



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**SECRETARÍA DE SALUD DEL DISTRITO FEDERAL
DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN
MEDICINA LEGAL**

***“MÉTODO HISTOLÓGICO PARA DETERMINAR LA DATA DE CONGELAMIENTO
ARTIFICIAL EN CADÁVERES EN EL INSTITUTO DE CIENCIAS FORENSES DEL
TRIBUNAL SUPERIOR DE JUSTICIA DEL DISTRITO FEDERAL EN 2013”***

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
BIOMEDICA**

**PRESENTA
DRA. MÓNICA GABRIELA SANTAMARÍA GARCÍA**

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN
MEDICINA LEGAL**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. FRANCISCO GARCIA ARELLANO**

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

***“MÉTODO HISTOLÓGICO PARA DETERMINAR LA DATA DE CONGELAMIENTO
ARTIFICIAL EN CADÁVERES EN EL INSTITUTO DE CIENCIAS FORENSES DEL
TRIBUNAL SUPERIOR DE JUSTICIA DEL DISTRITO FEDERAL EN 2013”***

DRA. MÓNICA GABRIELA SANTAMARÍA GARCÍA

Vo. Bo

DR. VÍCTOR HUGO SOTO FLORES

TIULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN
MEDICINA LEGAL

Vo. Bo

DR. ANTONIO FRAGA MOURET

DIRECTOR DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN

***“MÉTODO HISTOLÓGICO PARA DETERMINAR LA DATA DE CONGELAMIENTO
ARTIFICIAL EN CADÁVERES EN EL INSTITUTO DE CIENCIAS FORENSES DEL
TRIBUNAL SUPERIOR DE JUSTICIA DEL DISTRITO FEDERAL EN 2013”***

DRA. MÓNICA GABRIELA SANTAMARÍA GARCÍA

Vo. Bo

DR. JOSÉ FRANCISCO GARCIA ARELLANO
DIRECTOR DE TESIS

Vo. Bo

DR. JAIME OLICON HERNÁNDEZ
ASESOR DE LA INVESTIGACIÓN

Al mejor padre,
por darme lo más importante,
un ejemplo de vida.

A mi abuela,
por enseñarme
a nunca vencerme.

Gracias por su apoyo incondicional
a los maestros, compañeros y amigos.

CONTENIDO

1. RESUMEN	2
2. DEFINICIONES OPERACIONALES	3
3. INTRODUCCIÓN	4
4. MATERIAL Y MÉTODOS	6
4.1 Justificación	
4.2 Hipótesis	
4.3 Objetivos	
4.4 Universo	
4.5 Determinación de variables	
4.6 Estrategias para la recolección de datos	
4.7 Procesamiento estadístico	
5. RESULTADOS	19
5.1 Distribución de la muestra según sexo, grupo de edad y afinidad racial	
5.2 Causas de muerte	
5.3 Valores antropométricos. Proporcionalidad y composición corporal.	
5.4 Descripción de las variables macroscópicas.	
5.4.1 Signos tanatológicos	
5.4.2 Temperatura y humedad relativa	
5.5 Variables microscópicas	
5.6 Interpretación de resultados	
5.6.1 De los valores antropométricos	
5.6.2 De la relación de las variables macroscópicas	
5.6.3 De la relación de las variables microscópicas	
6. DISCUSIÓN	35
7. CONCLUSIONES	38
8. RECOMENDACIÓN	39
9. HEMEROGRAFÍA Y BIBLIOGRAFÍA CITADA	40
10. ANEXOS	43
10.1 Escala visual de variables macroscópicas	
10.2 Escala visual de variables microscópicas	
10.3 Lista de cotejo y registro de variables macroscópicas	
10.4 Registro de variables microscópicas	
10.5 Proceso de las muestras para microscopía óptica.	
10.6 Elaboración de la escala micrométrica	
10.7 Preparación del cadáver para congelamiento	
10.8 Características del congelador	
10.9 Comportamiento de las variables tanatológicas.	

1. RESUMEN

En instalaciones del Instituto de Ciencias Forenses del Distrito Federal en 2013, se congelaron cinco cadáveres humanos haciendo un registro detallado de los cambios inducidos por congelamiento en el hábito externo e interno de cada cadáver y se desarrolló un método histológico para identificar los cambios inducidos en los tejidos por congelamiento. Se analizaron 830 fotomicrografías de tejido cardíaco, hepático y músculo estriado preparados con H-E en siete cortes seriados (0h, 12h, 24, 72, 240h y al descongelamiento) y se definió la evolución de los cambios celulares y extracelulares durante el congelamiento y el descongelamiento. Los resultados se integrarán a un método estadístico en una segunda etapa de investigación dirigido a desarrollar un instrumento para la estimación del intervalo post-mortal en cadáveres congelados.

Palabras clave: Congelamiento; cadáver; tiempo, método, cristales; vacuolas.

2. DEFINICIONES OPERACIONALES.

2.1 Congelamiento rápido. Conservación de un tejido por exposición a una temperatura extremadamente baja (≤ 160 °C) en un tiempo corto, con la formación de cristales de hielo intracelulares, evitando la deshidratación celular.

2.2 Congelamiento lento celular. Conservación de un tejido por enfriamiento a una temperatura baja, que produce cristales de hielo fuera de la célula, y que aumentan su tamaño por condensación de líquido extraído de las células por ósmosis.

2.3 Congelamiento artificial. Tipo de conservación que se produce al someter cualquier objeto congelable a bajas temperaturas dentro de un frigorífico.

2.4 Congelamiento criminal de cadáveres. Exposición intencionada de un cadáver a bajas temperaturas para que se conserve en buenas condiciones y con motivo de ocultar la muerte probablemente violenta del sujeto.

2.5 Intervalo post mortal (IPM). Periodo de tiempo que transcurre del momento de la muerte hasta un tiempo determinado mediante el examen externo del cadáver y que puede apoyarse con otras técnicas médico forenses.

2.6 Cambio histológico. Relación distintiva notable que existe al comparar la morfología de dos o más tejidos del mismo tipo.

2.7 Medición microscópica. Determinación de una magnitud contenida en una imagen, que puede ser examinada por medio de un microscopio, al compararla con su respectiva unidad.

2.8 Vacuola extracelular. Estructura microscópica con forma de vesícula que se encuentra contenida en el espacio extracelular de un tejido.

2.9 Cristal de hielo extracelular. Espacio virtualmente vacío en el espacio extracelular que corresponde a la extensión de una sustancia en estado sólido que se encontraba en un tejido por acción de la exposición del mismo a bajas temperaturas.

3. INTRODUCCIÓN

Determinar el periodo de intervalo post mortal (IPM), es uno de los objetivos primordiales en el estudio del cadáver; representa un reto para el médico especialista en la materia. Para su estimación requiere hacer determinaciones sobre los cambios cadavéricos, con base en una correlación entre mediciones y signos en base a su percepción (temperatura, grado de hidratación, rigidez, livideces y putrefacción), más aún cuando estos se ven modificados por la exposición a diferentes condiciones, entre las que destacan el medio ambiente (temperatura y humedad) le dificultan aun más la determinación del periodo de tiempo transcurrido del momento de la muerte al del hallazgo^{1,2,3}; periodo de gran relevancia en la investigación criminal y que en los últimos años ha llevado a los investigadores forenses a instrumentar técnicas cada vez más precisas para su determinación^{4,5,6,7,8}.

Dejando atrás el escenario típico de la determinación del IPM, calcular éste periodo bajo parámetros como refrigeración y congelación ha sido poco estudiado. Tan sólo durante el año 2011 en la Republica Mexicana se reportaron en los noticieros tres muertes vinculadas a refrigeración/congelación criminal; el cuerpo de una persona de sexo masculino de 41 años localizado dentro de una congeladora industrial para almacenamiento de productos lácteos, dentro de un departamento en Iztapalapa, Distrito Federal y en Tijuana dos cadáveres fueron encontrados envueltos en plástico dentro de un contenedor en la parte externa de un predio, aun congelados^{9,10}. En Chapala Jalisco en 2012, fueron encontrados por elementos del ejército mexicano restos humanos en un refrigerador industrial en

¹ Kaliszan Michał, Hauser Roman, Kernbach, W Gerhard. Estimation of the time of death based on the assessment of post mortem processes with emphasis on body cooling. Review Article. *Legal Medicine* 2009; 11. 111–17.

² Al-Alousi M Louay, Anderson A Robert, Worster M Diana, Land V David. Factors influencing the precision of estimating the postmortem interval using the triple-exponential formulae (TEF) Part I. A study of the effect of body variables and covering of the torso on the postmortem brain, liver and rectal cooling rates in 117 forensic cases. *Forensic Science International* 2002; 125. 223–30.

³ Al-Alousi M Louay, Anderson A Robert, Worster M Diana, Land V David. Factors influencing the precision of estimating the postmortem interval using the triple-exponential formulae (TEF) Part II. A study of the effect of body temperature at the momento of death on the postmortem brain, liver and rectal cooling in 117 forensic cases. *Forensic Science International* 2002; 125. 231–36.

⁴ Kaliszan Michał. First practical applications of eye temperature measurements for estimation of the time of death in casework. Report of three cases. *Forensic Science International*. 2012; 219.13-15.

⁵ Bardale R Dixit. Evaluation of Morphological Changes in Blood Cells of Human Cadaver for the Estimation of Postmortem interval. *Indmedica*. 2007; 2, 7.

⁶ Kohji Honjyo, Kosei Yonemitsu, Shigeyuki Tsunenari. Estimation of early postmortem intervals by a multiple regression analysis using rectal temperature and non-temperature based postmortem changes. *Journal of Clinical Forensic Medicine*. 2005; 12. 249–53.

⁷ Larkin B, Iaschi S, Dadour I, Tay GK. Using accumulated degree-days to estimate postmortem interval from the DNA yield of porcine skeletal muscle. *Forensic Sci Med Pathol*. 2010; 6, 2 jun. 83-92.

⁸ Poloz O Yekaterina, O'Day H Danton. Determining time of death: temperature-dependent postmortem changes in calcineurin A, MARCKS, CaMKII, and protein phosphatase 2A in mouse. *Int J Legal Med* 2009; 123. 305–314.

⁹ SDP noticias. Encuentran cadáver en refrigerador en Iztapalapa [en línea] [México]: SDP noticias, 11 de Marzo de 2011 [04/04/2012]. Disponible en Web:<<http://www.SDPnoticias.com>>.

¹⁰ Terra noticias. Hallan cadáveres congelados dentro de contenedor en Tijuana [en línea] [México]:Terra, 15 de Noviembre de 2011 [04/04/2012]. Disponible en Web:<<http://www.noticias.terra.com.mx>>.

una casa de seguridad¹¹. En España y Puerto Rico se han reportado casos de congelamiento de lactantes cometido al intentar ocultar la muerte de los menores^{12,13}.

Dado que la congelación es un medio de conservación de material orgánico ampliamente conocido y al alcance de la población en general, aunado a los casos reportados en el párrafo anterior, la preservación criminal de cadáveres toma relevancia forense y hace necesario el que los médicos peritos sean capaces de identificar los signos tanatológicos en cadáveres conservados mediante congelación artificial. Al momento no se cuenta con estudio alguno en el que se integre un modelo para determinar IPM en estos casos y los estudios para comprobar congelamiento cadavérico son pocos y sólo han sido utilizados en la prácticas como prueba pericial de este tipo de conservación en una ocasión.

En la literatura médico legal son pocas y breves las referencias sobre las modificaciones de los signos tanatológicos en el cadáver congelado, lo que hace que existan errores significativos en la determinación del IPM por parte de los médicos forenses, especialmente cuando se ignora que el cadáver se preservó por este medio, dificultando la investigación criminal, tal como ocurrió en el caso de Richard Kuklinski por el asesinato de Louis Masgay en Pennsylvania, Nueva York en 1983, en donde se determinó de primera instancia que la víctima había fallecido dos semanas y media previas al hallazgo de su cuerpo, siendo que el asesino había conservado el cadáver por dos años y tres meses congelado, error que dificultó el proceso judicial, ya que situaba al agresor en tiempo y lugar distintos al evento de la muerte de la víctima¹⁴.

En el presente estudio se desarrolló un instrumento para la identificación de signos de congelamiento de cadáveres como una herramienta para detectar estos casos y un modelo de prueba para determinar el IPM en cadáveres sometidos a conservación por congelamiento en base a la evolución de los cambios histológicos inducidos por exposición a congelamiento lento^{15,16,17,18,19,20}.

¹¹ Zócalo Saltillo. Hallan restos humanos en refrigerador en Chapala [en línea]: [México]: Zócalo, 14 de Mayo de 2012 [10/02/2012]. Disponible en Web: <<http://www.zocalo.com.mx>>.

¹² Peru21. Encuentran cuerpo de un bebé en un refrigerador [en línea] [Perú]:Peru21, 27 de noviembre de 2012 [10/02/2013]. Disponible en Web: <<http://www.peru21.pe>>.

¹³ El Vocero de Puerto Rico. Encuentran bebé de 5 meses muerto dentro de un congelador [en línea]: [Puerto Rico]: El Vocero de Puerto Rico, 18 de diciembre de 2012 [02/12/2013]. Disponible en Web: <<http://www.vocero.com>>.

¹⁴ Zugibe T Frederick and Costello T James. The Iceman Murder: One of a Series of Contract Murders. *Journal of Forensic Sciences*. 1993; 6, 38 nov.1404-08.

¹⁵ Schafer A, Kaufmann J D. What happens in freezing bodies? Experimental study of histological tissue change caused by freezing injuries. *Forensic Science International*. 1999; 102. 149-158.

¹⁶ Pegg DE, Diaper MP: On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes. *Biophys J*. 1988; 54. 471-88.

¹⁷ Kimura- M. Abe M. Histology of postmortem changes in rat livers to ascertain hour of death. *International Journal of Tissue Reactions*. 1994; 3, 16.139-50.

¹⁸ Hegarty PVJ, Naudé RT. Effect of Freezing, Thawing and Fixatives on the Diameter of Fibres from Pre- and Post-Rigor Skeletal Muscles. Proceedings of the Royal Irish Academy. Section B: *Biological, Geological, and Chemical Science*. 1973; 73. 87-94.

¹⁹ Tomita Y et al. Histological study of early postmortem changes in various organs: comparison of the paraffin embedding method and the epoxy resin embedding method. *Japanese Journal of Legal Medicine*. 1999, 2, 53 jun. 207-17.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En los últimos años, los casos de congelamiento criminal de cadáveres y restos humanos que se han reportado con cierta recurrencia en la prensa y en la literatura médica, hace necesario que los médicos legistas sean capaces de determinar el IPM en estos casos.

Por lo anterior, es necesario poder identificar cuáles son los cambios histológicos del cadáver humano secundarios a congelamiento, para que en la práctica estos aporten al médico especialista el medio de prueba para determinar si existió o no conservación por congelamiento artificial en una investigación judicial determinada.

4.1- Justificación

Partiendo de que al momento no se cuenta reportado en la literatura especializada método alguno que permita identificar signos de congelamiento y descongelamiento en el cadáver humano, que permita a los peritos en la materia determinar el IPM, y dado que las condiciones de preservación por congelamiento de cadáveres son fácilmente reproducibles empleando una gaveta frigorífica convencional y el medio histológico de comprobación del congelamiento en tejidos se apega al estándar de los estudios histológicos con microscopía óptica; fue posible llevar a cabo el presente estudio conforme a la disponibilidad de recursos humanos, materiales y físicos disponibles al momento, en las instalaciones del Departamento de Patología del Instituto de Ciencias Forenses del Tribunal Superior de Justicia del Distrito Federal (IN.CI.FO.).

El estudio que se llevó a cabo en el periodo comprendido de agosto del año 2012 a julio de 2013, mediante un estudio de intervención pre-experimental con el fin de generar definiciones operacionales en la descripción de los fenómenos tanatológicos y su evolución en cadáveres sometidos a conservación por congelamiento aplicables al establecimiento de un modelo de prueba para determinar el IPM.

²⁰ Garber Cohen IP, Castello PR, González Flecha FL. Ice-induced partial unfolding and aggregation of an integral membrane protein. *Biochim Biophys Acta*, 2010; 11 nov. 2040-7.

