podemos distinguir dos tipos: la muerte celular y la muerte somática. La muerte somática es cuando una persona está inconsciente y no puede iniciar un movimiento voluntario o responder a estímulos sensoriales y ser consciente de su entorno. La muerte somática es equiparada con la muerte cerebral,

las funciones circulatorias y respiratorias continúan, de forma natural o artificial, asegurando que los tejidos y las células del cuerpo permanecen vivos y en funcionamiento (Saukko y Knight, 2015). Pero cuando falla la función cardiorespiratoria, se produce la muerte celular, donde los tejidos y las células ya no funcionan y carecen de actividad metabólica, conocido como cese irreversible de la circulación sanguínea (Tsokos y cols., 2001). La muerte celular es el proceso usado para describir los cambios y la química de la descomposición postmortem. Sin embargo, el metabolismo de los tejidos no cesa de forma inmediata tras la muerte, continua durante un número de horas, siendo en el periodo temprano tras la muerte, la reacción creatinina-kinasa de la glicolisis anaerobia, el principal productor de energía.

Por tanto, tras la muerte suceden de forma continuada en el cuerpo una serie de cambios físicos, químicos y biológicos que tienen patrones predecibles y que se pueden clasificar de diversas formas. Normalmente hay 4 etapas en el proceso de descomposición, que son colorativa o cromática, enfisematosa o de desarrollo gaseoso, colicuativo o de licuefacción y de reducción esquelética (Unluturk y Sahin, 2017; Villanueva Cañadas y Gisbert Calabuig, 2004), por lo que diferenciaremos entre cambios postmortem tempranos y tardíos (Zapico y cols., 2014).

Los cambios postmortem tempranos son los que suceden de forma inmediata tras el cese de la función respiratoria y pulmonar. Dentro de este período se puede observar (Figura 2):

- Procesos físicos: la hipostasis visceral, *livor mortis* (livideces cadavéricas) y *algor mortis* o enfriamiento cadavérico (período de equilibrio térmico, hipertermia postmortem).
- Procesos físico-químicos: el *rigor mortis* (rigidez y espasmo cadavéricos) y la deshidratación cadavérica (pérdida de peso, apergaminamiento cutáneo, desecación de las mucosas, fenómenos oculares).
- Procesos metabólicos: supravitalidad (excitabilidad mecánica de los músculos, excitabilidad eléctrica de los músculos esqueléticos, excitabilidad farmacológica del iris).

Una vez superado este período se producen los fenómenos tardíos que se dividen en destructores y conservadores:

- Fenómenos destructores: la autólisis, (alteraciones en los tejidos y órganos) y la putrefacción, siendo la última etapa, la esqueletización (Madea, 2016; Madea, 2014; Villanueva Cañadas y Gisbert Calabuig, 2004).

Introducción

- Fenómenos tardíos de conservación mediante los cuales el cuerpo mantiene un estado de preservación, y que se producen en función de las condiciones del cuerpo y de las condiciones ambientales donde se halle, como la momificación, adipocira y congelación.

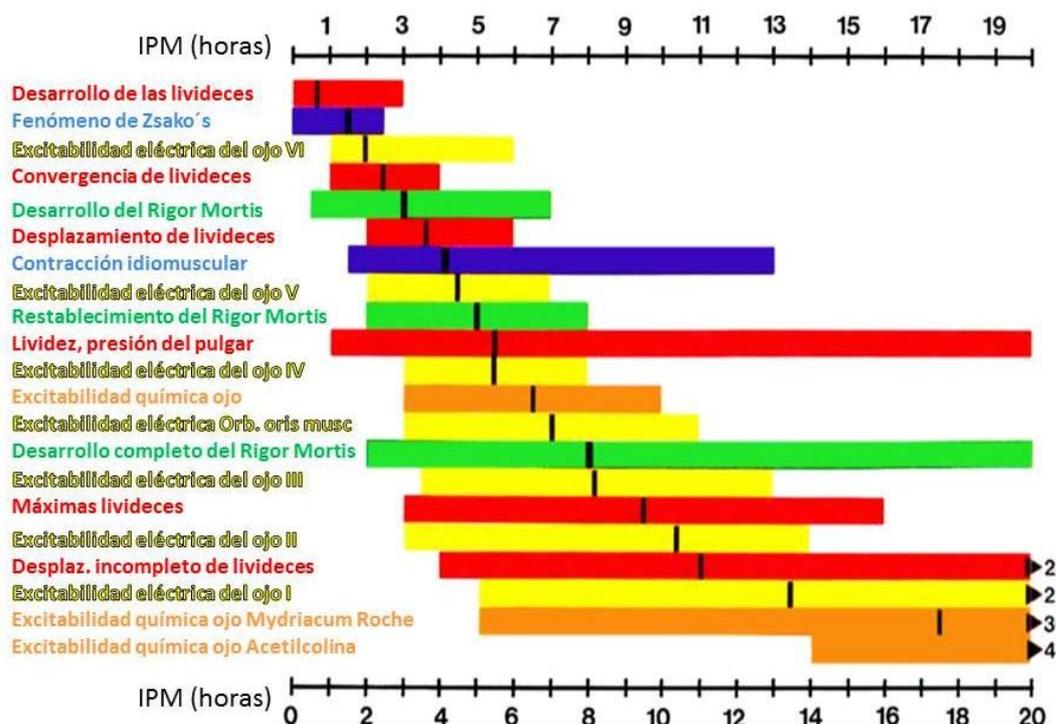


Figura 2. Proceso de descomposición en función del IPM. Valores medios (barras negras) y criterios de variación en función del tiempo de la muerte. Rojo: lividez; azul: excitabilidad mecánica del músculo esquelético; amarillo: excitabilidad eléctrica; verde: rigor mortis; naranja: excitabilidad farmacológica o química; orb., orbicularis; musc., muscular. Adaptada de: Madea (2014). Handbook of Forensic Medicine. [Figura]

2.1. INTERVALO POSTMORTEM

En el Real Decreto 32/2009, de 16 de enero, (BOE» núm. 32, de 6 de febrero de 2009, Sección I. Disposiciones generales) por el que se aprueba el Protocolo nacional de actuación Médico-Forense y de Policía Científica en sucesos con víctimas múltiples, en el Capítulo II, Sección 3.^a Fase de tratamiento de cadáveres y restos humanos, establece en el Artículo 8 de actuaciones básicas, que la actuación de los médicos forenses se centrarán en 2º lugar en su procedimiento en la estimación de la data de la muerte.

El intervalo postmortem (IPM) es uno de los problemas más complejos de resolver en las Ciencias Forenses y en la Medicina Legal. Las características del fallecimiento y su intervalo postmortem serán más o menos precisas en función de las técnicas que se empleen para el establecimiento de la data (Maldonado, 2010). En términos

legales, precisar el momento exacto de la muerte puede suponer el éxito o el fracaso en la resolución de un posible delito y muchas de las investigaciones que se llevan a cabo en las ciencias forenses versan sobre la estimación de la data de la muerte (Villanueva Cañadas y Gisbert Calabuig, 2004).

El principal fundamento en la estimación del tiempo transcurrido desde la muerte es el cálculo de una fecha a través de una curva dependiente del tiempo hasta llegar al punto inicial o al momento de la muerte. Algunas características de esta curva, como la pendiente y el punto de partida se ven afectados por factores internos, externos, condiciones antemortem y postmortem del cuerpo y del medio donde es hallado. Debido a esto, la estimación nos proporciona un rango de tiempo, pero difícilmente nos dice un punto o momento exacto (Figura 3).

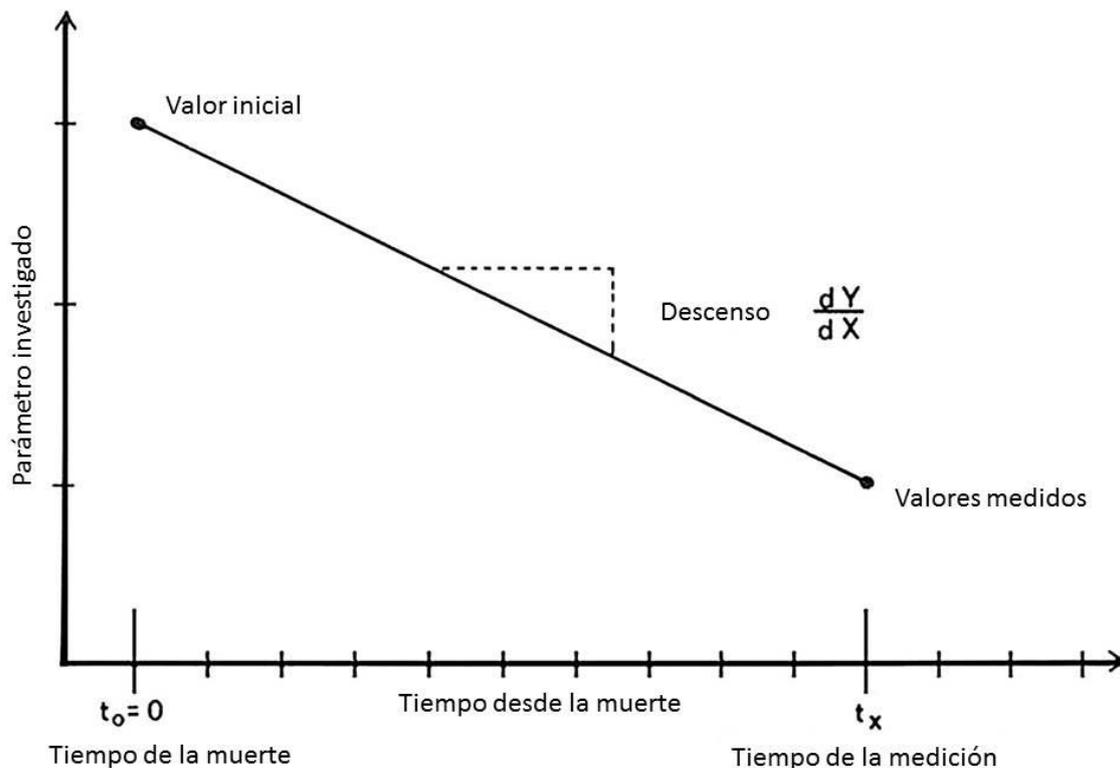


Figura 3. Principio de determinación del tiempo desde muerte (cálculo de un valor medido a lo largo de una curva hasta volver al valor inicial). Adaptada de: Madea (2014). Handbook of Forensic Medicine. [Figura]

Podemos diferenciar, a grandes rasgos, dos objetivos principales en la estimación de la data de la muerte, uno de ellos es qué cambios premortem, fisiológicos o patológicos se pueden detectar y permiten junto con otras investigaciones conocer el momento de la muerte. El segundo objetivo se basa en el

estudio de los cambios progresivos que se producen tras la muerte para estimar el momento de la misma. Generalmente, es necesario la combinación de ambos objetivos para poder estimar de forma más aproximada el momento de la muerte.

2.1.1. Interés médico-legal

La estimación del intervalo postmortem es un objetivo importante en las ciencias Forenses siendo importante en casos criminales y civiles. Desde el punto de vista del derecho penal, una estimación precisa de IPM ayuda a establecer la hora del crimen, verificar las declaraciones de los testigos, limitar el número de sospechosos y evaluar sus declaraciones. También es de crucial importancia para los investigadores forenses, especialmente cuando están reuniendo evidencia que puede apoyar o negar las acciones declaradas de los sospechosos en un presunto delito (Salam y cols., 2012).

Los problemas médico-legales que se plantean en este campo responden fundamentalmente a tres cuestiones: realizar el diagnóstico de muerte, efectuar el diagnóstico individual o la causa de la muerte y establecer la data de la muerte (Villanueva Cañadas y Gisbert Calabuig, 2004).

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. Cuando 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.

2.1.2. Métodos para la estimación del IPM

Actualmente, a nivel práctico, el método que se emplea en una autopsia para la estimación del intervalo postmortem, en conjunto con otros, cuando se cumplen todos los criterios, por su grado de precisión y confianza, es el nomograma de Henssge (Matuszewski, 2017). Este método se basa en el enfriamiento del cuerpo tras la muerte y requiere de la medición de la temperatura rectal, la temperatura ambiental y su media, la estimación de la masa corporal y su factor de corrección, por lo que se aplica cuando el cuerpo se encuentra en un IPM temprano.

Además del nomograma de Henssge, los métodos complementarios que se emplean junto con este método, siguen un criterio dependiente del tiempo, como el rigor mortis (comienzo, máximo, restablecimiento); la hipóstasis (comienzo, confluencia, máximo, desaparición); la presión del pulgar (completo/incompleto); la excitabilidad eléctrica de los músculos faciales (m. orbiculares oculi con seis grados, m. orbicularis oris); la excitabilidad mecánica de los músculos del cuerpo (almohadilla idiomuscular); y la excitabilidad farmacológica del iris.

Debemos diferenciar entre método y parámetro para poder entender mejor las nuevas investigaciones que se llevan a cabo sobre la estimación de la data de la muerte. Son varios los parámetros o elementos utilizados para estimar el tiempo desde la muerte y son de naturaleza completamente diferente, pudiendo clasificarse (Madea, 2016) en:

- Procesos físicos: enfriamiento cadavérico, livideces cadavéricas
- Datación con radiocarbono, hipostasis
- Procesos físicoquímicos: rigor mortis, supravitalidad de los musculos esqueléticos
- Procesos bacterianos: putrefacción
- Métodos químicos: basados en procesos metabólicos, autolisis y difusión en función del gradiente de concentración
- Entomología forense

Los métodos o procedimientos usados para la estimación de la data de la muerte difieren no solo en su naturaleza sino también en su valor científico y en la cantidad de validación, mientras unos métodos se basan en medidas cuantitativas con descripciones matemáticas, otros se apoyan en la clasificación subjetiva de los cambios postmortem, basándose la mayoría de ellos en datos empíricos y no en datos estadísticos (Madea, 2016; Madea, 2014). Los métodos con mayor valor probatorio

Introducción

son métodos que se basan en estudios longitudinales sobre muestras bien caracterizadas, descripciones matemáticas de los cambios postmortem, datos claros sobre la precisión del tiempo estimado de muerte, la alta precisión del intervalo postmortem comprobado con controles independientes y estudios de estudios de campo sobre la aplicabilidad del método en la práctica.

Los métodos que se emplean actualmente se pueden dividir en 5 categorías en función del tipo de medida, de la descripción de los cambios postmortem, los factores que influyen, y la precisión de la estimación y su valor probatorio (Hostiuc y cols. 2017; Madea, 2005):

1. Medición cuantitativa, descripción matemática teniendo en cuenta los factores de influencia cuantitativa, declaración de precisión, prueba de precisión del material independiente. Ejemplos: enfriamiento corporal (método del nomograma) y potasio en humor vítreo (VH). Todos los analitos de importancia tanatocronológica también están incluidos en esta categoría. Debería haber una medición cuantitativa del analito, una descripción matemática durante el cambio post mortem, y tener en cuenta de forma cuantitativa factores influyentes, como la temperatura.
2. Descripción subjetiva (calificación), considerando factores influyentes, declaración de precisión, prueba de precisión del material independiente. Ejemplo: reacciones supravitales.
3. Descripción subjetiva de los cambios postmortem, factores conocidos que influyen, estimaciones empíricas en lugar de valores de referencia evaluados estadísticamente Ejemplos: rigor mortis, lividez.
4. Descripción subjetiva, conclusiones análogas basadas en empirismo y suposiciones en lugar de valores referenciados evaluados estadísticamente. Ejemplo: contenido gástrico.
5. Descripción subjetiva, velocidad de progresión de los cambios postmortem dependientes completamente de factores ambientales; debido al amplio espectro de factores ambientales sin estimación empírica posible. Ejemplo: putrefacción.

Además, existen métodos químicos que se emplean para la estimación de la data de la muerte actualmente y que se basan en los siguientes principios:

1. Autólisis con ruptura de membranas celulares y difusión debido al gradiente de difusión según la ley de difusión de Fick. Cuanto mayor sea el gradiente de

concentración, más adecuado es el analito para la estimación del tiempo desde la muerte, dependiendo del volumen de distribución.

2. Dado que los procesos metabólicos no cesan de inmediato los productos del metabolismo después de la muerte pueden ser investigados (lactato, hipoxantina (Hx)).
3. Productos del metabolismo bacteriano (aumento de aminoácidos).
4. Productos de descomposición de proteínas (disminución).

Los patólogos forenses son conscientes de la dificultad y las limitaciones que hay en la estimación del tiempo de la muerte. A pesar de la gran cantidad de investigaciones en este tema, siendo la mayoría de difícil aplicación en la práctica, muchos autores han llegado a la conclusión de que el momento de la muerte solo puede ser estimado dentro de ciertos límites de probabilidad (Madea, 2016).

2.1.2.1. Estimación de la data de la muerte en diferentes matrices y revisión de métodos

Desde hace décadas los investigadores han estudiado los cambios sobre la composición corporal tras la muerte para caracterizar diferentes fases de la descomposición dentro del intervalo post mortem (IPM). Las primeras alteraciones después de la muerte incluyen el desarrollo de la rigidez y relajación de los músculos, la sedimentación de hemoderivados en las partes inferiores del cuerpo y el ajuste del cuerpo a la temperatura ambiental. La temperatura es el marcador líder después de muchos años de investigaciones y limitaciones (Sabucedo y Furton, 2003). Aunque estos métodos se aplican para delimitar el IPM en el trabajo forense cotidiano, todavía hay grandes imprecisiones y limitaciones en muchos casos.

A partir de las 72 horas postmortem, es la entomología forense la única información valiosa sobre el tiempo transcurrido desde la muerte. Sin embargo, este método es altamente dependiente de la fauna local, las condiciones climáticas (estacionales) y la exposición del cuerpo. Otros métodos más elaborados en las fases postmortem posteriores son medidas colorimétricas de la pulpa dental y análisis de bacterias abdominales y superficiales (Al-Shareef y Zaki, 2017).

La determinación del período de tiempo transcurrido entre la muerte y la recuperación de restos forenses relevantes ha sido un tema clave en las ciencias forenses. Existen métodos bien establecidos para determinar el IPM para cadáveres

que se encuentran en un período postmortem temprano, especialmente antes de que comience la descomposición de los tejidos blandos. Si bien todavía están influenciados por factores ambientales y tafonómicos, estos métodos han sido ampliamente probados. La determinación del IPM se vuelve más difícil cuanto más largo es el período post-mortem del cadáver, y más avanzado es el estado de descomposición de los restos.

Existe una falta de procedimientos fiables para la determinación del IPM en la fase intermedia, es decir, entre las 24 horas y 7 días postmortem (Pittner y cols., 2016a), aunque se han llevado a cabo investigaciones considerables para estimar el IPM de los restos durante las etapas de descomposición tempranas cuando el tejido blando está, al menos, todavía parcialmente presente. La mayoría de las técnicas existentes se centran en la estimación en data temprana (Vass y cols., 1992). Por otro lado, en la data tardía, se realizan estudios antropológicos sobre restos óseos, generalmente con fines identificativos, ya que en este periodo es donde más dificultad encontramos para estimar la data de la muerte.

2.1.3.2. Estimación de la data de la muerte en Ojo

El globo ocular es una matriz que ha atraído la atención de muchas investigaciones forenses, sin embargo, los cambios postmortem en los ojos no se han estudiado lo suficiente en la literatura para la estimación del intervalo postmortem.

La técnica que se emplea actualmente para la estimación de la muerte en el globo ocular, se realiza en el humor vítreo, que es una de las matrices que por ley (Orden JUS/1291/2010, de 13 de mayo, Capítulo II, artículo 11) se puede emplear para estudios toxicológicos, y se basa en la medición de la concentración de potasio (Coe 1989; Madea, 1989; Adjuntantis y Coutselinis, 1972; Coe, 1969; Stuenkel, 1963) e hipoxantina (Muñoz-Barus y cols., 2010; Munoz y cols., 2006; Madea y Rodig, 2006; Madea y Lachenmeier, 2005; Barús y cols., 2002; James y cols., 1997; Madea y cols., 1994), aunque pocas veces es usado en la práctica y tomada como evidencia (Materazzi y cols., 2017; Madea, 2016). El humor vítreo es de creciente interés (Madea, 2006; Madea, 2005; Madea, 1994; Coe, 1989; Coe, 1969; Coe y Apple, 1985) en la química forense como un fluido estable en el período postmortem como consecuencia de su localización y de la fácil recolección de la muestra, haciendo que esta matriz sea un medio muy investigado para la estimación de la data de la muerte (Materazzi y cols., 2017). El humor vítreo se ha utilizado durante varias décadas y presenta algunas ventajas en comparación con otros fluidos corporales, ya que tiene

una difusión decelerada, apenas sufre contaminación por los procesos postmortem y sufre menor degradación bacteriana (Júnior y cols., 2014).

A pesar de su uso en las rutinas forenses, sigue habiendo numerosas investigaciones que se centran en establecer una ecuación que permita junto con la concentración del potasio, estimar la data de la muerte (Zilg y cols., 2015; Siddamsetty y cols., 2014; Mihailovic y cols., 2012; Bortolotti cols., 2011; Jashnani y cols., 2010; Zhou y cols., 2007; Muñoz y cols., 2001; James y cols., 1997; Madea y cols., 1989; Stephens y Richards, 1987; ; Coe, 1989; Hansson, 1966; Sturner y Ganter, 1964; Adelson y cols. 1963), ya que existe numerosas investigaciones con resultados contradictorios sobre la modificación de la concentración de estos analitos debido a las condiciones premortem del individuo y del tipo de fallecimiento y también hay serias dudas sobre su estabilidad. Hay numerosos estudios que se centran en la variación de la concentración en otros elementos del humor vítreo (Tatiya y cols., 2017) para la estimación de la data de la muerte, como en el hierro (García y cols., 2017), urea (Madea, 2016), hipoxantina (Go y cols., 2017), sodio, cloro, amonio, ácido láctico y en función de la temperatura (Yang y cols., 2017), el sexo, la edad (Agoro, 2017) o entre el ojo derecho e izquierdo tras la muerte (Tatiya cols., 2017). También se han considerado técnicas analíticas alternativas para determinar modificaciones importantes de los componentes químicos, como la fluorescencia óptica y técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) (Materazzi y cols., 2017).

A pesar de todos los avances realizados en esta matriz, se reconoce la falta de estandarización de metodologías y de instrumentaciones que pueden conducir a la obtención de diferentes concentraciones de potasio, por lo tanto, una estimación diferente del IPM correcto (Materazzi y cols., 2017).

Además del humor vítreo, otros autores como Lynnerup y cols. (2008) han estudiado las proteínas del cristalino con radiocarbono para tratar de estimar la data de la muerte. Otros autores se han centrado en la córnea, estudiando cambios de la opacidad y transparencia postmortem (Salam y cols., 2012; Balci y cols., 2010; Kumar y cols., 2008; Fang y cols., 2007; Honjyo y cols., 2005; Jaafar y Nokes, 1994; Tsunenari y Kanda, 1977; Aoki, 1965). Por otro lado, Kumar y cols., (2008) clasificaron la transparencia de la córnea en seis niveles y los asociaron con el tiempo transcurrido después de la muerte. Sin embargo, estas investigaciones dependen de observaciones personales, siendo muy subjetivas, por lo que sigue siendo necesario mediciones cuantitativas a través de los métodos de procesamiento de imágenes que pocos han llevado a cabo. Algunos investigadores como Li y cols., (2013); Zhu y cols.,

(2008); Song y Shi, (2001); también han estudiado diferentes parámetros corneales, como el grosor de la córnea para estimar el momento de la muerte. Liu y cols., (2008), analizaron los cambios post mortem de una córnea de conejo a través de técnicas de procesamiento de imágenes.

2.1.3.3. Estimación de la data de la muerte en Hueso

Los huesos son una matriz que actúa como una caja negra almacenando información muy valiosa al ser compuestos biomecánicos extremadamente complejos que están formados por materia orgánica e inorgánica (Creagh y Cameron, 2017).

Está bien establecido en la literatura que la determinación a partir de los restos óseos es necesaria para las investigaciones médico-legales, aunque a menudo es una tarea difícil de lograr (Vass y cols., 1992). Los restos encontrados pueden tener interés histórico, arqueológico o interés forense en función del tiempo que haya pasado tras la muerte, por tanto, es muy importante conocer el IPM (Sterzik y cols., 2016).

Para un antropólogo forense el tiempo de la muerte de un resto óseo es una de las preguntas más difíciles de responder debido a la ausencia de métodos para evaluar el IPM en huesos y a la escasez de conocimiento que hay sobre los cambios que éstos sufren en relación a las diversas etapas del IPM (Wilson y Christensen, 2017), siendo también muy difícil simplemente diferenciar entre huesos de menor data o de mayor data teniendo “relevancia forense” o no, lo que tiene implicaciones importantes para procedimientos legales (Schultz, 2012; Cattaneo, 2007).

El intervalo de tiempo para que los restos esqueléticos sean de relevancia forense difiere según los países (Swift, 2006). En España según 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. Sin embargo, en la literatura publicada desde 1950 el criterio general utilizado se reduce a

los restos que se clasificaron como "relevantes desde el punto de vista forense" según varios autores (Capella y cols., 2015; Ubelaker y cols., 2006; Ubelaker, 2001; Wild y cols., 2000; Introna y cols., 1999; Taylor y cols., 1989;).

Los primeros intentos de estimar el IPM a partir de restos esqueléticos fueron realizados por Knight (1969) y Knight y Lauder (1967) que informaron sobre una serie de técnicas utilizadas para intentar fechar el material esquelético humano. Las técnicas empleadas por Knight (1969) y Knight and Lauder (1967) involucraron análisis del contenido de nitrógeno, contenido de aminoácidos en proteínas, reacción con ácido mineral, reacción con bencidina, fluorescencia UV y estimación de grasa en los huesos. Estas pruebas no dieron lugar a correlaciones precisas con un IPM conocido. Sin embargo, Knight (1969) y Knight and Lauder (1967) identificaron la pérdida de nitrógeno, la pérdida de aminoácidos de la proteína ósea, la fluorescencia UV y la pérdida de actividad inmunológica, como criterios útiles para discriminar entre reciente (menos de 100 años) y muestras de hueso antiguas (más de 100 años).

Facchini y Pettener (1977) también examinaron varios métodos químicos y físicos para fechar restos de esqueletos humanos. Utilizaron varios métodos diferentes, incluyendo la reacción de bencidina, fluorescencia UV, gravedad específica y conductividad supersónica, en 71 restos esqueléticos fechados de un rango de edad en los últimos 3.500 años. Los resultados fueron variables según el método utilizado. La reacción de bencidina y la fluorescencia UV coinciden, y las lecturas positivas para estos métodos se obtuvieron hasta 200-350 años. Los valores medidos de la gravedad específica y las pruebas de conductividad supersónica mostraron una tendencia paralela entre las muestras de los tres primeros siglos y las pertenecientes a períodos más antiguos.

En la osteología forense actual, la estimación del tiempo desde la muerte en esqueletos humanos es una tarea difícil (Sterzik y cols., 2016) que debe comenzar con un examen macroscópico, a pesar de todas sus limitaciones metodológicas. Este examen macroscópico se suele realizar junto con métodos morfológicos, métodos químicos, físicos e histológicos (Unluturk y Sahin, 2017).

Entre las técnicas que se están estudiando actualmente para la estimación de la data de la muerte en restos óseos encontramos:

- Fluorescencia UV (Facchini y Petterner 1977; Hoke y cols., 2013; Knight, 1969, Knight y Lauder, 1967, 1969; Swaraldahab y Christensen, 2016; Yoshino y cols., 1991; Sterzik y cols., 2016).
- Luminol y quimioluminiscencia (Capella y cols., 2015; Ramsthaler y cols., 2011; Ramsthaler y cols., 2009; Introna y cols., 1999).
- Isótopos radiactivos (Schrag y cols., 2014; Ziad y cols., 2012, Zinka y cols., 2012; Kandlbinder y cols., 2009; Swift, 2004; Forbes, 2004; Ubelaker y cols., 2006; Ubelaker, 2001; Wild y cols., 2000; Neis y cols., 1999; Swift, 1998; MacLaughlin-Black y cols., 1992; Taylor y cols., 1989;).
 - Estroncio 90 (Swift, 2004, MacLaughlin-Black y cols., 1992, Neis y cols., 1999).
 - Plomo y Polonio 210 (Forbes, 2004).
 - Torio y Radio (Zinka y cols., 2012, Kandlbinder y cols., 2009).
- Contenido de citrato (Costello y cols., 2014; Kanz y cols., 2014; Schwarcz y cols., 2010).
- Degradación del ADN (Pérez-Martínez y cols., 2017; Kaiser y cols., 2008).
- Pérdida de nitrógeno (Unluturk, 2017).
- Peso del hueso (Unluturk, 2017).
- Contenido de aminoácidos de las proteínas (Unluturk, 2017).
- Análisis termogravimétrico (Raja y cols., 2009).
- Análisis de moléculas residuales dentro del hueso (Perez-Martínez y cols., 2017; Castellano y cols., 1984).
- Degradación de lípidos (Unluturk, 2017).
- Determinación serológica de las proteínas: (Unluturk, 2017; Wilson, 2017).
- Comunidades bacterianas dentro del hueso (Damann y cols., 2015).
- Evidencia botánica (Cardoso y cols., 2010).
- Métodos espectroscópicos como la espectroscopia infrarroja y Raman (Swaraldahab y Christensen, 2016).
- El análisis estructural radiográfico o microradiografía y microscopia electrónica (Unluturk y cols., 2017, Sterzik y cols., 2016; Hoke y cols., 2013).

2.2. EL GLOBO OCULAR

2.2.1. Generalidades del globo ocular

El ojo o globo ocular, es el órgano que detecta la luz y la base del sentido de la vista. El globo ocular mide alrededor de 25 mm de diámetro. Está sostenido dentro de

la cavidad orbitaria por seis músculos extrínsecos que controlan su movimiento. Una capa gruesa de tejido adiposo lo rodea parcialmente y lo amortigua durante sus movimientos dentro de la órbita. Los músculos extraoculares están coordinados de manera que los ojos se mueven simétricamente alrededor de sus propios ejes centrales.

Los rayos de luz que entran al ojo a través de la pupila son concentrados por la córnea y el cristalino para formar una imagen en la retina. La retina contiene millones de células sensibles a la luz (bastones y conos), que forman un mosaico de puntos sensibles, cada uno de los cuales puede ser excitado independientemente por un punto luminoso. Los rayos luminosos conforme atraviesan los componentes del globo ocular, se refractan. La refracción enfoca estos rayos sobre los fotorreceptores de la retina. Los cuatro componentes del globo ocular (córnea, humor acuoso, cristalino, cuerpo vítreo, los llamados medios ópticos de difracción (o aparato dióptrico) modifican el trayecto de los rayos luminosos. Las excitaciones nerviosas producidas en la retina, son transmitidas por los nervios ópticos en forma de impulsos nerviosos, hasta la corteza cerebral, donde se producen los estímulos inmediatos de las sensaciones y percepciones visuales. De forma que, la información procedente de cada uno de los dos nervios ópticos es procesada en el cerebro para producir una única imagen coordinada.

La pared del globo ocular está compuesta por tres capas o túnicas: la túnica fibrosa, la túnica vascular y la túnica nerviosa. La túnica fibrosa consiste en la córnea transparente y la esclerótica blanca y opaca. La túnica nerviosa o úvea consiste principalmente en la coroides, y la capa vascular provee las sustancias nutritivas a la retina.

