



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**MÉTODOS PARA LA ESTIMACIÓN DEL TIEMPO TRANSCURRIDO
DESDE EL DECESO A PARTIR DE ANÁLISIS QUÍMICO Y BIOQUÍMICO
DE FLUIDOS**

Trabajo Monográfico de Actualización

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

PRESENTA

KAREN YESSICA GAYOSSO CRUZ



MÉXICO, D.F.

2016



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre.

VOCAL: Profesora: María Elena Bravo Gómez.

SECRETARIO: Profesora: Alejandra Quijano Mateos.

1er. SUPLENTE: Profesor: Benjamín Parada De la Cruz.

2° SUPLENTE: Profesora: Verónica Garrocho Villegas.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Toxicología y Química Forense, Ciencia Forense, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESORA DEL TEMA
DRA. MARÍA ELENA BRAVO GÓMEZ.

SUSTENTANTE
KAREN YESSICA GAYOSSO CRUZ.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	iv
INTRODUCCIÓN	1
INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL TEMA	3
<i>Proceso de muerte</i>	3
<i>Generalidades</i>	4
<i>Biomarcadores</i>	14
Metabolitos	14
I. Potasio	14
II. Sodio	36
III. Cloro	39
IV. Calcio	40
V. Glucosa	41
VI. Hipoxantina	43
VII. Adenosintrifosfato	46
VIII. Ácido ribonucleico	55
Proteínas	60
I. Troponinas cardíacas	60
II. Proteínas de músculo esquelético	63
DISCUSIÓN	74
CONCLUSIONES.....	81
BIBLIOGRAFÍA	82

ABREVIATURAS

°C: Grados Celcius.

μM: Micromolar.

μmol: Micromol.

ADP: Adenosindifosfato.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ARNnc: Ácido ribonucleico no codificante.

ARNr-18S: Ácido ribonucleico ribosomal 18-S.

ATP: Adenosintrifosfato.

Ca²⁺: Calcio.

CaCl₂: Cloruro de calcio.

CLAR: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Ct: Del inglés: *Cycle threshold*, ciclo umbral.

dL: Decilitro.

ERM: Espectroscopia de resonancia magnética.

FF: Fotometría de flama.

Glu: Glucosa.

h: Hora(s).

Hx: Hipoxantina.

SDS-PAGE: Acrónimo del inglés: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

IPM: Intervalo *post mortem*.

K, K⁺: Potasio.

ABREVIATURAS

kDa: Kilodalton.

L: Litro.

ln: Logaritmo natural.

log: Logaritmo.

mEq: Miliequivalentes.

mg: Miligramo.

miARN: MicroARN.

mL: Mililitro.

mM: Milimolar.

mmol: Milimol.

n: Número de muestras.

N1: Nebulina 1.

N2: Nebulina2.

Na, Na⁺: Sodio.

pb: Pares de bases.

PCr: Fosfocreatina.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

pd: Producto de degradación.

Pi: Fosfato inorgánico.

PM: Peso molecular.

PME: Fosfomonoéster.

r: Coeficiente de correlación.

R_a²: R² ajustada.

SERCA: Acrónimo del inglés: *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase*, ATPasa que transfiere calcio.

ABREVIATURAS

SIS: Sistema de inyecciones secuenciales.

T: Temperatura.

t: Tiempo.

T1: Titina nativa.

T2: Principal producto de degradación de titina.

Tnlc: Troponina I cardiaca.

TnT: Troponina T.

TnTc: Troponina T cardiaca.

URL: Unidades Relativas de Luz.

INTRODUCCIÓN

La estimación del tiempo de muerte o intervalo *post mortem* (IPM) es una parte integral de las investigaciones médicas y legales ¹. El IPM se define como “el tiempo que ha transcurrido desde la muerte hasta que se realiza la autopsia” ².

Aunque la estimación exacta del IPM puede determinarse raramente sólo con base en los hallazgos de la autopsia, las técnicas modernas permiten deducir un intervalo apropiado por medio de una interpretación de varios cambios físicos, metabólicos, autolíticos, fisicoquímicos y bioquímicos, los cuales toman lugar después de la muerte y son dependientes de los factores endógenos y ambientales ^{2,3,4}.

Los métodos bioquímicos se han propuesto como alternativa durante los últimos 60 años¹. En ellos, se han estudiado muestras provenientes de diferentes partes del cuerpo tales como: sangre, humor vítreo, fluido cerebroespinal, tejido cardiaco, hígado, músculo esquelético, páncreas, cerebro, fluido sinovial, entre otras ^{4,5}. La muestra se elige con base en el método y el marcador que se requiere analizar, los cuales pueden ser: potasio, sodio, cloro, glucosa, calcio ², magnesio, fosfato, ácido láctico, hipoxantina, urea, creatinina, ácido úrico, catecolaminas, etanol ⁵, troponina T cardiaca, troponina I cardiaca, actina, nebulina y otras proteínas ⁶, así como ARN ⁷.

Las metodologías químicas y bioquímicas empleadas para realizar la determinación del IPM dependen de las condiciones del sitio anatómico y el momento en el cual se recolecte la muestra, así como del método analítico que se utilice ⁹.

Actualmente, la mayoría de los resultados publicados para la determinación del IPM pueden dividirse en dos categorías principales: aquellos relacionadas con el intervalo *post mortem* temprano, periodo definido desde la muerte hasta el comienzo de la descomposición de los tejidos suaves; y por otra parte, los relacionados con un periodo tardío, el cual transcurre con la esqueletización y alteraciones de la matriz ósea ⁵.

La determinación del IPM además puede ayudar a distinguir una patología *ante mortem* a partir de un marcador *post mortem*⁵.

El objetivo de esta revisión bibliográfica es establecer cuáles son los métodos más precisos y hacer una comparación entre éstos y los utilizados actualmente.

La hipótesis de este trabajo es que la estimación del IPM se realiza con base en pocos biomarcadores, los cuales no proveen una estimación exacta de dicho intervalo. Esto es debido al costo elevado que implica realizar una serie de pruebas de diferentes biomarcadores, que en conjunto y con la consideración de factores ambientales y fisiológicos, permitirían realizar una interpretación que dé como resultado una estimación más exacta al tiempo real.

INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL TEMA

Proceso de muerte

Dentro del cuerpo en su estado normal, el corazón late, la sangre circula en todos los tejidos, y en los pulmones hay intercambio de dióxido de carbono por oxígeno. El oxígeno se usa para mantener el estado de energía celular en el cuerpo mediante el uso de moléculas, llamadas ATP (adenosintrifosfato). Cuando una molécula de ATP se utiliza, ésta pasa a un estado de menor energía llamada adenosindifosfato (ADP) el cual requiere de oxígeno para ser regenerado a ATP. El ATP es necesario para el transporte de componentes celulares y así mantener el *status quo* de las concentraciones celulares internas y externas de varios minerales, enzimas, aminoácidos, lípidos, y glucosa, entre otros. Sin ATP todas las funciones de las células del cuerpo fallan, causando la muerte celular ¹⁰.

Usualmente, se asume que la causa final de la muerte es la hipoxia de los tejidos, la cual llega a las células. Sin embargo, también puede causarse por la desnaturalización de proteínas (incluyendo enzimas), variaciones de pH en los tejidos, envenenamiento o inhibidores metabólicos. La muerte entonces, puede entenderse como una serie de eventos consecutivos, desde el deceso del paciente hasta el deterioro de la función de los órganos hacia el *rigor mortis*, bacteriemia, muerte de tejidos o colapso de la homeostasis en las células.

Desde el punto de vista clínico, las etapas de la muerte son:

1. Los agentes causantes de la muerte producen sus propios efectos, tales como hemorragia, explosión o daño a los tejidos. En esta etapa el sujeto se encuentra hiperactivo debido al estrés y al dolor.
2. Colapsan los sistemas que soportan la homeostasis en la respiración, la presión sanguínea, la temperatura y el sistema inmune.
3. Ocurren cambios químicos, tales como disrupción de las vías metabólicas, la desnaturalización de las proteínas, y la cesación de la biosíntesis ¹¹.



Generalidades

Los métodos para la determinación del IPM deben ser tan precisos y exactos como sea posible, pero sobre todo confiables. El principio fundamental de esta estimación es calcular el dato inicial de una relación dependiente del tiempo a partir de un conjunto de datos medibles. Estas mediciones están influenciadas por factores internos y externos, así como de condiciones *ante mortem* y *post mortem*. Es importante mencionar que la estimación del IPM no revela un punto en el tiempo sino un intervalo ¹².

Existen diferentes métodos para la determinación del IPM, entre los cuales se encuentran:

- **Métodos físicos**

Algor mortis: Se refiere al decremento gradual de la temperatura corporal después de la muerte. Es uno de los indicadores más útiles para la estimación del IPM durante las primeras 24 horas después de la muerte. En un humano vivo existe un balance entre la pérdida y la producción de calor. Sin embargo, después de la muerte, la producción de calor cesa y el cuerpo pierde calor cediéndolo al ambiente hasta llegar a un equilibrio con éste. El cambio de la temperatura en el cuerpo principalmente es un proceso físico, por lo cual la influencia de los procesos biológicos es relativamente baja. La tasa de cambio en la disminución de la temperatura respecto al tiempo se utiliza para determinar el IPM. Se usan diferentes partes del cuerpo para realizar las mediciones de la temperatura, tales como: la superficie de la piel abdominal, la axila, la oreja, la fosa nasal, y el recto, el cual es el más utilizado¹. Asimismo se han realizado estudios en el cerebro, el hígado¹² y el ojo¹³.

Para poder usar este método deben considerarse algunos factores como: vestimenta o algún recubrimiento, las corrientes de aire, el tipo de soporte donde se encuentre el cuerpo, condiciones de aislamiento, el peso del cuerpo y el uso de un nomograma. Por otra parte, los requerimientos para poder aplicar esta metodología son: que el cuerpo no se haya expuesto a radiaciones fuertes, ausencia de fiebre o

hipotermia, el lugar de muerte debe ser el mismo donde se encontró el cuerpo y finalmente, no debe haber alta conductividad térmica de la superficie debajo del cuerpo ¹².

Rigor mortis: Conocido comúnmente como rigor, es el endurecimiento *post mortem* de los músculos del cuerpo. Se origina por la escasez de oxígeno en las células, lo que resulta en niveles bajos de ATP en el cuerpo. El ATP es necesario en las células musculares para mantener el balance de diferentes moléculas. La falta de ATP causa la fuga de calcio en las células alrededor de las fibras musculares, esto permite que las fibras musculares que se unen por reticulación se contraigan en su posición presente. El cuerpo permanece en estado de contracción muscular en el que sucedió la muerte. El cuerpo puede asumir una posición de relajación hacia la gravedad o hacia el objeto sobre el cual esté descansando. La contracción se detecta, primeramente, en músculos pequeños de la cara o manos, posteriormente en músculos largos o amplios de los brazos y piernas, donde permanece por más tiempo. Eventualmente, el rigor pasa y los músculos se relajan de igual forma, primero en músculos pequeños y después en músculos grandes. Los factores que deben ser considerados son: la temperatura ambiente, la edad, las patologías, la presencia de infecciones, la cantidad de ropa que tenga el cuerpo, la masa muscular del cuerpo y el grado de actividad muscular inmediatamente antes de la muerte.

Los términos para describir este fenómeno físico son: rigor completo, el cual se observa entre las 6 y 12 horas después de la muerte; rigor que se rompe fácilmente, se aprecia en la fase *post mortem* temprana y después del pico del periodo de rigor completo y finalmente el rigor ausente, en la cual empieza la fase temprana de descomposición y el rigor desaparece ^{1,10}.

Livor mortis: conocido comúnmente como livor o hipostasis, se refiere a la sedimentación *post mortem* de la sangre en la porción del cuerpo dónde éste descansa, lo que da una decoloración a la piel de color púrpura oscuro. El proceso se inicia inmediatamente después de que se detiene la circulación. A medida que el corazón deja de bombear la sangre, los glóbulos rojos se hunden por acción de la gravedad porque la sangre permanece líquida en vez de coagular, en todo el



sistema vascular. La decoloración no se observa en las áreas del cuerpo que están en contacto con el suelo porque los capilares quedan comprimidos.

Después de 30 a 60 minutos *post mortem*, la sangre pierde la capacidad de coagular. Esto se debe a la liberación de fibrinolisin, especialmente de vasos pequeños y de superficies serosas tales como la pleura. El livor es independiente de la causa de muerte. Sin embargo, en algunos casos debido a infección, el efecto de las fibrolisinas no se observa; por otra parte, cuando la muerte es repentina, la sangre permanece espontáneamente coagulable sólo durante un periodo breve después de la muerte ¹.

El livor comienza a aparecer como parches de color rojo tenue después de 20 a 30 minutos *post mortem*, en las horas siguientes estos parches se unen para formar áreas grandes de coloración roja-púrpura. Posteriormente, alrededor de 10 a 12 horas, el livor se vuelve “fijo”. Luego de 12 horas, alcanza su máxima intensidad, aunque existen algunas variaciones de cuándo inicia y cuándo está bien desarrollada ¹.

- **Métodos biológicos**

Entomología forense: es la ciencia que aplica el conocimiento de los insectos y de otros artrópodos para los procedimientos civiles y juicios penales. En este último caso, el estudio de la fauna cadavérica es un método válido para establecer el tiempo de muerte y puede apoyar a los análisis histológicos y químicos para las investigaciones policíacas¹⁴. Se utiliza principalmente en casos de homicidio, suicidio, accidentes y muertes debidas a causas naturales que no se testificaron ¹⁵. El objetivo principal de la entomología forense es establecer el IPM de una forma más exacta al determinar cuánto tiempo tiene el cuerpo expuesto al ambiente.

La mayoría de la fauna invertebrada que se encuentra en los cuerpos son insectos, principalmente de los órdenes *Coleoptera* y *Diptera* (gusanos). Los insectos se sienten atraídos de forma selectiva de acuerdo con el estado de descomposición del cuerpo, y forman comunidades complejas conformadas por las especies necrófagas y sus depredadores, parásitos y parasitoides. Los cambios rápidos y continuos en el

micro-ecosistema carroñero no permiten un estado estable o de equilibrio entre las comunidades de animales hasta la descomposición. Existe así una serie de sucesiones en la fauna que permite estimar cuándo y dónde se produjo la muerte. La identificación de las especies, el conocimiento de su ciclo de vida, así como la duración de cada etapa en presencia de temperaturas variables y otros factores abióticos permiten establecer el IPM ¹⁴. Actualmente, la entomología forense se considera parte integral de las investigaciones cuando se debe estimar un IPM más allá de 3 días, tiempo para el cual este método es el más preciso ¹⁶.

- **Métodos bioquímicos**

La **bioquímica post mortem**, también conocida como tanatoquímica, se define como el estudio de los parámetros bioquímicos para describir los cambios que ocurren en la composición química de los fluidos biológicos después de la muerte, así como para resolver los problemas presentados en el diagnóstico ^{17,18}. Después de la muerte, los fluidos biológicos muestran cambios en su composición a través del tiempo, ya sea inmediatamente o lentamente. Estos cambios tienen su propio factor de tiempo o tasa de cambio y ocurren de una forma bastante ordenada hasta que el cuerpo se desintegra ¹.

Los factores que deben considerarse para hacer uso de la bioquímica para aproximar el IPM son: el tipo de muestra que se extrae, el método analítico y los metabolitos presentes.

- I. **El tipo de muestra que se extrae:**

Existe controversia respecto al lugar elegido para realizar el muestreo. Diversos estudios han demostrado diferencias significativas entre las muestras extraídas de las cavidades cardíacas derecha e izquierda o entre la sangre cardíaca (central) y la sangre de los vasos periféricos. Por lo tanto, es de gran importancia conocer exactamente el sitio del cual se ha extraído la muestra para poder realizar una interpretación correcta de los resultados ⁹.

Los sitios y fluidos biológicos más utilizados para realizar los ensayos bioquímicos son: sangre y humor vítreo. Sin embargo, se pueden emplear otro tipo de muestras

tales como: fluido sinovial ¹⁷, fluido cerebroespinal, fluido pericárdico ¹⁸, músculo esquelético, músculo cardiaco, corazón, riñón, cerebro, páncreas ⁵, pulpa dental ³, entre otras. A continuación se describen las características y consideraciones en los dos fluidos más empleados.

Sangre: La sangre es un fluido que normalmente consiste de 45% eritrocitos, 54% suero y 1% de leucocitos y plaquetas. El plasma sanguíneo se compone de proteínas y metabolitos, incluyendo aquellos que se fugan al torrente sanguíneo después de una lesión celular. Una ventaja clave de la sangre, desde la perspectiva tanatológica, es que es un biofluido notablemente uniforme y se ve ligeramente afectado por factores tales como: la edad, el sexo, la dieta, los ciclos diurnos y el estrés. Además, como se mencionó con anterioridad, sigue siendo fluida después de la muerte, por lo que es ideal para las determinaciones del IPM.

Las investigaciones respecto al uso de la sangre para la estimación del IPM, sugieren que ésta debe recolectarse sólo de la vena femoral, especialmente si se emplea para medir biomarcadores. La sangre de la vena femoral tiene cambios *post mortem* muy ligeros que se producen lentamente con el tiempo, a diferencia de la sangre del corazón, que puede dar grandes cambios rápidamente.

Después de la muerte, el pH de la sangre decrece de 7.35-7.45 a 5-5.5 y el hematocrito es la proporción de células rojas de la sangre y el volumen total de la misma incrementa de 40-45% a 47-78%; las diferencias en el hematocrito son principalmente debidas a la pérdida de plasma y a la caída del pH. Por otra parte, la sangre comienza a acidificarse debido a la acumulación de dióxido de carbono, ácido láctico y otras especies químicas formadas como resultado de la descomposición de los tejidos ⁵.

Humor vítreo: Es un fluido que se encuentra dentro del globo ocular del ojo, entre la retina y el cristalino. Esta sustancia no tiene células, es viscosa, incolora, normalmente limpia y se compone de agua (99%), glucosa, ácido hialurónico, fibras de colágeno (tipo II), sales inorgánicas y ácido ascórbico ¹⁹.

El humor vítreo es ideal para el análisis químico debido a que se encuentra relativamente aislado de la sangre y otros fluidos corporales que son afectados por



cambios *post mortem*, tales como la redistribución y hemoconcentración. También, este fluido es más resistente que otros tejidos a la putrefacción, cambios bioquímicos, degradación bacteriana y contaminación, aunque no es completamente resistente a esto. Aproximadamente, puede obtenerse 1 mL de cada ojo mediante la inserción del globo ocular con una aguja de calibre 18 o 20 unida a una jeringa de 10 mL. La inserción es mejor en el canto lateral, introduciendo el extremo de la aguja en el centro del globo. El humor vítreo debe retirarse lentamente. No deben utilizarse tubos de vacío (Vacutainer[®]) para extraerlo, ya que la retina puede dañarse y así se podrían aspirar otros fluidos o tejidos, los cuales, evidentemente interferirían en la cuantificación de los biomarcadores. Por otra parte, existe controversia en la determinación del IPM relacionada con los resultados obtenidos de las muestras que se extraen de diferente ojo del mismo individuo, del método que se utiliza para el análisis, el volumen de muestra, la temperatura ambiente y la edad^{19,20}. Todas estas variables relacionadas con el humor vítreo se discutirán a fondo posteriormente en este trabajo.

II. Método analítico

Se han encontrado diferencias de resultados debidas al método analítico, por lo que es necesario que cada analista forense realice las determinaciones bioquímicas siempre en el mismo laboratorio, bajo las mismas condiciones y tenga a éste de referencia⁹.

III. Biomarcadores

Un biomarcador es “una característica que se puede medir y evaluar de forma objetiva como indicador de un proceso biológico normal, patogénico o como respuesta farmacológica a una intervención terapéutica”²¹. Esta definición está dada en términos desde el punto de vista farmacológico y terapéutico. Sin embargo, con el fin de emplear este término en la ciencia forense, se define como biomarcador a la variación cuantificable de una especie química (un ion, una molécula o un compuesto), correspondiente un proceso biológico que ocurre después de la muerte.

Algunos biomarcadores muestran estabilidad después de la muerte, mientras otros manifiestan cambios respecto a sus niveles o a su degradación en los diferentes

fluidos y sitios anatómicos. Con fines de investigación forense, A. Donaldson e I. Lamont ⁵, clasifican a los biomarcadores como: metabolitos y proteínas. A continuación se mencionan algunos biomarcadores, los cuales se han estudiado para conocer su utilidad respecto a la determinación del IPM.

- **Metabolitos**

Actualmente se cuenta con una amplia búsqueda e investigación sobre los biomarcadores a partir de los cuales se pueda realizar la estimación del IPM. En la práctica forense sólo unos cuantos se utilizan, tales como: el potasio y el sodio ²². Sin embargo, otros biomarcadores requieren de más investigación para poder emplearlos en la determinación del IPM, por ejemplo, el fosfato orgánico ⁵, y algunos metales, que por ser indispensables para la vida, podrían servir como biomarcadores, tales como zinc, hierro y cobre ²³.

Sodio y cloruro: Las concentraciones séricas de estos electrolitos decrecen durante las primeras 3 a 52 horas con un promedio de 1 mmol/L por hora. Sus concentraciones séricas también pueden variar en un periodo *ante mortem* debido al estado de hidratación, la función renal y casos de enfermedad. Se realiza la cuantificación tanto en humor vítreo como en suero ⁵. Aunque estos electrolitos exhiben un comportamiento similar, posteriormente en este trabajo se presenta que el ion sodio muestra una mayor confiabilidad que el ion cloruro.

Potasio: Los niveles de este biomarcador incrementan después de la muerte debido a que es liberado de las células. Se ha observado un incremento rápido dentro de las primeras 6 a 12 horas después de la muerte y después muestra un comportamiento lineal después de las 24 horas. Se mide en humor vítreo. Algunos estudios indican que la concentración *post mortem* de potasio en humor vítreo aumenta de forma más rápida en niños que en adultos ⁵.

Calcio: Se han reportado concentraciones variables de este ion entre las 2 y las 36 horas *post mortem* tanto en suero como en plasma ⁵. Por lo que no es un biomarcador que se pueda utilizar para la estimación del IPM.

Magnesio: Se ha indicado que los valores séricos de magnesio no aumentan

sustancialmente durante la etapa *post mortem* temprana si la integridad celular se mantiene, pero cuando ocurre hemólisis las concentraciones aumentan rápidamente de 10 a 15 mmol/L ⁵. Por otra parte, varios estudios han demostrado que existe un ligero incremento *post mortem*, respecto al tiempo, en los niveles de magnesio en humor vítreo, por lo que la utilidad de este biomarcador para estimar el IPM no se ha comprobado ⁹.

Fosfato: Se ha observado un incremento en la sangre para el fosfato orgánico e inorgánico. En el caso del fosfato inorgánico se ha registrado una concentración *ante mortem* de 0.6 a 0.9 mmol/L e incrementa dentro de la primera hora *post mortem* para alcanzar concentraciones de 6.6 mmol/L, después de 18 horas de la muerte. Por otra parte, *ante mortem*, el fosfato orgánico no se encuentra normalmente en el torrente sanguíneo. Aunque, debido a la descomposición *post mortem* del cuerpo posiblemente se podría detectar, por lo que éste podría ser un biomarcador adecuado para la estimación del IPM. Sin embargo, se requiere de investigaciones respecto a este biomarcador ⁵.

Ácido láctico: Es la forma más simple de ácido hidroxicarboxílico. Existe en dos estereoisómeros: D- y L-lactato. Las concentraciones normales de lactato son de 0.5 a 2.2 mmol/L y casi todo está considerado como L-lactato, ya que el D-lactato está presente en concentraciones nanomolares. El L-lactato se produce en pequeñas cantidades en la vía glucólisis en el músculo esquelético, hígado y células rojas de la sangre. El D-lactato se produce en pequeñas cantidades mediante la descomposición de aminoácidos y el catabolismo de la hidroxiacetona fosfato. Se han estudiado en sangre de corazón humano las concentraciones de lactato sérico *post mortem* observando que éste incrementa 20 veces dentro de la primera hora después de la muerte y aumenta hasta 50 a 70 veces más respecto a los niveles *ante mortem* después de 24 horas. Se examina en fluido cerebroespinal, humor vítreo y el cerebro ⁵.