4.2- Hipótesis

A partir de los cambios al hábito exterior del cadáver se identificó la necesidad de generar definiciones operacionales de los cambios tanatológicos al congelamiento y descongelamiento. Y de los cambios histológicos secundarios a congelamiento artificial lento en el cadáver en relación a las propiedades físico-químicas de los tejidos. Se espera que se presente un aumento progresivo del espacio extracelular con pérdida de volumen celular progresivo (osmosis), formación de cristales de hielo en el espacio extracelular y aumento en el tamaño del mismo.

4.3- Objetivos.

Desarrollar un método histológico que confirme la exposición a congelamiento artificial lento en cadáveres humanos y permita determinar objetivamente el tiempo de exposición del cadáver a este tipo de conservación.

4.3.1- Objetivos específicos.

- 4.3.1.1 Identificar los cambios en los signos tanatológicos a la inspección externa del cadáver durante el proceso de congelamiento/descongelamiento en relación a las características de estos signos previo a la conservación por congelación artificial lenta y la evolución habitual de los mismos a temperatura ambiental.
- 4.3.1.2 Elaborar definiciones operacionales de los cambios en los signos tanatológicos identificados a la inspección externa del cadáver durante el proceso de congelamiento/descongelamiento.
- 4.3.1.3 Determinar las características distintivas en el hábito exterior del cadáver sometido a proceso de congelamiento/descongelamiento para que sean utilizadas como herramienta en sospecha de congelamiento criminal de cadáveres humanos.
- 4.3.1.4 Obtener muestreo histológico seriado de los cadáveres sometidos a proceso de congelamiento/descongelamiento (hígado, músculo cardiaco y músculo estriado), procesando las muestras sistemáticamente para realizar preparados histológicos con tinción convencional (Hematoxilina/Eosina, H-E).
- 4.3.1.5 Determinar las dimensiones celulares y el tamaño del espacio extracelular en los tejidos muestreados.
- 4.3.1.6 Identificar la evolución de las dimensiones celulares y el tamaño del espacio extracelular en el proceso de congelamiento artificial lento y descongelamiento a temperatura ambiental.

4.4- Universo.

Cadáveres de autopsias de sujetos de ambos sexos, edad igual o mayor a 18 años, no identificados, en los que se haya realizado autopsia in situ y/o evisceración parcial de cavidades torácica, abdominal y pélvica y sean recibidos en el Instituto de Ciencias Forenses del Tribunal Superior de Justicia del Distrito Federal, entre enero y junio de 2013.

4.4.1- Criterios de Inclusión.

- 4.4.1.1 Cadáveres en resguardo en el IN.CI.FO.,
- 4.4.1.2 Sujetos de ambos sexos,
- 4.4.1.3 Edad biológica igual o mayor a 18 años,
- 4.4.1.4 Sin identidad,
- 4.4.1.5 Que presenten autopsia in situ y/o evisceración parcial de cavidades torácica, abdominal y pélvica,
- 4.4.1.6 Entre enero y agosto de 2013.

4.4.2- Criterios de No inclusión.

- 4.4.2.1 Cadáveres no identificados en los que se realice autopsia con evisceración total de cavidades torácica, abdominal y pélvica
- 4.4.2.2 Cadáveres con IPM menor a 48 horas.
- 4.4.2.3 Indicación de las autoridades competentes del IN.CI.FO.

4.4.2- Criterios de Interrupción.

- 4.4.2.1 Identificación del sujeto de estudio durante la intervención de investigación.

4.4.3- Criterios de Eliminación.

- 4.4.3.1 Patología hepática, cardíaca o muscular que altere gravemente la morfología del tejido a analizar, es decir, que no permita medir las células y los espacios intercelulares (p. ej. esteatosis hepática).
- 4.4.3.2 Artefacto que altere gravemente la morfología del tejido a analizar o que no permita su observación con microscopio óptico de campo claro.

4.4.4- Tamaño de la muestra.

- 4.4.4.1 Se incluyo el estudio de cinco cadáveres en cumplimiento a los criterios de inclusión, no inclusión y eliminación ya descritos.

4.5- Determinación de variables

Se estableció la definición operativa de las variables macroscópicas a estudiar, con base en los cambios tanatológicos que habitualmente se observan en el estudio al exterior del cadáver para determinar el IPM.

Y para las variables histológicas se identificaron las métricas celulares y extracelulares más representativas de los cambios teóricos que se producen en los tejidos con el congelamiento.

Las características de las variables (definición, medición y calificación) se describen en la siguiente tabla:

VARIABLE/CATEGORÍA (Índice-indicador / constructo)	TIPO	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN	CALIFICACIÓN
1. Tiempo de estudio	Independiente	Tiempo estimado de permanencia bajo condición de congelamiento y descongelamiento, en minutos.	Cuantitativa continua	Minutos
2. Edad biológica estimada	Control	Estimación de la edad en el adulto por caracteres clínicos odontológicos (características de la dentición y grado de desgaste del esmalte) en tres grupos.	Cualitativa ordinal.	< 39 años. De 40 a 65 años. > 65 años.
3. Causa de muerte	Control	Identificación de la causa de la muerte fundamentada en el procedimiento de autopsia con cuatro niveles.	Cualitativa ordinal.	<ul style="list-style-type: none"> • Conjunto de traumatismos. • Traumatismo abdominal. • Traumatismo craneoencefálico. • Cirrosis hepática y bronconeumonía.
4. Talla	Control	Medición de la talla al ingreso del sujeto al protocolo de estudio en centímetros.	Cuantitativa continua	Al ingreso del sujeto al estudio.
5. Peso	Control	Determinación del peso corporal del sujeto al ingreso al protocolo de estudio en kilogramos.	Cuantitativa continua.	Al ingreso del sujeto al estudio.
6. Afinidad biológica	Control	Determinación de la afinidad de los rasgos morfológicos pertenecientes a un tipo étnico con dos niveles y determinación ingreso del sujeto al estudio.	Cualitativa ordinal.	<ul style="list-style-type: none"> • Mestizoide. • Caucasoide.
7. Índice de Masa Corporal	Control	Determinación por fórmula con el empleo de los valores obtenidos de talla y peso para cada sujeto de estudio en dos niveles (OMS).	Cuantitativa continua.	<18.4kg/m ² . Entre 18.5 y 24.9 kg/m ² .
8. Perímetro torácico	Control	Medición del perímetro torácico al ingreso del sujeto al protocolo de estudio en centímetros.	Cuantitativa continua.	Al ingreso del sujeto al estudio.

9. Perímetro abdominal	Control	Medición del perímetro abdominal al ingreso del sujeto al protocolo de estudio en centímetros.	Cuantitativa continua.	Al ingreso del sujeto al estudio.
10. Peso del corazón	Control	Determinación del peso del órgano cardíaco del sujeto al ingreso al protocolo de estudio en kilogramos.	Cuantitativa continua.	Al ingreso del sujeto al estudio.
11. Peso del hígado	Control	Determinación del peso del hígado al ingreso al protocolo de estudio en kilogramos.	Cuantitativa continua.	Al ingreso del sujeto al estudio
12. Temperatura Del cadáver (TR)	Control	Medición de la temperatura rectal o de la cavidad toracoabdominopélvica, en grados Celsius mediante termómetro mercurial de laboratorio convencional en catorce determinaciones.	Cuantitativa continua.	La señalada en la medición por termometría.
13. Temperatura del medio ambiente (TA)	Control	Medición de la temperatura con termohigrómetro analógico en grados Celsius en catorce registros.	Cuantitativa continua.	La señalada en la medición por termometría.
14. Humedad relativa del ambiente (HR)	Control	Medición de la temperatura con termohigrómetro analógico en porcentaje en catorce registros.	Cuantitativa continua.	La señalada en la medición por el medidor de humedad relativa.
15. Temperatura del medio de congelamiento (TC)	Control	Medición de la temperatura con termohigrómetro analógico en grados Celsius en catorce seis registros.	Cuantitativa continua.	La señalada en la medición por termometría.
16. Humedad relativa del medio de congelamiento (HR)	Control	Medición de la temperatura con termohigrómetro analógico en porcentaje en seis registros.	Cuantitativa continua	La señalada en la medición por el medidor de humedad relativa.
17. Apertura palpebral (AP)	Control	Condición palpebral de apertura al ingreso del sujeto al estudio en dos niveles.	Cualitativa ordinal.	<ul style="list-style-type: none"> • Cerrado. • Entreabierto.
18. Hidratación de los globos oculares (HGO)	Dependiente	Estimación de la hidratación ocular por inspección, en catorce ocasiones y con siete niveles.	Cualitativa ordinal	<ul style="list-style-type: none"> • Opacidad corneal inicial. • Opacidad corneal completa. • Mancha negra de la esclerótica, desde su aparición (puntillado). • Colapso del globo ocular en: <ul style="list-style-type: none"> • Iris. • Iris y esclerótica. • Pérdida de morfología • No valorable (congelamiento o ausencia del globo ocular))

<p>19. Hidratación de las mucosas (HM)</p>	<p>Dependiente</p>	<p>Estimación de la hidratación de las mucosas nasal y oral, en catorce ocasiones con cinco niveles.</p>	<p>Cualitativa ordinal</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Hidratada. • Levemente seca, parcialmente localizada en el borde libre de la mucosa de los labios. • Deshidratada, todo el borde libre de la mucosa de los labios. • Muy deshidratada, sobrepasa la mucosa los labios en todo su perímetro. • No valorable.
<p>20. Livideces (LIVID)</p>	<p>Dependiente</p>	<p>Estimación de la extensión y modificación de las livideces en catorce ocasiones, con cuatro niveles.</p>	<p>Cualitativa ordinal</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Generalizada a la cara posterior del cuerpo. Sin modificación a la presión digital. • Coloración rojo violácea. • Coloración rojo brillante.
<p>21. Rigidez muscular (RM)</p>	<p>Dependiente</p>	<p>Estimación de la intensidad de la contractura muscular de las extremidades en catorce ocasiones, con siete niveles.</p>	<p>Cualitativa ordinal</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Limitada a músculos pequeños (cara y cuello) • Reducción fácil y parcial limitada a codo y rodilla. • Reducción fácil y parcial de extremidades hasta articulación de hombro y cadera. • Generalizada a las cuatro extremidades con fácil reducción a la manipulación con una mano. • Generalizada con difícil reducción que sólo cede a la manipulación con dos manos. • Flacidez generalizada. • No valorable (congelamiento).
<p>22. Putrefacción (PUTR)</p>	<p>Dependiente</p>	<p>Determinación de la presencia o ausencia de signos de putrefacción en catorce ocasiones con siete niveles.</p>	<p>Cualitativa ordinal</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ausente. • Presente. • Cambios de coloración de la piel. • Red venosa. • Enfisema subcutáneo • Desprendimiento epidérmico. • No valorable.
<p>23. Lesiones (LX)</p>	<p>Control</p>	<p>Presencia o ausencia de solución de continuidad de los tejidos y el grado de afección de los mismos con dos signos a identificar al ingreso del sujeto al estudio en cuatro niveles:</p>	<p>Cualitativa ordinal.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sin lesiones. • Con lesiones. • Lesiones sin pérdida de continuidad de la piel. • Lesiones con pérdida de continuidad de la piel.

<p>24. Cambios de coloración de los tegumentos I (CCT-I)</p>	<p>Dependiente</p>	<p>Determinación de los cambios de coloración de los tegumentos por su localización en catorce momentos con siete niveles.</p>	<p>Cualitativa ordinal</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Cambio de coloración localizado a cabeza. • Tronco. • Extremidades superiores. • Extremidades inferiores. • Las cuatro extremidades. • Generalizada. • No valorable.
<p>25. Cambios de coloración de los tegumentos II (CCT-II)</p>	<p>Dependiente</p>	<p>Determinación de los cambios de coloración de los tegumentos en catorce momentos con cuatro niveles.</p>	<p>Cualitativa ordinal</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Coloración ocre (amarillo a naranja, semi-claro y de saturación moderada). • Coloración verdosa • Coloración rojiza brillante. • No valorable.
<p>26 a 37. Características histológicas</p>	<p>Dependiente</p>	<p>Inspección histológica de tejidos muscular cardíaco a nivel del ápex, abductor medio (femoral) y lóbulo caudado del hígado. Con medición en micrómetros (μm) de los diámetros celulares y los espacios intercelulares, las vacuolas extracelulares y los espacios ópticos vacíos compatibles con cristales, en siete muestreos seriados y con doce niveles para este signo.</p>	<p>Cuantitativa discreta.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Número de células por campo. • Características de necrosis predominantes por campo. • Mayor diámetro celular. • Menor diámetro celular. • Mayor espacio intercelular. • Menor espacio intercelular. • Numero de vacuolas extracelulares por campo • Mayor diámetro vacuolar. • Menor diámetro vacuolar. • Número de cristales por campo. • Mayor diámetro de los cristales. • Menor diámetro de los cristales.

Para todas las variables macroscópicas y microscópicas analizadas se determinó una calificación con base en dos escalas análogas visuales, ver anexos 10.1 y 10.2.

4.6- Estrategias para la recolección de datos.

Se sistematizó la obtención de datos tanto para las variables macroscópicas como las microscópicas mediante la observación directa y su calificación con el apoyo de las escalas análogo- visuales desarrolladas para tal efecto, una lista de cotejo y una hoja de registro de los hallazgos; ver anexos 10.1, 10.2 y 10.3.

Siguiendo el orden expuesto en el listado de cotejo, en todos los sujetos de estudio y para cada registro de las variables macroscópicas y toma de muestras, sistemáticamente de la siguiente forma:

4.6.1 Registro de las variables antropométricas.

A la exploración del hábito exterior del cadáver y el registro de datos biométricos de cada sujeto de estudio (talla y perímetros) se efectuó con cinta métrica no elongable conforme a la técnica exploratoria descrita para cada medición^{21,22}.

4.6.1.1 Talla.

Esta medición se efectuó sobre una superficie firme, se midió desde la parte superior de la cabeza hasta el borde inferior de los talones con las extremidades del cuerpo en extensión completas en centímetros.

4.6.1.2 Perímetro cefálico.

Se mide la circunferencia de la cabeza colocando la cinta métrica justo por encima de cejas pasando sobre la parte más prominente del occipucio en centímetros.

4.6.1.3 Perímetro torácico.

Se mide la circunferencia del tórax justo por debajo de la línea de los pezones registrando el valor obtenido en centímetros.

4.6.1.4 Perímetro abdominal.

Medición que se relaciona con los índices de grasa corporal y sus determinaciones.

Se mide la circunferencia de la cintura en centímetros sobre la cicatriz umbilical. Sus valores se organizaron en tres estratos: <60, 60 a 79 y 80 a 89, los tres por debajo del límite para riesgo cardiovascular en hombres mexicanos (>95 centímetros)

4.6.1.5 Peso del cadáver.

Se empleó una báscula análoga de plataforma con capacidad para 250 kilogramos con precisión de 1g al colocarse el cadáver en decúbito dorsal sobre una plancha metálica de 33 kilogramos nivelada sobre la plataforma de la báscula calibrada para discriminar el peso de la plancha metálica, su registro se realizó en kilogramos. Sus valores se organizaron en tres estratos de 10 kilogramos: 50 a 59, 60 a 69 y 70.

²¹ Surós BJ, Surós, Batlló, Antonio, J. *Semiología médica y técnica exploratoria*. Séptima edición. España, MASSON Editores, 2004. 35-57.

²² Secretaría de Salud. Manual de procedimientos para la toma de medidas clínicas y antropométricas en el adulto y adulto mayor [en línea]: [México], Secretaría de Salud, Abril 2002 [11/08/2013]. Disponible en Web:<<http://www.salud.gob.mx>>.

4.6.1.6 Peso de los órganos.

Se utilizó una báscula digital con capacidad de 1 gramos a 3,000 gramos con precisión de 0.01g, registrándose los resultados en gramos en tres estratos (<250, 250 a 300 y >300 para corazón y <1500, 1,500-1,700 y >1,700 para hígado) de acuerdo al peso normal de los órganos.²³

4.6.1.7 Índice de Quetelet o Índice de masa corporal (IMC).