Las capas del globo ocular y el cristalino forman los límites de las tres cámaras del ojo (Figura 4):

- Cámara anterior: el espacio que hay entre la córnea y el iris.
- Cámara posterior: el espacio que hay entre la superficie posterior del iris y la superficie anterior del cristalino.
- Cámara vítrea: el espacio que hay entre la superficie posterior del cristalino y la retina nerviosa. La córnea, las cámaras anterior y posterior y su contenido constituyen el segmento anterior del ojo; la cámara vítrea, la retina y el epitelio pigmentario de la retina (EPR), la parte posterior de la esclerótica y la úvea constituyen el segmento posterior (Ross y Pawlina, 2015).

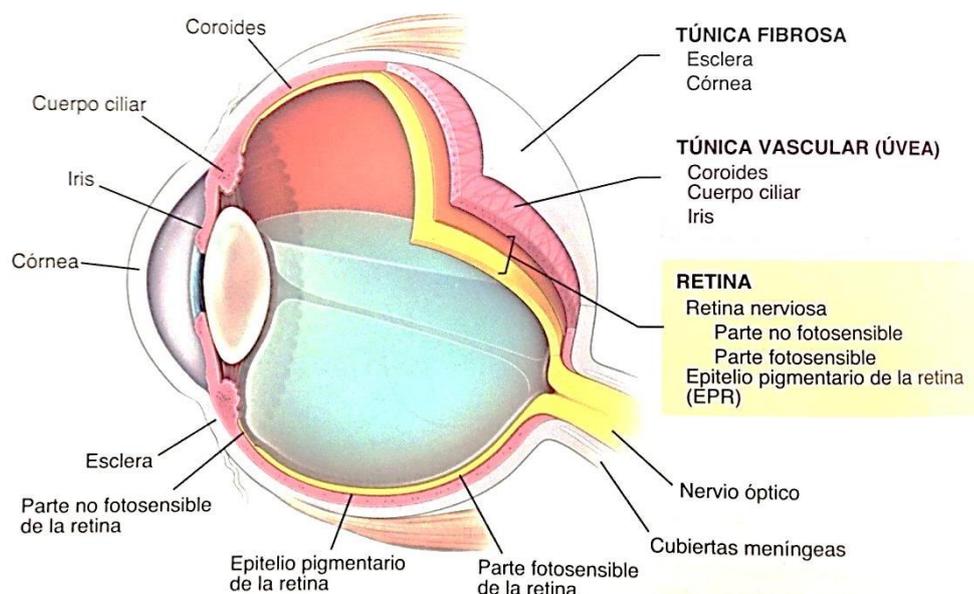


Figura 4. Esquema del globo ocular, morfología y sus partes. Adaptada de: Eynard (2011). *Histología e Embriología Humanas: Bases Celulares e Moleculares*. [Figura]

2.2.2. Estructura microscópica del ojo

La córnea es el elemento retráctil principal del ojo. Su índice de refracción es de 1,372 (el del aire es de 1,0). El cristalino ocupa el segundo lugar en importancia en lo que se refiere a la refracción de los rayos luminosos. A causa de la elasticidad, la forma del cristalino puede sufrir cambios leves en respuesta a la tensión del músculo ciliar. Estos cambios son importantes en la acomodación para el enfoque adecuado de los objetos cercanos. El humor acuoso y el cuerpo vítreo solo desempeñan papeles menores en la refracción. Sin embargo, el humor acuoso tiene la importante función de proveer sustancias nutritivas a dos estructuras avasculares: el cristalino y la córnea. Además de transmitir la luz, el cuerpo vítreo, contribuye a mantener la posición del cristalino y ayuda a conservar la retina nerviosa en contacto con el epitelio pigmentario de la retina.

2.2.3. El cristalino

A) Anatomía macroscópica

El cristalino es una estructura avascular, transparente, biconvexa, elástica y asimétrica (Figura 5) (Kierszenbaum, 2008). Mantiene su transparencia mediante la regulación del volumen interno, el control del voltaje, la bomba de sodio y potasio, su estructura interna y su metabolismo (Pérez-Salvador, 2000).

La superficie de su cara anterior está en contacto con los márgenes pupilares del iris, y el humor acuoso (cámara posterior), mientras que la cara posterior está en contacto con el humor vítreo (cavidad vítrea). El plano ecuatorial es perpendicular con respecto al eje antero-posterior del globo ocular (Pérez-Salvador 2000). Está sustentado por el ligamento suspensorio (fibras zonulares), formado por haces de filamentos que unen el cuerpo ciliar con el ecuador del cristalino. El cuerpo ciliar y las fibras zonulares parecen influir en la acomodación (Kierszenbaum, 2008).

Según Kierszenbaum (2008), las dimensiones del cristalino son:

- Diámetro antero-posterior aproximado de 9-10 milímetros.
- Grosor de 4-5 milímetros.
- Radio de curvatura de la cara anterior de 9-10 milímetros.
- Radio de curvatura de la cara posterior de 5,5-6 milímetros.
- Peso del cristalino adulto: 200 gramos.

En condiciones normales se trata del segundo tejido ocular más transparente con un índice de refracción de 1,39 (Pérez-Salvador, 2000) encargado junto con la córnea y las tres cámaras oculares transparentes también, de que la luz se enfoque debidamente en la retina (Kierszenbaum, 2008). Para ello debe mantener su propia transparencia aportando un apropiado índice de refracción entre el humor acuoso y el vítreo.

Tiene cuatro funciones principales y todos los procesos fisiológicos y bioquímicos están encaminados a cumplir con los siguientes objetivos: mantener su transparencia, proporcionar poder refractivo contribuyendo al sistema óptico del ojo, la acomodación y absorber luz ultravioleta para proteger a la retina (Costello y cols., 1989).

Desde el nacimiento esta estructura está en continuo cambio: su peso, volumen y tamaño, se incrementan con el paso del tiempo, existen algunos estudios que demuestran que el cristalino del varón es ligeramente más pesado que el de la mujer a la misma edad, sin embargo, la diferencia no parece ser significativa, presentando muy poca variación en cuanto a su función.

El cristalino tiene una morfología elíptica en los primeros meses de la vida y con el paso de los años adquiere una forma redonda que se observa más claramente en la segunda y tercera década de la vida, esta tendencia aumenta con la edad, el

Introducción

diámetro antero-posterior se incrementa aproximadamente 0,023 milímetros cada año de vida (Pérez-Salvador, 2000).

En el cristalino adulto se puede observar, además de la estructura a modo de membrana basal gruesa y transparente que lo rodea, dos regiones bien definidas, la corteza y el núcleo, la primera se puede subdividir en región superficial, intermedia y profunda; esta sucesión se forma con la edad, siendo la primera la más reciente (Figura 5). La corteza está más hidratada que el núcleo, y esta carencia de agua se debe casi en su totalidad a una bomba de sodio. El núcleo del cristalino se puede dividir en núcleo embriológico, núcleo fetal y núcleo adulto. El núcleo fetal rodea al embriológico y finalmente el núcleo adulto comprende a los dos anteriores y se integra por las fibras del cristalino (Pérez-Salvador, 2000). La región cortical interna y el centro del cristalino comprenden unas fibras más antiguas exentas de núcleos. Un 80% de la glucosa disponible es metabolizada por el cristalino (Kierszenbaum, 2008).

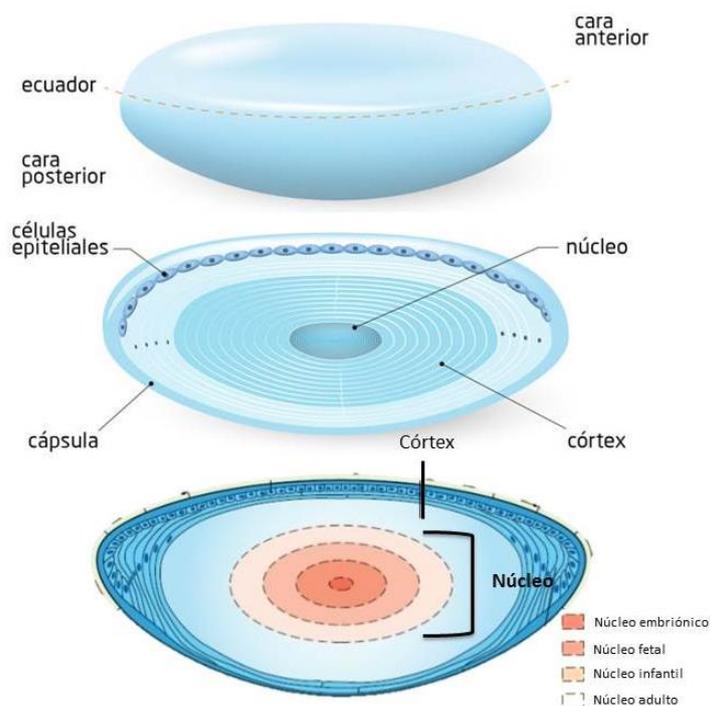


Figura 5. Capas del cristalino adulto.

B) Anatomía microscópica

El cristalino tiene tres componentes: la capsula elástica, el epitelio del cristalino y la sustancia del cristalino (Figura. 6):

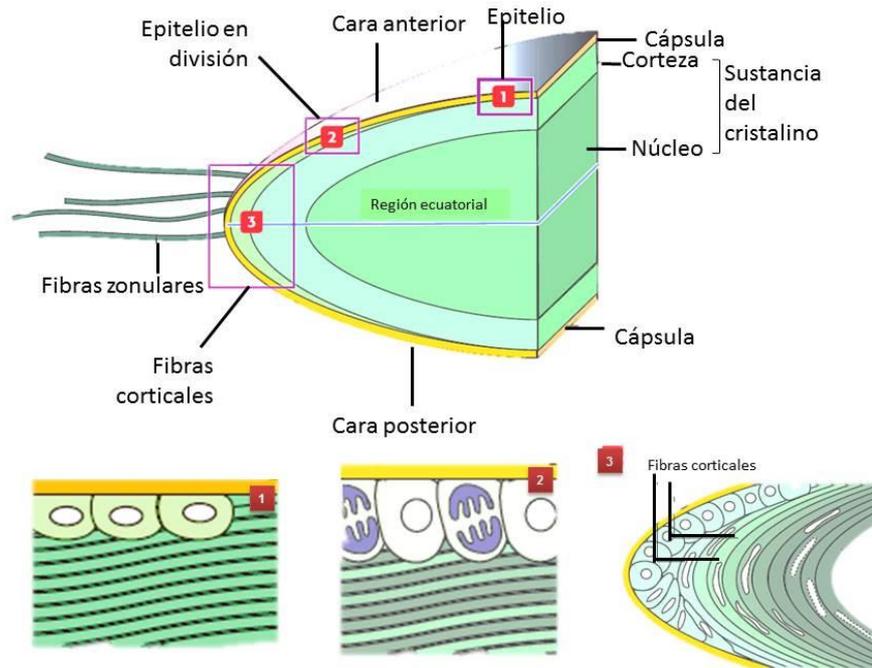


Figura 6. Imagen del cristalino, su morfología y sus partes. Adaptada de: Kierszenbaum (2008). *Histología y biología celular: introducción a la anatomía patológica.* [Figura]

- 1) La cápsula elástica del cristalino que rodea un grupo de fibras densamente ocupadas, producidas por células epiteliales de la porción anterior del cristalino y le confiere al cristalino las propiedades de una célula gigante.

En todos los cristalinos de los animales vertebrados se puede observar una cápsula no celular compuesta de colágeno (Pirie, 1951) con una densidad fibrilar uniforme, que rodea la lente (Ortega y cols., 2001), en la cual se pueden distinguir tres elementos:

- Laminilla zonular. Sólo existe a nivel ecuatorial y es la parte más superficial. Está atravesada por las fibras zonulares.
- Membrana pericapsular. Capa situada bajo la anterior, de 1-2 μm de espesor.
- Cristaloides propiamente dicha. Se sitúa por dentro de la membrana pericápsular. Su grosor es de 20 μm .

La capa más externa de mayor densidad está formada por filamentos de colágeno capsular y microfibras elásticas zonulares en las áreas cercanas al ecuador, estas fibras toman una dirección tangencial a la superficie del cristalino y se adhieren a la cápsula, penetrando en ella a razón de 0,5 a 1 micra de profundidad.

Los filamentos que la forman tienen una periodicidad de 4,1 nanómetros de largo y con una pequeña tendencia en forma de redes, el estudio de estos filamentos demostró que son helicoidales con un ángulo de aproximadamente 55 grados (Maisel, 1985, Kuszak y cols., 1985).

Estos filamentos debido a la estructura que presentan se acomodan en forma de cadenas y adquieren en conjunto una disposición en malla, lo cual produce que la membrana basal capsular sea elástica.

La capa más interna de la cápsula adyacente al epitelio del cristalino es transparente y se continúa con el espacio intracelular subyacente a las células epiteliales.

La cápsula del cristalino crece durante toda la vida, aumentando de volumen y grosor. Este crecimiento se hace más evidente a nivel del ecuador, en especial en el lugar de adhesión de la zónula, estos cambios se observan tanto en la cápsula de la parte anterior como de la posterior, en este último caso se debe a la acción de fibras cristalinas (Pérez-Salvador, 2000).

- 2) El epitelio del cristalino es una capa de células aplanadas y cúbicas situada en la cara anterior del mismo que se extienden en sentido posterior hasta la región ecuatorial. Son más altas cuanto más cerca del ecuador se sitúan. Se denomina zona germinativa al grupo celular situado en la zona más ecuatorial. En esta zona las mitosis son mucho más frecuentes. Las células que se van creando se van alejando de la cápsula. Sin embargo, no se encuentran células epiteliales por debajo de la superficie posterior de la cápsula (Ortega y cols., 2001).
- 3) La sustancia del cristalino, que consiste en las fibras celulares corticales y nucleares del cristalino (Pérez-Salvador, 2000; Kierszenbaum, 2008).

Las fibras cristalinas o cristalinas se originan a partir de la zona germinativa. Sus extremos apicales están adheridos a las células del epitelio. Las fibras están dirigidas hacia el interior. Las fibras cristalinas siguen una dirección anteroposterior, pero no rectilínea, sino con una trayectoria curvilínea de convexidad hacia el ecuador. La unión de los puntos de inserción anterior de las fibras forma una estructura en forma de "Y" (sutura anterior), mientras que las inserciones posteriores delimitan una "Y" invertida (sutura posterior) (Kierszenbaum, 2008). En la zona más periférica el

trayecto no está aún bien definido (torbellino cristaliniario de Schwalbe) (Ortega y cols., 2001).

Las fibras más jóvenes, que presentan núcleo están inmediatamente por debajo de la cápsula, siendo ésta la corteza. Es en esta zona donde la estructura de las fibras individuales es más evidente que hacia el núcleo. Hacia el ecuador las fibras se van alargando y en el centro o núcleo pierden sus núcleos y su adherencia basal, se vuelven más homogéneas y difíciles de distinguir histológicamente como tales. Las fibras muestran que las células están dispuestas en forma compacta, sin espacios intercelulares apreciables y las membranas celulares forman varios tipos de unión.

Las células presentan interdigitaciones visibles, especialmente hacia el ecuador. Asimismo, la superficie celular de las fibras del cristalino en la corteza y en zonas más profundas posee finas crestas dispuestas formando un retículo. Las células corticales contienen microtúbulos dispuestos longitudinalmente en la zona marginal del citoplasma de las fibras. Hacia el centro del cristalino, el citoplasma se vuelve sumamente homogéneo y denso. Estas células no contienen organelas. Al presentar las fibras del cristalino adulto una de las mayores concentraciones de proteínas existentes en los tejidos del todo el organismo, se tiñe intensamente con eosina y otros colorantes ácidos. Las células se van alargando en el ecuador, se insinúan debajo de la capa del epitelio del cristalino en la parte anterior y debajo de la cápsula posterior en la parte posterior (Figura 7) (Ham y Cormack, 1983).

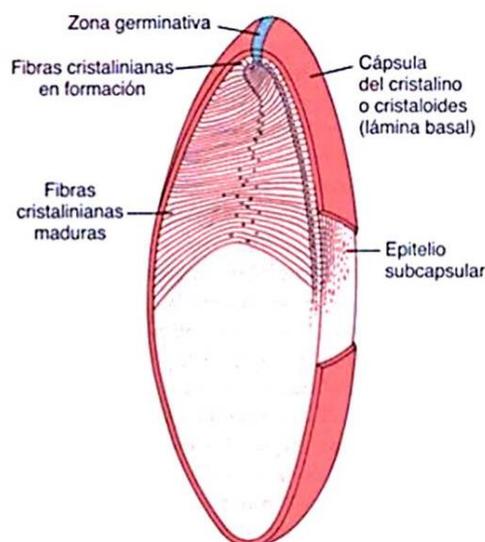


Figura 7. Disposición de las células y fibras del cristalino. Adaptada de: Ross y Pawlina (2015). *Histología: texto y atlas: correlación con biología celular y molecular*. [Figura]

C) Tipos celulares

El cristalino se compone de tres diferentes tipos de células, cada una presenta una permeabilidad y características metabólicas propias:

1. Células epiteliales, situadas en el epitelio del cristalino formado por una capa única de células cuboidales, que se encuentran adheridas de manera firme a la cápsula anterior del cristalino y de manera pobre a las fibras subyacentes. Estas contienen en su interior todas las organelas que se encuentran en la mayoría de las células y son responsables del transporte activo de iones, aminoácidos, lípidos y facilitan la difusión de glucosa, como polisomas, ribosomas, retículo endoplásmico liso y rugoso, aparato de Golgi, y por ser células metabólicamente activas presentan también mitocondrias que suelen ser pequeñas y con crestas irregulares. El transporte se produce de manera activa y debido a que las uniones celulares son estrechas la difusión de solutos es lenta y selectiva basándose en su peso molecular (Costello y cols., 1989).

La principal diferencia de las células epiteliales es la presencia de un citoesqueleto muy bien estructurado, hecho de filamentos de actina y miosina localizadas cerca de la membrana celular en su región apical, este citoesqueleto se vuelve marcadamente denso con la edad. Las membranas laterales de las células epiteliales han demostrado ser ricas en actividad enzimática, encontrándose de manera importante ATPasa de sodio y potasio, y ácido fosfatasa, ambas enzimas aumentan con la edad y se mantienen estables después de los cincuenta años, en algunos casos pueden presentar una disminución. A este nivel (membranas laterales) se observan uniones GAP que son complementarias a canales proteicos transmembrana que conectan con las células vecinas. Los espacios intracelulares son angostos y representan una brecha hidrofílica. Las conexiones intracelulares favorecen el paso de iones, metabolitos y nutrientes, sin el uso de energía adicional (Rafferty y Scholz, 1984; Kuszak y cols., 1985; Maisel, 1985, Costello y cols., 1989).

Según Kuszak (2004) se ha observado que las membranas apicales de las células epiteliales son aplanadas y se encuentran en a la zona apical de las células fibrilares del cristalino, a esta región se le conoce como interfase celular epitelio-fibrosa. Se piensa que gracias a esta interfase puede existir movimiento activo de nutrientes, iones, metabolitos y sustancias mediadas por receptores desde la región periférica hacia la región central.

2. Células especiales que se encuentran en la región ecuatorial, se caracterizan por alargarse y llegar a cubrir todo el diámetro del cristalino de polo a polo, presentan abundantes organelas citoplasmáticas, estas células están localizadas muy cerca del ecuador con el fin de no influir en la transmisión de la luz. Presentan una difusión facilitada de solutos (Ortega y cols., 2001).

3. Células fibrosas maduras que constituyen la masa de la corteza y núcleo del cristalino, se originan de las células epiteliales ecuatoriales, siendo su permeabilidad casi nula (Jakobiec, 1982; Costello y cols., 1989). La fibrogénesis es continua, las células superficiales maduran, pierden organelas citoplasmáticas y se adhieren a las fibras nucleares, por lo que el tamaño del núcleo adulto del cristalino se incrementa en todo momento, y el área denominada corteza contiene las fibras más recientes. La diferenciación de células epiteliales en células fibrosas del cristalino al parecer ocurre a un ritmo importante. A medida que van produciéndose células y penetrando en el interior del cristalino el número de inclusiones citoplasmáticas al igual que de organelas disminuye, el núcleo de las fibras jóvenes del cristalino se encuentran cerca de la zona ecuatorial y se pierde con el envejecimiento, encontrándose en las fibras del interior de la lente únicamente una granulación fina cuyo principal componente son las cristalinas; inicialmente desaparecen los polisomas, el retículo endoplásmico rugoso y las mitocondrias, quedando solamente el aparato de Golgi, posteriormente al continuar su avance el núcleo se rompe y el nucléolo desaparece (Pérez-Salvador, 2000).

Las fibras toman una dirección hacia el núcleo embrionario y representa a una célula elongada con una membrana. En el interior de las fibras se puede observar la interacción de estructuras filamentosas que actúan como una unidad funcional y estructural, esta recibe el nombre de citoesqueleto.

Los espacios entre las fibras o espacios extracelulares del cristalino son muy pequeños y constituyen solamente el 5% del total del cristalino. La acumulación de líquido entre los espacios da como resultado vacuolas, los espacios de las fibras no pueden aumentar mucho a menos que se rompan las membranas de las fibras.

A nivel del ecuador se pueden contar entre 330 a 500 micras de fibras maduras en un centímetro de largo. Las fibras suelen medir entre 7 y 10 micras de diámetro y pueden llegar a tener una longitud de 8 milímetros, conforme las fibras se acercan a las suturas se vuelven más delgadas y anchas, es decir, aplanadas, observándose a este nivel una unión más estrecha entre las fibras y más organizada en comparación con la que presenta en la superficie. La membrana basal de las células fibrosas

elongadas continúa produciendo cápsula posterior de cristalino durante toda la vida, pero a un ritmo menor en comparación con la que se produce en la cápsula anterior. Las membranas laterales de las células fibrosas presentan uniones importantes entre las células vecinas, las uniones más fuertes son a través de mecanismos de interdigitación que dan como resultado un entrelazado de las fibras, esta unión se hace más fuerte conforme la célula penetra en el interior del cristalino y facilita que las fibras cambien de forma durante la fase de acomodación.

El otro mecanismo de unión se denomina unión Gap. Estas uniones son muy numerosas a escala central, en cambio están prácticamente ausentes en la región anterior y posterior. La gran cantidad de uniones Gap es importante para proporcionar al tejido del cristalino firmeza y habilidad de mantenerse viable a pesar de ser avascular, además explica que el cristalino se comporte como una unidad protoplasmática isoelectrónica simple (Worgul y cols., 1976; Rafferty y Scholz, 1985; Kuszak y cols., 1985).

Además, al parecer la unión e interacción de estos filamentos también se debe a que están unidos unos con otros a través de una malla microtrabecular. El citoesqueleto está formado por filamentos de actina, filamentos intermedios, microtúbulos, y filamentos de miosina. Estos elementos en conjunción con las proteínas reguladoras están implicados en la motilidad celular, en movimientos internos y externos, y en mantener la integridad celular (Pérez-Salvador, 2000).

Las fibras del cristalino mantienen un adecuado intercambio nutricional y metabólico desde la periferia hacia el centro y viceversa y esto se debe también a la unión estrecha de las fibras (Rafferty y Scholz, 1985).

D) Composición química

El cristalino es un órgano deshidratado que contiene aproximadamente un 66% de agua y un 33% de proteínas y otros componentes.

Su interior es electronegativo y el flujo de electrolitos se realiza hacia el interior del cristalino y está gobernado por un gradiente eléctrico (Costello y cols., 1989; Kuszak y cols., 1985).

❖ Azúcares: glucosa 0,61 $\mu\text{mol/g}$, glucosa 6P 0,3 $\mu\text{mol/g}$, fructosa 6P 0,41 $\mu\text{mol/g}$, fructosa 1,6 DP 0,03 $\mu\text{mol/g}$, triosas y tetrasas P 0,7 $\mu\text{mol/g}$ (Cheng y cols., 1981).

La glucosa es la fuente energética fundamental del cristalino, a través del humor acuoso. Penetra mediante un sistema de transporte pasivo facilitado, insulina-

dependiente, estereoespecífico para D-glucosa (Okuda y cols., 1987). La glucólisis proporciona dos tercios de la energía, mientras que el ciclo de Krebs (que no ocurre en las fibras cristalinas ya que carecen de mitocondrias) proporciona el resto. Parte de la glucosa se degrada por la vía de las pentosas-fosfato (Van Heyningen, 1959).

- ❖ Lípidos: en las membranas celulares, donde son tan abundantes como las proteínas. El 50-60% de los lípidos presentes lo compone el colesterol (Zelenka, 1984), además se encuentran fosfolípidos (47-56% de esfingomielina, 9-18% de fosfatidiletanolamina, 6-15% de fosfatidilserina, 2-5% de fosfatidilcolina y 1-4% de fosfatidilinositol), y existe abundancia de ácidos grasos saturados (palmitato) y monoinsaturados.

El alto contenido de esfingomielina, colesterol y ácidos grasos saturados en las membranas celulares de las fibras cristalinas hace que estas sean muy rígidas. Cuanto mayor es la concentración de colesterol mayor rigidez se producirá, debido a que existe un contenido en colesterol mayor en el núcleo que en la corteza, el núcleo tiene unas membranas celulares más rígidas (Alcalá y cols., 1988).

- ❖ Solutos de bajo peso molecular: ácido ascórbico (300 µg/g), con acción antioxidante, aunque puede ser prooxidante bajo determinadas circunstancias (Wolff y cols., 1987), urea (4,7 µg/g), glutatión (1,43 µg/g), potasio, sodio y calcio.

Los aminoácidos más abundantes en el cristalino humano, ordenados de manera decreciente según la cantidad de µg/g de peso húmedo, son (Berman, 2013): glutámico: 3,42, alanina: 1,34, taurina: 0,79, serina: 0,56 y prolina: 0,16.

- ❖ Proteínas: la diferenciación de las células del cristalino se debe a la aparición de unas proteínas únicas en el citoesqueleto:

1) Filesina, un filamento intermedio que contiene sitios de unión para las cristalinas.

2) Cristalinas que son unas proteínas específicas del cristalino (alfa, beta y gamma).

La filesina y las cristalinas mantienen la forma y transparencia de las fibras celulares del cristalino (Kierszenbaum, 2008).

El contenido de proteínas del cristalino, como se comentó anteriormente es el 33% del peso total, por lo tanto, es mayor que el de cualquier otro órgano del cuerpo (por ejemplo, el cerebro contiene un 10%, el músculo un 18%). La perfecta

Introducción

coordinación fisicoquímica de las proteínas cristalinas que proporcionan un medio óptimo de agua, electrolitos y grupos sulfhidrilo juega un papel de suma importancia en la transparencia del cristalino (Mathias y cols., 1985; Moses y Hart, 1988).

La transparencia y el poder refractivo del cristalino normal es dependiente del gradiente de índice refractivo a la luz visible, estas propiedades se deben no solo a la disposición de sus fibras, sino a la presencia de las proteínas cristalinas.

La compleja distribución de estas proteínas, sus diferentes tamaños y características bioquímicas y la interacción con el agua, las membranas celulares y el citoesqueleto mantienen un índice refractivo constante en el cristalino (Pérez-Salvador, 2000).

En los animales vertebrados, las cristalinas constituyen el 90% de las proteínas solubles del cristalino, se clasifican en tres familias de polipéptidos diferentes basados en sus características antigénicas y se denominan alfa, beta y gamma cristalinas, en las aves y en algunos reptiles la gamma cristalina se encuentra sustituida casi en su totalidad por la delta cristalina (Mathias y cols., 1985; Bassnett y cols. 1988).

La gamma cristalina presenta un bajo peso molecular, alrededor de 20000 daltons, una carga eléctrica positiva a pH fisiológico; se encuentra en el centro de la región nuclear del cristalino de los mamíferos, en donde el índice de refracción es mayor y el contenido de agua es mínimo. Una característica importante de estos polipéptidos es que deben poseer una gran estabilidad tanto en su estructura como en sus interacciones con las células, debido a que una vez que se han formado, permanecen en el interior de la lente durante toda la vida. A pesar de esta situación la estructura de las gamma cristalinas es rica en residuos que contiene sulfuro, cisteína, metionina y residuos aromáticos, todos ellos son susceptibles a procesos oxidativos, y es aquí donde se llevan a cabo algunos cambios patológicos iniciales en la formación de ciertos tipos de cataratas (Pérez-Salvador, 2000).

Las cristalinas de tipo beta presentan propiedades intermedias entre las cristalinas alfa y gamma, son heterogéneas y su estructura está formada por cinco subunidades de polipéptidos que se entrelazan y presentan un peso molecular entre 50000 y 200000 daltons. Al parecer comparten ciertas características con las cristalinas gamma, como su estabilidad, la localización de ciertos grupos sulfhidrilo e interacciones moleculares; presentan una carga isoeléctrica y constituyen el 55% de las cristalinas en el lente humano (Mathias y cols., 1985).

Las alfa cristalinas presentan una carga negativa a pH fisiológico, constituyen el 15% de las cristalinas en la lente, su peso molecular es mayor, de 800 000 daltons y representan por lo tanto las proteínas más grandes en el cristalino (Mathias y cols., 1985).

2.2.1. Cuerpo vítreo

Es una sustancia gelatinosa transparente que ocupa la cámara vítrea del segmento posterior del ojo. Está fijado laxamente a las estructuras vecinas, incluida la capa limitante interna de la retina. La porción principal del cuerpo vítreo es un gel homogéneo que contiene alrededor del 99% de agua (humor vítreo), colágeno, glucosaminoglucanos (sobre todo ácido hialurónico) y una pequeña población de células llamadas hialocitos. Se cree que estas células sintetizan las fibrillas colágenas y los glucosaminoglucanos del cuerpo vítreo. En las preparaciones histológicas, los hialocitos aparecen teñidos con hematoxilina y eosina y son difíciles de ver. En la microscopia electrónica con frecuencia se observa un RER y un aparato de Golgi bien desarrollados. En la periferia del cuerpo vítreo a veces aparecen fibroblastos y macrófagos. El conducto hialoideo (o conducto de Cloquet), que no siempre es visible, atraviesa el cuerpo vítreo en una dirección anteroposterior, desde el disco óptico hasta la superficie posterior de la cápsula del cristalino. Es el resto de la vía por donde transcurre la arteria hialoidea durante el desarrollo ocular (Ross y Pawlina, 2015, Kierszenbaum, 2008).

2.2.2. Cambios postmortem del globo ocular

Entre los fenómenos de descomposición postmortem de la fase temprana, se da la deshidratación cadavérica, que produce la desecación de las mucosas, dando como resultado dos fenómenos oculares manifiestos:

- Signo de Stenon-Louis: Consiste en hundimiento del globo ocular, pérdida de la transparencia de la córnea, tornándose opaca; formación de arrugas en la córnea, depósito de polvo de aspecto arenoso “telilla glerosa”. Aparece a los 45 minutos en el ojo con los párpados abiertos, y a las 24 horas en el ojo con los párpados cerrados”.
- Signo de Sommer-Larcher: Consiste en un triángulo oscuro con la base en la córnea. Comienza en la mitad externa del ojo y se debe a la transparencia de la esclerótica por deshidratación, que deja visible al pigmento de la coroides. Suele aparecer con una data superior a 10 horas (Carvajal Oviedo, 2012).

