

Biomarcadores de restos óseos humanos en la investigación antropológica

Cristina Pérez Martínez

Departamento de Medicina Legal y Forense, Universidad de Murcia. Spain.

cristina.perez.mtnz@gmail.com

RESUMEN

La estimación del intervalo postmortem (IPM) y la identificación de los sujetos en estado de esqueletización son objetivo importante en la Medicina Forense, siendo sin embargo aún hoy en día una de las tareas más difíciles del investigador forense. Y es que, en realidad, existen pocos métodos precisos para determinar el IPM y establecer la identidad de sujetos mediante restos humanos esqueletizados debido al gran número de factores intrínsecos y externos y a la dificultad de realizar una osteobiografía mediante la realización de perfiles biológicos.

Los objetivos de esta investigación fueron en primer lugar, evaluar la utilidad de diversos parámetros bioquímicos como las bases nitrogenadas (adenina, guanina, purinas, citosina, timina, pirimidinas, hipoxantina, xantina) y péptidos de colágeno tipo I en el hueso cortical para el establecimiento de un IPM donde se contó con un total de 80 huesos largos con IPM de entre 5 y 47 años. En segundo lugar, analizar las proteínas en restos óseos para buscar biomarcadores patológicos que estén estrechamente relacionados con varias enfermedades que permitan la identificación de sujetos mediante el uso de 45 huesos largos de los cuales se conocía la historia clínica de 29 (64.4%) y presentaban un IPM de entre 18 y 45 años.

Las técnicas empleadas para la cuantificación de bases nitrogenadas fue cromatografía líquida de alta resolución con detector UV (HPLC-UV) y para la detección de péptidos de colágeno tipo I se empleó cromatografía líquida de alta resolución con detector de masas/masas (HPLC-MS/MS). La extracción de proteínas de enfermedades se llevó a cabo de forma específica utilizando tampón Tris-Urea y se identificaron usando HPLC-MS/MS.

Los resultados muestran como las concentraciones de las bases nitrogenadas son significativamente mayores en un IPM que oscila entre 5 y 19 años y posteriormente sufre una disminución en las concentraciones en un IPM que oscila entre 20 y 47 años.

Respecto a la identificación de sujetos, nuestros resultados muestran que las proteínas resultantes de enfermedades tumorales y patógenos bacterianos y virales pueden ser detectados e identificados en los restos óseos, convirtiéndolos en biomarcadores patológicos útiles para la construcción de perfiles biológicos.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Caso A. Valencia. 2018.

Hallan el esqueleto de un hombre emparedado en una vivienda cuyos restos podrían corresponder a la víctima de un crimen cometido hace más de 5 años. ¿Cuál es el intervalo de tiempo transcurrido desde la muerte? *¿Presenta signos de violencia?*

Caso B. Barcelona. 2018.

Encuentran un cadáver en estado de esqueletización en una finca de un posible hombre desaparecido hace 32 años. *¿Quién es el hombre encontrado?*

Caso C. La Habana. 2018.

Accidente aéreo del vuelo DMJ-972 de Cubana de Aviación que se estrelló poco después de despegar del aeropuerto de La Habana con 110 víctimas. *¿Cómo proceder a la identificación en desastres masivos?*

Por regla general, encontramos en las series de investigación problemas de muy fácil resolución, sin embargo, en casos reales, la determinación de la antigüedad (intervalo postmortem), establecer la causa de la muerte (natural o violenta) e identificar al sujeto presenta muchas dificultades ya que no existen actualmente técnicas que arrojen soluciones precisas a estas cuestiones (Longato y cols., 2015).

Para poder descifrar estos interrogantes que se plantean se recurre al campo de las Ciencias Forenses que comprende disciplinas como la antropología forense, la patología forense y la biología molecular que son ciencias complementarias y evolutivas entre sí.

Por un lado, la biología molecular permite identificar y cuantificar biomoléculas (ADN y proteínas) que se encuentran en todo tipo de muestras biológicas (huesos, tejidos, pelo, etc.) con técnicas analíticas modernas que proporcionan un espectro cada vez mayor de información (Panzer y cols., 2014).