Hipoxantina: Es un intermediario en la vía catabólica de las purinas. En presencia de oxígeno se oxida por la xantina oxidasa a ácido úrico, el producto final del metabolismo de las purinas en humanos. Durante la hipoxia de los tejidos, después

de la muerte se hallan concentraciones elevadas de hipoxantina en el plasma, fluido cerebroespinal y orina ⁵. La hipoxantina difunde por gradiente de concentración, principalmente de la retina al centro del humor vítreo ²⁴, esto representa una ventaja para su cuantificación en humor vítreo, y por lo tanto, para determinar el IPM.

Urea: Es un compuesto muy estable y sus niveles séricos *post mortem* se aproximan a los niveles séricos *ante mortem* incluso después de una descomposición moderada, esto independientemente de la metodología que se use, el nivel en que se encuentre y también del IPM. Razón por la cual no es un biomarcador útil para la estimación del IPM ²⁵.

Creatinina: Es un metabolito del fosfato de creatina, el cual se produce a partir de creatina y ATP por la creatincinasa. El fosfato de creatina se almacena en el tejido muscular como una fuente de energía, y después de donar su grupo fosfato al ADP, se convierte en creatinina, ésta es transportada a los riñones por medio de la sangre y posteriormente se excreta en la orina ²⁶. La creatinina es muy estable en la sangre del cadáver. Sin embargo, en la mayoría de las investigaciones que se han realizado, se ha encontrado que los niveles de creatinina *post mortem* eran independientes del IPM ⁹. Por tal motivo, es un biomarcador útil para diagnosticar desórdenes en la función renal y en el músculo, pero no para la determinación del IPM.

Ácido úrico: Es una sustancia que debido a las grandes modificaciones *post mortem* que sufre, no posee utilidad médico legal ⁹.

Amoniaco: Se forma en casi todos los tejidos y órganos por el catabolismo de los aminoácidos. En el periodo *ante mortem*, el amoniaco se elimina rápidamente y se desplaza al hígado, donde se convierte en urea y sólo deja trazas en el torrente sanguíneo (5.87-11.74 $\mu\text{mol/L}$). Durante la descomposición de un cuerpo, el amoniaco producido de la degradación de aminoácidos y tejidos se acumula con el tiempo, ya que no se elimina del hígado. Sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre este biomarcador, por lo que se debe trabajar para hallar la correlación entre el amoniaco y el IPM ⁵.

Catecolaminas: Se ha investigado el uso de catecolaminas en relación con el IPM y



se ha observado que las concentraciones de adrenalina y noradrenalina incrementan con el tiempo. Sin embargo, el uso de catecolaminas para determinar el IPM no se considera confiable debido a la liberación inmediata de adrenalina y noradrenalina de las glándulas adrenales al torrente sanguíneo durante situaciones de estrés, tales como el periodo de agonía ⁵.

Etanol: Se produce de manera natural en cantidades traza dentro del cuerpo debido a la fermentación de carbohidratos que se lleva a cabo por la acción de los microorganismos y levaduras en el yeyuno y el colon mayor. Sin embargo, la concentración endógena de etanol que llega a la sangre venosa periférica es muy baja (<0.1-0.2 mg/100 mL). Asimismo, en las primeras horas *post mortem*, las bacterias intestinales penetran el sistema venoso portal y después de aproximadamente seis horas se contaminan los vasos sistémicos, donde utilizan la glucosa y el lactato para la producción de etanol ⁵ con lo que se llegan a producir hasta 100mg/100mL de alcohol en casos de descomposición¹⁹. Por otra parte, el consumo excesivo de etanol se define como el consumo de 4 a 5 bebidas durante dos horas para alcanzar una concentración de 80mg/100mL o más de alcohol en sangre ²⁷. De tal manera, que no se puede distinguir entre el etanol ingerido en vida y el producido por acción microbiana después de la muerte, por lo que no se puede utilizar como biomarcador para determinar el IPM ⁵.

- **Proteínas**

Proteínas totales: La cantidad de proteínas totales en la sangre se ha considerado como un marcador para estimar el IPM. Sin embargo, se encontró que los niveles de proteína son variables y no son diferentes de forma estadísticamente significativa a los valores *ante mortem* ⁵.

Otras proteínas: En este trabajo se hace referencia a otras proteínas tales como: troponina T cardíaca, troponina I cardíaca, actina, nebulina, entre otras ⁶, de las cuales posteriormente se hará mención.

A continuación se presentan los biomarcadores y los hallazgos de esta revisión bibliográfica, los cuales se muestran con base en la clasificación de Donaldson y colaboradores ⁵.



Biomarcadores

- **Metabolitos**

I. Potasio

Es el biomarcador que se utiliza con mayor frecuencia para la determinación del IPM, por lo que se han realizado diferentes estudios sobre su utilidad y las variables que afectan en la cuantificación, entre las que se encuentra la temperatura y la edad, cuya influencia se discute más adelante.

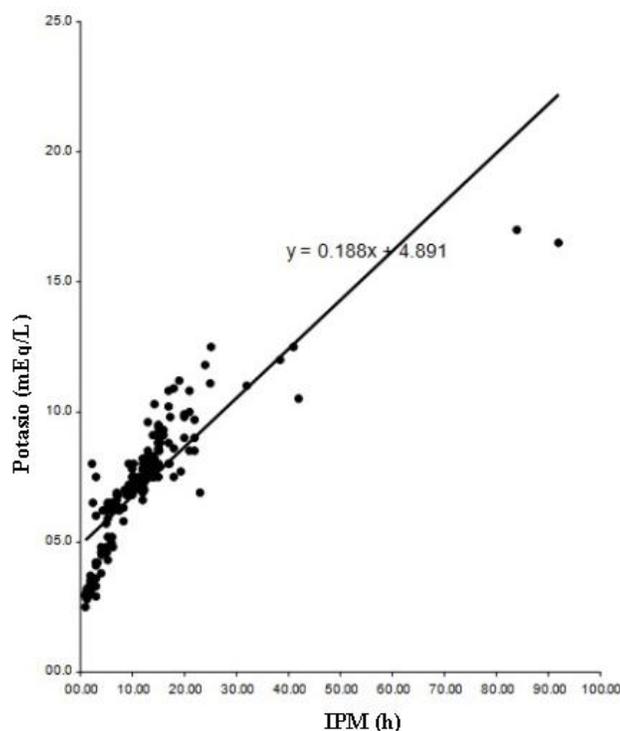
Diferentes estudios han observado la correlación que existe entre la variación de los niveles de potasio y el IPM, entre éstos se encuentran los realizados por Tumram ²⁸, Ahi ²⁹ y Singh ³⁰ y colaboradores, respectivamente. A continuación se muestra la **Tabla 1**, la cual contiene de forma resumida algunas características de estas investigaciones: la muestra y la metodología que utilizaron para la cuantificación de potasio, así como las observaciones que realizaron de en cada caso sobre el efecto de los factores temperatura y humedad.

Tabla 1. Resumen de tres estudios relacionados con la utilidad de potasio en la determinación del IPM.

Autor	Muestra que utilizaron	Metodología	Observaciones
Tumram ²⁸	Humor vítreo.	Electrodo selectivo de iones.	Efecto de la temperatura.
Ahi ²⁹	Humor vítreo.	Fotometría de flama.	Efecto de la temperatura y la humedad.
Singh ³⁰	Sangre.	Fotometría de flama.	Efecto de la temperatura.

En los tres estudios se observó que la concentración de potasio aumenta conforme incrementa el IPM (**Gráfica 1**), Ahí y colaboradores ²⁹, consideran que el aumento en

la concentración de potasio se debe a la autólisis de la coroides y de las células de la retina del ojo. Este comportamiento ha sido estudiado por varios autores estableciendo ecuaciones que describen dicho fenómeno (**Tabla 3**). En el estudio de Tumram y colaboradores ²⁸, se indica que el coeficiente de correlación ($r = 0.526$) que encontraron entre los niveles de potasio y el IPM es bajo comparado con otras investigaciones, las cuales se mencionan más adelante.



Gráfica 1. Diagrama de dispersión. Muestra la correlación entre el intervalo *post mortem* y la concentración de potasio en humor vítreo. Traducido de Ahí y colaboradores ²⁹.

Por otra parte, Singh y colaboradores ³⁰, observaron que la concentración sérica de potasio incrementó con una media de 13.95 ± 4.77 mEq/L en las primeras 3 a 6 h a 38.14 ± 6.89 mEq/L en un IPM de 48 a 58 h, además de que el incremento fue más rápido en las primeras 36 horas después de la muerte. Asimismo, la velocidad en el aumento de la concentración de potasio en verano (de abril a septiembre, $T_{promedio} =$

38.1 °C) fue de 1.09 mEq/h y de 0.92mEq/h en invierno (de octubre a marzo, $T_{\text{promedio}} = 14.1$ °C), es decir, hubo un incremento mayor en los niveles de potasio a mayor temperatura ambiente, por lo que ésta es un factor que tiene influencia en la determinación del IPM. Por el contrario, Ahi y colaboradores ²⁹, encontraron que la temperatura ambiente en un rango de 21 a 35 °C, no presentó influencia significativa en la cuantificación de los niveles de potasio. Aunque, es importante mencionar que no hay estudios en un rango de temperatura amplio que permita determinar de forma clara, las tendencias que se observan a diferentes temperaturas.

Tumram y colaboradores ²⁸, sugieren que las concentraciones de potasio presentan un aumento respecto al incremento del IPM debido a que después de la muerte, el mecanismo de transporte de este ion se inactiva y la membrana celular se vuelve semipermeable, así, al ser más altas las concentraciones intracelulares que las concentraciones extracelulares, el potasio se libera del medio intracelular y de este modo se mantienen los niveles de potasio en aumento. Además, los niveles de este ion se pueden afectar por cambios *post mortem*, tales como redistribución y hemoconcentración. Respecto a la metodología, mencionan que con un electrodo selectivo de iones se disminuyen los errores que se cometen al utilizar fotometría de flama.

Efecto de la temperatura en combinación con la edad.

Zilg y colaboradores ³¹, estudiaron el efecto de la temperatura ambiente y la edad en un rango de 0 a 95 años y con intervalos *post mortem* que excedían las 100 h. La muestra se conformó por un “*pool*” del humor vítreo de ambos ojos y se analizó con un electrodo selectivo de iones. Por otra parte, el ensayo se aprovechó para evaluar las diferencias entre resultados que se obtuvieron para una misma muestra en diferentes laboratorios con la misma metodología.

Se observó que no hubo una relación lineal entre la concentración de potasio y el IPM, por lo que se prosiguió a establecer una ecuación que considerara el efecto de

la temperatura ambiente (**Gráfica 2**) y la edad (**Gráfica 3**), para así poder observar su efecto en la estimación del IPM. De esta forma se obtuvo la siguiente ecuación:

$$IPM = \frac{\ln((M - C_0)/(M - [K^+]))}{L_0 + m_A A + m_T T}$$

Donde:

M (concentración estable de potasio) = 34.44 mmol/L.

C₀ (concentración de potasio al momento de la muerte) = 4.4 mmol/L.

L₀ (término de cruzamiento a través de la membrana) = 0.135 x 10⁻³/día.

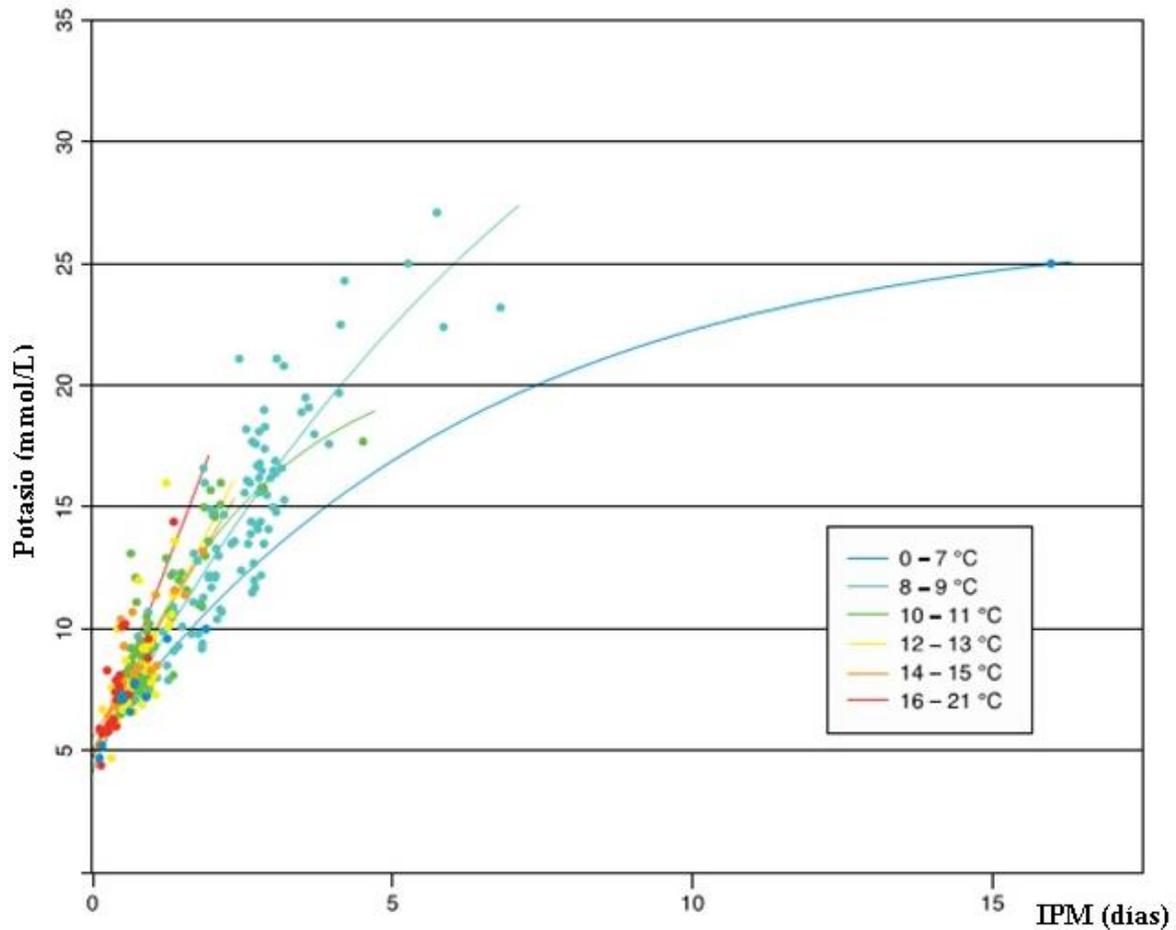
m_A (coeficiente de edad) = - 0.00112 x 10⁻³/día x año.

m_T (coeficiente de temperatura) = 0.00985 x 10⁻³/día x °C.

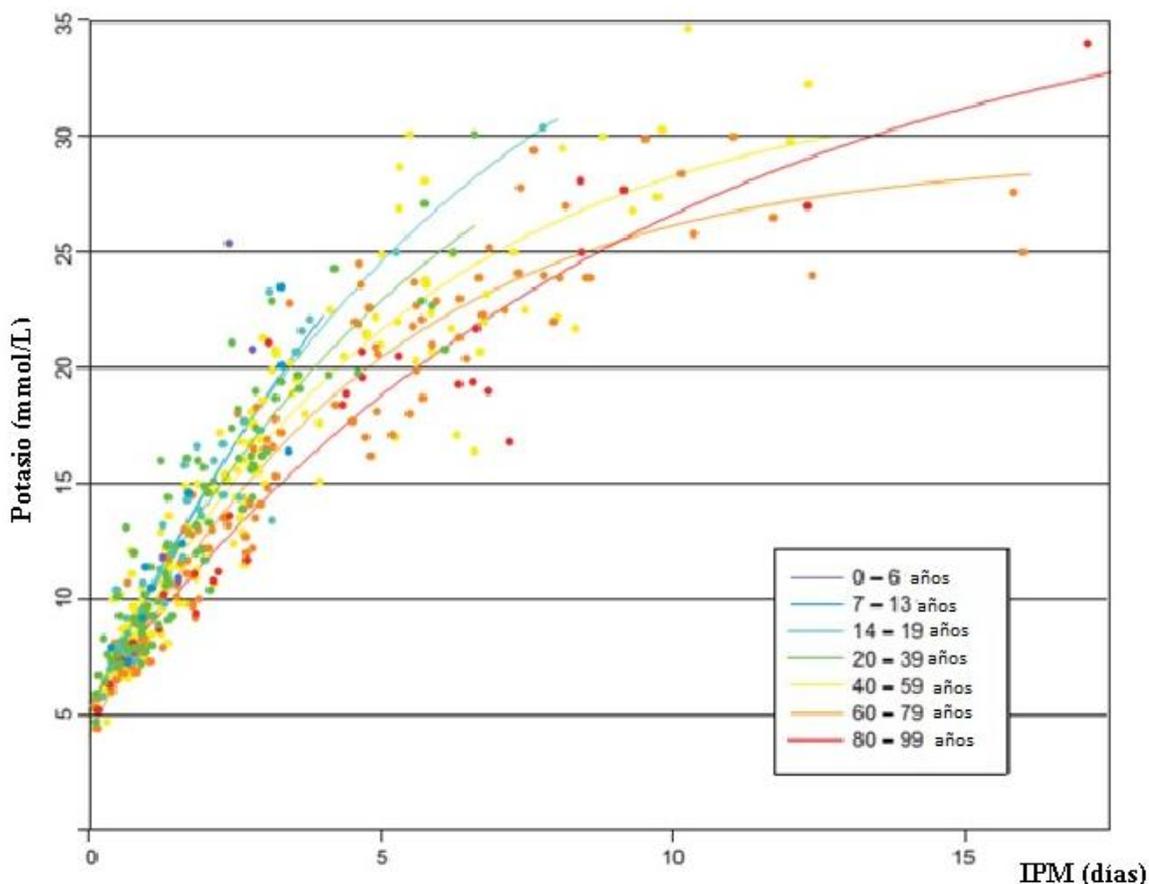
A = edad expresada en años.

T = Temperatura expresada en °C.

Respecto a la influencia de la temperatura ambiente se observó que favorece el incremento de los niveles de potasio. La **Gráfica 2**, muestra que a mayor temperatura, la pendiente inicial del aumento en la concentración de potasio respecto al tiempo es mayor. Por otra parte, en la **Gráfica 3** se muestra la influencia de la edad, mientras más joven era el difunto la pendiente es mayor.



Gráfica 2. La influencia de la temperatura en el incremento de los niveles potasio en humor vítreo *post mortem*. Los diferentes colores representan las diferentes temperaturas ambiente reportadas en 272 casos. Traducido de Zilg y colaboradores³¹.



Gráfica 3. La influencia de la edad en el incremento de los niveles de potasio en humor vítreo *post mortem*. Los diferentes colores representan los diferentes grupos de edad en los 462 casos. Traducido de Zilg y colaboradores ³¹.

Uno de los hallazgos más importantes de este estudio es que la edad del fallecido afecta de forma significativa en el incremento de las concentraciones de potasio: de tal manera que en un sujeto joven se observa dicho aumento a una mayor velocidad (**Gráfica 3**).

Así, al incluir los factores edad y temperatura en la ecuación, observaron una mejor correlación entre el IPM y la concentración de potasio. Por lo que se mejoró la exactitud de estimación del IPM y el valor de la correlación fue de $r = 0.93$. Así, Zilg y colaboradores ³¹ presentaron un modelo que permite una mayor precisión y confiabilidad en la determinación del IPM, incluso en intervalos mayores a cinco días *post mortem* y en todos los grupos de edad, desde la infancia hasta la vejez.

Por otra parte, es importante mencionar que Zilg y colaboradores ³¹, realizaron un estudio con un gran número de casos (462) y además con intervalos *post mortem* mayores a 17 días. En la mayoría de los casos, los cuerpos se mantuvieron en almacenamiento a bajas temperaturas. Sin embargo, si el cuerpo se expone de manera constante a temperatura ambiente por más de una semana, las muestras de humor vítreo no se pueden obtener debido a cambios *post mortem*.

Los hallazgos encontrados con respecto a la edad, aunque es poco probable, pueden deberse a la difusión de iones, ya que durante la niñez, el humor vítreo consiste en mayor proporción a un gel y en menor cantidad a un líquido. Sin embargo, con la edad, la porción líquida incrementa hasta constituir más del 50% del volumen del humor vítreo a la edad de 90 años, por lo que la difusión del potasio es mayor en un medio líquido que un gel, de tal forma que se concentra más en este último. Por otra parte, es posible que los cambios en las células de la corteza vítrea y las de la adhesión a la retina jueguen un papel más importante respecto a la concentración de los iones. Otra posible explicación a que se encuentre una concentración de potasio en sujetos jóvenes implica la pérdida significativa de células de la retina con la edad y una consecuente disminución en el espesor de la retina.

Comparación de resultados que se obtienen al tomar la muestra de humor vítreo del ojo derecho o izquierdo.

Uno de los factores que se ha sugerido como posible influencia sobre las determinaciones de la concentración de potasio en humor vítreo es el ojo del cual se extrae la muestra de humor vítreo.

Con el fin de analizar la influencia de dicho factor, Mulla ³² y Chandrakanth ² y colaboradores, respectivamente, cuantificaron las concentraciones de potasio en humor vítreo con un electrodo selectivo de iones, en el primer caso se utilizaron muestras de 48 autopsias (con un rango del IPM de 4.5 a 84.3 horas) y en el

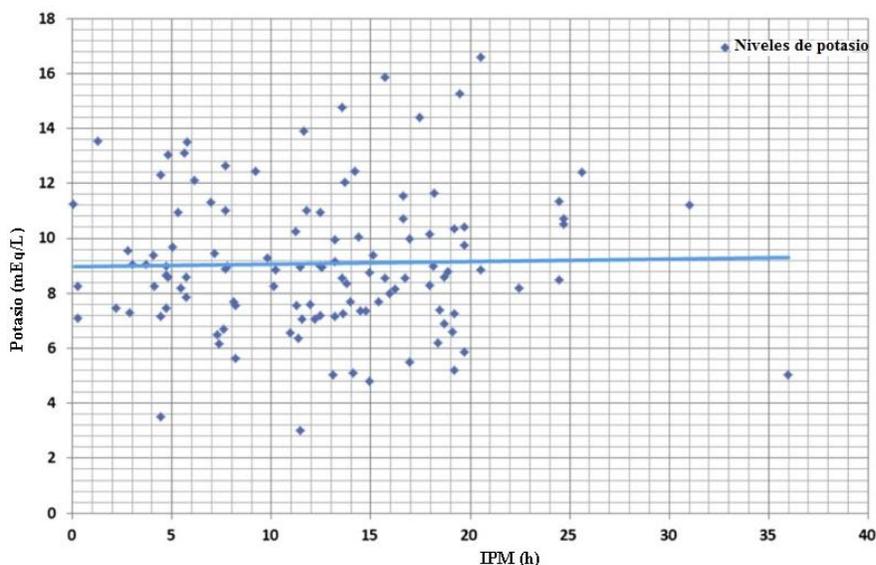
segundo se analizaron muestras de 114 autopsias (con un rango del IPM de 0.08 a 36 horas).

Los resultados de estos estudios sugirieron que las diferencias de las concentraciones en el mismo par de ojos con un IPM idéntico, no son significativas. Sin embargo, Mulla y colaboradores ³², observaron que los niveles de potasio presentaron una correlación significativa con el IPM, tanto para las concentraciones individuales de cada ojo como para el promedio de las concentraciones de ambos ojos. Así, las correlaciones lineales entre el IPM y los niveles de potasio vítreo fueron: $r = 0.733$, en el ojo derecho; $r = 0.727$, en el ojo izquierdo; y del promedio de las concentraciones, $r = 0.739$. El resumen de resultados se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Parámetros estadísticos de las concentraciones de potasio y las diferencias observadas entre el mismo par de ojos para muestras de humor vítreo. Tomado de Mulla y colaboradores ³².