Además de estos cambios ampliamente descritos, en diferentes estudios se ha observado que tras la muerte la córnea también se ve afectada. La córnea se vuelve opaca en un proceso gradual con el avance del IPM hasta que pierde su turgencia. Esto es debido a la hidratación corneal. Las células endoteliales degeneradas no pueden evitar el flujo del humor acuoso hasta la córnea, con lo que el humor acuoso fluye hacia la córnea, produciendo la opacidad. La cantidad de humor acuoso en la córnea determina el nivel de opacidad y dado que el flujo de humor acuoso a la córnea continúa durante un tiempo tras la muerte, por tanto, la opacidad aumenta con el IPM (Cantürk, 2017; Salam y cols., 2012).

2.3. EL TEJIDO ÓSEO

2.3.1. Generalidades del tejido óseo

Los huesos representan el 12% aproximadamente del peso corporal. Las funciones del hueso son soporte mecánico, transmisión de las fuerzas generadas por los músculos, protección de las vísceras, homeostasia mineral y provisión de un espacio para la producción de células sanguíneas (Cotran y cols., 1995).

El tejido óseo está en continuo cambio y es una forma especializada de tejido conjuntivo que se compone de células especializadas responsables de la producción y del mantenimiento de la matriz y la matriz extracelular. A diferencia de otros tejidos su matriz esta mineralizada, produce un tejido muy duro capaz de proporcionar sostén y protección. En virtud de su contenido mineral, el tejido óseo también sirve como sitio de almacenamiento de calcio y fosfato (Ross y Pawlina, 2015).

2.3.2. Estructura general de los huesos

Si se corta un hueso, pueden reconocerse dos organizaciones estructurales distintas de tejido óseo Una capa densa, compacta, forma la superficie ósea externa (hueso compacto o cortical) y una malla de aspecto esponjoso que está compuesta por cordones (delgadas espículas del tejido óseo anastomosadas) y que forma el interior del hueso (hueso esponjoso o trabecular) (Figura 8). Los espacios dentro de la malla están comunicados y en un hueso vivo, contienen la médula y los vasos sanguíneos (Ross y Pawlina, 2015). La proporción entre ambos tipos en un hueso largo adulto es aproximadamente del 80% de hueso cortical y 20% de hueso trabecular. Ambos tipos de huesos están compuestos de osteonas (Clarke, 2008).

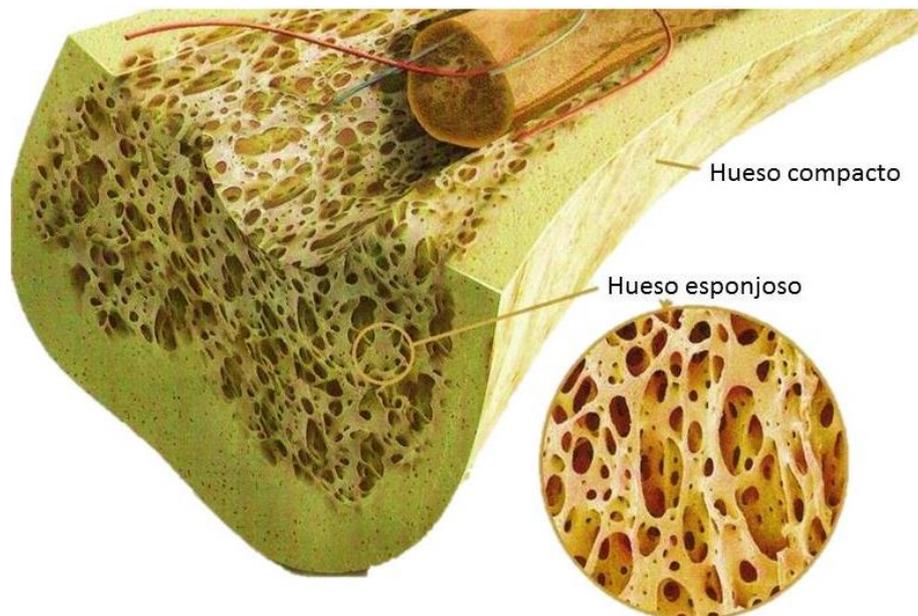


Figura 8. Reconstrucción tridimensional de un hueso largo, mostrando la parte compacta y la parte esponjosa.

Las osteonas corticales se llaman sistemas de Havers, que tienen forma cilíndrica, miden aproximadamente 400 mm de largo y 200 mm de ancho en su base, y forman una red de ramificación dentro del hueso cortical (Clarke, 2008). Las paredes de los sistemas de Havers están formadas por laminillas concéntricas formadas por las fibras colágenas que están paralelas entre sí pero orientadas de forma alterna, esto es lo que le confiere una resistencia paralela de cada una de las laminillas concéntricas de una osteona son paralelas entre sí en cualquier laminilla dada, pero orientadas en una dirección diferente a la que adoptan las fibras en las laminillas contiguas (Figura 9).

Los conductos perforantes (de Volkmann) son túneles en el hueso laminar a través de los cuales pasan vasos sanguíneos y nervios desde la superficie del periostio y endostio para alcanzar el conducto osteonal (de Havers); también conectan los conductos de Havers entre sí. Suelen extenderse más o menos perpendiculares al eje longitudinal de las osteonas y del hueso. Los conductos de Volkmann no están rodeados por laminillas concéntricas, una característica clave en su identificación histológica (Ross y Pawlina, 2015) (Figura 9).

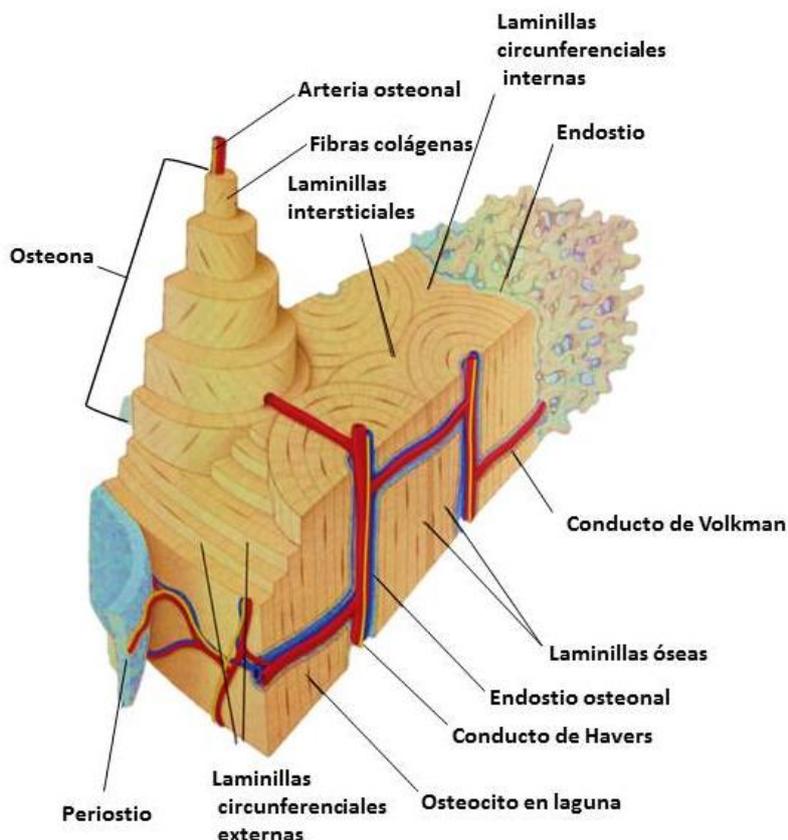


Figura 9. Diagrama de un bloque de hueso compacto. Adaptada de: Ross y Pawlina (2015). *Histología: texto y atlas: correlación con biología celular y molecular.* [Figura]

El hueso cortical es menos activo metabólicamente que el hueso trabecular, pero esto depende de la especie. La porosidad ósea cortical suele ser <5%, pero esto depende de la proporción de sistemas de Havers que se remodelan activamente para osteonas corticales inactivas. El aumento de la remodelación cortical provoca un aumento de la porosidad cortical y una disminución de la masa ósea cortical. Los adultos sanos que envejecen normalmente experimentan adelgazamiento de la corteza y aumento de la porosidad cortical.

El periostio es una cubierta de tejido conectivo fibroso que rodea la superficie cortical externa del hueso. El periostio está fuertemente unido a la superficie cortical externa del hueso por fibras de colágeno gruesas, llamadas fibras de Sharpey, que se extienden hasta el tejido óseo subyacente. El endostio es una estructura membranosa que cubre la superficie interna del hueso cortical, el hueso trabecular y los canales de los vasos sanguíneos (canales de Volkman) presentes en el hueso. El endostio está en contacto con el espacio de la médula ósea, el hueso trabecular y los canales de los vasos sanguíneos y contiene vasos sanguíneos, osteoblastos y osteoclastos (Figura 10) (Clarke, 2008).

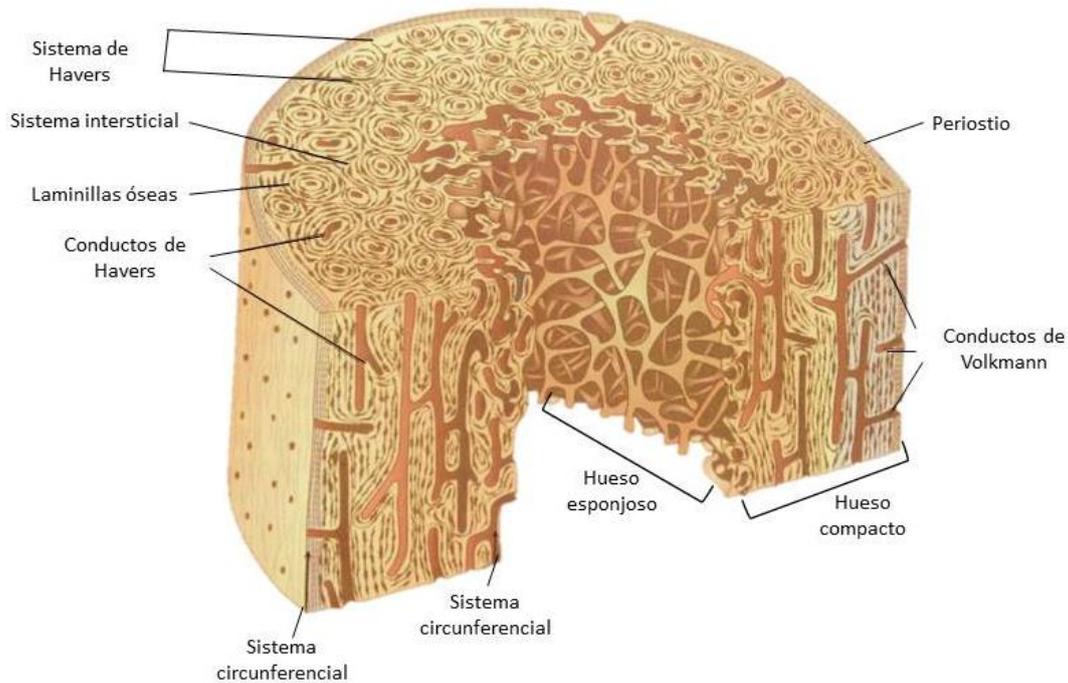


Figura 10. Representación de los componentes de un hueso adulto en un segmento transversal de la diáfisis. Adaptada de: Eynard (2010). *Histología y Embriología humanas*. [Figura]

La sangre que nutre al tejido óseo sale de la cavidad medular hacia el hueso y después lo abandona a través de las venas del periostio; por lo tanto, su flujo es centrífugo. Con respecto a la nutrición misma del hueso, los conductos de Volkman proveen la vía de entrada principal para los vasos que atraviesan el tejido óseo compacto. Los vasos sanguíneos más pequeños se introducen en los conductos de Havers, que contienen una arteriola y una vénula o un solo capilar. Una menor irrigación proviene de los vasos del periostio, que suelen irrigar sólo la porción más externa del tejido óseo compacto. El tejido óseo carece de vasos linfáticos; solo el periostio posee drenaje linfático.

Los huesos se pueden clasificar según su forma y la ubicación de los tejidos óseos compacto y esponjoso varía de acuerdo con la forma del hueso. Según su forma, los huesos se pueden clasificar en cuatro grupos: Huesos largos, huesos cortos, huesos planos y huesos irregulares.

Los huesos largos tienen un cuerpo, llamado diáfisis y dos extremos expandidos que reciben el nombre de epífisis (Figura 11). La superficie articular de la epífisis está cubierta de cartílago hialino. La porción del hueso entre la diáfisis y la epífisis se denomina metáfisis. Se extiende desde la diáfisis hasta la línea epifisaria. Una gran cavidad ocupada por la medula ósea, llamada cavidad medular, forma la parte interna del hueso. En la diáfisis, casi todo el espesor del tejido óseo es compacto; a lo sumo, sólo una pequeña cantidad de hueso compacto apenas forma

Introducción

una delgada cubierta externa. El resto de la superficie externa del hueso está cubierto por una cápsula de tejido conjuntivo fibroso, el periostio (Ross y Pawlina, 2015).

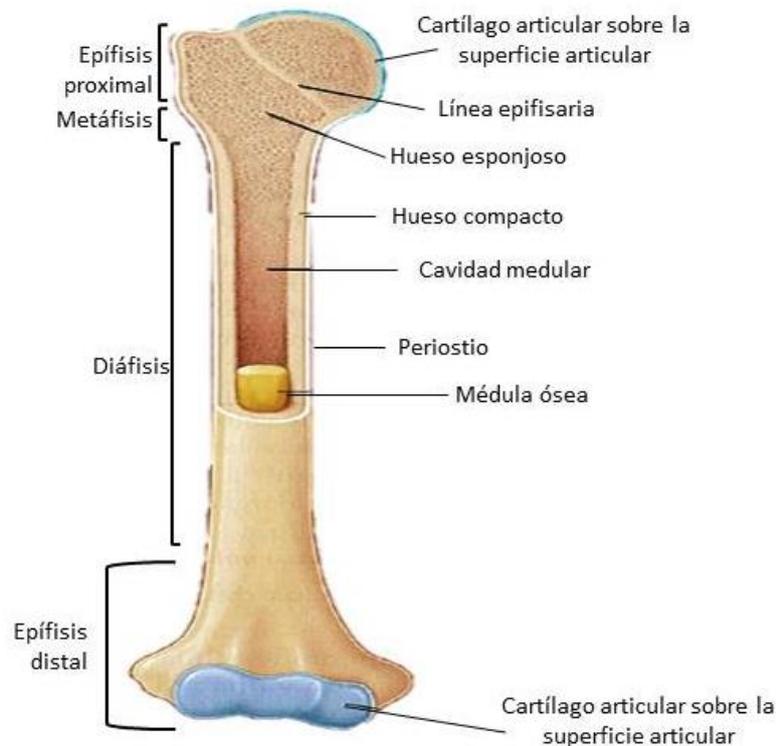


Figura 11. Estructura de un hueso largo. Adaptada de: Ross y Pawlina (2015). *Histología: texto y atlas: correlación con biología celular y molecular*. [Figura]

2.3.3. Células del tejido óseo

En la matriz ósea hay espacios llamados lagunas, cada una de las cuales contiene una célula ósea u osteocito. El osteocito extiende gran cantidad de evaginaciones en pequeños túneles llamados canalículos. Los canalículos atraviesan la matriz mineralizada, conectando lagunas contiguas y permitiendo el contacto entre las evaginaciones de los osteocitos vecinos. De esta manera, se forma una red continua de canalículos y lagunas con células y las evaginaciones de los osteocitos están comunicadas a través de uniones de hendiduras. El tejido óseo depende de los osteocitos para mantener su viabilidad (Ross y Pawlina, 2015).

Además de los osteocitos, en el tejido hay otros cuatro tipos celulares (Figura 12). Las células del tejido óseo se desarrollan a partir del mesénquima en una doble vertiente y su diversificación celular está regulada por un conjunto complejo de diversas citocinas y factores de crecimiento (BMP, FGF, IGF, TGF-beta), que inducen la diferenciación de cada variedad celular en localizaciones determinadas, estando las

células del primer grupo confinadas de manera indefinida en la proximidad de las superficies óseas (Eynard y cols., 2010).

- Células osteoprogenitoras, que son células derivadas de las células madre mensequimales; dan origen a los osteoblastos y tienen que ver con la formación del hueso.
- Osteoblastos, que son células que secretan la matriz extracelular del hueso; una vez que la célula queda rodeada por la matriz secretada, pasa a llamarse osteocito.
- Células de revestimiento óseo, que permanecen en la superficie ósea cuando no hay crecimiento activo. Derivan de aquellos osteoblastos que quedan después del cese del depósito óseo.
- Osteoclastos, que son células de resorción ósea presentes en las superficies óseas donde el hueso se está eliminando o remodelando o donde el hueso ha sido dañado.

Las células osteoprogenitoras y los osteoblastos son precursores del desarrollo de los osteocitos. Los osteoclastos son células fagocíticas producto de la fusión de células progenitoras hematopoyéticas en la medula ósea, que dan origen a los linajes granulocítico, neutrófilo y monocítico (Ross y Pawlina, 2015).

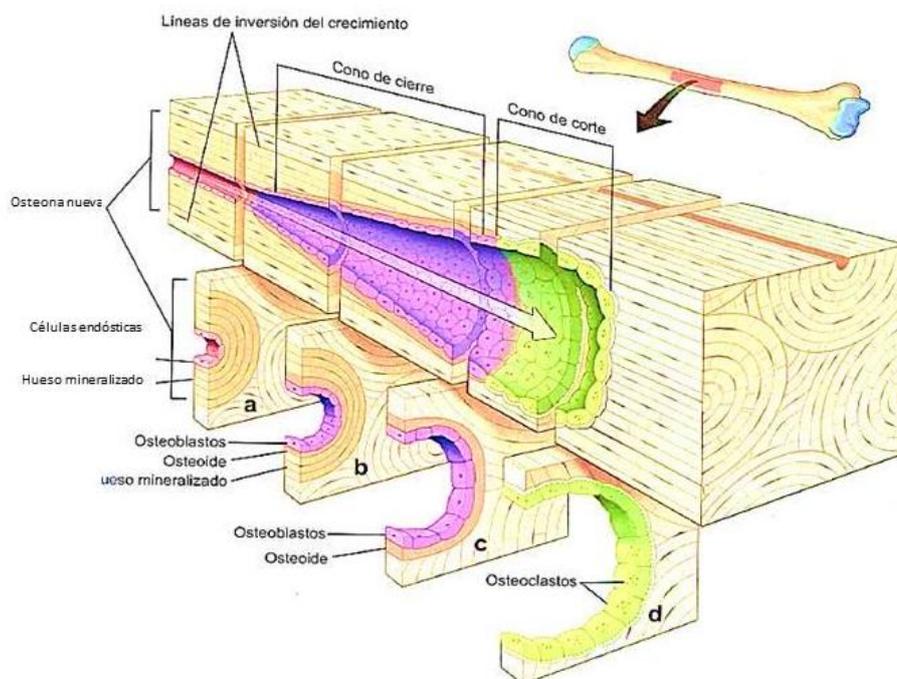


Figura 12. Diagrama de una unidad de remodelado óseo. Adaptada de: Ross y Pawlina (2015). *Histología: texto y atlas: correlación con biología celular y molecular.* [Figura]

2.3.4. Matriz ósea

La matriz ósea es el componente extracelular del hueso. Está formada por un componente orgánico denominado osteoide (35%) y por un componente mineral, la hidroxiapatita (65%). El osteoide está formado, predominantemente, por proteínas y sustancia fundamental (Cotran, 1995).

La característica singular de la matriz ósea, su dureza, proviene de su mineralización en los 15 primeros días tras su producción, al precipitarse sobre ella los cristales de hidroxiapatita (65% restante) y, en menor medida, otras sales minerales (Eynard, 2010). La hidroxiapatita (HA), molécula inorgánica, actúa también como depósito del 99% de calcio y del 85% del fósforo del organismo. La matriz ósea se sintetiza en una de las dos formas histológicas, reticular o laminar. El hueso reticular se produce rápidamente, como sucede durante el desarrollo fetal o la reparación de una fractura, pero la disposición aleatoria de las fibras de colágeno proporciona menos integridad estructural que las fibras de colágeno paralelas en hueso laminar producido lentamente. En un adulto, la presencia de hueso reticular siempre es anómala, pero no es específica de ninguna enfermedad ósea, porque puede estar presente en distintos trastornos. Un corte transversal de un hueso largo típico muestra una zona cortical externa densa y una cavidad medular central formada por trabéculas óseas separadas por médula ósea (Cotran, 1995).

Existen dos formas básicas de matriz extracelular (MEC):

- Matriz intersticial: se encuentra en los espacios que separan las células del tejido conjuntivo y entre el epitelio y las estructuras vasculares y musculares lisas de sostén; sintetizada por las células mesenquimatosas, tiende a formar un gel amorfo tridimensional. Sus componentes principales son los colágenos fibrilares y no fibrilares, así como otros proteoglicanos y glucoproteínas.
- Membrana basal (MB). La disposición aparentemente aleatoria de la matriz intersticial de los tejidos conjuntivos pasa a estar muy bien organizada alrededor de las células epiteliales, endoteliales y del músculo liso, donde forma la membrana basal especializada. La MB se encuentra bajo los epitelios y su síntesis depende tanto de éstos como de las células mesenquimatosas subyacentes. Tiende a formar un enrejado de tipo plano y sus componentes principales son el colágeno tipo IV, amorfo y no fibrilar, y glicoproteínas adhesivas (Kumar, 2008).

2.3.4.1. Funciones de la matriz ósea

La MEC es mucho más que un relleno en torno a las células; entre sus misiones figuran: sostén mecánico para el anclaje celular, determinación de la orientación de la célula (polaridad), control del crecimiento celular, conservación de la diferenciación celular, andamiaje para la renovación hística, establecimiento de microambientes hísticos, almacenamiento y presentación de moléculas reguladoras (Kumar, 2008).

2.3.4.2. Componentes de la matriz ósea

A) Componente mineral

El mineral es el fosfato de calcio en la forma de cristales de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ (Ross y Pawlina, 2015). La apatita es una forma compleja de fosfato cálcico. Los iones fosfato y de calcio pueden formar diversas sales; algunas cristalinas y otras amorfas. Desde el punto de vista microscópico, el apatito está formado por cristales pequeños con unas dimensiones (aproximadamente de 5-10-25nm y mucho más largos). Los cristales biológicos contienen otros iones, además de calcio y fosfato, como hidroxilo (OH^-) y fluoruro (F^-), por lo que se llaman hidroxiapatito y fluorapatito. Este último es el mejor modelo para el estudio de la estructura cristalina.

Considerando la función biológica que desempeña, el apatito deber ser poco reactivo. Sus reacciones principales son la de disolución en medios ácidos y la de intercambio de iones. Ambas tienen un aspecto perjudicial, pues suponen la disolución del hueso o el diente, pero, también un aspecto beneficioso, al convertir los tejidos calcificados en reguladores ácidos-base y electrolíticos de los líquidos con los que están en contacto (suero, saliva y líquido extracelular). Desde el punto de vista del equilibrio ácido-base, el apatito es una gran reserva alcalina, puesto que, en exceso de acidez, provoca una reacción de neutralización que solubiliza material. Por el contrario, un aumento de pH desplaza la reacción en sentido contrario, depositándose material (Lozano Teruel., 2005).

B) Componentes de la fase orgánica u osteoide de la matriz ósea

Proteínas. Clasificación de los tipos de proteínas del tejido óseo

Las proteínas que componen la MEC se pueden clasificar entre proteínas colágenas y no colágenas. Tanto el colágeno como los componentes de la sustancia fundamental se mineralizan para formar el tejido óseo, siendo los componentes de la sustancia fundamental: proteínas estructurales fibrosas, que confieren fuerzas de

tensión y retroceso; geles hidratados, que aportan elasticidad y lubricación, y glucoproteínas adhesivas, que conectan los elementos de la matriz entre sí y con las células (Kumar, 2008).

De las proteínas fibrosas el colágeno tipo I es el que está en mayor proporción (90%), y en menor medida, el colágeno tipo V. En la matriz también se han encontrado vestigios de otros tipos de colágeno, como los tipos III, XI, XIII. Todas las moléculas de colágeno constituyen alrededor del 90% del peso total de las proteínas de la matriz ósea. También encontramos en menor cantidad, glucosaminoglucanos y otras proteínas (Ross y Pawlina 2015; Cotran, 1995).

Los osteoblastos también sintetizan factores tróficos o de crecimiento que, una vez liberados al medio, quedan retenidos en la matriz (factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento transformante beta y la proteína morfogenética de hueso). Los factores de crecimiento son polipéptidos que estimulan la proliferación celular o la quimiotaxis (reclutamiento celular) de diversas variedades celulares. Además, se encuentran los aniones citrato, carbonato y los cationes magnesio y sodio, que son característicos del comportamiento extracelular (Eynard, 2010).

I. Colágenas

Los colágenos son proteínas estructurales fibrosas que proporcionan tensión. El colágeno constituye, aproximadamente, el 90% de la proteína total de los tejidos calcificados. Su estructura molecular contiene unidades de tropocolágeno, al igual que sucede con el colágeno del tejido conjuntivo. El tropocolágeno de los tejidos calcificados es mayoritariamente de tipo I y la fibra de colágeno es más insoluble por tener un menor recambio y formar un mayor número de entrecruzamientos entre residuos de hidroxilisina con lisina o hidroxilisinal. En cualquier caso, las moléculas de tropocolágeno, una vez situadas en el espacio extracelular destinado a calcificarse, adoptan una disposición tridimensional ordenada en filas paralelas, con huecos de unos 40nm entre cada unidad, mostrando mayores irregularidades que en el caso del tejido conjuntivo, no destinado a calcificarse. Estos huecos se van desplazando en las diferentes filas consecutivas, aproximadamente, una cuarta parte de la longitud de cada unidad de tropocolágeno, dando lugar a fibras similares a las de otros tejidos. La distancia entre las fibras de colágeno, antes del inicio de la mineralización, es mayor que en el tejido conjuntivo blando, lo que parece ser necesario para que el fosfato penetre en la red e inicie el proceso de mineralización (Lozano Teruel 2005). Las tres cadenas peptídicas distintas que forman el colágeno trenzadas como una triple hélice en forma de cuerda; pueden entrelazarse estrechamente porque los péptidos poseen

glicinas en cada tercera posición. Más de 30 cadenas peptídicas distintas forman aproximadamente 18 tipos diferentes de colágeno. Algunos de ellos son especiales de determinadas células y tejidos. Ciertos tipos de colágeno (p.ej., tipos I, III y V) forman fibrillas gracias a enlaces cruzados laterales de triple hélice; otros (p. ej., tipo IV) son no fibrilares y forman parte de las membranas basales. La fuerza de tensión de los colágenos fibrilares procede de sus enlaces cruzados, proceso que a su vez depende de la vitamina C. Los colágenos fibrilares constituyen una proporción mayor del tejido conjuntivo en las heridas en fase de curación y, en particular, en las cicatrices (Kumar, 2008).

-Elastina: aunque la fuerza de tensión deriva de los colágenos fibrilares, la capacidad de los tejidos para retroceder y recuperar su estructura inicial después de una fuerza física depende de su contenido en tejido elástico. Éste adquiere una importancia especial en las paredes de los grandes vasos, así como en el útero, la piel y los ligamentos. Morfológicamente, las fibras elásticas constan de un eje central de proteína elastina rodeado por una malla de glucoproteína fibrilina. Como los colágenos, las elastinas necesitan una glicina en cada tercera posición, pero a diferencia de ellos, tienen menos enlaces cruzados. La red de fibrilina sirve como andamiaje para el depósito de elastina y el ensamblaje de las fibras elásticas; los defectos de su síntesis producen anomalías óseas y debilidad de las paredes de la aorta (Kumar, 2008).

II. No colágenas

Este grupo de proteínas forman el 10% del peso total de la matriz ósea, esenciales para el desarrollo, el crecimiento, el remodelado y la reparación ósea, formando la sustancia fundamental del tejido óseo, y que se pueden clasificar en distintos grupos: Macromoléculas de proteoglucanos (condroitina sulfato, decorina, biglicano y hialuronano), glucoproteínas multiadhesivas, proteínas dependientes de vitaminas K osteoespecíficas, factores de crecimiento y citocinas (Ross y Pawlina, 2015).

Estas pueden ofrecer variaciones, aunque, en su mayor parte, son similares a moléculas del tejido conjuntivo, pertenecientes a las familias de proteoglicanos, sialoproteínas y proteínas ácidas. Las dos primeras son glicoconjugados, mientras que las proteínas ácidas son ricas en los aminoácidos Asp (Ácido Aspártico) y Glu (Ácido Glutámico). La elastina, la fibronectina, la oxitalina y las calbindinas son proteínas muy vinculadas a los ligamentos, tanto periodontal como del tejido

conjuntivo, en general. En resumen, las proteínas específicas más importantes para los distintos tejidos calcificados son:

- Sialoproteína. Está muy ramificada en sus cadenas glicídicas, y es rica en grupos ácidos como el ácido N-acetilneuramínico en la parte glicídica y en Asp y Glu, en la polipeptídica. En el cartílago existe otra sialoproteína análoga, de mayor tamaño que la del hueso mineralizado.
- Osteocalcina o BGP (proteína ósea con gamma-Glu). Tiene un gran contenido en gamma-carboxiglutamato, que se sitúa en esta proteína a distancias regulares e idénticas a las existentes entre los iones de calcio en el cristal de hidroxiapatito. Semejante a la osteocalcina, existe otra proteína de matriz menos abundante, la MGP, que contiene sólo cinco restos gamma-Glu por molécula.
- Osteonectina. Es una fosfoproteína ácida muy rica en aminoácidos hidroxilados (Ser y Thr), y dominios de interacción distintos, tanto para el colágeno, como para la hidroxiapatita.
- Osteopontina. Es una sialoproteína altamente fosforilada común en los huesos y dientes. Contiene regiones de poliaspartato y motivos RGD (aminoácidos Arg-Gly-Asp) que sirven para la interacción con la hidroxiapatita extracelular y con las integrinas del glicocáliz de membranas celulares. Es una proteína enigmática con múltiples funciones, puesto que se expresa en distintas fases del desarrollo óseo, la cicatrización de las heridas, la respuesta inmunológica y la oncogénesis. Estimula la actividad celular de líneas celulares muy diversas, y es una de las proteínas más investigadas para su posible aplicación en el remodelado y mantenimiento de los huesos y dientes (Lozano Teruel, 2005).
- Proteoglucanos y hialuronano. Estas moléculas forman geles compresibles muy hidratados que proporcionan elasticidad y lubricación. Constan de policasáridos largos denominados glucosaminoglucanos (p.ej., sulfato de dermanato y sulfato de heparan) unidos a un esqueleto de proteínas, de manera muy parecida a las cerdas sobre un cepillo para tubos de ensayo; ayudan a regular la estructura y la permeabilidad de la MEC.

El hialuronano es una molécula enorme formada por múltiples disacáridos repetidos sin un núcleo proteico. También es un componente importante de la MEC, sobre todo gracias a su capacidad para ligar volúmenes de agua y formar matrices viscosas parecidas a la gelatina. Además de aportar compresibilidad al tejido, los

proteoglicanos actúan como depósito de los factores de crecimiento secretados en la MEC. Cualquier lesión de la MEC libera el factor de crecimiento para que inicie el proceso de curación. Los proteoglicanos también pueden formar parte integral de las proteínas de la membrana celular y, como tales, modular el crecimiento y la diferenciación celular. Por ejemplo, el proteoglicano transmembranoso sindecán posee cadenas de hialuronano adheridas que pueden unirse a factores de crecimiento de la matriz como FGF; esta unión facilita las interacciones entre FGF y los correspondientes receptores de la membrana celular. El sindecán se asocia asimismo al citoesqueleto intracelular de actina para mantener la morfología normal de la lámina epitelial.

