



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
SOCIOSANITARIAS

Estudio de la Quimioluminiscencia medida por
Luminometría y su aplicación en la estimación
de la data de los Restos Óseos.

D. Jesús Sarabia Vicente

2015



UNIVERSIDAD DE MURCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
SOCIOSANITARIAS**

Estudio de la quimioluminiscencia medida por luminometría y su aplicación en la estimación de la data de los restos óseos.

D. Jesús Sarabia Vicente

2015

Directores:

Prof. Dr. D. Aurelio Luna Maldonado

Prof. Dr. D. Juan Pedro Hernández del Rincón

AGRADECIMIENTOS

A Paqui, Javi y Jesús.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Prof. Dr. D Aurelio Luna Maldonado, maestro de toda una generación, director de este trabajo y padre de la idea, tanto en su contenido como en la forma y método, así como por su siempre segura supervisión científica. Sin su decisión, ayuda permanente y su paciencia eterna, éste trabajo nunca hubiese llegado a término.

A mi amigo el Prof. Dr. D. Juan Pedro Hernández del Rincón, por su supervisión y por poner a mi disposición sus vastísimos conocimientos medicolegales que de tanta ayuda y utilidad me han sido y cuya insistencia “casi cicatera” ha sido el motor de mi iniciativa personal en todo este proyecto.

Al Prof. Dr. D. Marcos Sarabia Vicente, por su indispensable ayuda y ejemplo de rigor profesional, tanto en el trabajo de laboratorio como por su profundísimo conocimiento de la química que tan magistralmente me ha transmitido en todo momento.

A la Dra. D^a. Antonia Bernabeu Esclapez del SAI de la UMU por su encantadora generosidad conmigo, haciendo posible que la luminometría pudiera iluminarme en mis oscuras dudas instrumentales.

A mi amigo D. Mateo Nicolás Gambín, técnico de autopsias de la cátedra de Anatomía Patológica de la UMU por poner a mi disposición su enorme habilidad a la hora de tratar los restos óseos con los que hemos trabajado. A Cari Blanco de postgrado de la UMU, siempre informándome de la hora del último tren.

A toda mi familia, porque ha sabido comprender el esfuerzo y dedicación que conlleva la realización de este trabajo, su continuo ánimo, a mi hermano Paco y mis sobrinos, incluido Marcial, víctima de mis abusos matemáticos.

A mis amigos, Gaspar Sánchez Blanco, Alfredo Gómez Hita, Andrés Cánovas Inglés y a José Antonio Sandoval Arracó (In memoriam) por su apoyo práctico, moral y estímulo permanente en todo este proceso.

Y como siempre y no podría ser de otra manera, el recuerdo y el ejemplo de unos padres inolvidables.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. – Estructura y Fisiología del Sistema Óseo	1
1.1. – Generalidades	1
1.2. - Tejido Cartilaginoso	1
1.2.1. - Cartílago hialino	2
1.2.2. - Cartílago elástico	3
1.2.3. – Cartílago fibroso	3
1.3. - Tejido Óseo	4
1.3.1. - Morfología	4
1.3.2. - Estructura del tejido óseo	5
1.3.2.1. - Matriz ósea	5
1.3.2.2. - Células óseas.....	7
1.3.2.3. - Hueso maduro	10
1.3.2.4. - Cavidades óseas	12
1.3.3. - Irrigación del tejido óseo	13
1.3.4. - Inervación del tejido óseo.....	14
1.4. - Mineralización Biológica.	14
1.5. - Variaciones de la masa ósea con la edad.....	16
1.6. - Masa ósea y Osteoporosis	17
1.7. – Aspectos fisiológicos del tejido óseo: Homeostasis del Calcio.....	18
2. - Estimación del Intervalo Postmortem en restos óseos	20
2.1. - Generalidades	20
2.2. – Criterios y Métodos.	22
2.2.1. - Criterios Extrínsecos	22

2.2.2. - Criterios Morfológicos	23
2.2.3. - Criterios Físicos	25
2.2.4. - Criterios Químicos.....	28
2.2.5. - Criterios Histopatológicos	37
2.2.6. - Criterios Biológicos	38
2.2.7. – Otros Criterios.....	39
3. - Hemoglobina y grupo Hemo	41
3.1. - Generalidades	41
3.2. - Biosíntesis del grupo hemo	42
3.3. - Catabolismo del grupo hemo	43
4. - Quimioluminiscencia y Luminol.....	44
4.1.- Quimioluminiscencia.....	44
4.1.1. - Principios generales sobre la quimioluminiscencia	44
4.1.2. - Factores que influyen en la emisión de quimioluminiscencia	48
4.1.3. - La quimioluminiscencia como técnica analítica.....	49
4.1.4. – Instrumentación básica en quimioluminiscencia: Estructura general del luminómetro	50
4.2. - Luminol	52
4.2.1. - Antecedentes históricos	52
4.2.2. – Propiedades físicas y químicas del luminol	53
4.2.3. - Síntesis del luminol	56
4.2.4. - Reacción del luminol	58
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	69
1. - Hipótesis de trabajo	69
2. – Objetivos	69

MATERIAL Y MÉTODOS	70
1. - Instrumental.....	72
2. - Metodología.....	72
3. - Método estadístico.	75
RESULTADOS	80
DISCUSIÓN	124
CONCLUSIONES	134
BIBLIOGRAFÍA	135
ANEXOS	
Anexo I: Valores de QL en URL obtenidas por luminometría en intervalos de 5s para cada una de las muestras estudiadas.	1
Anexo II: Coordenadas de la curva COR para QL35s	14

INTRODUCCIÓN

1. - ESTRUCTURA Y FISIOLOGÍA DEL TEJIDO OSEO.

1.1. - Generalidades

La palabra esqueleto (gr. skeleton) significa materia seca, pero esta denominación difícilmente podrá ser mas errónea. Los tejidos esqueléticos sin duda poseen vida y el conocimiento de su estructura y función conforma la base para comprender, diagnosticar y tratar las enfermedades del esqueleto y lo que influye sobre él (Geneser, 2000).

En los mamíferos, incluido el hombre, los tejidos esqueléticos se limitan en realidad a tres: tejido conectivo de colágeno denso, cartílago y tejido óseo. De éstos, el tejido conectivo de colágeno denso es una variante del tejido conectivo común, mientras que el cartílago y el tejido óseo son formas muy especializadas del tejido conectivo (Geneser, 2000).

1.2. - Tejido cartilaginoso

El tejido cartilaginoso (lat: cartílago; gr: chondros) es una forma especializada de tejido conectivo, compuesto como otros tejidos conectivos por células y componentes extracelulares. A diferencia de otros tejidos conectivos, el cartílago no contiene vasos ni terminaciones nerviosas (salvo las articulaciones) y las células se nutren por difusión a través de la sustancia fundamental (Geneser, 2000).

El tejido cartilaginoso es un tejido avascular compuesto por condrocitos y una abundante matriz extracelular. Producida y mantenida por los condrocitos, la matriz cartilaginosa es sólida y firme, aunque algo maleable.

La gran proporción de glucosaminoglucanos con respecto al colágeno de tipo II en la matriz cartilaginosa permite la difusión de sustancias entre los vasos sanguíneos del tejido conjuntivo circundante y los condrocitos, con lo que se mantienen la viabilidad del tejido. Además, la presencia de una gran cantidad de hialuronano (ácido hialurónico) en la matriz cartilaginosa lo capacita bien para soportar peso (Ross, 2013).

Según las características de la matriz distinguimos cartílago hialino, elástico y fibroso.

1.2.1. - Cartílago hialino

En estado fresco, el cartílago hialino tiene un aspecto verdoso azulado (gr. hyalos, vidrio). Es el más abundante y se le describe como ejemplo general de cartílago. En el individuo adulto aparece en los cartílagos costales, como parte del esqueleto nasal, en la laringe, en la tráquea, en los bronquios y en las superficies articulares (Geneser, 2000). Se distingue por tener una matriz amorfa y homogénea y los condrocitos.

La matriz se produce por los condrocitos y contiene tres clases principales de moléculas:

- a) Moléculas de colágeno: la mayor parte colágeno tipo II, también el colágeno tipo XI que regula el tamaño fibrilar, colágeno tipo IX que facilita la interacción de la fibrilla con las moléculas de proteoglicanos de la matriz y el colágeno tipo X que organiza las fibrillas colágenas en una red hexagonal tridimensional (serían los colágenos condroespecíficos). También hay colágeno tipo VI en su mayoría en la periferia de los condrocitos donde contribuye a la adhesión de estas células a la armazón matricial.
- b) Proteoglicanos: tres clases de glucosaminoglicanos: hialuronato, condroitín sulfato y queratán sulfato. Estos dos últimos con una proteína central forman el monómero de proteoglicano, y 80 de ellos se unen a una molécula hialuronano, formando grandes agregados de proteoglicanos de hialuronato.
- c) Proteínas no colágenas: actúan sobre la interacción entre los condrocitos y la matriz y tienen valor clínico como marcadores de recambio y de la degeneración del cartílago, como la fibronectina y la tenascina.

La matriz del cartílago hialino está muy hidratada, entre los 60-80 % del peso neto corresponde a agua, favoreciendo la difusión de metabolitos pequeños y la elasticidad (Ross, 2013).

Condrocitos: Son células especializadas que producen y mantienen la matriz extracelular y se encuentran en las lagunas o condroplastos. Su citoplasma varía en función de la actividad de la célula. En su ciclo mas activo de síntesis proteica el citoplasma es muy basófilo y presenta un gran aparato de Golgi. Al microscopio

electrónico de transmisión (MET) el condrocito activo exhibe abundantes perfiles de RER, un aparato de Golgi prominente, gránulos de secreción, vesículas, filamentos intermedios, microtúbulos y microfilamentos de actina. A menudo, los condrocitos maduros contienen cantidades importantes de grandes gránulos de glucógeno y pequeñas gotas de lípido.

El cartílago hialino es el precursor del tejido óseo que se origina por osificación endocondral, en un primer momento podemos decir que es un molde óseo, que con el desarrollo se reemplaza por tejido óseo y termina persistiendo de forma activa como placa epifisaria de crecimiento en longitud.

El cartílago hialino se encuentra rodeado por el pericondrio, que es un tejido conjuntivo denso y que además es fuente de nuevas células cartilaginosas, aunque no las encontraremos en aquellos casos en que el cartílago tiene una superficie libre, como ocurre en las superficies articulares y en las regiones en que el cartílago entra en contacto directo con el hueso (cartílagos costales y nasales).

1.2.2. - Cartílago elástico

Caracterizado por fibras elásticas y láminas elásticas además del material de matriz del cartílago hialino. Se distingue del hialino por presentar gran cantidad de fibras elásticas en la matriz, aunque también es muy rico en colágeno tipo II. Aparece formando parte del cartílago de la epiglotis, en el pabellón auricular, en las paredes del conducto auditivo externo y en la trompa de Eustaquio. A diferencia de los otros cartílagos no se calcifica con el envejecimiento. A simple vista el cartílago elástico es amarillento y presenta mayor elasticidad y flexibilidad que el cartílago hialino.

1.2.3. - Cartílago fibroso

Es una forma de transición entre el tejido conectivo denso y el cartílago hialino, dado que se compone de una combinación de fibras densas de colágeno y de condrocitos ubicados en lagunas y rodeados por cantidades variables de matriz hialina. No hay pericondrio. Se encuentra en los discos intervertebrales, la sínfisis pubiana, los discos articulares de las articulaciones esternoclavicular y temporomaxilar, los meniscos de la

rodilla y en las inserciones tendinosas. Está adaptado para soportar fuerzas de compresión y distensión, siendo un buen amortiguador (Ross, 2013).

1.3. - Tejido óseo

El hueso, como los restantes tejidos conjuntivos, está formado por células y matriz extracelular, aunque a diferencia de los otros componentes extracelulares están mineralizados y lo convierten en un material duro, firme e idealmente adecuado para la función de soporte y protección. Proporciona apoyo interno al cuerpo y ofrece lugares de inserción a los músculos y tendones que son esenciales para el movimiento. Protege a los órganos vitales en la cavidad craneal, torácica y raquis y envuelve a los órganos formadores de la sangre de la médula ósea (Bloom-Fawcett, 1995).

El hueso tiene una notable combinación de propiedades físicas: alta resistencia a la tracción y a la compresión, mientras que al mismo tiempo tiene cierta elasticidad y la ventaja de ser un material relativamente ligero (Bloom-Fawcett, 1995). El mineral depositado es fosfato cálcico en la forma de cristales de hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. En virtud de su contenido mineral el tejido óseo sirve también como depósito de calcio y fosfato. Tanto el calcio como el fosfato pueden ser movilizados de la matriz ósea y captados por la sangre según sea necesario para mantener las concentraciones adecuadas en todo el organismo. Por tanto, el tejido óseo desempeña un papel importante en la regulación homeostática de la calcemia (Ross, 2013).

El hueso es un material vivo y dinámico que está siendo renovado continuamente. La falta de movimiento es seguida de atrofia y pérdida de sustancia ósea; su uso aumentado se acompaña de hipertrofia con incremento de masa ósea.

1.3.1. - Morfología

Al examinar la superficie de corte de un hueso se pueden identificar macroscópicamente dos tipos estructurales completamente diferenciados. Por una parte, una capa densa y compacta que encontramos en la superficie externa, tejido óseo compacto, y otra una estructura en forma de malla de aspecto esponjoso, en la zona interna, compuesta por trabéculas (delgadas espículas de tejido óseo anastomosadas) y que constituye el tejido óseo esponjoso.

Según su forma, también se distinguen cuatro tipos de huesos:

- a) Huesos largos: predomina la longitud y están compuestos por una diáfisis y dos epífisis (ej: fémur). La parte dilatada entre epífisis y diáfisis es la metáfisis. En la diáfisis predomina el tejido compacto y en la epífisis el esponjoso.
- b) Huesos cortos: las tres dimensiones son casi iguales.
- c) Huesos planos: delgados y anchos, como los huesos de la calota craneana o el esternón, y están estructurados por dos capas de tejido compacto con una interpuesta de esponjoso.
- d) Huesos irregulares: aquellos inclasificables en las clases anteriores (Ross, 2013).

1.3.2. - Estructura del tejido óseo.

En la estructura del tejido óseo debemos considerar la matriz ósea y las células óseas.

1.3.2.1. - Matriz ósea

La sustancia intersticial del hueso está constituida por dos componentes principales, una matriz orgánica que representa el 35 % de la misma, y las sales inorgánicas que comprenden el 65 % del peso seco.

1. **MATRIZ ORGÁNICA:** está compuesta por fibras de colágeno incluidas en una sustancia fundamental rica en proteoglicanos. Se mineralizan para formar tejido óseo.

- a) Colágeno: los principales componentes estructurales de la matriz ósea son el colágeno tipo I y, en menor medida el colágeno tipo V. En la matriz también se han encontrado vestigios de otros tipos de colágeno, como los tipos II, XI y XIII. La suma de los colágenos suponen el 90 % del total del peso de las proteínas de la matriz.
- b) Sustancia fundamental (proteínas no colágenas): aunque sólo representan el 10 % del peso total de las proteínas de la matriz, son indispensables para el

desarrollo, crecimiento, remodelado y reparación del hueso. Se describen cuatro grupos principales de proteínas no colágenas:

b.1) Macromoléculas de proteoglicanos: proteína central con diversas cadenas de glucosaminoglicanos (hialuronatos, condroitín-4-sulfato, condroitina-6-fosfato y queratán-sulfato), que proporcionan al hueso resistencia a la compresión y fijan los factores del crecimiento e inhiben la mineralización.

b.2) Glucoproteínas multiadhesivas: son las responsables de la adhesión de las células óseas y las fibras colágenas a la sustancia mineralizada. Osteonectina, sialoproteínas como la osteopontina y las sialoproteínas I y II cada una con una función específica.

b.3) Proteínas dependientes de la vitamina K osteoespecíficas: osteocalcina capturadora de calcio, la proteína S y la proteína Gla matricial (MGP).

b.4) Factores de crecimiento y citocinas que son proteínas reguladoras pequeñas entre las que se encuentran los factores de crecimiento, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), las proteínas morfogénicas óseas (BMP) y las interleucinas (IL-1, IL-6). Los miembros más singulares de este grupo son las BMP porque inducen la diferenciación de las células mesenquimáticas en osteoblastos, las células formadoras del tejido óseo. La BMP7 humana recombinante, también conocida como proteína osteogénica 1 (OP-1), actualmente se utiliza clínica para inducir el crecimiento óseo después de ciertas cirugías como las que implican una pérdida importante de masa ósea, o fusiones columnares o implantación de materiales de injerto (Ross, 2013).

2. SALES INORGÁNICAS: la porción inorgánica o hidroxapatita cálcica, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ es el mineral que otorga resistencia y dureza al hueso y donde se aloja el 99% del calcio, el 85% del fósforo y el 65% del sodio y el magnesio del organismo. Además de fosfato cálcico, podemos encontrar otras sales inorgánicas como carbonato cálcico, fosfato magnésico, fluoruro cálcico y sales alcalinas, entre otras. Las sales forman cristales de hidroxapatito. Estos cristales son diminutos, tienen forma de aguja o placa,

delgada y alargada, de 400Å de longitud, 10 a 30 Å de espesor y 100Å de ancho. En cada cristal se distinguen tres capas, la interior, una de hidratación y otra superficial. La capa de hidratación facilita el intercambio de iones entre la hidroxiapatita y los líquidos orgánicos. Los cristales óseos son diminutos e impuros, ya que contienen otros muchos iones además de los iones calcio, fosfato e hidroxilo de la hidroxiapatita sintética pura.

Hay además entre las sales del hueso, iones de carbonato, citrato, magnesio, sodio, potasio y fluoruro; sin embargo, los estudios de difracción de rayos X no permiten individualizar sus cristales. Ello parece indicar que se encuentran absorbidos en la superficie de los cristales de hidroxiapatito, en lugar de estar organizados en cristales propios y distintos. También hay trazas de hierro, zinc, cobre, plomo, manganeso, estaño, aluminio, estroncio, boro y silicio. Los cristales óseos se distribuyen de forma regular, a intervalos de 600 a 700 Å a lo largo de las fibras de colágeno; uniéndose firmemente a ella y estando rodeados por sustancia fundamental. Las fibras colágenas tienen gran fuerza tensil y las sales de calcio gran fuerza de compresión.

1.3.2.2. - Células óseas

En la matriz ósea mineralizada encontramos unas lagunas u osteoblastos en donde se aloja la célula ósea específica, el osteocito, y de dichas lagunas parten unos canalículos por donde discurren las prolongaciones de los osteocitos, los cuales contactan por medio de uniones de hendidura con las prolongaciones de otros osteocitos. En los osteocitos descansa la vitalidad del tejido óseo. Además de los osteocitos encontramos en el tejido óseo cuatro tipos celulares, dos de ellos precursores de los mismos como son las células osteoprogenitoras y los osteoblastos, y por otra parte los osteoclastos y las células de revestimiento óseo.

1) Células osteoprogenitoras: Derivan de las células madre mesenquimáticas de la médula ósea, desencadenándose la diferenciación hacia osteoblastos por un factor proteico de transición llamado factor fijador central alfa 1 (BFA1). Los BMP también desempeñan un papel en la diferenciación de los osteoblastos. Esta célula en reposo puede transformarse en osteoblasto y secretar matriz ósea. Se hallan en la capa más interna y profunda del periostio y son las células endósticas que tapizan las cavidades medulares,

los conductos de Havers y los de Volkmann. También podrían hallarse en la microvasculatura que irriga el tejido óseo.

2) Osteoblasto: es una célula secretora con capacidad de dividirse y cuando madura y está completamente rodeada de osteoide o matriz no mineralizada se convierte en osteocito. Secreta colágeno tipo I, proteínas fijadoras de calcio (osteoclacina y osteonectina), glucoproteínas multiadhesivas, sialoproteínas óseas I y II, la osteopontina y la trombospondina, proteoglicanos diversos y sus aglomeraciones y fosfatasa alcalina (Ross, 2015). También pueden producir factores de crecimiento óseo y muestran receptores en la superficie celular para diversas hormonas, vitaminas y citocinas. Participan en la reabsorción ósea del osteoide favoreciendo por ello la acción del osteoclasto sobre la matriz mineralizada (Bloom-Fawcett, 1995). Inicia el proceso de calcificación de la matriz mediante la secreción de vesículas matriciales muy ricas en fosfatasa alcalina. En el microscopio óptico es una célula cuboide que se dispone de forma estratificada en las zonas de formación de hueso, mientras que al microscopio electrónico se ven las prolongaciones citoplasmáticas que se comunican atravesando el osteoide con los de otros osteoblastos e incluso osteocitos por medio de uniones de hendidura (Ross, 2013).

3) Osteocitos: proceden del osteoblasto que una vez rodeado completamente por osteoide se convierte en áquel, siendo a partir de ahora la célula responsable de toda la histofisiología ósea. Cada osteocito ocupa su laguna y se comunica por sus prolongaciones citoplasmáticas con otras células similares. Son los responsables de mantener la matriz ósea. Al microscopio electrónico se distinguen tres tipos de esta estirpe celular que se corresponden con respectivos estados funcionales: a) osteocitos latentes que están rodeados de una lámina de matriz calcificada madura, b) osteocitos formativos, cercanos a los osteoblastos y rodeados de osteoide en su laguna y c) osteocitos resorptivos con abundantes lisosomas y secretores de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) que degradan colágeno (osteolisis osteocítica) y que se encarga en parte de mantener las concentraciones sanguíneas del calcio y no de la remodelación ósea.

4) Células de revestimiento óseo: también derivan de los osteoblastos y los encontramos en la capa más superficial del endostio y del periostio y se cree que además intervienen en el mantenimiento de los osteocitos subyacentes y en la transferencia del calcio y del

fósforo entre el hueso y la sangre (Ross, 2013). También se les conoce como osteocitos superficiales y osteoblastos en reposo.

5) Osteoclastos: el hueso sufre durante toda la vida un proceso intenso de remodelación y renovación a través del cual se elimina la matriz ósea en múltiples puntos y es sustituida por hueso neoformado. En este proceso, las células que llevan a cabo la reabsorción ósea son los osteoclastos, que alcanzan 150 μm de diámetro y pueden presentar hasta 50 núcleos. Estas células ocupan unas concavidades superficiales denominados lagunas de Howship, que se deben a la acción erosiva del osteoclasto sobre el hueso subyacente (Bloom-Fawcett, 1995). Estas células no están emparentadas con los osteoblastos, sino que proceden de la fusión de las células progenitoras hematopoyéticas, como CFU-GM y CFU-M. Las células del estroma de la médula ósea secretan citocinas que al actuar sobre CFU-GM las diferencian en osteoclastos y macrófagos. Entre las citocinas se encuentran el factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF), el factor de necrosis tumoral (TNF) y varias interleucinas (Ross, 2013).

Las células predestinadas a convertirse en osteoclastos (precursores osteoclásticos) expresan en su superficie una molécula receptora (RANK) que interacciona con la molécula ligando secretada por las células del estroma (RANKL). La conjugación RANK-RANKL es indispensable para la maduración y diferenciación en osteoclastos, los cuales a su vez pueden producir la osteoprotegerina (OPG) que bloquea RANK y evita el ligando RANK-RANKL y por tanto se inhibe la formación de osteoclastos. Esta OPG está a su vez regulada metabólicamente por IL-1, TNF, vitamina D y prostaglandina E2. Todo sucede, puesta en marcha o inhibición funcional, por el sistema OPG-RANKL, el cual puede a su vez ser determinados con finalidad clínica (Ross, 2013). Para que sea eficaz la acción de las hidrolasas lisosómicas que secretan los osteoclastos en los espacios extracelulares comprendidos entre las microvellosidades, para degradar el colágeno y otras proteínas, es preciso que se produzca la descalcificación de dicha matriz y por tanto necesaria una previa acidificación. De dicha acidificación también se encarga el osteoclasto. Para ello y gracias a la anhidrasa carbónica II intracelular, se produce ácido carbónico CO_3H_2 a partir de CO_2 y H_2O , dividiéndose el carbónico en bicarbonato (HCO_3^-) y un protón (H^+) que son bombas protónicas de ATP para el espacio extracelular disminuyendo el pH. La membrana celular permanece neutra por canales de Cl y el exceso de bicarbonato se intercambia con ión Cl mediante proteínas

intercambiadoras de Cl y bicarbonato de la membrana basolateral. El descenso del pH extracelular descompone la hidroxiapatita en iones Ca, fosfatos inorgánicos solubles y agua, y una vez completada la reabsorción ósea los osteoclastos sufren un proceso de apoptosis.

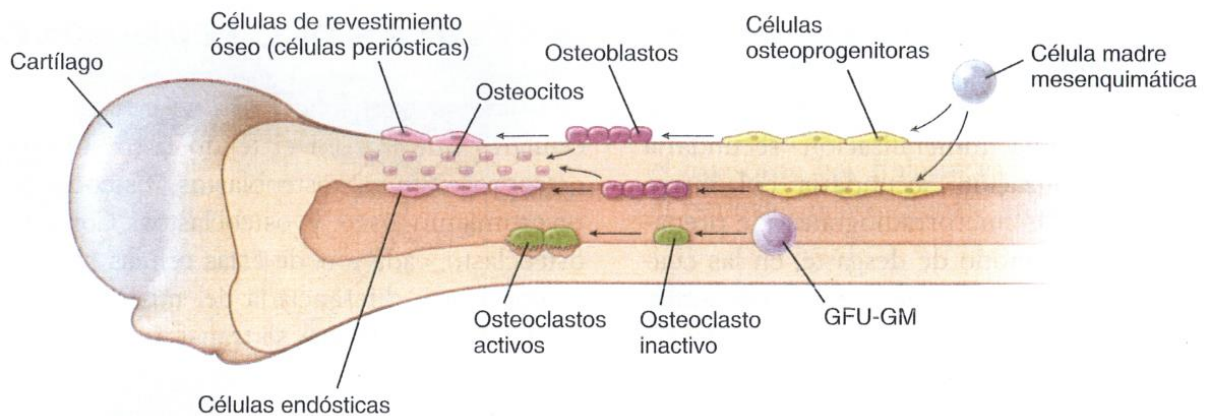


Figura 1. Estirpes celulares (Ross 2013)

1.3.2.3. - Hueso maduro

La unidad histológica fundamental del hueso maduro es la osteona, la cual es muy evidente en el hueso compacto. Una osteona consiste en laminillas concéntricas de matriz ósea que adoptan una forma de cilindro y que envuelven un conducto o cavidad central al que se llama conducto de Havers o conductillo osteónico, en el cual discurren vasos y nervios y que sirve para el intercambio de sustancias entre los osteocitos y los vasos sanguíneos.