Concentración de potasio			Diferencias entre un ojo y otro		
Rango (mmol/L)	Promedio (mmol/L)	Desviación estándar	Rango (mmol/L)	Promedio (mmol/L)	Desviación estándar
6.2 - 19.0	11.25	3.47	0 - 3.9	0.49	0.77

Por otra parte, Chandrakanth y colaboradores ², observaron los niveles de potasio en un rango de 3.0 a 16.60 mEq/L y que las concentraciones fueron más altas en el ojo derecho. Pero en contraste a los hallazgos de Mulla y colaboradores ³², no encontraron correlación entre el intervalo *post mortem* y la concentración de potasio, tal como se observa en la **Gráfica 4** por lo que indicaron que el papel que juega la concentración potasio en dicha determinación es limitado.



Gráfica 4. Diagrama de dispersión para los niveles de potasio y el intervalo post mortem. Traducido de Chandrakanth y colaboradores ².

Estudios en fluidos diferentes

Aunque la muestra que más se utiliza para la cuantificación de potasio es humor vítreo, existen otros fluidos en los cuales también se han realizado estudios, tales como fluido sinovial y fluido cerebrospinal.

Por una parte, Siddhamsetty ³³ y Tumram ¹⁷ y colaboradores, respectivamente, examinaron líquido sinovial. En el primer caso se cuantificó la concentración de potasio en 210 muestras con un IPM de 0 a 170 h y en el segundo caso, se analizaron 308 casos con un IPM de 1.45 a 35.18 h. En ambos estudios se utilizó un electrodo selectivo de iones. En los resultados de ambos estudios se observó el incremento de los niveles de potasio respecto al IPM, comportamiento que se describió en cada caso por una ecuación (**Tabla 3**). Asimismo, hubo una correlación mayor de los datos en el estudio que realizaron Siddhamsetty y colaboradores ³³ ($r = 0.84$) que en el estudio de Tumram y colaboradores ¹⁷ ($r = 0.74$).

Por otra parte, Swain y colaboradores ⁴, cuantificaron las concentraciones de potasio en fluido cerebrospinal y en humor vítreo con el fin de comparar la precisión de la

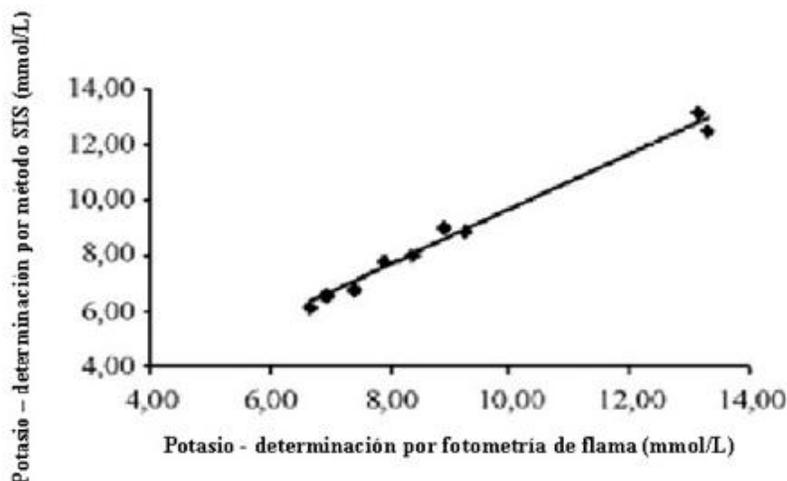
determinación del IPM que se obtiene del análisis de cada fluido. Cuantificaron los niveles de potasio de 100 casos, en los cuales el IPM fue de 4.5 a 78.5 h. Ambas muestras se analizaron con un electrodo selectivo de iones. Observaron que las concentraciones de potasio en humor vítreo y fluido cerebroespinal aumentan después de la muerte. Sin embargo, para ambos fluidos existieron diferencias significativas entre los coeficientes de correlación con el incremento del IPM, de modo que en humor vítreo se presentó una correlación mayor ($r = 0.62$) que en fluido cerebroespinal ($r = 0.37$). Por lo tanto, la determinación en humor vítreo resultó ser más confiable. Asimismo, Swain y colaboradores ⁴, describen al humor vítreo como un fluido más estable que el cerebroespinal, debido a que está topográficamente aislado y bien protegido, de tal forma que el proceso de autólisis que ocurre después de la muerte ocurre a una velocidad menor en humor vítreo en comparación con el fluido cerebroespinal.

Metodología analítica para la determinación de la concentración de potasio en humor vítreo y sus variables involucradas.

a. Método analítico

Como se ha mencionado con anterioridad, la metodología analítica más empleada para la determinación de la concentración de potasio es el uso del electrodo selectivo de iones, sin embargo, Passos y colaboradores ²⁴, propusieron un sistema de inyecciones secuenciales (SIS) para la determinación de potasio e hipoxantina a partir de la misma muestra de humor vítreo. La determinación de potasio se realizó por mediciones de potencial y el número de determinaciones fue de 60 por hora. Con el fin de evaluar la exactitud de los resultados obtenidos por el SIS, las muestras se analizaron por un segundo método, el cual fue fotometría de flama (FF).

Observaron que las concentraciones de potasio incrementaron respecto al tiempo, aunque no de manera lineal. Además, con los resultados establecieron una relación entre las concentraciones de potasio que obtuvieron de las dos metodologías que se utilizaron (**Gráfica 5**).



Gráfica 5. Correlación entre las concentraciones que se obtuvieron por metodología del sistema de inyecciones secuenciales y su comparación con el método de fotometría de flama para la determinación de potasio. Traducido de Passos y colaboradores ²⁴.

La ecuación que describe la **Gráfica 5** es: $C_{SIS} = (1.001 \pm 0.092) C_{FF} - (0.35 \pm 0.84)$.

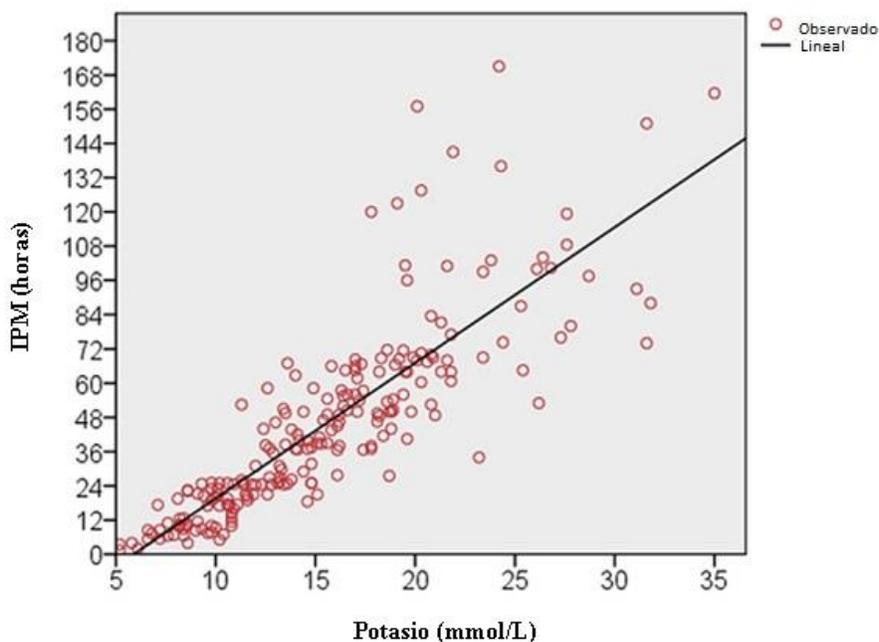
Con un intervalo de confianza de 95% se afirmó que no se observaron diferencias significativamente estadísticas entre las metodologías que se emplearon para la determinación. Asimismo, con la metodología del SIS los resultados que se obtienen son igualmente confiables que los que se obtienen por otras metodologías, con la ventaja adicional de poder analizar un número grande de muestras. Por lo que este SIS es una buena alternativa para la determinación del IPM.

b. Consideración de cambio de variable dependiente e independiente para realizar las predicciones.

Una forma de aumentar la exactitud de la determinación del IPM es invertir las variables de la función, es decir, considerar los niveles de potasio como variable independiente y el IPM como variable dependiente. Para estudiar este cambio de variables, Siddhamsetty ³³ y Madea ³⁴ y colaboradores, respectivamente,

cuantificaron las concentraciones de potasio con un electrodo selectivo de iones, en el primer caso se examinaron 210 casos (36 mujeres y 174 hombres) y en el segundo caso se analizaron casos reportados en la literatura por Muñoz y colaboradores ³⁵, así como casos independientes. Sin embargo, las muestras que analizaron Siddhamsetty y colaboradores ³³, fueron de líquido sinovial y las que utilizaron Madea y colaboradores ³⁴ fueron de humor vítreo.

En ambos casos se observó una correlación positiva, es decir, que el intervalo *post mortem* incrementa conforme incrementa la concentración de potasio, tal como se observa en la **Gráfica 6**.



Gráfica 6. Distribución de los niveles de potasio en líquido sinovial en relación con el tiempo de muerte. Traducido de Siddhamsetty y colaboradores ³³.

El estudio de Madea y colaboradores ³⁴, en el cual los casos tenían un IPM hasta de 133 h, se observó un aumento en la exactitud de ± 25.96 a ± 23.27 h, respecto a la regresión lineal donde se colocó al IPM como variable independiente. Se observaron

los mismos resultados para el grupo de datos de Muñoz y colaboradores³⁵, donde la exactitud aumentó de ± 8.56 a ± 7.15 h. Sin embargo, en este último caso el IPM no fue mayor de 29 h.

Por otra parte, Madea y colaboradores³⁴ también realizaron una re-evaluación estadística de seis estudios en el incremento de potasio vítreo, en el cual se usa un análisis de regresión conocido como “procedimiento de Loes”, y que ha revelado tener una exactitud en la estimación del IPM de ± 1 h en el periodo temprano *post mortem* y de ± 10 h, después de 110 h *post mortem*. Sin embargo, de 492 casos que se estudiaron, 153 presentaron un IPM dentro del rango predicho para la concentración de potasio. Por lo que con este tratamiento de los datos no se observó una mejora para la estimación del IPM.

c. Influencia del volumen de muestra y comportamiento de las concentraciones de potasio a través del tiempo en la misma muestra de humor vítreo.

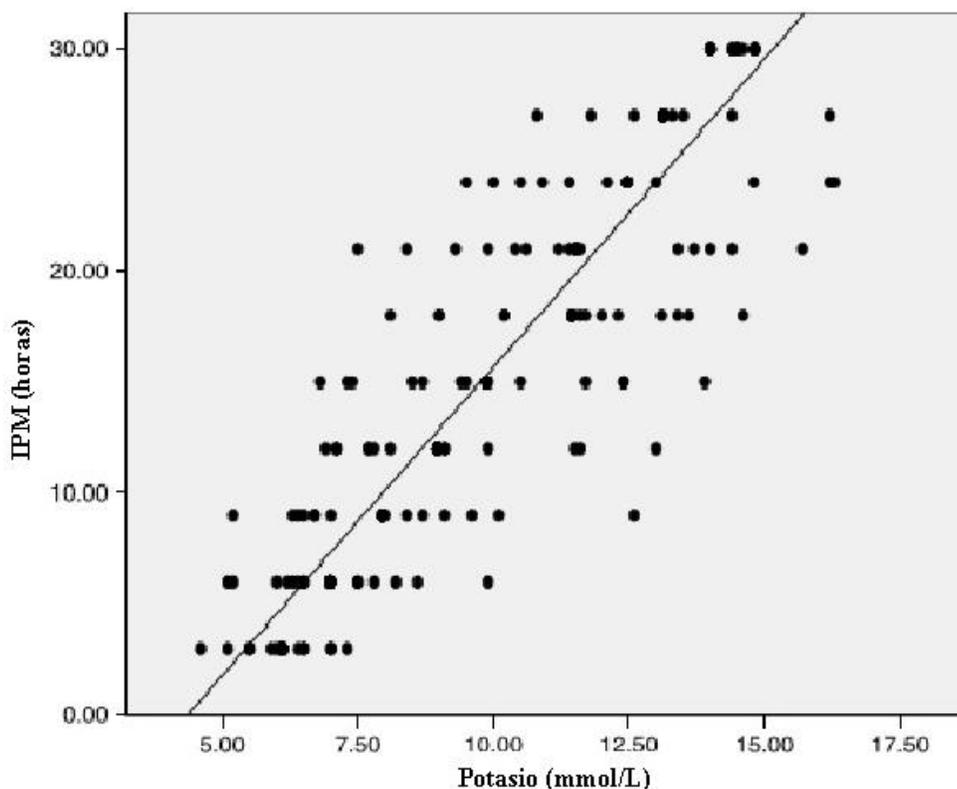
Mihailovic y colaboradores³⁶, estudiaron el posible beneficio de la extracción repetitiva de muestras de humor vítreo de cada cadáver, con el fin de observar si de esta forma se podía reflejar el proceso natural del aumento de la concentración de potasio a mayor detalle y así establecer una correlación más exacta.

Analizaron 320 muestras de humor vítreo provenientes de 32 casos de autopsia con un rango de edad entre 18 a 65 años de edad. Las muestras se tomaron y analizaron en intervalos *post mortem* cada 3 horas hasta las 30 horas después de la muerte, extrajeron 0.1 mL de humor vítreo. Se determinó la concentración de potasio con un electrodo selectivo de iones.

Los resultados mostraron una correlación estadísticamente significativa entre la concentración de potasio y el IPM. En la **Gráfica 7** se aprecian los resultados que se obtuvieron, cuya pendiente de la línea de regresión fue 0.36 mmol/L por hora y el coeficiente de correlación fue de 0.923. Sin embargo, es importante mencionar que

dicha pendiente es ligeramente más alta en las primeras 6 horas que en las últimas 6 horas (0.39 mmol/L por hora y 0.37 mmol/L por hora, respectivamente), lo cual se puede atribuir a la alto gradiente de difusión que ocurre durante la descomposición de la bomba de sodio-potasio. Asimismo, estos resultados indican que la extracción repetitiva de volúmenes pequeños de humor vítreo no afecta a la determinación de la concentración de potasio en las últimas extracciones.

Una de las limitaciones que presentan otros estudios respecto a éste, es que están limitados por el muestreo, ya que en la mayoría de los casos se extrae todo el humor vítreo en una muestra de diferentes cadáveres, lo que hace que las muestras no sean homogéneas. En cambio, en este estudio se trató de minimizar la influencia de diferentes niveles *ante mortem* de potasio así como de otras diferencias interindividuales.



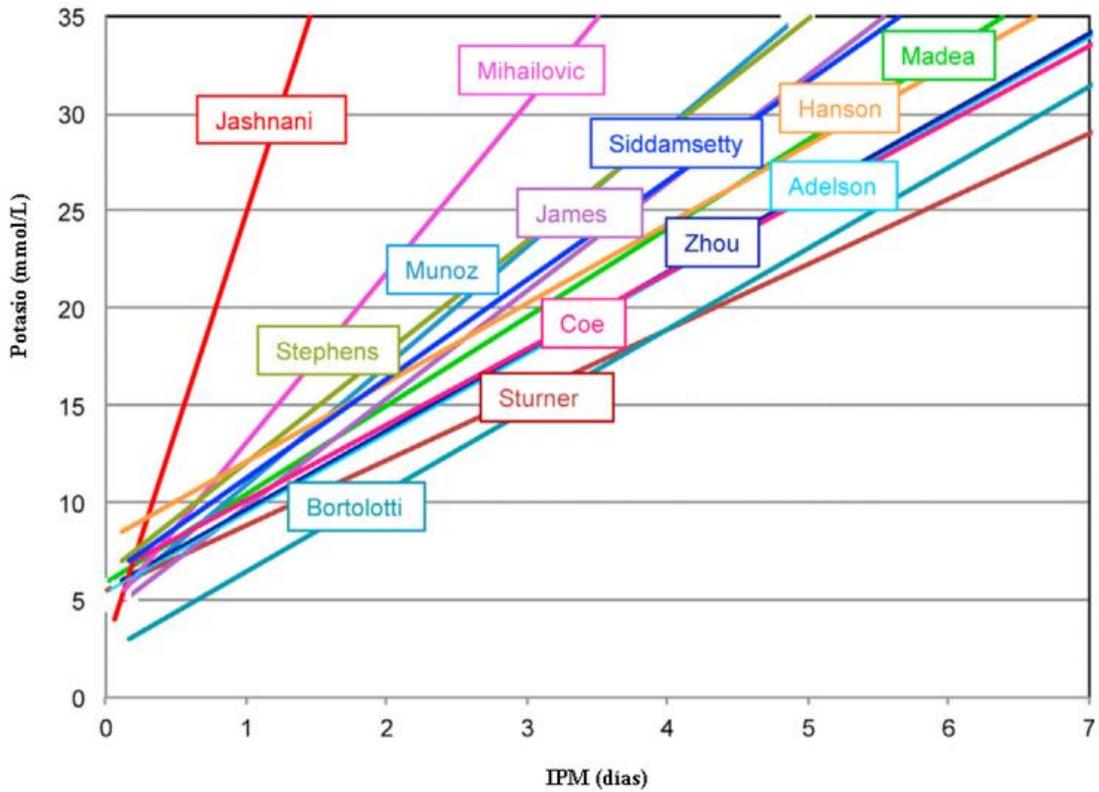
Gráfica 7. Relación lineal. Traducido de Mihailovic y colaboradores ³⁶.

d. Ecuaciones propuestas por diferentes autores para el cálculo del IPM a partir de las concentraciones de potasio en humor vítreo.

Debido a que la cuantificación de potasio es la determinación que más se utiliza para la estimación del IPM, este biomarcador se presenta en diferentes estudios y por lo tanto, en diferentes modelos matemáticos. Algunos autores que han realizado una recopilación de las diferentes ecuaciones son Tumram ²⁸ y Zilg ³¹ y colaboradores, respectivamente.

Por un lado, Tumram y colaboradores ²⁸, establecieron una ecuación para la estimación del IPM y también calcularon el IPM con sus datos experimentales en ecuaciones establecidas por otros autores. De modo que observaron similitudes respecto al intercepto y la pendiente. Por otra parte, Zilg y colaboradores ³¹, realizaron un estudio donde analizaron las concentraciones de potasio vítreo y además, retomaron algunas representaciones gráficas (**Gráfica 8**).

En la **Tabla 3**, se muestran las ecuaciones que describen estas regresiones lineales, en la cual además se anexan las ecuaciones propuestas por otros autores. Asimismo, esta tabla permite observar las variables que existen en los distintos estudios, tales como: diferentes valores en la pendiente y el intercepto; número de muestras analizadas; intervalo de tiempo en el que se trabajó; el establecimiento de la variable dependiente e independiente; el fluido que se analizó; los criterios de inclusión y exclusión; consideración de otros factores como temperatura y edad; etcétera. Además de las variables que no se describen, por ejemplo: la temperatura a la cual se tomó la muestra, la temperatura en la que se mantuvo almacenado al cadáver, la metodología que se empleó para la cuantificación de potasio, el tratamiento de la muestra, entre otros, que en conjunto, estos factores y variables hacen que en cada estudio se describa un comportamiento diferente de los niveles de potasio.



Gráfica 8. Regresiones lineales para calcular en IPM en estudios diferentes. Traducido de Zilg y colaboradores ³¹.

Tabla 3. Ecuaciones publicadas para la estimación del IPM a partir de las concentraciones de potasio en humor vítreo. Traducido y completado de Zilg y colaboradores ³¹.

Autor (año)	Ecuación (h)	n	IPM máximo (h)	Comentarios
Adelson (1963) ³⁷	$IPM = 5.88 [K^+] - 31.53$	209	21	-
Sturner (1964) ³⁸	$IPM = 7.14 [K^+] - 39.1$	125	104	-
Hansson (1966) ³⁹	$IPM = 5.88 [K^+] - 47.1$	203	310	-
Coë (1969) ⁴⁰	$IPM = 6.15 [K^+] - 38.1$	145	100	Se estableció una ecuación adicional para IPM < 6h.
Stephens (1987) ⁴¹	$IPM = 4.20 [K^+] - 26.65$	1427	35	Se excluyeron casos de ahogamiento, síndrome de muerte infantil repentina, desequilibrios electrolíticos y temperaturas extremas.
Madea (1989) ⁴²	$IPM = 5.26 [K^+] - 30.9$	107	130	Se excluyeron casos con urea elevada y un periodo prolongado de agonía.
James (1997) ⁴³	$IPM = 4.32 [K^+] - 18.35$	100	80	También se incluyó hipoxantina
Muñoz (2001) ³⁵	$IPM = 3.92 [K^+] - 19.04$	133	40	Sólo se analizaron casos no hospitalarios, hubo cambio en las variables
Zhou (2007) ⁴⁴	$IPM = 5.88 [K^+] - 32.71$	62	27	-
Jashnani (2010) ²²	$IPM = 1.076 [K^+] - 2.81$	120	50	Principalmente se incluyeron casos relacionados con sepsis o tuberculosis
Bortolotti (2011) ⁴⁵	$IPM = 5.77 [K^+] - 13.28$	164	110	-
Mihailovic (2012) ³⁶	$IPM = 2.749 [K^+] - 11.98$	32	30	Muestreo repetitivo.
Siddamsetty (2014) ⁴⁶	$IPM = 4.701 [K^+] - 29.06$	210	170	-
Zilg (2015) ³¹	$IPM = \frac{\ln((M - C_0)/(M - [K^+]))}{L_0 + m_A A + m_T T}$	462	409	No se excluyeron casos. La ecuación que se propuso incluye los factores temperatura y edad del fallecido.
Singh (2002) ³⁰	$\log IPM = 0.96 \log [K^+] - 614$	474	58	Casos de muertes por trauma, quemaduras y envenenamiento

n: número de muestras.



Tabla 3. (Continuación).

Autor (año)	Ecuación (h)	n	IPM máximo (h)	Comentarios
Passos (2009) ²⁴	$IPM = 5.36 [K^+] - 33.41$	-	-	-
Ahí (2011) ²⁹	$IPM = 5.319 [K^+] - 25.75$	176	91	-
Salam (2012) ⁴⁷	$IPM = 1.38 [K^+] + 9.05$	70	60	-
Siddhamsetty (2014) ³³	$IPM = 4.75 [K^+] - 27.92$	210	170	El estudio se realizó en un clima semi-árido
Tumram (2014) ²⁸	$IPM = 2.71 [K^+] - 20.19$	308	35	Se excluyeron casos con desordenes metabólicos.
Tumram (2014) ¹⁷	$IPM = 2.83 [K^+] - 15.41$	308	35	Se excluyeron casos con desordenes metabólicos.
Swain (2015) ⁴	$IPM = 2.88 [K^+] - 11.86$	100	79	Estudio comparativo entre fluidos. Ecuación para humor vítreo.
Swain (2015) ⁴	$IPM = 0.82 [K^+] + 8.49$	100	79	Estudio comparativo entre fluidos. Ecuación para líquido cerebroespinal.

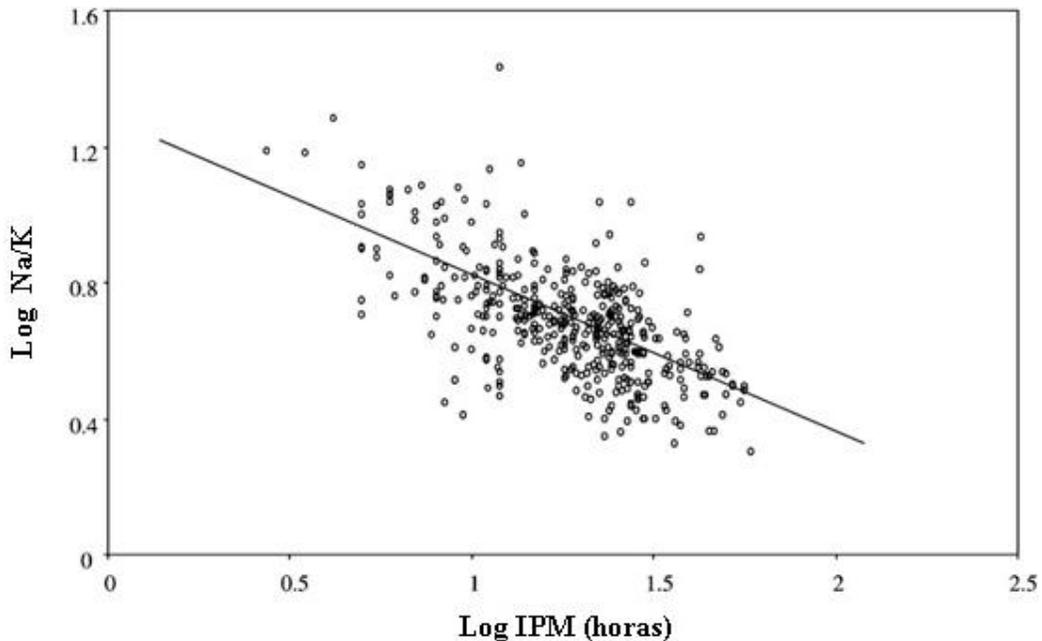
n: número de muestras.

