

Aplicación del estudio de las concentraciones de bases nitrogenadas a la data de restos óseos

C. Pérez Martínez¹, G. Prieto Bonete¹, L. Fernández López¹, A. Luna Maldonado¹

¹ Área de Medicina Legal y Forense. Departamento de Ciencias Sociosanitarias. Facultad de Medicina. Campus Universitario de Espinardo, Murcia. crystina.perez.mtnz@gmail.com.

1. Introducción

El establecimiento del IPM presenta una serie de problemas muy complejos debido a la gran cantidad de factores intrínsecos que pueden alterar el curso normal de los cambios postmortem, tales como la edad, el sexo, la constitución y los anteriores estados fisiológicos y patológicos del sujeto, así como factores externos, tales como el clima y las características del suelo en el que está enterrado el cuerpo [1]. También se encuentran dificultades a causa de las diferentes modificaciones sufridas por los cadáveres, como consecuencia de la influencia de los fenómenos cadavéricos [2]. A pesar de esto, varios métodos han sido descritos para este fin, el más común se basa en las modificaciones estructurales y de composición que tienen lugar en el hueso después de la muerte [1].

La determinación de la fecha de la muerte de los restos óseos es de utilidad para fines investigadores, pero también tiene importantes implicaciones legales, tanto en casos penales como civiles, ya que es de gran ayuda para las autoridades en las investigaciones judiciales [3].

Cuando nos enfrentamos a cadáveres bien conservados, existen multitud de herramientas que permiten resolver el proceso de forma rápida. Sin embargo, en muchos casos, estos métodos no pueden ser aplicados o se han de complementar y/o confirmar empleando como fuente los restos óseos, los cuales contienen información genética [4-6].

Estudios de diferentes autores señalan que el material genético se degrada más rápidamente en tejidos blandos que en huesos, debido a la estructura más resistente del último que actúa como barrera física frente a las influencias tafonómicas [7]. La densidad del hueso también es un factor importante que influye en su preservación [8]. De este modo, el ADN está normalmente menos degradado en las porciones más densas del esqueleto, como el fémur y la tibia [7].

En general, la cantidad y la integridad del ADN recuperado es un factor importante limitante en la investigación forense y arqueológica [9-10]. Tras la muerte de un individuo se desencadenan procesos de hidrólisis y de oxidación que causan así la degradación del ADN cromosómico en fragmentos cada vez más pequeños a través del tiempo y como consecuencia de este acortamiento, las bases nitrogenadas que lo conforman así como el ácido ortofosfórico y el azúcar quedaran libres [11].

Respecto al uso de ADN para la determinación del IPM, en los últimos años, se han publicado muchas investigaciones acerca de la identificación y la determinación del sexo de los huesos humanos secos por medio de análisis de ADN. Sin embargo, existen pocos estudios que investigan el posible uso de la técnica de ADN para determinar el intervalo postmortem (IPM).

Por otro lado, encontramos que el uso de bases nitrogenadas para la estimación del IPM aún no ha sido empleado para este fin. En vista de la ausencia de métodos precisos para la determinación del IPM, parece importante tratar de desarrollar un nuevo método para el último período post mortem, por lo que el propósito de esta investigación es evaluar la utilidad de los distintos parámetros bioquímicos tales como las bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina, timina, hipoxantina y xantina) para el establecimiento de la data en los huesos largos.

2. Material y Métodos

Con el fin de evaluar la utilidad de las bases nitrogenadas en el hueso para el establecimiento del intervalo postmortem, fueron analizados un total de 80 huesos largos de 80 cadáveres diferentes (50 varones, 27 mujeres y 3 indeterminada) con una edad media de 68.31 años (SD = 18.021, Rango 20-97). Los huesos se obtuvieron del Cementerio de Murcia, donde habían permanecido en nichos durante un periodo documentado que abarca desde los 5 hasta los 47 años (S.D. = 10.853, Media = 23.83 años).

Los parámetros de estudio en las 80 muestras fueron la adenina, guanina, citosina, timina, hipoxantina y xantina de hueso cortical. El procedimiento seguido para la determinación de las bases púricas y pirimidínicas, así como de Xantina e Hipoxantina, fue en primer lugar la aplicación de un protocolo de desmineralización y lisis [12-13]. Posteriormente un alícuota del sobrenadante de las 80 muestras fue analizado y cuantificado mediante HPLC-UV.