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

La **determinación del IPM** presenta una gran utilidad para fines investigadores, sin obviar sus importantes implicaciones legales, tanto en casos civiles como penales. Esto es debido a que la Ley Española contempla dos posibilidades (BOE. Núm. 281, 24 de noviembre de 1995):

- Que los restos encontrados tengan un **IPM inferior a 20 años**, como el **Caso A** descrito de Valencia. Lo que implica que el caso permanecerá abierto y los datos aportados podrán ayudar en la investigación policial para la determinación de una línea de tiempo para los eventos que rodean a la muerte.

- Que los huesos hallados tengan un **IPM igual o superior a 20 años**, lo que se relaciona con el **Caso B** en Barcelona. Aquí, el caso se dará por sobreseído y presentará importancia histórica o arqueológica.

No obstante, el llevar a cabo esta tarea a día de hoy aún presenta problemas ya que los cambios postmortem pueden verse afectados por varios factores como: **(i)** factores intrínsecos, tales como la edad, el sexo, la constitución y el estado fisiológico y patológico del sujeto in vivo; **(ii)** factores externos, tales como el clima y las características del suelo en el que está enterrado el cuerpo y **(iii)** las diferentes modificaciones sufridas por los cadáveres, como consecuencia de la influencia de los fenómenos cadavéricos que comenzaran minutos después de la muerte, siendo estos **(a)** la autólisis o autodigestión (primera fase del proceso de descomposición) (Vass, 2001), **(b)** la putrefacción que se produce tras el agotamiento del O₂, momento en el

que comienza la destrucción de los tejidos por microorganismos anaerobios (Statheropoulos y cols., 2005; Vass y cols., 2002; Vass, 2001; Pounder, 1995) y por último, **(c)** la esqueletización, donde se produce la degradación de los tejidos blandos.

Para la identificación de desaparecidos como el Caso B planteado y en casos de desastres masivos como el Caso C, en la práctica forense, es también fundamental poder establecer la **identidad de los sujetos** mediante factores de individualización y la generación de un perfil biológico, que comprenderán información relativa a la especie, la edad, el sexo, la raza y/o el estado patológico previo del sujeto.

Los progresos de la investigación en el ámbito de la biomedicina han conseguido nuevos hallazgos en distintos campos, los cuales permiten su aplicación a la problemática de la identificación del individuo (Villanueva-Cañadas y Castilla-Gonzalo, 2004), siendo el estudio de enfermedades infecciosas postmortem en restos óseos uno de ellos, ya que:

- Diferentes patologías pueden producir alteraciones en la estructura y composición de los huesos (artrosis, osteoporosis, osteopenia, Paget óseo, etc.)

- Cambios relacionados con traumatismos (fracturas, abombamiento cortical, etc.), deficiencias nutricionales (déficit de vitamina D y calcio) u otras patologías (bacterias, virus, tumores, etc.).

A pesar de los problemas que se presentan, los huesos, en ocasiones el único material del que se dispone para analizar, presenta ventajas sobre otras matrices como la barrera física de hidroxapatita que le confiere densidad, favoreciendo la preservación y la unión biomoléculas (Collins y cols., 2002; Galloway y cols., 1996) confiriéndole más resistencia frente a las influencias tafonómicas (Barrio-Caballero, 2013) y ralentizando en el tiempo la diagénesis del hueso, donde se producen modificaciones postmortem (Collins y cols., 2002; Child, 1995) (biodegradación y degradación química) y posteriormente el deterioro químico de la fracción orgánica principalmente formada por proteínas colágenas (Hedges, 2002; Collins y cols., 1995) y a continuación del ADN por degradación enzimática y no enzimática (Pääbo y cols., 2004; Pääbo y cols., 1989; Bär y cols., 1988) lo que conlleva la ruptura de las cadenas en fracciones más pequeñas y en las unidades principales del ADN, las bases nitrogenadas (adenina (A) y guanina (G) (purinas) y timina (T) y citosina (C) (pirimidinas), xantina e hipoxantina).