Ecuaciones que consideran además de potasio otros compuestos, iones y factores físicos.

Con el fin de mejorar la precisión en la estimación del IPM, diferentes autores han realizado estudios en los cuales se plantean modelos matemáticos que además de considerar la concentración de potasio como variable, propusieron la integración de otras moléculas y iones: hipoxantina y sodio; así como factores físicos: la rigidez, la hipostasis y la turbidez de la cornea.

Diferentes investigadores han evaluado el comportamiento que tienen los niveles de potasio y sodio respecto al IPM. Con este enfoque Singh y colaboradores ³⁰, realizaron un estudio con sangre de la arteria femoral derecha; Chandrakanth y colaboradores ², trabajaron muestras de humor vítreo y Siddhamsetty y colaboradores ³³, cuantificaron los niveles sodio y potasio en líquido sinovial. Las metodologías utilizadas fueron: electrodo selectivo de iones, para los primeros dos casos y fotometría de flama, en el tercer estudio.

Por una parte, Singh ³⁰ y Chandrakanth ² y colaboradores, respectivamente, estudiaron la variación en la proporción de las concentraciones de sodio/potasio como marcador para estimar el intervalo *post mortem*. Singh y colaboradores ³⁰ observaron que dicha proporción disminuyó rápidamente en las primeras 12 h de muerte en promedio de 10.59 ± 3.96 a 6.81 ± 3.27 y continuó el decremento lentamente hasta alcanzar un valor de 2.95 ± 0.13 cuando el IPM fue de 48 a 58 h, esta correlación se observa en la **Grafica 9** y la ecuación que describe el comportamiento de la proporción se presenta en la **Tabla 4**.



Gráfica 9. Relación logarítmica doble entre el intervalo *post mortem* y la proporción de los electrolitos sodio y potasio en sangre. Hay una diferencia significativa la cual expresa que un cambio ligero en IPM tiene mayor impacto en la proporción de sodio/potasio. Traducido de Singh y colaboradores ³⁰.

Por otra parte, Chandrakanth y colaboradores ², observaron que la proporción sodio/potasio fue más alta en el ojo izquierdo, pero las diferencias entre el ojo izquierdo y el ojo derecho no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, a diferencia de Singh y colaboradores ³⁰, no observaron correlación entre el IPM y la proporción sodio/potasio.

Asimismo, Siddhamsetty y colaboradores ³³, establecieron una ecuación donde consideran las concentraciones de potasio y sodio como factores independientes (**Tabla 4**), el coeficiente de correlación fue de 0.71. A pesar de que en su estudio al considerar sólo la concentración de potasio se obtenía un coeficiente de correlación de 0.84, observaron que la precisión de la determinación del IPM fue mayor con la

ecuación que considera las concentraciones de sodio y potasio, en muertes con un IPM menor a 72 h.

Por otra parte, Salam y colaboradores ⁴⁷, cuantificaron la concentración de potasio muestras de humor vítreo del ojo derecho por un método turbidimétrico y establecieron una ecuación (**Tabla 3**). Sin embargo, dicha ecuación presentó un coeficiente de correlación de 0.61, por lo que prosiguieron a establecer un modelo matemático que considerara los niveles de hipoxantina así como los factores físicos: rigidez (*rigor mortis*), hipostasis (*livor mortis*) y turbidez de la cornea. A los cuales, para poder estimar el IPM, se les asignó un valor numérico según las descripciones que se muestran en la **Tabla 5**. De esta forma, establecieron la ecuación que se muestra en la **Tabla 4**, la cual considera cinco variables con su correspondiente coeficiente. De este modo, el coeficiente de correlación aumentó a 0.88.

Salam y colaboradores ⁴⁷, observaron una tendencia, en la cual al aumentar el número de variables en el análisis de regresión incrementa la precisión de la estimación y tiene la ventaja de no necesitar instrumentos especiales para su evaluación. Pero, para poder utilizar las variables físicas, el IPM debe ser menor a 60 h y por otra parte, existe una variación mayor debido a que las puntuaciones son subjetivas.

Tabla 4. Ecuaciones publicadas para la estimación del IPM a partir de una combinación de las concentraciones de potasio con otras moléculas e iones, así como factores físicos.

Autor (año)	Ecuación (h)	n	IPM máximo (h)	Comentarios
Singh (2002) ³⁰	$\log \text{IPM} = 1.76 - 0.72 \log \left(\frac{[\text{Na}^+]}{[\text{K}^+]} \right)$	474	58	Casos de muertes por trauma, quemaduras y envenenamiento.
Siddhamsetty (2014) ³³	$\text{IPM} = 4.70 [\text{K}^+] - 0.16 [\text{Na}^+] - 4.36$	210	170	El estudio se realizó en un clima semi-árido
Salam (2012) ⁴⁷	$\text{IPM} = 0.98 [\text{K}^+] + 0.01 [\text{Hx}] + 9.18$	70	60	Se excluyeron casos con daño en el cráneo, en los ojos y sujetos con enfermedades crónicas.
Salam (2012) ⁴⁷	$\text{IPM} = 0.67 [\text{K}^+] + 0.003 [\text{Hx}] - 0.19$ (rigidez) + 4.91 (hipostasis) + 4.68 (turbidez de la cornea) - 13.62	70	60	

n: número de muestras. Hx: Hipoxantina.

Tabla 5. Puntuaciones para el desarrollo de tres cambios *post mortem* (rigidez, hipostasis y turbidez de la cornea). Traducido de Salam y colaboradores⁴⁷.

Valor numérico	Rigidez	Hipostasis	Turbidez de la cornea
1	Antes de su aparición	Antes de su aparición	Sin turbidez
2	Desarrollo parcial	Fácil de remover por presión del pulgar	Turbidez ligera
3	Desarrollo completo	Difícil de remover por presión del pulgar	Turbidez media
4	Desvanecimiento parcial	No se puede remover por presión del pulgar	Turbidez fuerte
5	Desvanecimiento parcial	-	-



II. Sodio

Después del potasio, el ion sodio es el más estudiado para conocer su utilidad en la estimación del intervalo *post mortem*.

Siddhamsetty ³³ y Singh ³⁰ y colaboradores, respectivamente, cuantificaron los niveles de sodio en sangre y fluido sinovial, respectivamente. En el primer caso utilizaron un electrodo selectivo de iones y en el segundo caso, fotometría de flama.

De forma general, en los dos estudios se encontró una correlación negativa entre las concentraciones de sodio y el IPM, es decir, los niveles de sodio disminuyen conforme aumenta el IPM. Por un lado, Siddhamsetty y colaboradores ³³, cuantificaron al sodio en un rango de 104 a 186 mmol/L. Por otro lado, Singh y colaboradores ³⁰ observaron el decremento en promedio de 132.58 ± 4.23 a 109.91 ± 4.35 mEq/L en un periodo de 3 a 58 h con una velocidad media de 0.8 mEq/L por h con el punto más alto en las primeras 3 a 6 h después de la muerte (1.86 mEq/h). Además, estudiaron la tasa de cambio de las concentraciones de sodio en diferentes épocas del año de modo que en verano la velocidad de la disminución fue de 0.82 mEq/L por h, mientras que en invierno fue de y 0.78 mEq/L por h.

En ambos casos, establecieron ecuaciones, que describieran la disminución de los niveles de sodio, las cuales se presentan en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Ecuaciones publicadas para la estimación del IPM a partir de las concentraciones de sodio.

Autor (año)	Ecuación (h)	n	IPM máximo (h)	Coefficiente de correlación (r)
Singh (2002) ³⁰	$\log \text{IPM} = -0.50 \log [\text{Na}^+] + 2.31$	474	58	0.52
Siddhamsetty (2014) ³³	$\text{IPM} = -0.38 [\text{Na}^+] + 101.50$	210	170	-0.18
Siddhamsetty (2014) ³³	$\text{IPM} = 0.02 [\text{Na}^+]^2 - 5.06 [\text{Na}^+] + 433$	210	170	0.23

n: número de muestras.

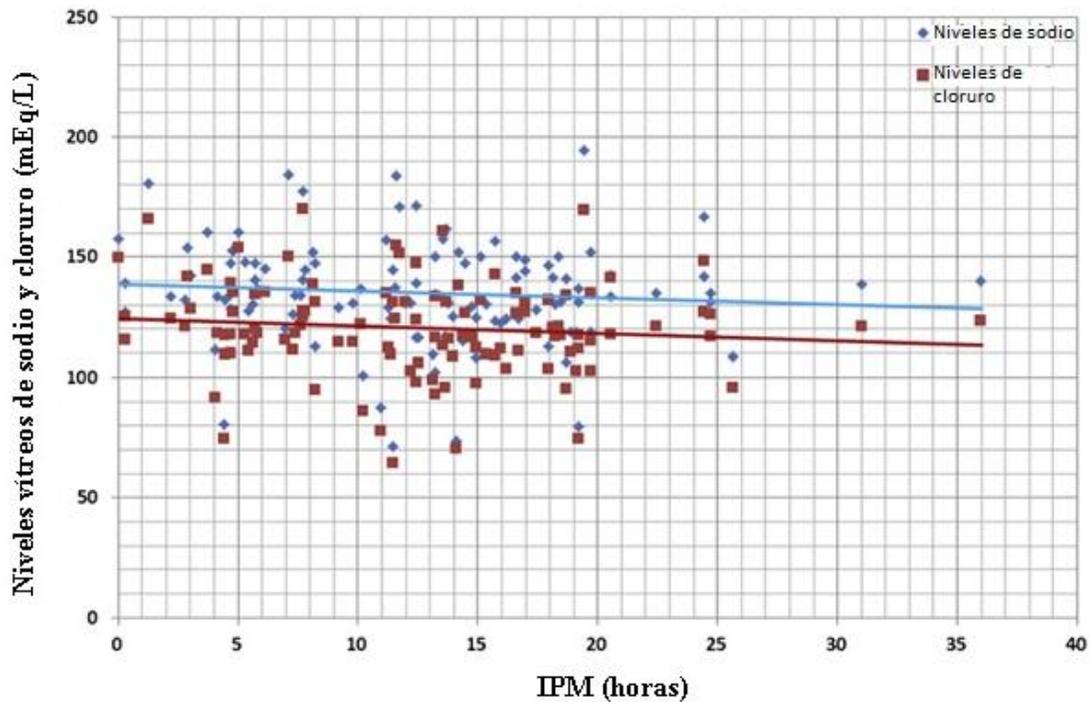
Sin embargo, las ecuaciones que se plantearon presentaron coeficientes de correlación bajos, por lo que no se considera a esta determinación como un buen parámetro para la estimación de IPM.

Comparación de resultados que se obtienen al tomar la muestra de humor vítreo del ojo derecho o izquierdo.

Chandrakanth ² y Mulla ³² y colaboradores, respectivamente, cuantificaron los niveles de sodio en humor vítreo. En el primer caso se analizaron 114 casos con un IPM entre 0.08 a 36 h y en el segundo caso, se estudiaron 48 casos con un IPM de 4.5 a 84.3 h. Ambas cuantificaciones se realizaron con un electrodo selectivo de iones.

Por una parte, Chandrakanth y colaboradores ², encontraron las concentraciones de sodio en un rango de 71.50 a 194.5 mEq/L y mostraron una ligera disminución con el incremento del IPM, el cual se observa en la **Gráfica 10**. Los niveles fueron más altos en el ojo izquierdo. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Por otra parte, Mulla y colaboradores ³², observaron las concentraciones de sodio en un rango de 0 a 54 mmol/L (promedio, 4.2 mmol/L) y que aproximadamente 13% de los sujetos mostraron diferencias mayores del 20% respecto al valor promedio en las concentraciones de sodio en ambos ojos. Sin embargo, en este estudio como en el de Chandrakanth y colaboradores ², no encontraron una correlación significativa con el IPM.



Gráfica 10. Diagrama para los niveles de sodio y cloruro y el intervalo *post mortem*. Traducido de Chandrakanth y colaboradores ².

Comparación de resultados que se obtienen al tomar la muestra de diferentes fluidos.

Swain y colaboradores ⁴, evaluaron las diferencias entre las concentraciones de sodio en fluido cerebroespinal y humor vítreo en 100 casos con un IPM máximo de 79 h. Realizaron la cuantificación con un electrodo selectivo de iones y encontraron que las concentraciones de este ion no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre un fluido y otro. Aunque, la correlación con el IPM, fue mayor en fluido cerebroespinal ($r = -0.34$) que en humor vítreo ($r = -0.27$). Sin embargo, éstas no son confiables para la determinación del IPM.

III. Cloro

El cloro es otro ion que se ha estudiado para la determinación el IPM. Entre los autores que han evaluado su relación con el IPM se encuentran Siddhamsetty y colaboradores ³³, quienes cuantificaron los niveles del ion cloruro en muestras de líquido sinovial. Para lo cual, utilizaron una metodología basada en una reacción con el ion tiocianato.

Las concentraciones de cloruro se encontraron en un rango de 39 a 213 mmol/L (promedio, 105.02 mmol/L). Sin embargo, el coeficiente de correlación fue de 0.082 y no se halló una relación significativa entre los niveles de cloruro y en el IPM.

Comparación de resultados que se obtienen al tomar la muestra de humor vítreo del ojo derecho o izquierdo.

Chandrakanth ² y Mulla ³² y colaboradores, respectivamente, evaluaron las diferencias de las concentraciones de cloruro que se encuentran en el humor vítreo del ojo izquierdo y del ojo derecho. En ambos estudios se empleó un electrodo selectivo de iones para la cuantificación.

Por un lado, Chandrakanth y colaboradores ² encontraron las concentraciones de ion cloruro en un rango de 64.5 a 170.0 mEq/L con una ligera disminución en estos niveles conforme el IPM incrementó (**Gráfica 10**). Asimismo, las concentraciones de cloruro fueron más altas en el ojo izquierdo que en el ojo derecho. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Por otro lado, Mulla y colaboradores ³², encontraron los niveles de cloruro en un rango de 88 a 133 mmol/L (promedio, 112.2 mmol/L), con una diferencia de concentraciones entre un ojo y otro de 0 a 54 mmol/L, aproximadamente 8% de los sujetos mostraron diferencias mayores del 20% respecto al valor promedio en las concentraciones de cloruro en ambos ojos.

En ambos estudios, se encontró un coeficiente de correlación bajo. Por lo que este ion no es confiable para realizar la estimación del IPM.

IV. Calcio

Otro de los iones que ha sido estudiado para estimar su utilidad en la determinación del IPM es el calcio. Siddhamsetty y colaboradores³³, cuantificaron los niveles de calcio en líquido fluido sinovial con una metodología basada en la formación de un complejo entre el calcio y la O-cresolftaleína.

Las concentraciones de calcio que encontraron fueron de 1.8 a 12.0 mg/dL. Sin embargo, el coeficiente de correlación fue de 0.010 y no se observó una relación estadísticamente significativa entre los niveles de calcio y el IPM.

Comparación de resultados que se obtienen al tomar la muestra de humor vítreo del ojo derecho o izquierdo.

Mulla y colaboradores³², evaluaron las diferencias de los niveles de calcio que se encuentran en el humor vítreo del ojo izquierdo y del ojo derecho. Para ello, cuantificaron las concentraciones de calcio con un electrodo selectivo de iones. Encontraron un rango de concentraciones de 1.65 a 3.07 mmol/L (promedio, 2.03 mmol/L). Las diferencias de los niveles entre un ojo y otro fueron de 0 a 0.91 mmol/L y aproximadamente en 16% de los sujetos exhibieron diferencias mayores al 20% de los valores promedio de las concentraciones de calcio. Estos niveles que hallaron en el ojo izquierdo y el ojo derecho presentaron un coeficiente de correlación de 0.49. Sin embargo, respecto al IPM, no observaron una correlación estadísticamente significativa.

Comparación de resultados que se obtienen al tomar la muestra de diferentes fluidos.

Swain y colaboradores ⁴, determinaron los niveles de calcio en humor vítreo y fluido cerebroespinal. Cuantificaron las concentraciones de calcio con una metodología basada en la formación de un complejo con arsenazo. Las concentraciones promedio que encontraron en humor vítreo y fluido cerebroespinal fueron 5.9 ± 1.4 mmol/L y 6.2 ± 1.0 mmol/L, respectivamente. No obstante, en ambos fluidos no se presentó una correlación entre los niveles de calcio y el IPM.

V. Glucosa

Existen pocos estudios sobre la utilidad de la glucosa para la estimación del IPM. Entre ellos, se encuentran los realizados por Siddhamsetty y colaboradores ³³, que analizaron muestras de líquido sinovial y Swain y colaboradores ⁴, quienes además de investigar su utilidad en la estimación del IPM, realizaron un estudio comparativo entre humor vítreo y fluido cerebroespinal. La cuantificación en ambos estudios se realizó por medio de reacciones enzimáticas.

Siddhamsetty y colaboradores ³³, encontraron las concentraciones de glucosa en un rango de 0 a 69 mg/dL (por promedio, 4.16 mg/dL), que a su vez presentaron una correlación negativa con el IPM. Por otra parte, Swain y colaboradores ⁴, también observaron una correlación negativa entre las concentraciones promedio de glucosa y el IPM. Sin embargo hubo una mayor correlación en humor vítreo que en fluido cerebroespinal. En ambos estudios se establecieron ecuaciones que describen su comportamiento respecto al IPM (**Tabla 7**). Sin embargo, los coeficientes de correlación son bajos. Por lo que la utilización de este biomarcador con estos resultados se ve limitada.

Tabla 7. Ecuaciones publicadas para la estimación del IPM a partir de las concentraciones de glucosa.

Autor (año)	Ecuación (h)	Coefficiente de correlación (r)	n	IPM máximo (h)	Comentarios
Siddhamsetty (2014) ³³	$IPM = -1.63 [Glu] + 52.57$	- 0.43	210	170	El estudio se realizó en un clima semi-árido.
Swain (2015) ⁴	$IPM = -1.27 [Glu] + 37.18$	- 0.63	100	79	Ecuación para humor vítreo.
Swain (2015) ⁴	$IPM = -0.23 [Glu] + 25.51$	- 0.35	100	79	Ecuación para fluido cerebroespinal.

n: número de muestra. Glu: glucosa

VI. Hipoxantina

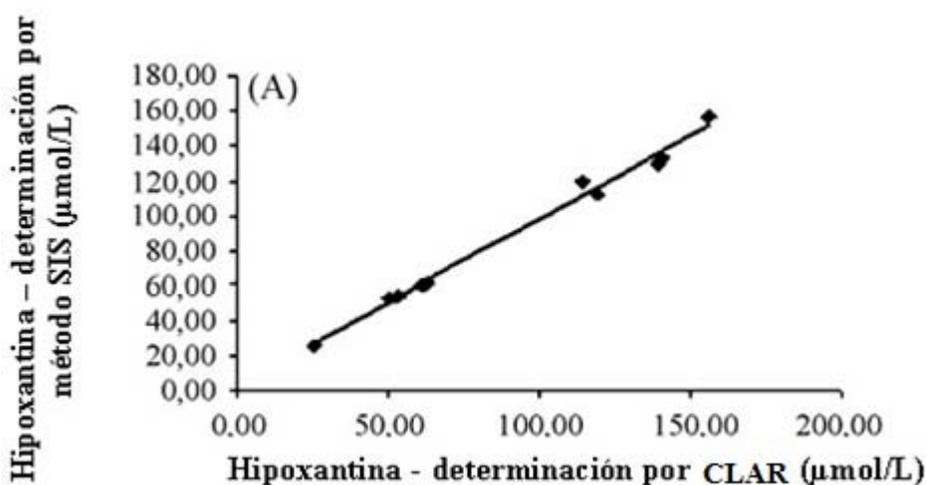
La hipoxantina es uno de los biomarcadores que más se han estudiado para la determinación de IPM, diferentes investigaciones reportan que es útil para dicha determinación. Entre ellos, se encuentran Salam ⁴⁷ y Madea ³⁴ y colaboradores, respectivamente, quienes cuantificaron los niveles de hipoxantina en humor vítreo, en el primer caso, realizaron las determinaciones por CLAR y en el segundo caso, utilizaron un ensayo enzimático de xantina oxidasa.

En ambos estudios encontraron un aumento de las concentraciones de hipoxantina con el incremento del IPM. Por un lado, Salam y colaboradores ⁴⁷, hallaron un rango de concentraciones de 60 a 680 $\mu\text{mol/L}$ (promedio, $269 \pm 140 \mu\text{mol/L}$), las cuales aumentaron en una relación de 4.55 $\mu\text{mol/L}$ por h. Por otro lado, Madea y colaboradores ³⁴, además observaron que la exactitud de la determinación mejoró al realizar un cambio de variables, el cual consistió en considerar los niveles de hipoxantina como variable dependiente y el IPM como variable independiente, de modo que la exactitud aumentó de ± 23.41 a ± 19.88 h. Sin embargo, sólo Salam y colaboradores ⁴⁷, presentaron la ecuación que describe el comportamiento que encontraron en las concentraciones de hipoxantina (**Tabla 8**).

Implementación de una metodología innovadora basada en un Sistema de Inyecciones Secuenciales.

Passos y colaboradores ²⁴, propusieron un sistema de inyecciones secuenciales (SIS) para la determinación de hipoxantina a partir de muestras de humor vítreo. La metodología que emplearon para medir los niveles de hipoxantina fue espectrofotometría, estas mediciones se basaron en la cuantificación del ácido úrico producido durante la oxidación de hipoxantina por la enzima xantina oxidasa y el número de determinaciones que se realizaron por el SIS fue de 15 por hora. Con el fin de evaluar la exactitud de los resultados obtenidos por el SIS, las muestras se analizaron por un segundo método, el cual fue CLAR.

Con los resultados que obtuvieron establecieron una relación entre las metodologías que utilizaron. La ecuación que describe la **Gráfica 11** es: $C_{SIS} = (0.951 \pm 0.078) C_{CLAR} - (2.9 \pm 7.9)$. Con un intervalo de confianza de 95% se afirmó que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las metodologías que se emplearon para la determinación de hipoxantina.

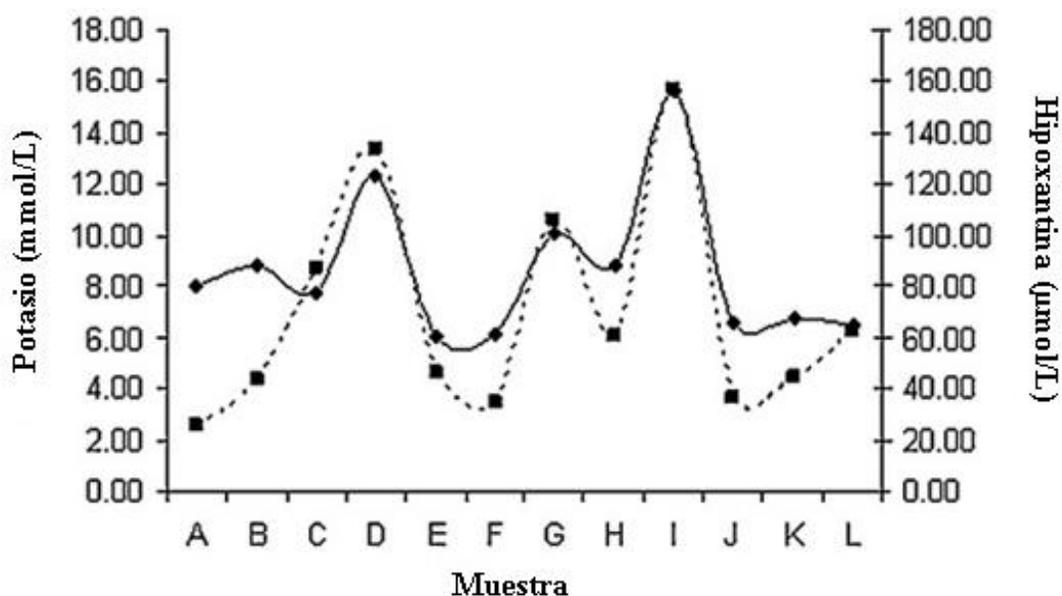


Gráfica 11. Correlación entre el método SIS y su comparación con el método de CLAR para la determinación de hipoxantina. Traducido de Passos y colaboradores ²⁴.