Es el índice más utilizado para determinar la proporción de grasa en el individuo adulto. Para obtenerlo, se divide el peso en kilogramos entre la talla en metros elevado al cuadrado. Las determinaciones se organizaron en tres estratos de acuerdo a los criterios de la OMS para el adulto en: normal (con rango de 18.5 a 24.9) y desnutrición (<18.5)²⁴.

Imagen 1 y 2

Peso del cadáver y peso de los órganos



Todos valores biométricos obtenidos se registraron en las hojas de resultados para cada sujeto de estudio y se determinaron únicamente al ingreso de cada cadáver al estudio (momento 0 horas).

4.6.2 Registro de la temperatura ambiental, del congelador, del cadáver, humedad relativa.

4.6.2.1 La temperatura ambiental y del interior del congelador.

Se midió con un termómetro análogo interior/externo de columna para frigorífico con escala en grados Celsius con rango para la temperatura interior de 0 a 50°C y para la temperatura exterior de 40 a 70°C.

²³ Grandini GJ. *Medicina forense, aplicaciones teórico-prácticas*. Segunda. Edición. México, Manual Moderno, 2009. 38.

²⁴ World Health Organization. *Physical Status: The use and interpretation of anthropometry*. Geneva: World Health Organization, 1995.

Los registros se efectuaron en seis momentos (1–6) para la interior y en catorce momentos (1-14) para la exterior (sala aislada de anfiteatro) en dos ocasiones para cada momento (1 y 2).

4.6.2.2 Humedad relativa del medio de congelamiento y del medio ambiente.

Se midió con un medidor de humedad relativa análogo con escala de reloj porcentual de 0 a 100.

El registro se realizó en seis (1 – 6) momentos para la humedad relativa del congelador y en catorce (1-14) para la humedad relativa del ambiente (sala aislada de anfiteatro).

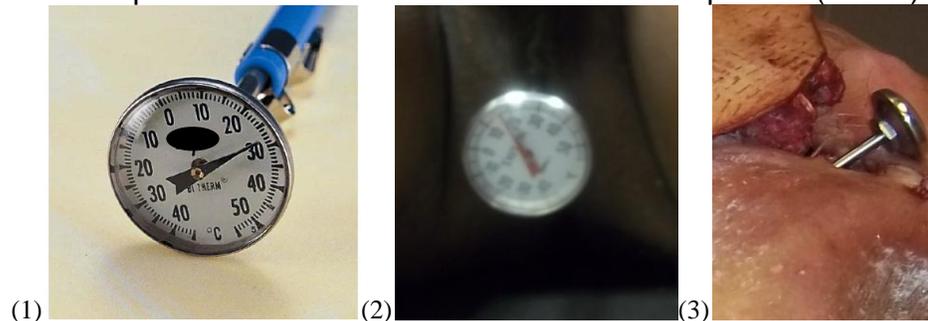
4.6.2.3 Temperatura de los cadáveres.

Se empleó en todos los casos, un termómetro bimetálico de bolsillo para laboratorio con rango de -40 a 50°C.

Se utilizaron dos técnicas de medición. En los sujetos de estudio no congelados, se determinó la temperatura rectal^{25,26} introduciendo la columna del termómetro diez centímetros en el orificio del ano. En los cadáveres en congelamiento, se realizó la medición de la temperatura al colocar la columna dentro de la cavidad toraco- abdomino- pélvica (CTAP) sin retirar el peto esternal.

Imagen 3, 4 y 5

Termómetro bi- metálico, registro de la temperatura a nivel rectal y de la Apertura de la cavidad toraco- abdomino- pélvica (CTAP).



4.6.2.4 Inspección externa de los signos tanatológicos.

Para el estudio del hábito externo del cadáver, se colocó a éste en posición decúbito dorsal, sobre una mesa de necropsias de acero inoxidable a una altura del suelo de 90 centímetros bajo condiciones de luz blanca ambiental artificial interior de 500 lux; ver imagen 4.

²⁵ Gisbert, Calabuig. *Medicina legal y toxicología*. Sexta edición. España, MASSON editores, 2004. 245- 9.

²⁶ Patitó JA et al. *Tratado de medicina legal y elementos de patología forense*. Argentina, Editorial Quorum, 2003. 189-201.

Imagen 6
Inspección externa del cadáver



4.6.2.5.1 Fijación fotográfica del hábito exterior del cadáver.

Se tomaron fotografías digitales con resolución de 12 megapíxeles del hábito externo del cadáver en dos tomas (cara anterolateral derecha e izquierda) y con acercamientos de hasta 5X de las variables macroscópicas (signos tanatológicos y lesiones), con un patrón métrico (regleta en centímetros).

Las fotografías se identificaron para cada registro del estudio del cadáver (14 registros en total) y luego fueron usadas para la revisión de los registros de las variables con el uso de la escala analógica visual macroscópica.

4.6.2.5.2 Apertura de la cavidad CTAP.

Se realizó la apertura de la cavidad al retirar los puntos de sutura del procedimiento de necropsia, haciendo revisión de los planos de los tejidos blandos, la caja torácica y al retirar el peto esternal se realizó inspección de la cavidad y de los órganos fijando los hallazgos en la hoja de registro de variables.

4.6.2.5.3 Inspección de la cavidad CTAP y de los órganos.

Se efectuó inspección *in situ* de los órganos con fijación fotográfica y examen de los órganos (corazón e hígado) al extraerlos de la cavidad.

4.6.2.5.4 Muestreo histológico (sólo en los registros 1 y 7).

Una vez extraídos los órganos interesados; en los sujetos no congelados, se procedía al muestreo de tejido para estudio histológico; ver anexo 10.5.

Para los cadáveres en congelamiento, el muestreo se realizó *in situ*, asistido con sierra circular eléctrica con punta diamante; ver imagen 3 y 4.

Imagen 7 y 8

Corte de tejido congelado con sierra circular y muestras de tejido en frascos con fijador



Para las muestras de músculo esquelético, se realizaron en el primer muestreo disección de piel y tejido subcutáneo en la cara interna tercio proximal del muslo derecho, se obtuvo una ventana de quince por cinco centímetros con un colgajo de piel obteniendo el tejido por corte de las fascias y haces musculares. Para los muestreos posteriores, se mantuvo abierta la ventana de disección al suturar el colgajo diseccionado a piel con un punto de sutura a uno de los bordes (ver imagen 5).

Imagen 9

Ventana de disección en muslo



Por último, se colocaron los órganos retirados en su localización anatómica normal.

4.6.3 Medición de las variables microscópicas.

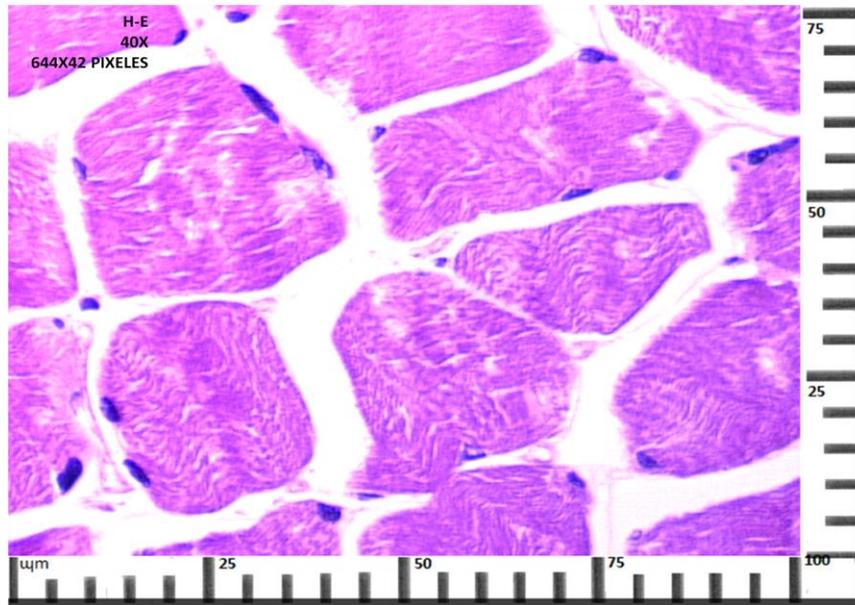
Se prepararon cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E) para microscopía óptica de campo claro; ver anexo 10.6. De los cortes se tomaron diez fotomicrografías de 644x42 pixeles de diez campos observados a 400 aumentos (40X) elegidos al azar para cada corte

histológico. La medición microscópica de las doce variables se realizó en forma manual utilizando un patrón micrométrico digital (ver imagen 6).

En el músculo estriado y cardíaco se midió en un corte transversal. El diámetro mayor de las fibras musculares y el espacio comprendido entre las fibras musculares de un campo de Cohnheim. En el lobulillo hepático en corte transversal se midieron los espacios comprendidos entre los cordones de hepatocitos (sinusoides) de la zona central y periférica; también se registró la métrica de vacuolas extracelulares en el espacio extracelular y los espacios virtualmente vacíos correspondientes a cristales de hielo. El procedimiento y su registro se detallan en los anexos 10.2 y 10.4.

Imagen 10

Fotomicrografía de músculo estriado identificada y con patrón micrométrico



Una vez obtenidas los valores numéricos de los diámetros celulares, de los espacios extracelulares de los diferentes tejidos, las dimensiones de las vacuolas extracelulares y de los espacios virtualmente vacíos correspondientes a cristales de hielo.

4.7 Procesamiento estadístico

Para el análisis estadístico de todas las variables se aplicó el paquete EPI – INFO 6.0.4d™ obteniendo medidas de tendencia central (media, mediana, moda) y de dispersión (rango, desviación estándar, varianza), posteriormente, la información se estructuró en tablas y gráficas para su descripción e interpretación. El análisis estadístico inferencial de la muestra se abordará en una segunda etapa de investigación.

5- RESULTADOS

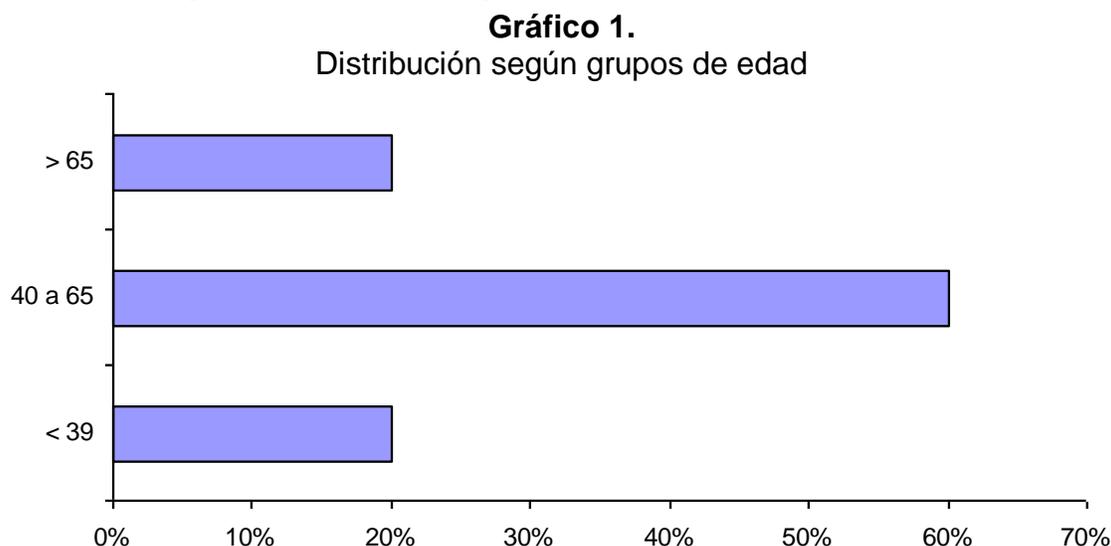
Se sometió a congelamiento artificial lento, cinco cadáveres humanos del sexo masculino por un periodo de diez días, continuando su estudio hasta el descongelamiento a temperatura ambiente por treinta y un horas, entre Enero y Junio de 2013.

Se evaluaron 37 variables en 279 tablas, correspondiendo a 199 para las variables macroscópicas y 80 para las variables microscópicas. Las variables se midieron en seis momentos para las que son valorables en el congelamiento y catorce para las que son valorables con y sin congelamiento.

Cada una de las tablas se muestra para una variable en forma completa y posteriormente se encuentra una tabla comprensiva de los estadísticos globales, de cada variable, para cada momento de medición; ver anexo 10.9 y 10.10.

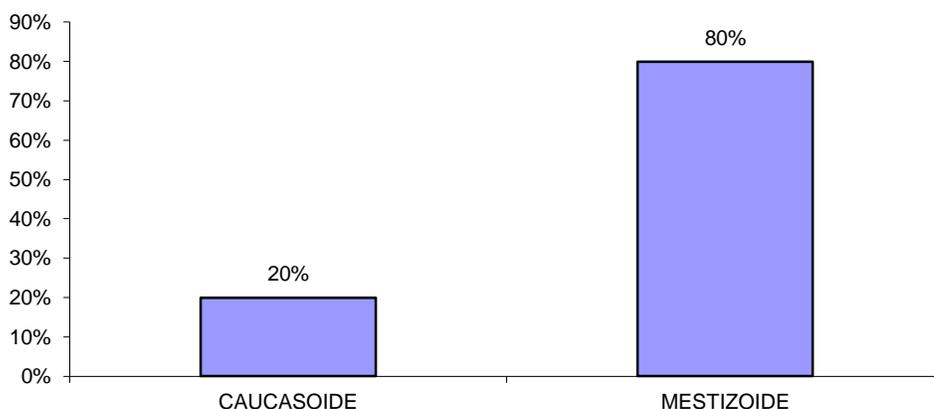
5.1 Distribución de la muestra según sexo, grupo de edad y afinidad racial.

De los individuos estudiados el total (100%) correspondieron al sexo masculino, con edad promedio de 48.6 años, mínima de 25 años y máxima de 70 años. Se definieron tres grupos de edad; ver gráfico 1.



Cuatro de los sujetos presentaron afinidad biológica mestizoide (80%) y un caso afinidad biológica caucasoide (20%).

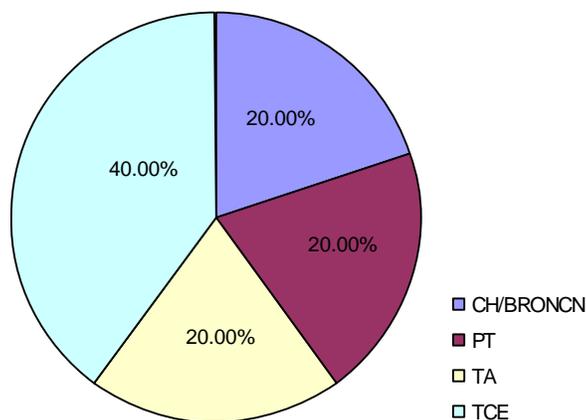
Gráfico 2.
Afinidad biológica



5.2 Causas de muerte.

Cuatro de los sujetos fallecieron por etiología traumática; dos de éstos por traumatismo craneoencefálico (40%). Uno más falleció de etiología no traumática por insuficiencia hepática y bronconeumonía (20%).

Gráfico 3.
Causas de muerte



5.3 Valores antropométricos. Proporcionalidad y composición corporal.

Las medidas antropométricas registradas fueron: Talla, peso corporal, IMC, perímetro cefálico, torácico y abdominal, peso del corazón e hígado.

A partir de estas mediciones, se estimaron los estadísticos: media, desviación estándar (DE) y los valores mínimos y máximos resultando talla promedio de 157.8 centímetros con DE de 4.8, peso promedio de 60 kilogramos con DE de 9.5 e IMC de 19.1 kg/m² con DE de 3.4, perímetro cefálico de 55 centímetros con DE 0.7, perímetro abdominal de 75.4 centímetros con DE 6.8, peso del corazón de 315.4 gramos con DE de 76.2 y peso del hígado de 1,509 gramos con DE de 257.6.

La tabla 1 presenta los valores promedio de las variables antropométricas.

Variable	Masculinos (n=5)	Mínimo	Máximo
	x±DE		
Talla (cm)	157.8 ± 4.8	150	162
Peso (kg)	60.4 ± 9.5	50	70
IMC (kg/m ²)	19.1 ± 3.4	15.9	23.3
Perímetro cefálico (cm)	55 ± 0.7	54	56
Perímetro torácico (cm)	86.8 ± 4.4	80	92
Perímetro abdominal (cm)	75.4 ± 6.8	64	81
Peso del corazón (g)	315.4 ± 76.2	220	440
Peso del hígado (g)	1,509 ± 257.6	1,187	1,750

DE = Desviación estándar.
IMC= Índice de masa corporal.