Teniendo en cuenta lo anterior y la problemática que

presentan estas cuestiones en las Ciencias Forenses los objetivos de esta investigación fueron dos. El primero de ellos ha sido analizar componentes biológicos (adenina (A), guanina (G), purinas (Σ (adenina+guanina)), citosina (C), timina (T), pirimidinas (Σ (citosina+timina)), xantina (X) e hipoxantina (HX)) presentes en cualquier muestra biológica, en este caso hueso, para poder establecer el IPM (IPM<20 años o IPM \geq 20 años). El segundo objetivo de este estudio ha sido analizar la posibilidad de caracterizar las proteínas presentes en la matriz ósea, utilizando técnicas analíticas que proporcionan información sobre los antecedentes patológicos del sujeto para su identificación e individualización.

MATERIAL Y MÉTODOS

La realización del estudio del IPM se llevó a cabo sobre 80 huesos largos (fémur, tibia y húmero) de 80 cadáveres (50 hombres, 30 mujeres) con una edad media de 68.31 años (DE=18.021, rango=20-97). Los huesos fueron retirados de los nichos de cemento de un cementerio de Murcia (sudeste de España), donde habían permanecido entre 5 y 47 años (tiempo medio 23.83 años, DE=10.85).

En función a la Legislación Española, las muestras se clasificaron en 2 grupos:

- IPM<20 años (causa judicial abierta).
- IPM \geq 20 años (causa judicial cerrada).

Para la identificación de sujetos se emplearon 45 muestras de huesos largos (fémur, tibia y húmero) (Figura 1) de 45 cadáveres diferentes (29 varones, 16 mujeres) con una edad media de 66.31 años (DE=19.48, rango=20-97). Los huesos se encontraban en nichos de cemento de un cementerio murciano (sudeste de España), donde habían permanecido entre 18 y 45 años (tiempo medio 25.84 años, DE=8.91).



Figura 1. Muestras hueso largo.

La metodología empleada para la identificación de señal y cuantificación de bases nitrogenadas (ng/g hueso) (adenina, guanina, timina, citosina, xantina e hipoxantina) fue HPLC-UV a una longitud de onda de 254 nm; para establecer la concentración de ADN (ng/g hueso) y para la identificación y cuantificación de péptidos de colágeno tipo I (nº péptidos/g hueso) y para la detección de proteínas relacionadas con enfermedades se empleó HPLC-MS/MS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad, la estimación del IPM reciente cuenta con métodos que proporcionan información relativamente precisa. Sin embargo, esta precisión se ve negativamente afectada por:

- Períodos largos de exposición, como en nuestro caso, que se trata de años y esto dar lugar a la desaparición de órganos y tejidos y se produce la esqueletización.

- Situaciones en las que sólo se dispone de muestras de hueso como material biológico, los cuales pueden presentar información muy valiosa para esta estimación, como es el caso de posibles desapariciones donde solo se hallan restos, de desastres masivos, etc.

En consecuencia, en la actualidad, existe un gran interés y necesidad médico-legal de desarrollar herramientas y métodos que permitan establecer el IPM a partir de restos óseos.

Para solucionar esta incógnita, y con el fin de comprender el comportamiento de las proteínas de colágeno y las diferentes bases nitrogenadas en función del IPM, y a la luz de la ausencia de literatura al respecto, se analizaron las diferencias entre sus concentraciones medias en dos grupos: IPM<20 años e IPM \geq 20 años

Nuestros resultados muestran que los “huesos recientes”, catalogados como muestras con un IPM inferior a 20 años, presentan una cantidad significativamente superior ($p=0.005$) de proteínas de colágeno tipo I (0.85 ± 1.663 nº péptidos/g hueso) a la encontrada en las muestras consideradas como “huesos antiguos”, con un IPM superior o igual a 20 años, las cuales presentan signos de degradación ya que han perdido densidad y la materia orgánica, lo cual se refleja en una disminución de biomoléculas y concretamente de péptidos de colágeno tipo I (0.085 ± 0.227 nº péptidos/g hueso). Lo cual se vio reflejado en una tendencia de decrecimiento de tipo.

Esto es debido a que el colágeno, que es el principal componente proteínico de hueso, se hidroliza lentamente

dando péptidos y aminoácidos, lo que lleva a la ruptura de los lazos de colágeno-mineral y al posterior debilitamiento de la estructura ósea en general (Henderson, 1987).