Observaron que las concentraciones de hipoxantina, incrementaron linealmente con el tiempo, con una velocidad de $7.12 \mu\text{mol/L}$ por hora. De esta forma, la hipoxantina y el sistema SIS resultaron útiles para la estimación de IPM. Por lo que plantearon dos ecuaciones, la primera que considera la concentración de hipoxantina como variable dependiente y la segunda, en la que la concentración de hipoxantina es la variable independiente (**Tabla 8**).

En este estudio, Passos y colaboradores ²⁴, evaluaron de manera conjunta la utilidad del SIS para la determinación de hipoxantina y potasio a partir de una misma

muestra de humor vítreo. Otra observación interesante sobre esta investigación fue que ambos biomarcadores presentaron un comportamiento similar respecto a la muestra en que fueron evaluados (**Gráfica 12**).



Gráfica 12. Correlación entre las concentraciones de hipoxantina y potasio en diferentes muestras de humor vítreo. Línea punteada corresponde a hipoxantina. Línea continua corresponde a potasio. Traducido de Passos y colaboradores²⁴.

Tabla 8. Ecuaciones publicadas para la estimación del IPM a partir de las concentraciones de hipoxantina.

Autor (año)	Ecuación (h)	n	IPM máximo (h)
Passos (2009) ²⁴	$[Hx] = 7.12 (IPM) + 31.49$	-	-
Passos (2009) ²⁴	$IPM = 0.14 [Hx] - 4.42$	-	-
Salam (2012) ⁴⁷	$IPM = 0.03 [Hx] + 15.40$	70	60

n: número de muestras. Hx: hipoxantina.

VII. Adenosintrifosfato

Debido al papel tan importante que tiene el ATP en el suministro de energía de los seres vivos, se han estudiado los cambios que tiene éste a través del IPM.

Influencia de la temperatura en la determinación de ATP.

El grupo de investigación de Sun y colaboradores ^{48,49}, examinó la relación entre la degradación del ATP en sangre y el IPM a diferentes temperaturas. Realizaron los estudios en 24 y 28 conejos respectivamente, los cuales se sacrificaron por embolismo aéreo. En el primer caso, dividieron los cuerpos en tres grupos y cada grupo se expuso a una temperatura diferente: 15°C, 25°C, 35°C; en el segundo caso, dividieron los cuerpos en seis grupos y cada grupo se expuso a: 10 ± 0.05 °C, 15 ± 0.05 °C, 20 ± 0.05 °C, 25 ± 0.05 °C, 30 ± 0.05 °C y 35 ± 0.05 °C. En ambas investigaciones recolectaron muestras de sangre del ventrículo derecho cada 4 h hasta las 72 h *post mortem* y posteriormente las analizaron con una técnica de fluorescencia, la cual dio como resultados valores de unidades relativas de luz (URL) y a partir de éstas obtuvieron los valores logarítmicos de las concentraciones de ATP.

Sun y colaboradores ⁴⁸, graficaron los valores logarítmicos de las concentraciones de ATP en función del IPM a las diferentes temperaturas. Posteriormente, realizaron un análisis de los resultados, en el cual observaron que no todas las temperaturas se pudieron evaluar en el mismo rango del intervalo *post mortem* propuesto para el estudio, de tal manera que los niveles de ATP pudieron cuantificarse: de 0 a 64 h, a 15 °C; de 0 a 56 h, a 25 °C y de 0 a 36 h a 35 °C. Esto se debió a que posterior a estos intervalos, el ATP se degradó, y por lo tanto, obtuvieron resultados que no se pudieron analizar. Asimismo, graficaron los valores del IPM con diferentes ecuaciones: una lineal, una cuadrática y una cúbica, representaciones que se observan en la **Figura 1** las cuales mostraron que a distintas temperaturas, los valores del log[ATP] incrementaron en un intervalo de tiempo corto y después

decrecieron constantemente. Así, la ecuaciones cúbicas fueron las que describieron mejor a este comportamiento (**Tabla 9**).

Tabla 9. Ecuaciones cúbicas de regresión con log [ATP] a diferentes temperaturas e IPM. R_a^2 : R^2 ajustada. Traducido de Sun y colaboradores ⁴⁸.

T (°C)	IPM (h)	Ecuación de regresión	R_a^2
15	0 a 64	$y = 1.214 \times 10^{-5}x^3 + 0.001 \times 10^{-5}x^2 - 0.012x - 11.563$	0.976
	16 a 64	$y = 3.027 \times 10^{-5}x^3 + 0.003x^2 - 0.096x - 10.625$	0.992
25	0 a 56	$y = 1.555 \times 10^{-5}x^3 + 0.001x^2 - 0.016x - 11.566$	0.976
	8 a 56	$y = 2.921 \times 10^{-5}x^3 + 0.002x^2 - 0.059x - 11.186$	0.989
35	0 a 36	$y = 4.123 \times 10^{-5}x^3 + 0.002x^2 - 0.046x - 11.530$	0.970
	4 a 36	$y = 9.769 \times 10^{-5}x^3 + 0.005x^2 - 0.117x - 11.166$	0.991

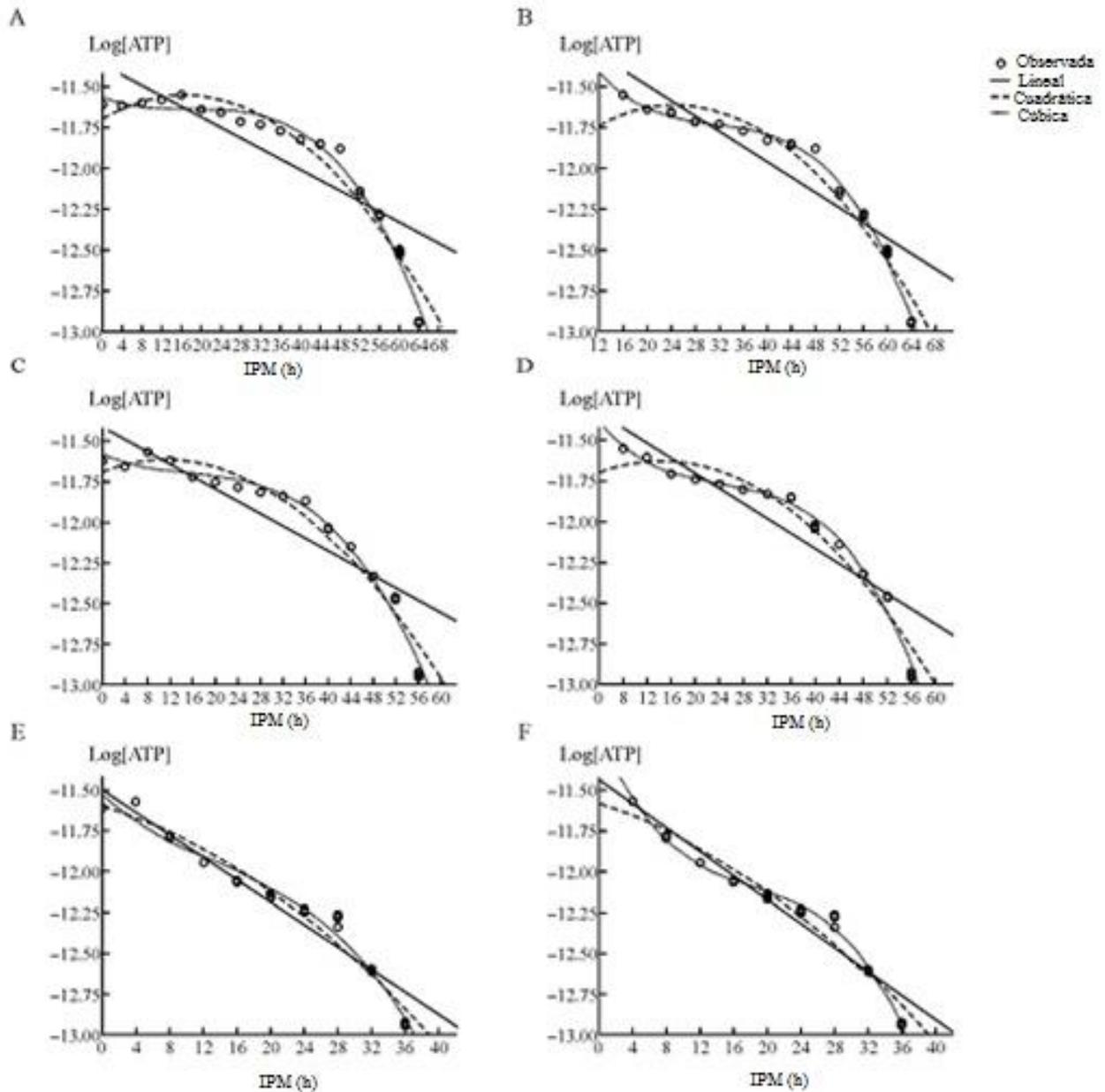


Figura 1. Curvas ajustadas acorde a las ecuaciones de regresión para del $\log[\text{ATP}]$ en función del IPM, a diferentes temperaturas e intervalos *post mortem*. A: 15 °C, curva ajustada para el $\log[\text{ATP}]$ en función del IPM de 0 a 64 h *post mortem*; B: 15 °C, curva ajustada para el $\log[\text{ATP}]$ en función del IPM de 16 a 64 h *post mortem*; C: 25 °C, curva ajustada para el $\log[\text{ATP}]$ en función del IPM de 0 a 56 h *post mortem*; D: 25 °C, curva ajustada para el $\log[\text{ATP}]$ en función del IPM de 8 a 56 h *post mortem*; E: 35 °C, curva ajustada para el $\log[\text{ATP}]$ en función del IPM de 0 a 36 h *post mortem*; F: 35 °C, curva ajustada para el $\log[\text{ATP}]$ en función del IPM de 4 a 36 h *post mortem*. Traducido de Sun y colaboradores⁴⁸.

En otro estudio Sun y colaboradores ⁴⁹, observaron que los niveles de ATP incrementaron inicialmente y subsecuentemente decrecieron de manera constante. Así, desarrollaron un modelo matemático con una función de interpolación para caracterizar la correlación entre los niveles de ATP y el IPM a las diferentes temperaturas de estudio.

Posteriormente, plantearon ecuaciones de regresión lineal a las diferentes temperaturas, considerando los valores de URL como variable independiente y los intervalos *post mortem* como variable dependiente, estas ecuaciones de regresión lineal sirvieron para seleccionar los intervalos de los cuales utilizarían los valores de URL para plantear la ecuación de interpolación, que resultaron ser: de 0 a 72 h (10 °C), de 0 a 60 h (15 °C), de 0 a 56 h (20 °C), de 0 a 52 h (25 °C), de 0 a 40 h (30 °C) y de 0 a 32 h (35 °C). Respecto a la interpolación, obtuvieron una ecuación con las URL (eje de x) y la temperatura (eje de y), como variables independientes, y como variable dependiente el IPM (eje de z). La **Figura 2** muestra el diagrama de ajuste correspondiente.

Asimismo, realizaron una comparación, con base en los coeficientes de correlación, entre los intervalos *post mortem* que obtuvieron con las ecuaciones de regresión lineal y los que obtuvieron con la función de interpolación. De este modo observaron que las estimaciones del IPM que se calcularon con la función de interpolación se aproximaron más a los valores reales. Otra ventaja dicha función es que provee una distribución probable de los posibles valores dentro de los intervalos que no se midieron, en cambio, las ecuaciones de regresión sólo reflejan el patrón de degradación del ATP a las diferentes temperaturas.

De este modo, los estudios que realizó el grupo de investigación de Sun y colaboradores ^{48,49} sobre las concentraciones de ATP en sangre de corazón proveen información cuantitativa para la estimación del IPM.

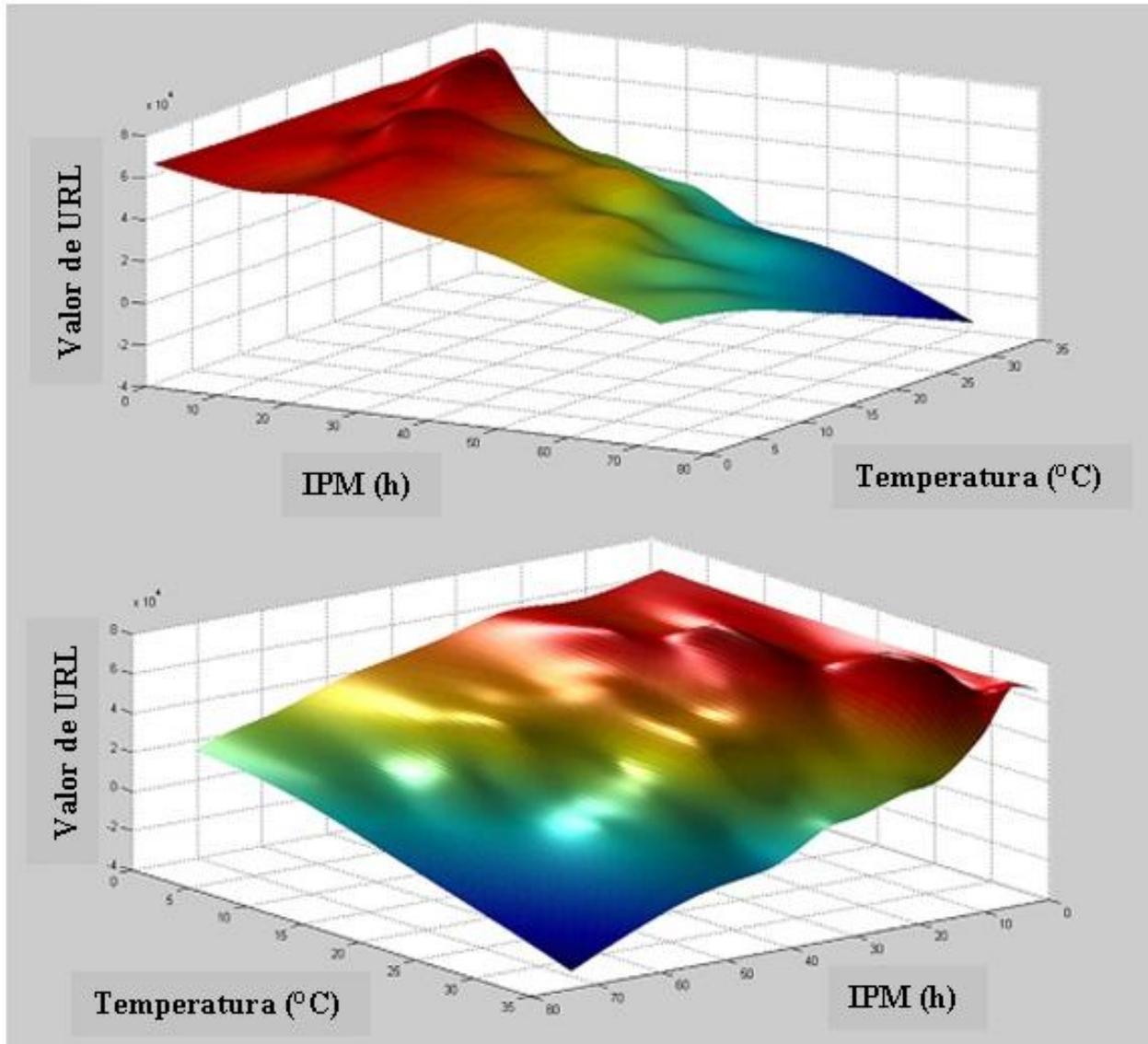


Figura 2. Curva tridimensional. El ajuste de la superficie corresponde a la función de interpolación que incluye las tres variables, IPM como variable dependiente y como variables independientes el valor de URL y la temperatura ambiente. Traducido de Sun y colaboradores ⁴⁹.

La ecuación que describe la curva de la **Figura 2** es:

$$Z = 302.1 - 0.01084x - 36.89y + 1.813 \times 10^{-7}x^2 + 0.001263xy + 2.107y^2 + 3.926 \times 10^{-13}x^3 - 1.912 \times 10^{-8}x^2y - 5.663 \times 10^{-5}xy^2 - 0.05093y^3 - 7.208 \times 10^{-17}x^4 + 2.763 \times 10^{-13}x^3y + 2.129 \times 10^{-10}x^2y^2 + 1.336 \times 10^{-6}xy^3 + 0.0003059y^4 + 6.771 \times 10^{-22}x^5 - 1.707 \times 10^{-18}x^4y - 5.216 \times 10^{-16}x^3y^2 - 1.488 \times 10^{-12}x^2y^3 - 1.223 \times 10^{-8}xy^4 + 2.955 \times 10^{-6}y^5$$

($R_a^2 = 0.930$).

Estudio del comportamiento del ATP en músculo esquelético.

La espectroscopia de resonancia magnética (ERM) de fósforo es una metodología que se utiliza para exámenes metabólicos del músculo esquelético. Con el fin de investigar el comportamiento *post mortem* de los metabolitos de fósforo en el músculo aductor mayor y evaluar la ERM como una herramienta para la determinación del IPM, Schmidt y colaboradores⁵⁰, realizaron un estudio en ocho cadáveres, que murieron por causas naturales. Almacenaron los cuerpos a temperatura ambiente hasta las exámenes, las cuales realizaron en intervalos de 1 h en un periodo de 4.5 a 24 h *post mortem*. Por otra parte, para hacer una comparación entre los resultados *ex vivo* e *in vivo*, estudiaron un grupo control de tres individuos. A partir de los resultados que obtuvieron calcularon la proporción entre α ATP y el fosfato inorgánico (Pi). Así establecieron la relación entre dicha proporción y el IPM.

En la **Figura 3**, se aprecian las diferencias características entre los espectros *in vivo* y *ex vivo*. Respecto a los metabolitos de fósforo de interés, en el espectro *ex vivo*, observaron el dominio de la señal de Pi y para α ATP, hallaron una intensidad de señal similar en ambos espectros. Por otra parte, para otros metabolitos, tales como: fosfocreatina (PCr), en el espectro *ex vivo* la señal fue muy leve o incluso no detectable, dependiendo del IPM; el fosfomonoéster (PME), presentó una señal más intensa en el en el espectro *ex vivo*; mientras que las señales de γ ATP y β ATP, presentaron intensidades de señal similares en ambos espectros.

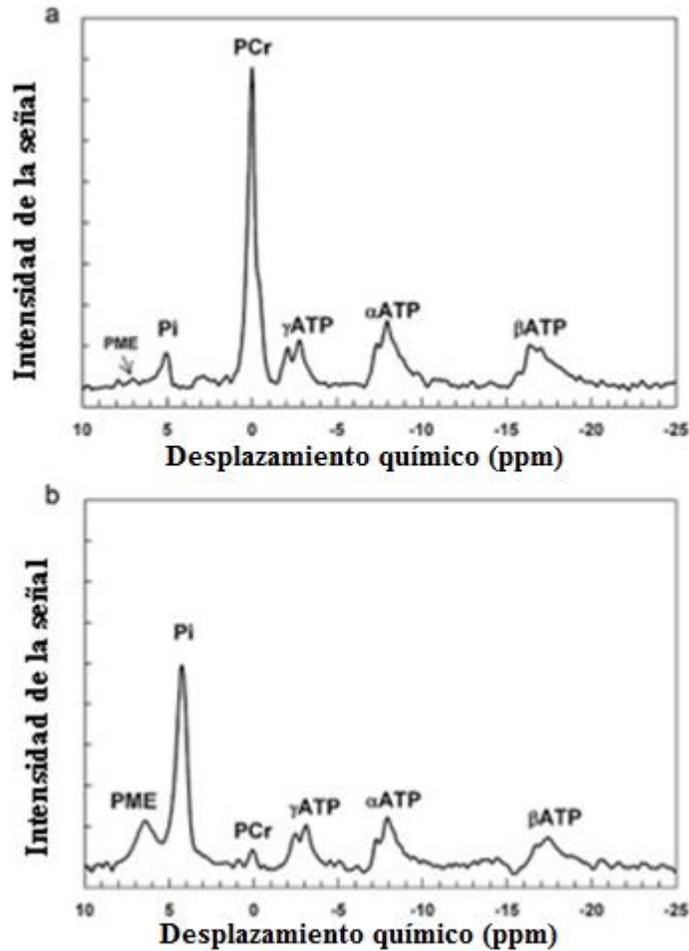


Figura 3. Comparación de un espectro de resonancia magnética ³¹P *in vivo* (a) y uno *ex vivo* [(b) 4.5 h *post mortem*] del músculo aductor mayor. Traducido de Schmidt y colaboradores⁵⁰.

Asimismo, referente a la proporción de α ATP/Pi observaron que ésta decrece con el tiempo, en promedio, de 0.445 en un IPM de 4 h a 0.032 en el IPM de 24 h. En la **Gráfica 13** se puede observar dicho comportamiento y los datos se pudieron describir con una función mono-exponencial:

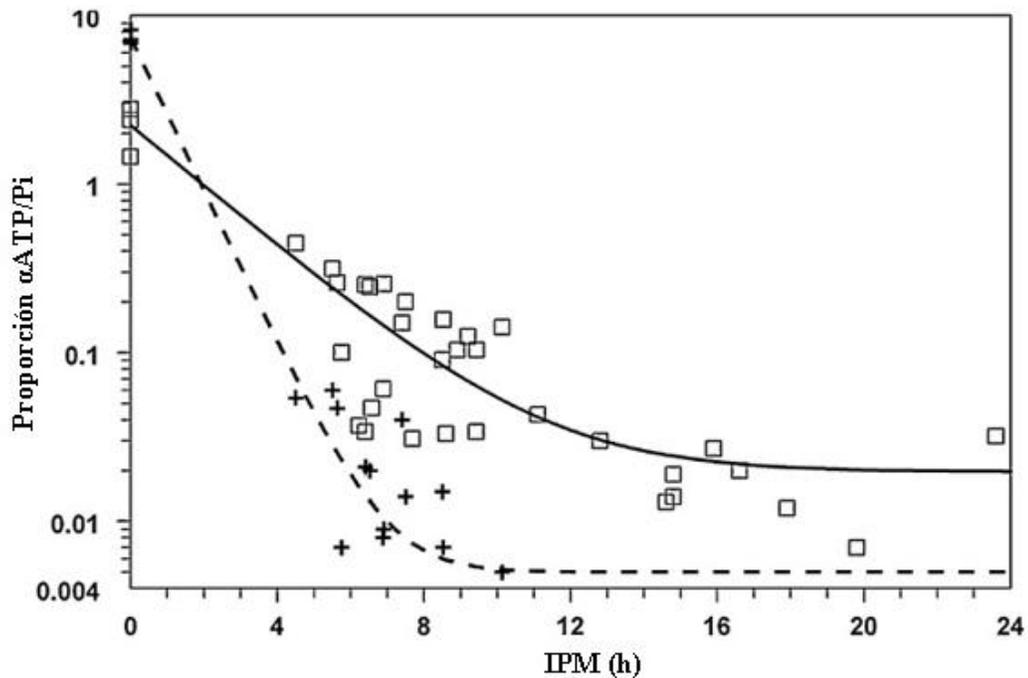
$$\alpha\text{ATP/Pi} = C \times e^{-(0.42 \pm 0.07)t} + (0.02 \pm 0.05)$$

Donde:

C: es la proporción de α ATP/Pi al momento de la muerte.

t: el tiempo de muerte.

El modelo matemático anterior, presentó un coeficiente alto de determinación ($r^2 = 0.92$) y el intercepto fue $C = 2.19 \pm 0.12$ al tiempo cero, que concordó con la proporción de $\alpha\text{ATP}/\text{Pi}$ *in vivo* del grupo control, $C = 2.2 \pm 0.6$.