3. Resultados

Se realizó un análisis de correlación bivariada (no paramétrico) entre el intervalo postmortem y los distintos parámetros bioquímicos. Los resultados obtenidos en la investigación, fueron el establecimiento de una correlación negativa entre la adenina ($r = -0.254$; $p = 0.023$) guanina ($r = -0.266$; $p = 0.017$), purinas ($r = -0.259$; $p = 0.020$), citosina ($r = -0.362$, $p = 0.001$), pirimidinas ($r = -0.264$, $p = 0.018$) y xantina ($r = -0.254$, $p = 0.023$) y la data de la muerte, las cuales se ajustan a un modelo exponencial (Figura 1-6).

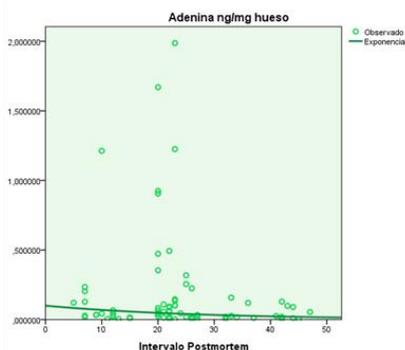


Figura 1. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Adenina respecto al IPM.

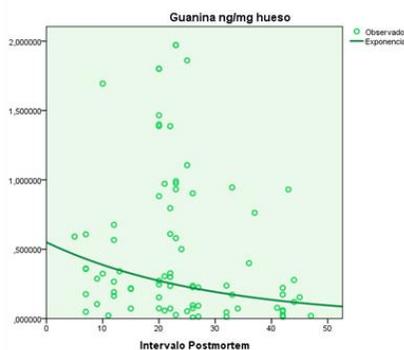


Figura 2. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Guanina respecto al IPM.

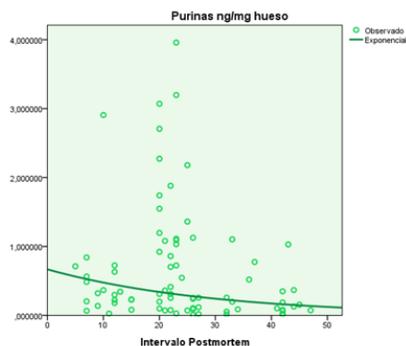


Figura 3. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Purinas respecto al IPM.

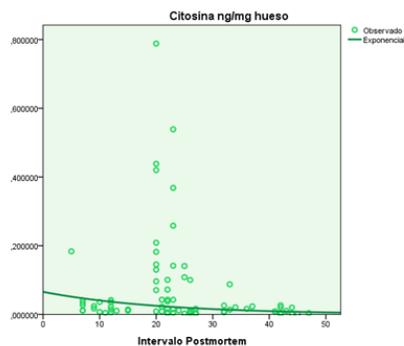


Figura 4. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Citosina respecto al IPM.

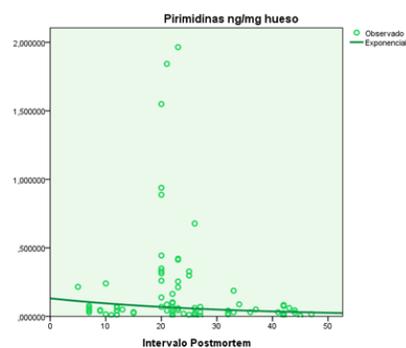


Figura 5. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Pirimidinas respecto al IPM.

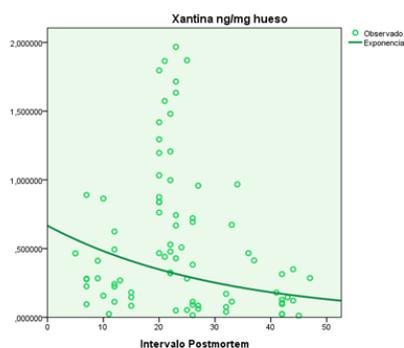


Figura 6. Diagrama de dispersión y regresión exponencial que representa la variación de la concentración de Xantina respecto al IPM.

Encontramos además un aumento de las concentraciones relativas de timina respecto a citosina y una mayor liberación de guanina respecto a adenina en relación a la data (Figura 7-8).

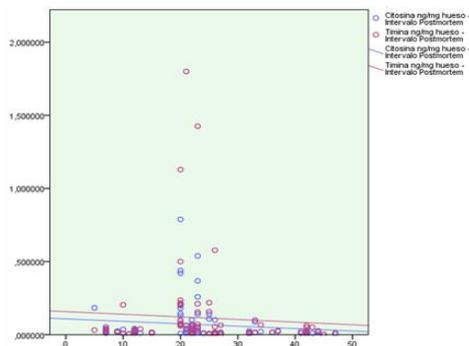


Figura 7. Diagrama de dispersión y línea de ajuste que representa la concentración de Timina y Citosina respecto al IPM.