Esta primera capa de matriz envolvente se ve rodeada asimismo de capas sucesivas de laminillas con la característica de que conforme se van superponiendo presentan diferente orientación en sus fibras de colágeno. Entre las diferentes osteonas se pueden ver segmentos circulares de restos de fibras concéntricas de otras osteonas que se les conoce como laminillas intersticiales. El eje longitudinal de una osteona suele estar paralelo al eje longitudinal del hueso. Esta organización del hueso maduro también se denomina hueso laminillar.

En esta organización se encuentran unos conductos perforantes que comunican el conducto de Havers con el periostio, con el endostio y entre ellos, dispuestos radial y perpendicularmente y que se conocen como conductos de Volkmann o conductos perforantes. Histológicamente también se diferencian de los primeros en la ausencia de laminillas concéntricas.

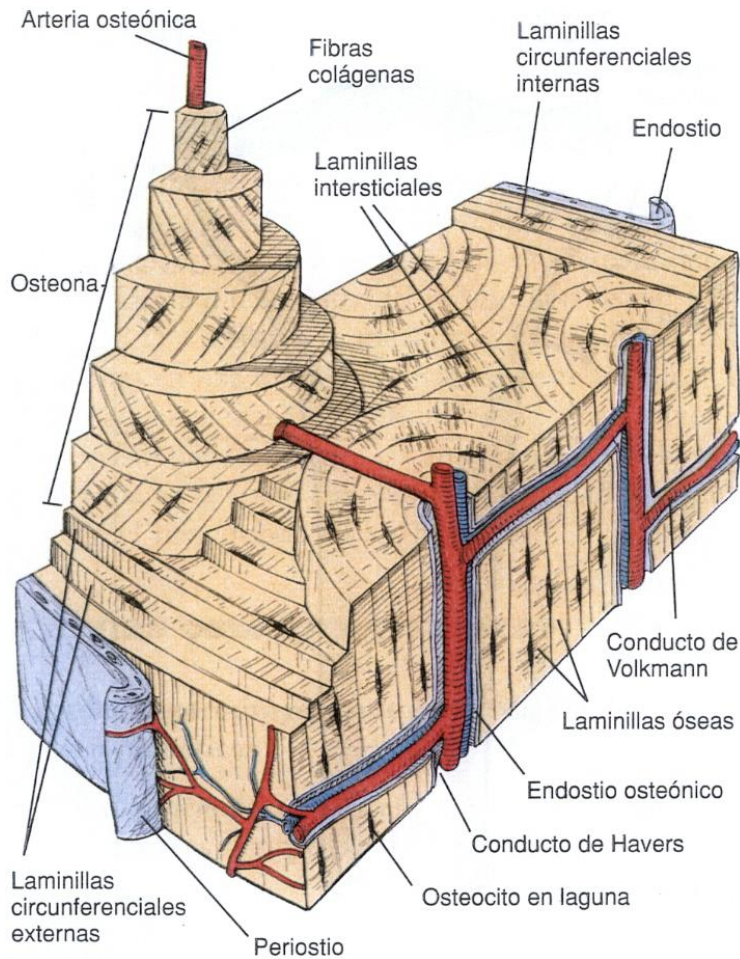


Figura 2. Estructura de hueso maduro (Ross 2013)

El hueso esponjoso también tiene estructura laminillar, sólo que a diferencia del compacto se distribuye en forma de trabéculas entre las cuales distinguimos cavidades medulares que se comunican entre sí.

1.3.2.4. - Cavidades óseas

El tejido que reviste tanto el hueso compacto que limita la cavidad medular como las trabéculas del hueso esponjoso se conoce como endostio. El endostio no suele ser mayor de una capa celular de espesor y sus células pueden diferenciarse en osteoblastos en respuesta a los estímulos adecuados. Estas células osteoprogenitoras, llamadas células endósticas, son aplanadas y se parecen a fibroblastos (Ross, 2013).

La cavidad medular y los espacios del hueso esponjoso contienen médula ósea. Se distinguen distintas variedades de médula ósea:

- a) **Medula ósea roja:** Se compone de células de las progenies hematopoyéticas en diferentes etapas evolutivas y una red de fibras y células reticulares que funcionan como un almacén de sostén para los vasos y las células en desarrollo (Ross, 2013). La médula ósea fetal y en el adulto está en el interior de las areolas de diferentes huesos de estructura esponjosa (cuerpos vertebrales, base craneal, costillas, esternón), teniendo un papel importante en la osificación y en la hematopoyesis. Debe su color al gran número de glóbulos rojos que contiene, en diversas etapas de su desarrollo, siendo la que produce activamente glóbulos sanguíneos. En ella se diferencian dos compartimentos, el hematopoyético y el vascular. El primero está constituido por células grasas y células hematopoyéticas. El vascular está formado por sinusoides medulares.

A medida que el niño crece, la cantidad de médula roja no aumenta en proporción con el crecimiento óseo. A mayor edad y en el adulto, cuando el ritmo de producción de células sanguíneas disminuye, la cavidad medular está ocupada en su mayor parte por tejido adiposo y recibe el nombre de médula ósea amarilla. En el adulto la médula roja está normalmente restringida a los espacios del hueso esponjosos de muy pocos sitios, como el esternón y las crestas ilíacas. Las muestras óseas diagnósticas y la médula para trasplantes se obtienen de estos sitios (Ross, 2013).

- b) **Medula ósea amarilla:** llena casi la totalidad de cavidades óseas del adulto, principalmente el conducto diafisario de los huesos largos. Debe su color a la gran

cantidad de grasa que contiene. Aunque la médula amarilla conserva en potencia la capacidad de producir glóbulos rojos, su tarea fundamental es la de almacenar grasa. La masa total de médula ósea pesa en el adulto por término medio 2600 g. La médula ósea supera en masa a todos los órganos, salvo la sangre, la musculatura y el esqueleto y contiene hasta un 10% de la sangre total. La médula ósea posee vasos y nervios; los primeros provienen de la arteria nutricia y de las arterias periósticas y terminan en una red capilar. De igual modo los nervios son ramificaciones de los que acompañan a la arteria nutricia y otros surgen de la red perióstica. En las enfermedades consuntivas y en la vejez avanzada desaparece la grasa y en su lugar aparece una masa gelatinosa o médula ósea blanca (Leonhart, 1975).

1.3.3. - Irrigación del tejido óseo

Distinguimos tres caudales vasculares que aportan sangre a los huesos. Las arterias nutricias de las metáfisis, las arterias epifisarias y las arterias metafisarias.

Un hueso largo es recorrido por una o dos arterias principales, las arterias nutricias de la diáfisis, que ingresan a través del agujero nutricio y el conducto nutricio, normalmente de localización anatómica constante y que llega hasta la cavidad medular, dividiéndose en dos ramas que discurren en direcciones opuestas entre sí a lo largo de la cavidad y que se denominan arterias longitudinales centrales. A su vez dan ramificaciones radiales que discurrirán desde la médula hacia la periferia. Por otro lado, se encuentran las numerosas arterias metafisarias y epifisarias que irrigan los extremos óseos, perforan y llegan a toda la estructura esponjosa, dando ramificaciones que confluyen con las que proceden de la arteria nutricia. Las arterias epifisarias y metafisarias son más importantes desde el punto de vista cuantitativo y pueden reemplazar la irrigación arterial de la diáfisis.

En el tejido óseo las arterias están compuestas por una única capa de endotelio rodeada por una delgada capa de tejido conectivo de sostén.

Los sinusoides venosos de la médula convergen en la vena longitudinal central y otras ramificaciones que como capilares arteriales, pasan al hueso compacto, donde continúan como los vasos de Volkmann y Havers. La vena longitudinal central

desemboca en venas que acompañan a la arteria nutricia fuera del hueso, o perforan la diáfisis de forma independiente como venas emisarias. Las vénulas que discurren por los conductos de Havers y Volkmann llegan hasta el exterior y se anastomosan en el plexo perióstico, el cual recibe sangre de las arterias musculares adosadas, que forman anastomosis longitudinales en la capa externa del periostio. Desde allí, un plexo capilar atraviesa la capa profunda del periostio.

Las grandes arterias epifisarias se anastomosan activamente dentro del tejido óseo y emiten ramificaciones en dirección de la superficie articular, donde forman arcadas anastomosadas cerca del cartílago articular. Las arterias terminales perforan la delgada capa de hueso compacto y continúan hacia el interior de la zona profunda calcificada del cartílago articular, para regresar a los sinusoides venosos de la epífisis (Geneser, 2000).

Con respecto a la nutrición del hueso, los conductos de Volkmann proveen la vía de entrada principal para los vasos que atraviesan el tejido óseo compacto. Los vasos sanguíneos de menor calibre se introducen en los conductos de Havers, donde se pueden encontrar una arteriola y una vénula o solo un capilar (Ross, 2013).

1.3.4. - Inervación

Los nervios se encuentran en gran número en las epífisis de los huesos largos, en las vértebras y en los huesos planos grandes. En las capas de periostio se distinguen numerosas ramificaciones de estos nervios, y de aquí parten delgados filetes nerviosos que acompañan las venas nutricias hacia el interior del hueso, hasta alcanzar los conductos de Havers. El periostio es muy sensible a los estímulos dolorosos (Gesener, 2000).

1.4. - Mineralización biológica

La mineralización se produce en la matriz extracelular del hueso. En la matriz hay colágeno y sustancia fundamental y la mineralización se produce tanto dentro como fuera

de las fibrillas colágenas en relación con los componentes de la sustancia fundamental. A pesar de su localización extracelular y del hecho de que los factores fisicoquímicos son fundamentales para el proceso, la mineralización biológica es un fenómeno regulado por células.

Para que se inicie la mineralización la concentración de Ca^{2+} y de PO_4^- en la matriz debe de superar el nivel umbral normal. En un primer momento la osteocalcina y otras sialoproteínas fijan el Ca^{+2} extracelular conllevando una concentración alta del mismo, que a su vez aumenta la concentración de PO_4^- , el cual a su vez estimula el aumento de la concentración de Ca^{+2} . Ante el aumento de Ca^{+2} y de PO_4^- , los osteoblastos liberan vesículas matriciales (50 a 200 nm de diámetro) a la matriz ósea, ricas en fosfatasa alcalina y pirofosfatasa que liberan más iones PO_4^- de otras moléculas de la matriz. Las vesículas matriciales que acumulan Ca^{+2} y escinden iones de PO_4^- determinan un aumento de punto isoelectrico local, lo que produce la cristalización de PO_4Ca en las vesículas matriciales circundantes. Los cristales de PO_4Ca inician la mineralización de la matriz por formación y depósito de cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ en la matriz que rodea a los osteoblastos.

Las vesículas matriciales de los osteoblastos son los factores esenciales en el control del sitio donde se inicia el depósito de mineral en el osteoide. Una vez precipitados los primeros cristales de hidroxiapatita crecen con rapidez por acreción hasta que se unen con los cristales vecinos producidos alrededor de otras vesículas matriciales. De esta manera, una onda de mineralización recorre el osteoide. Otras células que producen osteoide son los ameloblastos y los odontoblastos de los dientes en desarrollo (Ross, 2013).

Por difracción de RX se pudo caracterizar los microcristales de hidroxiapatita. Estos cristales de facies prismática hexagonal, con frecuencia deprimidos, formando delgadas tabletas de $85 \times 250 \times 500 \text{ \AA}$, se disponen ordenadamente y en forma prácticamente continua (como un pavimento) sobre la superficie de las fibras de colágena, de modo que se orientan según sus ejes principales permaneciendo en su posición, en virtud de una especial afinidad química; de esta forma las fibrillas forman un conjunto sólido que comunica al tejido su capacidad de resistencia a la tracción, torsión y flexión (Hernández, 2001).

1.5. - Variaciones de la masa ósea en las diferentes edades de la vida

Durante el crecimiento, la cantidad de materia orgánica por unidad de volumen, permanece relativamente constante, pero la cantidad de agua disminuye y la proporción de mineral óseo aumenta. Las modificaciones de la masa mineral acompañan al crecimiento y a la senectud.

A partir de los 20-22 años la masa esquelética permanece constante, ya que los ritmos de formación y reabsorción, además de bajos son prácticamente iguales, alcanzando su valor máximo a los 30 años. Se puede decir que entre 30 y 40 años el balance es neutro y la masa esquelética es estable (Serrano, 1977). Siguiendo esta cinética a partir de la quinta década el balance comienza a ser negativo perdiéndose de forma progresiva masa esquelética.

El sexo influye notablemente en este ritmo negativo, de tal forma que la pérdida de masa esquelética es mayor en la mujer que en el hombre y se produce asimismo de forma desigual en distintas partes del esqueleto. En el anciano puede llegar a haber una pérdida de masa esquelética entre el 30 y el 50% de la que se poseía a los 30 años, y ello porque la reducción de la formación no es capaz de compensar el ritmo de reabsorción mantenido a lo largo de la edad (Krane y Holick, 1989).

La pérdida de masa ósea se observa tanto en el hueso esponjoso como en el compacto. Así en la esponjosa y trabecular, el desequilibrio entre formación y reabsorción lleva consigo pérdidas de trabéculas con perforaciones de las mismas que conlleva una reducción de tabiques y un aumento de cavidades. En el hueso compacto y en zonas corticales, por el mismo mecanismo y a nivel endóstico se va produciendo un aumento del canal medular a expensas de la reabsorción no compensada de la cortical. Este efecto también se produce a nivel de los conductos de Havers, lo que produce un ensanchamiento secundario de la circunferencia del hueso.

Balthazard, Muller y Lebrun (1910) estudiaron las transformaciones histológicas que se producen en los huesos durante el crecimiento, concluyendo que con la edad aumenta el diámetro de los mismos. De tal forma que en el recién nacido aquél es de 25-

30 μ , llega a los 20 años a las 35 μ , a los 50 años miden unas 40 μ y en los ancianos 45 μ (Villanueva y Castilla, 1988).

En definitiva podemos concluir con respecto a la pérdida de la masa ósea que es un componente universal del proceso de envejecimiento:

- Con la edad se pierde hueso en todo el esqueleto pero de forma desigual.
- El sexo es determinante en el momento del inicio de dicha pérdida, de tal forma que en la mujer se inicia el proceso unos diez años antes que en el hombre. Asimismo el proceso una vez instaurado, es mucho más acelerado en la mujer que en el hombre.
- Afecta tanto al hueso compacto como esponjoso trabecular y se inicia en ambos a nivel endóstico.
- Se produce siempre un aumento de la cavidad medular con un discreto aumento del diámetro óseo.
- La reabsorción ósea aumenta con la edad, en tanto que la formación disminuye.

1.6. - Masa ósea y osteoporosis

El término osteoporosis significa hueso poroso y aparece por disminución de la masa ósea. La osteoporosis, en el humano, puede ser localizada o generalizada, y en este caso tendremos que contemplar que puede ser tanto primaria o secundaria a una serie de afecciones. Cuando el término osteoporosis se usa sin calificativos, suele referirse a las variedades más frecuente de osteoporosis, senil y postmenopáusica, en las que la pérdida de masa ósea hace que el esqueleto se vuelva vulnerable a las fracturas. Con la edad, y una vez que se obtiene la máxima masa esquelética, se va produciendo un déficit de osteoformación cada vez que se repite el ciclo de resorción y formación ósea. La pérdida de hueso relacionada con la edad (0,7 % anual) es un fenómeno biológico normal y previsible (Robbins, 1999).

Los descubrimientos de la biología molecular del hueso han aportado interesantes hipótesis patogénicas sobre esta enfermedad. En la osteoporosis senil, los osteoblastos de los ancianos tienen menos capacidad de reproducción y biosíntesis y las proteínas unidas a la matriz extracelular (como los factores de crecimiento) pierden su fuerza biológica

con el tiempo. El resultado final es un esqueleto poblado por células formadoras de hueso que han perdido parte de esa capacidad. Se ha comprobado que la disminución del ejercicio físico también acelera la osteoporosis ya que las fuerzas mecánicas son un estímulo importante para la remodelación ósea normal.

Dietas bajas en calcio en edades de crecimiento, condicionan bajas masas óseas que predispondrán a padecer esta enfermedad con el paso de los años. Como factores genéticos hay que tener en cuenta el polimorfismo de la molécula receptora de la vitamina D cuya alteración es responsable del 75% aproximadamente de la masa ósea máxima que se obtiene. Entre los factores hormonales, el déficit de estrógenos desempeña un papel importante en la patogenia de esta enfermedad. Durante el decenio que sigue a la menopausia, las pérdidas anuales de masa ósea pueden llegar a ser del 2% de hueso cortical y del 9% de hueso esponjoso. La mujer puede perder hasta un 35% del hueso cortical y un 50 % del hueso trabecular en los 30 a 40 años posteriores a la menopausia. Las concentraciones bajas de estrógenos aumentan la secreción de IL-1, IL-6 y TNF- α por los monocitos sanguíneos y las células de la médula ósea. Estas citosinas estimulan a los osteoclastos, no siendo suficiente la actividad compensadora de los osteoblastos. La mejor forma de determinar la cuantía de la masa ósea perdida de forma precoz, aparte de la biopsia, es usar técnicas de imágenes radiográficas especializadas. La radiografía simple solo es capaz de diagnosticar la osteoporosis cuando ésta alcanza pérdidas del orden de un 30 % o un 40 %. En la osteoporosis senil la cortical osteoporótica sufre adelgazamiento debido a la resorción subperióstica y endóstica, y los conductos de Havers se ensanchan y, en casos intensos, se agrandan tanto que la cortical parece hueso trabecular (Robbins, 1999).

1.7. - Aspectos fisiológicos del tejido óseo: homeostasis del calcio.

El tejido óseo brinda al esqueleto la dureza y la fortaleza necesarias para que pueda cumplir con sus importantes funciones mecánicas. Con esta finalidad, los huesos del esqueleto contienen más del 99% del calcio del organismo y representan así un importante depósito de este mineral. Parte de esta reserva actúa como amortiguador (“buffer”) del contenido sanguíneo de calcio, dado que alrededor del 1% del calcio de los huesos está compuesto por calcio intercambiable, capaz de captar o ceder con rapidez iones de calcio del plasma sanguíneo. El calcio intercambiable se encuentra, en su mayor parte, en el

tejido óseo recién formado. La importancia de la reserva ósea de calcio intercambiable radica en la rápida actividad amortiguadora frente a súbitas variaciones de la concentración sérica de calcio, que es regulada dentro de márgenes muy estrechos, dado que variaciones mayores pueden tener consecuencias dramáticas e incluso fatales (Geneser, 2000).

El efecto amortiguador ejercido por el calcio intercambiable solo es capaz de regular variaciones de la concentración de calcio sérico pequeñas y de corta duración. El mantenimiento de una concentración sanguínea de calcio (calcemia) normal es decisivo para la salud y la vida. El calcio puede ser llevado desde la matriz ósea hasta la sangre si la calcemia disminuye por debajo de un punto crítico (la concentración fisiológica de calcio en el ser humano oscila entre 8,9 y 10,1 mg/dL). Por el contrario, el exceso de calcio sanguíneo puede ser extraído de la sangre y almacenado en el hueso (Ross, 2013).

La regulación más prolongada y más amplia es mediada por las hormonas con acción sobre el metabolismo óseo, sobre todo la hormona paratiroidea y la calcitonina, además de la forma activa de la vitamina D (1,25-dihidroxicolecalciferol). La hormona paratiroidea sobre el tejido óseo conduce a aumento de la resorción ósea, con mayor cesión de calcio iónico al plasma sanguíneo. La calcitonina, secretada por las células C de la glándula tiroidea, tiene efecto antagónico al de la hormona paratiroidea, dado que inhibe la resorción ósea. La vitamina D actúa como hormona en la regulación del calcio, debido a que la vitamina D₃ o colecalciferol, captada en el intestino o formada en la piel por irradiación ultravioleta es transformada en la forma con actividad biológica, el 1,25-dihidroxicolecalciferol por sucesivas hidroxilaciones en hígado y riñón. Dicha forma favorece la absorción de calcio en el intestino y desempeña un importante papel en el depósito y reabsorciones óseas (Geneser, 2000).

2. - ESTIMACIÓN DEL INTERVALO POSTMORTEM EN RESTOS ÓSEOS

2.1 - Generalidades.

Se entiende por intervalo postmortem o data de la muerte el tiempo trascurrido desde que falleció una persona. El determinar la data de un cadáver siempre será de una gran importancia y trascendencia médicolegal, ya que es un dato imprescindible por las consecuencias jurídicas que conlleva. Será también fundamental para corroborar la identidad del fallecido, con todo lo que ello supone (testamentaría, seguros, etc.), como para contribuir de forma decisiva en una investigación policial.

El Código Penal español vigente en el Título VII de la extensión de la responsabilidad criminal y sus efectos, Capítulo I, bajo la rúbrica “De las causas que extinguen la responsabilidad criminal”, establece en su artículo 130, apartado 6º, que la responsabilidad criminal se extingue por la prescripción del delito, y en el artículo 131, apartado 1, que los delitos prescriben a los 20 años cuando la pena máxima señalada al delito sea prisión de 15 o más años.

Ateniéndonos a lo anterior, si en un estudio pericial se concluye que los restos óseos estudiados, en un supuesto delito de homicidio tuviesen una data superior a los 20 años, el efecto jurídico será la consecuente prescripción y archivo. Sin embargo, si los restos fuesen de una data inferior a 20 años, resulta decisivo el establecimiento de la data, ya que no hay prescripción y será de importancia fundamental en la instrucción e investigación sumarial que nos ocupe y por tanto de un notabilísimo interés policial y judicial. Por el contrario, un error en este extremo invalidará cualquier estudio posterior y desembocará en unas diligencias insolubles.

Por otra parte Knight (1997), señala que si los restos óseos son muy antiguos, de años, décadas o incluso siglos, en la práctica aunque no tengan importancia judicial o policial sí la tendrán desde un punto de vista histórico y arqueológico.

En el momento actual se solicitan con frecuencia estudios y peritajes de restos óseos dadas las numerosas ocasiones en que la autoridad tiene que decidir sobre la actuación a seguir ante el hallazgo de dichos restos, como sucede en la aparición en

núcleos urbanos y rurales en caso de derribos, nuevas construcciones, replanteamientos urbanos, fosas comunes, posibilidad de genocidios, etc.

Genéricamente los problemas médicolegales a resolver en restos óseos se centran fundamentalmente en tres cuestiones: diagnóstico de la especie, diagnóstico individual y la data de los mismos.

Para Simonin (1982) la identificación de un esqueleto supone la investigación metódica y sucesiva de la raza, sexo, talla, edad, caracteres individuales, causa y data de la muerte.

A la hora de establecer la data de la muerte nos enfrentamos a múltiples circunstancias o factores que pueden influir notablemente en la evolución de los fenómenos cadavéricos, como puede ser el medio ambiente, las condiciones atmosféricas y climáticas y las condiciones de la inhumación. Otros factores también importantes pueden ser la edad, el sexo, causa y mecanismo de la muerte, constitución previa del individuo, etc. El conjunto de todo ello constituirá un mecanismo modificador en la putrefacción ósea, o en sentido contrario de la conservación ósea, lo que hace que restos óseos muy antiguos aparenten ser más recientes o que otros temporalmente más recientes simulen una mayor antigüedad.

Así, la permanencia de restos óseos al aire libre favorece y acelera su descomposición, siendo ésta mucho más notable que si aquellos restos estuvieran inhumados en tierra o sumergidos en medios acuosos. Un cadáver al aire libre en nuestro medio puede esqueletizarse en un plazo de un año, con un margen de variación de seis meses a tres años aproximadamente. Una vez esqueletizado, estos restos óseos sufrirán fenómenos erosivos, apareciendo grietas en uno o dos años y siendo éstas muy notables a los cinco o diez años.

Cuando un cadáver se encuentra sumergido en agua, la descomposición y esqueletización dependerá de la temperatura del agua, de la existencia de corrientes y de la acción de los animales, pero siempre será más lenta que al aire libre, siendo de unos dos años en ríos, el doble en canales y llegando a veces a 20 años en estanques y lagos

por la formación de la adipocira, la cual puede estar presente en el canal medular a los 50 o 60 años.

En definitiva, todos los agentes físicos, mecánicos, químicos y biológicos pueden actuar sobre los restos óseos, en su superficie, y éstos serán muy sensibles para poner en evidencia cualquier acción que le afecte de alguna forma.

2.2. - Criterios y Métodos.

La determinación de la data es un problema de tal complejidad que actualmente no se puede establecer ninguna determinación u observación que sea lo suficientemente definitiva para que podamos pronunciarlo con certeza ante este problema, lo que consecuentemente hace que sean muchos los métodos de estudio necesarios para poder llegar a resultados lo más fiables posibles.

Las distintas escuelas y autores siguen distintos criterios, que aún por diferentes, no impiden la concurrencia de los diferentes métodos para establecer la data. Para ello, tendremos en cuenta criterios extrínsecos, morfológicos, físicos, químicos, histopatológicos, biológicos y otros.

2.2.1. - Criterios extrínsecos

Como señala el profesor Piga Pascual, la determinación de la data es un problema médicolegal en que hay que recurrir a cualquier elemento disponible para poder objetivarlo, y entre estos elementos o datos los habrá de carácter extrínseco al cadáver, y aunque algunos de ellos no van a tener ningún significado médico, si van a tener un extraordinario valor orientador.

El cadáver puede portar una serie de objetos muy resistentes a la putrefacción como monedas, vestidos, zapatos, colgantes, relojes, etc., que nos pueden servir para identificar dicho cadáver y por tanto que pueden ser notablemente esclarecedores de la data cuando se conoce la fecha de la desaparición.

2.2.2. - Criterios morfológicos

La putrefacción es un proceso de fermentación pútrida de origen bacteriano que evoluciona en cuatro periodos, periodo cromático, enfisematoso, colicuativo y un cuarto periodo de reducción esquelética que según los profesores Gisbert y Villanueva (1998), ocupa entre 2 y 3 años, haciéndose completa a los 5 años, persistiendo a partir de entonces las partes esqueléticas de naturaleza calcárea, dientes, uñas y pelos. Sin embargo, la duración y características de este periodo de reducción esquelética están sujetas a influjos de naturaleza externa medioambiental, produciéndose por tanto amplios márgenes evolutivos. Reverte (1991) distingue dentro del periodo de reducción esquelética un periodo preesquelético, en donde persisten restos ligamentosos y musculares adheridos y el periodo esquelético propiamente dicho, en que el resto solo es hueso.

Son numerosos los autores que han expuesto a lo largo del tiempo una cronología descriptiva de los restos óseos basándose en su aspecto externo. Así, Lazaretti (1878) señaló que solo se puede distinguir huesos recientes, más blancos y más sólidos que los de fecha antigua (López y Gisbert, 1961).