Por otro lado, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1 y Figura 2, donde se observa una concentración significativamente superior de todas las bases en el IPM < 20 años respecto al IPM ≥ 20 años, lo cual se traduce en una tendencia decreciente de tipo exponencial en todos los casos. Las diferencias encontradas entre intervalos son debidas a que, tras la muerte, se desencadenan procesos de hidrólisis y de oxidación que causan la degradación del ADN cromosómico en fragmentos cada vez más pequeños y como consecuencia de este acortamiento, las bases nitrogenadas que lo conforman, así como el ácido ortofosfórico y el azúcar quedan libres (Kaiser y cols., 2008).

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

Concentración media* (ng/g hueso)	Grupos de IPM (años)		p*
	G1: < 20 años	G2: ≥ 20 años	
Adenina	9.288 ± 4.835	4.646 ± 4.370	0.0004
Guanina	6.499 ± 5.362	2.114 ± 1.973	0.0001
Purinas	15.787 ± 10.724	6.790 ± 5.833	0.0001
Citosina	5.021 ± 2.969	2.159 ± 1.675	0.0001
Timina	6.021 ± 2.879	4.235 ± 2.735	0.0226
Pirimidinas	11.041 ± 4.854	6.394 ± 3.912	0.0002

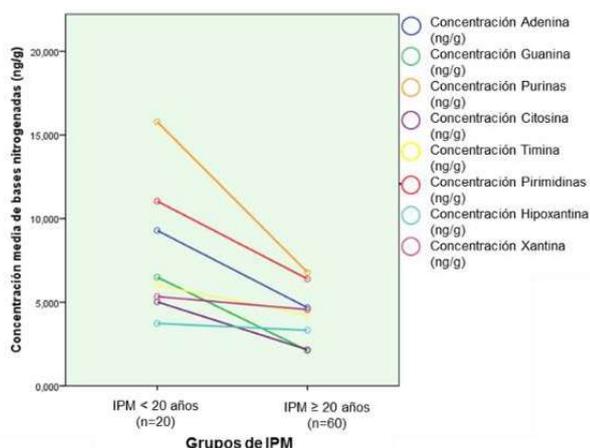


Figura 2. Comportamiento de las bases nitrogenadas respecto 2 grupos de IPM en muestras de restos óseos. (IPM < 20 años e IPM ≥ 20 años).

Además, los datos encontrados muestran una mayor concentración de adenina que de guanina y una mayor concentración de timina que de citosina, lo que podría sugerir que se han producido transiciones de tipo I (G↔A y C↔T), que son las más frecuentes tanto en el ADN mitocondrial (ADNmt) como en el ADN nuclear (ADNn) (Binladen y cols., 2006; Gilbert y cols., 2003a; Hansen y cols., 2001; Hofreiter y cols., 2001), y que han sido detalladas en varios estudios (Schwarz y cols., 2009; Götherström y cols., 2002; Smith y cols., 2003; Poinar y cols., 1996). También encontramos concentraciones más altas de purinas que de pirimidinas, lo que significa que la tasa de depuración es mayor que la de depirimidinización (Lindahl, 1993).

El análisis discriminante aplicado a todas las variables obtenidas en función del IPM mostró un porcentaje de muestras correctamente clasificadas en el IPM < 20 años del 95.0% y un porcentaje del 80.0%, muestras correctamente clasificadas en el IPM ≥ 20 años, lo que representa un porcentaje del total correcto clasificación del 86.7%. lo que sugiere que el análisis de todos estos parámetros discierne entre un intervalo y otro.

Por otro lado, el segundo objetivo que se planteó en esta investigación fue la identificación de posibles patologías y biomarcadores de enfermedades para su uso como herramienta en la identificación y elaboración de perfiles biológicos de sujetos, propósito esencial en la Antropología Forense y que supone un nuevo campo de investigación ya que, a diferencia de otros estudios, nuestro objetivo era el de establecer un perfil del sujeto a partir de sus patologías mediante estudios proteómicos.