5.4 Descripción de las variables macroscópicas.

5.4.1 Signos tanatológicos. Ver anexo 10.9 (graficas 4 y 5).

Se encontró en 80% de los casos apertura palpebral (AP) con ojos entreabiertos (EA) al ingreso de los sujetos al estudio, permaneciendo en ésta posición hasta el término del estudio (271 horas).

Respecto a opacidad corneal (OC) al ingreso de los sujetos al estudio (momento 0 –cero-), en 60% de los sujetos se encontró opacidad corneal completa (OCC), a las 12 horas opacidad corneal completa en 80%, fue no valorable (NV) en 100% de las 24 a 240 horas de estudio, y de las 241 a 271 horas se encontró opacidad corneal completa en el 100% de casos.

La mancha negra escleral (MNE) se encontró presente en 100% de los sujetos al ingreso al estudio, fue no valorable de las 12 a las 240 horas y se la encontró presente de las 241 a las 271 horas.

Se identificó colapso del globo ocular (CGO) con hundimiento del iris (HI) en 60% de los casos al ingreso de los sujetos al estudio, de las 12 a las 240 horas se encontró no valorable por congelamiento, a las 241 horas continuó siendo no valorable en 66.7%, a las 241 horas se encontró hundimiento del iris en 66.7%, de las 247 a las 253 horas y 271 horas con 66.7% con hundimiento en iris y esclerótica (HIE).

En relación con el estado de hidratación de las mucosas (HM), al ingreso de los sujetos al estudio se encontraron levemente secas (LS) en 80% de los cadáveres y 100% a partir de las 12 horas hasta las 259 horas de estudio. Se presentó un caso de rehidratación (RH) a las 259 horas y un caso de deshidratación (D) a las 271 horas.

Al ingreso de los sujetos al estudio , las livideces (LIVID) se encontraron generalizadas a la cara posterior del cuerpo, fijas y con coloración rojo violácea en todos los casos. Posteriormente, entre las 12 y a las 271 horas, fueron de coloración rojo brillante (CRB).

La rigidez muscular (RM) al momento cero del estudio se encontraron los sujetos de estudio en flacidez (FL) en 60% de los casos, de las 12 a las 240 horas no valorable por congelamiento y de las 241 a las 247 horas con rigidez generalizada con difícil reducción (GDR), con reducción fácil y parcial limitada a codo y rodilla en el 100% a las 253 horas, generalizada y con fácil reducción en el 100% y flacidez en el 100% a las 271 horas.

La putrefacción (PUTR) se encontró ausente en 60% de los sujetos de estudio en el momento cero, de las 12 a las 240 horas no valorable por congelamiento, ausente en 66.7% de las 241 a las 242 horas, se identificó red venosa (RV) en 66.7% a las 243 horas y del 100% a las 244 horas, y cambios de coloración de la piel (CCP) en 66.3% de las 253 a las 271 horas.

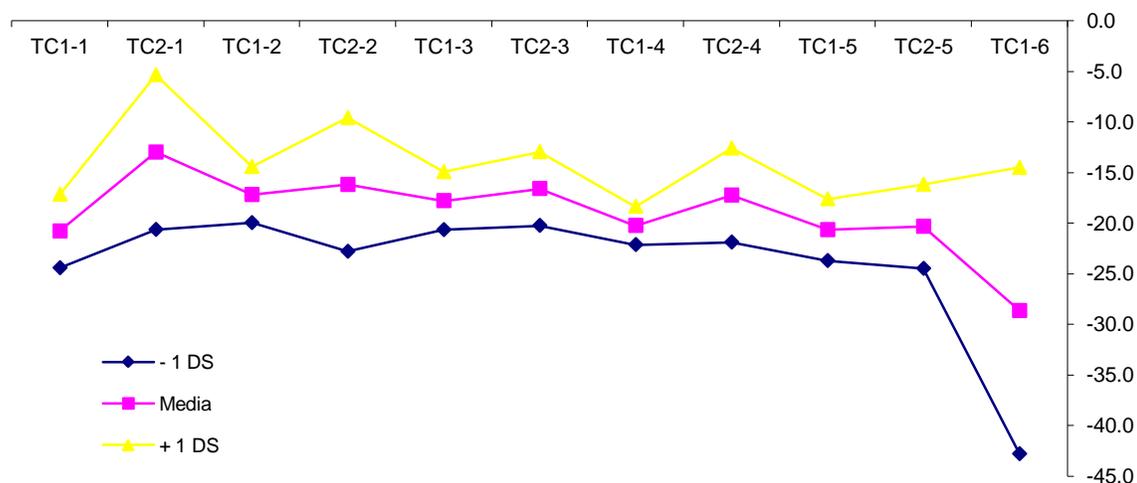
El cambio de coloración de los tegumentos (CCT-I) fue no valorable en el 100% de los cadáveres al ingreso, se encontró presente en las extremidades superiores (ES) en el 100% a las 12 horas de estudio y a las 24 horas en las cuatro extremidades (EX) en el 100%, de las 72 a las 271 horas con cambio de coloración generalizada (G).

Los cambios de coloración de los tegumentos (CCT-II), fueron no valorables al momento cero del estudio en el 100% de los cadáveres, de las 12 a las 240 horas se presentó coloración ocre (CO), de las 241 a las 242 horas se encontró no valorable en 66.7% y de las 243 **a las 271 horas se encontró coloración rojo brillante en el 100% de los casos.**

5.4.2 Temperatura y humedad relativa.

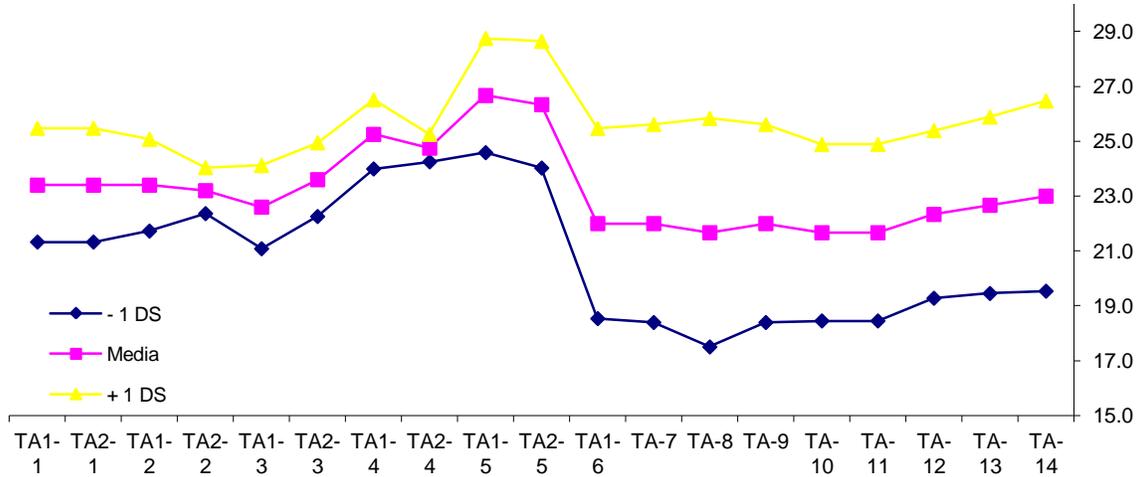
La distribución media de la temperatura de congelamiento (TC) en el frigorífico durante el tiempo de estudio, presentó un descenso progresivo a partir del cuarto momento de medición con una fase de incremento de la temperatura en los momentos dos y tres. La temperatura inicial media fue -20.8°C y la final -28.7°C , las mediciones posteriores presentaron fluctuación entre la primera y segunda medición de cada momento con descenso de la temperatura en la segunda toma en relación a la primera, encontrándose la fluctuación mayor a las 12 horas, siendo en la primera toma -13°C con DE 7.6 y en la segunda -17°C con DE 2.8; la fluctuación menor se presentó a las 120 horas con -20.7°C con DE -17.6 en la primera toma y -20.3°C con DE 4.2 en la segunda.

Gráfica 6
Distribución media de la temperatura de congelamiento (TC)

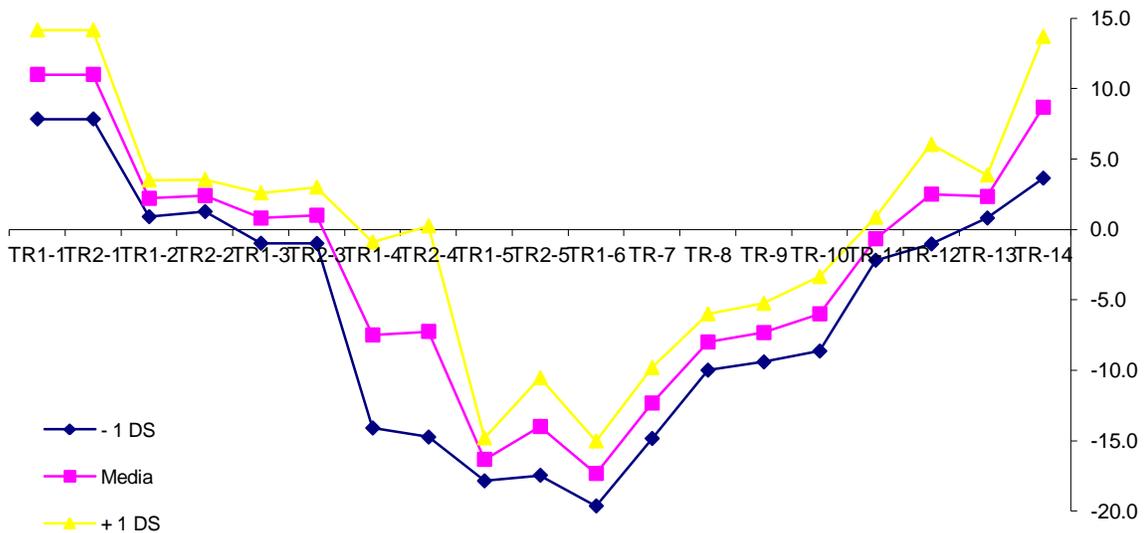


La distribución media de la temperatura ambiental (TA) en el tiempo de estudio, presentó variación entre los distintos momentos, presentando la temperatura más alta a las 120 horas siendo de 28.7°C con DE de 2.1, y la mínima de 21.7°C a las 244 y 247 horas con DE de 3.2. La mayor variación entre momentos se presentó de las 120 y 240 horas con disminución de la temperatura de 28.6°C con DE 2.3 a 25.5°C con DE 3.5.

Gráfica 7
Distribución media de la temperatura ambiental (TA)

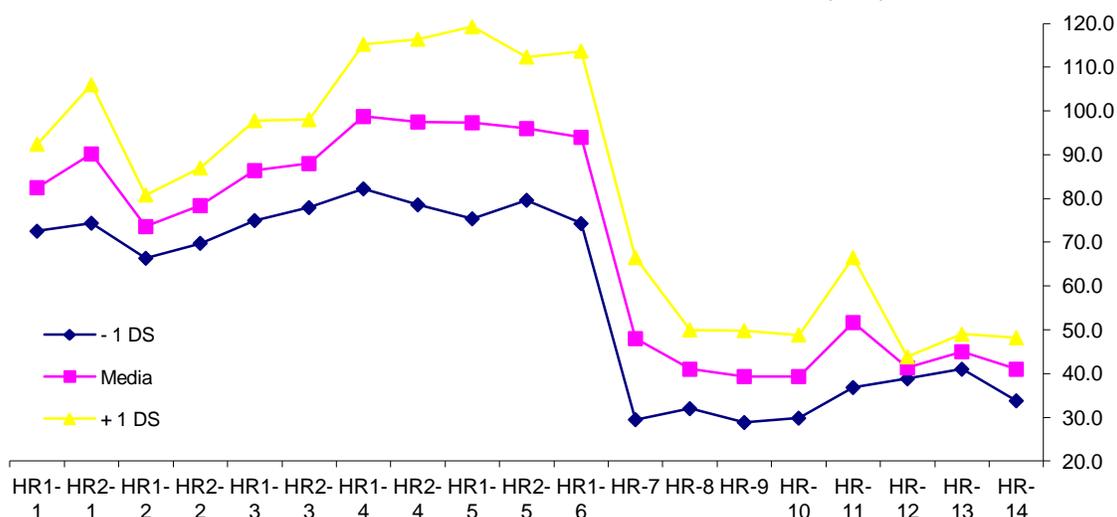


Gráfica 8
Distribución media de la temperatura del cadáver (TR)



La distribución media de la temperatura del cadáver (TR) en el tiempo de estudio, presentó descenso progresivo desde el inicio del estudio hasta las 240 horas (tiempo de congelamiento). Posteriormente mostró un incremento progresivo hasta el término del estudio (descongelamiento). La temperatura más elevada se presentó al ingreso del cadáver congelamiento siendo de 11°C con DE de 3.2 y la menor se registró a las 240 horas siendo de -17.3 con DE 2.3.

Gráfica 9
Distribución media de la humedad relativa (HR)

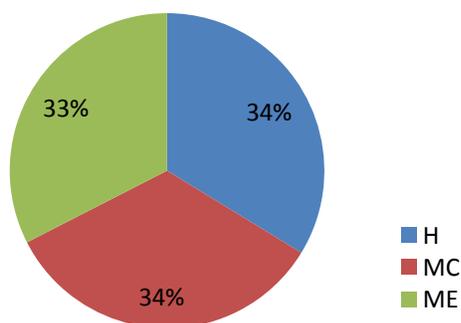


La distribución media de la humedad relativa (HR) en el tiempo de estudio. Al ingreso del cadáver al medio de congelación, la humedad relativa del medio presentó incremento inicial de 82.5% con DE 10 a 90.2% con DE 15.8 y descenso a las 12 horas a 73.6% con DE 7.2. A partir de las 12 horas presentó incremento progresivo hasta las 72 horas alcanzando 98.8% con DE 16.5. De las 72 horas a las 240 horas presentó descenso progresivo de 97.5% con DE 18.9 a 94% con DE 19.7. A la exposición del cadáver al medio ambiente (sala de necropsias) a las 241 horas fue de 44% con DE 18.5 con variación posterior entre los momentos de medición siendo la mayor a las 247 horas con 51.7% con DE 14.8 y la menor a las 243 y 244 horas con 39.3% con DE 10.5 y 9.5 respectivamente, al finalizar el estudio se la encontró de 41% con DE 7.2.

5.5 Variables microscópicas.

Se analizaron 12 variables en 830 fotomicrografías tomadas a 40X de tres tejidos: Músculo cardíaco (MC), tejido hepático (H) y músculo esquelético (ME).

Gráfica 10
Porcentaje de las fotomicrografías analizadas por tejido.



El número de células por campo (CXC) encontrado en el tejido cardiaco fue 33 cxc con DE de 26, para el tejido hepático de 32 cxc con DE 17 y para el músculo esquelético de 6 cxc con DE 5. Estos valores, así como los mínimos y máximos se muestran en la gráfica 9.

En músculo cardiaco y tejido hepático se encontró predominio de necrosis (NC) de tipo lisis celular (L) en 39% y 69% respectivamente. Para músculo estriado, se encontró 72% de necrosis tipo picnosis (P); ver gráfica 10.

En músculo cardiaco se encontró el mayor diámetro celular (MD1) de 17 μ m con DE 4 y menor diámetro celular (MD2) de 8 μ m con DE 3; en tejido hepático MD1 de 12 μ m con DE 3 y MD2 de 5 μ m con DE 1; en músculo esquelético MD1 de 36 μ m con DE 10 y MD2 de 25 con DE 10. Estos valores, así como los mínimos y máximos se muestran en la gráfica 11.

En músculo cardiaco se encontró el mayor espacio extracelular (EI1) de 10 μ m con DE 6 y menor espacio extracelular (EI2) de 1 μ m con DE 1; en tejido hepático EI1 de 13 μ m con DE 7 y EI2 de 1 μ m con DE 1; en músculo esquelético con EI1 de 13 μ m con DE 7 y EI2 de 3 con DE 3. Estos valores, así como los mínimos y máximos se muestran en la gráfica 12.