- Glucoproteínas adhesivas e integrinas. Las glucoproteínas adhesivas son moléculas estructuralmente diferentes, cuya principal función consiste en unir a los componentes de la MEC entre sí y con las células a través de las integrinas de la superficie celular. Estas proteínas incluyen, entre otras muchas, la fibronectina (componente principal de la MEC intersticial) y la laminina (componente principal de la MB), descritas aquí como prototipos de todo el grupo.

La fibronectina es un heterodímero grande (450kD) con enlaces disulfuro que se sintetiza por distintas células, tales como fibroblastos, monocitos y endotelio, y se relaciona con las superficies celulares, las MB y la matriz pericelular. Posee regiones específicas que se unen a una amplia gama de componentes de la MEC (p.ej., colágeno, fibrina, heparina y proteoglicanos) y también puede fijarse a las integrinas celulares mediante tripéptidos arginina-glicina-ácido aspártico. Esta secuencia de reconocimiento RGD desempeña un papel esencial en la adherencia entre célula y MEC.

La laminina es la glucoproteína más abundante de la MB. Se trata de un heterotrímero de 820 kD en forma de cruz que conecta las células a componentes de la MEC subyacente, como el colágeno tipo IV o el sulfato de heparán. Además de mediar en su unión a la MB, la laminina modula la supervivencia, la proliferación, la diferenciación y la movilidad de las células.

Las integrinas son una familia de glucoproteínas heterodiméricas (cadenas alfa y beta) transmembrana cuyas regiones intracelulares se relacionan con elementos del citoesqueleto. Las integrinas situadas sobre las células epiteliales o mesenquimatosas también se unen a la MEC mediante secuencias RGD; estas interacciones señalan la unión a la célula y pueden influir en su locomoción, proliferación empleadas por los

receptores de los factores de crecimiento; por ejemplo, la adherencia mediada por la integrina a la fibronectina estimula elementos de las vías de la MAP quinasa, la fosfatidilinositol 3-cinasa y la proteína quinasa C. Esto permite el acoplamiento de las fuerzas mecánicas extracelulares y las vías de síntesis y transcripción intracelulares.

Así pues, las proteínas adhesivas de la matriz, como fibronectina y laminina, pueden mediar directamente la adherencia, la propagación y la migración celular. Mediante la activación de vías intracelulares de señalización, la fibronectina mejora también la sensibilidad de ciertas células a los efectos proliferantes de los factores de crecimiento. En las primeras etapas de la cicatrización de las heridas cutáneas se acumulan en la MEC grandes cantidades de fibronectina procedente del plasma, que actúan como un andamiaje provisional para el crecimiento del endotelio y de los fibroblastos. Después de dos o tres días, las células endoteliales proliferantes de la zona de la herida en fase de curación sintetizan activamente fibronectina (Kumar, 2008).

2.3.5. Degradación ósea

Es la pérdida de la integridad histológica a nivel microestructural. Se puede producir por diferentes mecanismos incluyendo ruptura física, descalcificación, y la disolución debido a suelos ácidos y agua (Dent y cols., 2004). Hay diversas causas, pero la principal, es la actividad microbiana, que se inicia rápidamente tras la muerte (Barrientos y cols., 2016, Child, 1995, Bell y cols., 1996; Yoshino y cols., 1991). Por otro lado, la velocidad de la degradación varía en función del pH, la temperatura elevada, el lugar de enterramiento (Hedges, 2002), la cantidad de agua en el entorno inmediato al hueso circundante (Turner-Walker, 2008), el pH de las aguas subterráneas, (Turner-Walker, 2008; Lindsay, 1979), el tipo de suelo, su pH y composición (Child, 1995), la actividad microbiana (Ioan y cols., 2017).

2.3.5.1. Degradación de los componentes orgánicos

El cambio diagenético primario es el deterioro de la proteína principal (colágeno) del componente orgánico del hueso, que va a influir en el deterioro total de la fracción orgánica (Hedges, 2002; Collins y cols., 1995). Esta degradación del colágeno producirá un cambio en la organización del hueso, produciendo una gelatinización y pérdida total del colágeno (Miles y cols., 2000; Collins y cols., 1995).

La velocidad de este proceso 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 pH extremos también pueden causar hinchazón del colágeno y acelerar la hidrólisis, siendo particularmente sensible a los álcalis (Rudakova y Zaikov, 1987). En los enterramientos, el pH del suelo será mitigado por el mineral, y actuará como un tampón del pH (Collins y cols., 1995).

A) Degradación proteica

Durante la descomposición química postmortem, las proteínas primero se descomponen principalmente en proteasas, peptonas, polipéptidos y aminoácidos a través de la proteólisis que se produce a velocidades variables y depende de la acción de las bacterias, la cantidad de humedad y la temperatura del ambiente circundante, degradadas por las enzimas bacterianas. Las proteínas se reducen a compuestos de nitrógeno, fósforo y azufre (Ioan y cols., 2017; Forbes, 2008; Janaway y cols., 2009). (Figura 13.)



Figura 13. Esquema de la descomposición de proteínas postmortem. Adaptada de: Ioan y cols., (2017). The Chemistry Decomposition in Human Corpses. *REVISTA DE CHIMIE*, 68(6), 1352-1356. [Figura]

Las exoenzimas bacterianas desnaturalizan las proteínas y eventualmente liberan sus aminoácidos constituyentes (Gill King, 1996). Los aminoácidos posteriormente se someten a un desaminado (extracción de grupos amínicos) o descarboxilación (extracción de grupos carboxilo) y los que contienen azufre (es decir, cisteína, cistina y metionina) se desulfurizan, lo que al reducirse produce gas de sulfuro de hidrógeno, ácido pirúvico, sulfuros, amoníaco, tioles y sulfuros (Forbes, 2008; Gill-King, 1996; Janaway y cols., 2009), este último favorecido por el suelo

Introducción

anaeróbico, condiciones para los cadáveres enterrados. En los cementerios, el entorno anaeróbico del suelo detiene el proceso en esta etapa, y los sulfuros no se siguen transformando. En cambio, el oxígeno en condiciones aeróbicas ayuda a la transformación de sulfuro en sulfato, por bacterias específicas (por ejemplo, *Thiobacillus*), lo que contribuye a su posterior transformación en ácido sulfuroso (Ioan y cols., 2017) (Figura 14).



Figura 14. Esquema de la descomposición de sulfuro-amino ácidos. Adaptada de: Ioan y cols., (2017). The Chemistry Decomposition in Human Corpses. *REVISTA DE CHIMIE*, 68(6), 1352-1356. [Figura]

Durante el mismo proceso de descomposición, el nitrógeno de los aminoácidos se libera en forma de amoníaco (NH₃), y las condiciones ácidas del suelo (en ambientes de enterramiento) convertirá el amoníaco en amonio (NH₄⁺). El resto de amonio seguirá dos caminos: nitrificación y desnitrificación estando en ambos procesos hay involucradas diferentes bacterias. Durante el proceso de nitrificación (aeróbico), el amoníaco se transforma en nitrito y más adelante en nitrato. La desnitrificación (anaeróbica) induce la reducción de nitrato para generar nitrógeno gaseoso y óxido nitroso (Ioan y cols., 2017) (Figura 15).

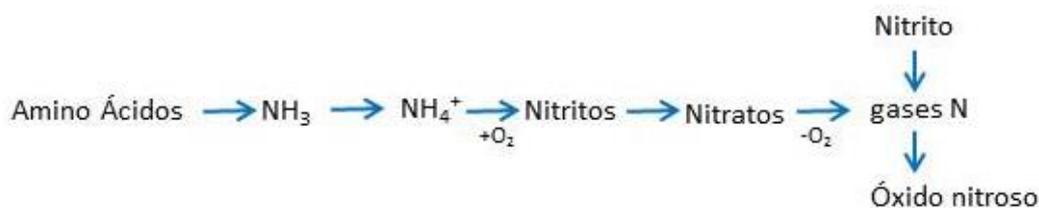


Figura 15. Esquema del proceso de nitrificación y desnitrificación. Adaptada de: Ioan y cols., (2017). The Chemistry Decomposition in Human Corpses. *REVISTA DE CHIMIE*, 68(6), 1352-1356. [Figura]

Además, este proceso genera productos intermedios, conocidos como aminas biogénicas que son subproductos de la proteólisis. Los más importantes son la histamina, putrescina (resultado de la descarboxilación L-ornitina), cadaverina (resultado de la descarboxilación L-lisina), tiramina, triptamina, betafeniletilamina, espermina y espermidina. Entre estos, la histamina, la triptamina y la feniletilamina son acompañados por la emanación de gases como el metano y dióxido de carbono, mientras que las diaminas tóxicas (cadaverina y putrescina) confieren el olor

característico de cuerpos en descomposición (Ioan y cols., 2017; Gill-King, 1996; Forbes, 2008; Pessione y cols., 2005; Vass, 2001) (Figura 1). Sin embargo, estas diaminas han estado siempre ausentes de los perfiles de compuestos orgánicos volátiles de restos humanos y del cerdo (Stadler y cols., 2013; Dekeirsschieter y cols., 2009; Hoffman y cols., 2009; Statheropoulos y cols., 2005; Vass, 2001). Por lo tanto, su importancia como productos de degradación de las proteínas no está clara.

La tasa de descomposición de las proteínas es distinta dependiendo de cada tejido. La proteólisis primero se produce en los tejidos blandos, como los tejidos neuronales y epiteliales (Janaway y cols., 2009; Forbes, 2008) y ocurre durante las primeras etapas de descomposición en el cerebro, el hígado y los riñones (Janaway y cols., 2009; Forbes, 2008). Los tejidos conectivos e integumentos (tejidos que contienen la proteína del colágeno), incluyendo la epidermis, la reticulina y las proteínas musculares, son más resistentes a la proteólisis, pero finalmente sucumben a la degradación (Forbes, 2008; Dent y cols., 2004; Gill-King, 1996).

El colágeno y la queratina persisten durante períodos postmortem más largos, ya que son altamente resistentes tanto a las enzimas hidrolíticas como a la degradación microbiana (Forbes, 2008). La descomposición del colágeno en los huesos se ve restringida en gran medida debido a su exclusión física de las enzimas extracelulares microbianas. Sin embargo, la tasa de degradación del colágeno es dependiente del tiempo, a la temperatura y al pH ambiental. Sin embargo, los tejidos duros están en gran medida protegidos de la proteólisis como resultado de su asociación con la hidroxiapatita (Collins y cols., 2002).

Del mismo modo, el cabello, la piel y las uñas, que contienen queratina (una proteína fibrosa insoluble) (Janaway y cols., 2009; Gupta y Ramnani, 2006), también tienen el potencial de permanecer intactos durante largos periodos de tiempo (Forbes, 2008; Wilson y cols., 2007; Linch y Prahlow, 2001;). La queratina es una proteína secundaria con una estructura rígida creada por extensas uniones de disulfuro y enlaces cruzados en la cisteína (Gupta y Ramnani, 2006). Su estructura impide su degradación por las enzimas proteolíticas comunes y sólo se utiliza como fuente de nutrientes por microorganismos queratinolíticos especializados (Janaway y cols., 2009; Gupta y Ramnani y cols., 2006;), que influyen en la velocidad a la cual estas estructuras se degradan o fragmentan (Wilson y cols., 2007).

2.3.5.2. Degradación de los componentes inorgánicos

La fase mineral se ve alterada por el agua, por lo que la cantidad de agua en el lugar de enterramiento será clave en el proceso de degradación de esta fase (Hedges, 2002; Pike y cols., 2001; Hedges y Millard, 1995). A su vez, las transformaciones minerales, expondrán al colágeno y acelerarán la degradación química y biológica.

Los cristales de hidroxiapatita son termodinámicamente inestables, por lo tanto se producen cambios en la cristalinidad después del enterramiento (Grynpas, 1976). Las alteraciones minerales que se producen como resultado de la acción del medio ambiente, 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).

3.JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3.1. JUSTIFICACIÓN

Determinar la data de muerte, es estimar el tiempo transcurrido desde la muerte, lo cual puede efectuarse en periodos de tiempo inmediatos cuando se trata de una muerte reciente, o por el contrario periodos de tiempo mediatos o alejados, cuando han transcurrido días, semanas, meses o años de haberse producido la muerte. Dependiendo de la legislación de cada país, identificar el momento de la muerte es importante tanto para las investigaciones legales como para la reconstrucción de los hechos.

Desde el punto de vista del derecho penal, una estimación precisa de IPM ayuda en procesos civiles (Ferreira y cols., 2017; Ahi y Garg, 2011; Henssge y Madea, 2007; Zhou y cols., 2007; Tanaka y cols., 2002; McDowall y cols., 1998), y en investigaciones criminales para verificar las declaraciones de los testigos, limitar el número de sospechosos y evaluar sus declaraciones. También es de crucial importancia para los investigadores forenses, especialmente cuando están reuniendo evidencia que puede apoyar o negar las acciones declaradas por los sospechosos en un presunto acto criminal (Salam y cols., 2012, Ahi y Garg, 2011; Kaliszan y cols., 2009; Pounder, 1995).

La determinación del intervalo post mortem es un problema central de la práctica forense (Le Graff, 2017). Debido a la gran variabilidad de circunstancias que rodean a la muerte y el estado en que se puede encontrar el cadáver, hay diversas metodologías que se pueden aplicar. En la fase temprana de descomposición (~0-36 h postmortem, hpm), el método más preciso para determinar el IPM es la medida de la temperatura corporal que se basa en la disminución de la temperatura central del cuerpo desde 37 °C (Madea, 2016). Otros métodos adicionales para la delimitación del IPM en esta fase implican reacciones supravitales del tejido (Rodrigo, 2016), como la estimulación eléctrica del músculo del párpado y excitabilidad farmacológica del iris (Rognum y cols., 2016; Perper, 1993). Adicionalmente también se emplea el análisis de potasio e hipoxantina en el humor vítreo, aunque cada vez menos debido a su grado de incertidumbre (Belsey 2016; Haskell y Catts, 2008), también se emplean el rigor y livor mortis y recientemente el análisis de la expresión génica (Maile 2017; Tarone y Foran, 2011).

La última fase (a partir de las 72 hpm) está relativamente bien caracterizada por la entomología forense (Metcalf, 2016). Más recientemente, la última fase se puede

identificar por cambios post mortem de la comunidad microbiana en el abdomen y en la piel (Perchal, 2014) o degradación del ARN de la pulpa dental y análisis colorimétrico de la descomposición de la pulpa (Maldonado, 2010; Al-Shareef, 2017; Javan y cols., 2016).

La mayoría de métodos y parámetros para la estimación de la data de la muerte, como hemos visto, se realizan en un intervalo de muerte reciente. En el intervalo de las 24 a las 72 h se requiere la utilización conjunta de los datos bioquímicos junto con un conjunto de datos complementarios que dependen de las características concretas del caso, y a partir de las 72 h las dificultades se incrementan exponencialmente; si bien el uso de la fauna cadavérica resulta un indicador útil, es preciso disponer de estudios específicos regionales para aumentar la precisión de la estimación (Maldonado, 2010; Al-Shareef, 2017). Además, los procesos agónicos, pocas veces son tenidos en cuenta en los estudios de este campo y pueden alterar algunos parámetros bioquímicos que posteriormente se emplean para la estimación de la data muerte, y detectar estas alteraciones puede ayudar a hacer una estimación más aproximada de la data.

Todas las técnicas empleadas para la estimación del IPM se pueden usar por separado o en combinación, pero la estimación del IPM se vuelve más difícil gradualmente a medida que éste aumenta (debido a descomposición sustancial o la esqueletización del cuerpo) (Le Graff, 2017) y, a menudo, depende de los cambios post mortem y los procesos de descomposición. En contraste con las fases post mortem temprana y tardía, hay una falta de métodos fiables para la delimitación de IPM entre las 36 y 120 hpm, y a partir de las 120 hpm. Varios estudios se están llevando a cabo para estrechar esta falta de conocimientos. Sin embargo, los nuevos estudios en este campo presentan grandes debilidades con respecto a su practicabilidad y precisión (Pittner y cols., 2016a).

La dificultad llega cuando hay casos en los que los métodos habituales no se pueden emplear, por las condiciones del cadáver o por el estado de los restos hallados, de ahí la necesidad de establecer métodos nuevos y multicéntricos basados en la complementariedad de los métodos y con un número suficiente de casos que nos permitan desarrollar modelos matemáticos explicativos fiables, que tengan en cuenta el peso de los diferentes factores (individuales premortem, postmortem y ambientales) (Maldonado, 2010).

Con este trabajo pretendemos contribuir a mejorar la determinación de la data de la muerte, en data temprana y tardía, y las matrices usadas con este fin le confieren al trabajo una relevancia especial.

3.2. OBJETIVOS

PRIMER OBJETIVO GENERAL:

Estudio del perfil proteico en huesos largos humanos con un intervalo postmortem tardío, entre 5-20 años, y su posible aplicación a la data de la muerte.

Objetivo específico:

- Identificación de aquellas proteínas para estudiar si hay un perfil proteico o no y que nos pueda ayudar a la estimación del IPM.

SEGUNDO OBJETIVO GENERAL:

Estudio de las modificaciones morfológicas e histológicas postmortem del cristalino en un el intervalo postmortem intermedio (24-96 hpm) y sus aplicaciones al establecimiento del intervalo postmortem.

Objetivo específico:

- Establecimiento de criterios para a estimación del IPM en función de los hallazgos estructurales en el cristalino (fibras y proteínas).

TERCER OBJETIVO GENERAL:

Analizar las concentraciones de los elementos del humor vítreos (potasio, fosfato, hipoxantina, ácido úrico, microproteínas, microalbúmina, cloruro, sodio, urea y la presión osmótica) en un intervalo postmortem reciente, menor de 24 horas y sus posibles aplicaciones para la estimación de la data de la muerte.

Objetivo específico:

- Selección y aplicación de los parámetros bioquímicos ideales para aplicarlos como factores de corrección en el IPM.

4.MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. TIPO DE ESTUDIO

Este trabajo está formado por tres estudios experimentales, dos de ellos se centran en mejorar la estimación del intervalo postmortem en matrices de data reciente (cristalino y humor vítreo del ojo), y el tercero en data tardía (hueso).

4.2. OBJETIVO 1 → PRIMER ESTUDIO

La estimación de la data de la muerte en cadáveres en fase de esqueletización es uno de los problemas más importantes por sus repercusiones médico-legales. Para cumplir con este objetivo analizamos el perfil proteico en hueso seguimos el siguiente procedimiento:

4.2.1. Descripción y toma de la muestra

4.2.1.1. *Hueso*

Se obtuvieron fragmentos óseos de hueso compacto (posición similar en todos los casos) del fémur proximal de 40 cadáveres (33 hombres y 7 mujeres, rango de edad 20-93 años, rango de intervalo postmortem 5-20 años). Los huesos fueron extraídos de nichos de un cementerio en Murcia, una zona de muy poca lluvia. Los inviernos son suaves con temperaturas que oscilan entre 5 y 19 ° C, mientras que los veranos son calurosos con temperaturas que oscilan entre 22 y 40 ° C. El cementerio está situado en un área seca y en un suelo rico en cal y yeso. Los huesos habían permanecido en nichos durante tiempos documentados de entre 5 y 20 años. La fecha de la muerte se obtuvo del registro del cementerio y luego se verificó con los documentos del registro civil. Los restos, que estaban completamente esqueletizados, fueron enterrados de tal manera que los restos óseos no entraron en contacto con el suelo. Los procesos diagenéticos que inducen transformaciones de la matriz mineral ósea, fueron mínimos. Teniendo en cuenta que los huesos se identificaron y se autentificaron utilizando datos totalmente fiables, no se utilizaron estándares de referencia ósea, aunque se usaron estándares internos para verificar la confiabilidad y precisión de los análisis.

Los casos (n = 40) se distribuyeron en tres categorías de IPM: Grupo 1: 5-12 años post mortem, (n = 24); Grupo 2: 13-20 años post mortem (n = 16).

4.2.2. Procedimientos experimentales

4.2.2.1. Extracción proteica y proteólisis

El protocolo seguido para la extracción de proteínas óseas de los estudios es una modificación de varios protocolos con el fin de aumentar el rendimiento de extracción y la interpretación de los resultados (Procopio y cols., 2016; Pérez-Martínez y cols., 2016; Cleland y cols., 2012; Zeeberg y cols., 2003).

Las secciones cortadas de hueso se molieron en un molino de bolas (Tehcnica Milmiz 20) para facilitar la extracción de los constituyentes orgánicos de hueso. Primero, se lavaron 350 mg de polvo de cada muestra de hueso para eliminar contaminantes con solución salina tamponada con fosfato 1 M (PBS), pH 7.4 durante la noche a 4°C. Después del lavado, para mejorar el rendimiento de extracción, se eliminó cualquier material inorgánico del hueso. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 4000 rpm en una microcentrífuga de mesa. El sobrenadante se descartó y los gránulos se recogieron para su extracción a 4 °C durante una noche en 7.5 ml HCl 1M. El sobrenadante resultante (proteínas solubles en ácido) se recogió para un análisis posterior. El sedimento se lavó con agua y se extrajo durante 48 a 4°C en tampón de lisis que contenía Tris 100 mM y Urea 6M a pH 7.4, para extraer proteínas óseas no colágenas insolubles en agua estrechamente asociadas con los cristales de hidroxiapatita en la matriz mineralizada (Figura 16). Finalmente, se añadió tripsina (tripsina / proteína 1: 20-1: 100) a ambos sobrenadantes y las soluciones se incubaron a 37 °C durante 20 h. Las digestiones tripticas se desalaron con cartuchos de fase sólida C₁₈ (Pierce C18 Spin Columns, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.).

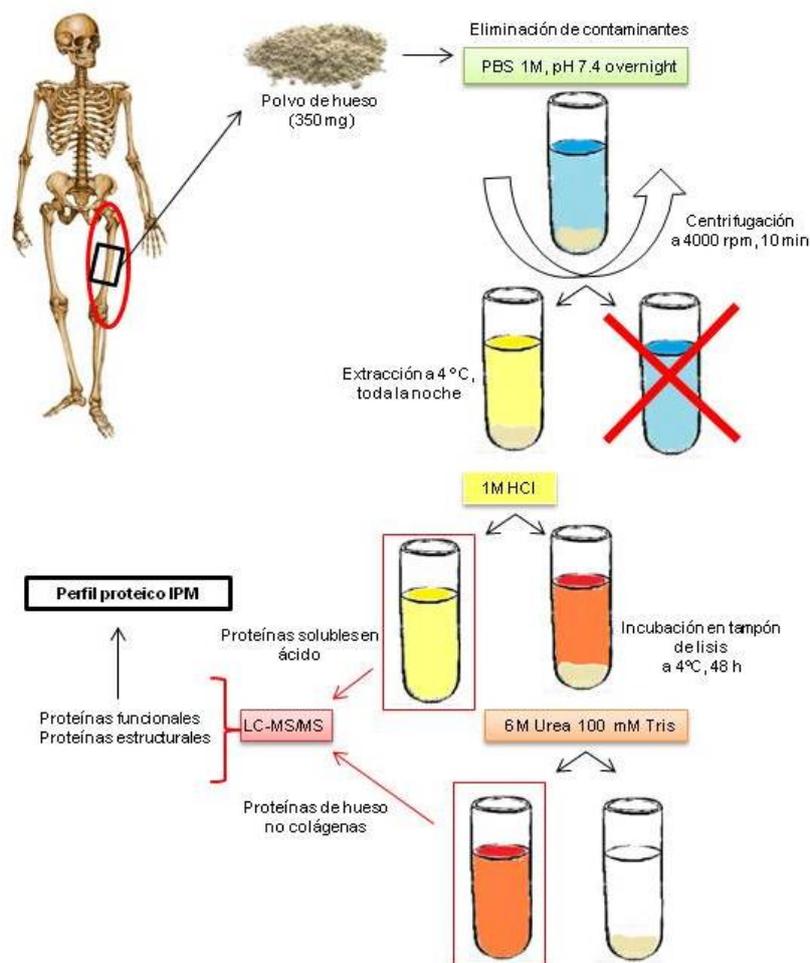


Figura 16. Esquema de la extracción y proteólisis de proteínas en hueso.

4.2.3. Cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas (LC-MS/MS)

Se analizaron 40 μ l de volumen de cada una de las 40 muestra en un sistema formada por un HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) con una columna de HPLC específica para la separación y análisis de péptidos (Waters Xbridge BEH300 C18 (5 μ m, 150 x 1 mm) acoplado a un espectrómetro de masas (resolución de 120 k, exploración completa, modo positivo, rango de masas normal 350-1500). Se empleó un gradiente del 0% B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo) al 80% durante 180 min a un flujo constante de 10 μ l/min. 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%.

4.2.4. Análisis de datos

Las masas de péptidos obtenidas por HPLC/MS/MS se compararon con la base de datos de Homo sapiens (humano) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (versión de julio de 2015) con las secuencias de proteínas primarias y se utilizó el análisis de datos 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.). La tolerancia de masa fue de 2 Da para masas primarias y 1 Da para las masas de los fragmentos. El criterio de selección y validación de los péptidos fue el de Mill (Kapp y cols., 2005), lo que permite conocer con un grado de confianza la presencia del péptido en las muestras de estudio. Los péptidos validados se usaron para identificar un conjunto de proteínas a partir del cual se creó un archivo de resultados. Con una tasa de identificación de falsos positivos estimada del <5%, se identificaron un total de 275 proteínas en el estudio.

4.2.5. Análisis, selección y caracterización de proteínas

Las proteínas que se pueden encontrar en la parte orgánica del hueso incluyen diferentes tipos de colágeno y proteoglicanos (PG), que se consideran componentes estructurales. Las proteínas no colágenas y las proteínas específicas de los huesos, pueden desempeñar un papel durante el proceso de mineralización, o exhiben una amplia gama de funciones que incluyen el control de la proliferación celular, las interacciones célula-matriz y la mediación de hidroxapatita (Makrodimitris y cols., 2007). Las proteínas que circulan en los vasos sanguíneos, como los factores de crecimiento, las citoquinas, relacionadas con las funciones de defensa del cuerpo, se absorben en la matriz ósea después de la muerte como resultado del cese de la circulación. Por lo tanto, su presencia es ocasional y está condicionada por factores intrínsecos de la persona, así como por cualquier condición previa y procesos patológicos sufridos, por lo que no proporcionaría gran información para la estimación

de la fecha de la muerte. Por esta razón, están excluidos de este estudio. Sin embargo, la información que proporcionan es muy valiosa para conocer las patologías sufridas (Pérez-Martínez y cols., 2016).

Las proteínas previas incluidas en este estudio son estructurales (colágeno y proteoglicanos) y funcionales, y aquellas que participan en procesos óseos (proteínas no colágenas y proteínas específicas del hueso), ya que su presencia no es eventual y no depende de los factores intrínsecos de la persona.

Para facilitar la interpretación de los datos, las proteínas incluidas en el estudio se agruparon en 2 grupos según el intervalo postmortem que caracterizan: grupo A (5-12 años postmortem), grupo B (13-20 años postmortem). Para asignar una categoría funcional a cada una de las proteínas, se utilizó el programa Ontology GoMiner y STRING 10.5.

4.2.6. Análisis estadístico

Recientemente, Procopio y cols. (2018) relatan la abundancia de las proteínas con el IPM a partir de experimentos con restos forenses. En esta investigación se realizó un análisis de correspondencia múltiple (MCA) sobre la abundancia normalizada visualizada por separado para cada muestra. Este trabajo ha sido de mucha ayuda para establecer nuestro modelo de análisis.

El análisis de correspondencia múltiple (MCA) fue aplicado a las variables (proteínas) observada en las muestras a través del programa Progenesis usando el software R, versión 3.4.3, con el paquete FactoMineR (Lê y cols., 2008; Husson y cols., 2017) para estimar una aproximación dimensional alta de las proteínas y optimizar la caracterización de los huesos como una función de estas proteínas y obtener una representación individual de los huesos en función de las proteínas que mejor los describen (Husson y cols., 2017).

Las dimensiones cuantificadas usando el MCA representan combinaciones de múltiples variables y modalidades como un método que reduce la información para una fácil interpretación. Una dimensión explica las variaciones de una variable combinando su posición relativa en el eje basándose en su nivel de correlación con esa dimensión. Se puede realizar una visualización simultánea de dos planos con las proteínas que caracterizan esa dimensión, los individuos y los grupos de IPM que las contienen.

Por otro lado, el programa STRING (versión 10.5) fue usado para crear interacciones proteína-proteína para cada muestra, representando las líneas que las unen la fuerza de la interacción, y habiendo un mínimo de puntuación requerida de 0.400 como nivel de confianza.

4.3. OBJETIVO 2 → SEGUNDO ESTUDIO

Para poder llevar a cabo este primer objetivo realizamos un estudio morfológico e histológico del cristalino, en el que medimos su absorbancia y esfericidad. Para ello seguimos la siguiente metodología:

4.3.1. Descripción y toma de la muestra

4.3.1.1. Cristalino

Los cristalinos (n=80) fueron extraídos de 40 conejos con una edad media de 84,02 días (rango edad 75-95 días) sacrificados en un matadero local. Todos los animales usados fueron tratados en un proceso habitual de la empresa y no fueron sacrificados exclusivamente para el experimento. En el laboratorio del Área de Medicina Legal y Forense de la Universidad de Murcia, los cristalinos fueron expuestos a temperatura ambiente en una habitación a 21.3°C durante 24 hpm, a 21.4 °C durante 48 hpm, a 22.4 °C durante 72 hpm, y a 22.7 C durante 96 hpm.

Los animales fueron tratados según la legislación española (RD 1201/05) de acuerdo con los principios de la Directiva UE 86/609. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Murcia (España).

4.3.2. Procedimientos experimentales

4.3.2.1. Enucleación y medida de la esfericidad y absorbancia

Los 80 cristalinos se clasificaron en cuatro grupos de 20 muestras cada uno. Cada 24 h todas las lentes de un grupo determinado fueron enucleadas (primer grupo a las 24 h postmortem, segundo grupo a las 48 hpm, tercer grupo a las 72 hpm y el último grupo a las 96 hpm) haciendo una incisión lateral y cortando los músculos orbitales (Harris y Gehrsitz, 1953). Una vez extraídas, las 20 lentes se colocaron en solución salina fisiológica, su absorbancia se midió a 365, 370, 375, 415 y 420 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 (Bassnet y cols., 1988). La absorbancia de cada lente ocular se midió directamente en una cubeta de plástico de 1 cm diseñada y desarrollada en nuestro laboratorio (Figura 17), y una cubeta vacía se usó como blanco. El diseño especial de la cubeta permitió que la lente se mantuviera en posición vertical, de modo que su propio peso y el efecto de la gravedad no

Material y Métodos

afectarán su estructura ya que estaba sostenida por los bordes, dejando la parte central en su posición anatómica correcta cuando los rayos fueron dirigidos a él (Figura 17).