En este mismo sentido los criterios de Mende (López y Gisbert, 1961) establecen distintas características morfológicas:

1. Si a los huesos se adhieren todavía múltiples residuos de cartílago y de partes blandas y contienen aún médula en su cavidad medular, el enterramiento no data más de cinco años.
2. Si las partes blandas están completamente desaparecidas, si existen aún escasos residuos de cartílago y los huesos están impregnados de grasa, pero aún no están notablemente alterados en su sustancia, el enterramiento no data de más de diez o quince años.
3. Si los huesos largos están completamente desecados en sus partes medias y terminales y privados de grasa, están enterrados de veinticinco a treinta años.
4. Finalmente, si los huesos son friables y porosos pueden estar enterrados desde cien años y aún más.

Sin embargo, estas conclusiones fueron muy discutidas ya que no se tuvo en cuenta el medio ambiente en que habían permanecido los huesos.

De gran trascendencia pericial, histórica y bibliográfica, son los criterios que expuso Muller (1940) donde sistematiza todos los conocimientos que se tenían al respecto sobre la materia:

1. Formación de una capa de moho en los cadáveres sepultados en tierra, se presentan después de 2 a 4 años postmortem.
2. Desaparición de las partes blandas en los enterramientos en fosas, indica que han transcurrido de 3 a 5 años.
3. Desaparición de ligamentos y cartílagos en los sepultados en tierra, después de 5 o más años.
4. Desaparición de las grasas de los huesos, después de 5 a 10 años postmortem.
5. Inicio de la destrucción de los huesos, después de 10 a 15 años postmortem.
6. Estado quebradizo, frágil y superficie porosa, después de más de 50 años.

Tirelli (1911) realizó un estudio sobre las variaciones que con el paso del tiempo se producen en la médula ósea (Villalaín, 1997), y dicho trabajo fue tenido en cuenta y ampliado por Maestre y Piga Pascual (1928) llegando a las siguientes conclusiones:

- Las modificaciones de la médula ósea en el esqueleto pueden orientar a la estimación de la data de la muerte.
- Durante los 4-6 primeros años después de la muerte puede encontrarse médula ósea, aunque más o menos alterada.
- Cuando el hueso no tiene médula ósea, pero la cavidad medular está tapizada por una capa negruzca de materia orgánica, podemos establecer una antigüedad de 6 a 8 años.
- Tras 10 años después de la muerte, el canal medular se encuentra desprovisto completamente de materia orgánica y los huesos aparecen en su cavidad medular tan blancos como en su superficie.

Por otra parte el profesor Piga estudió la permanencia de la pulpa dentaria en la cámara pulpar dentaria, concluyendo que aquella persiste 12 a 14 años tras la muerte, desapareciendo en su totalidad a los 16-20 años (López y Gisbert, 1961).

Siguiendo con los criterios morfológicos, Knight (1997) hace dos aportaciones de interés. En 1985 formuló que el efecto del medio ambiente es mucho más decisivo que el tiempo a la hora de producirse modificaciones en el estado del hueso, cometándose graves y decisivos errores si se realiza exclusivamente el examen morfológico. Así, diferencia morfológicamente entre huesos recientes y huesos antiguos, señalando que los primeros tienen aún en la zona articular restos adheridos de tejidos blandos, tendones, ligamentos y cartílagos. Cuando desaparece todo resto de tejido blando, los más recientes se pueden diferenciar de los antiguos por la densidad y por el tacto, siendo éste grasiento durante varios años, hasta 10 aproximadamente, además de estar muy duro por la conservación aún de la materia orgánica. Por contra, los huesos viejos, pesan poco por la pérdida de aquella, produciéndose inicialmente dicha pérdida en la zona más externa y en la que rodea a la cavidad medular.

2.2.3. - Criterios Físicos

Con el transcurso del intervalo postmortem, los huesos irán cambiando sus propiedades físicas y lógicamente se ha intentado establecer una relación entre dichos cambios y el intervalo postmortem. Tómese por ejemplo que con el paso del tiempo perderán los huesos parte de sus sales constituyentes, lo que lógicamente producirá variaciones en la densidad y en el peso específico.

En este principio basó sus estudios Carnot (1906) sobre las variaciones que experimenta el peso de los huesos con el paso del tiempo. Aznar (1945) realizó los mismos estudios pero con mayor precisión instrumental al utilizar una balanza hidrostática. Entre estos métodos físicos tuvieron su importancia los estudios de Nokes (1987) evaluando con microscopía electrónica de barrido el isótopo estroncio 90 y estudios con RX. Durlingon (1998) postula como prueba orientativa para establecer la data de restos óseos el someterlos a la acción con luz ultravioleta, comprobando una fluorescencia azul violácea difusa que se va tornando blanco amarillenta con el paso de los años.

Siguiendo esta misma línea de trabajo, Knight (1997) abunda en el valor orientativo de la fluorescencia con luz ultravioleta como prueba preliminar, y comprueba que en los cortes de hueso reciente, brillará toda la superficie de sección con un matiz

azul plateado, y con el paso del tiempo irá perdiéndose primero en el borde externo, luego en la medular y por fin se va extendiendo dicha pérdida hacia el centro de la pared ósea. Entre 100 y 150 años desaparecerá completamente la fluorescencia.

También Knigth (1997) siguió profundizando en los cambios físicos secundarios a la pérdida de materia orgánica y del desarrollo de una matriz calcificada con una estructura porosa, realizando estudios de densidad, medidas de gravedad y conducción ultrasónica y comportamiento térmico.

Villanueva, Girela y Castellanos (1976) estudiaron el proceso de mineralización postmortem del hueso con técnicas de análisis térmicodiferencial (ATD) y análisis termogravimétrico (ATG). Partieron de 34 cadáveres de data conocida y de procedencia diversa, determinando la pérdida de peso (ATG) y el proceso fisicoquímico que lo relaciona (curva de ATD). Concluyeron que aún a pesar del escaso número de muestras de que disponían, el método era útil para su estudio dinámico relativo a los procesos de degradación ósea, pudiendo reproducir los resultados si los huesos hubiesen estado enterrados en el mismo lugar durante un periodo similar de tiempo. Bajo una perspectiva cualitativa los modelos obtenidos por análisis térmicodiferencial les permitieron dividir los huesos en tres grupos diferentes:

- a) Huesos antiguos que muestran un efecto exotérmico en la región de los 340° C, con picos que presentan una buena configuración, debida a la homogeneidad de las muestras preparadas.
- b) Huesos recientes que muestran una curva compleja, siendo los únicos que presentan efectos endotérmicos en la región de los 380° C. Los efectos exotérmicos aparecen a lo largo del modelo completo con efectos de baja temperatura en la región de 270° C y el efecto más alto en la región de 470° C.
- c) Huesos con edad media desde la muerte, que presentan una curva intermedia entre las dos anteriores. Al igual que los huesos antiguos, muestran los efectos más altos en la región de los 350° C y al igual que los huesos recientes, un alto efecto cerca de la región de 450° C. No presentan baja temperatura ni efectos endotérmicos.

Dichos autores estudiaron la relación entre el área del efecto producido en la región de los 350° C y la pérdida de peso mientras tiene lugar este efecto y obtuvieron

una curva que se aleja de la abscisa proporcionalmente al aumento del periodo de tiempo desde la muerte. La curva se invierte al estudiar la relación en la región de los 450° C.

Se consideró que la técnica es capaz de distinguir entre huesos de diferentes periodos de tiempo desde la muerte, clasificando el proceso de envejecimiento postmortem que se produce en los huesos con independencia de la data de cada uno de ellos. Comprobaron que los factores que influyen en el periodo de envejecimiento óseo como el lugar de enterramiento, edad del individuo, patología propia de los huesos, tipo de hueso o el ambiente en que se desenvuelve la putrefacción pueden conducir a error. Aconsejaron que se realizara una correlación entre los componentes minerales y orgánicos del hueso con los espectros de RX.

Castellano (1976) por técnicas termogravimétricas demostró la pérdida de peso que se produce en el envejecimiento de los huesos a expensas de la materia orgánica, y estudiando la materia mineral resultante también comprobó que cuando ésta era menor de 60%, la data ósea sería inferior a 20 años.

Álvarez Jiménez en 1999 realizó un estudio de huesos largos de 36 cadáveres de data conocida y que habían permanecido inhumados en condiciones similares, utilizando técnicas de difracción de RX, análisis termogravimétrico y estudio de microscopía electrónica de barrido. En la difracción de RX obtuvo la identificación cualitativa y el análisis semicuantitativo identificó el componente mineral del hueso como hidroxapatito en todas las muestras, no encontrando diferencias en las distintas alturas en que dividió el hueso en su eje mayor y apreció que las variables relativas a la estructura cristalina de la difracción de RX mostraban una relación significativa con la edad del sujeto y con el sexo, ya que dichas variables se relacionan con el contenido de materia orgánica del hueso. Concluye asimismo que aunque la difracción de RX da mejores resultados que la técnica termogravimétrica, su uso conjunto mejora los resultados definitivos. Aprecia asimismo que estas técnicas dan mejores resultados con huesos de más de 20 años y que la zona cortical obtiene mejores resultados y más fiables que la medular.

Swift (1998) utilizó para investigar la data en restos óseos la relación entre dos radioisótopos naturales, ^{210}Po y ^{210}Pb , estudiando el equilibrio existente entre ambos. Propone un análisis profundo que proporcione una escala de calibración para poder datar los huesos. Posteriormente, Swift y col. (2001) utilizó por primera vez el estudio de

radionucleidos correlacionando alguno de ellos con el intervalo postmortem. En esta línea de investigación Neis (1999) estudió la data analizando la radiación del Sr ⁹⁰.

Mann (1998) estudió con difracción de RX y microscopía electrónica con análisis de energía dispersiva los restos esqueléticos de soldados americanos desaparecidos en Vietnam identificando una sustancia asociada a huesos y dientes fosilizados denominada vivianita Fe³ (PO₄)₂. H₂O, que puede formarse en determinadas condiciones (suelo árido, arcilla, Fe o metal). Este hallazgo sirve de ayuda para comprender de manera más completa los procesos tafonómicos.

2.2.4. - Criterios Químicos.

Estos métodos se basan en el estudio de las modificaciones químicas que sufre el hueso tras la muerte. Intervienen en dichos cambios químicos dos pilares de interés, por una parte los propios fenómenos putrefactivos, y por otra todos aquellos fenómenos derivados de los procesos y relaciones que se establecen entre el cadáver y el medio en que se encuentra. Este último aspecto estudiado por la denominada Tafonomía Forense.

La putrefacción afecta a la materia orgánica, degradándola y transformándola progresivamente en productos químicos cada vez más elementales. Sin duda, la identificación de dichos elementos nos orienta sobre el momento degradativo en que se encuentra el cadáver, y, por ende, sobre la data del mismo.

Dadas las características estructurales del tejido óseo, al encontrarse tanto materia orgánica como materia inorgánica, podemos sacar conclusiones cronotanatodiagnósticas de interés derivadas de ambos componentes. Por una parte la ya mencionada degradación química de la materia orgánica. Por otra, y teniendo en cuenta la presencia, resistencia y perdurabilidad de la materia inorgánica, hace posible que en un periodo prácticamente ininterrumpido en el tiempo se produzca un intercambio de elementos entre el propio hueso y el medio donde se encuentra inhumado. La profundización en esta disciplina, la Tafonomía forense, también podrá proporcionarnos parámetros de interés que sirvan como variables útiles para estimar la data de unos restos óseos.

Tirelli (1910) avanzando en el estudio y aplicación de estos conocimientos orientados a la data, propuso investigar la velocidad de descalcificación de los restos óseos. Así, sumergiendo el hueso en CIH, postuló que los huesos se descalcifican más rápidamente cuanto más antiguos son (López y Gisbert, 1961).

Beumer (1914) abre otro campo de investigación al estudiar la presencia de proteínas en los restos óseos. Pudo comprobar que al enfrentar polvo óseo con antisuero humano se producía una reacción antígeno-anticuerpo. Demostró, con las limitaciones de la época, que para que se produzca dicha reacción hacía falta 20 g de polvo como mínimo cuando el hueso era de 40 años, sin embargo, bastaron 8 g cuando el hueso era de 8 años. Por tanto, con el paso del tiempo se estaba produciendo una degradación de proteínas que de alguna manera orientaba sobre la data ósea.

Siguiendo con las proteínas, Amy y Rondeau du Noyer (1935) estudiaron el contenido proteico de los huesos, y Berg (1963) comenzó con el estudio cualitativo de las proteínas óseas. Para ello investigó un método muy sencillo, consistente en la maceración de polvo de hueso en solución salina, de tal forma que las proteínas solubles pasaban al sobrenadante, y por último, enfrentaba éste último a un antisuero humano, comprobando que se producían reacciones positivas cuando el hueso era de una data conocida, no superior a 20 años. Así mismo, comprobó que a medida que la data aumentaba, coincidiendo con Beumer, la cantidad de polvo o harina ósea necesaria para que se produjera la reacción, era directamente proporcional a la data.

También y con la misma finalidad se estudiaron otros componentes óseos, como la materia grasa. Lecha Marzo, Buerger y Maestre sumergían hueso con tinciones especiales, en concreto sulfato de cobre o ácido ósmico y observaron como el hueso se teñía de azul cuando su data conocida era inferior a 8-10 años, y a partir de este momento dicha tinción se negativizaba (Castellano y col., 1976).

En la misma línea, los bioquímicos forenses Hester y Cook determinaron el contenido total de nitrógeno en hueso para relacionarlo con la data (Villalaín,1997). Siguiendo esta línea, Knight (1970-1974), analizando la degradación proteica del estroma óseo y el nitrógeno total evidenció que un hueso reciente contiene entre 4-5 % de nitrógeno y que dicha cantidad iba disminuyendo conforme avanzaba la data. Así, si tiene

más de un 4% de nitrógeno el hueso debe de tener una data inferior a 100 años, si el rango de nitrógeno es igual o inferior a 2,5 %, la data debe ser superior a 350 años.

En la misma línea de investigación el profesor Knight (1997) utilizando técnicas de cromatografía en papel en presencia de aminoácidos, pudo comprobar que los huesos recientes tienen alrededor de 15 aminoácidos, identificando la glicina y la alanina y más específicamente la prolina y la hidroxiprolina, todos ellos derivados del colágeno. Concluyó por una parte que si la concentración de aminoácidos en hueso era inferior al 7 %, la data sería siempre superior a los 100 años, y por otra parte el interesante hallazgo de que la glicina es capaz de perdurar milenios, encontrándose incluso en restos del Paleolítico.

Siguiendo con la cuantificación de los niveles de nitrógeno, pero circunscribiéndose a huesos largos, Jarvis (1997) calculó los resultados en 42 cuerpos de varones inhumados en ataúdes y con datas conocidas entre 26 y 93 años. Los niveles de nitrógeno los estableció con el método de Kjejdhal. Tuvo en cuenta el tiempo de enterramiento, profundidad del mismo, la edad del sujeto y la presencia de cal, ya que del total de los ataúdes a 17 de ellos se les había añadido cal y 3 de ellos estaban contaminados con fuel-oil. El mayor contenido de nitrógeno, en concreto 4,06 g/100g de hueso se correspondió con el cadáver de data más baja, es decir, el de 26 años de enterramiento, y el resultado más bajo con el que llevaba 80 años enterrado (3,27 g de nitrógeno), por debajo incluso del cadáver de 93 años que tenía 3,49g de nitrógeno/ 100 g de hueso.

A la vista de estos resultados Jarvis concluyó que:

- 1) El nitrógeno contenido en los huesos disminuye con los años de enterramiento.
- 2) El porcentaje de nitrógeno que se pierde es independiente de la profundidad del enterramiento.
- 3) La cal puede actuar retardando inicialmente la descomposición de las partes blandas, pero no tiene efecto a largo plazo.
- 4) Los casos contaminados por fuel-oil dan cifras elevadas, dando la impresión de ser mucho más recientes.

Castellano, Villanueva y López Gorje (1976) estudiaron la evolución de la composición proteica a lo largo del envejecimiento óseo. Estudian y cuantifican las

proteínas solubles, el comportamiento electroforético de sus componentes y los aminoácidos. Para ello utilizaron tanto fragmentos óseos como huesos largos de procedencia dispar, amputaciones, otros guardados en laboratorios, exhumados con ataúd y sin él e incluso hallazgos de cavernas prehistóricas. Por tanto, los datos iban a ser muy diversos. Como método de trabajo para obtener y extraer las proteínas solubles sometieron 1 g de polvo de hueso de cada muestra a maceración en 10 ml de solución salina y la sometieron a agitación durante 48 horas a 4°C y posterior centrifugación. Las proteínas totales obtenidas las estudiaron por el método de Lowry. Observaron que las proteínas totales disminuían con el envejecimiento y comprobaron una correlación significativa entre el logaritmo de la concentración proteica y la antigüedad del resto óseo. En el desarrollo electroforético observaron:

- a) Que las proteínas del hueso eran las α -proteínas, las β -proteínas y la albúmina, claramente diferenciadas en los huesos de edad reciente (desde 6 meses hasta 18 años); y que en la serie ósea de 20 años se apreciaban dos bandas, una de albúmina clara y bien diferenciada y otra de gran amplitud y débil densidad, compuesta por α y β -proteínas.
- b) Una estimación cuantitativa relativa de estos valores, indica que, en función del tiempo, los valores de las α proteínas disminuía y la cantidad de albúmina se enriquecía relativamente.

Estos autores, sometiendo a hidrólisis las proteínas solubles y añadiendo ClH 6N a 110° C durante 20 horas obtuvieron el aminograma y los resultados obtenidos pusieron de manifiesto:

- 1) La presencia en huesos humanos de lisina, histidina, arginina, hidroxiprolina, ácido aspártico, prolina, treonina, serina, ácido glutámico, glicocola, alanina, cistina, valina, metionina, isoleucina, tirosina y fenilalanina.
- 2) La prolina y la hidroxiprolina se incrementaron con el envejecimiento y otros como la glicocola, isoleucina, tirosina, arginina e histidina disminuyeron sin gran significación estadística.

La degradación putrefactiva de las albúminas y peptonas las dividen en polipéptidos y aminoácidos, desapareciendo éstos últimos bien por sustitución del grupo amina por nitrógeno o por la formación de aminas por descarboxilación o por el efecto conjugado de la intensa oxidación. El resultado es una disminución progresiva de todos

los aminoácidos, a excepción de la prolina y la hidroxiprolina que resultan más resistentes a los procesos putrefactivos originarios. Por tanto, estos autores coinciden y confirmaron los trabajos de Knight en el sentido de que el predominio de prolina e hidroxiprolina permite asegurar que estamos ante un resto óseo de data considerable.

Por otro, una investigación sobre el análisis cualitativo por electroforesis de proteínas solubles en el hueso reciente revela los siguientes resultados: albúmina 61,15%, 2 β globulina de 22,50% y α globulina 14,48%. Con el tiempo, se produce un enriquecimiento relativo de la albúmina en relación a las fracciones α y β globulinas (Castellano y vol., 1976).

Siguiendo el estudio de la data utilizando la herramienta de los aminoácidos, se pudo comprobar que con el fallecimiento, los aminoácidos por un fenómeno de racemización se van transformando de levógiro a dextrógiros, de tal suerte que se va produciendo un aumento de la relación dextrógiro/levógiro en función del tiempo transcurrido. Álvarez (1999) señala que el ácido aspártico es el aminoácido más utilizado. Ohtani (2000) utiliza dicho aminoácido para la determinación de la edad dental.

También tiene su protagonismo la investigación de grasas y lípidos en la solución del cronotanodiagnóstico de los restos óseos. En términos generales, López y Gisbert (1961) postulan que la grasa de la médula ósea sigue en lo referente a su degradación una ruta cronológica diferente al resto del cuerpo. Inicialmente la cavidad ósea es rica en células adiposas con importante contenido graso, el cual, una vez producido el fallecimiento, es liberado y va impregnando todo el hueso, llegando incluso a la superficie, y trascurridos 8 a 10 años, la grasa termina desapareciendo.

Buerger y Maestre estudiaron por caminos paralelos y con métodos de histoquímica macroscópica la presencia de materia grasa en el hueso (Castellano, 1976). Así Buerger sumergió una rodaja ósea en una solución saturada de acetato de cobre y reveló que los vestigios grasos se tiñen de verde, por su parte Maestre reveló un color negruzco empleando el ácido ósmico. Coinciden ambos autores en que los lípidos totales desaparecen tras 8-10 años (Castellano 1976).

Berg (1963) con extracción continua con un solvente de grasas, demuestra que los huesos milenarios también contienen lípidos (Castellano y Villanueva, 1977).

En su tesis doctoral, Castellano (1976), comprobó que los lípidos totales tienden a disminuir con el paso del tiempo, pero distingue claramente dos periodos, uno primero de 10 años de pérdida muy brusca y una vez transcurrido este periodo se enlentifica de forma notable, ya que lógicamente la cantidad de lípidos ya es muy inferior.

La grasa que procede de la médula ósea va filtrando hacia la superficie y de ésta hacia la vecindad. La velocidad a la que se produce este itinerario es directamente proporcional a la cantidad de grasa original que hay en la médula y a la temperatura del ambiente, a mayor temperatura lógicamente mayor será su fusión y por tanto su difusión.

Por cromatografía en capa fina mostró en un primer momento la presencia de triglicéridos, diglicéridos, colesterol y ácidos grasos libres, y en un segundo momento, con el envejecimiento, se produce un empobrecimiento general de los lípidos totales, con disminución de los tres primeros y aumento de los ácidos grasos libres. De todas formas, se puede concluir, que la curva de disminución de los lípidos no va a ser lineal, ya que hay un primer periodo de gran descenso y pérdida prácticamente brusca y un segundo tiempo de disminución progresiva muy lenta.

Castellano y Villanueva (1977) en sus estudios sobre lípidos y data de los restos óseos, tras el estudio de distintas series, concluyen que la concentración inicial de lípidos totales varía mucho de unos huesos a otros, dependiendo de la edad, del sexo, del tipo de alimentación, etc.. También siguen comprobando que la mayoría de la grasa se encuentra en la médula ósea y ésta va migrando a la superficie, produciéndose una pérdida muy brusca en los primeros 10 años, mientras que a partir de este momento el proceso es más lento y la pérdida va siendo mínima, hasta el punto de que la grasa restante queda conformando la estructura química del hueso, y de hecho podemos encontrar lípidos en huesos centenarios e incluso milenarios.

Castellano y Villanueva (1978) siguieron profundizando en este campo y con técnicas de cromatografía de capa fina pusieron de manifiesto los siguientes extremos:

- 1) En los huesos no encontramos fosfolípidos.

- 2) En los huesos recientes encontramos diglicéridos y monoglicéridos que no se encuentran en estadíos avanzados.
- 3) Las cromatografías realizadas sobre huesos recientes de 6 meses, 1 año, 2 años, 15 años y 18 años muestran un progresivo empobrecimiento de triglicéridos, diglicéridos y colesterol, y un enriquecimiento de ácidos grasos libres, todo ello dentro de una disminución generalizada de todas las fracciones.
- 4) El colesterol disminuye conforme aumenta la data, persistiendo un descenso brusco en huesos recientes, y se sigue de un descenso muy suave en huesos entre 10 y 20 años.
- 5) Los triglicéridos también presentan un descenso importante y conjunto al resto de lípidos en una primera fase, mientras que en una segunda fase se hidrolizan en ácidos grasos libres y en glicerina.
- 6) Los ácidos grasos libres tienen un comportamiento contrario al resto de las fracciones lipídicas, de tal suerte que con el paso del tiempo van aumentando, pero de una forma lenta en los primeros 10 años, haciéndose más brusco dicho aumento a partir de los 10-20 años. Este aumento se justifica e interpreta como resultado de la degradación de las demás fracciones, especialmente los triglicéridos que sufren un catabolismo que los descomponen en glicerina y ácidos grasos libres.

Castellano y Villanueva (1978) también estudiaron con técnicas de cromatografía en fase gaseosa el comportamiento de los ácidos grasos libres en el envejecimiento óseo postmortem. Establecieron que el ácido oleico es el más abundante en el hueso y le siguen por orden de presencia el palmitato, el araquidónico, palmitoleico, esteárico y mirístico. Con el aumento de la data comprobaron que aumenta el palmitato, esteárico, linoleico, miristoleico y el C14:2, por el contrario disminuyen el oleico y el araquidónico. Comprobaron que aparecen ciertos ácidos grasos libres a partir de los 10 años postmortem como el C20:1, C16:2, el linoleico y el C20:3.

Siguiendo con los métodos químicos, cada vez serían más importantes los estudios sobre la materia mineral del hueso para orientar sobre el periodo postmortem. Se ha podido comprobar como a medida que se prolonga el periodo postmortem, mayor será la

proporción de materia mineral ósea. Se podría afirmar que cuando tras un periodo de mineralización del hueso si la materia mineral resultante es menor del 60% nos indicaría que dicho hueso debe de tener una data inferior a 20 años (Castellano 1976).

En 1976, Castellano, Rodrigo, Villanueva y Luna, estudiaron cada uno de los componentes óseos de la materia mineral en huesos de diferentes datas y procedencias y obtuvieron los siguientes resultados al estudiar el fósforo por la técnica de Fiske – Soubarov y por espectrofotometría de absorción atómica para el resto de minerales. Observaron que la materia orgánica disminuye de forma significativa con el transcurso postmortem y un enriquecimiento relativo de la materia mineral. Obtuvieron los siguientes resultados:

- 1) El hueso se enriquece relativamente de materia mineral con el paso del tiempo.
- 2) El Ca, Cu y Na no sufren modificaciones significativas.
- 3) El Mg y el K disminuyen.
- 4) El Fe, Pb, Zn y P aumentan y consideraron dos fases en dicho aumento. En la primera fase en huesos recientes de 6 meses a 1 año, tiene lugar un enriquecimiento relativo tras un periodo de calcinación y una segunda fase que incluye a los huesos de 10, 15, 18, 20, 50 años y los milenarios, justificando los autores por el aporte mineral exógeno procedente del terreno que envuelve el féretro y que por estas fechas ya se encontraría lo suficientemente deteriorado como para evitar dicho intercambio.

En 1983, Castellano, Villanueva y Frenkel, teniendo en cuenta los resultados de los trabajos anteriores referentes a parámetros como lípidos totales, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, proteínas totales, Zn, Fe, Mg y P, los interrelacionaron aplicando un análisis estadístico multifactorial, que consiste en una ecuación de regresión múltiple. Se adelantaron tres fórmulas que relacionan la data de la muerte con los parámetros que mejor la definen y así en la primera fórmula estimaron la data de la muestra ósea en relación a las proteínas, una segunda referida a los triglicéridos y una tercera de acuerdo con proteínas, triglicéridos y colesterol.

Reverte Coma, en 1991 demuestra que la materia mineral está presente en el hueso en función de la antigüedad y distingue:

- 1) Hueso reciente: 38-50% de materia mineral.