El número de vacuolas extracelulares (#V) encontrado en músculo cardiaco fue de 40 con DE 21, en tejido hepático 18 con DE 13 y en músculo estriado 5 con DE 3; ver gráfica 13.

En músculo cardiaco se encontró el mayor diámetro vacuolar (V1) de 14 μ m con DE 10 y menor diámetro vacuolar (V2) de 1 μ m con DE 1; en tejido hepático V1 de 20 μ m con DE 9 y V2 de 3 μ m con DE 3; en músculo esquelético V1 de 8 μ m con DE 10 y V2 de 2 con DE 2. Estos valores, así como los mínimos y máximos se muestran en la gráfica 14.

El número de cristales extracelulares (CR) encontrado en músculo cardiaco fue de 39 con DE 28, en tejido hepático 14 con DE 11 y en músculo estriado 8 con DE 7; ver gráfica 15.

En músculo cardiaco se encontró el mayor diámetro de los cristales extracelulares (CR1) de 25 μ m con DE 14 y menor diámetro de los cristales extracelulares (CR2) de 2 μ m con DE 1; en tejido hepático CR1 de 23 μ m con DE 13 y CR2 de 63 μ m con DE 6; en músculo esquelético CR1 de 25 μ m con DE 15 y CR2 de 4 con DE 6. Estos valores, así como los mínimos y máximos se muestran en la gráfica 16.

5.6 Interpretación de resultados.

5.6.1 De los valores antropométricos.

El promedio del peso corporal se encontró en rango normal para la talla según las tablas de peso y talla para adultos mexicanos²⁷. El IMC promedio representa un *estado nutricional* en rango normal en 60% y con desnutrición en 40% de los sujetos, según referentes establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). El perímetro abdominal se encontró en todos los sujetos de estudio por debajo del esperado para riesgo cardiovascular (94 cm) según referentes establecidos por la Secretaría de Salud en México. Derivado de éste análisis, consideramos la composición corporal de los sujetos relacionado a la proporción de la grasa corporal dentro de la normalidad a la adiposidad baja y lo consideramos como un indicador de pérdida de calor en el cadáver al actuar como un aislante térmico.

En cuanto a las variables talla, pesos y perímetros como datos de *proporcionalidad corporal* entre los sujetos del estudio, encontramos que el 100% de los sujetos tiene características antropométricas pertenecientes al somatotipo del adulto delgado²⁸.

Lo anterior, permite estimar que la composición y proporción corporal de los sujetos de estudio no muestran variaciones físicas relevantes entre sí para el desarrollo de un modelo de la pérdida y ganancia de calor y temperatura; es decir, no existen variaciones significativas en sus componentes físicos antropométricos que traduzcan cambios importantes en su comportamiento como un objeto cilíndrico sólido para el flujo calorífico según la ley de Fourier^{29, 15}.

5.6.2 De la relación de las variables macroscópicas.

Los valores de hidratación ocular a partir de las 12 horas en congelamiento no fue posible valorarlas hasta las 241 horas, es decir, después de 1 hora de exposición a temperatura ambiental. La evolución de los cambios a partir de ese momento partió del estado de hidratación que se encontró previo a la congelación y presentó tendencia a la deshidratación acelerada y determinada por el colapso del globo ocular sin cambio de las otras variables oculares. Durante el congelamiento los sujetos de estudio se vieron expuestos a humedad relativa con valores superiores a 65%, y al descongelamiento, la humedad del medio ambiente fue inferior a 67%. Aunado a esto, es importante considerar que la deshidratación cadavérica en congelamiento se vio reducida por

27 Casillas LE, Vargas LA. Cuadros de peso y talla para adultos mexicanos. *Arch. Invest. Méd.* 1980.

28 Organización Mundial de la Salud. El estado físico: uso e interpretación de la antropometría [en línea]: [Ginebra]. Organización Mundial de la Salud, 1995 [12/08/2013] Disponible en web: <whqlibdoc.who.int/>.

29 Fernández S José María. Transmisión del calor [en línea]: [España]: Universidad de Almería. Dpto. Ingeniería Química, 2004 [12/08/2013] Disponible en internet: <<http://www.itescam.edu.mx>>.

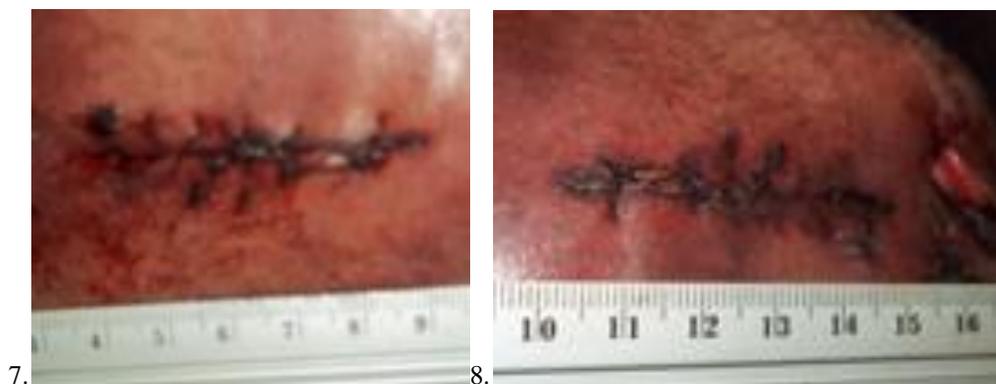
¹⁵ *op cit*

permanecer los cadáveres dentro de una bolsa plástica (con el objeto de simular un congelamiento artificial criminal similar a los reportados en la prensa), y al descongelamiento, se les expuso al medio ambiente sin este aislante.

En los cadáveres que presentaron lesiones al exterior con pérdida de continuidad de la piel se encontró a partir de las 12 horas de estudio cambio de coloración de los bordes de las lesiones a tono negruzco asociado a deshidratación, mismo que permanecía constante y sin cambios hasta las 240 horas de estudio. Al descongelamiento el borde de las lesiones se encontraba sin cambios en relación a su estado inicial (previo a la congelación) asociado a gran condensación de agua en la superficie cutánea a la exposición al medio ambiente (considerando que la piel es un medio hidrófilo), contrario a la deshidratación acelerada de los globos oculares, estructuras que no presentaban condensación al descongelamiento. De igual forma, en un caso se presentó rehidratación de las mucosas al descongelamiento y en general, contrario a lo esperado con exposición a baja humedad relativa, en todos los casos se encontró deshidratación leve de las mucosas.

Imagen 11 y 12

Deshidratación a nivel de una herida suturada al ingreso del sujeto al estudio y a las 241 horas.



Las livideces presentaron un cambio constante en los sujetos de estudio a la coloración rojo brillante a partir de las 12 horas en congelamiento sin mostrar cambios posteriores. Encontrando en ese momento una temperatura cadavérica menor a 4°C con exposición de 12 horas a temperatura constante de congelamiento a -20°C. Es probable asociar el cambio de coloración a la temperatura de congelamiento.

Imagen 13 a 15

Inflexibilidad generalizada con deformidad de los tejidos blandos en el cadáver expuesto a congelación por 12 horas

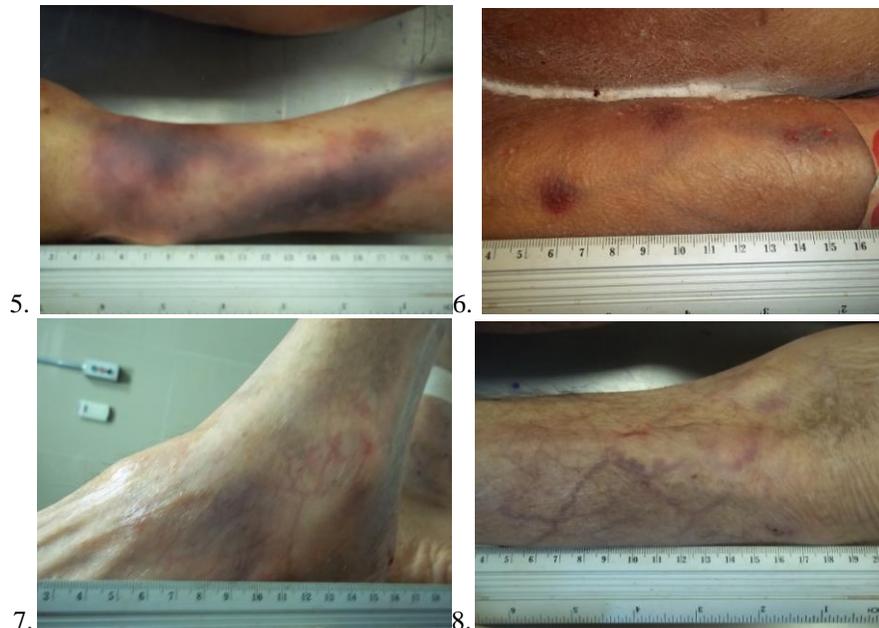


La rigidez muscular en forma constante no fue valorable en el congelamiento por inflexibilidad generalizada con deformidad de los tejidos blandos en los puntos de apoyo (cara posterior del cadáver) a partir de las 12 horas. A partir de una hora con exposición a temperatura ambiente se identificó pérdida progresiva de la inflexión del cadáver, primero de las articulaciones distales de los miembros superiores e inferiores con reducción parcial y limitada a muñecas y tobillos en las primeras 3 horas de descongelamiento, después a nivel de codo y rodilla con reducción fácil a las 13 horas de exposición a temperatura ambiente y por último flacidez generalizada a las 31 horas con descongelamiento total del cadáver.

La putrefacción no fue valorable de las 12 a las 240 horas por congelamiento con cese en su evolución habitual a temperatura ambiente. A la hora de exposición ambiental se identificaron cambios cromáticos en tercios distales de piernas y antebrazos a manera de manchas violáceas de forma ovoide bien limitadas sobre los trayectos venosos. Estas manchas, presentaron cambio progresivo de su configuración adoptando forma lineal con incremento de su tamaño hacia proximal en las 3 horas siguientes hasta identificarse plenamente como red venosa de color violácea al mismo tiempo que se presentaron manchas iniciales de red venosa en tercios proximales de los miembros. A las 13 horas en descongelamiento, se presentó coloración verdosa en 2 de los sujetos de estudio en cara anterior del tronco (mancha verde) con aumento progresivo en su métrica.

Imagen. 16 a 17

Aparición de red venosa en las extremidades del cadáver a la hora (5 y 6) y tres horas (7 y 8) en descongelamiento



Considerando que la temperatura media del ambiente se mantuvo entre 27°C y 17°C y la temperatura del cadáver alcanzó temperatura mayor a cero a las 13 horas de exposición al medio ambiente encontramos los cambios de las variables rigidez muscular y putrefacción asociados directamente al incremento de temperatura del cadáver por arriba de cero grados Celsius.

En forma constante, se identificó cambio en la coloración de la piel a tonos ocre al congelamiento, a las 12 horas localizado en antebrazos y piernas abarcando sus cuatro caras y sus tres tercios llegando a abarcar toda la extensión de las extremidades a las 24 horas, para generalizarse a toda la piel a las 72 horas. Al descongelamiento, sin poderse valorar por efecto de la condensación en la superficie del cadáver hasta pasadas tres horas encentrándose cambio de coloración de tonos ocre a rojo brillante con predominio en la región cefálica, para después tomar la tonalidad pálida habitual encontrada en el cadáver. Este representa un efecto conocido a la exposición al congelamiento de los cadáveres más sin embargo se desconoce su etiología.

Con la condensación de agua en la superficie cutánea al exponer el cadáver congelado al medio ambiente, la piel de encontrarse inflexible por congelamiento con surcos muy demarcados y apariencia deshidratada en las lesiones con pérdida de contigüidad, paso a rehidratación llegando a adquirir textura pastosa y elástica con desprendimiento epidérmico en las zonas de apoyo y fricción similar a lo encontrado en la exposición del cadáver a la sumersión en

agua. Estos efectos desaparecían al secarse la piel completamente para iniciar a deshidratarse rápidamente.

Imagen 18 y 19

Consistencia de los tejidos blandos



Al estudio de la consistencia de los tejidos blandos en las extremidades mediante la presión digital, encontramos aumento de la consistencia de los tejidos blandos a partir de las 12 horas de congelamiento con predominio en las extremidades, llegando a encontrarlos de consistencia pétrea a las 24 horas; al descongelamiento, pérdida del estado de inflexibilidad iniciando a la hora de descongelamiento nivel de los extremos distales de antebrazos y piernas identificado en forma constante en los sujetos de estudio, que evolucionó a brazos, muslos y caja torácica a las 3 horas en descongelamiento.

Imagen 20 y 21

Aspecto de la superficie cutánea a la 241 horas y 243 horas de estudio respectivamente.



Al estudio interno de los cadáveres a las 31 horas de exposición al medio ambiente, se encontró cambio en la coloración de los órganos a rojo brillante similar al encontrado en muerte por intoxicación con monóxido de carbono, con los órganos sólidos con disminución de su consistencia y las asas intestinales sin distensión por gas.

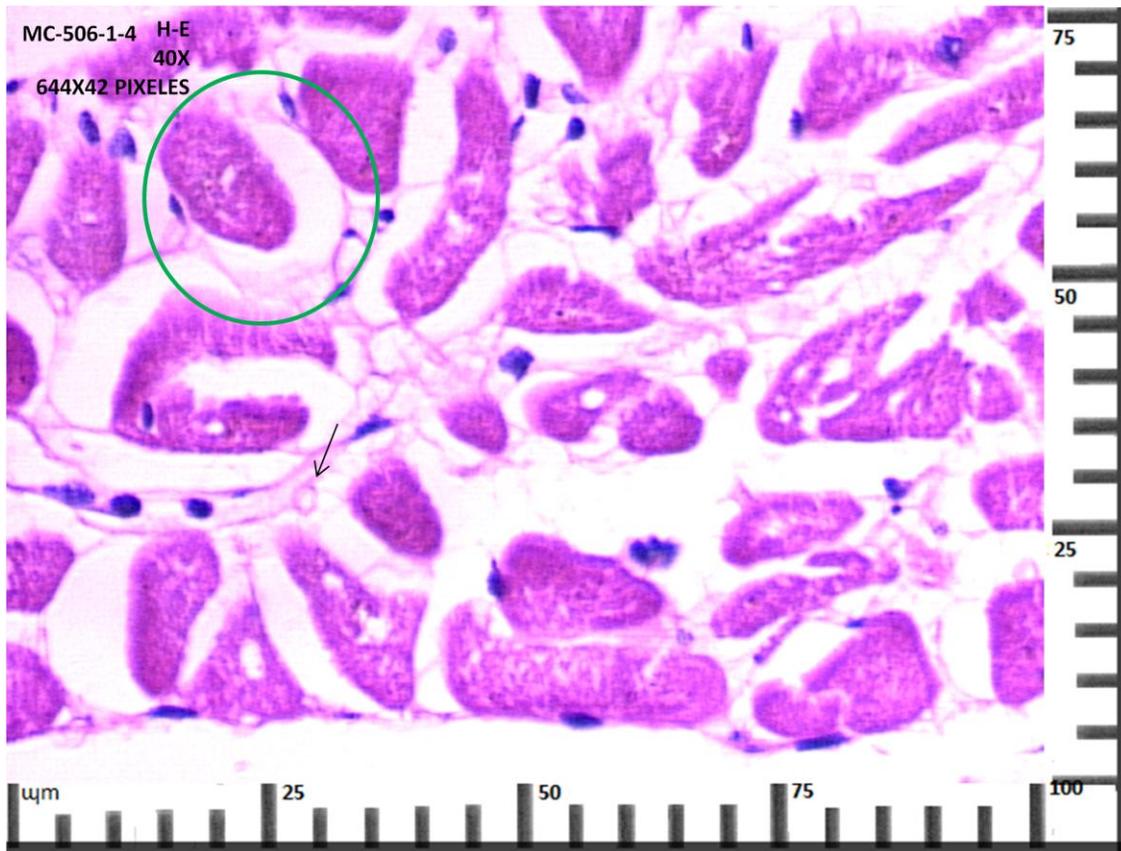
5.6.3 De la relación de las variables microscópicas.