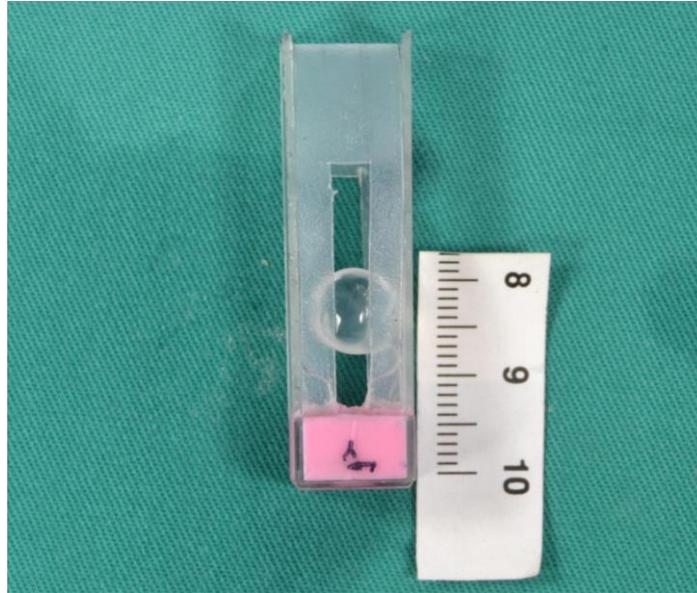


Figura 17. Cubeta diseñada atendiendo a la estructura y dimensiones del cristalino. Es una cubeta de plástico normal, a la que se le han quitado dos de las cuatro caras y se le ha añadido una base de plastilina donde se ha fijado el material plástico en forma de pinza con una abertura en medio de 0,5 mm donde la lente queda sujeta pinzada por sus laterales y queda despejado su centro por donde inciden los rayos de luz en la lente y donde se realiza la medición de la absorbancia.

Después de la medición de la absorbancia, las lentes se fotografiaron con una cámara digital Nikon DX (AF-S DX NIKKOR), a una distancia de 20 cm y con una resolución de 10.2 megapíxeles. El programa de análisis de imagen UTHSCSA se usó para medir el diámetro más grande y el más pequeño, y para calcular la esfericidad de la lente (Figura 18). De esta forma, pudimos evaluar cualquier modificación de la transparencia o translucidez en función del IPM.

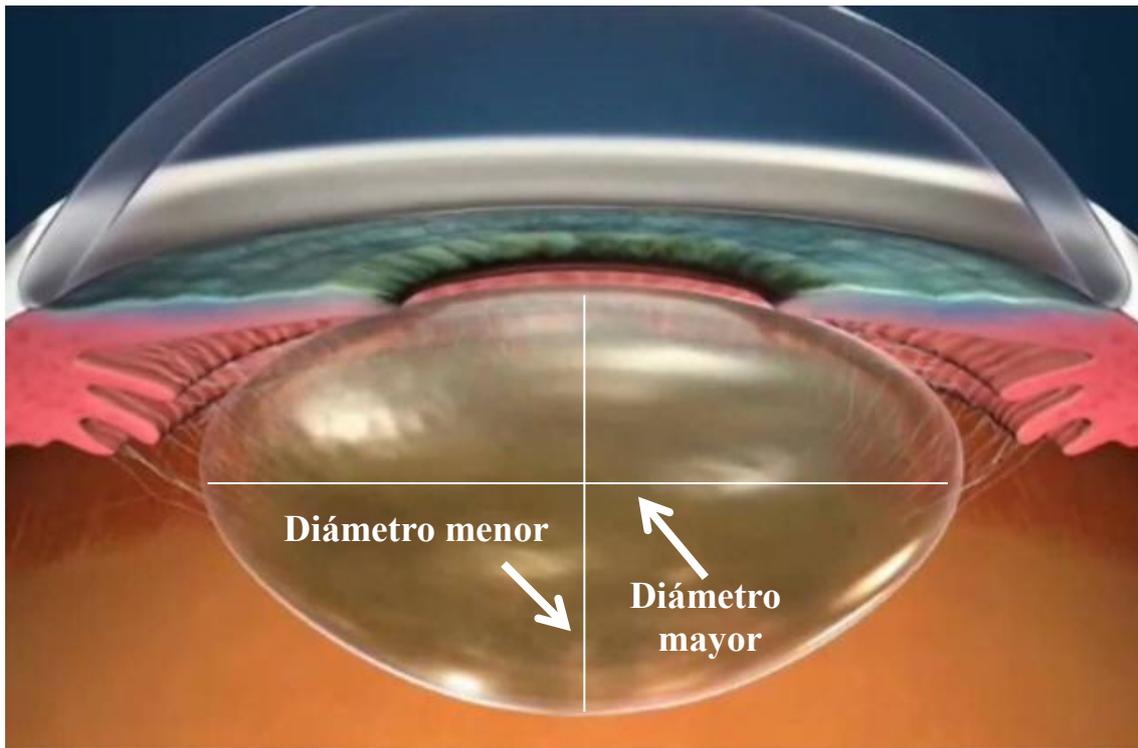


Figura 18. Esquema de la medición de los diámetros mayor y menor para la esfericidad.

4.3.3. Estudio histológico

Después del examen visual mediante el programa de análisis de imagen, la lente ocular se fijó en formol tamponado al 10% durante 22-30 días y se incluyó en parafina. Se obtuvieron secciones (4 μ m de espesor) de cada bloque de parafina y se colocaron en un portaobjetos de vidrio SuperFrost (Menzel-Gläser, Braunschweig, España). Después de la desparafinación y rehidratación en alcoholes graduados, se aplicó hematoxilina y eosina para su tinción.

4.3.4. Análisis estadístico

El programa estadístico empleado para realizar los análisis estadísticos fue el SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

En el caso de los cristalinos se calculó la media, la desviación estándar (SD) y los niveles de confianza del 95%. Y se empleó para comparar grupos, el test de Kruskal-Wallis, una prueba no paramétrica para más de dos muestras independientes. Además, se realizaron contrastes específicos para cada variable agrupada según la categoría de diagnóstico utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para dos muestras independientes.

Los casos se consideraron estadísticamente significativos cuando los valores de p fueron menores de 0.05.

4.4. OBJETIVO 3→ TERCER ESTUDIO

El humor vítreo es una de las matrices más empleadas para la estimación de la data de la muerte en cadáveres recientes. Para dar respuesta a este objetivo en nuestro segundo estudio, seguimos la siguiente metodología:

4.4.1. Descripción y toma de la muestra

4.4.1.1. Humor vítreo

Se analizaron un total de 298 muestras de humor vítreo del ojo derecho, tomadas de cadáveres humanos sin ninguna patología previa médica conocida, durante autopsias rutinarias médico-legales en el Instituto Anatómico Forense de Murcia. El intervalo postmortem medio (IPM) fue de 19.9 ± 13.31 (horas \pm SD). Del total de muestras, el 68.5% eran hombres (204) y el 31.5% mujeres (94) con una edad promedio de 59.43 ± 20.66 (años \pm SD). La causa de muerte había sido de forma natural o violenta (151 y 147 casos, respectivamente) y las principales causas de muerte fueron infarto de miocardio (52,3%), lesiones múltiples (48,3%), asfixia (32,7%) o intoxicación (19%) (Tabla 1). Aproximadamente 0.2 ml de humor vítreo fue aspirado de la esclerótica cerca del canto externo del ojo, usando una jeringa estéril de 1 ml, equipada con una aguja de calibre 20. Para evitar la degradación, las muestras se almacenaron inmediatamente y se congelaron a -72 ° C hasta su análisis.

4.4.2. Procedimientos experimentales

Todos los análisis se realizaron en el sobrenadante después de la centrifugación durante 10 minutos (3000 rpm a 4°C) de la muestra de humor vítreo previamente descongelada. Las concentraciones de potasio, fosfato, hipoxantina, ácido úrico, microproteínas, microalbumina, cloruro, sodio se determinaron en un autoanalizador, modelo 7117 HITACHI Multicanal Autoanalyser (Boehringer Mannheim). La presión osmótica (OP) se determinó mediante un osmómetro modelo K-7400 Knauer (Knauer).

Todos los análisis fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Murcia (España).

4.4.3. Análisis estadístico

El programa estadístico empleado para realizar los análisis estadísticos fue el SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

En el caso del humor vítreo, los datos sociodemográficos y los resultados se recopilaron en una base de datos (Microsoft Access 2.0; Microsoft Corporation, Seattle, WA) y todos los resultados se expresan como la media \pm SD o como un porcentaje. Empleamos una correlación de Pearson para establecer la correlación entre los componentes bioquímicos de los humores vítreos y el IPM. Además, realizamos un análisis de correlación y análisis de varianza entre todas las variables y el IPM utilizando regresión lineal múltiple para determinar el grado en que la variable dependiente podría ser explicada por la variable independiente. Consideramos estadísticamente significativos los casos cuando los valores de p fueron menores de 0.05.

5.RESULTADOS

Artículo 1: Prieto-Bonete, G., Pérez-Martínez, C., Pérez-Cárceles, M. D., & Luna, A. (2018). Association between protein profile and postmortem interval in bone remains. *Journal of Proteomics*. (In press). doi.org/10.1016/j.jprot.2018.08.008 (Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391918303129>)

Artículo 2: Prieto-Bonete, G., Perez-Carceles, M. D., & Luna, A. (2015). Morphological and histological changes in eye lens: Possible application for estimating postmortem interval. *Legal Medicine*, 17(6),437-442. doi:10.1016/j.legalmed.2015.09.002 (Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1344622315300249>)

Artículo 3: Prieto-Bonete, G., Legaz, I., Pérez-Martínez, C., Pérez-Cárceles, M. D., & Luna, A. (2017). Biochemical correction factors to estimation of post-mortem interval in vitreous humor. *Romanian Journal of Legal Medicine*, 25(2), 201-204. doi: 10.4323/rjlm.2017.201. (Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/319797747_Biochemical_correction_factors_to_estimation_of_post-mortem_interval_in_vitreous_humor)

Artículo 1: Prieto-Bonete, G., Pérez-Martínez, C., Pérez-Cárceles, M. D., & Luna, A. (2018). Association between protein profile and postmortem interval in bone remains. *Journal of Proteomics*. (In press). doi.org/10.1016/j.jprot.2018.08.008

Proteomic techniques in bones forensic samples are increasingly, being applied. The main aim of forensic sciences is the estimation of postmortem interval. Most current techniques are useful for the first post-mortem stages. However, in the case of osseous remains, these techniques may be difficult to use due to the high level of decomposition of the sample. Our objective was to attempt to know whether there is a protein profile in human bone remains that would enable a late postmortem.

Interval ranging from 5 to 20 years postmortem to be estimated. A total of 40 femur bones from 40 different cadavers (data range 5–20 years) were use. Of the 275 total proteins, we excluded the circulating ones (n=227), leaving a total of 48 proteins (29 structural and 19 functional) were found. A multiple correspondence analysis was applied on the 48 proteins. Finally selecting 32 proteins that allowed us to discriminate between the. Two groups of postmortem interval. Analysis of the protein profile present in bone permits an approximation of the date of death within the studied interval, and could be used to complement other tests for estimating the postmortem interval.

Keywords: Forensic science; Proteomic; Bone remain; Protein profile; Postmortem Interval.

Artículo 2: Prieto-Bonete, G., Perez-Carceles, M. D., & Luna, A. (2015). Morphological and histological changes in eye lens: Possible application for estimating postmortem interval. *Legal Medicine*, 17(6),437-442. doi:10.1016/j.legalmed.2015.09.002

Establishing the postmortem interval is a very complex problem in Forensic Science despite the existence of several macro- and microscopic methods. In the case of ocular methods, most are based on an evaluation of the biochemical components of the vitreous humour 24–36 h after death, but, to our knowledge, there are no studies on the relationship between lens and the postmortem interval. Since the lens is protected between the vitreous humour and the aqueous humour inside the eyeball, postmortem changes are assumed to start later in the lens. To evaluate the usefulness of using the lens to establish the postmortem interval, we examined 80 rabbit lens enucleated 24, 48, 72 and 96 h after death, assessing changes in sphericity and absorbance at different wavelengths and any histological alterations. Both sphericity and absorbance were seen to decrease to a statistically significant extent, and there was a gradual loss of structure and organisation of the lens components as a function of the postmortem interval. Modifications in the lens were seen to be useful for determining the postmortem interval between 24 and 96 h.

Keywords: Postmortem Interval; Eye lens; Corneal transparency; Proteins; Histology.

Artículo 3: Prieto-Bonete, G., Legaz, I., Pérez-Martínez, C., Pérez-Cárceles, M. D., & Luna, A. (2017). Biochemical correction factors to estimation of post-mortem interval in vitreous humor. *Romanian Journal of Legal Medicine*, 25(2), 201-204. doi: 10.4323/rjlm.2017.201.

Vitreous humor is the matrix chosen on most occasions because it is less likely to be affected by postmortem changes. Potassium concentration is the common measurement of estimation time since death in vitreous humor, but there are another electrolytes concentrations are stable after death. The aim of this study was to analyze whether any of the components or characteristics of VH can be use as inner standard in a postmortem interval of less than 24 hours to accurately estimate the time of death in both natural and violent death. A total of 298 vitreous humor from 298 different cadavers (204 males, 94 females) with a mean age of 19.9 ± 13.31 (hours \pm SD) and different causes of death (myocardial infarction, multiple injuries, suffocation or intoxication).The concentrations of potassium, phosphate, hypoxanthine, uric acid, microproteins, microalbumine, chloride, sodium were determined. After measurement, we observed that chloride, sodium, urea and osmotic pressure were independent of the PMI. Our results show that sodium concentration is the best inner standard to have a accurate estimation of post-mortem interval and it can give information about disturbed electrolyte homeostasis at the moment of death.

Keywords: Forensic medicine; Vitreous humor, Inner standard, Stable electrolytes; Post-mortem interval.

6. APORTACIÓN DE LA DOCTORANDA EN CADA ARTÍCULO

Artículo 1: “Association between protein profile and postmortem interval in bone remains.”

En este artículo publicado en la revista Journal of Proteomics por Gemma Prieto Bonete, María Dolores Pérez Cárceles, Antonio Maurandi López, Cristina Pérez Martínez y Aurelio Luna, la doctoranda ha participado en el diseño del estudio y en el procesamiento de las muestras y ha realizado el procedimiento experimental completo. Ha analizado los datos en las bases de datos de proteínas y ha interpretado estos resultados. Ha interpretado también los análisis estadísticos en R y en el análisis de los resultados del MCA. Ha participado en la elaboración del manuscrito y se ha responsabilizado del proceso editorial.

Artículo 2: “Morphological and histological changes in eye lens: Possible application for estimating postmortem interval.”

En este artículo publicado en la revista Legal Medicine por Gemma Prieto Bonete, Cristina Pérez Martínez, María Dolores Pérez Cárceles y Aurelio Luna, la doctoranda ha participado en el diseño del estudio y en la recogida de la muestra, en realizado el procedimiento experimental completo. Ha realizado el análisis de las muestras y el análisis estadístico de los resultados mediante el programa informático SPSS, versión 19.0. Ha participado en la preparación del manuscrito y se ha responsabilizado del proceso editorial.

Artículo 3: “Biochemical correction factors to estimation of post-mortem interval in vitreous humor.”

En este artículo publicado en la revista Romanian Journal of Legal Medicine por Gemma Prieto Bonete, Isabel Legaz Pérez, Cristina Pérez Martínez, María Dolores Pérez Cárceles y Aurelio Luna, la doctoranda ha participado en la elaboración del manuscrito y en la interpretación de los resultados, y ha participado en el proceso editorial.

7. PUBLICACIONES

Además de las publicaciones mencionadas en el capítulo anterior, parte de los resultados de esta tesis, han sido presentados previamente en congresos nacionales e internacionales de reconocido prestigio en el campo de las Ciencias Forenses y la Medicina Legal.

1. Prieto Bonete G., Pérez Martínez C., López Fernández L., Fernández Escudero AC., Pérez Cárceles MD., Luna Maldonado A. "Perfil proteico de huesos humanos con un intervalo postmortem de hasta 20 años". Comunicación oral IV Jornadas Doctorales. Murcia, Junio, 2018.
2. Prieto Bonete G., Pérez Martínez C., López Fernández L., Fernández Escudero AC., Pérez Cárceles MD., Luna Maldonado A. "Empleo de parámetros bioquímicos en humor vítreo como factores de corrección para la estimación de la data de la muerte." Comunicación oral, I Jornadas Interdisciplinarias de Jóvenes Investigadores. Murcia, Octubre 2017.
3. Prieto Bonete G., Pérez Martínez C., López Fernández L., Pérez Cárceles MD., Luna Maldonado A. "Empleo parámetros bioquímicos en humor vítreo como factores de corrección para la estimación del Intervalo Postmortem". Comunicación oral III Jornadas Doctorales. Murcia, Abril, 2017.
4. Prieto Bonete G., Pérez Martínez C., Fernández López L., Pérez Cárceles MD., Luna Maldonado A. "Proteomic profiling of postmortem bone remain at 5-10 years". Póster, Congreso Medicina Legal y Forense. Venecia, Junio 2016.
5. Prieto Bonete G., Pérez Martínez C., Fernández López L., Pérez Cárceles MD., Luna Maldonado A. "Proteomic profiling of postmortem bone remain at 5-15 years". Congreso Medicina Legal y Forense. Venecia, Junio 2016.
6. Prieto Bonete G., Pérez Martínez C., Fernández López L., Pérez Cárceles MD., Luna Maldonado A. "Proteomic profiling of postmortem bone remain at 5-20 years". Póster, Congreso Medicina Legal y Forense. Venecia, Junio 2016.
7. Pérez Martínez C., Prieto Bonete G., Fernández López L., Pérez Cárceles MD., Luna Maldonado A. "Correction factors for the estimation of postmortem interval through biochemical parameters in vitreous humor. Póster, Congreso Medicina Legal y Forense. Venecia, Junio 2016.

8. Prieto Bonete G., Pérez Martínez C., Fernández López L., Pérez Cárceles MD., Luna Maldonado A. "Caracterización proteica de huesos humanos con un intervalo postmortem entre 5 y 15 años". Comunicación oral, II Jornadas Doctorales. Murcia, Junio 2016.

9. K. Sydow; B. Madea; L. Fernández López; G. Prieto Bonete; F. Musshoff; C. Hess. "Postmortem formation of free amino acids in vitreous humor at different storage conditions." Póster, 95 Jahrestagung der Deutschen Gessellschanff für Rechtsmedizin Heidelberg (Alemania), Agosto 2016.

10. Prieto Bonete G., Pérez Martínez C., Pérez Cárceles MD., Luna Maldonado A. "ADN y proteínas colágenos Tipo I: Comportamiento postmortem en restos óseos". Póster, XXI Jornadas Internacionales mediterráneas de Medicina Legal. Badajoz, Abril 2016.

11. Prieto Bonete G., Pérez Martínez C., Pérez Cárceles MD., Luna Maldonado A. "Factores de corrección para la estimación de la data de la muerte, utilizando parámetros bioquímicos en humor vítreo". Póster, XXI Jornadas Internacionales mediterráneas de Medicina Legal. Badajoz, Abril 2016.

12. Prieto Bonete G., Pérez Martínez C., Fernández López L., Pérez Cárceles MD., Luna Maldonado A. "Cambios morfológicos e histológicos del cristalino: su posible aplicación para la estimación del intervalo postmortem". Comunicación oral, I Jornadas Doctorales. Murcia, Abril 2015

13. Prieto Bonete G., Pérez Cárceles MD., Luna Maldonado A. "Morphological and Histological Changes in Eye Lens For Estimating Postmortem Interval. Comunicación oral, Dubai, Enero 2015.

Las muestras empleadas en este estudio también han servido para la realización de otros estudios relacionados con las Ciencias Forenses y la biomedicina.

8.DISCUSIÓN

8.1. DISCUSIÓN GENERAL

La estimación del intervalo postmortem puede limitar la lista de personas desaparecidas y facilitar una identificación positiva a través de huellas dactilares, investigación de ADN o de registros dentales. Hay una compleja interacción entre el medio ambiente, el contexto inmediato de la muerte y las variables extrínsecas e intrínsecas que afectan a la forma y la velocidad de la descomposición. Nuestro nivel de comprensión sobre la descomposición tras la muerte, dada la gran cantidad de variables que la afectan, no nos permite asignar cualquier nivel de previsibilidad a este hecho (Hau et al. 2004). Los factores intrínsecos incluyen la edad y el tamaño físico del cadáver, la condición médica ante mortem y la presencia de lesiones. Por otro lado, los factores extrínsecos incluyen la variación de la temperatura ambiente, el clima, las condiciones de enterramiento, la vestimenta, la presencia de artrópodos y carroñeros (Cockle y Bell, 2015; Hau y cols., 2014).

Los restos hallados pueden encontrarse en diferentes etapas de la descomposición, en la fase temprana (<24 hpm), la intermedia (>24 hpm) y la tardía (>120 hpm). En relación al intervalo postmortem estudiado, se observa que a mayor intervalo postmortem mayor dificultad para dar una mayor aproximación en la estimación de la data de la muerte (Le Garff y cols., 2017; Henssge and Madea, 2007). La exactitud sólo puede ser probada empíricamente mediante análisis estadísticos con sus errores en el campo de estudio.

Nuestros resultados muestran que la estimación de la data de la muerte está influenciada por los factores antes mencionados.

Los métodos usados con frecuencia por los patólogos para estimar el IPM como el nivel del potasio en el humor vítreo o el nivel de digestión del contenido gástrico han demostrado no ser tan exactos como se esperaba (Cockle y Bell, 2015; Pittner y cols., 2016). Algunas observaciones en este terreno, como la alteración de los parámetros con el incremento del intervalo postmortem, demuestran que existe una gran variabilidad en la medida en relación con el intervalo postmortem estudiado y la influencia de la temperatura lo que ha llevado a tener que mejorar las investigaciones en este campo (Henssge and Madea, 2007). Los métodos usados para estimar el tiempo tras la muerte son solo de naturaleza diferente y con distinto valor científico, (Madea, 2014) pudiendo categorizarse en cuantitativos o subjetivos según su naturaleza y si hay o no presencia de variables independientes o estar solamente basada en suposiciones (Hau y cols., 2014). Actualmente son numerosas las

investigaciones longitudinales que tratan de mejorar la aproximación en la estimación del intervalo postmortem en cada fase de la descomposición.

Por tanto, la estimación del IPM de restos humanos requiere una actividad multidisciplinar entre diferentes profesionales, y el forense patólogo o antropólogo debe recurrir a entomólogos, botánicos, geólogos, zoólogos o estadísticos (Madea, 2014).

Además, muchos de los métodos propuestos en estas nuevas líneas de investigación en este campo tienen sólo interés académico ya que se trata solamente de estudios descriptivos de cambios postmortem. Para que estos métodos adquieran más relevancia práctica deberían realizar medidas cuantitativas, descripciones matemáticas y tener en cuenta factores que influyen en su cuantificación (Henssge y Madea, 2007).

En general, se acepta que la temperatura, el agua, la acidez y la disponibilidad de oxígeno pueden moderar el medio químico interno y progresión biológica de la descomposición (Cockle y Bell, 2015).

Las etapas de la descomposición, por tanto, están determinadas principalmente por la observación de los cambios postmortem o el análisis del patrón de sucesión de la fauna cadavérica (Lee, 2009; Myburgh, 2010). Hay varias etapas para describir el grado de descomposición, con variaciones menores que dependen del punto de vista de los investigadores y las diferencias geográficas. Normalmente hay 4 etapas en el proceso de descomposición, que son colorativa o cromática, enfisematosa o de desarrollo gaseoso, colicuativo o de licuefacción y de reducción esquelética (Gisbert, 1998), pero a veces la etapa enfisematosa y el periodo de licuefacción se incorporan en una etapa de descomposición temprana (Hostiuc y cols., 2017; Unluturk y Sahin 2017; Hau y cols. 2014). Las observaciones utilizadas para describir el proceso de descomposición son generalmente aplicables en todas las áreas geográficas ya que todos los cadáveres se descomponen con un patrón similar. Sin embargo, la velocidad de descomposición puede parecer diferente incluso dentro de la misma área geográfica simplemente debido a las diferencias microclimáticas, topográficas y geográficas.

Los cambios postmortem ocurren en la fase temprana y tardía. Los primeros cambios postmortem incluyen *algor mortis* (enfriamiento cadavérico), *rigor mortis* (rigidez cadavérica) y *livor mortis* (livideces cadavéricas), mientras que los posteriores

Discusión

cambios post mortem implican la rotura de los tejidos blandos que conducen a cambios macroscópicos notables (Lee, 2009, Swift, 2006).

Para cadáveres en una etapa reciente, el IPM se estima principalmente mediante el examen del enfriamiento cadavérico, la rigidez y las livideces cadavéricas (Poloz y O'day, 2009; Tibbett y Carter, 2009). El enfriamiento cadavérico es el proceso de disminución de la temperatura corporal a la temperatura ambiente (Parsons, 2009; Reddy y Lowenstein, 2011). Hay algunas condiciones ante mortem, que pueden conducir a una temperatura corporal anormalmente alta o baja. Existen diferentes condiciones antomortem que pueden llevar a tener una temperatura corporal inicial anormal, tales como golpe de calor, fiebre, estrés, hipertiroidismo, lesión cerebral, hipertermia maligna, medicación neuroléptica, sepsis, presencia de toxinas o drogas, la actividad física ante mortem y la edad de los fallecidos o ciertas causas de muerte (como asfixia) (Adams, 2009; Smart y Kaliszan, 2012).

Las zonas más habituales del organismo que se utilizan para registrar la temperatura corporal el hígado, el recto y la boca (temperatura intrahepática, rectal y oral) en algunos casos (Lee, 2009; Swift, 2006). Generalmente, se prefiere la temperatura rectal porque es la forma más fácil y accesible de medir la temperatura central del cuerpo sin producir heridas adicionales, a menos que exista un problema de agresión sexual o exista una destrucción del cadáver que impida la medición de la temperatura en esta localización (Hubig y cols., 2011; Mall y cols., 2005; Muggenthaler y cols., 2012). Sin embargo, Den Hartog y Lotens (2004) destacaron algunas posibles fuentes de error en el registro de la temperatura rectal. Estos errores incluyen el tipo de termómetro utilizado, la calibración del termómetro, la profundidad de la inserción, el cese de la actividad metabólica después de la muerte y circunstancias especiales; por ejemplo, fuego.

Una vez que el cadáver inicia la etapa de putrefacción, los cambios postmortem y la etapa de descomposición proporcionan simplemente un rango aproximado de IPM debido a la influencia de demasiadas variables (Myburgh, 2010; Shattuck, 2009).

La estimación del intervalo postmortem en la fase intermedia (>24 hpm) se realiza a través de la determinación de potasio e hipoxantina en el humor vítreo, de las rigideces y las livideces cadavéricas y recientemente mediante el análisis genético

(Pittner y cols., 2016a; Pittner y cols., 2016b). Se han investigado en esta fase otros parámetros como fracciones proteicas, urea, creatinina, glucosa, hierro, potasio, calcio, enzimas, detección inmunohistoquímica de insulina en las células B del páncreas, fracción microalbúmina y estroncio-90 (Sabucedo, 2003).

En la fase tardía (> 120 hpm), se emplea fundamentalmente la entomología para aproximarse al intervalo postmortem, sin embargo, cuando la descomposición es total la antropología forense ha empleado el hueso como indicador de la edad (Procopio y cols., 2018a), estudiando las lesiones paleopatológicas o detección de patologías previas (Pérez-Martínez y cols., 2016) y pudiendo dar así una estimación aproximada del intervalo postmortem (Delabarde y cols., 2017). Actualmente se están llevando a cabo diversos estudios sobre restos óseos para la estimación del intervalo postmortem mediante el estudio de la descomposición del colágeno (Pérez-Martínez y cols. 2017), concentración de citrato (Wilson y Christensen, 2017; Brown y cols., 2017), emisión de fluorescencia (Hoke y cols., 2013), quimioluminiscencia (Sarabia y cols., 2018), trazas de hemina (Ramsthaller y cols., 2011), degradación proteica en modelos animales (Pittner y cols., 2016, Proccopio y cols., 2018b, Procopio y cols., 2017).

Hoy en día, no existe un único método de estimación que pueda proporcionar un momento preciso, por lo que la combinación entre diferentes técnicas de estimación es necesaria para aumentar la precisión de IPM.

8.2. PRIMER OBJETIVO: INTERVALO POSTMORTEM TARDÍO.

La etapa esquelética se alcanza cuando existe un grado muy elevado de exposición ósea, pero no se ha iniciado la descomposición extrema del material óseo (Sharanowski y cols., 2008; Swann y cols., 2010). Adlam y Simmons (2007) definieron como esqueletización cualquiera de las siguientes situaciones: solamente la columna vertebral permanece debajo de la piel seca acompañada de una pérdida importante de tejido intraabdominal; existe más del 50% de la exposición ósea con humedad mínima; o más del 30% de los huesos presentan procesos de blanqueamiento y erosión (Adlam y Simmons, 2007). Durante esta etapa, solo permanecen muy pocas cantidades de piel seca, tendones y cartílagos. La humedad mínima del ambiente o la grasa puede encontrarse en la superficie del hueso y el olor a descomposición generalmente se desvanece (Matuszewski y cols., 2008). Algunas especies de insectos todavía están presentes en esta etapa, pero principalmente la Coleoptera y Acari (ácaros) (Ahmad y cols., 2011; Braig y Perotti, 2009). La secuencia de esqueletización puede variar según el entorno y el estado del cadáver, así se cree

que, en circunstancias normales, la cabeza, la cara y las extremidades se descompondrán más rápido que el resto del cadáver, pero esta secuencia está sujeta a variaciones causadas por la posición del cadáver y el ambiente (Bachmann y Simmons, 2010; Dautartas, 2009). Cuando el cadáver alcanza la etapa esquelética, la descomposición se ralentiza dramáticamente y progresa a un ritmo de años o décadas. Los huesos experimentarán un proceso de ataque microbiano al colágeno; así como erosión, decoloración, exfoliación, agrietamiento del hueso cortical (seguido de la exposición del hueso trabecular), pérdida de su contenido mineral inorgánico e invasión por la vegetación (Shattuck, 2009; Vass, 2001). El IPM en esta etapa puede ser difícil de determinar, aunque existen métodos para examinar restos esqueléticos basados en la integridad, la fragmentación y la articulación o el efecto de la erosión (Lieverse y cols., 2006; Ross y Cunningham 2011). Ross y Cunningham (2011) estimaron que la descomposición completa de los huesos requiere entre seis y treinta años en un ambiente tropical (Hau y cols., 2014).

8.2.1. Las proteínas como marcadores para la estimación del IPM.

En Ciencias Forenses, la proteómica está abriendo nuevas aplicaciones, entre ellas la posibilidad de analizar nuevas matrices para estimar un IPM reciente y establecer la causa de la muerte, estudiar patrones de descomposición o identificar marcadores de enfermedad y, más recientemente, relacionar proteínas con el IPM. En este contexto, hay estudios realizados en condiciones controladas y utilizando modelos animales con hasta un año de IPM (Procopio y cols., 2018) que relacionan la abundancia de ciertas proteínas en el hueso con la data. Otros autores han realizado una caracterización proteómica de los cambios postmortem en diferentes especies o muestras biológicas [Procopio y cols., 2017; Procopio y cols., 2018a; Procopio y cols., 2018b; Unluturk y Sahin, 2017; Le Garff y cols. 2017; Creagh, 2017; El-Kashef y cols., 2017; Li y cols., 2016; Li y cols., 2017; Pérez-Martínez y cols., 2016; Pittner y cols., 2016a; Pittner y cols., 2016b, Júnior y cols., 2014; Zapico y cols., 2014; Porto y cols., 2011; Gauthamadasa y cols., 2010; Di Luca y Elia, 2013) o perfiles proteínicos en muestras arqueológicas (Sawafuji y cols., 2017). El perfil de proteínas en los huesos humanos puede ser una técnica complementaria útil para la estimación del IPM (Porto y cols., 2011; Schweitzer y cols., 2014; Hofreiter y cols., 2012; Asara y cols., 2007).