- 2) Hueso de 50 años: 60-65% de materia mineral.
- 3) Hueso milenario: 74-8% de materia mineral.

Hernández del Rincón (2001), en su tesis doctoral, concluye que el conjunto de parámetros bioquímicos (potasio, urea y azufre) y la difracción de rayos X supone una herramienta útil en el establecimiento de la data de unos restos óseos. Y postula que la zona cortical del hueso es la zona de elección para la realización de este tipo de estudios, mejorando la eficiencia de los resultados obtenidos en la zona medular. También concluye que la edad a partir de los 80 años, supone un factor a tener en cuenta por las interferencias de los procesos ligados al envejecimiento.

Introna, Di Vella y Campobasso en 1999, publican su trabajo “*Determination of postmortem Interval from Old Skeletal Remains by Image Analysis of Luminol Test results*”. En dicha publicación evaluaron la posibilidad de correlacionar el intervalo postmortem con restos de sangre en el tejido óseo. Para ello, se realizó la prueba de luminol en 80 fémures con un tiempo conocido de la muerte, agrupados en cinco clases. Se obtuvo polvo de hueso (30 mg) a partir de tejido compacto de la mitad de la diáfisis de cada fémur y se trató con 0,1 ml de solución de Luminol. Se controlaron las reacciones en una habitación oscura filmando con una cámara de TV equipada con una cinta de grabación. Una quimioluminiscencia intensa se observó después de unos segundos en los 20 fémures con un intervalo postmortem que va de 1 mes a 3 años. En los 20 fémures con un intervalo postmortem desde 10-15 años, la quimioluminiscencia, aunque menos intensa que en el grupo anterior, era visible a simple vista en el 80 % de la muestra. Entre los 20 fémures con un intervalo postmortem de 25 a 35 años, una quimioluminiscencia más débil apareció solo en 7 fémures (33% de la muestra). En los 10 fémures con un intervalo postmortem comprendido entre 50 a 60 años, se observó una reacción débil sólo en un único fémur. En ninguno de los diez fémures con un intervalo postmortem de más de 80 años se observó quimioluminiscencia. La imagen de cada reacción se informatizó y se analizó para escala de grises. Los resultados de análisis de imágenes muestran una posible relación cuantitativa entre el intervalo postmortem y la quimioluminiscencia que se produce al reaccionar el luminol con el hueso en polvo.

Ramsthaler F y cols. (2009), siguiendo también la idea del profesor Introna sobre la utilización del luminol frente al polvo óseo para la determinación del periodo

postmortem de los restos óseos, utilizaron una muestra de cuatro poblaciones de data, de 20 huesos cada una de ellas, en total 80 huesos de datas conocidas, en donde dos poblaciones se correspondían con una data de menos de 100 años y las otras poblaciones eran de una data de más de 100 años. El rango de data oscilaba entre 6 y 25 años las poblaciones inferiores a 100 años de data y entre 107 y 1500 años las poblaciones de más de 100 años. Partieron del hecho de que con más de 100 años no habría quimioluminiscencia, la reacción será negativa. Deliberadamente, sin apoyo instrumental, solo con observadores a simple vista y en una habitación oscura observaron la reacción quimioluminiscente del luminol frente a los diferentes restos óseos. Mantienen que las técnicas instrumentales, en el caso que nos ocupa, no reportan ningún beneficio adicional sobre las conclusiones forenses que se puedan obtener con la observación. Comprobaron que hubo 6 falsos negativos con data inferior a 100 años y 3 falsos positivos en data superior a 100 años. Estudiaron estadísticamente los resultados y validaron la técnica de la observación. Concluyeron que la prueba del luminol no se debe de utilizar con fines judiciales ante el riesgo de falsos positivos y negativos. También llegaron a la conclusión de que un resultado positivo de quimioluminiscencia tiene aproximadamente once veces más probabilidades de darse para las muestras óseas recientes que para los casos históricos con una data de más de 100 años. Aun así, nunca se debe de utilizar la técnica del luminol como método único y exclusivo para la datación de restos óseos. Según estos autores solo una combinación de diferentes resultados, incluyendo el análisis de las condiciones ambientales y la interpretación del perfil antropológico pueden permitir una aceptable estimación del periodo de intervalo postmortem de los restos esqueléticos.

Para Ramsthaler y col. (2011) los resultados que muestran falta de luminiscencia y reducción de UV-fluorescencia son más significativos para la estimación del intervalo postmortem, que una reacción positiva al luminol o una fuerte UV-fluorescencia.

2.2.5. - Criterios Histopatológicos

Diferentes autores, incluidos clásicos de la Medicina Legal española, han abogado por estos métodos para contribuir a la determinación de la data de los restos óseos.

Destaca en estos estudios la Escuela de Medicina Legal que lideró el profesor Maestre. Así, en 1945, él mismo, con Piga y Aznar estudiaron la persistencia de elementos formes en los conductos de Havers, y comprobaron la presencia de aquellos hasta 16-20 años después de producirse la muerte. Aznar por su parte postuló que la reabsorción de los canales de Havers podría orientar sobre la data (López y Gisbert, 1961).

Yoshino (1991), estudió los cambios postmortem con microrradiografías y microscopía electrónica en el hueso humano y con examen de frecuencia UV en cortes de hueso. En huesos de más de 10 años en huesos expuestos al aire libre no evidenció ningún cambio, sin embargo, en huesos enterrados en el suelo sí observó que a partir de 5 años aparece vacuolización ósea y a partir de los 6 años hay cambios histológicos que afectan a la sustancia compacta. Por otra parte, en los huesos sumergidos en el mar se han detectado vacuolas de 5-10 μ de diámetro en la zona periférica de la sustancia compacta de forma correlativa con el tiempo o intervalo postmortem.

Yoshino, (1994), también por medio de microrradiografías estudió con el fin de relacionar con la data otros hallazgos como número de osteonas, número de osteonas dobles, osteonas de baja densidad, área total de canales de Havers, área total de osteonas, número de espacios de absorción, etc. Turban-Just y Grupe (1998) y Watanabe y cols. (1998) han realizado estudios histomorfométricos para la investigación del intervalo postmortem.

2.2.6. - Criterios Biológicos

Podemos incluir en este apartado aquellos estudios basados en las reacciones antígeno-anticuerpo valorando su intensidad, la cual va disminuyendo con la antigüedad de los huesos. Así, Beumer (1914), como ya se ha hecho referencia anteriormente, comprobó que la antigüedad de los restos óseos era directamente proporcional a la cantidad de hueso pulverizado necesario para obtener la reacción antígeno-anticuerpo. Así, para huesos de menos de 8 años fueron necesarios 8 g de limadura, sin embargo, para cadáveres de 40 años harían falta 20 g de hueso pulverizado. En un cráneo centenario la reacción fue negativa con 25 g de polvo de hueso.

El estudio de la fauna cadavérica puede aportar datos importantes para la determinación de la data del cadáver. Todo ello se inicia con los trabajos de Redi cuando demuestra que las larvas que se encuentran en el cadáver proceden de huevos de insectos que eran depositados a propósito para su desarrollo. Bergeret (1855) comienza a utilizar la entomología cadavérica en Medicina legal con fines de obtener la data. Otros famosos médicos legistas como Orfila y Brouardel trabajan sobre el tema y solicitan el estudio de Mégnin que en 1894 profundizó y sistematizó este campo.

Los objetivos generales de la entomología forense son, entre otros, datación de la muerte a través del estudio de la fauna cadavérica, determinar la época del año en que ha acaecido la muerte, verificar que el cadáver ha fallecido en el lugar en donde se ha encontrado o ha sido trasladado hasta el mismo y dar fiabilidad y apoyo a otros medios de datación forense (Magaña, 1999).

Hay dos criterios entomológicamente que pueden orientar en la investigación del intervalo postmortem: 1) Basado en la edad y tamaño de las larvas. 2) Sucesión ordenada de las diferentes cuadrillas de insectos en los diferentes periodos putrefactivos. De manera general podemos señalar que los primeros en aparecer serán dípteros, a los 3 o 6 meses coleópteros, y a partir de los 6 meses ácaros de varias especies, y entre el segundo y el tercer año postmortem aparecen diversas especies de coleópteros que se alimentan de los residuos cadavéricos (Magaña, 1999).

2.2.7. - Otros Criterios

Carnor (1892) en datación de yacimientos óseos antiguos utilizó la determinación del cociente Potasio/ Argon y de la cantidad de Fluor, concluyendo que éstos aumentan en los huesos humanos con la antigüedad.

Raleigh (1908) establece que los fosfatos minerales contienen uranio y que por tanto el hueso tendrá ese componente. El uranio se fija en los huesos reemplazando a los iones calcio de la hidroxapatita. En los huesos estudiados el contenido de uranio aumentaría conforme aumenta el tiempo de enterramiento. El uranio es medible por métodos radiométricos, tanto cuantitativa como cualitativamente.

Libby y cols. (1947) idea la técnica del radiocarbono o C14 utilizando la determinación del mismo con fines de datación de restos óseos y basándose en que dicho isótopo radiactivo está siempre presente en la materia viviente.

Como señala Knight (1997), aunque resulte contradictorio, los métodos usados por los arqueólogos estiman con bastante precisión el intervalo postmortem, sin embargo, no tiene ninguna utilidad en la práctica forense.

Facchini y Pettener (1997) estudiaron los resultados de métodos físicos y químicos en 71 hallazgos esqueléticos, distribuidos en un periodo que abarca los últimos 3500 años, observando que los resultados dados por la reacción de la bencidina y de la fluorescencia ultravioleta, básicamente coinciden para la datación, fundamentalmente en restos óseos entre 200 y 350 años; y que los estudios de gravedad específica y conductividad supersónica, muestran una clara diferencia en muestras entre 300 años y las más antiguas.

Molin y cols. (1997), realizaron un estudio para determinar el tiempo de enterramiento y evaluar las características individuales de restos enterrados en un antiguo monasterio ortodoxo. El estudio incluye la identificación osteológica, la espectral, la histológica, estudios biológicos, ficheros de archivos históricos, arqueológicos y datos científicos del suelo.

Isçan (2001) tras una revisión de los diferentes métodos de datación utilizados en los últimos 30 años destaca los estudios realizados con la relación de los radioisótopos ^{210}P y ^{210}Pb y los cambios en el contenido mineral del hueso después del enterramiento.

Con todos los métodos mencionados no se termina de resolver de una forma definitiva el problema de la determinación de la data de restos óseos de menos de 20 años, pero sí es evidente que aumentará la precisión del intervalo postmortem la investigación de mayor número de fenómenos y la aplicación de mayor número de técnicas.

3. - HEMOGLOBINA y GRUPO HEMO.

3.1. - Generalidades

La hemoglobina es una hemoproteína compuesta por un grupo prostético, el hemo y un componente proteico o apoproteína, la globina.

El grupo hemo de las hemoglobinas está formado por un anillo tetrapirrólico (protoporfirina) con un átomo de hierro unido al mismo.

La capacidad de unión al oxígeno que presenta la hemoglobina se debe a la existencia del grupo hemo.

El átomo de hierro de este grupo puede encontrarse en estado de oxidación (II), en el que es posible unir oxígeno, recibiendo entonces la hemoglobina el nombre de ferrohemoglobina. Si el átomo se encuentra en forma férrica (estado de oxidación III) la hemoglobina recibe el nombre de ferrihemoglobina o metahemoglobina, y no puede unirse a oxígeno.

La estructura proteica de la hemoglobina se compone de cuatro monómeros, iguales dos a dos, unidos por interacciones no covalentes. Cada uno de ellos contiene un grupo hemo que permite la unión de una molécula de oxígeno y una cadena polipeptídica.

Existen diferentes tipos de hemoglobina dependiendo del tipo de cadenas polipeptídicas que la forman. Así, la más abundante en el adulto es la hemoglobina A, que está constituida por dos cadenas α y dos cadenas β . Aproximadamente, un 2% del total de la hemoglobina en el adulto es A_2 , con dos cadenas α y dos cadenas δ . Existen además, cantidades pequeñas de otras especies de hemoglobina A, modificadas por glucosilación con monosacáridos. Entre ellos se encuentra la hemoglobina A_{1c} , con glucosa unida (su determinación en la sangre de un individuo diabético permite valorar el control de la enfermedad durante las semanas anteriores).

La cadena α tiene 141 aa, mientras que la β y la δ tiene 146.

El grupo hemo se halla situado en una cavidad apolar de la cadena polipeptídica. El átomo Fe^{+2} se encuentra ligado a los cuatro nitrógenos de la protoporfirina; por otra parte, se encuentra unido de forma covalente a un residuo histidina de la cadena y quedando una sexta posición de enlace libre para la unión de la molécula de oxígeno.

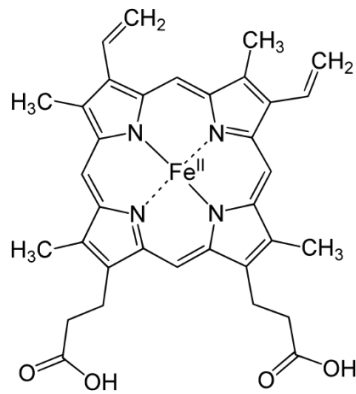


Figura 3. Estructura grupo Hemo

3.2. - Biosíntesis del grupo hemo

El grupo hemo es un representante típico de una estructura porfirínica. Estas moléculas están formadas por cuatro anillos pentagonales nitrogenados, llamados pirrólicos, unidos por puentes metilideno (grupos =CH-) en las posiciones 2 y 5 para formar una estructura cíclica.

A su vez los grupos pirrólicos tienen sustituyentes en su posición 3 y 4, que dan lugar a muchas porfirinas diferentes.

Las porfirinas suelen unir un ion metálico en su interior, y son parte esencial de gran cantidad de proteínas, por ejemplo, en el reino vegetal la clorofila contiene uno de estos grupos con Mg (II) en su interior y en los animales, todo el metabolismo aerobio depende de proteínas como la hemoglobina que contiene un grupo porfirínico con un átomo de Fe(II) en su interior, el grupo hemo. En el caso del grupo hemo de la hemoglobina humana encontramos protoporfirina IX y un ión ferroso Fe (II).

El grupo hemo lo vamos a ver en la mioglobina, los eritrocitos, la peroxidasa, la catalasa, las clorofilas o el anillo corrina de la vitamina B₁₂.

En la síntesis del grupo hemo distinguimos un primer tiempo mitocondrial, un segundo tiempo citoplasmático y un tercer tiempo nuevamente mitocondrial.

En el primer tiempo, por la acción de la δ -amino levulínico sintetasa se sintetiza el ácido δ -amino levulínico, el cual pasa a citoplasma.

A continuación por la acción de la porfobilinógeno sintetasa se ciclan dos moléculas de δ -amino levulínico y da lugar al porfobilinógeno, el cual por condensación

de cuatro anillos, gracias a la uroporfirinógeno I sintetasa da lugar a una superestructura cíclica que llamamos uroporfirinógeno I. En este momento, por la acción de la uroporfirinógeno III sintetasa, se gira en 180° el cuarto anillo pirrólico del uroporfirinógeno I, y llegamos al uroporfirinógeno III. La decarboxilación de esta molécula dará lugar al coprógeno III que termina penetrando nuevamente en la mitocondria en donde sufre la acción de coprógeno oxidasa y da lugar al protoporfirinógeno o protógeno III, tras la consiguiente decarboxilación y deshidrogenación. Y por un mecanismo similar, pero ahora mediado protoporfirinógeno oxidasa se produce la protoporfirina IX. Por último, en la mitocondria del hepatocito, la ferroquelatasa incorpora Fe (II) ferroso a protoporfirina IX y llegamos al grupo hemo. (Lozano 2005)

3.3. - Catabolismo del grupo hemo.

El destino del grupo hemo es paralelo al del eritrocito, en donde se encuentra, el cual va a ser fagocitado por los macrófagos fundamentalmente del hígado, aunque también, los encontramos en la médula ósea, bazo, y ganglios linfáticos.

Una vez liberados los grupo hemo dentro del citoplasma lisosómico, sobre ellos actúa la enzima microsómica hemooxigenasa, dando lugar a la biliverdina IXa (único paso metabólico de nuestra fisiología que es capaz de liberar el carbono en forma de CO que se eliminará por vía respiratoria), y sobre ésta actúa la biliverdina reductasa dando lugar a la bilirrubina.

Esta bilirrubina forma con la albúmina el bilirrubinato de albúmina que es atrapado y agrupado por unas pequeñas proteínas hepáticas llamadas ligandinas. Tras la esterificación hepática de la bilirrubina, se producen grandes moléculas no absorbibles y que van a parar a la vesícula biliar y de aquí a la vía digestiva siguiendo su recorrido y ahora transformándose en urobilinógeno y estercobilinógeno, sufriendo ambos metabolitos la acción de las β - glucuronidasas, pudiéndose reabsorber parte del primero por medio de la circulación enterohepática y llegar posteriormente al riñón y a la orina. La oxidación de estos productos catabólicos, dan lugar a la urobilina y a la estercobilina, que serán los pigmentos esenciales de los que depende el color amarillo de la orina y el marrón de las heces. (Lozano 2005)

4. - QUIMIOLUMINISCENCIA Y LUMINOL

4.1. - Quimioluminiscencia.

4.1.1.- Principios generales de la quimioluminiscencia.

La quimioluminiscencia se define como la emisión de radiación electromagnética producida por una reacción química. (García-Campaña 2001). Así mismo podemos afirmar que la quimioluminiscencia trata de las reacciones químicas que actualizan su energía en forma de luz.

Cuando aquella emisión proviene de organismos vivos o sistemas derivados de ellos, se denomina bioluminiscencia. La radiación que se produce pertenece al espectro visible, así como a las regiones del ultravioleta e infrarrojos más próximos a aquel. Admitiendo que la energía actualizada es útil, dicha forma de energía se identifica en termodinámica como energía libre de Gibb (G), la cual es fría por su propia naturaleza (luz fría) y por tratarse de un proceso espontáneo ($\Delta G < 0$).

Los fenómenos luminiscentes en general se pueden clasificar por su mecanismo de producción y en este caso distinguiremos:

- a) Producidos por Irradiación.
- b) Producidos por Calentamiento.
- c) Producidos por Reordenamientos Estructurales en sólidos.
- d) Producidos por Fenómenos Eléctricos.
- e) Producidos por Reacciones Químicas.

Entre las producidas por reacciones químicas encontramos lógicamente las dos modalidades de emisión de radiación anteriormente descritas:

- A) Bioluminiscencia: emisión por organismos vivos o sistemas biológicos.
- B) Quimioluminiscencia: emisión por una reacción química, y aquí distinguiríamos:

Electroquimioluminiscencia: emisión que se produce en solución, a partir de un estado eléctricamente excitado producido en una reacción de transferencia de alta energía de un electrón, en definitiva, electrones excitados que regresan a su estado fundamental.

Quimioluminiscencia Electrogenada: emisión producida en la superficie de un electrodo.

Nuestro trabajo se correspondería, como iremos viendo con un fenómeno luminiscente, producido por un mecanismo de reacción química, de tipo quimioluminiscente y en la modalidad de electroquimioluminiscencia.

En general, una reacción quimioluminiscente puede generarse mediante dos mecanismos básicos.

Reacción de Quimioluminiscencia Directa: en este caso, dos reactivos, normalmente un sustrato y un oxidante en presencia de algunos cofactores, reaccionan para formar un producto o intermedio de una reacción, algunas veces en presencia de un catalizador. Parte de ese producto o intermedio pasa a un estado electrónicamente excitado, que puede a continuación relajarse hasta el estado fundamental con emisión de un fotón.

Reacción de Quimioluminiscencia Indirecta o Sensibilizada: se basa en un proceso de transferencia de energía de la especie excitada a un fluoróforo. Se trata de moléculas que no pueden emitir directamente quimioluminiscencia, y transfieren el exceso de energía de la especie excitada a un fluoróforo que a su vez es excitado, volviendo a su estado fundamental con la emisión de un fotón. (García-Campaña. 2001).

Distinguiremos en las reacciones de quimioluminiscencia los siguientes tipos de cofactores: catalizadores, enzimas, e iones metálicos. Los cofactores favorecen la reacción quimioluminiscente por reducir la energía de activación y proporcionan el ambiente adecuado para una alta eficiencia quimioluminiscente.

La reacción del luminol es del tipo de quimioluminiscencia directa.

Requisitos básicos de la emisión de quimioluminiscencia:

1. La reacción debe de ser exotérmica y producir la suficiente energía para formar el estado electrónicamente excitado. En este sentido, para que ocurra una reacción quimioluminiscente, los requisitos energéticos pueden establecerse en términos de ΔG (Kcal.mol⁻¹):

$$-\Delta G \geq \frac{hc}{\lambda_{ex}} = 2.86 \cdot 10^4 / \lambda_{ex}$$

Donde λ_{ex} es la longitud de onda límite (nanómetro) para la excitación de las especies luminiscentes. Como la mayoría de las reacciones quimioluminiscentes producen fotones en el rango comprendido entre 400 (violeta) y 750 (rojo) nm, la formación del estado electrónicamente excitado y la generación de quimioluminiscencia en la región del visible requiere alrededor de 40-70 Kcal. mol⁻¹. Esta condición exotérmica se asocia a las reacciones redox que emplean oxígeno, peróxido de hidrógeno u oxidantes de potenciales similares. (García – Campaña. 2001).

La quimioluminiscencia es la energía que determinadas reacciones químicas actualizan en forma de luz. Es decir, de igual modo que en Termoquímica las reacciones se escriben $A + B \rightarrow C + G$, en la que G es la entalpía libre de la reacción, en quimioluminiscencia se tiene $A + B \rightarrow C + luz$. G y luz solo se diferencian cualitativamente.

Atendiendo al Primer Principio de la Termodinámica, para la emisión de luz es necesario que la energía libre sea cuantitativamente suficiente para la interconversión de un tipo de energía en otro.

2. La reacción debe de ser favorable para que dicha energía de lugar a un estado eléctricamente excitado. La energía no debe de dispersarse en forma de calor, vibración o rotaciones moleculares. En caso de producirse alguna de estas desviaciones no habría quimioluminiscencia. (García – Campaña. 2001)

3. El proceso de emisión de un fotón por desactivación del producto excitado, debe de ser favorable en relación con otros procesos no radiantes que pueden aparecer en la reacción. (García – Campaña. 2001)

Aun así, siempre pueden darse procesos internos capaces de desechar energía, que pueden ser intramoleculares (isomerizaciones, disociaciones), intermoleculares (desactivación por colisión), o de ambos tipos, de tal forma que la intensidad emitida sea inferior a la esperada. En definitiva, no todas las moléculas reactivas siguen el camino de reacción más favorable a la emisión de la luz.

Se hace por tanto necesario definir algún tipo de rendimiento. Se define el rendimiento de emisión como un rendimiento cuántico referido a la luminiscencia producida. Se deduce fácilmente, que en la luminiscencia en general, y en la quimioluminiscencia en particular, la intensidad de la emisión producida dependerá de la eficacia para generar moléculas excitadas, en este caso rendimiento cuántico, y de la velocidad de la reacción.

Se define el rendimiento cuántico (Φ) como el número de fotones emitidos dividido por las moléculas reactivas. Según la teoría del complejo activado se han de tener en cuenta varios rendimientos:

- a. Rendimiento de energización de moléculas reactivas (A y B).
- b. Rendimiento de impactos eficaces para alcanzar el complejo activado (I^*).
- c. Rendimiento de seguimiento del camino de reacción, pues el complejo activado puede invertir dicho camino ($A+B \rightleftharpoons I^*$.)
- d. Rendimiento de obtención del producto, que en este caso es el mismo complejo activado una vez estabilizado por la emisión de luz ($I^* \rightarrow I + hv$)

En definitiva, el rendimiento es a su vez un producto de rendimientos parciales.

La intensidad de emisión está en función de la velocidad de desaparición de uno de los reactivos. Interrelacionaremos los parámetros de intensidad y rendimiento cuántico con la siguiente ecuación:

$$I_{QL} = \Phi_{QL} \frac{-dA}{dt}$$

I_{QL} : Intensidad de emisión quimioluminiscente (fotones/seg).

Φ_{QL} : Rendimiento cuántico.

A : Precursor quimioluminiscente.

$\frac{-dA}{dt}$: Proporción en la que el precursor quimioluminiscente, A , es consumido.

Se hace necesario el signo (-) para que Φ_{QL} sea > 0 , por ser $A = f(t)$ una función decreciente. El rendimiento cuántico o eficiencia, oscila entre 10^{-15} y 10^{-1} . Solo para rendimientos superiores a 10^{-3} se aprecia la luz a simple vista. Para valores inferiores la luz es inapreciable y se hacen necesarios equipos auxiliares.

4.1.2. - Factores que influyen en la emisión de quimioluminiscencia.

Lógicamente la quimioluminiscencia resultante siempre estará influida por todos aquellos factores experimentales que afectan al rendimiento cuántico y a la velocidad de reacción. Habrá que tener en cuenta:

- a) Estructura química del precursor quimioluminiscente, no solo la parte correspondiente al grupo excitado, sino también las cadenas laterales.
- b) La presencia, concentración y naturaleza de cualquier otras sustancias que compitan favoreciendo otros procesos no radiantes.
- c) Tipo de catalizador.
- d) Presencia de iones metálicos, especialmente metales de transición implicados en el proceso de oxidación.
- e) Temperatura.
- f) pH y fuerza iónica.
- g) La hidrofobicidad del disolvente y la composición de la disolución.
- h) Presencia de aceptores de la energía trasferida.

4.1.3. - La quimioluminiscencia como técnica analítica.

La quimioluminiscencia en los últimos años representa una importante alternativa para la detección analítica, de hecho, gracias a los actuales medios instrumentales y a la incorporación de técnicas modernas algunas nuevas y otras tomadas de otras disciplinas, se ha convertido en una herramienta rutinaria en el análisis cuantitativo y cualitativo. (García –Campaña. 2001). Las grandes aplicaciones analíticas de la quimioluminiscencia como método de detección en inyección en flujo, cromatografía líquida y electroforesis capilar, junto con el inmunoensayo, hacen de esta técnica un campo de investigación muy interesante en una amplia variedad de disciplinas, que incluyen técnicas de separación de análisis químico, biológico, farmacológico, biomédico y alimentario, control de calidad, etc..

Es fundamental tener en cuenta que como la velocidad de la reacción es función de las concentraciones de reactivos, la quimioluminiscencia es una técnica adecuada para el análisis cuantitativo.