Inicialmente se identificó en todos los casos desde el primer muestreo (momento cero) citoplasma con hipereosinofilia con diferentes grados de pérdida de la estructura normal celular y en el núcleo picnosis, cariólisis o cariorrexis, pérdida de volumen celular respecto a las dimensiones que presentan en tejidos vivos con aumento del espacio entre las mismas y presencia de estructuras vacuolares en éste espacio.

Las formaciones vacuolares se encontraban limitadas por material con eosinofilia, producto de la separación de las uniones celulares y en mayor cantidad asociado a lisis celular, llegando a ser incluso no identificables el espacio celular del extracelular en un caso (tejido hepático en un sujeto de estudio que presentó laceración hepática por trauma abdominal). Por lo tanto, estas formaciones posiblemente se encuentren constituidas por lipoproteínas de las membranas celulares desnaturalizadas que se encuentran libres en los espacios extracelulares y asociado a disminución de la temperatura de los tejidos por debajo de los 15°C.

Imagen 22

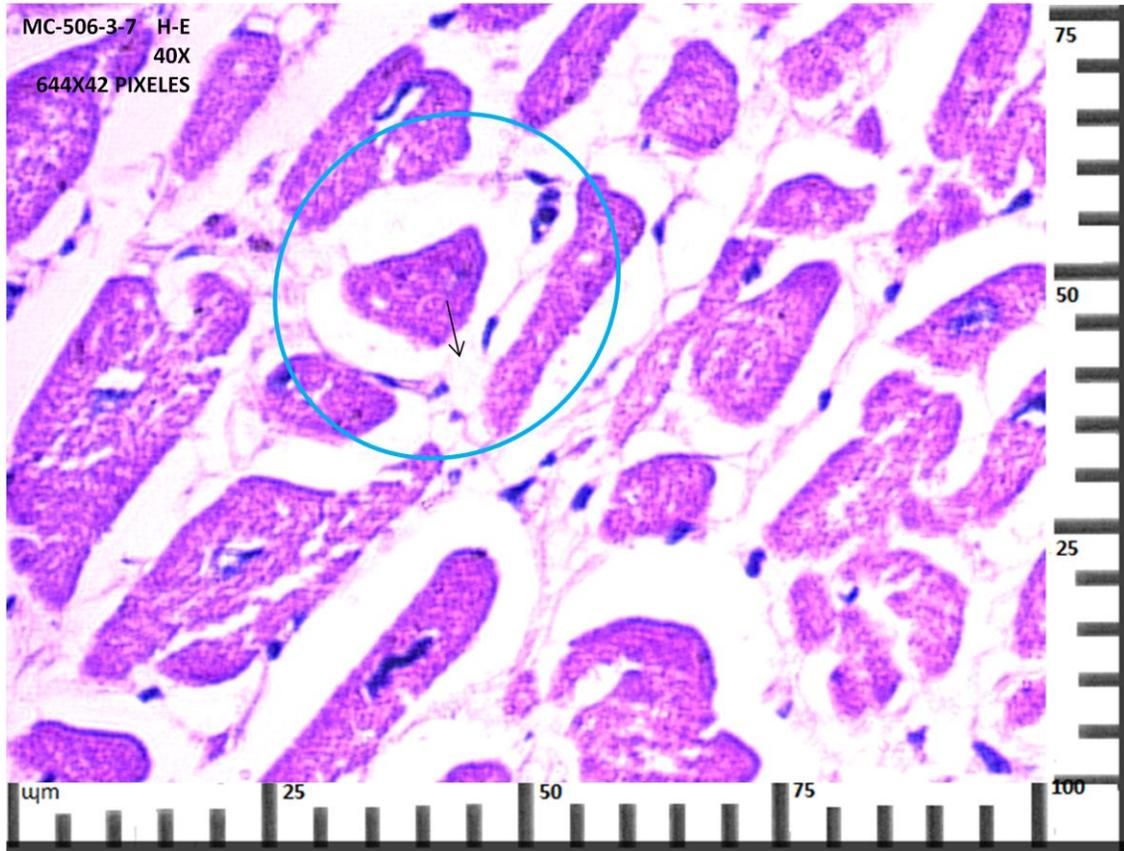
Cuerpos vacuolares en los espacios intercelulares asociados a lisis al primer muestreo con temperatura cadavérica entre 14 y 8°C.



Las vacuolas presentaron evolución en los muestreos 2 y 3 al aumento de su tamaño, disminución en su número y fusión de unas con otras.

Imagen 23

Aumento del tamaño de los cuerpos vacuolares al tercer muestreo con temperatura cadavérica entre 3 y -1C.

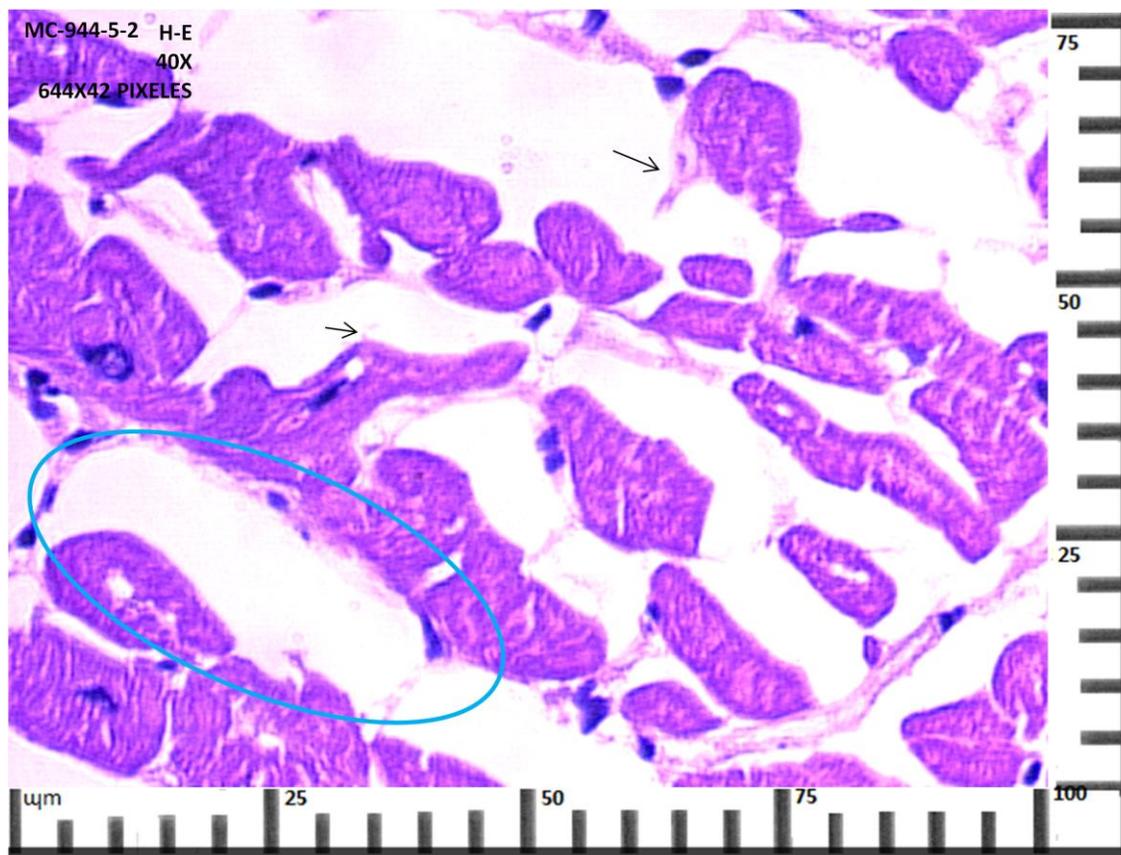


A partir del cuarto muestreo cambiaron su morfología de ser de aspecto micelar a conformaciones amorfas delimitadas por el mismo material de aspecto proteico con ángulos agudos rodeando espacios virtualmente vacios compatibles con cristales extracelulares de hielo.

Los cristales en los muestreos posteriores presentaron aumento de su tamaño con fusión entre los mismos adquiriendo aumento progresivo de su tamaño y tomando aspecto digitiforme desplazando a la periferia los cuerpos celulares deformándolos.

Imagen 24

Aumento del tamaño de los cristales extracelulares al quinto muestreo con temperatura cadavérica entre -15 y -18C.



Consideraremos una interpretación a mayor profundidad de estas variables al efectuar su análisis estadístico inferencial en una segunda etapa de investigación.

6. DISCUSIÓN

De los cambios en el hábito externo del cadáver al descongelamiento, encontramos cambios de su evolución en relación al proceso habitual que sufre el cadáver expuesto a temperatura ambiental templada. Se presentó inicialmente red venosa de aparición periférica con aumento en sus dimensiones hacia el tronco y aparición de mancha verde con acelerada putrefacción de los musculares de la caja torácica y de los órganos a las 31 horas de descongelamiento sin enfisema, cuando los cadáveres alcanzaron temperatura superior a los 4°C. Lo anterior se contrapone a los que reporta Micozzi³⁰ en modelos animales, es decir, no encontramos cambios por putrefacción de inicio externo con dirección al interior del cadáver. Y también es contrario a la falta de evidencia de putrefacción y autólisis en recién nacidos que reportaron Kosawa, Kakizaki y Yukawa³¹ a los 90 minutos de descongelamiento inducido por sumersión en solución salina a 37°C. La única coincidencia que encontramos con estos autores es la disminución de la consistencia de los órganos sólidos en todos los sujetos de estudio.

En relación con las cuatro preguntas que sugieren Zugibe y Costello¹⁴. para sospechar si un cadáver fue congelado y su estudio al descongelamiento, resulta característico en los sujetos investigados la ausencia de distensión de las asas intestinales al descongelamiento hasta las 31 horas de exposición a temperatura ambiente como sugiere, más no la consistencia pastosa de la piel, que sólo se presentó al momento de condensación de agua en la superficie cutánea. No encontramos coincidencia con el patrón de descomposición que describe Micozzi³⁰

Respecto a la rigidez muscular, tenemos que en esta investigación se la encontró no valorable a partir de iniciado el congelamiento por pérdida de la elasticidad de los tejidos involucrados en los movimientos articulares con inflexibilidad; característica rápidamente recuperada en las extremidades a partir de una hora de exposición a temperatura ambiente, lo que es contrario a la

³⁰ Micozzi, M. S. Experimental study of Postmortem change under field conditions: Effects of freezing, thawing, and mechanical injury. *Journal of Forensic Sciences JFSCA*. 1986; 3, 31 jul. 953-61.

³¹ Kosawa S, Kakizaki E, Yukawa N. Autopsy of two frozen newborn infants discovered in a home freezer. *Leg Med (Tokyo)*, 2010; 4, 12 jul. 203-7.

¹⁴ . *op cit*

³⁰ *op cit*

prolongación de la rigidez presente a la refrigeración.³² Y que se relaciona a lo expuesto por Huang et. al.³³; y Kennedy, Tordonado y Duma³⁴, cuando indican que el congelamiento y descongelamiento altera las propiedades estructurales de los tendones y cartílagos articulares con tendencia a sufrir daño mecánico, y por lo tanto, su respuesta al descongelamiento en nuestro estudio, con tendencia a la flacidez generalizada al hacer exploración de este signo mediante la movilización articular.

Los cambios histológicos que encontramos en los tejidos estudiados se relacionan al modelo de congelamiento lento celular descrito por Mazur y citado por Schäfer y Kauffmann¹⁵. Identificamos el aumento de los espacios intercelulares, disminución de los diámetros celulares y la formación de cristales de hielo extracelulares a temperatura por debajo de los - 5°C; más **NO encontramos en literatura revisada referencias sobre la formación de vacuolas en los espacios extracelulares asociadas a pérdida de temperatura del cadáver ni y la evolución de estas formaciones a espacios virtualmente vacíos compatibles con cristales de hielo extracelulares.**

Como describen Kimura y Abe¹⁷ a las 48 horas y 72 horas post-mortales, encontramos cambios positivos de necrofanerosis en todos los tejidos estudiados. Si lo sumamos a estos últimos los cambios histológicos descritos por Tomita y cols¹⁹.; y Bardale⁵ a la evolución de las formaciones vacuolares que encontramos, es posible aplicarlos como un instrumento para la estimación del intervalo post-mortal temprano, no sólo en los casos de congelamiento, también en los cadáveres en refrigeración y los conservados a temperatura ambiente.

Y tal como refiere Schäfer y Kauffmann¹⁵ encontramos que la valoración de los cristales extracelulares representa un reto para el

³² Varetto L, Curto O. Long persistence of rigor mortis at constant low temperature. *Forensic Science International*. 2005; 6.

³³ Huang Hongjie et al. Effects of repetitive multiple freeze- thaw cycles on the biomechanical properties of human flexor digitorum superficialis and flexor pollicis longus tendons. *Clinical Biomechanics*.2011; 4,26 may. 419-23.

³⁴ Kennedy EA, Tordonado DS, Duma SM. Effects of freezing on the mechanical properties of articular cartilage. *Biomed Sci instrum* 2007; 43. 342-7.

¹⁵ op cit

¹⁷ op cit

¹⁹ op cit

⁵ op cit

observador y son más fácilmente valorables en el tejido hepático donde se presentan en los espacios sinusoidales tomando formas alargadas (digitiformes), seguido del tejido cardíaco donde no toman estas formas y se observan amorfos.

Considerando nuevamente el modelo de congelamiento lento celular, la permeabilidad de la membrana celular aun con necrosis por coagulación y disrupción de sus medios de fijación intercelulares, por la propiedad de las proteínas que la conforman²⁰, conserva su morfología y propiedad de permeabilidad; por lo que encontramos que la lisis no está determinada por el daño mecánico que provocan los cristales de hielo, sino por el incremento de los solutos en los espacios extracelulares al congelamiento lento, que en el descongelamiento retornan al interior celular en la redistribución de los solutos por osmosis y reexpansión celular³⁵.

¹⁵ *op cit*

²⁰ *op cit*

³⁵ Bhratnagar BS, Bogner RH, Pikal MJ. Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharm Dev Technol.* 2007; 5, 12. 505-23.

7. CONCLUSIONES

Con la presente investigación, se desarrolló un instrumento de estudio del hábito externo de los cadáveres para sospechar y/o descartar congelamiento y un método para identificar los cambios progresivos de congelamiento en los tejidos con los que se describieron, dando respuesta a la pregunta inicial de investigación.

Sumado a lo anterior, identificamos la presencia de formaciones vacuolares en los espacios extracelulares, asociadas a pérdida de temperatura en el cadáver y la evolución de estas formaciones a espacios virtualmente vacíos compatibles con cristales de hielo extracelulares visibles, en cortes histológicos teñidos con H-E mediante microscopía óptica.

Como contribución adicional se elaboraron dos escalas analógicas visuales para la valoración objetiva de los signos tanatológicos y de los cambios inducidos por congelamiento a nivel histológico. Escalas que tienen aplicación en la práctica diaria de la necropsia para descartar congelamiento cadavérico y representan instrumentos objetivos de fácil aplicación.

Del método para identificar los cambios progresivos de congelamiento en los tejidos se obtuvo información de la que se hará un análisis estadístico inferencial en una segunda etapa de investigación dirigida a desarrollar un instrumento para la estimación del intervalo post-mortal en cadáveres congelados.

8. RECOMENDACIÓN

Como medio para auxiliar a los médicos legistas en su práctica diaria se deben priorizar las investigaciones dirigidas a desarrollar instrumentos, de fácil aplicación y bajo costo para la estimación objetiva del intervalo post-mortal, útil no sólo para los casos de congelamiento, también para los cadáveres en refrigeración y los conservados a temperatura ambiente y bajo condiciones particulares.