El estudio más reciente que hemos encontrado en la literatura que analiza los marcadores de patología en los huesos se refiere a huesos que tenían 2000 años (Bona, 2014). Encontramos otras referencias sobre el uso de biomarcadores para detectar procesos patológicos en diferentes muestras biológicas de pacientes, incluyendo suero (Mishra y cols., 2012; Pierer y cols., 2012; Obeid y Alzahrani, 2009), sangre (Andre-Garnier y cols., 2004; Gerrard y cols., 2004), plasma (Wibmer y cols., 2013), líquido cefalorraquídeo (Poissy y cols., 2012), piel, úlceras y abscesos (Gerrard y cols., 2004) y un estudio llevado a cabo por Cattaneo y cols. (1999) en huesos donde detectaron antígenos para VIH y Hepatitis C.

El análisis de los datos muestra un mayor número de proteínas víricas identificadas en los huesos (n=48, 73.8%) que bacterianas (n=17, 26.2%). Encontrando entre las proteínas víricas, distintos componentes y factores de patogenicidad del Virus de la inmunodeficiencia humana 1

(VIH), Virus del herpes humano 5 (CMV), Virus del herpes humano 6 (HVH-6), Virus del herpes humano 1 (HSV-1), Parvovirus humano B19 (B19V), *Parainfluenza virus 5* (PIV-5), Virus respiratorio sincitial humano (VRS) y Adenovirus humano 7d (AdV-7d). Además, se observa el Virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH) (n=8, 17.8%) como agente presente en el mayor número de casos con historia clínica conocida. Por otro lado, los resultados muestran una alta frecuencia de *Herpesvirus* humano tipo 5 (CMV) en las muestras óseas analizadas (n=21, 46.7%) que no pudimos corroborar con el expediente clínico de los sujetos del estudio.

Las proteínas bacterianas identificadas en los análisis pertenecen a géneros diversos como *Moraxella catarrhalis*, *Giardia intestinalis*, *Staphylococcus*, *Salmonella enterica*, *Photorhabdus asymbiotica* y *Sphingobacterium spiritivorum*.

Por último, en 13 de las 45 muestras analizadas encontramos proteínas relacionadas con enfermedades cancerígenas como leucemia, cáncer de mama, osteosarcoma, neuroblastoma, carcinoma, anemia de Fanconi y esclerosis.

De acuerdo a otros autores, los resultados del presente estudio sugieren que los biomarcadores de ciertas patologías humanas y proteínas relacionadas con diferentes agentes infecciosos pueden ser identificados en muestras de hueso cortical en sujetos de diferentes edades y un IPM que oscila entre los 18 y los 45 años.

Como afirma Lindahl (1993), esto se debe a que los componentes celulares son adsorbidos en la fracción inorgánica del hueso, constituida principalmente por hidroxiapatita, más abundante en el hueso cortical que en el medular.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que la cuantificación de proteínas de Colágeno tipo I y bases nitrogenadas puede ser utilizada como herramienta complementaria, junto con otros análisis, en la estimación del IPM.

Sin embargo, aunque los resultados de estos experimentos apuntan al uso potencial para estimar el tiempo desde la muerte, se deben realizar estudios adicionales para determinar la exactitud y precisión que se puede lograr.

Respecto, a la identificación de sujetos, nuestro estudio identificó biomarcadores potenciales para

patologías infecciosas y tumorales en restos óseos humanos con diferentes edades y un intervalo postmortem que oscila entre los 18 y los 45 años. Ya que, ciertas proteínas, características de la enfermedad tumoral, pueden ser extraídas de las células enfermas, que presumiblemente fueron transportadas antes por la sangre y absorbidas por la hidroxiapatita ósea (Schultz y col., 2007).