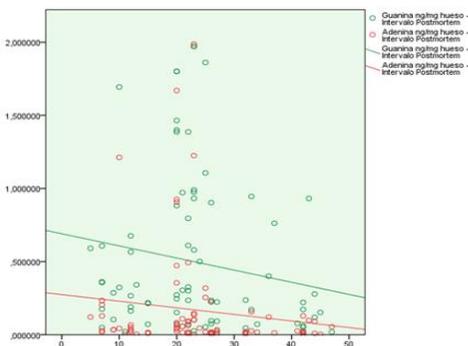


Figura 8. Diagrama de dispersión y línea de ajuste que representa la concentración de Guanina y Adenina respecto al IPM.

4. Conclusiones

Se considera que el hueso es una buena fuente, debido a que la matriz de apatita mineral actúa potencialmente como una barrera física y química contra el deterioro del ADN (a través de la actividad microbiológica y los factores ambientales) y ha sido ampliamente mencionado en la literatura para explicar la preservación excepcional de ADN y de bases nitrogenadas en tejidos duros [14-16].

Respecto a la metodología empleada, cabe mencionar que actualmente hay una amplia variedad de técnicas de separación pero el método más extendido para la determinación de nucleótidos, nucleósidos así como de metabolitos en diferentes muestras biológicas es la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) [17].

Nuestros resultados muestran una correlación negativa de las bases nitrogenadas (adenina, guanina, purinas, citosina, pirimidinas y xantina) respecto al intervalo postmortem que se ajustan a un modelo exponencial, así como un incremento de las concentraciones relativas de timina y guanina respecto a citosina y adenina, respectivamente. Este estudio podría permitir la estimación del intervalo postmortem, siendo usado como herramienta complementaria.

Bibliografía

[1] Prieto-Castelló, M. J., del Rincón, J. H., Pérez-Sirvent, C., Alvarez-Jimenez, P., Pérez-Cárceles, M. D., Osuna, E., & Luna, A. (2007). Application of biochemical and X-ray diffraction analyses to establish the postmortem interval. *Forensic science international*, 172(2), 112-118.

[2] Hernández del Rincón, J.P. (2001). "Aplicación de Análisis Bioquímicos y de Difracción de Rayos X al Cálculo de la Data de Restos Óseos". Murcia: Universidad de Murcia. Tesis Doctoral.

[3] Knight, B. (1997). The dating of skeletal remains. En: Arnold, E. *Forensic Pathology*. Londres.

[4] Budimlija, Z. M., Prinz, M. K., Zelson-Mundorff, A., Wiersema, J., Bartelink, E., MacKinnon, G., & Shaler, R. C. (2003). World Trade Center human identification project: experiences with individual body identification cases. *Croatian medical journal*, 44(3), 259-263.

[5] Alonso, A., Anđelinović, Š., Martín, P., Sutlović, D., Erceg, I., Huffine, E., & García, P. (2001). DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croatian medical journal*, 42(3), 260-266.

[6] Prinz, M., Carracedo, A., Mayr, W. R., Morling, N., Parsons, T. J., Sajantila, A., & Schneider, P. M. (2007). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Science International: Genetics*, 1(1), 3-12.

- [7] 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.
- [8] Galloway, A., Willey, P., Synder, L. (1997). Human Bone Mineral Densities and Survival of Bone Elements: A Contemporary Study. In Haglund, W.D., Sorg, M.H. (eds) *Forensic Taphonomy; the Postmortem Fate of Human Remains*. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 295 – 317.
- [9] Handt, O., Krings, M., Ward, R. H., & Pääbo, S. (1996). The retrieval of ancient human DNA sequences. *American journal of human genetics*, 59(2), 368.
- [10] Krings, M., Stone, A., Schmitz, R. W., Krainitzki, H., Stoneking, M., & Pääbo, S. (1997). Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *cell*,90(1), 19-30.
- [11] 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.
- [12] Loreille, O. M., Diegoli, T. M., Irwin, J. A., Coble, M. D., & Parsons, T. J. (2007). High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Science International: Genetics*, 1(2), 191-195.
- [13] Amory, S., Huel, R., Bilić, A., Loreille, O., & Parsons, T. J. (2012). Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 398-406.
- [14] Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *nature*, 362(6422), 709-715.
- [15] Tuross, N. (1994). The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia*,50(6), 530-535.
- [16] Collins, M. J., Nielsen–Marsh, C. M., Hiller, J., Smith, C. I., Roberts, J. P., Prigodich, R. V., & Turner–Walker, G. (2002). The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry*, 44(3), 383-394.
- [17] Burdett, T. C., Desjardins, C. A., Logan, R., McFarland, N. R., Chen, X., & Schwarzschild, M. A. (2013). Efficient determination of purine metabolites in brain tissue and serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical and UV detection. *Biomedical Chromatography*, 27(1), 122-129.