La utilidad de los sistemas quimioluminiscentes en química analítica se basa en las siguientes características especiales:

- a) Por sus cualidades cinéticas y luminiscentes es una técnica de gran sensibilidad y un amplio rango. Si el rendimiento Φ_{QL} es lo suficientemente alto se pueden alcanzar límites de detección excelentes, del rango de los femtomoles (10^{-15}). En comparación con otras técnicas espectrométricas, la quimioluminiscencia es aproximadamente 10^5 veces más sensible que la espectrometría de absorción y al menos 10^3 veces más sensible que la fluorimetría.
- b) No requiere fuente de excitación externa, por lo que evita dispersiones, señales fotoluminiscentes de fondo, problemas derivados de la inestabilidad de la fuente externa y la instrumentación es muy simple.
- c) La técnica es versátil por la determinación de una amplia variedad de especies que pueden participar en el proceso quimioluminiscente; precursores, reactivos, catalizadores, inhibidores, fluoróforos, algunas especies que no están directamente implicadas en la reacción quimioluminiscente pero que

pueden interactuar con otros reactivos en reacciones acopladas, para generar un producto que es un reactivo en la reacción quimioluminiscente.

- d) El incremento o disminución de la intensidad de la quimioluminiscencia estará directamente relacionada con la concentración del analito.
- e) La quimioluminiscencia se puede acoplar como método de detección en cromatografía, EC o inmunoensayo.

4.1.4. - Instrumentación básica en quimioluminiscencia: Estructura general del luminómetro.

Se conoce que la luz que se puede producir en una reacción química o bioquímica que se pueda relacionar con la concentración de sus participantes, será directamente proporcional a la concentración de los mismos. Gracias e ello, si conseguimos medir la luz que se emite, de alguna forma nos está reflejando la cantidad de analito presente.

El instrumento básico que es capaz de realizar esta medida se llama luminómetro. (García-Campaña.2001)

Cualquier luminómetro tendrá que constar de los siguientes componentes básicos:

- Célula de reacción.
- Compartimento cerrado de luz.
- Dispositivo de inyección y mezcla de reactivos y muestra.
- Detector de luz.
- Sistema de adquisición de señal.
- Procesador de la señal.

La célula de reacción debe de estar colocada en un compartimento cerrado con el fin de que no se pueda producir ninguna pérdida de quimioluminiscencia que se produzca. Por tanto siempre se exigirá que dicho compartimento sea hermético y completamente aislado de cualquier fuente de luz ambiental.

Por otra parte, para aprovechar el máximo de luminiscencia que se produzca, el detector de la misma debe de encontrarse muy próximo a la fuente de luminiscencia con el fin de obtener la máxima eficiencia óptica.

Lógicamente aquellas condiciones resultarán inexcusables si tenemos en cuenta que la reacción quimioluminiscente se irá agotando de forma proporcional y directa a como se van agotando los reactivos o las muestras intervinientes.

Así mismo podemos distinguir dos tipos de luminómetros según se introduzcan en los mismos la muestra y los reactivos. Tendremos por una parte los llamados luminómetros estáticos, en donde una jeringa o inyector automático que contiene el reactivo, genera una rápida mezcla entre la muestra que previamente se ha depositado en la célula de reacción y el propio reactivo. Lógicamente la curva de intensidades de luminiscencia que se registren estará en función del tiempo que dure la propia reacción. El otro modelo de luminómetro al que nos tenemos que referir será aquellos conocidos como de flujo continuo, en donde a través de un conector la muestra y el reactivo son continuamente bombeados.

Se puede usar como célula de reacción cualquier material que sea transparente a la luz en la región del visible y que sea compatible con la muestra, tales como vidrio, cuarzo, plástico acrílico u otros.

El detector de un luminómetro tiene que reunir las siguientes propiedades:

a) Debe ser capaz de detectar una señal luminosa de varios órdenes de magnitud de intensidad.

b) Debe ser sensible al menos en la región espectral de 400-600 nm, idealmente en la región completa del visible (380-750 nm), incluso en las regiones pertenecientes al UV e IR.

c) La señal registrada por el detector debe de estar relacionada directamente con la intensidad de luz que ha llegado a él, idealmente directamente proporcional en todo el rango de sensibilidad requerido. La señal producida por el detector debe poder ser fácilmente leída, registrada y analizada.

d) La velocidad de respuesta del detector debe ser más rápida que la velocidad de la reacción de quimioluminiscencia, si no, la señal será una versión

distorsionada de la señal original. (García-Campaña, 2001). La luz es detectada por dispositivos fotosensibles que generan una fotocorriente.

Hay dos clases de detectores:

Fotomultiplicadores, con alta ganancia y que posibilita la detección de bajos niveles de luz. Hay dos posibilidades en cuanto a su configuración en función de su disposición con respecto a la célula de reacción, aquellos de disposición lateral o los de disposición frontal.

Detectores multicanales, que proporcionan la detección simultánea de la radiación dispersada y produce una imagen permanente de un área amplia y se usan películas o placas fotográficas que constan de emulsiones que contienen cristales de haluro de plata, sobre las que van a incidir fotones que generarán una detección fotográfica.

4.2. - Luminol.

4.2.1. - Antecedentes históricos.

Aunque hay autores que lo dudan, la persona que sintetizó la molécula del luminol fue el alemán Schmitz en 1908, como puso de manifiesto en su “Über des hydrazine der trimensinsäure und hemimellit säure”. (Heidelberg. 1913). Al margen de esta controversia, hoy si está completamente aceptado que el también alemán H.O. Albrecht, en 1928, fue el primero que informó de las propiedades quimioluminiscentes del luminol.

En 1937, el también científico alemán del Instituto Universitario de Medicina Legal y Ciencias Criminalísticas de Jena, W. Specht, determinó el papel de la hemina y su reacción con el luminol y por tanto su aplicación potencial en la detección de la sangre. Proescher y Mody en 1939, investigan tanto la estructura, como las propiedades y la reacción química del luminol. En 1942, McGrath, del departamento de Medicina legal de la Universidad de Dublín, evaluó la especificidad del luminol por la sangre y recomendó la confirmación de los resultados positivos con otras pruebas serológicas más específicas.

En 1951, Grodsky y colaboradores proponen una de las preparaciones de reactivo de luminol más utilizada, a base del propio luminol, carbonato sódico, perborato sódico y agua destilada, siendo esta solución la más utilizada por los investigadores en la escena del crimen. Alternativamente, Weber en 1966 en sus estudios sobre los efectos de la aplicación de la quimioluminiscencia del luminol en medicina judicial y toxicología, propone otra forma de preparación del reactivo del luminol a base de hidróxido sódico o hidróxido de potasio y peróxido de hidrógeno con agua destilada, manteniendo la solución así obtenida en un lugar fresco, lejos de la luz directa, intentando salvar el inconveniente de su corto periodo de efectividad, como detallaremos más adelante. Esta fórmula es la que utilizan Introna y cols. en 1999 y es la que usamos nosotros en el presente trabajo.

En 1990, Mèrenyi, y sus colaboradores, en Suecia, hacen una actualización del mecanismo de reacción del luminol en presencia de sangre.

En las últimas décadas, el luminol ha adoptado un rango de gran trascendencia como reactivo de quimioluminiscencia en biología molecular, química analítica, métodos de selección en cromatografía líquida de alta resolución, inmunoensayo y otras. También entra de lleno y con éxito en los estudios arqueológicos.

4.2.2. - Propiedades físicas y químicas del luminol.

El nombre IUPAC (The International Union of Pure and Applied Chemistry) de la molécula del luminol ($C_8H_7N_3O_2$) es el *5-amino-2,3 dihidro-1,4 ftalazinediona*, también se le conoce entre otros como *hidrazida del ácido aminoftálico*. (fig.4)

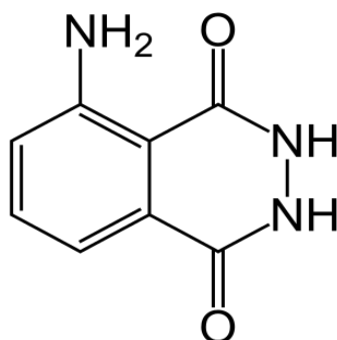


Figura 4. Estructura química del Luminol. (se corresponde con la fórmula 5 en la figura 7)

El peso molecular del luminol es de 177,16 umas. Es una sustancia sólida, cristalina, amarilla que funde a 317°C. Presenta dos constantes ácidas, que corresponden a los dos hidrógenos hidrazínicos; pK_1 de 6.74 y pK_2 de 15.1 que provienen de $K_1 = 1.82 \cdot 10^{-7}$ y $K_2 = 7.94 \cdot 10^{-16}$. De hecho, su actividad como precursor quimioluminiscente es consecuencia de su carácter diácido, que se potencia en medio alcalino.

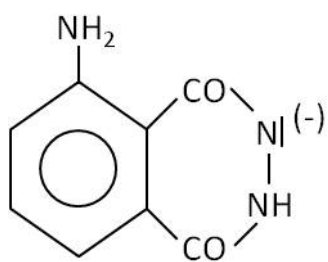
Su solubilidad en agua es escasa, inferior a 5,7 mM, o bien de 0.1 g/100cc. Es estable a temperatura ambiente, sensible a la luz y combustible. Inestable frente a oxidantes/reductores fuertes, así como frente a ácidos/ bases fuertes.

Su toxicología no está bien estudiada en humanos, aunque se describe irritación en las mucosas: ojos, piel, tracto respiratorio y digestivo, con diarreas, náuseas y vómitos.

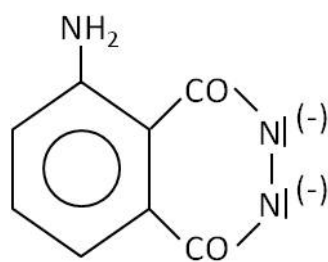
Atendiendo a la posibilidad de tautomería cetoenólica en el grupo amídico $[-CO - NH- \rightleftharpoons -(OH)C = N -]$, en el luminol son posibles 5 formas distintas, dos de ellas se presentan a su vez por sistemas resonantes. Además del efecto inductivo ($-I$) de los grupos carbonilo, es necesario un medio suficientemente alcalino para que el grupo amínico, típicamente básico (base de Lewis), libere un protón. En medio ácido la molécula está totalmente protonada. Para $pH > 7$, sin embargo, la molécula puede estar mono y diionizada.

Ambos efectos: inductivo y alcalino facilitan la migración del protón de un punto a otro de la molécula.

Las formas tautómeras así formadas, quedan en equilibrio, lo que significa que según las condiciones experimentales puede favorecerse una sobre la otra (incluso en estado sólido). En la bibliografía, y en esta tesis, la fórmula del luminol se escribe en su forma diceto. (fig.5 y 6).

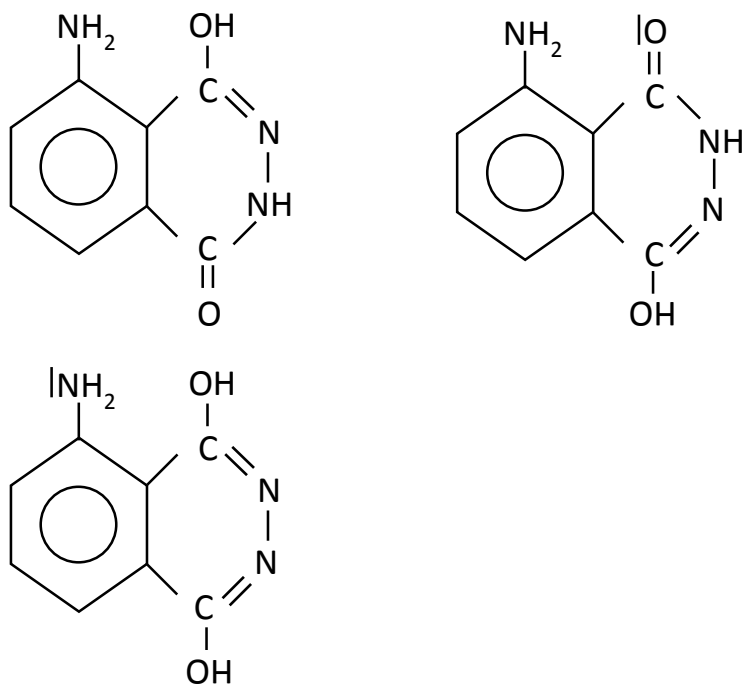


Forma monoprótica del Luminol (9)



Forma aprótica del Luminol (10)

Figura 5. Estructuras básicas del luminol susceptibles de múltiples formas resonantes. (incluye las formulas 9 y 10)



Forma tautómera Luminol (11) Forma tautómera Luminol (12)

Forma tautómera Luminol (13)

Figura 6. Formas tautómeras del luminol (incluye las fórmulas 11,12 y 13)

4.2.3. - Síntesis del luminol.

Los ácidos bencenodicarboxílicos son los ftálicos (o,m,p). Se parte del o-ftálico (fórmula 1). Nitrado en 3 sería el 3 nitro-o-ftálico (fórmula 2). La diamida del anterior es la sustitución de los oxidrilos carboxílicos por grupos amino (fórmula 3). Ambos oxidrilos pueden sustituirse simultáneamente con una molécula diamínica al reaccionar con la hidrazina (fórmula 4). La consecuencia es la formación de un nuevo ciclo.(fig.7) El grupo nitro puede reducirse a amina (fig.8). La molécula así escrita es el luminol (fórmula 5), que a efectos de numeración sigue el orden de la ftalazina. La molécula de 3 amino-o-ftálico (fórmula 7) puede comportarse como un ácido diprótico y formar los ftalatos mono y diftalato (fórmula 8). El luminol puede disociarse y se tienen dos formas apróticas o resonantes anteriormente mencionadas (fórmulas 9 y10).

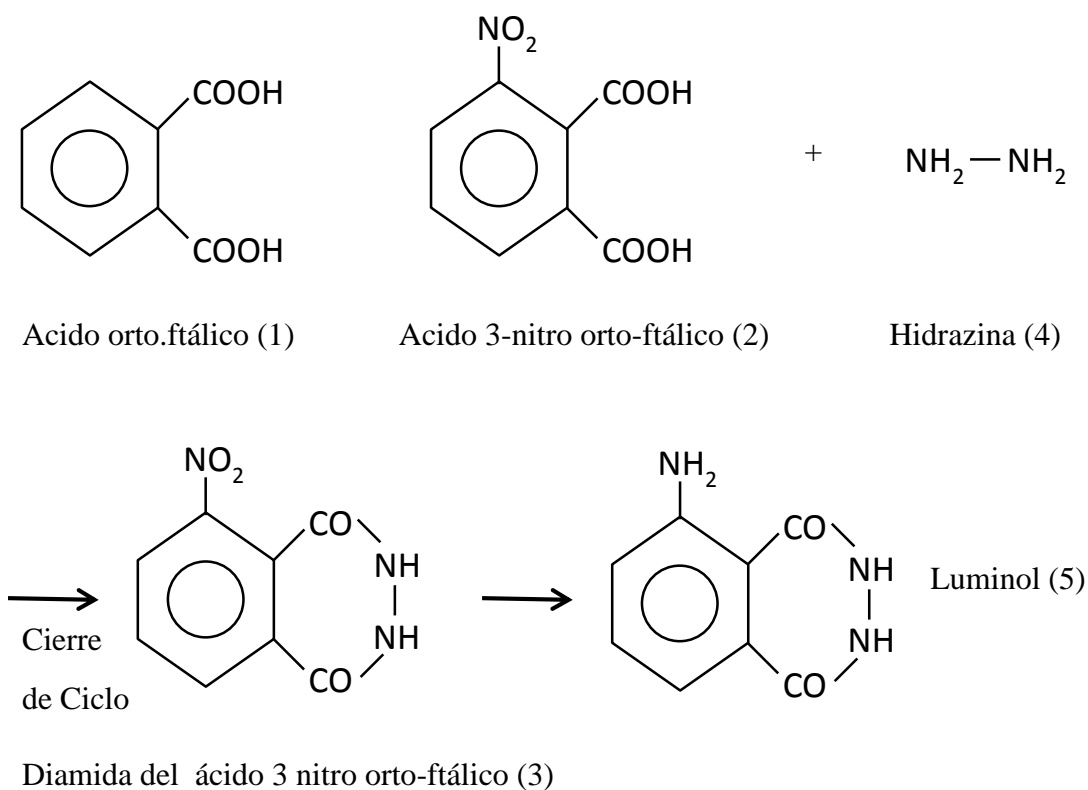


Figura 7. Síntesis del Luminol

Previamente a la síntesis final del luminol se habría producido una reducción del grupo nitro en amina dando lugar a las variantes de la fórmula 8 correspondientes al ácido 3 amino-orto-ftálico (fórmula 7) en las formas ácido 3 amino monoftalato y 3 amino diftalato (fórmula 8 indistintamente) de la siguiente forma (fig 8):

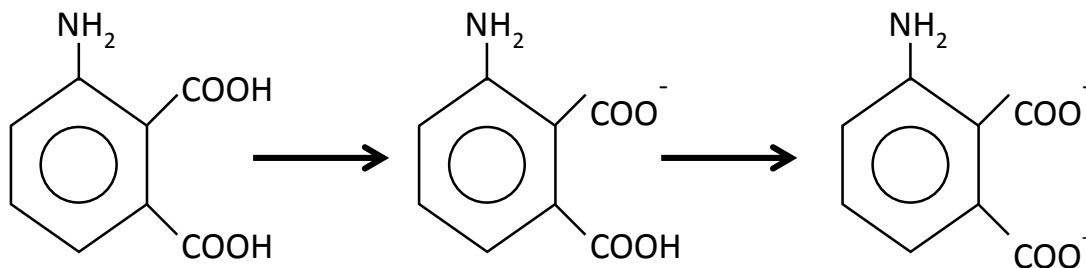


Figura 8. Reacción de reducción del orto-ftalato

4.2.4. - Reacción del luminol.

El esquema de la reacción del *luminol* es el de un proceso *redox* catalizado.

Barni y cols. (2007), identifican el 3-aminofталato (I*) como el ente activado que se desactiva sin alterar su fórmula molecular, emitiendo luz.

Fundamentalmente son tres las moléculas a tener en cuenta: oxidante, reductor y catalizador. En nuestro caso el oxidante será el peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), el reductor es el luminol, y el catalizador es el grupo hemo de la enzima nativa (hematina), que es un Fe^{+3} pentacoordinado (fig.9). De las catálisis conocidas la hematina cataliza por alteración química transitoria de su molécula.

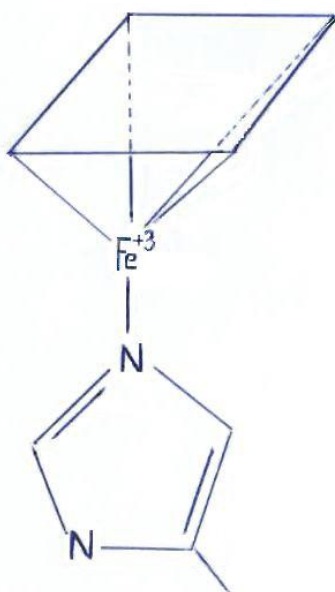


Figura 9. Hematina

Para comprender la oxidación del luminol hay que tener en cuenta que el mismo no se utiliza en el laboratorio aisladamente, como sustancia independiente, sino que es necesario disolverlo conjuntamente con otras dos: un oxidante y un medio alcalino. La disolución resultante es el reactivo. Se prepara disolviendo en agua destilada NaOH (o KOH), H_2O_2 y luminol. También se han usado CO_3Na_2 como álcali, y perborato de Sodio ($BO_3Na \cdot nH_2O$, $n = 1,3,4$) como oxidante, incluso otros oxidantes (MnO_4^- , IO_4^- , ClO^- ,

o mezcla de ellos). La anterior fórmula del perborato es una simplificación de $B_2O_4(OH)_4Na_2$, que sugiere dos grupos peroxo entre ambos boros (fig.10). En cualquier caso el grupo peroxo siempre desempeña un papel fundamental en la reacción de quimioluminiscencia.

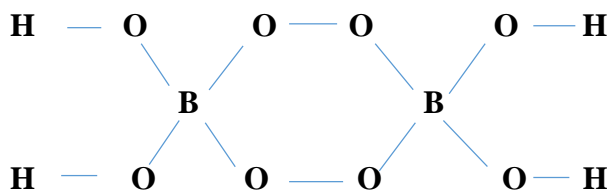


Figura 10. Grupos Peroxos.

Dicho reactivo se puede preparar como postula Grodsky (1951) con $CO_3 Na_2$ como álcali, perborato de sodio como oxidante y el luminol como reductor, o siguiendo la forma de Weber (1966) con sosa como álcali, peróxido de hidrógeno como oxidante y luminol:

- A partir de perborato, se pesan 3,5 g de sal anhidra y se disuelven en 0,5 ℓ. Se agregan 0,5 g de *luminol* y 25 de carbonato de sodio. La solución se guarda en lugar oscuro a temperatura baja (frigorífico).
- Siguiendo a Weber (1996), se prepara, como se verá más adelante, una triple disolución con sosa, peróxido de hidrógeno y luminol , recogiendo una alícuota de cada una de ellas para llegar al reactivo final.

Como hemos visto con anterioridad, las medidas de quimioluminiscencia no solo son proporcionales a la concentración del precursor (luminol), sino que también lo podrán ser del oxidante y del catalizador. Habrá quimioluminiscencia mientras dispongamos de catalizador. Cuando éste se agota, cesará la reacción.

En este trabajo el catalizador es un catión.

Ejemplos de cationes catalíticos son los siguientes: el reactivo {H₂O₂+luminol} detecta (Co⁺²,Cu⁺²,Fe⁺²,Hg⁺²) hasta 10⁻⁹M. El Vanadio (IV) se detecta con {luminol+H₂O₂+P₂O₇⁻⁴} hasta 0,002 µg/cc. El Ti (IV) con {luminol+H₂O₂+Cu⁺²} se detecta hasta 0,2 µg/cc. En la actualidad los cationes Cr (III y IV) se valoran en aguas de consumo con técnicas como cromatografía, espectrofotometría de absorción atómica y quimioluminiscencia con luminol, que compite con las anteriores por sensibilidad y bajo coste.

La sensibilidad de la quimioluminiscencia del luminol radica en el catión Fe⁺³ (y en otros como hemos visto) hasta tal punto que es también sensible a sus complejos cianurados, siendo el ferricianuro [Fe(CN)₆]⁻³ el más recogido en la bibliografía, y por supuesto a la hematina. Efectivamente el efecto catalítico de la hematina es fundamental desde el punto de vista criminalístico; la sangre se detecta a diluciones de 1 en 10⁶⁻⁷ (1µℓ/ℓ, o una parte por millón), y a hemoenzimas como la peroxidasa, que cataliza la oxidación de diversas sustancias orgánicas por peróxidos. Concretamente la peroxidasa se detecta en presencia de luminol a concentraciones décimofemtomolares (0,1.10⁻¹⁵ =10⁻¹⁶ M). De aquí que una reacción positiva del luminol no indique necesariamente la presencia de sangre, pero una reacción negativa prueba sin lugar a dudas la ausencia de sangre.

Como hemos visto anteriormente, refiriéndonos al grupo hemo, se denomina corona pirrólica a la agrupación de 4 pirroles unidos por grupos etino [-CH =]. Los pirroles se disponen a modo de segmento circular, de tal forma que los 4 nitrógenos quedan en el círculo interior. Se numera según IUPAC desde el 1 al 24 (los 20 primeros son exteriores, y los 4 últimos son interiores). (fig11) Según los sustituyentes y sus posiciones se tienen distintas estructuras; una vez coordinado el catión interior darán lugar a los distintos grupos hemo. Existen 3 hemos fundamentales: A, B, C, que a su vez pueden modificarse ligeramente. Las proteínas que contienen el grupo hemo se llaman hémicas y solo algunas de ellas se relacionan con el transporte de oxígeno.

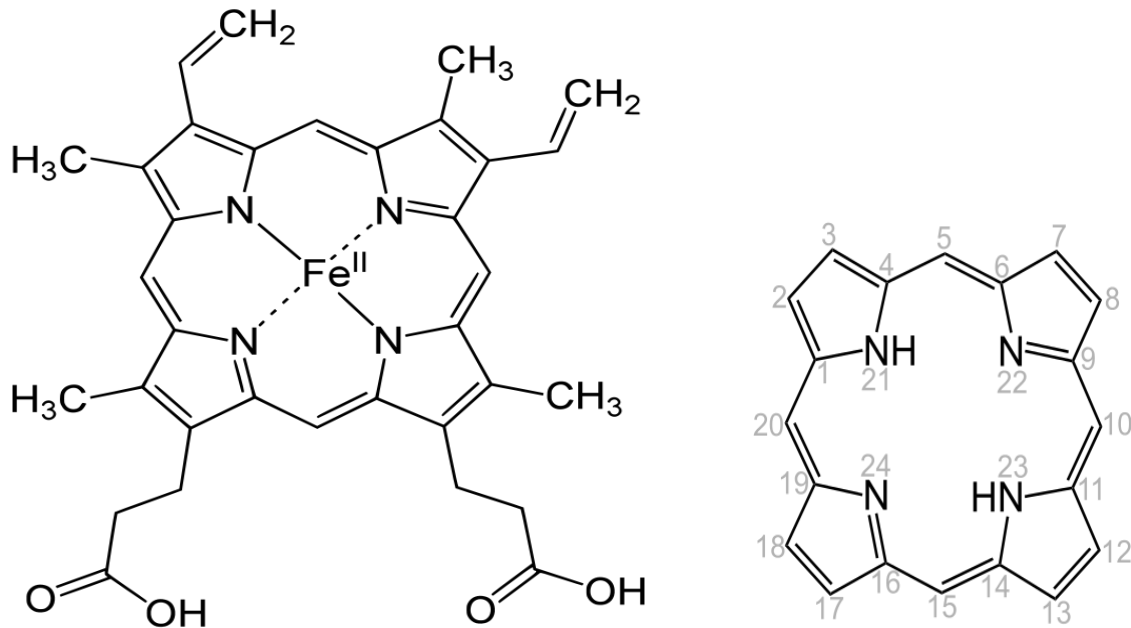


Figura 11. Grupo hemo.

Como hemos visto anteriormente se componen de una cadena peptídica y de un grupo prostético (no proteínico). En nuestro caso los grupos hemo son los prostéticos.

La protoporfirina (IX) es una corona pirrólica con 8 sustituyentes periféricos: 4 metilos, 2 vinilos, y 2 propionatos, que enlazan con los pirroles por sus carbonos β . Los nitrógenos interiores adoptan dos formas de distribución electrónica: 2 [$=\bar{N}-$] y 2 [$-\bar{N}H-$]. La porfirina es la estructura anterior en la que el Fe se coordina por cuatro enlaces desde los anteriores nitrógenos, tal que corona, metal y enlaces forman un plano. Las cuatro coordinaciones no son idénticas. Otros dos enlaces perpendiculares al plano anterior coordinan totalmente al Fe; por un extremo se enlaza con otro nitrógeno (esta vez de histidina, por un N de su heterociclo), y por otro, muy lábilmemente, con una molécula completa de oxígeno, que se toma de la membrana alveolocapilar y se transporta a las células.