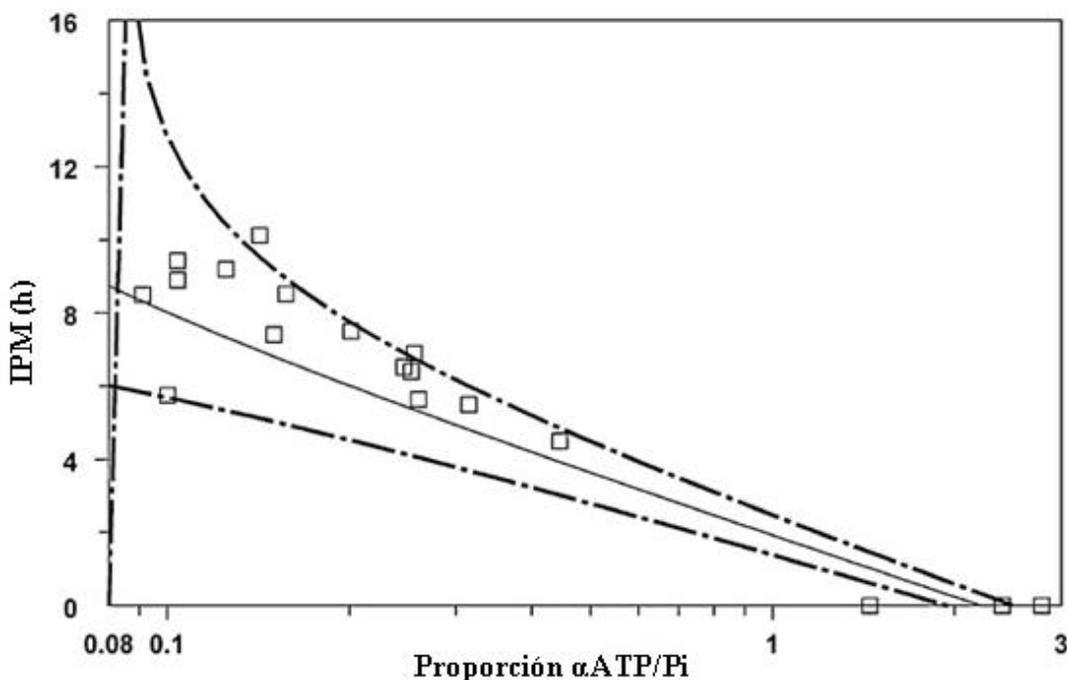


Gráfica 13. Patrón temporal de la proporción de los metabolitos postmortem $\alpha\text{ATP}/\text{Pi}$ (cuadrados y línea continua) y PCr/Pi (cruces y línea con guiones) de ocho cadáveres. Al tiempo cero del IPM se encuentran las proporciones que se hallaron en tres sujetos sanos. Traducido de Schmidt y colaboradores⁵⁰.

Así, se despejó la ecuación anterior con el fin de que ésta quedara en términos para la estimación del IPM:

$$\text{IPM} = \frac{-\ln \frac{\frac{\alpha\text{ATP}}{\text{Pi}} - 0.02}{2.19}}{0.42}$$

Con dicha ecuación, se describe el comportamiento de la **Gráfica 14**, en la cual una medición de la proporción $\alpha\text{ATP}/\text{Pi}$ de 1.0 se refiere a un lapso entre 1.04 a 2.5 h *post mortem*, mientras que una proporción de 0.1 aumenta en un intervalo de 5.7 a 12.8 h.



Gráfica 14. Función inversa de la **Gráfica 13** de las proporciones de los metabolitos $\alpha\text{ATP}/\text{Pi}$ (cuadrados y línea continua), las cuales permiten la determinación del tiempo de muerte con un intervalo de confianza del 95% (línea con guiones y puntos). Traducido de Schmidt y colaboradores⁵⁰.

El comportamiento de los metabolitos de fósforo en este estudio, se debieron a que al inicio de la muerte, la síntesis del ATP se lleva a cabo por la PCr, la cual sirve como fuente de grupos fosforilo, posteriormente, cuando la PCr disminuye, aumentan los niveles de Pi y posteriormente, la síntesis continua a partir del glucógeno. Asimismo, el incremento del Pi se debe a la hidrólisis del ATP. También, compararon la proporción *ex vivo* de $\alpha\text{ATP}/\text{Pi}$ con la de $\beta\text{ATP}/\text{Pi}$, no observaron diferencias significativas, pero el de βATP sólo pudieron analizarlo dentro de las primeras 10 h *post mortem*.

VIII. Ácido ribonucleico

Existen múltiples tipos de ARN, los cuales han sido estudiados con relación a su comportamiento con el IPM.

Corradini y colaboradores ⁷, realizaron un estudio en microARNs (miARN) con una supuesta variación en el ritmo circadiano. Las muestras que analizaron fueron sangre entera y humor vítreo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de la cual obtuvieron los valores de Ct (*cycle threshold*, ciclo umbral).

Eligieron diez miARN, en los cuales incluyeron dos que previamente se habían estudiado con fines forenses: mir-142-5p y mir-541. Adicionalmente, analizaron tres ARNs no codificantes (ARNnc) como referencias endógenas: SNORD61, SNORD95 y RNU6-2, así como un control positivo: mir-15a (**Tabla 10**).

Encontraron que el ARNnc que resultó ser el mejor como referencia endógena fue SNORD95, el cual mostró la mejor estabilidad respecto a su expresión, tanto en humor vítreo como en muestras sanguíneas. Asimismo, observaron que mir-15a sirvió como control positivo pero sólo en muestras de sangre, ya que en humor vítreo presentó una expresión baja.

Observaron diferencias en la expresión de dos miARNs de cada muestra en muertes que ocurrieron durante el día y muertes que ocurrieron durante la noche, estas diferencias de expresión fueron estadísticamente significativas en: mir-106b y mir-96, en humor vítreo y en mir-142-5p y mir-219, en sangre.

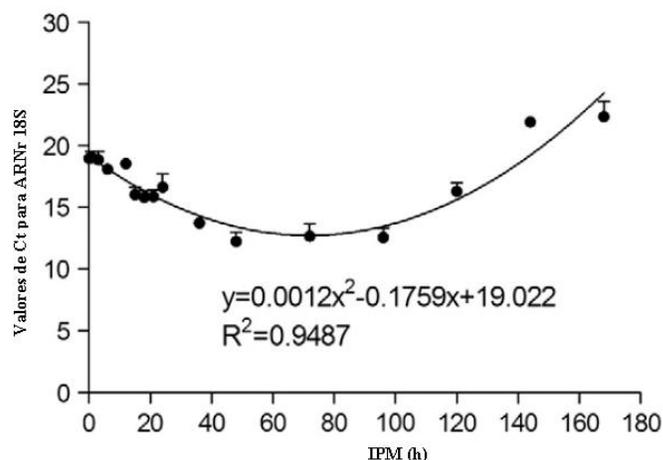
Aunque existe poca investigación respecto a los miARNs relacionada con la existencia de un “reloj de miARN”, muestran gran potencial para ser biomarcadores debido a su gran resistencia después de la muerte y bajo diversas condiciones ambientales y de tratamiento. Asimismo, Corradini y colaboradores ⁷, sugieren añadir otras muestras y más miARNs blanco, para ampliar el estudio de miARN como un cronobiomarcador.

Tabla 10. Promedio de los valores de Ct de 14 miARNs en humor vítreo y sangre de muertes que ocurrieron durante el día y muertes que ocurrieron durante la noche. Las celdas en azul representan los miARNs que presentaron diferencias de expresión estadísticamente significativas en humor vítreo y las celdas en amarillo representan los miARNs que presentaron diferencias de expresión estadísticamente significativas en sangre. Traducido de Corradini y colaboradores ⁷.

Gen	Valores promedio de Ct			
	Humor vítreo		Sangre	
	Muertes en el día	Muertes en la noche	Muertes en el día	Muertes en la noche
Hsa-miR-15a-5p	29.41	28.52	16.08	16.77
RNU6-2	21.92	23.76	17.43	18.13
SNORD-95	26.33	26.16	17.49	18.66
SNORD-61	26.71	27.79	19.27	19.25
hsa-miR-541-3p	31.00	33.46	27.84	31.01
hsa-miR-142-3p	31.44	34.23	14.53	16.70
hsa-miR-26a-5p	24.55	26.27	13.95	13.96
hsa-miR-182-5p	26.83	27.14	17.08	19.49
hsa-miR-219a-5p	33.03	32.15	23.32	26.33
hsa-miR-194-5p	29.47	29.28	16.08	16.15
hsa-miR-142-5p	33.68	34.53	17.92	21.74
hsa-miR-132-3p	30.36	30.16	22.36	24.58
hsa-miR-106b-5p	25.18	33.88	13.84	12.71
hsa-miR-96-5p	28.34	26.18	20.30	22.74

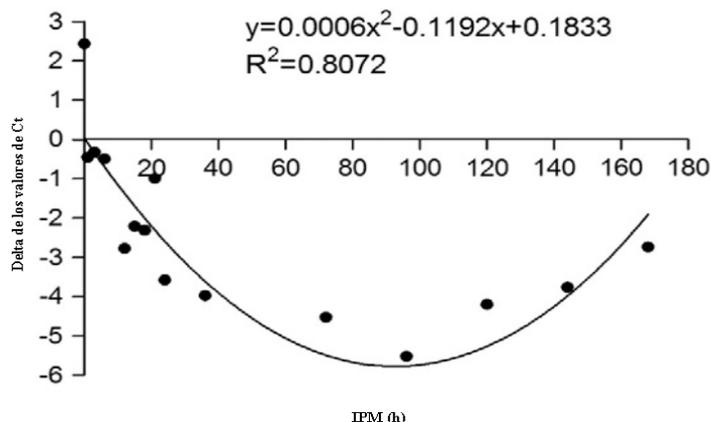
Por otra parte Li ⁵¹ y Young ³ y colaboradores, respectivamente, estudiaron la utilidad de la degradación del ARN para determinar el IPM.

Li y colaboradores ⁵¹, cuantificaron el ácido ribonucleico ribosomal 18S (ARNr-18S) y tres miARNs (miR-1, miR-143, miR-208) en ratas, por PCR. Observaron que los niveles ARNr-18S presentaron un incremento gradual en la etapa *post mortem* temprana, con su máximo a las 96 h, esto posiblemente a que dentro de las 96 h después de la muerte, la velocidad de degradación del ARNr-18S es menor que su velocidad de liberación de los complejos proteicos, así, después de 96 h, la mayoría de ARNr-18S se libera y la velocidad de degradación excede a la velocidad de liberación, lo que causa que los niveles de ARNr-18S decrezcan gradualmente (Gráfica 15).



Gráfica 15. Relación entre el IPM y los valores de Ct para ARNr-18S de tejido cardiaco de ratas. Se presenta también la ecuación de la parábola con su respectivo coeficiente de correlación que se calcularon por análisis de regresión. Traducido de Li y colaboradores ⁵¹.

Realizaron la cuantificación de los miARNs (miR-1, miR-30b y miR-208) con el fin de tener un control endógeno de referencia. Así, encontraron que miR-1 presentó el comportamiento más estable respecto al IPM, ya que de los tres miARNs, fue el que presentó un valor menor de desviación estándar. De este modo, evaluaron la relación entre el IPM y el delta de los valores de Ct para ARNr-18S/miR-1 y encontraron un comportamiento similar al que presentó en ARNr-18S con el IPM (Gráfica 16).



Gráfica 16. Relación entre el periodo *post mortem* de 0 a 168 h y el delta de los valores de Ct para ARNr-18S/miR-1. Se presenta también la ecuación de la parábola con su respectivo coeficiente de correlación que se calcularon por análisis de regresión. Traducido de Li y colaboradores ⁵¹.

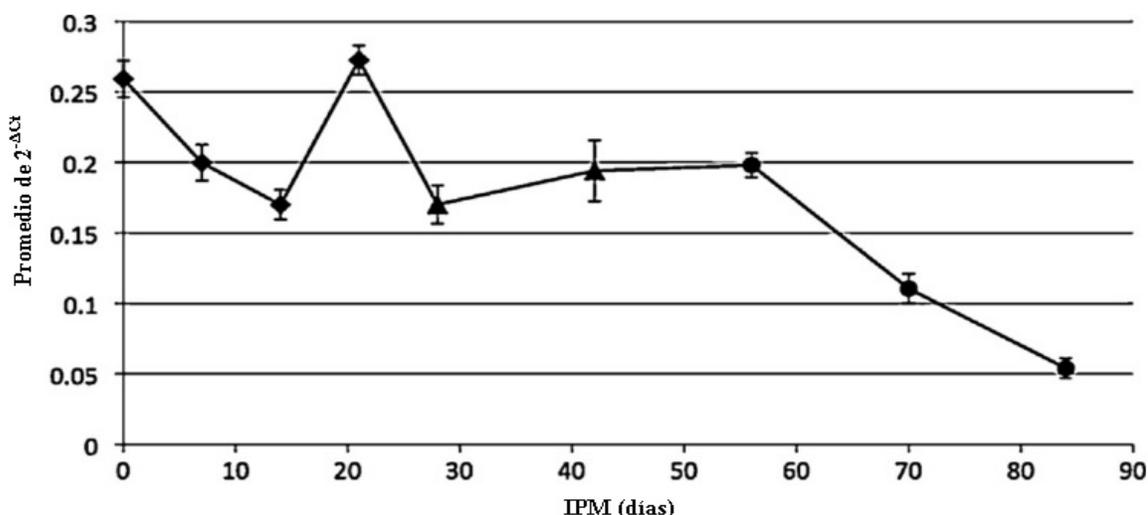
Aunque la regresión lineal del ARNr-18S presentó una mayor correlación que la regresión de ARNr-18S/miR-1 Li y colaboradores ⁵¹, proponen usar ésta última para la determinación del IPM debido a que el uso de un solo marcador está influenciado por varios factores que se compensa al tener el miR-1, como control endógeno de referencia, normalizando así las variaciones. Hasta el momento de la publicación de esta investigación (2014) esta metodología la aplicaron para determinar el IPM de ocho humanos, con resultados que indicaron que es útil para dicha estimación. Sin embargo, estas determinaciones deben mejorarse.

Young y colaboradores ³, estudiaron la degradación del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en pulpa dental de cerdos, específicamente de dos segmentos con diferente número de pares de bases (pb), uno de 301pb (fragmento grande) y otro de 71pb (fragmento pequeño) de β -actina por PCR, en este caso los valores de Ct que obtuvieron de la PCR los convirtieron a valores de $2^{-\Delta Ct}$, esta conversión fue necesaria debido a que los valores de Ct se midieron en escala logarítmica, la diferencial ΔCt consistió en la resta de los valores de Ct del segmento de 301pb menos el Ct del segmento de 71pb. Además, este estudio lo combinaron con un ensayo colorimétrico, con el fin de evaluar la edad de las muestras y poderlas clasificar con base en los resultados de la cuantificación del color que éstas adquieren a través del tiempo.

A valores mayores de $2^{-\Delta Ct}$, hay más similitud de las concentraciones de los segmentos amplificados, es decir, los segmentos presentan niveles similares de degradación. Sin embargo, encontraron que los valores de $2^{-\Delta Ct}$ disminuyeron con el incremento del IPM, lo cual indica que hay una degradación diferencial, donde la porción de 301pb se encuentra en menor cantidad que el segmento de 71pb, por lo tanto esta última porción de ARNm es más estable.

En la **Gráfica 17** se observa que el segmento de 301pb se degradó más rápido que el segmento de 71pb. Esta tendencia se presentó del día cero al día 84 después de la muerte, tiempo para el cual el fragmento grande no se pudo detectar. Así, con base en la **Gráfica 17**, las estimaciones más precisas del IPM se realizaron en las áreas donde los valores de $2^{-\Delta Ct}$, decrecieron. Por lo que la precisión de estimación del IPM

se afectó en los días 14, 28, 42 y 56, efecto que se puede observar como un área aplanada en la gráfica.



Gráfica 17. Degradación diferencial del ARN en pulpa dental con la conversión de los datos de Ct a $2^{-\Delta Ct}$, en función del intervalo *post mortem*. Representación de las diferencias en la degradación de los segmentos de 301pb y 71pb en una región de ARNm de β -actina porcina extraída de pulpa de diente por más de 84 días. Las barras de error representan el error estándar, donde el número de muestras por duplicado fue 192. Cada punto se representa con una de las tres figuras diferentes que indican si a ese determinado IPM se le asignó en el análisis colorimétrico el grupo #1 (◆), el grupo #2 (▲) o el grupo #3 (●). Traducido de Young y colaboradores³.

Respecto al análisis colorimétrico, tomaron fotografías de la pulpa dental con la misma cámara y controlando las condiciones de iluminación, obtuvieron una medición cuantitativa de tres colores: rojo, verde y azul con el programa “Photoshop”. De este modo, clasificaron las tendencias de los valores numéricos en tres grupos, que a su vez se relacionaron con la edad de las muestras (Tabla 11). En el grupo #1, las muestras presentaron un valor intermedio de rojo y valores bajos de azul y verde, el grupo #2 se conformó por muestras con valores altos de los tres colores y el grupo #3 se comprendió por muestras con valores bajos de color rojo y valores intermedios de azul y verde.

El análisis estadístico mostró que el 71% de las muestras de los días 0 a 21 se encontraron en el grupo #1, las cuales presentaron principalmente una coloración

roja. El grupo #2, conformado por el 78% de las muestras de los días 28 a 42 presentaron descomposición visual, la pulpa perdió su coloración rosa y pasó a ser blanca. Finalmente, el 64% de las muestras de los días 56 a 84 formaron el grupo #3, el cual correspondió a las últimas etapas de descomposición, cuando la pulpa se tornó a colores amarillo y café. En la **Gráfica 17** cada punto se representa con una figura geométrica, la cual indica el grupo que se le asignó con base en el análisis colorimétrico.

Tabla 11. Promedio y desviación estándar de los valores asignados para cada grupo, donde el número de muestras que se utilizó fue 114 dientes. Los tres grupos se obtuvieron con la división de los datos por el método de agrupamiento “k-means”. Se analizaron tres pixeles de cada fotografía con “Adobe Photoshop” para obtener un valor numérico de cada color. Los valores para cada color se promediaron por cada diente. Traducido de Young y colaboradores³.

Grupo	Rojo (DE)	Verde (DE)	Azul (DE)
1	243.696 (9.044)	151.933 (16.198)	120.993 (25.321)
2	268.148 (17.506)	245.049 (19.391)	221.099 (33.925)
3	236.841 (16.919)	202.159(16.113)	156.841 (30.093)

La cuantificación de ARN y el análisis colorimétrico se pueden emplear en conjunto para estimar de forma precisa el IPM. Una de las principales ventajas de este estudio es que las metodologías se pueden aplicar en intervalos *post mortem* largos y en muestras que se recolectan al aire libre, ya que la pulpa dental se encuentra protegida, por lo que se mantiene viable para el análisis.

- **Proteínas**

- I. **Troponinas cardiacas**

Las troponinas cardiacas son biomarcadores que permiten conocer la causa de muerte y también han mostrado tener diferencias dependientes del IPM. Chen y colaboradores⁵², midieron los niveles de troponina T cardiaca (TnTc) y troponina I

cardiaca (Tnlc) con inmunoensayos en sangre de las cavidades derecha e izquierda del corazón, de la vena iliaca externa, así como en fluido pericárdico y fluido cerebroespinal en cadáveres con múltiples causas de muerte.

Encontraron variaciones en los niveles de TnTc y Tnlc en los diferentes fluidos con distintas causas de muerte. Sin embargo, en las **Tablas 12 y 13** sólo se muestran los resultados más destacados del estudio, debido a que algunas causas de muerte mostraron niveles de TnTc y Tnlc independientes al IPM.

Tabla 12. Principales hallazgos de la relación de los niveles de TnTc y las causas de muerte a diferentes intervalos *post mortem*. Tomado de Chen y colaboradores ⁵².

Muestra	IPM (h)	Causas de muerte
Sangre periférica	Niveles altos	
	< 12	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad cardiaca congestiva crónica. • Hemopericardio.
	12 a 48	<ul style="list-style-type: none"> • Abuso fatal de metanfetaminas. • Intoxicación sedativa-hipnótica. • Hemorragia espontánea cerebral/subaracnoidea. • Electrocuci3n. • Embolismo pulmonar.
Sangre periférica y fluido pericárdico	Niveles bajos	
	12 a 48	<ul style="list-style-type: none"> • Hemorragia aguda debida a lesiones por instrumentos filosos.
Fluido cerebroespinal	Niveles altos	
	< 48	<ul style="list-style-type: none"> • Hipertermia (choque térmico). • Ahogamiento en el ba3o. • Enfermedad cardiaca congestiva crónica.
	Niveles bajos	
	< 48	<ul style="list-style-type: none"> • Ahogamiento en agua dulce o agua de mar. • Hipotermia (por exposici3n al frío). • Hemorragia aguda debida a lesiones por instrumentos filosos.

Tabla 13. Principales hallazgos de la relación de los niveles de Tnlc y las causas de muerte a diferentes intervalos *post mortem*. Tomado de Chen y colaboradores ⁵².

Muestra	IPM (h)	Causas de muerte
Sangre periférica y fluido pericárdico	Niveles altos	
	12 a 48	<ul style="list-style-type: none"> • Electrocuación.
	Niveles bajos	
	< 48	<ul style="list-style-type: none"> • Ahogamiento en agua dulce o agua de mar. • Hipotermia (por exposición al frío).
Fluido cerebrospinal	Niveles altos	
	< 48	<ul style="list-style-type: none"> • Hipertermia (choque térmico). • Intoxicación • Hemorragia subaguda debida a lesiones por instrumentos filosos. • Hemorragia subaguda debida a lesiones por instrumentos desafilados.
	Niveles bajos	
	< 48	<ul style="list-style-type: none"> • Ahogamiento en agua dulce o agua de mar. • Hipotermia (por exposición al frío).

Asimismo, plantearon una serie de ecuaciones que correlaciona el IPM con los biomarcadores cardiacos que estudiaron. A pesar de que establecieron cuatro ecuaciones para cada fluido tomando como criterio los niveles del biomarcador, si éstos eran altos, intermedios, bajos y una inclusión de todos los casos y con base en esto aplicar el modelo adecuado, ninguna ecuación presentó un coeficiente de correlación mayor a 0.4. Por lo tanto, estos biomarcadores no resultaron ser útiles para la estimación de IPM, aunque sí resultan serlo para la determinación de la causa de muerte.

II. Proteínas de músculo esquelético

Pittner ⁵³ y Foditsch ⁶ y colaboradores, respectivamente, estudiaron la degradación de diferentes proteínas en músculo esquelético de cerdo por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y western blot. En el primer caso también evaluaron el efecto de la temperatura en la degradación de las proteínas a 4 ± 1 °C (IPM máximo de 21 días) y a 22 ± 2 °C (IPM máximo de 5 días) y en el segundo estudio las muestras las mantuvieron a 21 ± 1 °C (IPM máximo 10 días).

Por una parte, Pittner y colaboradores ⁵³, estudiaron dos series de proteínas: titina y nebulina, formaron la serie 1; y α -actinina, tropomiosina, desmina, TnTc y la ATPasa SERCA 1 conformaron la serie 2. También examinaron la actividad dependiente de calcio de las calpaínas 1 y 2.

En la **Figura 4** se muestra el gel de electroforesis SDS-PAGE de la serie 1, donde encontraron siete bandas diferentes durante toda la investigación, las cuales presentaron patrones similares de localización, así como de apariciones y desapariciones respecto al tiempo (**Tabla 14**). T1, corresponde a la forma nativa de titina, T2, es su primer producto de degradación, el segundo producto de degradación es de 1200 kDa, sin embargo no se menciona su nombre, el tercer producto de degradación le denominaron pd1 de titina y al cuarto producto de degradación, pd2 de titina. Mientras que N1 corresponde a nebulina 1 y N2 se refiere a nebulina 2.