9. HEMEROGRAFÍA Y BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Kaliszan Michał, Hauser Roman, Kernbach, W Gerhard. Estimation of the time of death based on the assessment of post mortem processes with emphasis on body cooling. Review Article. *Legal Medicine* 2009; 11. 111–17.
2. Al-Alousi M Louay, Anderson A Robert, Worster M Diana, Land V David. Factors influencing the precision of estimating the postmortem interval using the triple-exponential formulae (TEF) Part I. A study of the effect of body variables and covering of the torso on the postmortem brain, liver and rectal cooling rates in 117 forensic cases. *Forensic Science International* 2002; 125. 223–30.
3. Al-Alousi M Louay, Anderson A Robert, Worster M Diana, Land V David. Factors influencing the precision of estimating the postmortem interval using the triple-exponential formulae (TEF) Part II. A study of the effect of body temperature at the momento of death on the postmortem brain, liver and rectal cooling in 117 forensic cases. *Forensic Science International* 2002; 125. 231–36.
4. Kaliszan Michał. First practical applications of eye temperature measurements for estimation of the time of death in casework. Report of three cases. *Forensic Science International*. 2012; 219.13-15.
5. Bardale R Dixit. Evaluation of Morphological Changes in Blood Cells of Human Cadaver for the Estimation of Postmortem interval. *Indmedica*. 2007; 2, 7.
6. Kohji Honjyo, Kosei Yonemitsu, Shigeyuki Tsunenari. Estimation of early postmortem intervals by a multiple regression analysis using rectal temperature and non-temperature based postmortem changes. *Journal of Clinical Forensic Medicine*. 2005; 12. 249–53.
7. Larkin B, laschi S, Dadour I, Tay GK. Using accumulated degree-days to estimate postmortem interval from the DNA yield of porcine skeletal muscle. *Forensic Sci Med Pathol*. 2010; 6, 2 jun. 83-92.
8. Poloz O Yekaterina, O'Day H Danton. Determining time of death: temperature-dependent postmortem changes in calcineurin A, MARCKS, CaMKII, and protein phosphatase 2A in mouse. *Int J Legal Med* 2009; 123. 305–314.
9. SDP noticias. Encuentran cadáver en refrigerador en Iztapalapa [en línea] [México]: SDP noticias, 11 de Marzo de 2011 [04/04/2012]. Disponible en Web: <<http://www.SDPnoticias.com>>.
10. Terra noticias. Hallan cadáveres congelados dentro de contenedor en Tijuana [en línea] [México]: Terra, 15 de Noviembre de 2011 [04/04/2012]. Disponible en Web: <<http://www.noticias.terra.com.mx>>.
11. Zócalo Saltillo. Hallan restos humanos en refrigerador en Chapala [en línea]: [México]: Zócalo, 14 de Mayo de 2012 [10/02/2012]. Disponible en Web: <<http://www.zocalo.com.mx>>.

12. Peru21. Encuentran cuerpo de un bebé en un refrigerador [en línea] [Perú]:Peru21, 27 de noviembre de 2012 [10/02/2013]. Disponible en Web: <<http://www.peru21.pe>>.
13. El Vocero de Puerto Rico. Encuentran bebé de 5 meses muerto dentro de un congelador [en línea]: [Puerto Rico]: El Vocero de Puerto Rico, 18 de diciembre de 2012 [02/12/2013]. Disponible en Web: <<http://www.vocero.com>>.
14. Zugibe T Frederick and Costello T James. The Iceman Murder: One of a Series of Contract Murders. *Journal of Forensic Sciences*. 1993; 6, 38 nov.1404-08.
15. Schafer A, Kaufmann J D. What happens in freezing bodies? Experimental study of histological tissue change caused by freezing injuries. *Forensic Science International*. 1999; 102. 149-158.
16. Pegg DE, Diaper MP: On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes. *Biophys J*. 1988; 54. 471-88.
17. Kimura- M. Abe M. Histology of postmortem changes in rat livers to ascertain hour of death. *International Journal of Tissue Reactions*. 1994; 3, 16.139-50.
18. Hegarty PVJ, Naudé RT. Effect of Freezing, Thawing and Fixatives on the Diameter of Fibres from Pre- and Post-Rigor Skeletal Muscles. Proceedings of the Royal Irish Academy. Section B: *Biological, Geological, and Chemical Science*. 1973; 73. 87-94.
19. Tomita Y et al. Histological study of early postmortem changes in various organs: comparison of the paraffin embedding method and the epoxy resin embedding method. *Japanese Journal of Legal Medicine*. 1999, 2, 53 jun. 207-17.
20. Garber Cohen IP, Castello PR, González Flecha FL. Ice-induced partial unfolding and aggregation of an integral membrane protein. *Biochim Biophys Acta*, 2010; 11 nov. 2040-7.
21. Surós BJ, Surós, Batlló, Antonio, J. *Semiología médica y técnica exploratoria*. Séptima edición. España, MASSON Editores, 2004. 35-57.
22. Secretaria de Salud. Manual de procedimientos para la toma de medidas clínicas y antropométricas en el adulto y adulto mayor [en línea]: [México], Secretaria de Salud, Abril 2002 [11/08/2013]. Disponible en Web:< <http://www.salud.gob.mx>>.
23. Grandini GJ. *Medicina forense, aplicaciones teórico- prácticas*. Segunda. Edición. México, Manual Moderno, 2009. 38.
24. World Health Organization. Physical Status: The use and interpretation of anthropometry. Geneve: World Health Organization, 1995.
25. Gisbert, Calabuig. *Medicina legal y toxicología*. Sexta edición. España, MASSON editores, 2004. 245- 9.
26. Patitó JA et al. *Tratado de medicina legal y elementos de patología forense*. Argentina, Editorial Quorum, 2003. 189-201.
27. Casillas LE, Vargas LA. Cuadros de peso y talla para adultos mexicanos. *Arch. Invest. Méd*. 1980.

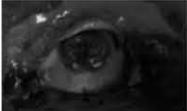
28. Organización Mundial de la Salud. El estado físico: uso e interpretación de la antropometría [en línea]: [Ginebra]. Organización Mundial de la Salud, 1995 [12/08/2013] Disponible en web: <whqlibdoc.who.int/>.
29. Fernández S José María. Transmisión del calor [en línea]: [España]: Universidad de Almería. Dpto. Ingeniería Química, 2004 [12/08/2013] Disponible en internet: <http://www.itescam.edu.mx>.
30. Micozzi, M. S. Experimental study of Postmortem change under field conditions: Effects of freezing, thawing, and mechanical injury. *Journal of Forensic Sciences JFSCA*. 1986; 3, 31 jul. 953-61.
31. Kosawa S, Kakizaki E, Yukawa N. Autopsy of two frozen newborn infants discovered in a home freezer. *Leg Med (Tokyo)*, 2010; 4, 12 jul. 203-7.
32. Varetto L, Curto O. Long persistence of rigor mortis at constant low temperature. *Forensic Science International*. 2005; 6.
33. Huang Hongjie et al. Effects of repetitive multiple freeze- thaw cycles on the biomechanical properties of human flexor digitorum superficialis and flexor pollicis longus tendons. *Clinical Biomechanics*. 2011; 4, 26 may. 419-23.
34. Kennedy EA, Tordonado DS, Duma SM. Effects of freezing on the mechanical properties of articular cartilage. *Biomed Sci instrum* 2007; 43. 342-7.
35. Bharnagar BS, Bogner RH, Pikal MJ. Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharm Dev Technol*. 2007; 5, 12. 505-23.

ANEXO 10.1

Escala visual de las variables macroscópicas

APERTURA PALPEBRAL (AP)	C	EA	EA
<p>Sólo valorado al inicio del estudio:</p> <p>C- Cerrado</p> <p>EA- Entreabierto</p>			

OPACIDAD EN LOS GLOBOS OCULARES (OO)	OCI	OCC	MNE	HI
<p>Sólo al ingreso y al descongelamiento:</p> <p>OCI- Opacidad corneal inicial.</p> <p>OCC- Opacidad corneal completa.</p> <p>MNE- Mancha negra de la esclerótica, desde su aparición (puntillado).</p>				

Colapso del globo ocular en:			
HI	PM	NV	
			
			

HI- Iris.
 HIE- Iris y esclerótica.
 PM- Pérdida de morfología.
 NV- No valorable (congelamiento o ausencia del globo ocular).

HIDRATACION DE LAS MUCOSAS (HM)	H	LS	D	MD
<p>H- Hidratada.</p> <p>LS- Levemente seca, parcialmente localizada en el borde libre de la mucosa de los labios.</p> <p>D- Deshidratada, todo el borde libre de la mucosa de los labios.</p> <p>MD- Muy deshidratada, sobrepasa la mucosa los labios en todo su perímetro.</p>				
<p>NV- No valorable.</p> <p>RH- Rehidratación.</p>				

LIVIDEZES (LIVID)	SMP	CRV	CRB
<p>SMP- Generalizada a la cara posterior del cuerpo sin modificación a la presión digital.</p> <p>CRV- Coloración rojo violácea.</p> <p>CRB- Coloración rojo brillante.</p>			

RIGIDEZ MUSCULAR (RM)

Sólo al ingreso y al descongelamiento:

MP- Limitada a músculos pequeños (cara y cuello).

CYR - Reducción fácil y parcial limitada a codo y rodilla.

HYC- Reducción fácil y parcial de extremidades hasta articulación de hombro y cadera.

GFR- Generalizada a las cuatro extremidades con fácil reducción a la manipulación con una mano.

GDR- Generalizada con difícil reducción que sólo cede a la manipulación con dos manos.

FL- Flacidez generalizada.

NV- No valorable (congelamiento).



PUTREFACCIÓN (PT)

Sólo al ingreso y al descongelamiento:

A- Ausente.

P- Presente.

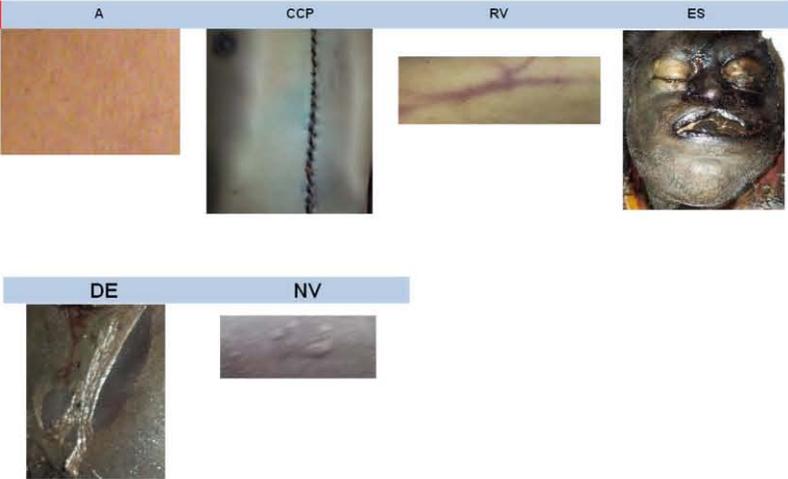
CCP- Cambios de coloración de la piel.

RV- Red venosa.

ES- Enfisema subcutáneo.

DE- Desprendimiento epidérmico.

NV- No valorable.



LESIONES (LX)

Sólo al ingreso:

SL- Sin lesiones.

CL- Con lesiones.

SPC- Lesiones sin pérdida de continuidad de la piel.

CPC- Lesiones con pérdida de continuidad de la piel.



Anexo 10.2

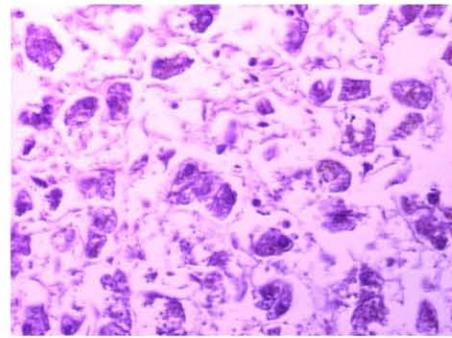
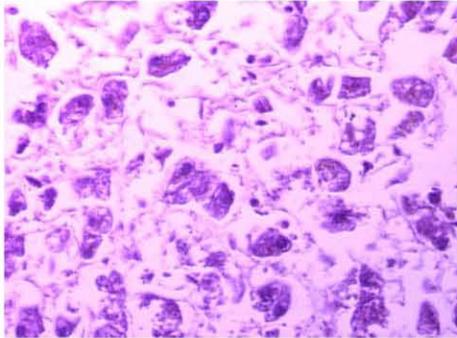
Escala visual de las variables microscópicas

AU/NC- Daño celular irreversible secundario a un estímulo dañino grave directo (anoxia) y se identificó morfológicamente por los signos de necrofanerosis: En el citoplasma hipereosinofilia y pérdida de la estructura normal; en el núcleo picnosis, cariólisis o cariorrexis. La picnosis es la retracción nuclear con condensación de la cromatina (hipercromía), cariólisis la disolución del núcleo y cariorrexis la fragmentación nuclear en trozos con cromatina condensada. También se encuentra lisis celular caracterizada por la pérdida de la integridad de la membrana celular identificándose únicamente fragmentos celulares y detritus in situ. En todas las microfotografías se identificaron alteraciones del citoplasma. Para cada caso se definió la alteración por necrosis predominante en un campo y se identificó como: **P=** Picnosis, **CL=** Cariólisis, **CX=** Cariorrexis, **L=** Lisis.



MD1- En cada fotomicrografía se identificó la célula cardíaca, esquelética o hepática de mayor tamaño y se midió con patrón micrométrico su diámetro mayor registrándose el valor obtenido.

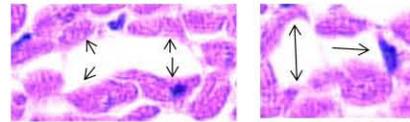
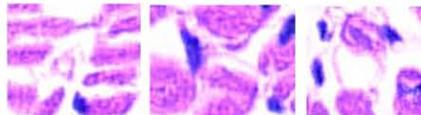
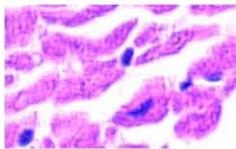
MD2- En cada fotomicrografía se identificó la célula cardíaca, esquelética o hepática de menor tamaño y se midió con patrón micrométrico su diámetro menor registrándose el valor obtenido.



Aumento del tamaño de los espacios extracelulares.

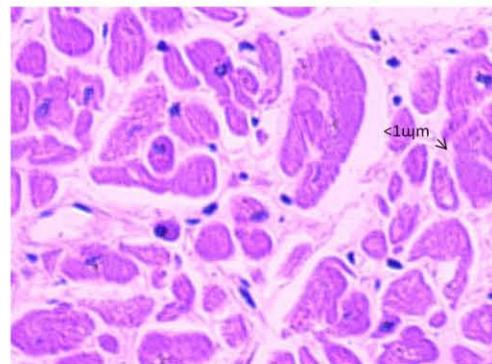
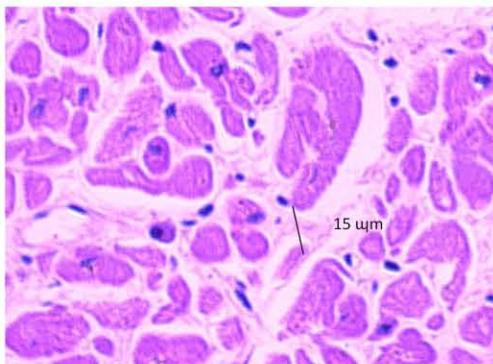
Vacuolas extracelulares: Formaciones como gotas o amorfas delimitadas por la organización de material eosinófilo de aspecto proteico presente en los espacios intercelulares como resultado de la pérdida de calor en el tejido.

Cristal de hielo extracelular. Espacio amorfo virtualmente vacío en el espacio extracelular que corresponde a la extensión de una sustancia en estado sólido que se encontraba en un tejido por acción de la exposición del mismo a bajas temperaturas.

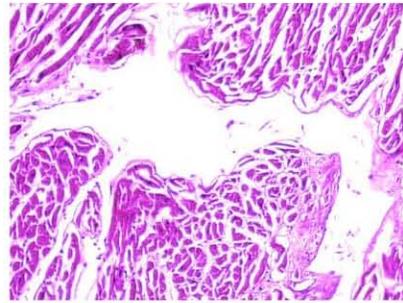
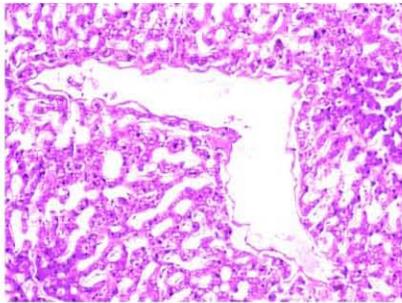


EI1- En cada fotomicrografía se identificaron los espacios entre célula y célula y se midió con patrón micrométrico el de mayor longitud registrándose el valor obtenido.