La proteómica también está siendo ampliamente aplicada en otras ramas de la ciencia como la bioarqueología y paleopatología en restos óseos de varias especies como en fémures de mamuts, dinosaurios, especímenes bovinos, o restos humanos arqueológicos (Sawafuji y cols., 2017; Bona y cols., 2014; Wadsworth y Buckley, 2014;

Tomassetti y cols., 2013; Caputo y cols., 2012; Schmidt-Schultz y Schultz, 2004), para evaluar la supervivencia y la recuperación de proteínas, establecer relaciones entre las especies, y estudiar la evolución de la enfermedad (Gauthamadasa y cols., 2010; San Antonio y cols., 2011; Bona y cols., 2014; Schmidt-Schultz y Schultz, 2004, Buckley y cols., 2017; Brown y cols., 2016; Buckley y cols, 2016a; Buckley y cols, 2016b; Mikšík, y cols., 2016; Buckley y cols, 2015; Cleland y cols., 2015; Demarchi y cols., 2016; Hill y cols., 2015; Buckley y cols., 2013; Callaway, 2013; Vega y cols., 2012; Washburn y Wolters, 2001), sus costumbres y el medio ambiente (Vinciguerra y cols., 2016; Downs y Lowenstein, 1995).

Durante la descomposición química postmortem, las proteínas primero se descomponen principalmente en proteasas, peptonas, polipéptidos y aminoácidos (Unluturk y Sahin, 2017; Capella y cols., 2015; Marais-Werne y cols., 2017) a través de proteólisis, por la acción de enzimas (Capella y cols., 2015). Más allá, las proteínas se reducen a nitrógeno, fósforo y compuestos del azufre (Procopio y cols., 2018a), estando éste último representado principalmente por dimetildisulfuro (Procopio y Buckley, 2016). Productos intermedios de este proceso son aminas biogénicas que son subproductos de la proteólisis (Capella y cols., 2015). El producto biogénico más importante de las aminas son histamina, putrescina (resultado de L-ornitina descarboxilación), cadaverina (resultado de L-lisina descarboxilación), tiramina, triptamina, betafeniletilamina, espermina y espermidina (Procopio y cols., 2018a; Sterzik y cols., 2016). Entre estos, la histamina, la triptamina y la feniletilamina están acompañadas de la emisión de gases como el metano y dióxido de carbono (Capella y cols., 2015), mientras que las diaminas tóxicas (cadaverina y putrescina) confieren el olor característico de los cuerpos en descomposición (Capella y cols., 2015). Las proteínas de tejido muscular, proteínas de membrana y las proteínas libres consisten principalmente en aminoácidos (Sterzik y cols., 2016). Algunos aminoácidos contienen átomos de azufre y durante el proceso de sulfhidratación se pueden reducir para formar amoníaco, tioles, ácido pirúvico, sulfuro de hidrógeno y sulfuros (Capella y cols., 2015), este último favorecido por las condiciones de un suelo anaeróbico para los cadáveres enterrados (Capella y cols., 2015). En los cementerios, el entorno anaeróbico del suelo detiene el proceso en esta etapa, y los sulfuros no se transforman (Capella y cols., 2015; Marais-Werne y cols., 2017). En cambio, el oxígeno en condiciones aeróbicas ayuda a la transformación de sulfuro en sulfato, y bacterias específicas (por ejemplo, *Thiobacillus*) contribuirán a su posterior transformación en ácido sulfuroso (Capella y cols., 2015; Marais-Werne y cols., 2017). Durante el mismo proceso de descomposición, el nitrógeno de los aminoácidos se

Discusión

libera en forma de amoníaco (NH_3), y las condiciones ácidas en el suelo (en ambientes de entierro) convertirá el amoníaco en amonio (NH_4^+). El resto de amonio seguirá dos caminos: nitrificación y desnitrificación (Capella y cols., 2015; Marais-Werne y cols., 2017), en ambos procesos están involucradas diferentes bacterias. Durante el proceso de nitrificación (aeróbico), el amoníaco se transforma en nitrito y más adelante en nitrato. La desnitrificación (anaeróbica) induce la reducción de nitrato para dar lugar a nitrógeno gaseoso y óxido nitroso (Capella y cols., 2015; Marais-Werne y cols., 2017, Ioan y cols., 2017).

La tasa de descomposición de las proteínas no es la misma en cada tejido. Las proteínas de membrana de las neuronas y las proteínas del tejido epitelial del tracto gastrointestinal son las primeras en descomponerse, mientras la reticulina y el colágeno de la epidermis y las proteínas musculares son mucho más resistentes a la putrefacción (Capella y cols., 2015; Marais-Werne y cols., 2017). La queratina, la proteína de la capa cornificada de la epidermis, es resistente a la mayoría de las enzimas proteolíticas (Unluturk y Sahin, 2017; Marais-Werne y cols., 2017), siendo ésta una explicación para la persistencia durante períodos de tiempo más largos (Marais-Werne y cols., 2017). Esta resistencia se debe a enlaces disulfuro en la estructura de la cisteína (Marais-Werne y cols., 2017). Los sulfuros en la piel sufrirán desulfhidratación para ser transformados en compuestos sulfúricos como dimetilsulfuro y tiol (Le Garff y cols., 2017; Ioan y cols., 2017).

Se han llevado a cabo estudios de degradación proteica en músculo como herramienta para estudiar el IPM, a través del nivel de proteína y su ultraestructura. Se ha observado que la degradación de proteínas depende de proteínas dependientes del calcio, como las Calpaínas. Por otro lado, algunas proteínas se degradan más tempranamente que otras, mostrando un rango de variación que permite delimitar el intervalo postmortem (Pittner y cols., 2016).

En este estudio, proponemos un enfoque diferente al resto de investigaciones llevadas a cabo en hueso para evaluar el IPM. En estudios previos realizados en su mayoría por Procopio y cols., 2018b y por Pittner y cols., 2016, observamos que han realizado un análisis de componentes principales (PCA) para estudiar la relación entre el IPM y las proteínas. En nuestro caso, al no tener concentraciones hemos realizado una representación de las proteínas características para cada grupo de IPM mediante el análisis de correspondencia múltiple, lo que permite identificar las proteínas que mejor ayudan a diferenciar entre huesos con un IPM menor o mayor de 12 años

postmortem. El uso de MCA es particularmente relevante en estudios donde se recopila una gran cantidad de datos cualitativos. El MCA se utiliza para evaluar las posibles relaciones entre todas las variables e identificar perfiles específicos (Costa y cols., 2013). Por tanto, mientras que el análisis de componentes principales se utiliza para variables de medición continua, el análisis de correspondencia se aplica a variables categóricas.

De las 48 proteínas sobre las que realizamos el MCA, 41 de ellas mostraron una relación con el IPM, ya que los datos de ambos grupos mostraban una amplia separación y el 53,94% del IPM se explicó con las tres primeras dimensiones. Para reducir la dimensionalidad, se seleccionaron 32 proteínas que mostraban una diferencia más pequeña entre las frecuencias relativas de ambos grupos de IPM. Centrándonos en las últimas 32 proteínas propuestas como perfil proteico, son principalmente aquellas cuya función biológica principal es el soporte y mantenimiento óseo: las que participan en procesos biológicos del hueso son 10, 4 tienen una función molecular y 18 son componentes celulares. Entre estas proteínas se encontraban 25 NCP (proteínas no colágenas) (ADAMTS17, ANXA2R, AREG, BMP5, CD163L1, CDH11, CTC1, CTNNB, DLX5, ENPP1, FBN1, FGFR1, INSIG2, JAG2, LAMA2, LMNA, MAF, MED12, MUC15, MYSM1, PAPP, PHOSPHO1, SLC26A1, SOX6, SUCO) y 7 proteínas colágenas (CILP, COL10A1, COL11A2, COL5A2, COL9A2, COMP, PCOLCE) que ayudan a discriminar entre los dos grupos de IPM (≤ 12 y > 12 años postmortem).

8.2.2. Conservación de las proteínas tras la muerte

En la investigación forense, una de las matrices ideales como fuente de proteínas en los intervalos postmortem tardíos es el hueso, que actúa como un buen reservorio de biomoléculas debido a su composición, ya que está compuesto de fracciones inorgánicas y orgánicas. La hidroxiapatita (parte inorgánica) es un mineral cuya superficie de cristales presenta un mosaico de puntos rígidamente fijos de calcio y fosfato. Los iones de calcio presentes en el medio sólo refuerzan la unión al permitir la formación de puentes adicionales entre los restos carboxilo de las proteínas y el fosfato de la HA (Makrodimitris y cols., 2017; Grandori y cols., 2003; Gray, 2004; Menanteau y cols., 1982). Además, las interacciones proteína-hidroxiapatita son una función de la carga eléctrica de la proteína neta, ya sea ácida o básica, aunque la participación de ambos no es la misma (Romberg y cols., 1986; Gorbunoff, 1984). Por

lo tanto, esto daría como resultado que un grupo dado de proteínas persistiera fuertemente unido a la hidroxiapatita, mientras que otras desaparecerían.

Los resultados de nuestro estudio sugieren que las proteínas con una masa molecular más alta son las más estables, ya que observamos que la masa de las proteínas que persisten a lo largo del IPM es mayor que la de otras proteínas que no persisten el mismo período de tiempo. Otros autores también observaron que las proteínas pequeñas se degradan rápidamente en la célula, aunque no encontraron correlación entre la degradación y el peso molecular (Schmidt y cols., 2014; Doherty y cols., 2008; Gorbunoff y Timasheff, 1984). Por su parte, Seo y cols., 2009 señaló que las proteínas más resistentes son las ácidas, mientras que las básicas y neutras desaparecieron más rápidamente, ya que la densidad de los carboxilos en las proteínas básicas no es suficiente para permitir su unión a la hidroxiapatita una vez que sus cargas positivas han sido eliminadas Gorbunoff y Timasheff, 1984. Esto puede deberse al hecho de que en un entorno ácido como el que se produce hay tras la muerte, las proteínas que menos se hidrolizan son las proteínas ácidas. La disminución del pH puede conducir a la desnaturalización de las proteínas junto con los procesos de degradación, y, como se ha comprobado en otro estudio, las proteínas desnaturalizadas no se unen a la HA (Gorbunoff, 1984). También se ha observado que el bloqueo de carboxilos a pH más bajo fortalece la unión de las proteínas tanto básicas como ácidas a la HA. Además, los procesos postmortem y la acción bacteriana producen su degradación y, por tanto la liberación de los aminoácidos (Seo y cols., 2009). Esto concuerda con nuestros resultados, en los que observamos que los aminoácidos ácidos y neutros aumentan con el IPM, por lo que la persistencia de determinadas proteínas es más probable que se deba a su estructura más que a su carga eléctrica.

8.2.3. Limitaciones del estudio

En nuestro estudio, las diferencias individuales en la composición de la matriz ósea y las condiciones de enterramiento pueden limitar parcialmente la aplicación y la comparación de estos análisis, a pesar de que las muestras analizadas se obtuvieron al azar en un clima árido. Una limitación de nuestros resultados sería su extrapolación a restos esqueléticos encontrados en entornos muy diferentes a los nuestros. Para la aplicación práctica del análisis de proteínas en la estimación del intervalo postmortem, sería necesario incluir pruebas complementarias para caracterizar la integridad del hueso, aumentar el número de muestras, utilizar

intervalos postmortem más largos y realizar estudios en diferentes condiciones ambientales.

Entre las 48 proteínas iniciales de las que partimos, identificamos COL1A1, la proteína colágena más abundante en el hueso. También identificamos Fetuina-A (AHSG) en el grupo con una data menor de 12 años postmortem, esta proteína es una de las proteínas no colágenas más abundantes en los huesos. La estabilidad postmortem de la Fetuina-A ha sido ampliamente demostrada en numerosos artículos, al igual que el hecho de que la variabilidad en su observación depende de las diferencias en el ambiente de enterramiento. Por otro lado, se ha correlacionado negativamente con la edad biológica de los sujetos, y por lo tanto se ha propuesto como un nuevo biomarcador para estimar la edad biológica de los restos esqueléticos para aplicaciones forenses (Procopio y cols., 2018; Cappellini y cols., 2011). En nuestro caso, las condiciones del enterramiento, la edad promedio de los individuos y el método de identificación de proteínas podrían explicar por qué Fetuin-A no se identificó en el grupo con un IPM más alto. Según otros estudios, la Fetuin-A no proporciona información para estimar el IPM (Procopio y cols., 2018a; Cappellini y cols., 2011).

Proteínas como el biglicano, proteína Gla de la matriz, fosfatasa alcalina, osteopontina, osteocalcina o sialoproteína ósea se han demostrado en otras investigaciones que perduran durante miles de años (Alves y cols., 2011; Ingram y cols., 1993; Termine y cols., 1981; Procopio y cols., 2016), sin embargo, no se han identificado en nuestras muestras. Una de las razones por las que estas proteínas no se identificaron puede deberse a que su degradación puede haber producido fragmentos de péptidos que son de un tamaño más pequeño que el que puede detectar nuestro software. Otras posibles causas incluyen el estilo de vida saludable, la nutrición y la edad de los individuos, las especies y las condiciones ambientales, ya que todas ellas afectan a la cinética de la degradación ósea y la preservación individual (Zioupou y cols., 2014). En este sentido, la mayoría de los estudios se han llevado a cabo con muestras obtenidas de cuevas en climas fríos o de individuos momificados (Procopio y cols., 2018; Cappellini y cols., 2011; Wadsworth y Buckley, 2014; Caputo y cols., 2012; Schweitzer y cols., 2014; Hofreiter y cols., 2012), circunstancias que difieren de nuestro estudio.

Debido al tipo de muestras estudiadas (de cadáveres en la fase de esqueletización), el número de péptidos en cualquier proteína dada será menor que en muestras de cadáveres con un IPM reciente. Además, la degradación de las muestras

significa que las secuencias de proteínas no son completas. Por esta razón, se realizó una validación específica de péptidos utilizando el software Spectrum Mill MS Proteomics Workbench (Perez-Martínez y cols., 2016; Perez-Martínez y cols., 2017), que reveló péptidos trípticos, fragmentos peptídicos no específicos y semitrípticos con una longitud mínima de 6 aminoácidos (Sarah y cols., 2016). En este tipo de análisis, existen secuencias de proteínas que son potencialmente más fáciles de encontrar y que el software detecta más fácilmente que otras. Por esta razón, muchos colágenos y otras proteínas pueden presentar las mismas secuencias de identificación.

8.3. SEGUNDO OBJETIVO: INTERVALO POSTMORTEM INTERMEDIO.

8.3.1. Características de los cristalinos para la estimación del IPM.

En condiciones normales el cristalino es una estructura transparente, biconvexa y avascular, a través de la cual pasan los rayos de luz para ser enfocados en la retina. Está formada por 1000-3000 capas de fibras celulares (Subczynski y cols., 2012). Los cristalinos adultos contienen dos tipos de fibras, unas en el córtex las cuales aún no han madurado y por tanto contienen orgánulos, y otras localizadas en el núcleo que ya ha madurado y no contienen orgánulos. La maduración de estas fibras es necesaria para la transparencia de la lente, ya que al madurar se pierden los orgánulos y las proteínas cristalinas se pueden ordenar. La transparencia y la forma de la lente dependen del alineamiento regular de las fibras, las cuales se encuentran apiladas juntas dando un volumen esferoidal, conteniendo proteínas cristalinas citoplasmáticas y filamentos citoesqueléticos intermedios. Las cristalinas se expresan en tres isoformas diferentes (a-cristalinas, b-cristalinas y c-cristalinas), siendo el componente citoplasmático más abundante y dependiendo su integridad de los procesos metabólicos vitales como son la agregación, oxidación, proteólisis, desaminación, glicosilación y transpeptidación (Toyama y Hetzer, 2013). Además de por su estructura, la transparencia también es debida a la bomba sodio-potasio, que en condiciones normales extrae sodio e introduce potasio. *In vivo* también se produce la opacificación del cristalino, es un proceso conocido como cataratas, y se puede producir por diferentes mecanismos a los que actúan tras el fallecimiento.

Recientemente se han publicado estudios en los que se emplean diferentes estructuras del ojo tanto para la estimación del intervalo postmortem como para la estimación de la edad. (Cantürk y cols. 2017; Nioi y cols. 2018; Cantürk y cols. 2018; Fleischer y cols. 2017; Jongenelen y cols. 2015; Trokielewicz y cols. 2018). Pero este ha sido el primer estudio a partir del cual se intenta estimar el intervalo postmortem a través de cambios en las características fisicoquímicas del cristalino.

8.3.2. Pérdida de la transparencia

Tras la muerte, se produce un cese metabólico, y la actividad de la bomba sodio-potasio cesa, consecuentemente los niveles de potasio disminuyen en la lente, y esto favorece la entrada de cloro junto con agua y calcio. La necrosis celular que ocurre tras la muerte, en la cual las enzimas lisosomiales están implicadas, produce un aumento en la opacidad, es decir, pérdida de la transparencia (Bassnett y cols., 1988; Duncan, 1969).

Los agentes oxidantes alteran la estructura de la proteína y afectan a los mecanismos de agregación, unión entre las proteínas, rotura de péptidos y la introducción de carbonos activos en las cadenas de proteínas (Toyama y Hetzer, 2013; Candia y cols., 1970; Lucas y Zigler, 1988; Paterson y cols., 1983). Además de estos procesos, se puede observar en el cristalino una fracción proteica de alto peso molecular (Harding, 1973). Los puentes disulfuro que hay en la unión proteína-proteína son responsables de estas fracciones de alto peso molecular, encontradas solo en cristalinos con cataratas (Spector, 1978). Por tanto, hemos formulado la hipótesis de que las proteínas del cristalino se agregan en partículas grandes que dispersan la luz, lo que causa la opacidad de la lente (Perry, 1987).

Según nuestros resultados, las autopsias realizadas dentro de las 10-30 h de la muerte pueden con fiabilidad emplear este método para la estimación precisa de la data. Sin embargo, en periodos de tiempo más cortos o más largos, la precisión puede disminuir.

En otros estudios, se ha observado también que, tras la muerte, la córnea se opacifica, y se relaciona este hecho con la degeneración de las células endoteliales y la hidratación que sufre al absorber el humor acuoso, y por tanto se espesa y se vuelve brumosa presentado edema, palidez, engrosamiento obvio y pequeñas protuberancias en la superficie, y se vuelve cóncava debido a la deshidratación y la consiguiente contracción; finalmente, su endodermis se adhiere al cristalino. Estos procesos se aceleran por las altas temperaturas (Kawashima y cols., 2015).

8.3.3. Descenso en la absorbancia del cristalino

A pesar del daño sufrido en las membranas celulares, esto no se relaciona con la pérdida de transparencia, considerando ambos procesos como fenómenos independientes (Malecaze y cols., 1981). Este hecho, está relacionado directamente con la pérdida de la orientación de las fibras en el cristalino (Toyama y Hetzer, 2013),

que como hemos observado la absorbancia es mínima a las 96 horas postmortem, lo que significa que la luz no es capaz de pasar a través de la lente.

8.3.4. Hallazgos morfológicos en el cristalino

En el estudio anatomopatológico, observamos una desestructuración clara en función del IPM, en la zona central del epitelio o núcleo y en la cápsula. Sin embargo, a las 24 y 48 h después de la muerte, la estructura de la lente se mostraba conservada como si se hubiera tratado inmediatamente después de la muerte, ya que conserva todas sus capas celulares y fibras intactas. Sin embargo, después de 48 h, la cápsula anterior estaba más desprendida que la cápsula posterior ya que esta última está más hidratada por el contacto con el humor vítreo y, por lo tanto, se ve menos afectada por los fenómenos postmortem.

La integridad de las proteínas cristalinas de las fibras depende de los procesos metabólicos vitales que implican su agregación, oxidación, proteólisis, desaminación, glicosilación y transpeptidación (Ceschi y Artraria, 1998; Rae y Kuszak, 1983). El cese de los procesos de intercambio metabólico produce un aumento de la glucosa libre dentro de la lente, lo que provoca una glicosilación excesiva de las proteínas cristalinas. En consecuencia, se atrae agua, ya que cambia la permeabilidad del sodio, alterando así la distribución de iones (Lyle y Jin, 1996). Esto va acompañado de un aumento en la concentración de sodio y una pérdida de potasio y aminoácidos. Además, la alta concentración de sorbitol atrae agua, provocando la rotura, licuefacción y separación de las fibras, y asimetría en las suturas de la lente, creando vacuolas en la corteza y afectando la estructura de la lente. Como resultado de la pérdida del contenido intracitoplasmático durante el proceso de degeneración celular, aparece un material denso, conocido como cuerpos multilamelares, que produce cambios en la densidad de las membranas citoplásmicas y separa las fibras (Brown, 1970; Cunanan y cols., 1991). Algo similar ocurre con la córnea. Se cree que el cambio en la opacidad corneal es consecuencia de un cambio en la hidratación, mientras que el aumento en el contenido de agua del estroma es la causa principal de la hinchazón de la córnea. Otras causas de pérdida de estructura incluyen la destrucción arquitectónica de la red de fibras de colágeno, la alteración funcional del endotelio corneal, la desregulación de la hidratación del proteoglicano y la concentración iónica del estroma corneal. La parte de la córnea cubierta por el párpado es más probable que se vuelva opaca antes. Cuando la temperatura ambiente es relativamente alta, la opacidad tiende a ocurrir temprano (Zhou y cols., 2010). Se ha visto que la temperatura tiene una influencia significativa en la

degradación de las proteínas y la supervivencia de las células endoteliales (Poloz y O'Day, 2009; Xu y cols., 1999), por lo que la temperatura ambiente debe tenerse en cuenta.

La luz *per se* no afecta la transparencia de la lente, a diferencia de la córnea en la que se cree que los cambios en la opacidad son secundarios al cambio en la hidratación, mientras que el aumento del contenido de agua del estroma es la principal causa de hinchazón de la córnea (Zhou y cols., 2010), ambos están estrechamente relacionados con que el ojo haya permanecido abierto (Kawashima y cols., 2015; Moreschi y cols., 2013). La opacidad de la lente y la córnea son dos procesos independientes.

Por otro lado, la edad es otro factor a considerar, ya que las cataratas tienden a formarse con la edad, mientras que generalmente se acepta que la opacidad corneal aumenta con la edad debido a una disminución en el número de células endoteliales corneales, lo que produce un aumento en el grosor de la córnea debido a la entrada del humor acuoso (Kawashima y cols., 2015). Otros factores que influyen incluyen la variación individual y la presencia de cataratas, en las cuales las medidas de transparencia no se pueden usar, y solo se podrían emplear las de la esfericidad.

Por último, cabe mencionar que los procedimientos descritos se pueden aplicar en autopsias humanas sin necesidad de que el globo ocular sea extraído, haciendo de la endoscopia oftalmológica una valiosa herramienta en autopsia forense (Amberg y Pollak, 2001).

8.4. TERCER OBJETIVO: INTERVALO POSTMORTEM RECIENTE.

8.4.1. Aplicación de los parámetros bioquímicos del humor vítreo como factores de corrección para la estimación del IPM.

El humor vítreo es la matriz elegida en numerosas ocasiones para la estimación de la data de la muerte debido a su fácil obtención y a su posición aislada, lo que le proporciona protección frente a la contaminación y putrefacción postmortem. Los analitos investigados más ampliamente tras la muerte son, potasio, sodio, cloro, calcio, magnesio, fosfato, urea, creatinina y lactato. Actualmente numerosos autores usan los principales componentes del humor vítreo para estimar la causa de la muerte, estableciendo valores normales para diferentes parámetros mediante una variedad de metodologías. No hay un consenso real acerca de los cambios postmortem de los

electrolitos debido a que son numerosos los factores por los que se pueden ver afectados, como el estado de salud previo a la muerte o el periodo agónico.

La estabilidad postmortem de algunos de estos electrolitos es ampliamente estudiada en este campo. Como otros autores han encontrado previamente, nuestros resultados muestra que las concentraciones de potasio, fosfato, hipoxantina, ácido úrico, microproteínas y microalbúmina pueden alterarse con dichos procesos antemortem (Zilg y cols., 2016; Madea y Lachenmeier, 2005; Coe, 1993; Blana y cols., 2011; Coe, 1969; Blumenfeld y cols., 1979; Balasooriya y cols., 1984; Farmer y cols., 1985; Madea y cols., 1989; Tao y cols., 2006; Jashnani y cols., 2010; Tumram y cols., 2011; Chandrakanth y cols., 2013; Mitchell y cols., 2013; Siddamsetty y cols., 2014; Madea, 2016). De manera similar a otros autores (Madea y cols., 1989; Tao y cols., 2006; Jashnani y cols., 2010; Tumram y cols., 2011; Madea, 2016; Mulla, 2005; Yogiraj y cols., 2008), encontramos que la urea (Madea, 2016; Coe, 1989), el cloruro (Blumenfeld y cols., 1979, Madea y cols., 1989; Tao y cols., 2006; Jashnani y cols., 2010; Tumram y cols., 2011; Yogirang y cols., 2008), y los niveles de sodio (Blumenfeld y cols., 1979; Madea y cols., 1989; Jashnani y cols., 2010; Tumram y cols., 2011; Mulla, 2005), no se correlacionados con IPM y se mantienen estables después de la muerte (Blumenfeld y cols., 1979; Madea y cols., 1989; Jashnani y cols., 2010; Tumram y cols., 2011; Mulla, 2005; Yogiraj y cols., 2008; Madea, 1989; Coe, 1898; Baniak y cols., 2015; Ingham y Byard, 2009).

Por el contrario, nuestros resultados no concuerdan con otros autores; por ejemplo, Balasooriya y cols. (1984) señalan que el sodio disminuye durante las primeras 85 h, y Tao y cols. (2006) que observó en 126 casos con un IPM de menos de 216 h que la concentración de sodio en humor vítreo disminuye después de la muerte, mientras que Siddamsetty y cols. (2014) encontraron una correlación negativa para el sodio en 210 casos con un IPM de menos de 72 h.

En nuestro estudio, en cuanto a la variabilidad del IPM, el 56% puede ser explicado por el modelo de regresión ajustado. El mejor marcador para explicar el IPM es el sodio, y si la concentración de este electrolito es conocido, es posible mejorar en un 56,7% la determinación del IPM si la muerte es natural o violenta indistintamente. Sin embargo, cuando se analizan las muertes violentas por separado, la estimación del IPM mejora en un 65% si la concentración de sodio en humor vítreo es conocida. En el caso de muertes naturales, la mejora es del 80%, resultados acordes con la investigación de Zilg y cols. (2016), quienes concluyeron que los niveles de sodio

pueden frecuentemente ayudar a establecer la causa de la muerte, o al menos la condición antemortem del sujeto, por lo que su análisis debe considerarse de rutina en la autopsia.

En cuanto a los otros dos parámetros estables, la urea y la presión osmótica, observamos que si la concentración de urea se conoce la estimación del tiempo de la muerte mejora, aunque éste no es el marcador de elección.

Sin embargo, estamos de acuerdo con Madea (2016) y Coe (1989), quienes consideraron que la urea puede identificar casos donde el potasio se altera debido a la patología antemortem, ya que un nivel superior a 100 mg/dl en humor vítreo indica un aumento de potasio. En el caso de la presión osmótica, su conocimiento también mejora la estimación del tiempo de la muerte, aunque con menores aproximaciones que el sodio, el cloruro y la urea. Sin embargo, no ha sido posible comparar este hallazgo con otros estudios, ya que no hay referencias en nuestro conocimiento en la literatura.

9. CONCLUSIONES

1. El análisis proteómico preliminar en restos óseos humanos entre 5 y 20 años postmortem es una herramienta que aporta información del estado previo del individuo y, que junto con otras técnicas, permita una aproximación de la estimación de la data de la muerte relativa.
2. En los restos óseos analizados en nuestro estudio, las diferencias en las frecuencias relativas de 25 proteínas no colágenas funcionales y 7 proteínas estructurales (colágenos) ayudan a discriminar entre ambos grupos de data.
3. El análisis de correspondencia múltiple (MCA) muestra que las proteínas funcionales relacionadas del mantenimiento del hueso aportan una mejor información sobre el IPM.
4. La disminución con el aumento del intervalo postmortem, de la esfericidad, el descenso de la absorbancia y la desestructuración histológica que se produce en el cristalino en cadáveres de conejos con una data intermedia entre las 24-96 horas, son parámetros complementarios útiles para la estimación del intervalo postmortem. Esta situación es extrapolable a cadáveres humanos debido a las características morfológicas e histológicas del cristalino.
5. La desnaturalización de las proteínas cristalinas del cristalino están directamente relacionadas con la pérdida de la transparencia, de la esfericidad y de su estructura histológica en el cristalino a medida que avanza el intervalo postmortem.
6. En el cadáver reciente (<24 horas postmortem), los parámetros bioquímicos habitualmente empleados en el humor vítreo para la estimación de la data de la muerte pueden verse alterados debido a los procesos agónicos o a procesos antemortem del sujeto, ofreciendo datos erróneos en la estimación de la data de la muerte.
7. Los factores de corrección en humor vítreo que permiten minimizar el error en la estimación de la data de la muerte son el sodio, el cloro, la urea y la presión

osmótica, que junto con la concentración de potasio, pueden mejorar la estimación de una data postmortem inferior a 24 horas.

8. Los factores de corrección más adecuados para la estimación del Intervalo postmortem en función de la etiología de la muerte, son la concentración de sodio para los casos de muerte natural y la concentración de sodio o cloro, indistintamente, para las muertes de naturaleza violenta.
9. La estimación del intervalo postmortem en el momento actual requiere de la aplicación de distintas técnicas complementarias adaptadas a las características de cada caso, que permitan con una mayor eficacia y eficiencia una mejor aproximación a la resolución de este importante interrogante en las ciencias forenses.

9. CONCLUSIONS

1. Preliminary proteomic analysis of post-mortem human remains within 5 to 20 years is a tool which provides information on the condition of the individual before death and also allows to estimate the relative date of death in combination with other techniques.
2. Relative frequencies of 25 non-collagenous proteins against 7 structural proteins (collagen) on the human remains analysed for the purpose of this research help establish the difference between the two types of dates.
3. Multiple Correspondence Analysis (MCA) shows that functional proteins related to the maintenance of bone structure contribute further to the estimation of post-mortem interval (PMI).
4. Post-mortem reduction in sphericity and absorbency together with the histological destructuring observed in the crystalline of rabbit corpses as PMI increases within 24-96 hours are useful additional parameters to estimation of the PMI. This is transferable to human beings due to the morphological and histological characteristics of the crystalline.
5. Denaturation of crystallins is closely related to the reduction in transparency and sphericity and histological destructuring of the crystalline as the PMI increases.
6. Biochemical parameters frequently used in vitreous humour on a corpse within the first 24 hours to estimation of the date of death can be biased by agonic or ante-mortem situations, which can lead to an erroneous estimate.
7. Sodium, chlorine, urea and osmotic pressure are correction factors which can reduce the margin of error to estimation of the PMI in vitreous humour within the first 24 hours.
8. Most relevant correction factors to estimation of the PMI based on etiology of death are the concentration of sodium in the event of natural death and the concentration of sodium or chlorine respectively in the event of violent death.
9. Estimation of the PMI is a major question mark in forensic sciences which will require various additional techniques tailored to the specifics of each case for its efficient resolution.

10. BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] Adams, V. I. (2009). Medicolegal autopsy and postmortem toxicology. In *Handbook of Autopsy Practice* (pp. 125-136). Humana Press.
 - [2] Adelson, L., Sunshine, I., Rushforth, N. B., & Mankoff, M. (1963). Vitreous potassium concentration as an indicator of the postmortem interval. *Journal of forensic sciences*, 8(4), 503-514.
 - [3] Adjutantis, G., & Coutselinis, A. (1972). Estimation of the time of death by potassium levels in the vitreous humour. *Forensic science*, 1(1), 55-60.
 - [4] Adlam, R. E., & Simmons, T. (2007). The effect of repeated physical disturbance on soft tissue decomposition—are taphonomic studies an accurate reflection of decomposition? *Journal of Forensic Sciences*, 52(5), 1007-1014.
 - [5] Agoro, E. S., Okoye, F. B. C., Azuonwu, O., & Ebiere, N. E. (2017). The Effect of Age and Sex on Vitreous Humour Chemistry and Postmortem Interval (PMI). *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 11(2).
 - [6] Ahi, R. S., & 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.
 - [7] Ahmad, N. W., Lim, L. H., Dhang, C. C., Chin, H. C., Abdullah, A. G., Mustaffa, W. N. W., & Azirun, S. M. (2011). Comparative insect fauna succession on indoor and outdoor monkey carrions in a semi-forested area in Malaysia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), S232-S238.
 - [8] Alcala, J., Katar, M., Rudner, G., & Maisel, H. (1988). Human beta crystallins: regional and age related changes. *Current eye research*, 7(4), 353-359.
 - [9] Al-Shareef, L. A., & Zaki, M. K. (2017). Arthropods associated with human remains and determination of postmortem interval in Jeddah, kingdom of Saudi Arabia. *Journal of American Science*, 13(3).
 - [10] Alves, R. D., Demmers, J. A., Bezstarosti, K., van der Eerden, B. C., Verhaar, J. A., Eijken, M., & van Leeuwen, J. P. (2011). Unraveling

- the human bone microenvironment beyond the classical extracellular matrix proteins: a human bone protein library. *Journal of proteome research*, 10(10), 4725-4733.
- [11] Amberg, R., & Pollak, S. (2001). Postmortem endoscopy of the ocular fundus: a valuable tool in forensic postmortem practice. *Forensic science international*, 124(2-3), 157-162.
- [12] Aoki, T. (1965). Studies on the estimation of time after death. *Jikeikai Med J*, 12, 164-177.
- [13] Asara, J. M., Schweitzer, M. H., Freimark, L. M., Phillips, M., & Cantley, L. C. (2007). Protein sequences from mastodon and *Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry. *Science*, 316(5822), 280-285.
- [14] Bachmann, J., & Simmons, T. (2010). The influence of preburial insect access on the decomposition rate. *Journal of Forensic Sciences*, 55(4), 893-900.
- [15] Balasooriya, B. A. W., Hill, C. S., & Williams, A. R. (1984). The biochemistry of vitreous humour. A comparative study of the potassium, sodium and urate concentrations in the eyes at identical time intervals after death. *Forensic science international*, 26(2), 85-91.
- [16] Balci, Y., Basmak, H., Kocaturk, B. K., Sahin, A., & Ozdamar, K. (2010). The importance of measuring intraocular pressure using a tonometer in order to estimate the postmortem interval. *The American journal of forensic medicine and pathology*, 31(2), 151-155.
- [17] Baniak, N., Campos-Baniak, G., Mulla, A., & Kalra, J. (2015). Vitreous humor: a short review on post-mortem applications. *J Clin Exp Pathol*, 4(6), 1-7.
- [18] Barrientos, G., Sarmiento, P. L., & 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.
- [19] Barús, J. I. M., Suárez-Peñaranda, J. M., Otero, X. L., Rodríguez-Calvo, M. S., Costas, E., Miguéns, X., & Concheiro, L. (2002). Improved

- estimation of postmortem interval based on differential behaviour of vitreous potassium and hypoxantine in death by hanging. *Forensic science international*, 125(1), 67-74.
- [20] Bassnett, S., Stewart, S., Duncan, G., & Croghan, P. C. (1988). Efflux of chloride from the rat lens: influence of membrane potential and intracellular acidification. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 73(6), 941-949.
- [21] Berman, E. R. (2013). *Biochemistry of the Eye*. Springer Science & Business Media.
- [22] Bell, L. S., Skinner, M. F., & 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.
- [23] Belsey, S. L., & Flanagan, R. J. (2016). Postmortem biochemistry: current applications. *Journal of forensic and legal medicine*, 41, 49-57.
- [24] Blana, S. A., Musshoff, F., Hoeller, T., Fimmers, R., & Madea, B. (2011). Variations in vitreous humor chemical values as a result of pre-analytical treatment. *Forensic science international*, 210(1-3), 263-270.
- [25] Blumenfeld, T. A., Mantell, C. H., Catherman, R. L., & Blanc, W. A. (1979). Postmortem vitreous humor chemistry in sudden infant death syndrome and in other causes of death in childhood. *American journal of clinical pathology*, 71(2), 219-223.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Bona, A., Papai, Z., Maasz, G., Toth, G. A., Jambor, E., Schmidt, J., & 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.

- [29] Bortolotti, F., Pascali, J. P., Davis, G. G., Smith, F. P., Brissie, R. M., & Tagliaro, F. (2011). Study of vitreous potassium correlation with time since death in the postmortem range from 2 to 110 hours using capillary ion analysis. *Medicine, Science and the Law*, 51(1_suppl), 20-23.
- [30] Braig, H. R., & Perotti, M. A. (2009). Carcasses and mites. *Experimental and Applied Acarology*, 49(1-2), 45-84.
- [31] Brown, M. A., Bunch, A. W., Froome, C., Gerling, R., Hennessy, S., & Ellison, J. (2017). Citrate Content of Bone as a Measure of Postmortem Interval: An External Validation Study. *Journal of forensic sciences*.
- [32] Brown, N. (1970). Slit-image photography. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom*, 89, 397.
- [33] Brown, S., Higham, T., Slon, V., Pääbo, S., Meyer, M., Douka, K., & Derevianko, A. (2016). Identification of a new hominin bone from Denisova Cave, Siberia using collagen fingerprinting and mitochondrial DNA analysis. *Scientific reports*, 6, 23559.
- [34] Buckley, M. (2015). Ancient collagen reveals evolutionary history of the endemic South American 'ungulates'. *Proc. R. Soc. B*, 282(1806), 20142671.
- [35] Buckley, M. (2016a). Species identification of bovine, ovine and porcine type 1 collagen; comparing peptide mass fingerprinting and LC-based proteomics methods. *International journal of molecular sciences*, 17(4), 445.
- [36] Buckley, M., Gu, M., Shameer, S., Patel, S., & Chamberlain, A. T. (2016). High-throughput collagen fingerprinting of intact microfaunal remains; a low-cost method for distinguishing between murine rodent bones. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 30(7), 805-812.
- [37] Buckley, M., Harvey, V. L., & Chamberlain, A. T. (2017). Species identification and decay assessment of Late Pleistocene fragmentary vertebrate remains from Pin Hole Cave (Creswell Crags, UK) using collagen fingerprinting. *Boreas*, 46(3), 402-411.

- [38] Buckley, M., Melton, N. D., & Montgomery, J. (2013). Proteomics analysis of ancient food vessel stitching reveals > 4000-year-old milk protein. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27(4), 531-538.
- [39] Callaway, E. (2013). Proteins help solve taxonomy riddle. *Nature*, 503(7474), 18-9.
- [40] Candia, O. A., Bentley, P. J., Mills, C. D., & Toyofuku, H. (1970). Asymmetrical distribution of the potential difference in the toad lens. *Nature*, 227(5260), 852.
- [41] Cantürk, İ., & Özyılmaz, L. (2018). A computational approach to estimate postmortem interval using opacity development of eye for human subjects. *Computers in biology and medicine*, 98, 93-99.
- [42] Cantürk, İ., Çelik, S., Şahin, M. F., Yağmur, F., Kara, S., & Karabiber, F. (2017). Investigation of opacity development in the human eye for estimation of the postmortem interval. *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, 37(3), 559-565.
- [43] Cappella, A., Gibelli, D., Muccino, E., Scarpulla, V., Cerutti, E., Caruso, V., & Cattaneo, C. (2015). The comparative performance of PMI estimation in skeletal remains by three methods (C-14, luminol test and OHI): analysis of 20 cases. *International journal of legal medicine*, 1-10.
- [44] Cappellini, E., Jensen, L. J., Szklarczyk, D., Ginolhac, A., da Fonseca, R. A., Stafford Jr, T. W., & Gilbert, M. T. P. (2011). Proteomic analysis of a pleistocene mammoth femur reveals more than one hundred ancient bone proteins. *Journal of proteome research*, 11(2), 917-926.
- [45] Caputo, I., Lepretti, M., Scarabino, C., Esposito, C., & Proto, A. (2012). An acetic acid-based extraction method to obtain high quality collagen from archeological bone remains. *Analytical biochemistry*, 421(1), 92-96.
- [46] Cardoso, H. F. V., Santos, A., Dias, R., Garcia, C., Pinto, M., Sérgio, C., & Magalhães, T. (2010). Establishing a minimum postmortem interval of human remains in an advanced state of skeletonization using the growth rate of bryophytes and plant roots. *International journal of legal medicine*, 124(5), 451-456.

- [47] Carvajal Oviedo, H. E. (2012). Determinación de la data de muerte. *Archivos Bolivianos de Medicina*, 17, 41.
- [48] Castellano, M. A., Villanueva, E. C., & Von Frenckel, R. (1984). Estimating the date of bone remains: a multivariate study. *Journal of Forensic Science*, 29(2), 527-534.
- [49] Cattaneo, C. (2007). Forensic anthropology: developments of a classical discipline in the new millennium. *Forensic science international*, 165(2-3), 185-193.
- [50] Cazalbou, S., Eichert, D., Ranz, X., Drouet, C., Combes, C., Harmand, M. F., & Rey, C. (2005). Ion exchanges in apatites for biomedical application. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16(5), 405-409.
- [51] Ceschi, G. P., & Artaria, L. G. (1998). Clear lens extraction (CLE) zur Korrektur der hochgradigen myopie. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 212(05), 280-282.
- [52] Chandrakanth, H. V., Kanchan, T., Balaraj, B. M., Virupaksha, H. S., & Chandrashekar, T. N. (2013). Postmortem vitreous chemistry—an evaluation of sodium, potassium and chloride levels in estimation of time since death (during the first 36 h after death). *Journal of forensic and legal medicine*, 20(4), 211-216.
- [53] Cheng, H. M., Chylack, L. T., & Von Saltza, I. (1981). Supplementing glucose metabolism
- [54] Child, A. M. (1995). Microbial taphonomy of archaeological bone. *Studies in Conservation*, 40(1), 19-30.
- [55] Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 3(Supplement 3), S131-S139.
- [56] Cleland, T. P., Schroeter, E. R., & Schweitzer, M. H. (2015). Biologically and diagenetically derived peptide modifications in moa collagens. *Proc. R. Soc. B*, 282(1808), 20150015.

-
- [57] Cleland, T. P., Voegelé, K., & Schweitzer, M. H. (2012). Empirical evaluation of bone extraction protocols. *PLoS One*, 7(2), e31443.
- [58] Cockle, D. L., & Bell, L. S. (2015). Human decomposition and the reliability of a 'Universal' model for post mortem interval estimations. *Forensic science international*, 253, 136-e1.
- [59] Coe, J. I. (1969). Postmortem chemistries on human vitreous humor. *American Journal of Clinical Pathology*, 51(6), 741-750.
- [60] Coe, J. I. (1989). Vitreous potassium as a measure of the postmortem interval: an historical review and critical evaluation. *Forensic science international*, 42(3), 201-213.
- [61] Coe, J. I. (1993). Postmortem chemistry update. Emphasis on forensic application. *The American journal of forensic medicine and pathology*, 14(2), 91-117.
- [62] Coe, J. I., & Apple, F. S. (1985). Variations in vitreous humor chemical values as a result of instrumentation. *Journal of Forensic Science*, 30(3), 828-835.
- [63] 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., & Turner-Walker, G. (2002). The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry*, 44(3), 383-394.
- [64] Collins, M. J., Riley, M. S., Child, A. M., & Turner-Walker, G. (1995). A basic mathematical simulation of the chemical degradation of ancient collagen. *Journal of Archaeological Science*, 22(2), 175-183.
- [65] Costa, P. S., Santos, N. C., Cunha, P., Cotter, J., & Sousa, N. (2013). The use of multiple correspondence analysis to explore associations between categories of qualitative variables in healthy ageing. *Journal of aging research*, 2013.
- [66] Costello, L. C., Chellaiah, M., Zou, J., Franklin, R. B., & Reynolds, M. A. (2014). The status of citrate in the hydroxyapatite/collagen complex of bone; and its role in bone formation. *Journal of regenerative medicine & tissue engineering*, 3, 4.

- [67] Costello, M. J., McIntosh, T. J., & Robertson, J. D. (1989). Distribution of gap junctions and square array junctions in the mammalian lens. *Investigative ophthalmology & visual science*, 30(5), 975-989.
- [68] Cotran, R. S., Kumar, V., & Robbins, S. L. (1995). *Patología estructural y funcional* (No. 407 COT).
- [69] Creagh, D., & Cameron, A. (2017). Estimating the Post-Mortem Interval of skeletonized remains: The use of Infrared spectroscopy and Raman spectro-microscopy. *Radiation Physics and Chemistry*, 137, 225-229.
- [70] Cunanan, C. M., Tarbaux, N. M., & Knight, P. M. (1991). Surface properties of intraocular lens materials and their influence on in vitro cell adhesion. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 17(6), 767-773.
- [71] Cunha, E., Cattaneo, C., Martrille, L., Gibelli, D., Taborelli, A., & 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.
- [72] Damann, F. E., Williams, D. E., & Layton, A. C. (2015). Potential use of bacterial community succession in decaying human bone for estimating postmortem interval. *Journal of forensic sciences*, 60(4), 844-850.
- [73] Dautartas, A. M. (2009). The effect of various coverings on the rate of human decomposition.
- [74] Dekeirsschieter, J., Verheggen, F. J., Gohy, M., Hubrecht, F., Bourguignon, L., Lognay, G., & Haubruge, E. (2009). Cadaveric volatile organic compounds released by decaying pig carcasses (*Sus domesticus* L.) in different biotopes. *Forensic Science International*, 189(1-3), 46-53.
- [75] Delabarde, T., Cannet, C., Raul, J. S., Géraut, A., Taccoen, M., & Ludes, B. (2017). Bone and soft tissue histology: a new approach to determine characteristics of offending instrument in sharp force injuries. *International journal of legal medicine*, 131(5), 1313-1323.

-
- [76] Demarchi, B., Hall, S., Roncal-Herrero, T., Freeman, C. L., Woolley, J., Crisp, M. K., & Jersie-Christensen, R. R. (2016). Protein sequences bound to mineral surfaces persist into deep time. *Elife*, 5, e17092.
- [77] Den Hartog, E. A., & Lotens, W. A. (2004). Postmortem time estimation using body temperature and a finite-element computer model. *European journal of applied physiology*, 92(6), 734-737.
- [78] Dent, B. B., Forbes, S. L., & Stuart, B. H. (2004). Review of human decomposition processes in soil. *Environmental Geology*, 45(4), 576-585.
- [79] Di Luca, A., Elia, G., Mullen, A. M., & Hamill, R. M. (2013). Monitoring post mortem changes in porcine muscle through 2-D DIGE proteome analysis of Longissimus muscle exudate. *Proteome science*, 11(1), 9.
- [80] Doherty, M. K., Hammond, D. E., Clague, M. J., Gaskell, S. J., & Beynon, R. J. (2008). Turnover of the human proteome: determination of protein intracellular stability by dynamic SILAC. *Journal of proteome research*, 8(1), 104-112.
- [81] Downs, E. F., & Lowenstein, J. M. (1995). Identification of archaeological blood proteins: A cautionary note. *Journal of Archaeological Science*, 22(1), 11-16.
- [82] Duncan, G. (1969). The site of the ion restricting membranes in the toad lens. *Experimental eye research*, 8(4), 406-412.
- [83] El-Kashef, N., Gomes, I., Mercer-Chalmers-Bender, K., Schneider, P. M., Rothschild, M. A., & Juebner, M. (2017). Comparative proteome analysis for identification of differentially abundant proteins in SIDS. *International journal of legal medicine*, 131(6), 1597-1613.
- [84] Eynard, A. R., Valentich, M. A., & Rovasio, R. A. (2011). *Histologia e Embriologia Humanas-: Bases Celulares e Moleculares*. Artmed Editora.
- [85] Facchini, F., & Pettener, D. (1977). Chemical and physical methods in dating human skeletal remains. *American journal of physical anthropology*, 47(1), 65-70.

- [86] Fang, D., Liang, Y. R., & Chen, H. (2007). The advance on the mechanism of corneal opacity and its application in forensic medicine. *Forensic Sci Technol*, 2, 36-38.
- [87] Farmer, J. G., Benomran, F., Watson, A. A., & Harland, W. A. (1985). Magnesium, potassium, sodium and calcium in post-mortem vitreous humour from humans. *Forensic science international*, 27(1), 1-13.
- [88] Ferreira, M. T., Coelho, C., & Gama, I. (2017). Application of forensic anthropology to non-forensic issues: an experimental taphonomic approach to the study of human body decomposition in aerobic conditions. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 1-9
- [89] Fleischer, L., Sehner, S., Gehl, A., Riemer, M., Raupach, T., & Anders, S. (2017). Measurement of Postmortem Pupil Size: A New Method with Excellent Reliability and Its Application to Pupil Changes in the Early Postmortem Period. *Journal of forensic sciences*, 62(3), 791-795.
- [90] Forbes, S. (2004). Time since death: a novel approach to dating skeletal remains. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 36(2), 67-72.
- [91] 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
- [92] Forbes, S. L., & 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
- [93] García, P. T., Gabriel, E. F., Pessôa, G. S., Júnior, J. C. S., Mollo Filho, P. C., Guidugli, R. B., & Coltro, W. K. (2017). based microfluidic devices on the crime scene: A simple tool for rapid estimation of post-

- mortem interval using vitreous humour. *Analytica Chimica Acta*, 974, 69-74.
- [94] Gauthamadasa, K., Rosales, C., Pownall, H. J., Macha, S., Jerome, W. G., Huang, R., & Silva, R. G. D. (2010). Speciated human high-density lipoprotein protein proximity profiles. *Biochemistry*, 49(50), 10656-10665.
- [95] 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.
- [96] Go, A., Shim, G., Hong, Y., Choe, S., In, S., Choi, Y., & Chung, H. (2017, August). Concentration of hypoxanthine in korean vitreous humor for the estimation of post-mortem interval. in *forensic science international (Vol. 277, pp. 62-62)*. Elsevier house, brookvale plaza, east park shannon, co, clare, 00000, ireland: Elsevier Ireland Ltd.
- [97] Gorbunoff, M. J. (1984). The interaction of proteins with hydroxyapatite: II. Role of acidic and basic groups. *Analytical biochemistry*, 136(2), 433-439.
- [98] Gorbunoff, M. J., & Timasheff, S. N. (1984). The interaction of proteins with hydroxyapatite: III. Mechanism. *Analytical biochemistry*, 136(2), 440-445.
- [99] Grandori, R. (2003). Origin of the conformation dependence of protein charge-state distributions in electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 38(1), 11-15.
- [100] Gray, J. J. (2004). The interaction of proteins with solid surfaces. *Current opinion in structural biology*, 14(1), 110-115.
- [101] Grynpas, M. (1976). The crystallinity of bone mineral. *Journal of Materials Science*, 11(9), 1691-1696.
- [102] Gupta, R., & Ramnani, P. (2006). Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(1), 21.

- [103] Ham, A., & Cormack, D. H. (1983). Histologia. In *Histologia*.
- [104] Hansson, L., Uotila, U., Lindfors, R., & Laiho, K. (1966). Potassium content of the vitreous body as an aid in determining the time of death. *Journal of forensic sciences*, 11(3), 390-394.
- [105] Harding, J. J. (1973). Disulphide cross-linked protein of high molecular weight in human cataractous lens. *Experimental eye research*, 17(4), 377-383.
- [106] Harris, L., & Gehrsitz, J. B. (1953). Sodium pump in human lens. *Am. J. Ophthalmology*, 36, 39-44.
- [107] Haskell, N.H.; Catts, E.P. (2008). Entomology and Death: A Procedural Guide, 2nd ed., East Park Printing.
- [108] Hau, T. C., Hamzah, N. H., Lian, H. H., & Hamzah, S. P. A. A. (2014). Decomposition process and post mortem changes. *Sains Malaysiana*, 43(12), 1873-1882.
- [109] Hedges, R. E. (2002). Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry*, 44(3), 319-328.
- [110] Hedges, R. E., & Millard, A. R. (1995). Bones and groundwater: towards the modelling of diagenetic processes. *Journal of Archaeological Science*, 22(2), 155-164.
- [111] Henssge, C., & Madea, B. (2007). Estimation of the time since death. *Forensic science international*, 165(2-3), 182-184.
- [112] Hill, R. C., Wither, M. J., Nemkov, T., Barrett, A., D'Alessandro, A., Dzieciatkowska, M., & Hansen, K. C. (2015). Preserved proteins from extinct *Bison latifrons* identified by tandem mass spectrometry; hydroxylysine glycosides are a common feature of ancient collagen. *Molecular & Cellular Proteomics*, mcp-M114.
- [113] Hoffman, E. M., Curran, A. M., Dulgerian, N., Stockham, R. A., & Eckenrode, B. A. (2009). Characterization of the volatile organic compounds present in the headspace of decomposing human remains. *Forensic Science International*, 186(1-3), 6-13.

-
- [114] Hofreiter, M., Collins, M., & Stewart, J. R. (2012). Ancient biomolecules in Quaternary palaeoecology. *Quaternary Science Reviews*, 33, 1-13.
- [115] Hoke, N., Grigat, A., Grupe, G., & Harbeck, M. (2013). Reconsideration of bone postmortem interval estimation by UV-induced autofluorescence. *Forensic science international*, 228(1-3), 176-e1.
- [116] Honjyo, K., Yonemitsu, K., & Tsunenari, S. (2005). Estimation of early postmortem intervals by a multiple regression analysis using rectal temperature and non-temperature based postmortem changes. *Journal of clinical forensic medicine*, 12(5), 249-253.
- [117] Hostiuc, S. O. R. I. N., Rusu, M. C., MĂNOIU, V. S., Vrapciu, A. D., NEGOI, I., & Popescu, M. V. (2017). Usefulness of ultrastructure studies for the estimation of the postmortem interval. A systematic review. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 58(2), 377-84.
- [118] Hubig, M., Muggenthaler, H., & Mall, G. (2011). Influence of measurement errors on temperature-based death time determination. *International journal of legal medicine*, 125(4), 503-517.
- [119] Husson, F., Lê, S., & Pagès, J. (2017). *Exploratory multivariate analysis by example using R*. Chapman and Hall/CRC.
- [120] Ingham, A. I., & Byard, R. W. (2009). The potential significance of elevated vitreous sodium levels at autopsy. *Journal of forensic and legal medicine*, 16(8), 437-440.
- [121] Ingram, R. T., Clarke, B. L., Fisher, L. W., & Fitzpatrick, L. A. (1993). Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone: evidence of anatomic and functional heterogeneity. *Journal of Bone and Mineral Research*, 8(9), 1019-1029.
- [122] Introna, F., Di Vella, G., & Campobasso, C. P. (1999). Determination of postmortem interval from old skeletal remains by image analysis of luminol test results. *Journal of Forensic Science*, 44(3), 535-538.

- [123] Ioan, B. G., Manea, C., Hanganu, B., Statescu, L., Solovastru, L. G., & Manoilescu, I. (2017). The Chemistry Decomposition in Human Corpses. *REVISTA DE CHIMIE*, 68(6), 1352-1356.
- [124] Jaafar, S., & Nokes, L. D. M. (1994). Examination of the eye as a means to determine the early postmortem period: a review of the literature. *Forensic science international*, 64(2-3), 185-189.
- [125] Jakobiec, F. A. (Ed.). (1982). *Ocular anatomy, embryology, and teratology*. Harpercollins.
- [126] James, R. A., Hoadley, P. A., & Sampson, B. G. (1997). Determination of postmortem interval by sampling vitreous humour. *The American journal of forensic medicine and pathology*, 18(2), 158-162.
- [127] Janaway, R. C., Percival, S. L., & Wilson, A. S. (2009). Decomposition of human remains. In *Microbiology and aging* (pp. 313-334). Humana Press.
- [128] Jashnani, K. D., Kale, S. A., & Rupani, A. B. (2010). Vitreous humor: biochemical constituents in estimation of postmortem interval. *Journal of forensic sciences*, 55(6), 1523-1527.
- [129] Javan, G. T., Finley, S. J., Can, I., Wilkinson, J. E., Hanson, J. D., & Tarone, A. M. (2016). Human thanatomicrobiome succession and time since death. *Scientific reports*, 6, 29598.
- [130] Jongenelen, S., Rozema, J. J., & Tassignon, M. J. (2015). Distribution of the crystalline lens power in vivo as a function of age. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(12), 7029-7035.
- [131] Júnior, J. C. S., Mollo Filho, P. C., Guidugli, R. B. F., Eberlin, M. N., de Souza Pessôa, G., da Silva, E. G., & Höehr, N. F. (2014). Metals and (metallo) proteins identification in vitreous humor focusing on post-mortem biochemistry. *Metallomics*, 6(10), 1801-1807.
- [132] Kaiser, C., Bachmeier, B., Conrad, C., Nerlich, A., Bratzke, H., Eisenmenger, W., & Peschel, O. (2008). Molecular study of time dependent changes in DNA stability in soil buried skeletal residues. *Forensic science international*, 177(1), 32-36.
- [133] Kaliszan, M., Hauser, R., & Kernbach-Wighton, 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.
- [134] Kandlbinder, R., Geißler, V., Schupfner, R., Wolfbeis, O., & Zinka, B. (2009). Analysing of ²²⁸Th, ²³²Th, ²²⁸Ra in human bone tissues for the purpose of determining the post mortal interval. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, 280(1), 113-119.
- [135] Kanz, F., Reiter, C., & 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.
- [136] Kapp, E. A., Schütz, F., Connolly, L. M., Chakel, J. A., Meza, J. E., Miller, C. A., & 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.
- [137] Kawashima, W., Hatake, K., Kudo, R., Nakanishi, M., Tamaki, S., Kasuda, S., & Ishitani, A. (2015). Estimating the time after death on the basis of corneal opacity. *Journal of Forensic Research*, 6(1), 1.
- [138] Kierszenbaum, A. L. (2008). *Histología y biología celular: introducción a la anatomía patológica* (No. Sirsi) i9788480863131).
- [139] Knight, B. (1969). Methods of dating skeletal remains. *Medicine, Science and the law*, 9(4), 247-252.
- [140] Knight, B., & 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.
- [141] Kumar, V., Cotran, R. S., & Robbins, S. L. (2008). *Patología humana*. Elsevier Health Sciences.
- [142] Kuszak, J. R., Macsai, M. S., Bloom, K. J., Rae, J. L., & Weinstein, R. S. (1985). Cell-to-cell fusion of lens fiber cells in situ: Correlative light, scanning electron microscopic, and freeze-fracture studies. *Journal of ultrastructure research*, 93(3), 144-160.

- [143] Kuszak, J. R., Zoltoski, R. K., & Tiedemann, C. E. (2004). Development of lens sutures. *International Journal of Developmental Biology*, 48(8-9), 889-902.
- [144] Le Garff, E., Mesli, V., Delannoy, Y., Colard, T., Demondion, X., Becart, A., & Hedouin, V. (2017). early post-mortem changes of human bone in taphonomy with μ CT. *International journal of legal medicine*, 131(3), 761-770.
- [145] Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008). FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of statistical software*, 25(1), 1-18.
- [146] Lee, G.M. 2009. Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers. *Experimental and Applied Acarology* 49(1): 21-36.
- [147] Li, C., Li, Z., Tuo, Y., Ma, D., Shi, Y., Zhang, Q., & Huang, P. (2017b). MALDI-TOF MS as a Novel Tool for the Estimation of Postmortem Interval in Liver Tissue Samples. *Scientific reports*, 7(1), 4887.
- [148] Li, C., Wang, Q., Zhang, Y., Lin, H., Zhang, J., Huang, P., & Wang, Z. (2016). Research progress in the estimation of the postmortem interval by Chinese forensic scholars. *Forensic Sciences Research*, 1(1), 3-13.
- [149] Li, X. N., Zheng, J. L., Hu, Z. G., & Wang, B. J. (2013). Relationship between corneal thickness and postmortem interval in rabbit. *Fa yi xue za zhi*, 29(4), 241-243.
- [150] Lieverse, A. R., Weber, A. W., & Goriunova, O. I. (2006). Human taphonomy at Khuzhir-Nuge XIV, Siberia: a new method for documenting skeletal condition. *Journal of Archaeological Science*, 33(8), 1141-1151.
- [151] Linch, C. A., & Prahlow, J. A. (2001). Postmortem microscopic changes observed at the human head hair proximal end. *Journal of Forensic Science*, 46(1), 15-20.
- [152] Lindsay, W. L. (1979). *Chemical equilibria in soils* (1st Ed.). John Wiley & Sons, New York, pp. 1 – 9.
- [153] Liu, F., Zhu, S., Fu, Y., Fan, F., Wang, T., & Lu, S. (2008, December). Image analysis of the relationship between changes of

- cornea and postmortem interval. In *Pacific Rim International Conference on Artificial Intelligence* (pp. 998-1003). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [154] Lozano Teruel, J. A. (2005). *Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud*. McGraw-Hill Interamericana.
- [155] Lucas, V. A., & Zigler, J. S. (1988). Identification of the monkey lens glucose transporter by photoaffinity labelling with cytochalasin B. *Investigative ophthalmology & visual science*, 29(4), 630-635.
- [156] Lyle, W. A., & Jin, G. J. (1996). Prospective evaluation of early visual and refractive effects with small clear corneal incision for cataract surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 22(10), 1456-1460.
- [157] Lynnerup, N., Kjeldsen, H., Heegaard, S., Jacobsen, C., & Heinemeier, J. (2008). Radiocarbon dating of the human eye lens crystallines reveal proteins without carbon turnover throughout life. *PLoS One*, 3(1), e1529.
- [158] Maclaughlin-Black, S. M., Herd, R. J., Willson, K., Myers, M., & West, I. E. (1992). Strontium-90 as an indicator of time since death: a pilot investigation. *Forensic science international*, 57(1), 51-56.
- [159] Madea, B. (2005). Is there recent progress in the estimation of the postmortem interval by means of thanatochemistry? *Forensic science international*, 151(2), 139-149.
- [160] Madea, B. (2016). Methods for determining time of death. *Forensic science, medicine, and pathology*, 12(4), 451-485.
- [161] Madea, B. (Ed.). (2014). *Handbook of forensic medicine*. John Wiley & Sons.
- [162] Madea, B., & Lachenmeier, D. W. (2005). Postmortem diagnosis of hypertonic dehydration. *Forensic science international*, 155(1), 1-6.
- [163] Madea, B., & Rödiger, A. (2006). Time of death dependent criteria in vitreous humor—accuracy of estimating the time since death. *Forensic science international*, 164(2-3), 87-92.
- [164] Madea, B., Henssge, C., Hönig, W., & Gerbracht, A. (1989). References for determining the time of death by potassium in vitreous humor. *Forensic science international*, 40(3), 231-243.