Utilizando un método de extracción adecuado, desarrollado por nuestro grupo de investigación, hemos sido capaces de identificar varias proteínas que estaban estrechamente relacionadas con estas enfermedades. Nuestros resultados indican, por tanto, que mediante análisis proteómico es posible identificar la presencia de biomarcadores patológicos en el tejido óseo para la construcción de perfiles patológicos de los sujetos postmortem.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andre-Garnier, E., Milpied, N., Boutolleau, D., Saiagh, S., Billaudel, S., ee Imbert-Marcille, B. M. (2004). Reactivation of human herpesvirus 6 during ex vivo expansion of circulating CD34+ haematopoietic stem cells. *Journal of General Virology*, 85(11), 3333-3336.
- Bär, W., Kratzer, A., Mächler, M., y Schmid, W. (1988). Postmortem stability of DNA. *Forensic Science International*, 39(1), 59-70.
- Barrio-Caballero, P. A. (2013). Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Revista Española de Medicina Legal*, 39(2), 54-62.
- Binladen, J., Wiuf, C., Gilbert, M. T. P., Bunce, M., Barnett, R., Larson, G., Greenwood, A. D., Haile, J., Ho, S. Y. M., Hansen, A. J., y Willerslev, E. (2006). Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes. *Genetics*, 172(2), 733-741.
- 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.
- Bona, A., Papai, Z., Maasz, G., Toth, G. A., Jambor, E., Schmidt, J., y Mark, L. (2014). Mass spectrometric identification of ancient proteins as potential molecular biomarkers for a 2000-year-old osteogenic sarcoma. *PloS One*, 9(1), e87215.
- Cattaneo, C. (2007). Forensic anthropology: developments of a classical discipline in the new millennium. *Forensic Science International*, 165(2), 185-193.
- Cattaneo, C., Nuttall, P. A., Molendini, L. O., Pellegrinelli, M., Grandi, M., y Sokol, R. J. (1999). Prevalence of HIV and hepatitis C markers among a cadaver population in Milan. *Journal of Clinical Pathology*, 52(4), 267-270.
- Child, A. M. (1995). Microbial taphonomy of archaeological bone. *Studies in Conservation*, 40(1), 19-30.
- Collins, M. J., Nielsen-Marsh, C. M., Hiller, J., Smith, C. I., Roberts, J. P., Prigodich, R. V., Wess, T. J., Csapò, J., Millard, A. R., y Turner-Walker, G. (2002). The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry*, 44(3), 383-394.