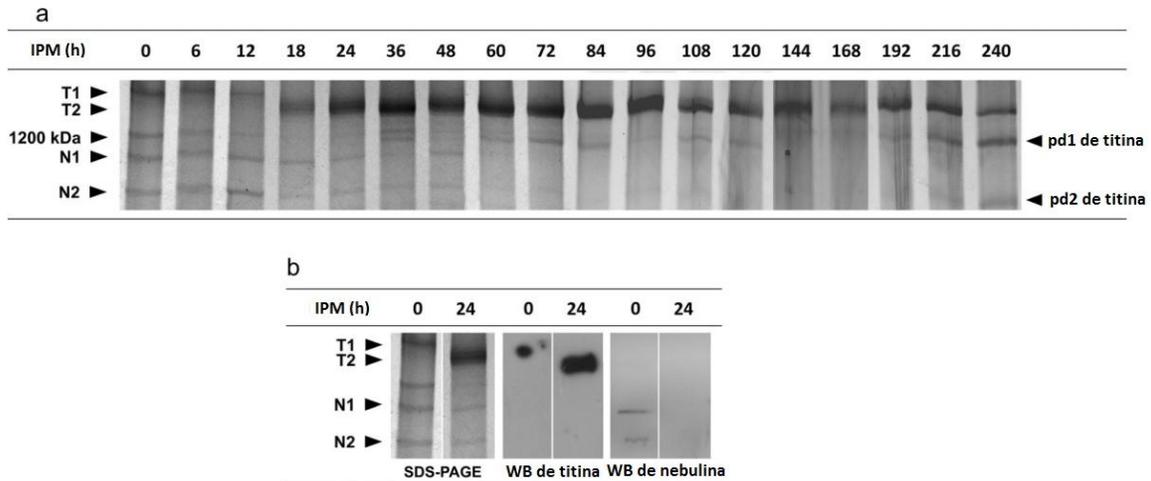


Figura 4. Degradación de la serie 1 de proteínas: titina y nebulina durante 240 h. **a.** gel de la electroforesis SDS-PAGE de una muestra de músculo porcino, la cual revela la presencia de titina y nebulina en sus formas nativas o degradadas en diferentes intervalos *post mortem*. **b.** análisis de western blot con el uso de anticuerpos anti-titina y anti-nebulina, que demostraron la identidad de las bandas del gel de electroforesis SDS-PAGE. T1: Titina nativa, T2: principal producto de degradación, N1: nebulina 1, N2: nebulina 2, pd: producto de degradación. Traducido de Pittner y colaboradores⁵³.

Tabla 14. Observaciones del comportamiento que presentaron las proteínas de la serie 1. Tiempos promedio de aparición y desaparición. T1: Titina nativa, T2: principal producto de degradación de titina, pd: producto de degradación, N1: nebulina 1, N2: nebulina 2. Tomado de Pittner y colaboradores⁵³.

Proteína o fragmento	Aparición (h)	Desaparición (h)
T1	0	14.0 ± 2.0
T2	16.0 ± 2.0	Presente hasta el fin del estudio.
Derivado de titina de 1200 kDa	0	13.2 ± 2.2
pd1 de titina	69.6 ± 7.0	Presente hasta el fin del estudio.
pd2 de titina	202.0 ± 18.4	Presente hasta el fin del estudio.
N1	0	52.8 ± 6.1
N2	0	84.0 ± 10.7

En la **Figura 5** se presenta el análisis de western blot de la serie 2. Los productos de degradación se denominaron con las letras pd seguidas de un número, por ejemplo, el primer producto de degradación de desmina se nombró, pd1 de desmina.

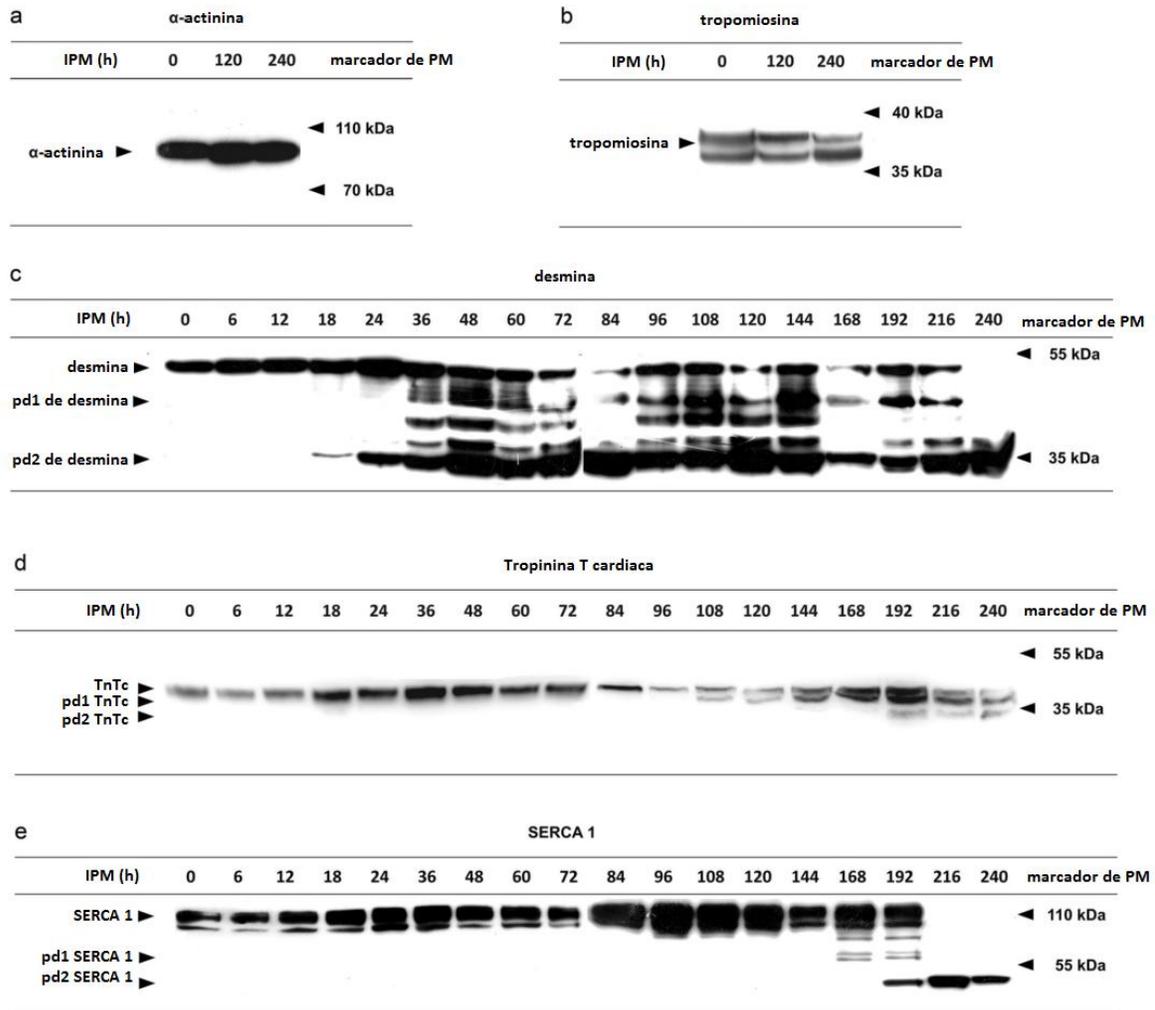


Figura 5. Análisis de western blot de músculo porcino. Comportamiento de degradación de α -actinina, tropomiosina, desmina, TnTc y SERCA 1 a varios intervalos *post mortem* (de 0 a 240 h). **a.** α -actinina y **b.** tropomiosina, en ambas proteínas no se encontraron productos de degradación. Por el contrario, **c.** desmina, **d.** TnTc y **e.** SERCA1 se degradaron en todas las muestras de músculo. PM: Peso molecular. Traducido de Pittner y colaboradores⁵³.

En la **Tabla 15** se muestran los tiempos promedio a los cuales aparecieron y desaparecieron las proteínas de la serie 2.

Tabla 15. Observaciones del comportamiento que presentaron las proteínas de la serie 2. Tiempos promedio de aparición y desaparición. TnTc: troponina T cardiaca, pd: producto de degradación. Tomado de Pittner y colaboradores⁵³.

Proteína o fragmento	Aparición (h)	Desaparición (h)
α -actinina	0	Presente hasta el fin del estudio.
Tropomiosina	0	Presente hasta el fin del estudio.
Desmina	0	224.0 \pm 13.3
pd1 de desmina	45.0 \pm 10.0	Variable en algunos casos estuvo presente hasta el fin del estudio y en otros se desvaneció al mismo tiempo que desmina.
pd2 de desmina	35.0 \pm 6.6	Presente hasta el fin del estudio.
TnTc	0	232.0 \pm 4.6
pd1 de TnTc	108.0 \pm 8.5	Presente hasta el fin del estudio.
pd2 de TnTc	132.0 \pm 6.9	Presente hasta el fin del estudio.
SERCA 1	0	230.4 \pm 6.1
pd1 de SERCA 1	199.2 \pm 31.3	Presente hasta el fin del estudio.
pd2 de SERCA 1	230.4 \pm 8.6	Presente hasta el fin del estudio.

Respecto al análisis de las calpaínas 1 y 2, estudiaron su degradación y su actividad en presencia de cloruro de calcio (CaCl_2), a dos concentraciones diferentes de éste: 4 mM y 40 μM y en ausencia de CaCl_2 . En la **Figura 6** se observan el zimograma de estos estudios. Asimismo en la **Tabla 16** se presentan los tiempos promedio de la aparición y desaparición de las bandas de las calpaínas y sus respectivos productos de degradación.

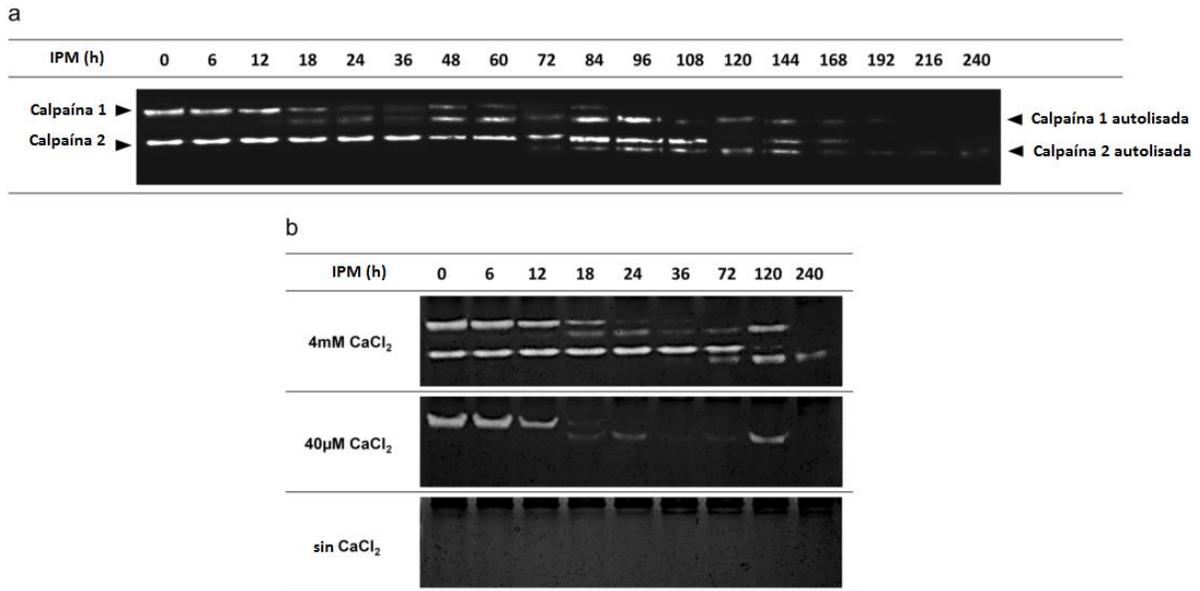


Figura 6. a. El zimograma muestra la actividad de las calpaínas a distintos intervalos post mortem. La calpaína 1 se desintegra en dos bandas entre las 18 y 36 h. En cambio, ocurre lo mismo para la calpaína 2 pero a las 72 h. Calpaína 1 desaparece a las 84 h, mientras que calpaína 2 desaparece a las 168 h. **b.** La actividad de las calpaínas es dependiente de las concentraciones de calcio. Calpaína 1 es activa a 40 µM de CaCl₂ y calpaína 2 sólo es activa en concentraciones de 4 mM de CaCl₂. Asimismo, sin CaCl₂ no se detectó actividad. Traducido de Pittner y colaboradores ⁵³.

Tabla 16. Observaciones del comportamiento que presentaron las calpaínas 1 y 2. Tiempos promedio de aparición y desaparición. Tomado de Pittner y colaboradores ⁵³.

Proteína o fragmento	Aparición (h)	Desaparición (h)
Calpaína 1	0	86.4 ± 2.4
Calpaína 1 autolisada	19.2 ± 1.2	Presente hasta el fin del estudio.
Calpaína 2	0	144.0 ± 18.2
Calpaína 2 autolisada	88.8 ± 13.3	Presente hasta el fin del estudio.

Con estos resultados, Pittner y colaboradores ⁵³, demostraron que si se usan en combinación los patrones de aparición y desaparición de ambas series de proteínas

con sus productos de degradación, se puede encontrar una buena herramienta que permite delimitar el IPM.

Las calpaínas, son una familia de enzimas proteolíticas dependientes de la concentración de Ca^{2+} , han sido involucradas en la degradación de proteínas, tales como: titina, nebulina, desmina. La calpaínas 1 y 2, mostraron ser activas en su forma nativa dentro de las primeras horas *post mortem*, y también lo fueron en su forma autolisada.

Por otra parte, Foditsch y colaboradores ⁶, analizaron la descomposición de tres grupos de proteínas, clasificadas con base en al comportamiento en western blot, el primero incluyó: α -actinina, calsecuestrina-1, laminina, tropomiosina; el segundo se conformó por: troponina T (TnT) y SERCA 2; y el tercero se formó por: desmina, SERCA 1, titina y nebulina (las últimas dos proteínas se determinaron por electroforesis debido a su alto peso molecular). Asimismo, estudiaron la presencia de la proteasa dependiente de calcio μ -calpaína para determinar la actividad proteolítica.

En la **Tabla 17** se describen los comportamientos que presentaron las proteínas del grupo 1, en la **Tabla 18** lo referente al grupo 2 y en la **Tabla 19** al grupo 3. Los hallazgos relacionados con la actividad proteolítica de μ -calpaína se muestran en la **Tabla 20**.

Tabla 17. Descripción del comportamiento de las proteínas en el análisis de western blot del grupo 1, durante 5 días (120 h) a 22 °C y 21 días (504 h) a 4 °C. Este grupo no mostró señales que indique proteólisis. En las imágenes, de forma horizontal aparece la línea del tiempo para cada proteína, mientras que de forma vertical se indica el peso molecular de los marcadores para cada proteína en kilodaltones (kDa). Tomado de Foditsch y colaboradores⁶.

Proteína	Temperatura (°C)	
	22 ± 2	4 ± 1
α-actinina	α-actinina fue resistente a la proteólisis durante el periodo de estudio en ambas temperaturas.	
Calsecuestrina-1	Mostró ligeras variaciones en cantidades detectables, pero fue resistente a la proteólisis durante el periodo de estudio en ambas temperaturas.	
Laminina	Mostró ligeras variaciones en cantidades detectables, pero fue resistente a la proteólisis durante el periodo de estudio en ambas temperaturas.	
Tropomiosina	No mostraron cambios notables en sus patrones durante el curso de los intervalos <i>post mortem</i> , durante el periodo de estudio en ambas temperaturas.	

Tabla 18. Descripción del comportamiento de las proteínas en el análisis de western blot del grupo 2, durante 5 días (120 h) a 22 °C y 21 días (504 h) a 4 °C. Ambas proteínas mostraron un decremento, a los 4 días *post mortem* a 22 °C, mientras que a 4 °C ambas proteínas no mostraron fragmentos proteolíticos hasta los 21 días *post mortem*. En las imágenes, de forma horizontal aparece la línea del tiempo para cada proteína, mientras que de forma vertical se indica el peso molecular de los marcadores para cada proteína en kDa. Tomado de Foditsch y colaboradores ⁶.

Proteína	Temperatura (°C)	
	22 ± 2	4 ± 1
TnT	<p>Fue inicialmente resistente a la degradación, al día 4 su cantidad decreció fuertemente y al día cinco sólo observaron una banda ligera.</p>	<p>Su degradación progresó lentamente, con una pérdida menor de su cantidad entre los días 15 y 21.</p>
SEARCA 2	<p>Varió ligeramente la cantidad entre los días 1 y 4, después hubo una disminución notable de la señal al día 5. La flecha roja señala la banda en la que se presentó un cambio notable.</p>	<p>La degradación ocurrió con mayor continuidad comparada con la degradación a 22 °C. La flecha roja señala la banda en la que se presentó un cambio notable.</p>

Tabla 19. Descripción del comportamiento de las proteínas del grupo 3 durante 5 días (120 h) a 22 °C y 21 días (504 h) a 4 °C. Análisis de western blot para desmina y SERCA 1, así como el análisis de electroforesis en gel SDS-PAGE para titina y nebulina. Las cuatro proteínas mostraron varios fragmentos de degradación (flechas rojas y negras). En las imágenes, de forma horizontal aparece la línea del tiempo para cada proteína, mientras que de forma vertical se indica el peso molecular de los marcadores para cada proteína en kDa. Tomado de Foditsch y colaboradores ⁶.

Proteína	Temperatura (°C)	
	22 ± 2	4 ± 1
Desmina	Entre los días 1 y 5 post mortem, apareció un primer fragmento de 39 kDa aproximadamente, seguido de dos fragmentos de 36 y 35 kDa a los 5 días.	Entre los días 10 y 21 aparecieron tres fragmentos grandes de aproximadamente 45, 39 y 36 kDa.
SERCA 1	Entre los días 3 y 4, se observó proteólisis dando el primer fragmento con un peso molecular de 70 kDa, seguido de tres fragmentos pequeños de 54, 39 y 35 kDa aproximadamente, entre los días 4 y 5.	El fragmento de 70 kDa se detectó con una banda ligera entre los días 15 y 21.

Tabla 19. (Continuación).

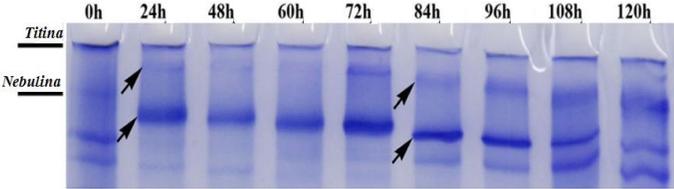
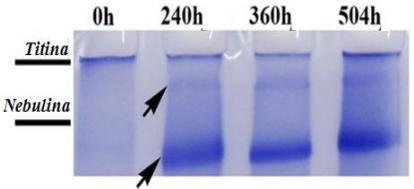
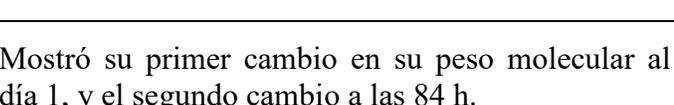
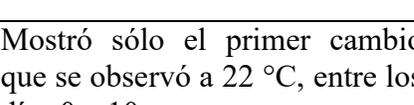
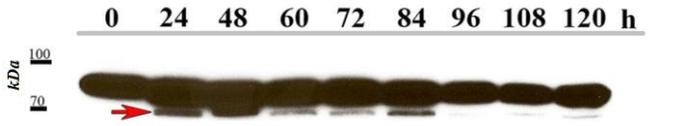
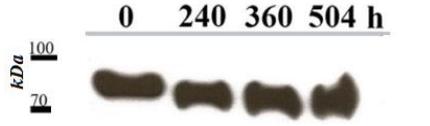
Proteína	Temperatura (°C)	
	22 ± 2	4 ± 1
Titina	Mostró su primer cambio en su peso molecular al día 1, y el segundo cambio a las 84 h.	Mostró sólo el primer cambio que se observó a 22 °C, entre los días 0 y 10.
		
Nebulina	Mostró su primer cambio en su peso molecular al día 1, y el segundo cambio a las 84 h.	Mostró sólo el primer cambio que se observó a 22 °C, entre los días 0 y 10.
		

Tabla 20. Descripción del comportamiento de μ -calpaína en el análisis de western blot, durante 5 días (120 h) a 22 °C y 21 días (504 h) a 4 °C. En las imágenes, de forma horizontal aparece la línea del tiempo, mientras que de forma vertical se indica el peso molecular de los marcadores en kDa. Tomado de Foditsch y colaboradores ⁶.

	Temperatura (°C)	
	22 ± 2	4 ± 1
	Durante los 5 días observaron la subunidad catalítica de 80 kDa, así como un fragmento de aproximadamente 70 kDa (flecha roja).	Observaron la subunidad de 80 kDa durante los 21 días <i>post</i> .
		

De esta manera, las proteínas que fueron resistentes a la proteólisis fueron las del grupo 1, mientras que las proteínas de los grupos 2 y 3 sí fueron susceptibles a la degradación. Sin embargo, en ambas temperaturas de estudio no observaron la degradación completa de ninguna proteína.

Con base en los resultados que se obtuvieron determinaron qué proteínas pueden ser útiles, dependiendo la temperatura ambiente o el IPM. La calsecuestrina-1, Laminina y α -actinina pueden servir para estimar IPM tardíos a temperaturas ambiente frías y calientes, debido a su larga estabilidad tanto a 22 °C, como a 4 °C. La desmina resultó ser una proteína que se puede utilizar en ambas temperaturas, debido a la observación de sus productos de degradación, ya que uno de éstos aparece desde el primer día. La tropomiosina puede servir como un marcador en intervalos tardíos, mientras que nebulina y titina funciona como un marcador de la fase *post mortem* temprana y tardía. TnT es buen biomarcador en la fase *post mortem* tardía, en ambos ambientes. SERCA 1 y 2 sirven como biomarcadores en los inicios de la fase tardía, principalmente, SERCA 1, ya que muestra distintos fragmentos.

Respecto a la μ -calpaína, ésta ha sido propuesta como la principal proteasa en el musculo esquelético. Debido a la gran intensidad de la señal que indica la posible autólisis de su subunidad de 80 kDa a una porción de 70 kDa y su rápida aparición durante el análisis de western blot, no se pudo asumir si hubo autólisis inicial sobre las proteínas de estudio debida a esta proteasa, resultado que es contrario a los hallazgos de Pittner y colaboradores⁵³.

DISCUSIÓN

La determinación del IPM es de gran relevancia en las ciencias forenses debido a la existencia de muertes que no se testificaron, ya sean suicidios, asesinatos o simplemente muertes que ocurrieron de manera natural, al aire libre o en un sitio delimitado.

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes métodos para la determinación del IPM: físicos, biológicos y bioquímicos. Sin embargo, cada metodología presenta ventajas y desventajas, por ejemplo, los métodos físicos tienen la ventaja de poder estimar el IPM sin necesidad de equipos o metodologías costosas, pero muestran la desventaja de tener un intervalo de aplicación más estrecho y quizá por esta razón presentan menor precisión respecto a los métodos biológicos y bioquímicos. Por otra parte, los métodos biológicos, para su correcta interpretación requieren de un amplio conocimiento del medio ambiente, flora y fauna que habitan el lugar.

Por estas razones, tienen importancia los métodos bioquímicos que comprenden metodologías químicas, bioquímicas y analíticas, para cuantificar la variación de los biomarcadores a través del tiempo y así obtener resultados más precisos y confiables. También, para los biomarcadores se cuenta con valores de referencia en humanos, con los cuáles se puede hacer una comparación entre éstos y los hallados en el cadáver. La bioquímica *post mortem* además de ofrecer ventajas sobre otros métodos, se pueden utilizar con un enfoque diferente a la estimación del IPM, que es determinar la causa de muerte.

Los biomarcadores son una opción útil para la determinación del intervalo *post mortem*, pero es necesario destacar que también se ven afectados por distintas variables por lo que deben considerarse los factores que influyen en las determinaciones, para poder hacer uso de la bioquímica *post mortem*, una interpretación correcta y aproximar el IPM.

De los biomarcadores estudiados y reportados en la literatura, los podemos dividir en dos grandes categorías, aquéllos que presentan correlación con el IPM y aquéllos

que no. Así, los que resultan ser útiles, según la información recopilada, son: potasio, la proporción Na/K, hipoxantina, ATP, ARN y las proteínas musculares: TnT, SERCA 2, desmina, SERCA 1, titina y nebulina. En cambio los biomarcadores que no presentaron tener utilidad para la estimación del IPM son: sodio (sólo es útil en combinación con potasio), cloro, calcio, glucosa, Tnlc, tropomiosina y α -actinina. Sin embargo, en el caso de los biomarcadores que no presentaron correlación con el IPM, debido a su estabilidad a través del tiempo, sirven para normalizar como un control interno, mejorando de esta forma las correlaciones, como en el caso de las proteínas musculares: laminina, calsecuestrina-1, α -actinina y tropomiosina, que no mostraron degradación con el tiempo.