EI2- En cada fotomicrografía se identificaron los espacios entre célula y célula y se midió con patrón micrométrico el de menor longitud registrándose el valor obtenido.

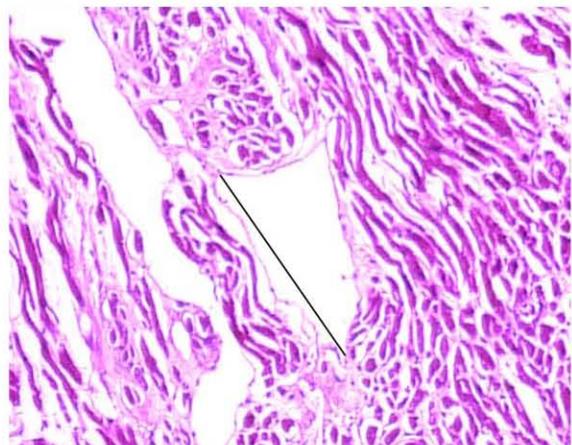
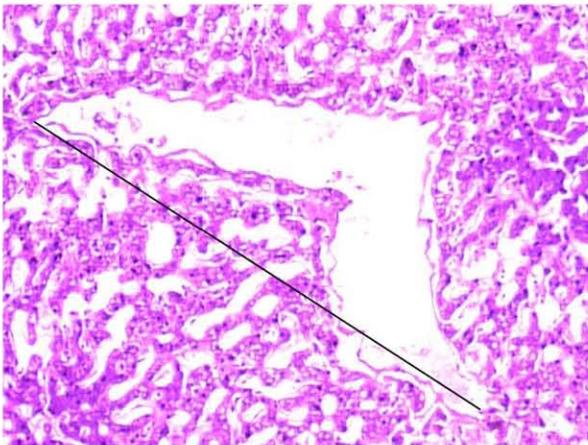


CR- Se identificaron como aumento en los espacios intercelulares caracterizados por contornos agudos y formas irregulares con prolongaciones digital-formes y rodeados de material eosinófilo extracelular.



CRD1- En cada fotomicrografía se identificaron los cristales de hielo y se midió la longitud mayor del de mayor tamaño registrándose el valor obtenido.

CRD2- En cada fotomicrografía se identificaron los cristales y se midió la longitud mayor del de menor tamaño registrándose el valor obtenido.



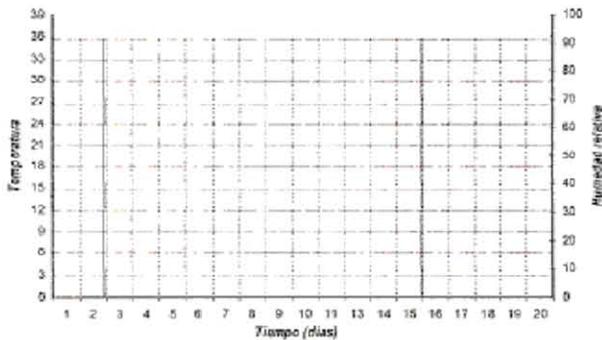
Anexo 10.3

Lista de cotejo y registro de variables macroscópicas

EXPEDIENTE INCIFO- _____

LISTADO/ NUMERO DE REGISTRO		01/Nov/08	10/Nov/08	20/Nov/08	30/Nov/08	01/Dic/08	10/Dic/08
1. Registro de datos generales (expediente IN.CI.FO., fecha, hora de inicio de registro y somatometría). 2. Registro de la temperatura ambiental, del congelador, del cadáver, humedad relativa. 3. Inspección externa de los signos tanatológicos. 4. Fijación fotográfica del hábito exterior. 6. Apertura de la cavidad toracoabdominopéptica. 7. Inspección de los órganos, reparación de tubo digestivo. 8. Peso y medida de los órganos. 9. Muestreo histológico, toma de cultivos (sólo en los registros 1 y 7). 10. Fijación fotográfica de la cavidad, los órganos y tejidos muestreados. 11. Registro de temperatura A/C, somatometría (sólo en el registro 1). 12. Registro de observaciones en bitácora.							
ANATOMIA							
SOMATOMETRIA: TALLA: PESO: IMC: PERIMETRO CEFÁLICO: PERIMETRO TORÁCICO: PERIMETRO ABDOMINAL: PESO DEL CORAZÓN: PESO DEL HIGADO: AFINIDAD RACIAL: APERTURA PALPEBRAL: LESIONES:	Fenómenos cadavéricos y lesiones. 						

Registro de la temperatura y humedad relativa



TA1 TC1 TC2 TR1 TR2 HR1 HR2

TC1-1	TA1-1	TR1-1	HR1-1	TR2-1	HR2-1
TC1-2	TA1-2	TR1-2	HR1-2	TR2-2	HR2-2
TC1-3	TA1-3	TR1-3	HR1-3	TR2-3	HR2-3
TC1-4	TA1-4	TR1-4	HR1-4	TR2-4	HR2-4
TC1-5	TA1-5	TR1-5	HR1-5	TR2-5	HR2-5
TC1-6	TA1-6	TR1-6	HR1-6		
TA-7	TR-7	HR-7			
TA-8	TR-8	HR-8			
TA-9	TR-9	HR-9			
TA-10	TR-10	HR-10			
TA-11	TR-11	HR-11			
TA-12	TR-12	HR-12			
TA-13	TR-13	HR-13			

Anexo 10.4
Registro de las variables microscópicas

MICROGRAFÍA	CXC	AU/NC	MD1	MD2	EI1	EI2	#V	V1	V2	#CR	CR1	CR2
MC-482-1-1												
MC-482-1-2												
MC-482-1-3												
MC-482-1-4												
MC-482-1-5												
MC-482-1-6												
MC-482-1-7												
MC-482-1-8												
MC-482-1-9												
MC-482-1-10												
...												

Anexo 10.5

Proceso de las muestras para microscopía óptica.

El muestreo histológico se realizó en forma seriada en los sujetos de estudio, al momento del ingreso del sujeto al estudio, y a partir de ese momento a las 24 horas, 36 horas, 72 horas, 5 días, 10 días y en el cadáver descongelado, a los 3 días del ingreso del sujeto al estudio (31 horas en descongelamiento), obteniéndose un total de 830 muestras.

10.5.1 Toma de muestras.

Se realizó sección de los tejidos con mayor conservación de sus características morfológicas al examen macroscópico. Seccionándose el tejido interesado (musculo estriado profundo a nivel de tercio medio de muslo en su cara antero-interna, musculo cardiaco a nivel de pared libre de ventrículo izquierdo, e hígado a nivel del lóbulo cuadrado).

Los cortes se realizaron mediante sección transversal con hoja de bisturí no. 22 en el tejido no congelado y con sierra circular eléctrica con punta diamante para el tejido congelado formando cubos no mayores de un centímetro cúbico (1cm³) evitando así áreas con cortes irregulares y para que la fijación del bloque fuera uniforme, facilitara los pasos siguientes de la técnica. Finalmente se depositarán en el fijador en forma inmediata.

10.5.2 Etapas del proceso de las muestras:

El proceso de las muestras se adecuó a la estandarizada en las instalaciones del Servicio de Patología del IN.CI.FO. para la tinción con Hematoxilina- Eosina para microscopía óptica convencional. El procedimiento empleado a continuación se describe.

10.5.2.1.-Fijación por inmersión.

Se utilizó una solución de formaldehído al 10% de concentración por ser el fijador por excelencia en microscopía óptica al establecer puentes covalentes entre las moléculas proteicas de los tejidos, lo que conserva la arquitectura celular en un tiempo relativamente corto al verter la muestra en el fijador en proporción aproximada de 10 a 20 veces el volumen de la muestra dentro de un frasco ancho y de cierre hermético, dos baños de una hora.

10.5.2.2.- Corte.

Después de un tiempo mínimo de fijación de 24 horas, se realizó el corte de los cubos de tejido en hojas de 3 milímetros de espesor para introducirlos en casetes de inclusión dentro de un frasco ancho y de cierre hermético.

10.5.2.3.-Deshidratación y aclaramiento.

Se realizó al verter el tejido en cortes finos y en capsulas en un carrusel automatizado de alcoholes en concentraciones crecientes hasta llegar a alcohol absoluto (70° – 80° – 90° – 96° – 100°), sustituyendo así toda el agua existente en los tejidos por alcoholes dentro de un frasco ancho y de cierre hermético con un tiempo de permanencia total de 12 horas.

Tiempos de permanencia en cada líquido:

Alcohol 70%, 2 horas.

Alcohol 96%, 2 baños de 1 hora cada uno.

Alcohol 100%, 2 baños de una hora cada uno.

El aclaramiento se realizó con xilol, en proporción de 30 veces el volumen de la muestra en dos baños por un periodo de 1 hora cada uno hasta que las piezas se tornaban transparentes.

10.5.2.4.- Infiltración en parafina histológica

Consiste en la sustitución total del xilol por la parafina, previo a la inclusión. Se realizó en dos baños de una hora cada uno.

10.5.2.5 Inclusión.

Se utilizó un baño con parafina líquida a 55°-60°C de las muestras contenidas en los casetes, por ser el medio de inclusión universalmente empleado en microscopía óptica. El conjunto se dejaba a temperatura ambiente sobre placas enfriadas para solidificar.

10.5.2.6.-Sección.

El bloque ya endurecido se situaba sobre un micrótopo de operación manual para realizar secciones de 2 μ m, y las secciones obtenidas se trasladaban al correspondiente soporte de cristal rectangulares de 7,5x2,5 cm x 1 mm (portaobjetos). Se lavaban los cortes con agua destilada.

Previo a la tinción se desparafinaron los cortes histológicos en estufa de cultivo a 100°C.

10.5.2.7.-Tinción.

Las secciones histológicas se tiñeron con dos colorantes: Hematoxilina y Eosina (H-E), por ser colorantes panópticos (que tiñen de forma general, y no específica todos los componentes celulares) con capacidad de teñir un gran número de diferentes estructuras tisulares.

El procedimiento de tinción fue el siguiente:

1. Hidratación de los cortes con alcohol etílico de mayor a menor concentración (alcohol absoluto y alcohol al 96%).
2. Tinción con Hematoxilina de Harris de 1 a 3 minutos.
3. Inmersión en alcohol ácido al 1% para diferenciación del colorante en el tejido.
4. Lavado con agua corriente.
5. Previo a la tinción se desparafinaron los cortes histológicos en estufa de cultivo a 100°C
6. Viraje en solución de carbonato de litio a saturación.
7. Lavado con agua corriente para detener el viraje.
8. Tinción con Eosina amarillenta.
9. Exposición a 10 lavados, cada uno de 2 a 3 segundos.
10. Deshidratación en alcoholes de menor a mayor concentración (alcohol al 96% y alcohol absoluto).
11. Inmersión en xilol.

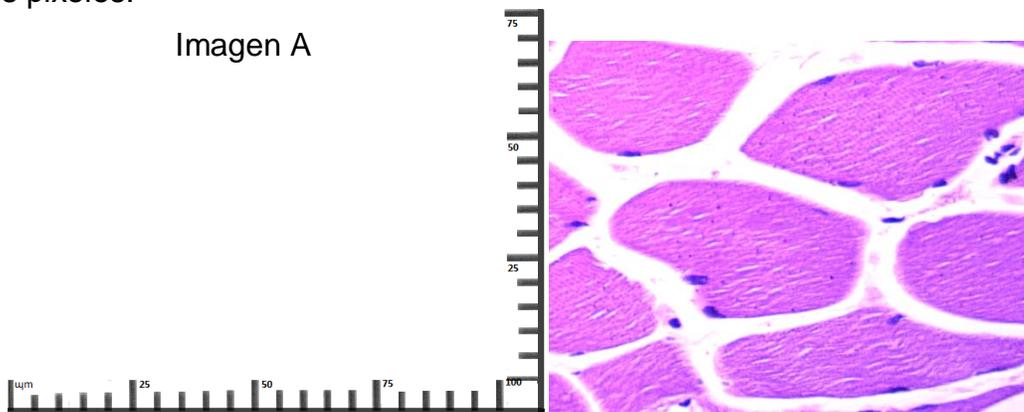
10.5.2.7.-Montaje de la preparación.

Después de la tinción a la muestra se cubría con resina sintética y se superponía un vidrio de 0,17 mm de espesor (cubreobjetos) para proteger el corte.

Anexo 10.6

Elaboración de la escala micrométrica

Para medir un objeto en un microscopio habitualmente se utilizan dos reglas, una ocular y otra objetiva. La regla o micrómetro ocular es un disco de vidrio que se coloca por debajo de la lente ocular. Posee grabada una escala con 50 divisiones que deben ser calibradas, es decir, debe adjudicársele un valor en micras a cada una de sus divisiones, para cada uno de los objetivos del microscopio. Para ello se utiliza la regla objetiva, la cual es una escala grabada en un portaobjetos. Esta última posee 100 divisiones, cada una correspondiendo a 10 μm , por lo cual el largo total de esta regla es de 1mm. Comparando la regla ocular con la regla objetiva, se obtiene el valor de cada unidad arbitraria (UA) de la reglilla ocular, para cada aumento del microscopio y en el caso de las microfotografías digitales de los pixeles.



Dado que el presente estudio requirió la medición microscópica de doce variables para 830 campos histológicos con objetivo de 400 aumentos (40X). Para obtener registros precisos, verificables, se procedió a digitalizar la escala micrométrica y los campos histológicos a analizar (IMAGEN A).

Una vez obtenidas las 830 fotomicrografías y el patrón métrico digital, se procedió a la medición de los diámetros celulares y de los espacios intercelulares y su registro como se refiere en los ANEXOS 10.2 y 10.4.

En músculo estriado y cardíaco: se midió en un corte transversal el diámetro mayor de las fibras musculares y el espacio comprendido entre las fibras musculares de un campo de Cohnheim. En el lobulillo hepático en corte transversal se midieron los espacios comprendidos entre los cordones de hepatocitos (sinusoides) de la zona central y periférica.

Una vez obtenido las medidas de los diámetros celulares, de los espacios extracelulares de los diferentes tejidos, las dimensiones de las vacuolas extracelulares y de los espacios virtualmente vacíos correspondientes a cristales de hielo, los datos fueron analizados en el programa EPIInfo para su análisis, ver el capítulo de resultados.

Anexo10.7

Preparación del cadáver para congelamiento (Sólo en el primer registro).

Una vez realizados todas el registro de variables como indica el **numeral 4.6.1** para el estudio del cadáver, se procedió a preparar la CTAP y la disección en muslo derecho para que se mantuvieran accesibles los tejidos interesados durante todo el periodo de estudio del cadáver y hacer posible la toma de los siete muestreos seriados de los tejidos.

Para lo anterior, fue necesario mantener los tejidos blandos de las ventanas de disección lateralizados en relación a la línea media y la cobertura de la ventana de disección con material orgánico que reprodujera las condiciones de los tegumentos. Por ello se prepararon colgajos de cuero de cerdo previamente sanitizados mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 1%, después se hicieron puntos ciegos de sutura con hilo cáñamo en el colgajo, en sus cuatro extremos y otros cuatro puntos en la piel alrededor de la ventana de disección en relación a los anteriores, de manera que se anudaban con jaretas de hilo que permitía retirar las cubiertas de cuero de cerdo en cada a ocasión sin lesionar la piel del sujeto, ver **imágenes (a) y (b)**.

Imágenes (a- d). Preparación del cadáver para congelamiento.



Para el caso de la ventana CTAP, se colocaba y retiraba el peto esternal en su localización normal para la inspección y muestreo de los órganos en cada ocasión.

Anexo 10.8

Características del congelador

Congelador horizontal con tapa tipo cofre con sellado hermético para evitar fugas de aire frío.

Dimensiones: 188x77x79 centímetros.

Capacidad: 705 litros (24.9 pies cúbicos).

Uso principal: Congelación de alimentos.

Imagen. Congelador en funcionamiento en la sala de necropsia.



Anexo 10.9

Comportamiento de las variables tanatológicas