- [165] Madea, B., Käferstein, H., Hermann, N., & Sticht, G. (1994). Hypoxanthine in vitreous humor and cerebrospinal fluid—a marker of postmortem interval and prolonged (vital) hypoxia? Remarks also on hypoxanthine in SIDS. *Forensic science international*, 65(1), 19-31.
- [166] Maile, A. E., Inoue, C. G., Barksdale, L. E., & Carter, D. O. (2017). Toward a universal equation to estimate postmortem interval. *Forensic science international*, 272, 150-153.
- [167] Maisel, H. (Ed.). (1985). *The Ocular lens: structure, function, and pathology*. Marcel Dekker Incorporated.
- [168] Makrodimitris, K., Masica, D. L., Kim, E. T., & Gray, J. J. (2007). Structure prediction of protein– solid surface interactions reveals a molecular recognition motif of statherin for hydroxyapatite. *Journal of the American Chemical Society*, 129(44), 13713-13722.
- [169] Maldonado, A. L. (2010). La data de la muerte, un desafío no resuelto.
- [170] Malecaze, F., Chollet, P., Cavrois, E., Vita, N., Arné, J. L., & Ferrara, P. (1991). Role of interleukin 6 in the inflammatory response after cataract surgery: an experimental and clinical study. *Archives of Ophthalmology*, 109(12), 1681-1683.
- [171] Mall, G., Eckl, M., Sinicina, I., Peschel, O., & Hubig, M. (2005). Temperature-based death time estimation with only partially known environmental conditions. *International journal of legal medicine*, 119(4), 185-194.
- [172] Marais-Werner, A., Myburgh, J., Meyer, A., Nienaber, W. C., & Steyn, M. (2017). Decomposition patterns of buried remains at different intervals in the Central Highveld region of South Africa. *Medicine, Science and the Law*, 57(3), 115-123.
- [173] Materazzi, S., Gullifa, G., Fabiano, M. A., Frati, P., Santurro, A., Scopetti, M., & Risoluti, R. (2017). New frontiers in thermal analysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 130(1), 549-557.
- [174] Mathias, R. T., Rae, J. L., Ebihara, L. I. S. A., & McCarthy, R. T. (1985). The localization of transport properties in the frog lens. *Biophysical journal*, 48(3), 423-434.

-
- [175] Matuszewski, S. (2017). A general approach for postmortem interval based on uniformly distributed and interconnected qualitative indicators. *International journal of legal medicine*, 131(3), 877-884.
- [176] Matuszewski, S., Bajerlein, D., Konwerski, S., & Szpila, K. (2008). An initial study of insect succession and carrion decomposition in various forest habitats of Central Europe. *Forensic Science International*, 180(2-3), 61-69.
- [177] McDowall, K. L., Lenihan, D. V., Busuttil, A., & Glasby, M. A. (1998). The use of absolute refractory period in the estimation of early postmortem interval. *Forensic science international*, 91(3), 163-170.
- [178] Meadows, L., Mann, R. W., & 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.
- [179] Megyesi, M. S., Nawrocki, S. P., & 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.
- [180] Menanteau, J., Neuman, W. F., & Neuman, M. W. (1982). A study of bone proteins which can prevent hydroxyapatite formation. *Metabolic Bone Disease and Related Research*, 4(2), 157-162.
- [181] Metcalf, J. L., Xu, Z. Z., Weiss, S., Lax, S., Van Treuren, W., Hyde, E. R., & Haarmann, D. (2016). Microbial community assembly and metabolic function during mammalian corpse decomposition. *Science*, 351(6269), 158-162.
- [182] Mihailovic, Z., Atanasijevic, T., Popovic, V., Milosevic, M. B., & Sperhake, J. P. (2012). Estimation of the postmortem interval by analyzing potassium in the vitreous humor: could repetitive sampling enhance accuracy? *The American journal of forensic medicine and pathology*, 33(4), 400-403.
- [183] Mikšík, I., Sedláková, P., Pataridis, S., Bortolotti, F., & Gottardo, R. (2016). Proteins and their modifications in a medieval mummy. *Protein Science*, 25(11), 2037-2044.
-

- [184] Miles, C. A., Sionkowska, A., Hulin, S. L., Sims, T. J., Avery, N. C., & 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.
- [185] Mitchell, R., Charlwood, C., Thomas, S. D., Bellis, M., & Langlois, N. E. (2013). An audit of the contribution to post-mortem examination diagnosis of individual analyte results obtained from biochemical analysis of the vitreous. *Forensic science, medicine, and pathology*, 9(4), 515-520.
- [186] Moreschi, C., Da Broi, U., & Lanzetta, P. (2013). Medico-legal implications of traumatic cataract. *Journal of forensic and legal medicine*, 20(2), 69-73.
- [187] Moses, R. A., & Hart, W. M. (1988). Fisiología del ojo de Adler. *Buenos Aires: Editorial Médica Pamericana*.
- [188] Muggenthaler, H., Sinicina, I., Hubig, M., & Mall, G. (2012). Database of post-mortem rectal cooling cases under strictly controlled conditions: a useful tool in death time estimation. *International journal of legal medicine*, 126(1), 79-87.
- [189] Mulla, A. A. (2005). *Role of vitreous humor biochemistry in forensic pathology* (Doctoral dissertation).
- [190] Munoz, J. I., Costas, E., Rodríguez-Calvo, M. S., Suarez-Penaranda, J. M., Lopez-Rivadulla, M., & Concheiro, L. (2006). A high-performance liquid chromatography method for hypoxanthine determination in vitreous humour: application to estimation of post mortem interval. *Human & experimental toxicology*, 25(5), 279-281.
- [191] Muñoz, J. I., Suárez-Peñaranda, J. M., Otero, X. L., Rodríguez-Calvo, M. S., Costas, E., Miguéns, X., & Concheiro, L. (2001). A new perspective in the estimation of postmortem interval (PMI) based on vitreous [K⁺]. *Journal of Forensic Science*, 46(2), 209-214.
- [192] Muñoz-Barús, J. I., Rodríguez-Calvo, M. S., Suárez-Peñaranda, J. M., Vieira, D. N., Cadarso-Suárez, C., & Febrero-Bande, M. (2010). PMICALC: an R code-based software for estimating post-mortem interval (PMI) compatible with Windows, Mac and Linux operating systems. *Forensic science international*, 194(1-3), 49-52.

-
- [193] Myburgh, J. (2010). *Estimating the post-mortem interval using accumulated degree-days in a South African setting* (Doctoral dissertation, University of Pretoria).
- [194] Neis, P., Hille, R., Paschke, M., Pilwat, G., Schnabel, A., Niess, C., & Bratzke, H. (1999). Strontium90 for determination of time since death. *Forensic science international*, 99(1), 47-51.
- [195] Nielsen-Marsh, C. M., & Hedges, R. E. (1999). Bone porosity and the use of mercury intrusion porosimetry in bone diagenesis studies, *Archaeometry*, 41(1), 165–74.
- [196] Nioi, M., Napoli, P. E., Demontis, R., Locci, E., Fossarello, M., & d'Aloja, E. (2018). Morphological analysis of corneal findings modifications after death: A preliminary OCT study on an animal model. *Experimental eye research*, 169, 20-27.
- [197] Okuda, J., Kawamura, M., & Didelot, S. (1987). Anomeric preference in uptake of D-glucose and of D-galactose by rat lenses. *Current eye research*, 6(10), 1223-1226.
- [198] Orden JUS/1291/2010, de 13 de mayo, por la que se aprueban las normas para la preparación y remisión de muestras objeto de análisis por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. BOE-A-2010-8030 de 19-5-2010.34.
- [199] Ortega, J. G., & Panesso, J. L. (2001). Cristalino. Fundamentos de Cirugía Oftalmológica. *Arango K, Mejía LF, Abad JC. Corporación para Investigaciones Biomédicas*, 159-76.
- [200] Parsons, H. R. (2009). The postmortem interval: a systematic study of pig decomposition in West Central Montana.
- [201] Paterson, C. A., Delamere, N. A., Mawhorter, L., & Cuizon, J. V. (1983). Na, K-ATPase in simulated eye bank and cryoextracted rabbit lenses, and human eye bank lenses and cataracts. *Investigative ophthalmology & visual science*, 24(11), 1534-1538.
- [202] Pechal, J. L., Crippen, T. L., Benbow, M. E., Tarone, A. M., Dowd, S., & Tomberlin, J. K. (2014). The potential use of bacterial community

- succession in forensics as described by high throughput metagenomic sequencing. *International Journal of Legal Medicine*, 128(1), 193-205.
- [203] Pérez-Martínez, C., Pérez-Cárceles, M. D., Legaz, I., Prieto-Bonete, G., & Luna, A. (2017). Quantification of nitrogenous bases, DNA and Collagen type I for the estimation of the postmortem interval in bone remains. *Forensic science international*, 281, 106-112.
- [204] Pérez-Martínez, C., Prieto-Bonete, G., Pérez-Cárceles, M. D., & Luna, A. (2016). Usefulness of protein analysis for detecting pathologies in bone remains. *Forensic science international*, 258, 68-73.
- [205] Pérez-Salvador García, E. (2000). Valor clínico de la exploración electrofisiológica ocular, electrorretinografía y potenciales evocados visuales, en los diferentes estadios evolutivos de las cataratas con relación a su pronóstico visual postoperatorio.
- [206] Perper, J. A. (1993). Time of death and changes after death. *U: Spitz and Fisher's medicolegal investigation of death: Guidelines for the application of pathology to crime investigation. 3d ed., ed. Spitz WU Springfield: Charles C. Thomas*, 14-49.
- [207] Perry, R. E., Swamy, M. S., & Abraham, E. C. (1987). Progressive changes in lens crystallin glycation and high-molecular-weight aggregate formation leading to cataract development in streptozotocin-diabetic rats. *Experimental eye research*, 44(2), 269-282.
- [208] Pessione, E., Mazzoli, R., Giuffrida, M. G., Lamberti, C., Garcia-Moruno, E., Barello, C., & Giunta, C. (2005). A proteomic approach to studying biogenic amine producing lactic acid bacteria. *Proteomics*, 5(3), 687-698.
- [209] 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.
- [210] Pirie, A. (1951). Composition of ox lens capsule. *Biochemical Journal*, 48(3), 368.
- [211] Pittner, S., Ehrenfellner, B., Monticelli, F. C., Zissler, A., Sängler, A. M., Stoiber, W., & Steinbacher, P. (2016a). Postmortem muscle

- protein degradation in humans as a tool for PMI delimitation. *International journal of legal medicine*, 130(6), 1547-1555.
- [212] Pittner, S., Monticelli, F. C., Pfisterer, A., Zissler, A., Sanger, A. M., Stoiber, W., & Steinbacher, P. (2016b). Postmortem degradation of skeletal muscle proteins: a novel approach to determine the time since death. *International journal of legal medicine*, 130(2), 421-431.
- [213] Poloz, Y. O., & O'Day, D. H. (2009). Determining time of death: temperature-dependent postmortem changes in calcineurin A, MARCKS, CaMKII, and protein phosphatase 2A in mouse. *International journal of legal medicine*, 123(4), 305-314.
- [214] Porto, I. M., Laure, H. J., Tykot, R. H., de Sousa, F. B., Rosa, J. C., & Gerlach, R. F. (2011). Recovery and identification of mature enamel proteins in ancient teeth. *European journal of oral sciences*, 119, 83-87.
- [215] Pounder, D. J. (1995). Postmortem changes and time of death. *Department of Forensic Medicine, University of Dundee, Dundee*.
- [216] Procopio, N., Chamberlain, A. T., & Buckley, M. (2017). Intra-and Interskeletal proteome variations in fresh and buried bones. *Journal of proteome research*, 16(5), 2016-2029.
- [217] Procopio, N., & Buckley, M. (2016). Minimizing laboratory-induced decay in bone proteomics. *Journal of proteome research*, 16(2), 447-458.
- [218] Procopio, N., Chamberlain, A. T., & Buckley, M. (2018a). Exploring Biological and Geological Age-related Changes through Variations in Intra-and Intertooth Proteomes of Ancient Dentine. *Journal of proteome research*, 17(3), 1000-1013.
- [219] Procopio, N., Williams, A., Chamberlain, A. T., & Buckley, M. (2018b). Forensic proteomics for the evaluation of the post-mortem decay in bones. *Journal of proteomics*, 177, 21-30.
- [220] Rae, J. L., & Kuszak, J. R. (1983). The electrical coupling of epithelium and fibers in the frog lens. *Experimental eye research*, 36(3), 317-326.

- [221] Rafferty, N. S., & Scholz, D. L. (1984). Polygonal arrays of microfilaments in epithelial cells of the intact lens. *Current eye research*, 3(9), 1141-1149.
- [222] Ramsthaller, F., Ebach, S. C., Birngruber, C. G., & Verhoff, M. A. (2011). Postmortem interval of skeletal remains through the detection of intraosseal hemin traces. A comparison of UV-fluorescence, luminol, Hexagon-OBTI®, and Combur® tests. *Forensic science international*, 209(1-3), 59-63.
- [223] Ramsthaller, F., Kreutz, K., Zipp, K., & Verhoff, M. A. (2009). Dating skeletal remains with luminol-chemiluminescence. Validity, intra- and interobserver error. *Forensic science international*, 187(1-3), 47-50.
- [224] Raja, S., Thomas, P., Stuart, B., Guerbois, J., & O'Brien, C. (2009). The estimation of pig bone age for forensic application using thermogravimetric analysis. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 98(1), 173-176.
- [225] Reddy, K., & Lowenstein, E. J. (2011). Forensics in dermatology: part I. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 64(5), 801-808.
- [226] Rhine, S., & 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.
- [227] Roberts, S. J., Smith, C. I., Millard, A., & Collins, M. J. (2002). The taphonomy of cooked bone: characterizing boiling and its physico-chemical effects. *Archaeometry*, 44(3), 485-494.
- [228] Rodrigo, M. R. (2016). A nonlinear least squares approach to time of death estimation via body cooling. *Journal of forensic sciences*, 61(1), 230-233.
- [229] Rodríguez, W. C., & Bass, W. M. (1985). Decomposition of buried bodies and methods that may aid in their location. *Journal of Forensic Science*, 30(3), 836-852.

- [230] Rognum, T. O., Holmen, S., Musse, M. A., Dahlberg, P. S., Stray-Pedersen, A., Saugstad, O. D., & Opdal, S. H. (2016). Estimation of time since death by vitreous humor hypoxanthine, potassium, and ambient temperature. *Forensic science international*, 262, 160-165.
- [231] Romberg, R. W., Werness, P. G., Riggs, B. L., & Mann, K. G. (1986). Inhibition of hydroxyapatite-crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry*, 25(5), 1176-1180.
- [232] Ross, A. H., & Cunningham, S. L. (2011). Time-since-death and bone weathering in a tropical environment. *Forensic Science International*, 204(1-3), 126-133.
- [233] Ross, M. H., & Pawlina, W. (2015). *Histología: texto y atlas: correlación con biología celular y molecular* (No. H200 ROSh 7a. ed.).
- [234] Rudakova, T. E., & Zaikov, G. E. (1987). Degradation of collagen and its possible applications in medicine. *Polymer Degradation and Stability*, 18(4), 271-291.
- [235] Sabucedo, A. J., & Furton, K. G. (2003). Estimation of postmortem interval using the protein marker cardiac Troponin I. *Forensic science international*, 134(1), 11-16.
- [236] Salam, H. A., Shaat, E. A., Aziz, M. H. A., MoneimSheta, A. A., & Hussein, H. A. S. M. (2012). Estimation of postmortem interval using thanatochemistry and postmortem changes. *Alexandria Journal of Medicine*, 48(4), 335-344.
- [237] San Antonio, J. D., Schweitzer, M. H., Jensen, S. T., Kalluri, R., Buckley, M., & Orgel, J. P. (2011). Dinosaur peptides suggest mechanisms of protein survival. *PLoS One*, 6(6), e20381.
- [238] Sarabia, J., Pérez-Martínez, C., del Rincón, J. P. H., & Luna, A. (2018). Study of chemiluminescence measured by luminometry and its application in the estimation of postmortem interval of bone remains. *Legal Medicine*, 33, 32-35.
- [239] Sarah, S. A., Faradalila, W. N., Salwani, M. S., Amin, I., Karsani, S. A., & Sazili, A. Q. (2016). LC-QTOF-MS identification of porcine-specific peptide in heat treated pork identifies candidate markers for meat species determination. *Food chemistry*, 199, 157-164.

- [240] Saukko, P., & Knight, B. (2015). *Knight's Forensic Pathology Fourth Edition*. CRC press.
- [241] Sawafuji, R., Cappellini, E., Nagaoka, T., Fotakis, A. K., Jersie-Christensen, R. R., Olsen, J. V., & Ueda, S. (2017). Proteomic profiling of archaeological human bone. *Royal Society open science*, 4(6), 161004.
- [242] Schmidt, A., Forne, I., & Imhof, A. (2014). Bioinformatic analysis of proteomics data. *BMC systems biology*, 8(2), S3.
- [243] Schmidt-Schultz, T. H., & 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.
- [244] Schrag, B., Uldin, T., Mangin, P., Bochud, F., & Froidevaux, P. (2014). Dating human skeletal remains using ⁹⁰Sr and ²¹⁰Pb: Case studies. *Forensic science international*, 234, 190-e1.
- [245] Schultz, J. J. (2012). *Determining the forensic significance of skeletal remains* (pp. 66-84). Wiley-Blackwell: Chichester, UK.
- [246] Schwarcz, H. P., Agur, K., & Jantz, L. M. (2010). A new method for determination of postmortem interval: citrate content of bone. *Journal of forensic sciences*, 55(6), 1516-1522.
- [247] Schweitzer, M. H., Schroeter, E. R., & Goshe, M. B. (2014). Protein molecular data from ancient (> 1 million years old) fossil material: pitfalls, possibilities and grand challenges. *Analytical chemistry*, 86(14), 6731-6740.
- [248] Seo, J. S., Keum, Y. S., & Li, Q. X. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *International journal of environmental research and public health*, 6(1), 278-309.
- [249] Sharanowski, B. J., Walker, E. G., & Anderson, G. S. (2008). Insect succession and decomposition patterns on shaded and sunlit carrion in Saskatchewan in three different seasons. *Forensic Science International*, 179(2-3), 219-240.
- [250] Shattuck, C. M. (2009). An analysis of decomposition rates on outdoor surface variations in Central Texas.
- [251] Siddamsetty, A. K., Verma, S. K., Kohli, A., Puri, D., & Singh, A. (2014). Estimation of time since death from electrolyte, glucose and

- calcium analysis of postmortem vitreous humour in semi-arid climate. *Medicine, Science and the Law*, 54(3), 158-166.
- [252] Smart, J. L., & Kaliszan, M. (2012). The post mortem temperature plateau and its role in the estimation of time of death. A review. *Legal Medicine*, 14(2), 55-62.
- [253] Song, G., & Shi, J. H. (2001). Study of corneal endothelium cell and its application in forensic medicine. *Forensic Sci Technol*, 1, 36-37.
- [254] Spector, A., & Roy, D. (1978). Disulfide-linked high molecular weight protein associated with human cataract. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(7), 3244-3248.
- [255] Stadler, S., Stefanuto, P. H., Brokl, M., Forbes, S. L., & Focant, J. F. (2012). Characterization of volatile organic compounds from human analogue decomposition using thermal desorption coupled to comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 85(2), 998-1005.
- [256] Statheropoulos, M., Spiliopoulou, C., & Agapiou, A. (2005). A study of volatile organic compounds evolved from the decaying human body. *Forensic Science International*, 153(2-3), 147-155.
- [257] Stephens, R. J., & Richards, R. G. (1987). Vitreous humor chemistry: the use of potassium concentration for the prediction of the postmortem interval. *Journal of Forensic Science*, 32(2), 503-509.
- [258] Sterzik, V., Jung, T., Jellinghaus, K., & Bohnert, M. (2016). Estimating the postmortem interval of human skeletal remains by analyzing their optical behavior. *International journal of legal medicine*, 130(6), 1557-1566.
- [259] Sturner, W. Q., & Gantner Jr, G. E. (1964). The postmortem interval. *American journal of clinical pathology*, 42(2), 137-144.
- [260] Subczynski, W. K., Raguz, M., Widomska, J., Mainali, L., & Konovalov, A. (2012). Functions of cholesterol and the cholesterol bilayer domain specific to the fiber-cell plasma membrane of the eye lens. *The Journal of membrane biology*, 245(1), 51-68.

- [261] Swann, L. M., Forbes, S. L., & Lewis, S. W. (2010). Analytical separations of mammalian decomposition products for forensic science: a review. *Analytica chimica acta*, 682(1-2), 9-22.
- [262] Swaraldahab, M. A., & Christensen, A. M. (2016). The effect of time on bone fluorescence: implications for using alternate light sources to search for skeletal remains. *Journal of forensic sciences*, 61(2), 442-444.
- [263] Swift, B. (1998). Dating human skeletal remains: Investigating the viability of measuring the equilibrium between ^{210}Po and ^{210}Pb as a means of estimating the post-mortem interval. *Forensic science international*, 98(1-2), 119-126.
- [264] Swift, B. (2004). *The use of radio-isotopes in forensic science: the development of the isotope fingerprint analysis* (Doctoral dissertation, Medicine).
- [265] Swift, B. (2006). The timing of death. In *Essentials of autopsy practice: Current Methods and Modern Trends*, edited by Rutty, G.N. New York: Springer. pp.189-214.
- [266] Tanaka, E., Oikawa, H., Aita, K., Tanno, K., Yamazaki, K., & 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.
- [267] Tao, T., Xu, J., Luo, T. X., Liao, Z. G., & Pan, H. F. (2006). Contents of vitreous humor of dead body with different postmortem intervals. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Sichuan University. Medical science edition*, 37(6), 898-900.
- [268] Tarone, A. M., & Foran, D. R. (2011). Gene expression during blow fly development: improving the precision of age estimates in forensic entomology. *Journal of Forensic Sciences*, 56, S112-S122.
- [269] Tatiya, H. S., Taware, A. A., Jadhav, V. T., & Punpale, S. B. (2017). Between Eye Difference in Vitreous Electrolytes after Death; for Identical Postmortme Intervals. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 11(2).

-
- [270] Taylor, R. E., Suchey, J. M., Payen, L. A., & Slota, P. J. (1989). The use of radiocarbon (^{14}C) to identify human skeletal materials of forensic science interest. *Journal of Forensic Science*, 34(5), 1196-1205.
- [271] Termine, J. D., Kleinman, H. K., Whitson, S. W., Conn, K. M., McGarvey, M. L., & Martin, G. R. (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*, 26(1), 99-105.
- [272] Tibbett, M. & Carter, D.O. (2009). Research in forensic taphonomy: A soil-based perspective. In *Criminal and Environmental Soil Forensics*, edited by Ritz, K., Dawson, L. & Miller, D. Bradford: Springer Science & Business Media. pp. 317-331.
- [273] Tomassetti, M., Marini, F., Campanella, L., & Coppa, A. (2013). Study of modern or ancient collagen and human fossil bones from an archaeological site of middle Nile by thermal analysis and chemometrics. *Microchemical Journal*, 108, 7-13.
- [274] Toyama, B. H., & Hetzer, M. W. (2013). Protein homeostasis: live long, won't prosper. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(1), 55.
- [275] Trokielewicz, M., Czajka, A., & Maciejewicz, P. (2018). Iris Recognition After Death. *arXiv preprint arXiv:1804.01962*.
- [276] Trueman, C. N., Behrensmeyer, A. K., Tuross, N., & 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
- [277] Tsokos, M., Reichelt, U., Jung, R., Nierhaus, A., & Püschel, K. (2001). Interleukin-6 and C-reactive protein serum levels in sepsis-related fatalities during the early postmortem period. *Forensic science international*, 119(1), 47-56.
- [278] Tsunenari, S., & Kanda, M. (1977). The Post-Mortem Changes of Corneal Turbidity and its Water Content. *Medicine, Science and the Law*, 17(2), 108-111.
- [279] Tumram, N. K., Bardale, R. V., & Dongre, A. P. (2011). Postmortem analysis of synovial fluid and vitreous humour for

- determination of death interval: a comparative study. *Forensic science international*, 204(1-3), 186-190.
- [280] Turner-Walker, G., & Jans, M. (2008). Reconstructing taphonomic histories using histological analysis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 266(3), 227-235.
- [281] 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.
- [282] Ubelaker, D. H., Buchholz, B. A., & Stewart, J. E. (2006). Analysis of artificial radiocarbon in different skeletal and dental tissue types to evaluate date of death. *Journal of forensic sciences*, 51(3), 484-488.
- [283] Unluturk, O., & Sahin, M. F. (2017). The effect of remaining in water in estimation of time since death in skeletal remains. *Medicine*, 6(1), 139-43.
- [284] Van Heyningen, R. (1959). Formation of polyols by the lens of the rat with 'sugar' cataract. *Nature*, 184(4681), 194.
- [285] Vass, A. A. (2001). Beyond the grave-understanding human decomposition. *Microbiology today*, 28, 190-193.
- [286] Vass, A. A., Bass, W. M., Wolt, J. D., Foss, J. E., & Ammons, J. T. (1992). Time since death determinations of human cadavers using soil solution. *Journal of Forensic Science*, 37(5), 1236-1253.
- [287] Vega, I. E., Rittschof, D., Dickinson, G. H., & Musgrave, I. (2012). Evolutionary Proteomics: Empowering Tandem Mass Spectrometry and Bioinformatics Tools for the Study of Evolution. In *Tandem Mass Spectrometry-Applications and Principles*. InTech.
- [288] Villanueva Cañadas, E., & Gisbert Calabuig, J. A. (2004). Medicina legal y toxicología. *Barcelona, España: editorial Masson, SA*, 322-330.
- [289] Vinciguerra, R., De Chiaro, A., Pucci, P., Marino, G., & Birolo, L. (2016). Proteomic strategies for cultural heritage: from bones to paintings. *Microchemical Journal*, 126, 341-348.
- [290] Wadsworth, C., & Buckley, M. (2014). Proteome degradation in fossils: investigating the longevity of protein survival in ancient bone. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 28(6), 605-615.

-
- [291] Washburn, M. P., Wolters, D., & Yates III, J. R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature biotechnology*, 19(3), 242.
- [292] Wild, E. M., Arlamovsky, K. A., Golser, R., Kutschera, W., Priller, A., Puchegger, S., & Vycudilik, W. (2000). ¹⁴C dating with the bomb peak: an application to forensic medicine. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 172(1-4), 944-950.
- [293] Wilson, A. S., Janaway, R. C., Holland, A. D., Dodson, H. I., Baran, E., Pollard, A. M., & Tobin, D. J. (2007). Modelling the buried human body environment in upland climes using three contrasting field sites. *Forensic science international*, 169(1), 6-18.
- [294] Wilson, S. J., & Christensen, A. M. (2017). A test of the citrate method of PMI estimation from skeletal remains. *Forensic science international*, 270, 70-75.
- [295] Wolff, S. P., Wang, G. M., & Spector, A. (1987). Pro-oxidant activation of ocular reductants. 1. Copper and riboflavin stimulate ascorbate oxidation causing lens epithelial cytotoxicity in vitro. *Experimental eye research*, 45(6), 777-789.
- [296] Worgul, B. V., Merriam, G. R., Szechter, A., & Srinivasan, B. D. (1976). Lens epithelium and radiation cataract: I. Preliminary studies. *Archives of Ophthalmology*, 94(6), 996-999.
- [297] Xu, C. M., Zhang, H. S., & Qian, S. F. (1999). The influence of temperature on the feature parameter of the endothelial cell living rate from corpse cornea. *Chin J Forensic Med*, 14(1), 33-34.
- [298] Yang, M., Li, H., Yang, T., Ding, Z., Wu, S., Qiu, X., & Liu, Q. (2017). A Study on the Estimation of Postmortem Interval Based on Environmental Temperature and Concentrations of Substance in Vitreous Humor. *Journal of forensic sciences*.
- [299] Yogiraj, V., Indumati, V., & Kodliwadmath, M. V. (2008). Study Of Vitreous Humour Electrolytes To Assess The Postmortem Interval And Cause Of Death. *Anil Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 9(2).

- [300] Yoshino, M., Kimijima, T., Miyasaka, S., Sato, H., & Seta, S. (1991). Microscopical study on estimation of time since death in skeletal remains. *Forensic Science International*, *49*(2), 143-158.
- [301] Zapico, S. C., Menéndez, S. T., & Núñez, P. (2014). Cell death proteins as markers of early postmortem interval. *Cellular and molecular life sciences*, *71*(15), 2957-2962.
- [302] Zeeberg, B. R., Feng, W., Wang, G., Wang, M. D., Fojo, A. T., Sunshine, M., & Bussey, K. J. (2003). GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome biology*, *4*(4), R28.
- [303] Zelenka, P. S. (1984). Lens lipids. *Current eye research*, *3*(11), 1337-1359.
- [304] Zhou, B., Zhang, L., Zhang, G., Zhang, X., & 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*(1-2), 278-281.
- [305] Zhou, L., Liu, Y., Liu, L., Zhuo, L., Liang, M., Yang, F., & Zhu, S. (2010). Image analysis on corneal opacity: a novel method to estimate postmortem interval in rabbits. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, *30*(2), 235-239.
- [306] Zhu, S. H., Fang, D., & Wang, J. C. (2008). An ultra structural observation of corneal collagen matrix of rabbit in the different time after death. *Chin J Forensic Med*, *23*(2), 99-101.
- [307] Ziad, N., Zarki, R., Benmansour, M., Sayerh, T., & Laissaoui, A. (2012). Determination of ^{210}Pb in human skeletal remains from Morocco: implications for time since death assessment. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, *292*(1), 315-319.
- [308] Zilg, B., Alkass, K., Berg, S., & Druid, H. (2016). Interpretation of postmortem vitreous concentrations of sodium and chloride. *Forensic science international*, *263*, 107-113.
- [309] Zilg, B., Bernard, S., Alkass, K., Berg, S., & Druid, H. (2015). A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature. *Forensic science international*, *254*, 158-166.

- [310] Zinka, B., Kandlbinder, R., Schupfner, R., Haas, G., Wolfbeis, O. S., & Graw, M. (2012). The activity ratio of ^{228}Th to ^{228}Ra in bone tissue of recently deceased humans: a new dating method in forensic examinations. *Anthropologischer Anzeiger*, 69(2), 147-157.
- [311] Zioupos, P., Williams, A., Christodoulou, G., & Giles, R. (2014). Determining 'age at death' for forensic purposes using human bone by a laboratory-based biomechanical analytical method. *journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 33, 109-123.