De esta forma se estableció una relación cronológica de los biomarcadores que resultan útiles para la determinación del IPM y el intervalo en el que se pueden utilizar, según los hallazgos de esta revisión. La **Figura 7** se tomó del estudio de proteínas de músculo esquelético de Pittner y colaboradores ⁵³, pero es importante mencionar que a esta relación cronológica se le añadieron los biomarcadores: potasio, la proporción Na/K, hipoxantina, ATP y ARN.

En la **Figura 7** se muestra esta relación cronológica, en la cual se podría ampliar el intervalo de estudio de algunos biomarcadores, tales como los miARNs y las proteínas de músculo esquelético y con esto saber el tiempo al cual siguen siendo confiables para la determinación o en el caso de las proteínas: α -actinina, calsecuestrina-1, laminina y tropomiosina para saber a qué IPM se degradan.

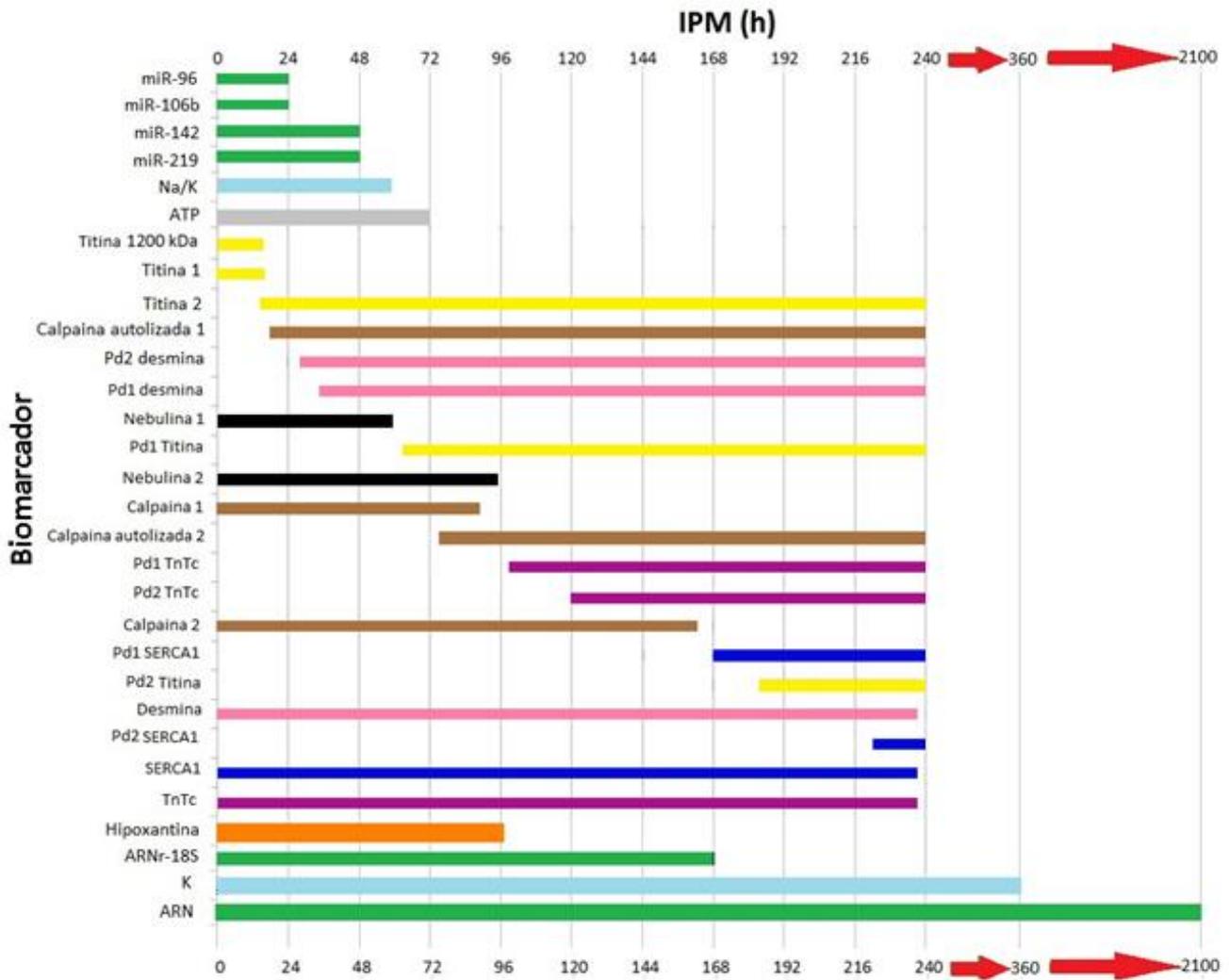


Figura 7. Biomarcadores útiles para la determinación del IPM. Tomado y completado de Pittner y colaboradores ⁵³.

La determinación de potasio es la que más se utiliza para la determinación del IPM debido a su alta correlación. Sin embargo, existen autores que como Chandrakanth y colaboradores ², no encontraron correlación entre sus resultados y el IPM.

La temperatura, es un factor crucial en las determinaciones, dicha influencia, puede provenir de varias fuentes, por ejemplo: la temperatura de almacenamiento del cadáver o en algunos casos de la muestra, la estación del año, así como la región

geográfica donde se realizó la determinación, si es de clima cálido o frío. De esta forma, los biomarcadores útiles en la determinación del IPM para los cuales se demostró la influencia de este factor fueron: potasio, ATP y proteínas del músculo esquelético.

La edad fue otro factor que consideraron algunos los autores. Sin embargo, la mayoría, entre ellos Singh ³⁰ y Chandrakanth ² y colaboradores, respectivamente mencionan que ésta no influye, ya que no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edades. Por otra parte, sólo Zilg y colaboradores ³¹, observaron que la edad influyó en sus determinaciones.

Asimismo, en algunos experimentos que se realizaron con animales, se menciona el rango de edad en los que se encontraban al morir, seguramente con el fin de disminuir la influencia de este factor. Por otra parte, respecto al análisis de troponinas cardíacas y de ARN, no se menciona la edad de los sujetos de los cuales obtuvieron las muestras, por lo que sería importante estudiar estos biomarcadores con el fin de determinar si se afectan con la edad.

En todos los estudios, entre ellos los de Chandrakanth ² y Salam ⁴⁷ y colaboradores, respectivamente, el sexo, no mostró ser un factor que influyera en las determinaciones de los biomarcadores, aunque es importante mencionar que en la mayoría de los estudios con humanos, la mayor parte de muestras a analizar fueron de hombres.

El tipo de muestra que se analiza, demostró ser importante cuando se realiza la interpretación, ya que el mismo biomarcador presenta un comportamiento o correlación distintos en cada fluido. Sin embargo, en este caso también se deben tomar en cuenta los factores que afectan a las determinaciones para considerar las variaciones que pueden presentar los resultados de los diferentes estudios.

La recolección de la muestra también se debe considerar, ya que ésta debe estar íntegra para el análisis. Durante la revisión se encontró la recolección de diversos tipos de muestra y las que se consideran más estables son: el humor vítreo y la pulpa dental. En el caso de la pulpa dental, ésta resulta estar aun más protegida de

los factores ambientales, así como de la degradación. Sin embargo, la determinación que se realizó en esta muestra fue de ARN, por lo que se podrían buscar otros biomarcadores que se puedan analizar con metodologías más sencillas, para así tener una muestra viable en un IPM mayor a un menor costo y que dé resultados confiables.

Por otra parte, también se observó que al tomar la muestra del mismo cadáver se describe de mejor manera el comportamiento de los biomarcadores, ya que se disminuye la variación debida a los individuos.

El volumen o cantidad de muestra, varió en cada investigación. Pero a pesar de esto, se encontraron tendencias y comportamientos similares entre un volumen y otro, por lo que no representa un factor que afecte en la determinación.

Otro aspecto a considerar, es que los autores describen cómo recolectaron la muestra y los criterios de inclusión y exclusión que debían cumplirse para estudiarla. Pero, debería existir una metodología para saber si el biomarcador o la muestra aun son útiles al momento de la recolección. También, se podría implementar un protocolo universal para la recolección de la muestra, y cómo es que debe tratarse antes de someterla a la cuantificación del biomarcador, así como indicar si se puede almacenar y bajo qué condiciones, ya que la variación entre los hallazgos de una investigación y otra podrían surgir en gran medida de estos factores.

El sitio anatómico del cual se extrae la muestra también influye en los hallazgos del biomarcador, un claro ejemplo es el estudio de Chen y colaboradores ⁵², quienes analizaron muestras de sangre que obtuvieron de diferentes sitios, de modo que no encontraron, los mismos niveles de TnTc o Tnlc en cuatro muestras diferentes. Asimismo, se ha sugerido que el sitio del ojo del cual se extraiga el humor vítreo, ya sea la parte central o la parte más cercana a la retina, puede afectar en la determinación de potasio ³². Con base en todos estos hallazgos, es relevante considerar que deben generarse protocolos que indiquen exactamente todas las características de la recolección para evitar sesgos en las determinaciones.

La causa de muerte, también presenta influencia sobre el IPM debido a que determinadas enfermedades pueden afectar los niveles de los biomarcadores. Por ejemplo, en falla renal, los niveles de potasio se afectan, por lo que realizar la determinación de este biomarcador no es útil. De este modo, si no se conoce la causa de muerte y se desea realizar la determinación de potasio para determinar el IPM, previamente se debería realizar una determinación de creatinina, la cual se ha reportado ser muy estable a través del tiempo.

En este sentido, uno de los hallazgos más importantes de esta revisión documental fue el de Passos y colaboradores ²⁴, quienes encontraron que los niveles de hipoxantina presentan un comportamiento colineal al de potasio, es decir, un comportamiento similar a través del tiempo. Por lo que en un determinado momento se podría cuantificar hipoxantina cuando no sea posible cuantificar potasio. Sin embargo, estos dos biomarcadores no pueden incluirse dentro de una misma ecuación, ya que debido a la colinealidad se podría “forzar” a la ecuación para dar un determinado resultado.

Dependiendo del biomarcador que se estudie, existe una o varias metodologías para poder monitorearlo, para el caso en cual existen varias metodologías, se han realizado estudios donde compara si existen diferencias estadísticamente significativas, tal como la experimentación de Passos y colaboradores ²⁴, quienes no encontraron diferencias entre los resultados que obtuvieron con los métodos que tomaron como referencia (fotometría de flama para potasio y CLAR para hipoxantina) y su metodología del SIS, implementada por ellos mismos.

Asimismo, también debe considerarse qué tan bueno resulta realizar una comparación de resultados que se obtuvieron hace más de una década con resultados que se obtuvieron en los últimos dos años, ya que posiblemente la precisión de los equipos más recientes es mayor, por lo que no se puede realizar una comparación bajo las mismas condiciones.

Respecto al análisis de los datos, la mayoría de los autores manejan los niveles del biomarcador como variable independiente y el IPM como variable dependiente. Sin

embargo, algunos autores observaron un aumento en la correlación entre los niveles del biomarcador y el IPM al considerarlos como variable dependiente e independiente, respectivamente. Por lo tanto sería importante realizar también el análisis estadístico considerando los niveles del biomarcador como variable dependiente y el IPM como variable independiente, para observar cual describe mejor la variación del biomarcador.

Para la mayoría de los biomarcadores se establecieron ecuaciones que describieran su comportamiento a través del tiempo, pero también se plantearon ecuaciones que incluyeran más de un biomarcador y más de una variable, como fue el caso de la utilización de la proporción de Na/K; potasio y sodio; potasio e hipoxantina; potasio con hipoxantina y las variables físicas; y la ecuación de interpolación entre ATP, URL y la temperatura. En la mayoría de estos casos aumentó la precisión en la determinación al combinar los biomarcadores y las variables. Sin embargo, se debe considerar que si bien con el aumento de variables incrementa la precisión, se tiene que hacer uso de variables que puedan ser cuantificadas, no sólo darle un valor numérico con base en observaciones a simple vista, ya que de lo contrario se puede afectar la confiabilidad de la determinación.

Por otra parte, el estudio de Young y colaboradores ³, es un ejemplo de que se puede combinar una determinación cuantitativa con una cualitativa, haciendo la transformación correcta de los datos que proporciona ésta última. Ya que transformaron datos de color a un valor numérico a través de un programa computacional y no sólo asignando un valor dependiente de observaciones, que resultan ser subjetivas y en vez de mejorar la determinación, la vuelven menos exacta.

CONCLUSIONES

Existen diferentes métodos para la determinación del IPM, los cuales se clasifican en: físicos, biológicos y bioquímicos. De estos métodos, los que permiten la estimación del IPM con un rango de variación menor son los métodos bioquímicos, de modo que la cuantificación de potasio la que más se utiliza. Sin embargo, se encontraron otros biomarcadores útiles para dicha determinación: la proporción Na/K, hipoxantina, ATP, ARN y algunas proteínas. Así, al utilizar en conjunto estos biomarcadores, con los que no presentan una variación a través del tiempo, para que éstos funcionen como controles internos y permitan normalizar los resultados disminuyendo la variación, se pueda prever un intervalo más exacto y preciso del tiempo real en el que ocurrió la muerte.

Es importante destacar que la cuantificación de todos los biomarcadores se afecta por los múltiples factores internos y externos, tales como: la temperatura, el tipo de muestra y el sitio anatómico del cual se obtiene, el método analítico, la edad, el manejo de las variables, entre otros. Por lo que sería de gran utilidad establecer protocolos que indiquen específicamente, las condiciones bajo las cuales se deben realizar las determinaciones para evitar errores o variaciones innecesarias y así homologar criterios en ciencia forense.

Aunque se cuenta con diferentes biomarcadores para la determinación del IPM, se debe seguir con la búsqueda de otros, que posiblemente presenten ventajas sobre los que ya se utilizan o simplemente para aumentar el número de biomarcadores útiles para este fin y así contar con más opciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mathur, A. & Agrawal, Y. K. An overview of methods used for estimation of time since death. *Aust. J. Forensic Sci.* **43**, 275–285 (2011).
2. Chandrakanth, H. V, Kanchan, T., Balaraj, B. M., Virupaksha, H. S. & Chandrashekar, T. N. Postmortem vitreous chemistry-An evaluation of sodium, potassium and chloride levels in estimation of time since death (during the first 36 h after death). *J. Forensic Leg. Med.* **20**, 211–216 (2013).
3. Young, S. T., Wells, J. D., Hobbs, G. R. & Bishop, C. P. Estimating postmortem interval using RNA degradation and morphological changes in tooth pulp. *Forensic Sci. Int.* **229**, 163.e1–6 (2013).
4. Swain, R. *et al.* Estimation of Post-mortem Interval: A comparison between cerebrospinal fluid and vitreous humour chemistry. *J. Forensic Leg. Med.* **36**, 144–148 (2015).
5. Donaldson, A. E. & Lamont, I. L. Estimation of post-mortem interval using biochemical markers. *Aust. J. Forensic Sci.* **46**, 8–26 (2014).
6. Foditsch, E. E., Saenger, A. M. & Monticelli, F. C. Skeletal muscle proteins : a new approach to delimitate the time since death. *Int J Leg. Med* 1–8 (2015). doi:10.1007/s00414-015-1204-4
7. Corradini, B. *et al.* Estimation of the time of death through the analysis of clock miRNAs expression in blood and vitreous humor. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* **5**, 204–206 (2015).
8. Corradini, B. *et al.* Estimation of the time of death through the analysis of clock miRNAs expression in blood and vitreous humor. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* (2015). doi:10.1016/j.fsigss.2015.09.082
9. Galega, A. & Forenses, D. E. M. *Medicina Legal E Forense.* (2012).
10. Bucholtz, A. in *Death Investigation* 57–69 (2015). doi:10.1016/B978-1-4557-7437-1.00004-1
11. Hillman, H. The physiology of sudden violent death. *Resuscitation* **56**, 129–133 (2003).
12. Madea, B. in *Encyclopedia of Forensic Sciences* 229–238 (2013). doi:10.1016/B978-0-12-382165-2.00188-4
13. Kaliszan, M. First practical applications of eye temperature measurements for estimation of the time of death in casework. Report of three cases. *Forensic Sci. Int.* **219**, (2012).
14. Turchetto, M. & Vanin, S. Forensic entomology and climatic change. *Forensic Sci. Int.* **146**, 207–209 (2004).



15. Pai, C. Y., Jien, M. C., Li, L. H., Cheng, Y. Y. & Yang, C. H. Application of forensic entomology to postmortem interval determination of a burned human corpse: A homicide case report from Southern Taiwan. *J. Formos. Med. Assoc.* **106**, 792–798 (2007).
16. Sharma, R., Kumar Garg, R. & Gaur, J. R. Various methods for the estimation of the post mortem interval from Calliphoridae: A review. *Egypt. J. Forensic Sci.* **5**, 1–12 (2015).
17. Tumram, N. K. Thanatochemistry: Study of synovial fluid potassium. *ALEXANDRIA J. Med.* **50**, 10–13 (2014).
18. Kernbach-wighton, G. & Luna, L. A. Postmortem Biochemistry as an Aid in Determining the Cause of Death. (2014).
19. Collins, A. K. A., Chief, F. & Kim, E. Postmortem Vitreous Analyses. 1–6 (2015).
20. Rose, K. L. & Collins, K. A. Vitreous Postmortem Chemical Analysis. *News Path* (2008).
21. Humbert, J. F. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. *Handb. Toxicol. Chem. Warf. Agents* 371–379 (2009). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744845000274>>
22. Jashnani, K. D., Kale, S. A. & Rupani, A. B. Vitreous humor: Biochemical constituents in estimation of postmortem interval. *J. Forensic Sci.* **55**, 1523–1527 (2010).
23. Davies, I. J. T. *The Clinical Significance of the Essential Biological Metals*. (1972).
24. Passos, M. L. C. *et al.* Estimation of postmortem interval by hypoxanthine and potassium evaluation in vitreous humor with a sequential injection system. *Talanta* **79**, 1094–1099 (2009).
25. Palmiere, C. & Mangin, P. Postmortem chemistry update part I. *Int. J. Legal Med.* **126**, 187–198 (2012).
26. Nishida, A. *et al.* Blood creatinine level in postmortem cases. *Sci. Justice* **55**, 195–199 (2015).
27. Jones, A. W. *Alcohol: Acute and Chronic Use and Postmortem Findings. Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine* **1**, (Elsevier Ltd., 2016).
28. Tumram, N. K., Ambade, V. N. & Dongre, A. P. Thanatochemistry: Study of vitreous humor potassium. *Alexandria J. Med.* **50**, 365–368 (2014).
29. Ahi, R. S. & Garg, V. Role of vitreous potassium level in estimating postmortem interval and the factors affecting it. *J. Clin. Diagnostic Res.* **5**, 13–15 (2011).
30. Singh, D. *et al.* Linearization of the relationship between serum sodium, potassium concentration, their ratio and time since death in Chandigarh zone of north-west India. *Forensic Sci. Int.* **130**, 1–7 (2002).



31. Zilg, B., Bernard, S., Alkass, K., Berg, S. & Druid, H. A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature. *Forensic Sci. Int.* **254**, 158–166 (2015).
32. Mulla, A., Massey, K. L. & Kalra, J. Vitreous humor biochemical constituents: evaluation of between-eye differences. *Am. J. forensic Med. Pathol. Off. Publ. Natl. Assoc. Med. Exam.* **26**, 146–149 (2005).
33. Siddhamsetty, A. K. *et al.* Exploring time of death from potassium, sodium, chloride, glucose & calcium analysis of postmortem synovial fluid in semi arid climate. *J. Forensic Leg. Med.* **28**, 11–14 (2014).
34. Madea, B. & Rödiger, A. Time of death dependent criteria in vitreous humor—Accuracy of estimating the time since death. *Forensic Science International* **164**, 87–92 (2006).
35. Muñoz, J. I. *et al.* A new perspective in the estimation of postmortem interval (PMI) based on vitreous. *J. Forensic Sci.* **46**, 209–214 (2001).
36. Mihailovic, Z., Atanasijevic, T., Popovic, V., Milosevic, M. B. & Sperhake, J. P. Estimation of the postmortem interval by analyzing potassium in the vitreous humor: could repetitive sampling enhance accuracy? *Am. J. Forensic Med. Pathol.* **33**, 400–3 (2012).
37. Adelson, L; Sunshine, I; Rushforth, N.B; Mankoff, M. Vitreous potassium concentration as an indicator of the postmortem interval. *J. Forensic Sci.* **8**, 503–504 (1963).
38. Sturner, W.Q; Gantner, G. E. The postmortem interval. A study of potassium in the vitreous humor. *Am. J. Clin. Pathol.* **42**, 137–144 (1964).
39. Hansson, L; Uotila, R; Lindfors, R; Laiho, K. Potassium content of the vitreous body as an aid in determining the time of death. *J. Forensic Sci.* **11**, 390–394 (1966).
40. Coe, J. I. Postmortem chemistries on human vitreous humor. *Am. J. Clin. Pathol.* **51**, 741–750 (1969).
41. Stephens, R.J; Richards, R. Vitreous humor chemistry: the use of potassium concentration for the prediction of the postmortem interval. *J. Forensic Sci.* **32**, 503–509 (1987).
42. Madea, B., Henssge, C., Honig, W. & Gerbracht, A. References for determining the time of death by potassium in vitreous humor. *Forensic Sci. Int.* **40**, 231–243 (1989).
43. James, R. A., Hoadley, P. A. & Sampson, B. G. Determination of postmortem interval by sampling vitreous humour. *Am. J. forensic Med. Pathol. Off. Publ. Natl. Assoc. Med. Exam.* **18**, 158–162 (1997).
44. Zhou, B; Zhang, L; Zhang, X; Jiang, X. The determination of potassium concentration in vitreous humor by low pressure ion chromatography and its application in the estimation of postmortem interval. *J. Chromatogr. B Anal.*

- Technol. Biomed. Life Sci.* **852**, 278–281 (2007).
45. Bortolotti, F. *et al.* Study of vitreous potassium correlation with time since death in the postmortem range from 2 to 110 hours using capillary ion analysis. *Med. Sci. Law* **51 Suppl 1**, S20–3 (2011).
 46. Siddamsetty, A. K., Verma, S. K., Kohli, A., Puri, D. & Singh, A. Estimation of time since death from electrolyte, glucose and calcium analysis of postmortem vitreous humour in semi-arid climate. *Med. Sci. Law* **54**, 158–166 (2014).
 47. Salam, H. A., Shaat, E. A., Aziz, M. H. A., MoneimSheta, A. A. & Hussein, H. A. S. M. Estimation of postmortem interval using thanatochemistry and postmortem changes. *Alexandria J. Med.* **48**, 335–344 (2012).
 48. Sun, T., Zhang, H., Yang, T. & Liu, L. Changes in ATP levels in rabbit blood and its application for estimation of the postmortem interval. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. [Medical Sci.]* **33**, 452–456 (2013).
 49. Sun, T., Yang, T., Zhang, H., Zhuo, L. & Liu, L. Interpolation function estimates post mortem interval under ambient temperature correlating with blood ATP level. *Forensic Sci. Int.* **238**, 47–52 (2014).
 50. Schmidt, T. M. *et al.* Postmortem ³¹P magnetic resonance spectroscopy of the skeletal muscle: α -ATP/Pi ratio as a forensic tool? *Forensic Sci. Int.* **242**, 172–176 (2014).
 51. Li, W. C. *et al.* Postmortem interval determination using 18S-rRNA and microRNA. *Sci. Justice* **54**, 307–310 (2014).
 52. Chen, J.-H. *et al.* Cardiac biomarkers in blood, and pericardial and cerebrospinal fluids of forensic autopsy cases: A reassessment with special regard to postmortem interval. *Leg. Med.* (2015). doi:10.1016/j.legalmed.2015.03.007
 53. Pittner, S. *et al.* Postmortem degradation of skeletal muscle proteins: a novel approach to determine the time since death. *Int. J. Legal Med.* (2015). doi:10.1007/s00414-015-1210-6