- Collins, M. J., Riley, M. S., Child, A. M., y Turner-Walker, G. (1995). A basic mathematical simulation of the chemical degradation of ancient collagen. *Journal of Archaeological Science*, 22(2), 175-183.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Després, V., Hebler, J., Rohland, N., y Hofreiter, M. (2004). Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics*, 38, 645-679.
- Galloway, A., Willy, P., y Snyder, L. (1996). Human bone mineral densities and survival of bone elements: a contemporary sample. En: Haglund, W. D., y Sorg, M. H (Eds.), *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains (1st Ed.)*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 295 – 317.
- Gerrard, J., Waterfield, N., y Vohra, R. (2004). Human infection with *Photobacterium* *asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen. *Microbes and Infection*, 6(2), 229-237.
- Gilbert, M. T. P., Hansen, A. J., Willerslev, E., Rudbeck, L., Barnes, I., Lynnerup, N., y Cooper, A. (2003a). Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. *The American Journal of Human Genetics*, 72(1), 48-61.
- Götherström, A., Collins, M. J., Angerbjörn, A., y Lidén, K. (2002). Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry*, 44(3), 395-404.
- Hansen, A. J., Willerslev, E., Wiuf, C., Mourier, T., y Arctander, P. (2001). Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates. *Molecular Biology and Evolution*, 18(2), 262-265.
- Hedges, R. E. (2002). Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry*, 44(3), 319-328.
- Henderson, J. (1987). Factors determining the state of preservation of human remains. En: Boddington, A., Garland, A.N., y Janaway, R.C. (Eds.), *Death, decay and reconstruction: approaches to archaeology and forensic science (1st Ed.)*. Manchester University Press, Manchester, pp. 43 – 54.
- Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., von Haeseler, A., y Pääbo, S. (2001). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research*, 29(23), 4793-4799.
- Kaiser, C., Bachmeier, B., Conrad, C., Nerlich, A., Bratzke, H., Eisenmenger, W., y Peschel, O. (2008). Molecular study of time dependent changes in DNA stability in soil buried skeletal residues. *Forensic Science International*, 177(1), 32-36.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709-715.
- Longato, S., Wöss, C., Hatzler-Grubwieser, P., Bauer, C., Parson, W., Unterberger, S. H., y Lackner, R. (2015). Post-mortem interval estimation of human skeletal remains by micro-computed tomography, mid-infrared microscopic imaging and energy dispersive X-ray mapping. *Analytical Methods*, 7(7), 2917-2927.
- Mishra, B., Varma, N., Appannanavar, S., Malhotra, P., Sharma, M., Bhatnagar, A., y Varma, S. (2012). Viral markers in patients with hemophagocytosis: A prospective study in a tertiary care hospital. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 55(2), 215.
- Obeid, O. E., y Alzahrani, A. J. (2009). Analysis of chemokines and soluble adhesion molecules in cytomegalovirus-positive renal transplant recipients. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 4(02), 110-113.
- Pääbo, S., Higuchi, R. G., y Wilson, A. C. (1989). Ancient DNA and the polymerase chain reaction: The emerging field of molecular archaeology (Minireview). *The Journal of Biological Chemistry*, 264(17), 9709-9712.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Després, V., Hebler, J., Rohland, N., y Hofreiter, M. (2004). Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics*, 38, 645-679.
- Panzer, S., Peschel, O., Haas-Gebhard, B., Bachmeier, B. E., Pusch, C. M., y Nerlich, A. G. (2014). Reconstructing the life of an unknown (ca. 500 years-old South American Inca) mummy—multidisciplinary study of a Peruvian Inca mummy suggests severe chagas disease and ritual homicide. *PLoS One*, 9(2), e89528.
- Pierer, M., Rothe, K., Quandt, D., Schulz, A., Rossol, M., Scholz, R., y Wagner, U. (2012). Association of anticytomegalovirus seropositivity with more severe joint destruction and more frequent joint surgery in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 64(6), 1740-1749.
- Poinar, H. N., Hoss, M., Bada, J. L., y Pääbo, S. (1996). Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science*, 272(5263), 864.
- Poissy, J., Champenois, K., Dewilde, A., Melliez, H., Georges, H., Senneville, E., y Yazdanpanah, Y. (2012). Impact of Herpes simplex virus load and red blood cells in cerebrospinal fluid upon herpes simplex meningo-encephalitis outcome. *BMC Infectious Diseases*, 12(1), 356.
- Pounder, D.J. (1995) *Postmortem Changes and the Time of Death*. Department of Forensic Science, University of Dundee. Lecture Notes. Unpublished.
- Schultz, M., Parzinger, H., Posdnjakov, D. V., Chikisheva, T. A., & Schmidt-Schultz, T. H. (2007). Oldest known case of metastasizing prostate carcinoma diagnosed in the skeleton of a 2,700-year-old Scythian king from Arzhan (Siberia, Russia). *International Journal of Cancer*, 121(12), 2591-2595.
- Schwarz, C., Debruyne, R., Kuch, M., McNally, E., Schwarcz, H., Aubrey, A. D., Bada, J., y Poinar, H. (2009). New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic Acids Research*, 1-15.
- Smith, C. I., Chamberlain, A. T., Riley, M. S., Stringer, C., y Collins, M. J. (2003). The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *Journal of Human Evolution*, 45(3), 203-217.
- Solla, H. E., e İşcan, M. Y. (2001). Skeletal remains of Dr. Eugenio Antonio Berríos Sagredo. *Forensic Science International*, 116(2), 201-211.
- Statheropoulos, M., Spiliopoulou, C., y Agapiou, A. (2005). A study of volatile organic compounds evolved from the decaying human body. *Forensic Science International*, 153(2), 147-155.
- Vass, A. A. (2001). Beyond the grave—understanding human decomposition. *Microbiology Today*, 28, 190-193.
- Vass, A. A., Barshick, S. A., Sega, G., Caton, J., Skeen, J. T., Love, J. C., y Synsteli, J. A. (2002). Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the postmortem interval. *Journal of Forensic Sciences*, 47(3), 542 – 553.
- Villanueva-Cañadas, E. y Castilla-Gonzalo, J. (2004). 94. Identificación en el cadáver. En: Gisbert-Calabuig, J.A. (Ed.) *Medicina Legal y Toxicología (6ª Ed.)*. Elsevier-Masson, Barcelona, pp. 1300 – 1309.
- Wibmer, C. K., Bhiman, J. N., Gray, E. S., Tumba, N., Karim, S. S. A., Williamson, C., y Moore, P. L. (2013). Viral escape from HIV-1 neutralizing antibodies drives increased plasma neutralization breadth through sequential recognition of multiple epitopes and immunotypes. *PLoS Pathogens*, 9(10), e1003738.