Una vez coordinado el catión de Fe^{+2} se tiene la porfirina (o ferroporfirina), que es el hemo de la hemoglobina y mioglobina. . La primera se involucra en el transporte de oxígeno (O_2), que se satura en la membrana alveolocapilar con un 96% de oxígeno, y

regresa a recarga con un 64 %, tal que solo el tercio del oxígeno se aprovecha en los tejidos. Se compone de cuatro cadenas polipeptídicas y cuatro grupos hemo en los que los átomos de Fe son ferrosos.

La función de la mioglobina es diferente. Su cometido no es exactamente el transporte de oxígeno dada su elevada afinidad con este. Más bien funciona a nivel muscular, como reserva de moléculas de oxígeno a disposición de las mitocondrias.

La hemoglobina se compone de 4 cadenas y la mioglobina de solo 1. El hemo de las hemoglobina y mioglobina es idéntico.

El catión del hemo anterior es ferroso en todo momento, existiendo mecanismos (enzimáticos y no enzimáticos) que imposibilitan la oxidación del Fe^{+2} , estado de oxidación que se mantiene independientemente de la fase de transporte (carga o descarga) del O_2 .

El peróxido de Hidrógeno oxida el Fe^{+2} a Fe^{+3} para formar metahemoglobina, cuya estabilidad con el O_2 es muy elevada, por tanto no es útil para el transporte del gas. La peroxidasa del glutatión que consume el peróxido, y la metahemoglobina reductasa que mantiene el Fe en su forma reducida, son procesos fundamentales para mantener el Fe en forma ferrosa.

Fuera del organismo la sangre se desnaturaliza rápidamente. Se desencadenan procesos degenerativos de tipo hidrolíticos, redox, y enzimáticos. La separación de la parte proteínica, la oxidación del hierro y la sustitución de la molécula de oxígeno por un grupo hidroxilo forman hematina, que da a la mancha un color pardo. Precisamente el reactivo luminol contiene H_2O_2 (oxidante), y NaOH (medio alcalino), que contribuyen a lo anterior. El peróxido en un medio alcalino se comportará como un ácido.

Está admitido que en la evolución hemoglobina–hematina son posibles 4 grados de oxidación progresivos en el grupo hemo, desde el 2 al 5, (tabla 1)

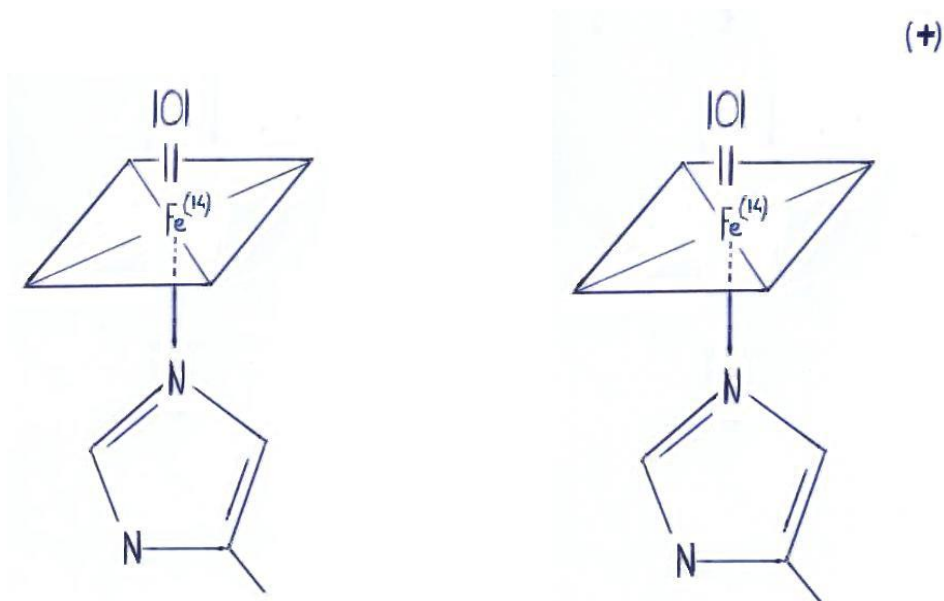
A	$\text{Fe}^{+2}\text{-P}$	Ferro-porfirina	
B	$\text{OH-Fe}^{+3}\text{-P}$	Hidroxi-ferrí-porfirina	Hematina (catalasa)
C	$\text{OH-Fe}^{+4}\text{-P}$	Hidroxi-ferril-porfirina	Compuesto II
D	$\text{OH-Fe}^{+4}\text{-P}^{(+)}$	Hidroxi-ferril-porfirina (radical)	Compuesto I

Tabla 1. Grados de oxidación progresivos del grupo hemo.

Lo que supone que el radical D contiene en realidad una carga positiva en algún punto de la corona de porfirina ($\text{C} \leftrightarrow \text{D} + e$). Al ser cuatro formas se dan todas estas posibilidades.

($\text{A} \leftrightarrow \text{B} \leftrightarrow \text{C} \leftrightarrow \text{D}$) (tabla 1) son posibles 3 oxidaciones de un único electrón y 2 de dos electrones. En la alteración química transitoria catalítica correspondiente a ($\text{B} \leftrightarrow \text{C} \leftrightarrow \text{D}$), son posibles una oxidación de 2 e ($\text{B} \leftrightarrow \text{D}$) y dos de 1 e.

A su vez los compuestos I y II (tabla 1) y (fig.12) pueden estar en forma de ferrilo no protonada similar al carbonilo ($\text{O}=\text{C}<$). De hecho el compuesto II solo es activo en la forma protonada.



. Compuesto II (Hematina en Fe^{+4})

Compuesto I (Hematina en $\text{Fe}^{+4(+)}$)

Figura 12. Representación de Compuesto I (D) y Compuesto II (C)

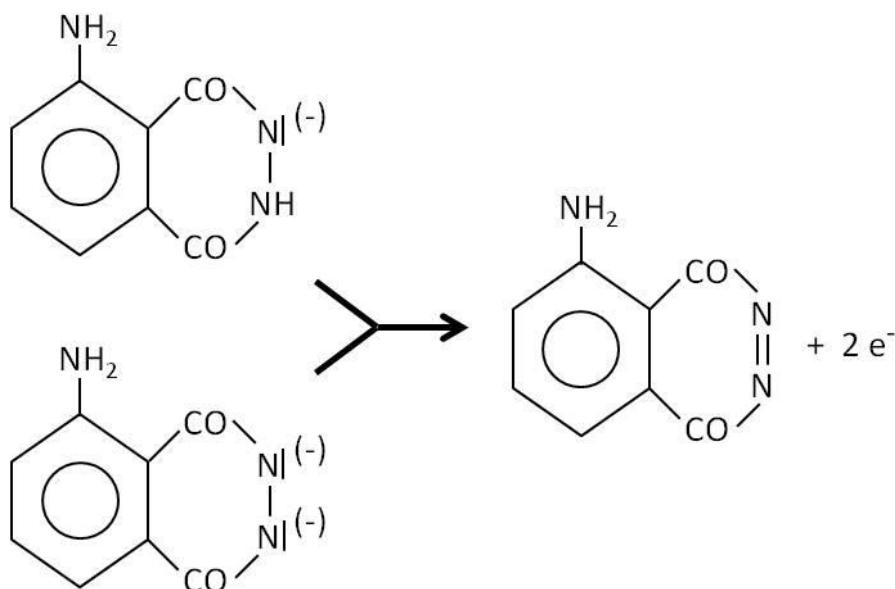
Puesto que puede considerarse nula la actuación de las oxidorreductasas típicas sobre la hematina, bien por concentración mínima, por pH inadecuado, o por la circunstancia fundamental de que la sangre está fuera del organismo, Thornton y Maloney (1985) propusieron $\text{B}(\text{OH}-\text{Fe}^{+3}-\text{P}$, hematina) como catalasa (tabla 1), es decir, como catalizador de la oxidación de sustratos por el H_2O_2 (pseudoperoxidasa).

El peróxido no solo es el oxidante del sustrato, también puede oxidar la hematina a su máximo grado de oxidación (compuesto I); lo que constituye un proceso redox de 2e^- .

Barni y cols. (2007) describen tres oxidantes: el hidroperóxido, peróxido y superóxido, y dos reductores: el luminol monoprotonado (fórmula 9) y el aprótico (fórmula 10). En electroquimioluminiscencia, se ha visto que la oxidación anódica del luminol produce azaquinona (fórmula 14), que libera la molécula de Nitrógeno gas que contiene, mientras que la del peróxido de Hidrógeno produce Oxígeno molecular; lo cual

sugiere que, ya en disolución, se forme un endoperóxido sobre la azaquinona, que se estabilizaría con la emisión de la molécula de Nitrógeno y la consiguiente formación de un ftalato.

Se sabe que las verdaderas peroxidasas sufren alteraciones de un único electrón. Efectivamente el paso entre los compuestos I y II es de un solo electrón, y el de compuesto II a hematina básica es también de un solo electrón. Sin embargo, en la oxidación (por H₂O₂) de la hematina hasta el compuesto I, se involucran 2 e⁻. En definitiva, a) la recuperación del catalizador se realiza mediante dos reacciones sucesivas de transferencia monoelectrónica, y b) se ha de considerar la necesidad de radicales (fórmula 15) intermedios entre la forma monoaniónica (fórmula 9) o dianiónica (formula 10) del luminol a la azaquinona (fórmula 14), pues dicha reacción involucra 2 e⁻ (fig.13). El radical (fórmula 15) debe intercambiar, además, un único electrón con la peroxidasas (pseudo o verdadera). Este esquema debe ser general, en el sentido de que igualmente se produce por reducción de otros sustratos (no necesariamente del luminol).



Formas resonantes del Luminol (9 y10) que dan lugar a la Azaquinona (14)

Figura 13. Formación de la Azaquinona.

Descritos los distintos elementos intervinientes, sus formas resonantes y redox, las moléculas intermedias, y el número de electrones en cada paso, se explica que la hematina sea un catalizador de los llamados de alteración transitoria. Todo lo anterior se integra en el ciclo descrito por Thornton y Maloney (1985) (fig.14) cuyo proceso global es la reducción del peróxido de hidrógeno ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{e}^-$) y la oxidación de 2 radical (fórmula 15).

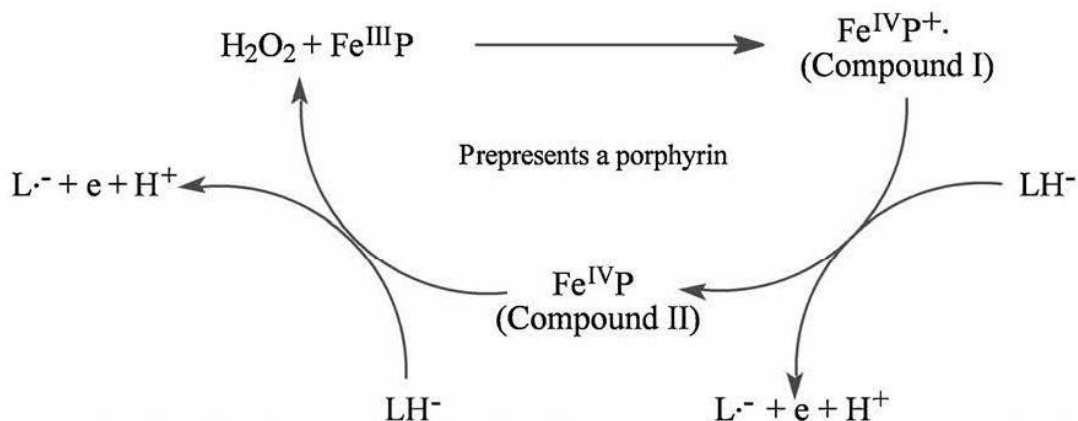


Figura 14. Ciclo descrito por Thornton y Maloney en donde el Compuesto I pierde un electrón, pasando a Compuesto II con pérdida de otro electrón en presencia de un radical, para terminar de nuevo en hematina.

En la figura 15 se presenta un esquema del proceso redox entre el luminol y el hidroperóxido. De las formas del luminol (fórmulas 5, 9 y 10),(fig.4 y 5)), diprótica, monoprótica y aprótica, en concreto una de las estructuras resonantes de la aprótica (fórmula 10), se oxida a radical (fórmula 15) por pérdida de un e^- (fig.14 y 15), que finalmente se estabiliza por una segunda oxidación a azaquinona (fórmula 14).

En cualquier caso la instalación del puente peroxo se inicia sobre uno de los carbonos carbonílicos de la azaquinona (fórmula 14). La pérdida del protón del hidroperóxido enlazado (fórmula 18) da lugar a fórmula 19, en la que el puente se instala definitivamente sobre el carbono positivado –por resonancia– del carbonilo opuesto. En

la fórmula 20 se producen dos circunstancias: a) la salida de la molécula de Nitrógeno ($N\equiv N$) mediante una doble ruptura heterolítica, que arrastra un solo par (un enlace $C-N$), y b) la ruptura homolítica del puente peroxo, que con el otro par residual ($C-N$) se reorganiza a la fórmula 21. Por último se tiene el aminofталato (fórmula 8).

La excitación electrónica seguida de estabilización de los pasos previos al aminofталato son los responsables de la emisión de quimioluminiscencia.

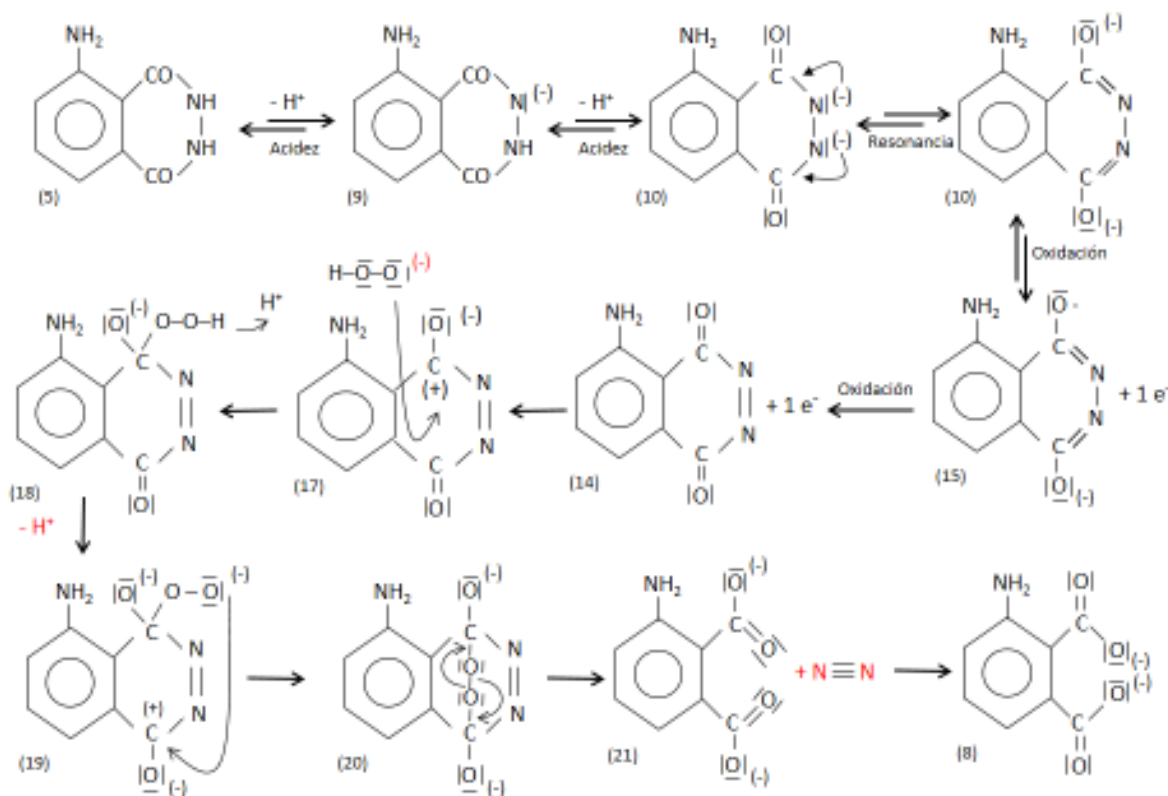


Figura 15: Oxidación del Luminol

Repetidamente se ha mencionado que la reacción del luminol sobre la sangre no es específica. Cualquier interacción a nivel de los elementos: oxidante, reductor, catalizador, incluso de absorbancias próximas a la emisión quimioluminiscente, alteran

el fin perseguido. Las interferencias que más afectan desde el punto de vista criminalístico son los falsos positivos. Aunque las causas de falsos negativos son también muy abundantes. Puede decirse que la química de las interferencias del luminol es extensa. Habiéndose publicado abundantes trabajos.

El caso más típico es el ClONa (BrONa).Oxidante, desinfectante y blanqueador; muy frecuente a niveles industrial y doméstico. De igual modo que en el sistema anterior [luminol / H₂O₂ / hematina], también el sistema [luminol / H₂O₂ / ClO⁻] es capaz de producir quimioluminiscencia . Problema en criminalística por la circunstancia, siempre posible, de limpieza de sangre previa con lejía. Emite a 431 nm , independientemente de la concentración de peróxido. Un valor tan próximo a los 425 nm del primer sistema parece indicar que el par [luminol / H₂O₂] es condición necesaria independientemente del sistema. La quimioluminiscencia del segundo se atribuye a que, igualmente que en el primero, se forma diazaquinona, aunque sin pasar por el radical (15). Es un caso de interferencia lumínica.

Hay otras muchas posibilidades de falsos positivos. Los efectos catalíticos de los cationes de Fe (u otros) son un factor a considerar. Se ha mencionado este punto. La presencia de cationes de Fe no hemáticos (la hematita Fe₂O₃, de nombre adecuado, u otros minerales similares), son causa de falsos positivos. La presencia de complejantes o precipitantes (cianuro y sulfuro) aminoran la quimioluminiscencia de la hematina. Existen aguas con importantes contenidos en óxidos e hidróxidos férricos que presentan carácter catalítico; así como los cationes de Cr, Co, Mn, Ni en forma inorgánica.

En forma orgánica (no hemática) el Fe se transporta en el organismo por la transferrina (proteína plasmática), y se almacena en forma de ferritina, que es una ferroproteína que contiene Fe en forma de [FeO(OH)₈]₈[FeO(PO₄H₂)]. Estas sustancias junto con las metalporfirinas de procedencia no hemática son también catalíticas.

La presencia de antioxidantes (polifenoles, por ejemplo), y de reductores con un potencial de reducción superior al del luminol interfieren en el proceso redox.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

1. Hipótesis de trabajo

Tras el fallecimiento se instauran una serie de modificaciones bioquímicas y estructurales que tienen como finalidad última la degradación de la materia orgánica del hueso.

La degradación de la materia orgánica está en relación directa con el intervalo postmortem.

En este contexto el hueso se irá empobreciendo de restos de sangre y por tanto de grupos hemo, lo que hará posible que se vaya perdiendo la capacidad de reacción con el reactivo de Luminol.

Conociendo la gran sensibilidad que tiene el Luminol para detectar la presencia de restos de sangre en polvo óseo, queremos demostrar que la reacción del Luminol puede ser útil para correlacionar el intervalo postmortem o data ósea con los restos de sangre que perduren en el tejido óseo.

2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo son:

- a) Demostrar que la quimioluminiscencia que se produce medida con luminómetro por la reacción del luminol frente al polvo óseo está en relación con la data.

- b) Intentar establecer una fórmula matemática que sea capaz de relacionar la quimioluminiscencia medida con la data de los restos óseos.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y METODOS.

El objetivo de nuestro trabajo es someter muestras de hueso en forma de polvo óseo al reactivo de luminol, y así obtener quimioluminiscencia que medimos con ayuda de un luminómetro para relacionarla con la data y establecer su posible aplicación en la datación de unos restos óseos.

Hemos dispuesto para el estudio de la cortical de hueso largo de un total de 102 muestras correspondientes a 88 individuos diferentes.

Las primeras 69 muestras proceden de huesos largos procedentes de los cementerios de Nuestro Padre Jesús de Murcia y de Totana conservados en el departamento de Medicina Legal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia y que se han procesado de la siguiente forma: cada una de las muestras procede de un fémur que se ha cortado en dos segmentos diafisarios, de tal manera que tendremos un segmento proximal y un segmento distal. A cada una de estas muestras se le asigna para su identificación un dígito desde el 1 al 69 seguido de la letra “a” si es proximal y de la letra “b” si es distal.

Desde los trabajos de Alvarez (1999) y Hernandez del Rincón (2001) sabemos que siempre que se trate de investigar la data de cualquier resto óseo se debe de trabajar sobre la cortical de los huesos compactos. Por ello, y dado que solo vamos a trabajar con cortical, se le añade al dígito y a las letras “a” o “b”, una segunda letra “c” que indica su procedencia cortical. Tendríamos por tanto un dígito que se sigue de “ac” o de “bc”. Se da la circunstancia de que no se disponía de cantidad suficiente de muchas de las muestras salvo que uniéramos las fracciones “ac” y “bc”, por lo que el resultado final será el de 69 muestras con sus respectivos dígitos seguidos del identificador ac+bc.

Aun así, de este grupo de muestras solo se pudieron utilizar 64 de ellas, ya que por motivos técnicos (normalmente escasez o por tener una consistencia no manejable) hubo que desechar 5 de ellas, en concreto las denominadas 40 ac+bc, 46 ac+bc, 52 ac+bc, 54 ac+bc y 64 ac+bc.

El segundo lote de muestras de 19 fémures, proceden del cementerio de Nuestro Padre Jesús de Murcia y se obtienen aprovechando un reordenamiento de nichos y cuyos restos óseos iban a ser destinados al osario general de dicho cementerio. Como en el grupo anterior se conoce con exactitud el sexo, edad y data de cada uno de los restos óseos que se obtienen.

Todos los huesos se limpiaron con un bisturí de los residuos de partes blandas residuales o de suciedad adheridos. Una vez limpios se procedió a cortar el hueso a la altura de la diáfisis ósea con una sierra eléctrica; tras lo cual se obtuvieron dos fragmentos de cada hueso, uno proximal y otro distal anatómicamente hablando.

De cada uno de estos fragmentos se tomó una muestra de la zona cortical utilizando una lima convencional para obtener la muestra mediante limado o raspado de la zona.

Por tanto, siguiendo la sistemática anterior, tendremos otras 38 muestras procedentes de obtener dos muestras de cada uno de los 19 nuevos huesos, y que les asignaremos un dígito del 70 al 88 que se seguirá de “ac” o “bc” según proceda del fragmento proximal o del fragmento distal diafisario.

En definitiva, trabajaremos con un total de 102 muestras de las cuales conoceremos el sexo, edad y data de cada una de ellas, con la excepción de que ignoramos la edad de las muestras 80 ac y 80 bc.

En total hemos trabajado con un hueso largo, en concreto un fémur, de 88 cadáveres, 54 varones y 34 mujeres, con una edad media de 67,29 años y un rango de 84 años, teniendo 13 años el de menor edad y 97 el más anciano. La data de la muerte oscila entre 15 y 64 años. Los restos óseos permanecieron enterrados en condiciones muy parecidas, ya que todos proceden de nichos. Las muestras referidas se obtuvieron solicitando los consiguientes permisos sanitarios.

1. - Instrumental

- Luminómetro lector de placas modelo FLUOstar Galaxy de la marca BMG, que a su vez contiene un software que permite el análisis remoto de datos y la exportación a Excel y que es capaz de predecir automáticamente curvas estándar, cálculo de concentraciones, cinéticas y cálculos estadísticos. El detector es un tubo fotomultiplicador de ventana lateral. Según la introducción de la muestra y el reactivo, el luminómetro que utilizamos es de tipo estático. Rango de espectro entre 240 y 740 nm. Lámpara de alimentación de Xenon de alta energía. Control de ganancia automático 1:4000 dividido en 128 pasos. Dispone de inyector automático. La célula de reacción es la propia placa de lectura.
- Molino de Bolas de Oxido de Circonio, modelo Pulvorissettere marca FRISTCH.
- Balanza de precisión marca METTLER AE 50.

2. - Metodología

a) Preparación de la muestra ósea.

Cada una de las muestras fue perfectamente molida y pulverizada lo más finamente posible con la ayuda de un Molino de Bolas de Oxido de Circonio, modelo Pulvorissettere, marca FRISTCH, sometiendo cada muestra a 10 minutos de trituración, a 3000 rpm, cuyo resultado final será un polvo lo suficientemente fino como para que la posibilidad de reacción sea máxima.

Con una balanza de precisión tipo METTLER AE 50 se pesan 30 mg de cada una de la muestra y se depositan en los diferentes pocillos o celdillas de una placa Nunclon^{TN}Δ Surface, específica para el luminómetro que usamos. Dicha placa tiene capacidad para 96 muestras, aunque solo se usaba en tandas de 25 muestras problema.

b) Preparación del reactivo.

Como vimos en la introducción, en concreto en el apartado del luminol, seguiremos la formulación de Weber (1966), en donde se prepara una triple disolución, recogiendo una alícuota de cada una de ellas para llegar al reactivo final.

Disolución A.- (0,354 g luminol + 62,5 ml de hidróxido sódico 0,4 N + 437,5 ml de agua destilada).

Disolución B.- (8 g de hidróxido sódico + 500 ml de agua destilada).

Disolución C.- (10 ml de peróxido de hidrógeno al 30% + 490 ml de agua destilada).

Disolución Final.- (10 ml de A +10 ml de B + 10 ml de C + 70 de agua destilada)

Las tres soluciones primeras pueden mantenerse en reserva protegidas de luz y calor en frigorífico. La disolución final es para uso inmediato, o como máximo para trabajar durante el mismo día en que ha sido preparada. Se ha de mantener necesariamente en frigorífico.

c) Reacción y lectura luminométrica.

Se depositan en el reservorio para reactivo de que dispone el luminómetro 10 ml de reactivo de Luminol preparado inmediatamente antes de su uso. A continuación se introduce la placa con las muestras de polvo óseo en el luminómetro.

Ponemos en marcha el programa de Fluostar y ahora el propio luminómetro inyecta de forma automática 0.1 ml de reactivo sobre cada uno de los pocillos de la placa que contiene la muestra.

El luminómetro mide la intensidad de quimioluminiscencia desde el segundo 00 y le llama ciclo 1, llamando a la medición en el segundo 05 ciclo 2, y así sucesivamente. En nuestro trabajo se programa el luminómetro para que comience midiendo la intensidad de quimioluminiscencia desde el segundo 15, es decir, desde el ciclo 4, ya que este es el momento en que hemos programado la inyección del reactivo procedente del depósito del mismo en la muestra problema, ya que si se inyectara en el segundo 00, al ser una reacción de instauración tan brusca, sería imposible que pudiéramos analizar el trazado ascendente de la curva de la reacción desde el punto cero hasta que alcanza el punto máximo. Con estas precauciones el luminómetro trabaja en 35 de ganancia. Haremos en todos los casos medidas parciales cada 5 segundos hasta completar un trazado de 5 minutos. Las lecturas correspondientes a los ciclos 1, 2 y 3 lógicamente tienen valor 0 ya que en estos casos no está actuando el reactivo.

El luminómetro FLUOstar Galaxy nos va proporcionando de cada una de las muestras sometidas a estudio por una parte una tabla de resultados y por otra una curva de cada una de las reacciones que se producen en cada uno de los casos.

Los resultados obtenidos se reflejan en una tabla de Excel de tal forma que, para cada una de las reacciones, observaremos en la misma el nombre de la muestra y seguidamente las cifras que se corresponden con la diferente medida obtenida en Unidades Relativas de Luz (URL) de las 60 lecturas que hace el luminómetro de cada muestra; correspondiéndose con el periodo de 5 minutos que hemos programado para cada caso. La medida del cuarto ciclo (momento de la inyección) la llamamos QLorigen.

En cuanto a la curva de cada una de las reacciones, resulta de correlacionar los diferentes valores obtenidos para cada caso a lo largo del tiempo, en abscisas, con los valores de quimioluminiscencia en ordenadas expresados en Unidades Relativas de Luz (URL).

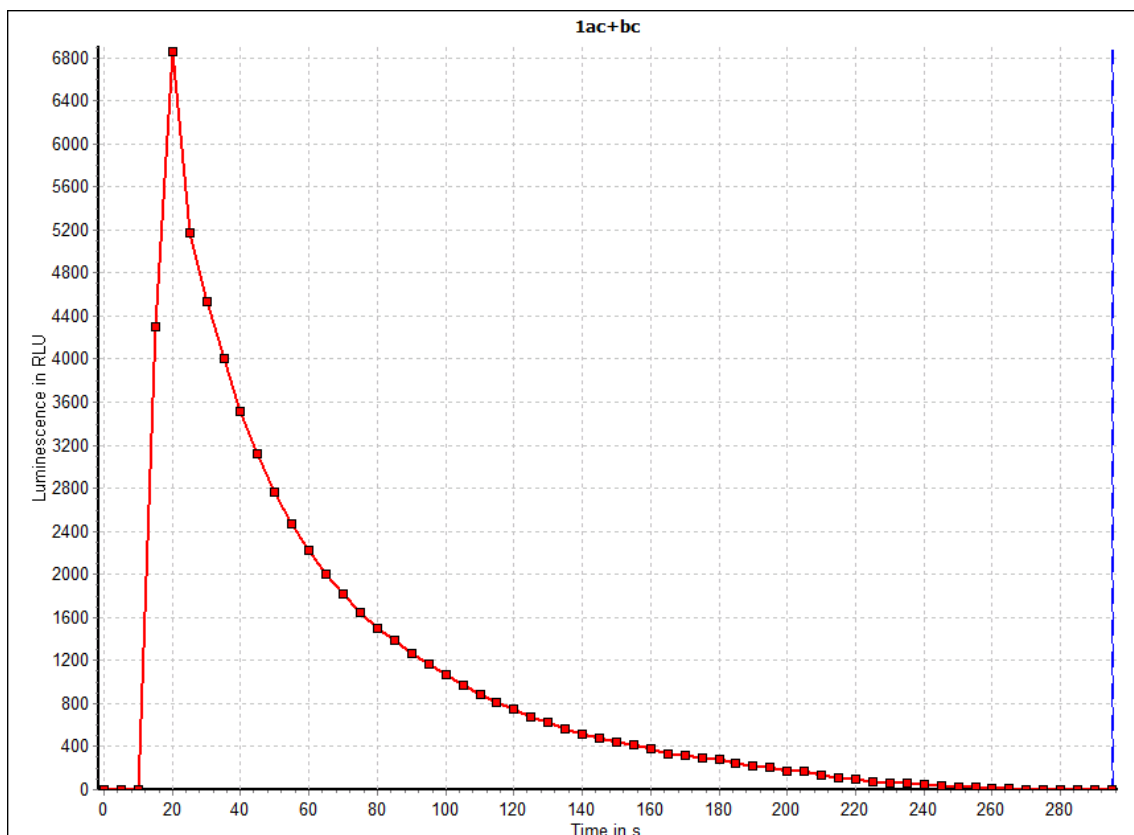


Figura 16 Curva quimioluminiscencia/ tiempo obtenida en el luminómetro Fluostargalaxy.

La curva anterior es una cinética de orden 2. No obstante es posible un ajuste polinómico de la curva estudiada a partir de orden 2 hasta orden 5, ya que cuanto mayor sea el orden, mayor será la aproximación a la predicción cuantitativa de las ordenadas de la curva. Aunque el estudio de este extremo sobrepasaría los límites de este trabajo.

3. - Método estadístico.

Siguiendo los objetivos de esta trabajo utilizamos fundamentalmente con dos parámetros o variables: data o intervalo postmortem; cuyo valor lo conocíamos desde el momento de la recogida de la muestra, y valores luminométricos obtenidos tras la realización del experimento. Ambos debemos de ajustarlos para poder trabajar con ellos desde un punto de vista estadístico en el programa SPSS 20.0. Los estadísticos utilizados han sido los siguientes:

- 1) Estudio de correlación bivariada, con el coeficiente de Pearson para las variables numéricas binarias. El objetivo de este análisis es establecer la existencia de correlación entre las distintas variables.
- 2) Regresión lineal múltiple: el objeto de este modelo matemático es establecer una fórmula matemática que permite predecir el porcentaje de una variable definida como dependiente, en este caso el intervalo postmortem, explicada por otra variable, y establecer una fórmula matemática que permite la estimación de la data de la muerte a partir del conjunto de variables definidas como independientes.
- 3) Estimación de los distintos modelos de ajuste (lineal, exponencial, logarítmico) de las fórmulas de representación gráfica de la regresión, de una variable dependiente, la data, en relación con cada una de las variables definidas como independientes.
- 4) Análisis discriminante: tiene como objetivo evaluar la capacidad de clasificación de una muestra en diferentes intervalos postmortem definidos previamente, a partir de las concentraciones de un conjunto de variables.

- 5) **Curvas COR:** Con estas curvas se consigue mediante la elección de distintos valores de corte una clasificación dicotómica de los valores de la prueba según sean superiores o inferiores al valor elegido. Se cuenta no con un único valor de sensibilidad y especificidad que definan la exactitud de la prueba, sino más bien con un conjunto de pares correspondientes cada uno a un distinto nivel de corte. Se entiende por punto óptimo el que tiene mejor par sensibilidad especificidad (más cercano a la esquina superior izquierda del cuadrado que la contiene, que se correspondería con valores de sensibilidad y especificidad de valor 1 y que separaría perfectamente las dos poblaciones) y la representación gráfica de todos estos puntos define la curva COR. Se utiliza el par Sensibilidad – (1-Especificidad) para su representación gráfica. Utilizaremos el ABC (área bajo la curva) como la medida de la separación entre las dos poblaciones que se quieren clasificar.

Para el estudio estadístico y en aras de la búsqueda de los resultados más óptimos hemos trabajado con diferentes posibilidades en el tratamiento de las variables referidas a la intensidad de quimioluminiscencia, edad, sexo y data.

<i>QLorigen</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 00 s</i>
<i>QL05s</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 05 s</i>
<i>QL10s</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 10 s</i>
<i>QL15s</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 15 s</i>
<i>QL20s</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 20 s</i>
<i>QL25s</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 25 s</i>
<i>QL30s</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 30 s</i>
<i>QL35s</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 35 s</i>
<i>QL40s</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 40 s</i>
<i>QL45s</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 45 s</i>
<i>QL50s</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 50 s</i>
<i>QL55s</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 55 s</i>
<i>QL60s</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 60 s</i>
<i>QL65s</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 65 s</i>
<i>QL70s</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 70 s</i>
<i>Pico maximo</i>	<i>Valor de quimioluminiscencia máximo en cada muestra medida.</i>
<i>Dif</i>	<i>Diferencia de medida entre pico máximo y medida 10 s siguientes</i>

Tabla2. Variables de quimioluminiscencia

<i>Edad</i>	<i>Edad de cada una de las muestras</i>
<i>Grupos de edad de las muestras en márgenes de 10 años.</i>	<p>1: entre 0 y 10 años.</p> <p>2: entre 11 y 20 años.</p> <p>3: entre 21 y 30 años.</p> <p>4: entre 31 y 40 años.</p> <p>5: entre 41 y 50 años.</p> <p>6: entre 51 y 60 años.</p> <p>7: entre 61 y 70 años.</p> <p>8: entre 71 y 80 años.</p> <p>9: entre 81 y 90 años.</p> <p>10: entre 91 y 100 años.</p>
<i>Grupos de edad en seis intervalos.</i>	<p>1: entre 0 y 39 años</p> <p>2: entre 40 y 59 años</p> <p>3: entre 60 y 69 años</p> <p>4: entre 70 y 79 años</p> <p>5: entre 80 y 89 años</p> <p>6: entre 90 y 99 años.</p>

Tabla 3 Variables de Edad

<i>Hombre</i>	<i>1</i>
<i>Mujer</i>	<i>2</i>

Tabla 4 Variables de sexo

<i>Data</i>	<i>Data de cada una de las muestras</i>
<i>Dos grupos de data (disc).</i>	<i>1: entre 0 y 19 años. 2: entre 20 y 69 años.</i>
<i>Dos grupos de data (disc2)</i>	<i>1: entre 0 y 20 años. 2: entre 21 y 69 años.</i>
<i>Diez grupos de data en intervalos de 5 años (Frag1).</i>	<i>1: entre 15 y 19 años. 2: entre 20 y 24 años. 3: entre 25 y 29 años 4: entre 30 y 34 años. 5: entre 35 y 39 años. 6: entre 40 y 44 años. 7: entre 41 y 49 años. 8: entre 50 y 54 años. 9: entre 55 y 59 años. 10: entre 60 y 69 años.</i>
<i>Seis grupos de data (Frag2).</i>	<i>1: entre 0 y 19 años. 2: entre 20 y 29 años. 3: entre 30 y 39 años. 4: entre 40 y 49 años. 5: entre 50 y 59 años. 6: entre 60 y 69 años.</i>
<i>Data en cuatro grupos (frag3)</i>	<i>1: entre 0 y 19 años. 2: entre 20 y 29 años. 3: entre 30 y 39 años. 4: entre 40 y 69 años.</i>

Tabla 5 Variables de Data

Al final seleccionamos para nuestro trabajo las variables de quimioluminiscencia QLorigen a QL70s, y para las de data utilizamos data en dos grupos con su valor 1(hasta 20 años) y 2 (con más de 20 años) y data en 4 grupos con su valor 1, 2 y 3 e ignorando el valor 4 (entre 40 y 69 años) ya que son pocas las muestras de que se disponen, siendo estos parámetros los que hemos podido comprobar que son los que presentan una mayor utilidad en la práctica forense.

RESULTADOS

RESULTADOS

Los valores de quimioluminiscencia (expresados en URL) obtenidos con el luminómetro en las lecturas realizadas (en intervalos de 5 s) en la reacción de cada muestra con el reactivo de luminol se expresan en el ANEXO I.

A continuación se presentan algunos ejemplos de las gráficas que se obtienen en el luminómetro que muestran la curva de la relación existente entre las medidas de quimioluminiscencia en URL frente al intervalo de tiempo de medida.

En el apartado siguiente se recoge en forma de tablas y gráficos la distribución de la muestra según sexo, edad y data con sus correspondientes tablas de frecuencias y un estadístico descriptivo.

Finalmente se han expuesto los resultados del tratamiento estadístico aplicado a la población muestral partiendo de un estudio de correlaciones bivariadas en donde se demuestra la existencia de relación entre quimioluminiscencia con la data. Seguimos con un estudio de regresión en donde enfrentamos las distintas variables luminométricas frente a la data, aplicando un sistema de estadísticos por pasos para obtener la variable con mayor valor de predicción, y una vez obtenida ésta se realiza un estudio de estimación curvilínea con el fin de llegar al modelo matemático que mejor ajusta.

A continuación se realiza un análisis discriminante en primer lugar con respecto a dos agrupaciones de data diferentes (data inferior a 20 años y data superior a 20 años) y a continuación otro segundo análisis discriminante con tres grupos de data diferente (data entre 0 y 19, data entre 20 y 29 y data entre 30 y 39), para terminar comparando los resultados.

Terminamos llevando a cabo un estudio de curvas COR. En el ANEXO II se reflejan las coordenadas de sensibilidad y especificidad correspondientes a QL35s para una población muestral con data de muerte hasta 20 años.

SIGNIFICADO DE SIGLAS UTILIZADAS EN EL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.

QLorigen	Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro en el momento de la inyección de reactivo sobre la muestra problema.
QL05s	Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 5 s
QL10s	Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 10 s
QL15s	Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 15 s
QL20s	Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 20 s
QL25s	Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 25 s
QL30s	Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 30 s
QL35s	Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 35 s
QL40s	Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 40 s
QL45s	Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 45 s
QL50s	Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 50 s
QL55s	Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 55 s
QL60s	Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 60 s
QL65s	Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 65 s
QL70s	Valor de quimioluminiscencia medida por luminómetro a los 70 s

Tabla 6 Denominación de las variables luminométricas en el tiempo.

GRAFICAS

Gráficas obtenidas en el luminómetro que expresan la curva de la relación existente entre las medidas de quimioluminiscencia en URL frente al intervalo de tiempo de medida en cada muestra estudiada.

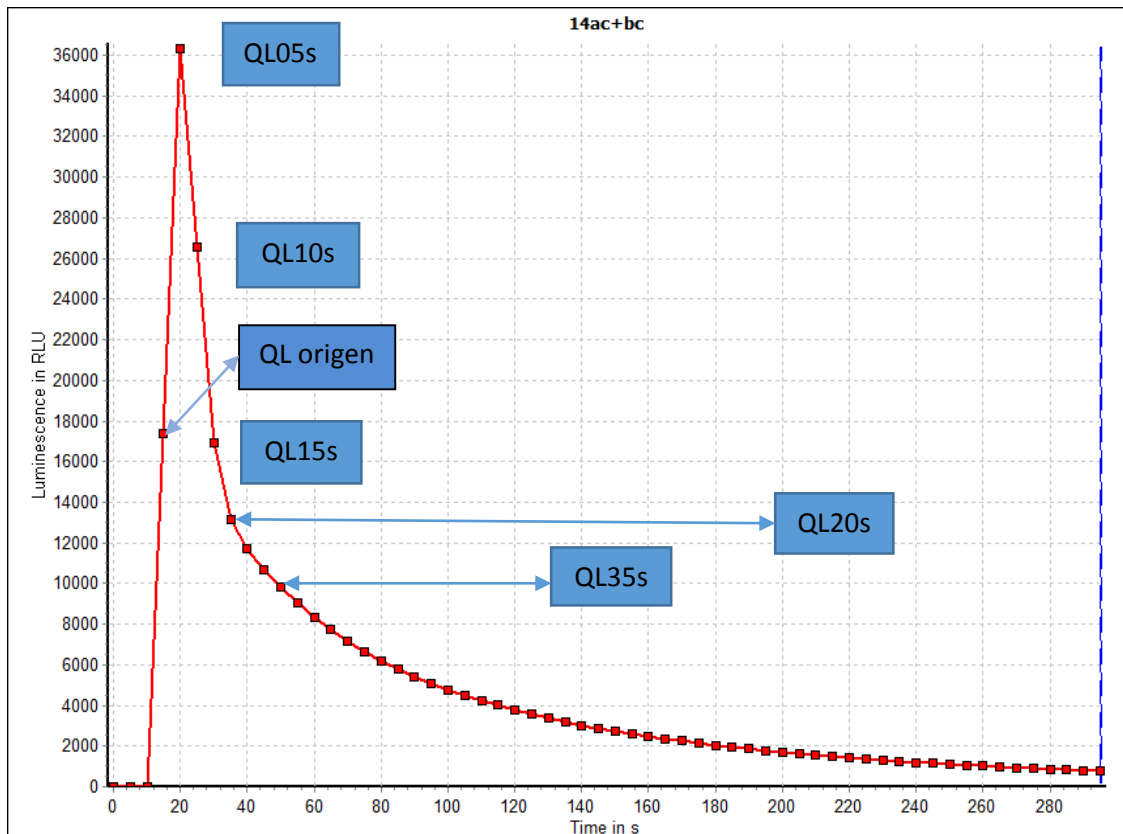
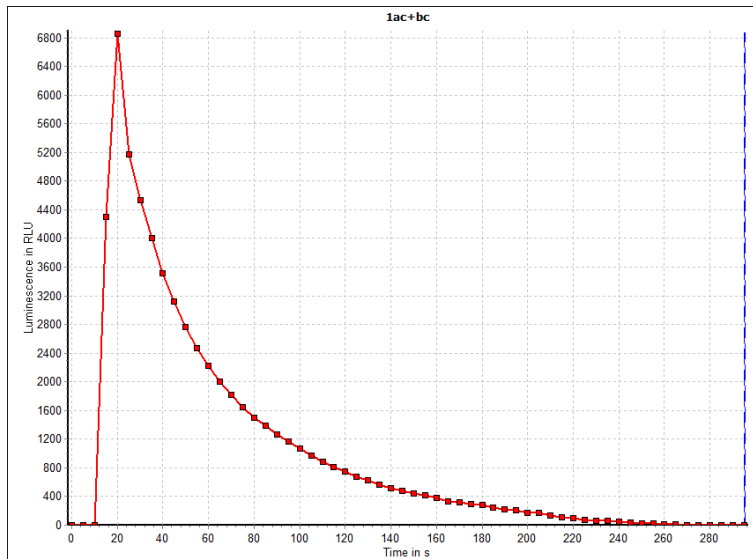


Figura 17. Gráfica de quimioluminiscencia y tiempo

1- Características cinéticas: La curva anterior es una cinética de orden 2. No obstante es posible un ajuste polinómico de la curva estudiada a partir de orden 2 hasta orden 5, ya que cuanto mayor sea el orden, mayor será la aproximación a la predicción cuantitativa de las ordenadas de la curva. Si bien, el estudio de este extremo sobrepasaría los límites de este trabajo.

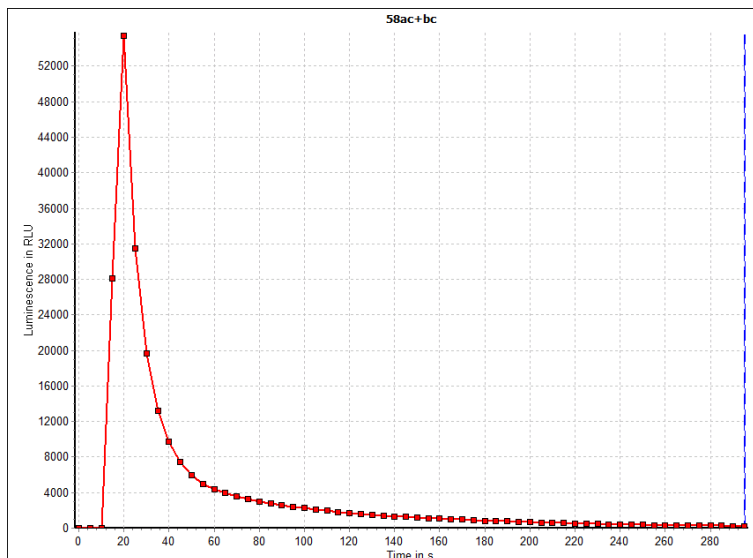
2- refleja 300 segundos de medición,

Ejemplos de diferentes gráficas obtenidas.



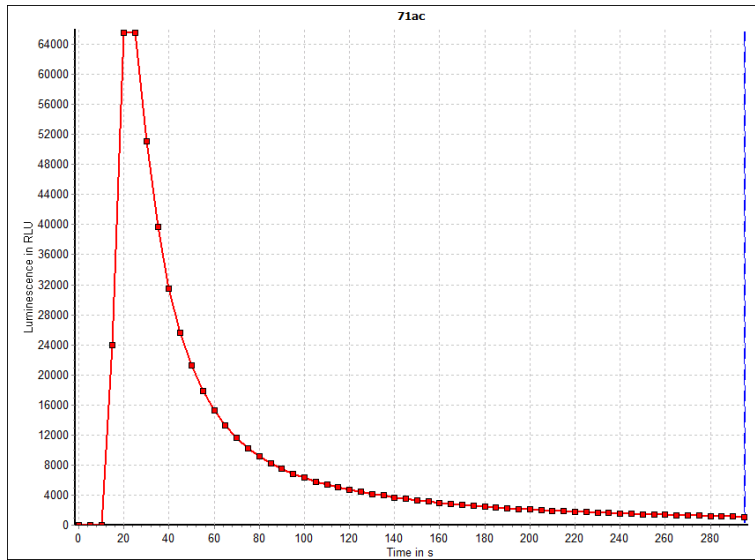
Variable	QL (URL)
QLorigen	4302
QL05s	6857
QL10s	5172
QL15s	4536
QL20s	4000
QL25s	3516
QL30s	3116
QL35s	2771
QL40s	2475
QL45s	2219
QL50s	2003
QL55s	1821
QL60s	1641
QL75s	1504
QL70s	1328

Muestra 1 ac+bc. Se trata del fémur de mujer que fallece a los 84 años y con una data verificada de 21 años. Pico máximo de quimioluminiscencia 6857.



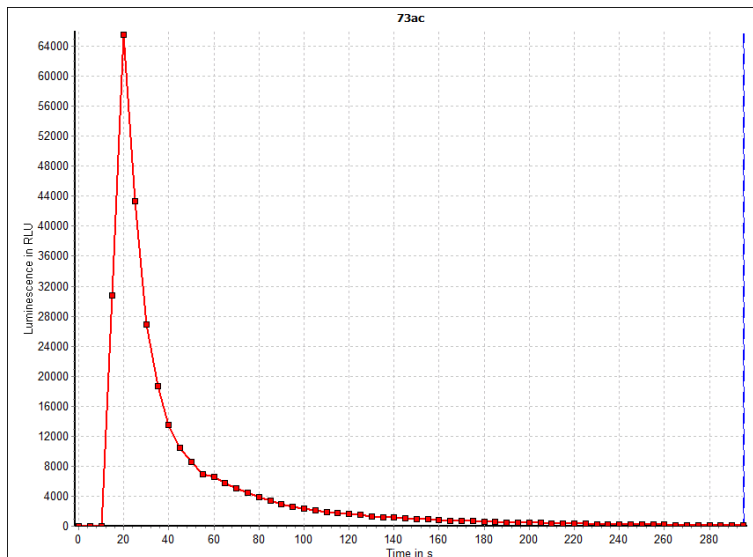
Variable	QL (URL)
QLorigen	28074
QL05s	55417
QL10s	31507
QL15s	19665
QL20s	13231
QL25s	9719
QL30s	7488
QL35s	5976
QL40s	4962
QL45s	4359
QL50s	3985
QL55s	3581
QL60s	3251
QL65s	3982
QL70s	2732

Muestra 58 ac+bc. Se trata del fémur de una mujer que fallece a los 68 años y con una data verificada de 43 años. Pico máximo de quimioluminiscencia 55417.



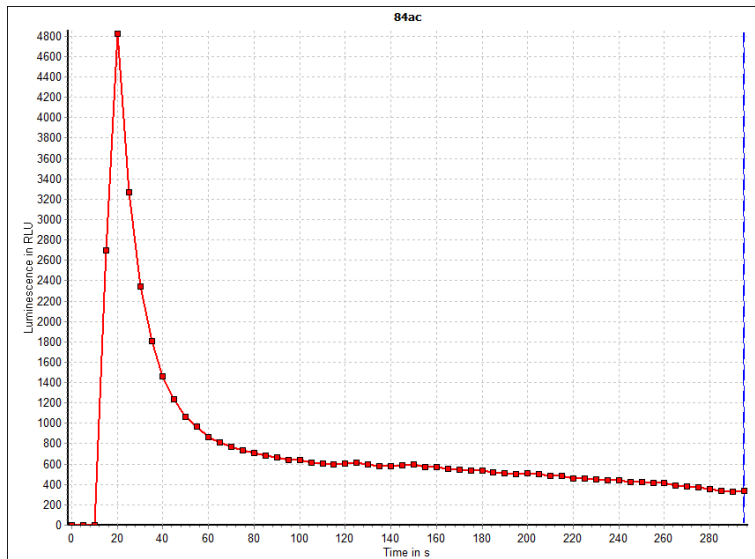
Variable	QL(URL)
QLorigen	24000
QL05s	65535
QL10s	65535
QL15s	51070
QL20s	39677
QL25s	31504
QL30s	25649
QL35s	21239
QL40s	17910
QL45s	15303
QL50s	13218
QL55s	11650
QL60s	10243
QL65s	9130
QL70s	8207

Muestra 71 ac. Se trata del fémur de un varón que fallece a los 24 años de edad y con una data verificada de 15 años. Se dan dos picos máximos en QL05s y QL10s de 65535, lo que nos indica que su valor real será superior ya que el máximo de medición del liminómetro en las condiciones del trabajo es 65535.



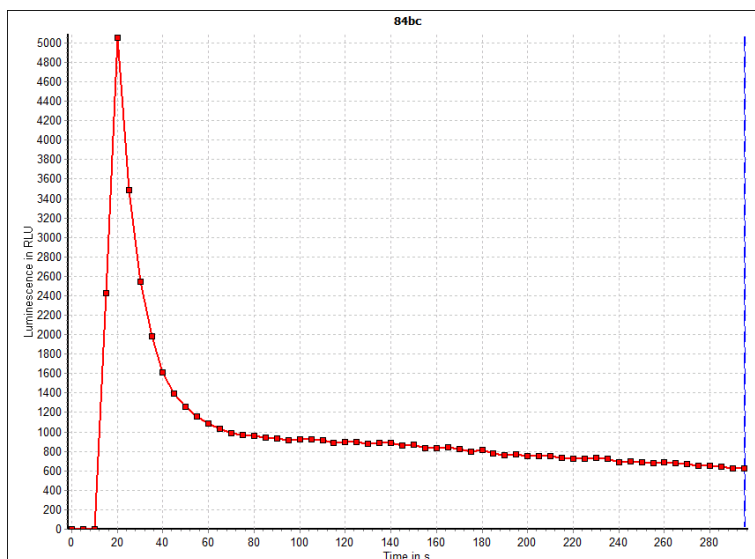
Variable	QL(URL)
QLorigen	30770
QL05s	65535
QL10s	43292
QL15s	26945
QL20s	18702
QL25s	13448
QL30s	10499
QL35s	8554
QL40s	6951
QL45s	6542
QL50s	5813
QL55s	5061
QL60s	4422
QL65s	3856
QL70s	3367

Muestra 73 ac. Se trata del fémur de varón que falleció a los 48 años y con una data verificada de 15 años. Pico máximo es 65535.



Variable	QL(URL)
QLorigen	2698
QL05s	4824
QL10s	3269
QL15s	2347
QL20s	1808
QL25s	1465
QL30s	1233
QL35s	1066
QL40s	966
QL45s	862
QL50s	813
QL55s	773
QL60s	734
QL65s	709
QL70s	685

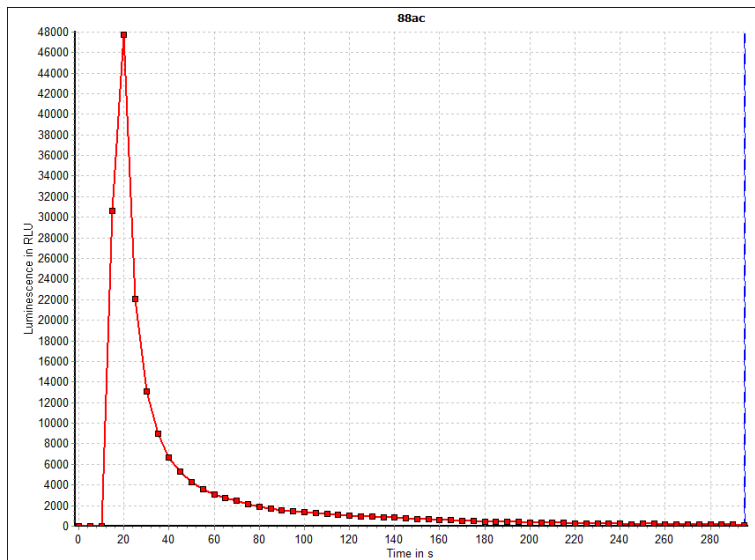
Muestra 84 ac. Se trata del fémur de una mujer fallecida con 88 años y con una data verificada de 20 años. Pico máximo 4824.



Variable	QL(URL)
QLorigen	2426
QL05s	5053
QL10s	3489
QL15s	2548
QL20s	1982
QL25s	1610
QL30s	1399
QL35s	1261
QL40s	1158
QL45s	1086
QL50s	1034
QL55s	990
QL60s	967
QL65s	956
QL70s	943

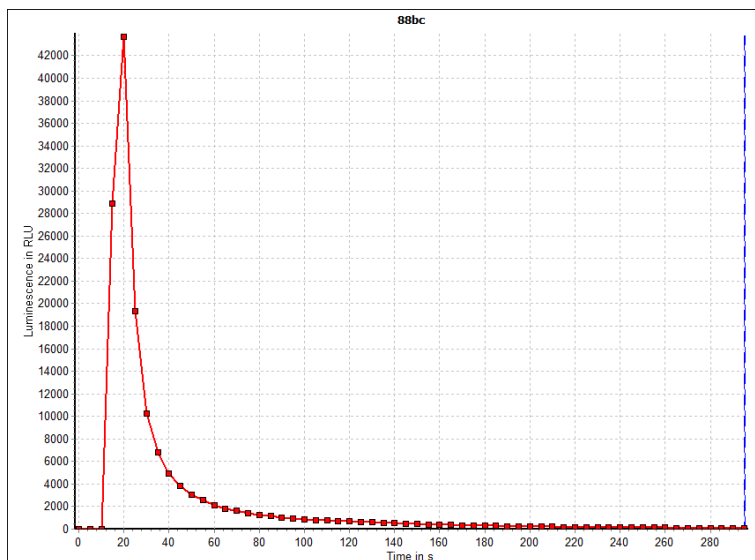
Muestra 84 bc. Se trata del fémur de una mujer fallecida con 88 años y con una data verificada de 20 años. Pico máximo de 5053.

Obsérvese la similitud de los datos obtenidos entre estas dos muestras, dándose la circunstancia de que pertenecen al mismo cadáver.



Variable	QL(URL)
QLorigen	30640
QL05s	47722
QL10s	22051
QL15s	13095
QL20s	8962
QL25s	6661
QL30s	5272
QL35s	4268
QL40s	3616
QL45s	3118
QL50s	2769
QL55s	2450
QL60s	2163
QL65s	1923
QL70s	1720

Muestra 88ac. Se trata del fémur de una mujer fallecida a los 94 años y con una data verificada de 25 años. Pico máximo 47422.



Variable	QL(URL)
QLorigen	28872
QL05s	43676
QL10s	19339
QL15s	10262
QL20s	6801
QL25s	4967
QL30s	3798
QL35s	3070
QL40s	2552
QL45s	2150
QL50s	1824
QL55s	1615
QL60s	1419
QL65s	1266
QL70s	1148

Muestra 88bc. Se trata del fémur de una mujer fallecida a los 94 años y con una data verificada de 25 años. Pico máximo 43676.

Obsérvese la similitud de los datos obtenidos entre estas dos muestras, dándose la circunstancia de que pertenecen al mismo cadáver.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS.

CORRELACIÓN BIVARIADA.

REGRESIÓN.

ESTIMACIÓN CURVILÍNEA.

ANÁLISIS DISCRIMINANTE.

CURVAS COR.

ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS

Trabajamos con 102 casos, de los cuales 63 son hombres y 39 son mujeres. Conocemos la edad de todos los casos, salvo en las muestras 80 ac y 80 bc, por tanto en la edad hay 100 casos válidos y 2 no válidos. La edad mínima de los fallecidos estudiados es de 13 años y la edad máxima es de 97 años. La data de la muerte es conocida en todos los casos, de tal forma que el límite inferior de la misma está en 15 años y el valor máximo se encuentra en 64 años.

FRECUENCIAS

		<i>edad</i>	<i>data muestra</i>
		<i>muestra</i>	
<i>N</i>	<i>Válidos</i>	100	102
	<i>Perdidos</i>	2	0
	<i>Media</i>	66,86	23,62
	<i>Mediana</i>	69,00	19,00
	<i>Moda</i>	69	15
	<i>Desv. típ.</i>	19,543	10,828
	<i>Varianza</i>	381,940	117,248
	<i>Curtosis</i>	-,002	1,890
	<i>Error típ. de curtosis</i>	,478	,474
	<i>Rango</i>	84	49
	<i>Mínimo</i>	13	15
	<i>Máximo</i>	97	64

Tabla 7 Estadísticos de edad y data

Edad

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
13	1	1,0	1,0
20	2	2,0	3,0
24	2	2,0	5,0
26	1	1,0	6,0
33	2	2,0	8,0
36	1	1,0	9,0
37	2	2,0	11,0
39	1	1,0	12,0
42	1	1,0	13,0
47	1	1,0	14,0
48	3	2,9	17,0
49	2	2,0	19,0
50	1	1,0	20,0
53	2	2,0	22,0
54	1	1,0	23,0
55	1	1,0	24,0
56	1	1,0	25,0
57	1	1,0	26,0
58	5	4,9	31,0
59	2	2,0	33,0
60	1	1,0	34,0
61	1	1,0	35,0
62	1	1,0	36,0
63	1	1,0	37,0
64	2	2,0	39,0
65	2	2,0	41,0
66	1	1,0	42,0
67	2	2,0	44,0
68	2	2,0	46,0
69	7	6,9	53,0
70	1	1,0	54,0
71	1	1,0	55,0
74	5	4,9	60,0
75	3	2,9	63,0
76	3	2,9	66,0

Tabla 8. Edad de la muestra

		<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
<i>Válidos</i>	77	1	1,0	67,0
	78	3	2,9	70,0
	79	2	2,0	72,0
	81	1	1,0	73,0
	82	2	2,0	75,0
	84	3	2,9	78,0
	85	1	1,0	79,0
	86	3	2,9	82,0
	87	3	2,9	85,0
	88	3	2,9	88,0
	89	2	2,0	90,0
	90	1	1,0	91,0
	91	1	1,0	92,0
	92	3	2,9	95,0
	93	2	2,0	97,0
	94	2	2,0	99,0
	97	1	1,0	100,0
	<i>Total</i>	100	98,0	
<i>Perdidos</i>	<i>Sistema</i>	2	2,0	
<i>Total</i>		102	100,0	

Tabla 8. Edad de la muestra. Continuación.

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
<i>11 a 20 años</i>	3	2,9	3,0
<i>21 a 30 años</i>	3	2,9	6,0
<i>31 a 40 años</i>	6	5,9	12,0
<i>41 a 50 años</i>	8	7,8	20,0
<i>51 a 60 años</i>	14	13,7	34,0
<i>61 a 70 años</i>	21	20,6	55,0
<i>71 a 80 años</i>	17	16,7	72,0
<i>81 a 90 años</i>	19	18,6	91,0
<i>91 a 100 años</i>	9	8,8	100,0
<i>Total</i>	100	98,0	
<i>Perdidos Sistema</i>	2	2,0	
<i>Total</i>	102	100,0	

Tabla 9 Frecuencias por grupos de edad con intervalos de 10 años.

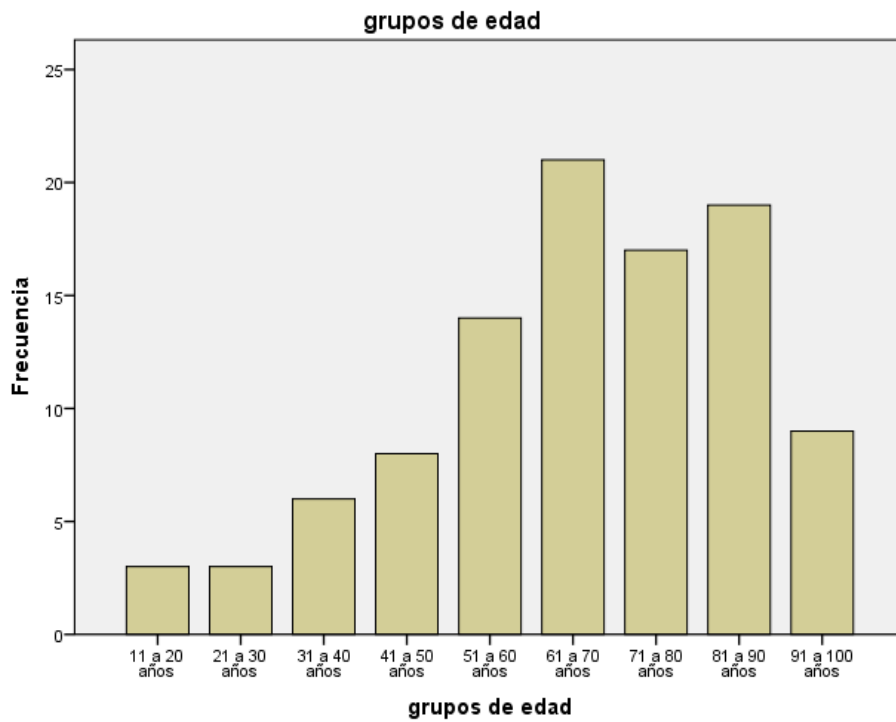


Figura 18. Grupos de edad con intervalo de 10 años.

Sexo

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
<i>hombre</i>	63	61,8	61,8
Válidos <i>mujer</i>	39	38,2	100,0
<i>Total</i>	102	100,0	

Tabla 10. Sexo de la muestra: frecuencia y porcentaje.

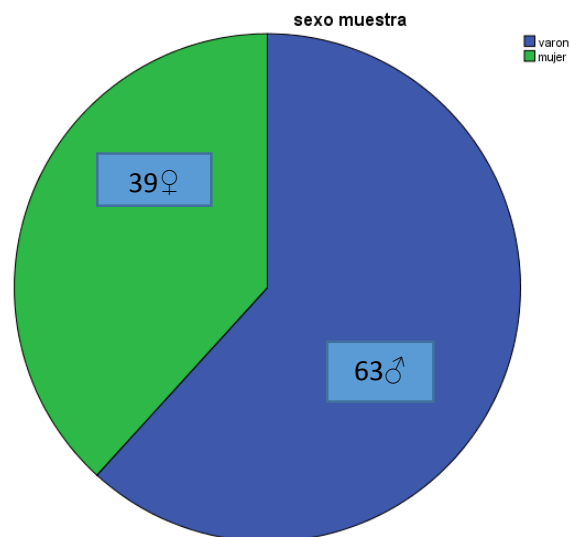


Figura 19. Sexo de la muestra

Data

<i>Data en años</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
15	30	29,4	29,4
17	7	6,9	36,3
18	13	12,7	49,0
19	5	4,9	53,9
20	5	4,9	58,8
21	7	6,9	65,7
22	1	1,0	66,7
24	1	1,0	67,6
25	3	2,9	70,6
26	1	1,0	71,6
27	1	1,0	72,5
28	3	2,9	75,5
29	1	1,0	76,5
31	2	2,0	78,4
32	2	2,0	80,4
35	2	2,0	82,4
37	2	2,0	84,3
38	5	4,9	89,2
40	3	2,9	92,2
41	1	1,0	93,1
43	2	2,0	95,1
47	1	1,0	96,1
50	1	1,0	97,1
51	1	1,0	98,0
58	1	1,0	99,0
64	1	1,0	100,0
<i>Total</i>	<i>102</i>	<i>100,0</i>	

Tabla 11 Data de la muestra

Observamos como la muestra se encuentra en un rango de data entre 15 de data mínima y 64 de data máxima.

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
<i>entre 15 y 19</i>	55	53,9	53,9
<i>entre 20 y 24</i>	13	12,7	66,7
<i>entre 25 y 29</i>	10	9,8	76,5
<i>entre 30 y 34</i>	4	3,9	80,4
<i>entre 35 y 39</i>	9	8,8	89,2
<i>entre 40 y 44</i>	6	5,9	95,1
<i>entre 45 y 49</i>	1	1,0	96,1
<i>entre 50 y 54</i>	2	2,0	98,0
<i>entre 55 y 59</i>	1	1,0	99,0
<i>entre 60 y 64</i>	1	1,0	100,0
<i>Total</i>	102	100,0	

Tabla 12. Data de la muestra en intervalos de 5 años.

CORRELACIONES BIVARIADAS

El objetivo de este análisis es establecer la existencia de correlación entre las distintas variables. En este caso relacionamos la data en años con las diferentes variables de quimioluminiscencia entre QLorigen (lectura en el momento del contacto del reactivo de luminol con la muestra de polvo óseo) y QL70s (lectura a los 70 s) en los 102 casos estudiados

	<i>Coefficiente de Pearson</i>	<i>Nivel significación</i>
<i>QLorigen</i>	<i>-,297**</i>	<i>,002</i>
<i>QL05s</i>	<i>-,345**</i>	<i>,001</i>
<i>QL10s</i>	<i>-,361**</i>	<i>,000</i>
<i>QL15s</i>	<i>-,367**</i>	<i>,000</i>
<i>QL20s</i>	<i>-,366**</i>	<i>,000</i>
<i>QL25s</i>	<i>-,356**</i>	<i>,000</i>
<i>QL30s</i>	<i>-,349**</i>	<i>,000</i>
<i>QL35s</i>	<i>-,342**</i>	<i>,000</i>
<i>QL40s</i>	<i>-,335**</i>	<i>,001</i>
<i>QL45s</i>	<i>-,329**</i>	<i>,001</i>
<i>QL50s</i>	<i>-,324**</i>	<i>,001</i>
<i>QL55s</i>	<i>-,318**</i>	<i>,001</i>
<i>QL60s</i>	<i>-,314**</i>	<i>,001</i>
<i>QL65s</i>	<i>-,314**</i>	<i>,001</i>
<i>QL70s</i>	<i>-,312**</i>	<i>,001</i>

Tabla 13. Coeficiente de Pearson entre data y quimioluminiscencia y nivel de significación.

La correlación es significativa al nivel de 0,01 (bilateral)**

Ateniéndonos al valor del Coeficiente de Pearson y al nivel de significación en todos los casos, se puede afirmar que la intensidad de quimioluminiscencia y la data se relacionan de forma inversamente proporcional.

REGRESION

Intentamos establecer una relación matemática que permite predecir el porcentaje de una variable definida como dependiente, en este caso el intervalo postmortem, explicada por otra variable, y establecer una fórmula matemática que permite la estimación de la data de la muerte a partir del conjunto de variables definidas como independientes, en este caso la quimioluminiscencia, que será la variable predictora.

Se efectúa un tratamiento estadístico buscando la variable con mayor poder de predicción, para lo cual hacemos una regresión por pasos en donde enfrentamos desde QLorigen hasta QL45s, ambas inclusive, con la data.

<i>Modelo</i>	<i>Variables introducidas</i>	<i>Variables eliminadas</i>	<i>Método</i>
<i>1</i>	<i>QL15s</i>		<i>Por pasos (criterio: Prob. de F para entrar <= ,050, Prob. de F para salir >= ,100).</i>

Tabla 14. Variables introducidas/eliminadas

Variable dependiente: data de la muerte.

Vemos que la variable resultante incluida será QL15s, excluyendo todas las demás variables estudiadas.

<i>Modelo</i>	<i>R</i>	<i>R cuadrado</i>	<i>R cuadrado corregida</i>	<i>Error típ. de la estimación</i>
<i>1</i>	<i>,379</i>	<i>,144</i>	<i>,135</i>	<i>10,108</i>

Tabla 15. Resumen del modelo

Variable predictoras: (Constante), QL15s

Variable dependiente: data de la muestra.

<i>Modelo</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>1</i> <i>Regresión</i>	1678,588	1	1678,588	16,430	,000 ^b
<i>Residual</i>	10012,002	98	102,163		
<i>Total</i>	11690,590	99			

Tabla 16. ANOVA

- Variable dependiente: data de la muerte.
- Variable predictora: (Constante), QL15s

<i>Modelo</i>	<i>Coefficientes no estandarizados</i>		<i>Coefficientes tipificados</i>	<i>t</i>	<i>Sig.</i>
	<i>B</i>	<i>Error típ.</i>	<i>Beta</i>		
<i>1</i> <i>(Constante)</i>	27,161	1,309		20,750	,000
<i>QL15s</i>	,000	,000	-,379	-4,053	,000

Tabla 17. Coeficientes.

- Variable dependiente: data de la muerte.
- Variable predictora: (Constante), QL15s.

Observamos con los resultados obtenidos hasta ahora que QL15s es la variable quimioluminométrica más predictora existiendo una relación lineal entre QL15s y la data como variable dependiente y los coeficientes de la recta de regresión permanecen con un nivel de significación ,000. La R^2 en el modelo lineal tiene un valor de ,144 y un R y coeficiente tipificado Beta de -,379. (Tablas 15 y 17).

Modelo	Beta dentro	t	Sig.	Correlación parcial	Estadísticos de colinealidad
					Tolerancia
QL10s	,020 ^b	,041	,967	,004	,036
QL20s	-,141 ^b	-,243	,809	-,025	,026
QL25s	-,056 ^b	-,171	,865	-,017	,081
QL30s	-,059 ^b	-,232	,817	-,024	,134
QL35s	-,058 ^b	-,263	,793	-,027	,184
QL40s	-,056 ^b	-,284	,777	-,029	,228
QL45s	-,055 ^b	-,300	,765	-,030	,260

Tabla 18. Variables excluidas

- a. Variable dependiente: data muerte
- b. Variable predictoras en el modelo: (Constante), QL15s

En el modelo lineal quedan excluidas todas las variables a excepción de QL15s.
(Tabla 18).

ESTIMACIÓN CURVILÍNEA

La estimación curvilínea nos determina el modelo matemático (lineal, exponencial, logarítmico) de la fórmula que mejor ajusta la representación gráfica de la regresión de una variable dependiente, la data, en relación con QL15s como variable independiente.

Nombre del modelo		MOD_1
Variable dependiente	1	data muestra
	1	Lineal
Ecuación	2	Logarítmica
	3	Exponencial
Variable independiente		QL15s
Constante		Incluidos
Variable cuyos valores etiquetan las observaciones en los gráficos		Sin especificar

Tabla 19. Descripción del modelo

	Variables		
	Dependiente	Independiente	
	data muestra	QL15s	
Número de valores positivos	102	101	
Número de ceros	0	1	
Número de valores negativos	0	0	
Número de valores perdidos			
	Perdidos definidos por el usuario	0	0
	Perdidos del sistema	0	0

Tabla 20. Resumen del procesamiento de las variables

En la tabla anterior podemos observar como el valor de la variable dependiente, data, es siempre positivo en los 102 casos, mientras que el valor de la variable independiente QL15s es positivo en 101 casos, ya que ésta presenta un valor 0 en el caso restante, en concreto la muestra 69 ac+bc, que nos impide calcular el modelo logarítmico.

Ecuación	Resumen del modelo					Estimaciones de los parámetros
	R cuadrado	F	gl1	gl2	Sig.	Constante
Lineal	,135	15,595	1	100	,000	26,857
Logarítmica
Exponencial	,164	19,614	1	100	,000	24,709

Tabla 21. Resumen del modelo y estimaciones de los parámetros I.

Variable independiente QL15s.

Variable dependiente: data de la muerte.

Ecuación	Estimaciones de los parámetros
	b1
Lineal	,000
Logarítmica	.
Exponencial	-6,950E-006

Tabla 22. Resumen del modelo y estimaciones de los parámetros II.

Variable dependiente: data de la muerte.

Variable independiente: QL15s.

Vemos que el modelo lineal presenta un R^2 de 0,135 con b_1 de ,000 frente al modelo exponencial que presenta un R^2 de 0,164 y con un b_1 de $-6,950 \cdot 10^{-6}$ que representa el coeficiente de QL15s en el modelo exponencial.

Por tanto nos encontramos ante un modelo exponencial, ya que sus valores son más representativos que en el caso del modelo lineal y el hecho de ser negativo nos pone de manifiesto de que se trata de una exponencial decreciente.

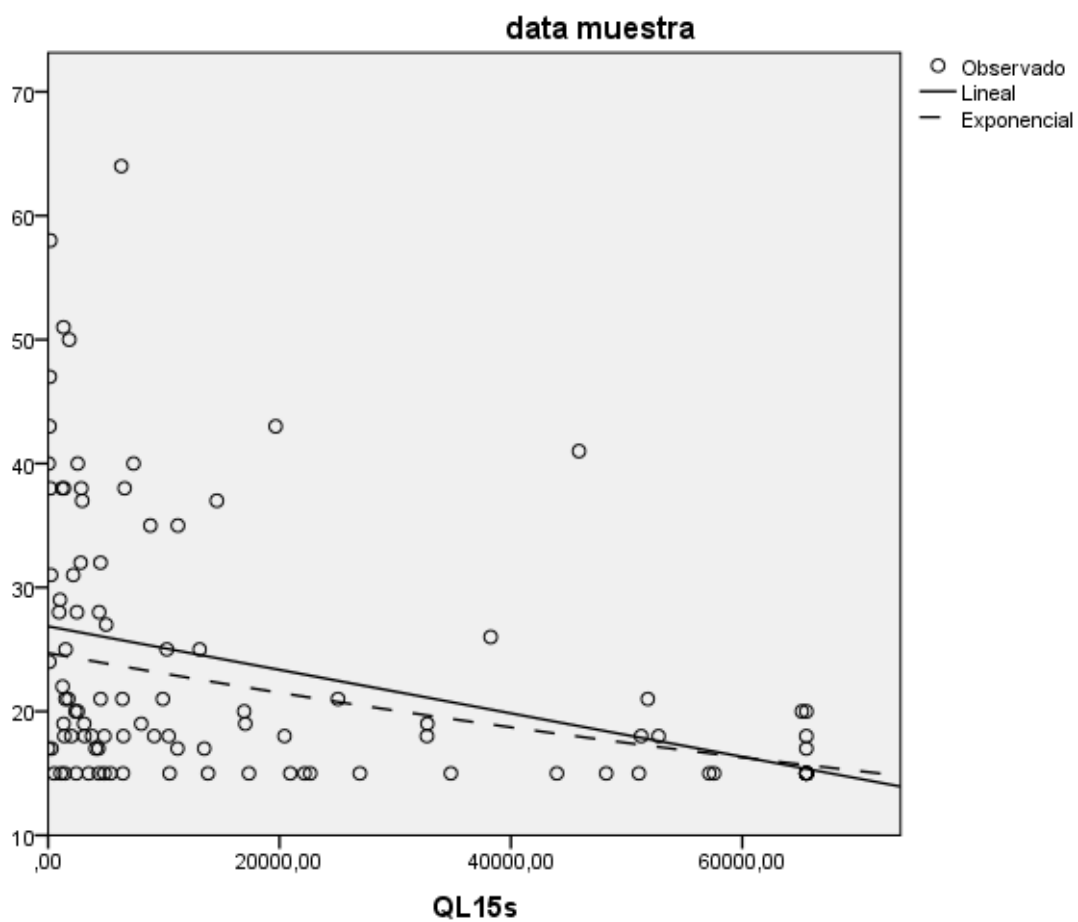


Figura 20. Representación gráfica comparativa entre el modelo exponencial y el lineal QL15s.

Hacemos también el cálculo del modelo matemático suprimiendo la muestra 69 ac+bc con la finalidad de excluir su valor 0 en QL15s y por tanto poder calcular junto al modelo lineal y exponencial el logarítmico. Trabajamos por tanto con 101 muestras en este caso. Los resultados serán los siguientes:

Nombre del modelo		MOD_3
Variable dependiente 1		data muestra
	1	Lineal
Ecuación	2	Logarítmica
	3	Exponencial ^a
Variable independiente		QL15s
Constante		Incluidos
Variable cuyos valores etiquetan las observaciones en los gráficos		Sin especificar

Tabla 23. Resumen del procesamiento de los datos sin muestra 69 ac+bc.

	Variables	
	Dependiente	Independiente
	data muestra	QL15s
Número de valores positivos	101	101
Número de ceros	0	0
Número de valores negativos	0	0
Número de valores perdidos		
Perdidos definidos por el usuario	0	0
Perdidos del sistema	0	0

Tabla 14. Tabla Resumen del procesamiento de las variables.

Ecuación	Resumen del modelo					Estimaciones de los parámetros
	R cuadrado	F	gl1	gl2	Sig.	Constante
Lineal	,140	16,122	1	99	,000	27,021
Logarítmica	,211	26,450	1	99	,000	48,762
Exponencial	,170	20,272	1	99	,000	24,864

Tabla 25. Resumen del modelo y estimaciones de los parámetros sin muestra 69 ac+bc. I.

Variable dependiente: data de la muestra

Variable independiente es QL15s.

Ecuación	Estimaciones de los parámetros
	b1
Lineal	,000
Logarítmica	-2,855
Exponencial	-7,085E-006

Tabla 26. Resumen del modelo y estimaciones de los parámetros sin muestra 69 ac+bc. II

Variable dependiente: data de la muestra.

Variable independiente es QL15s.

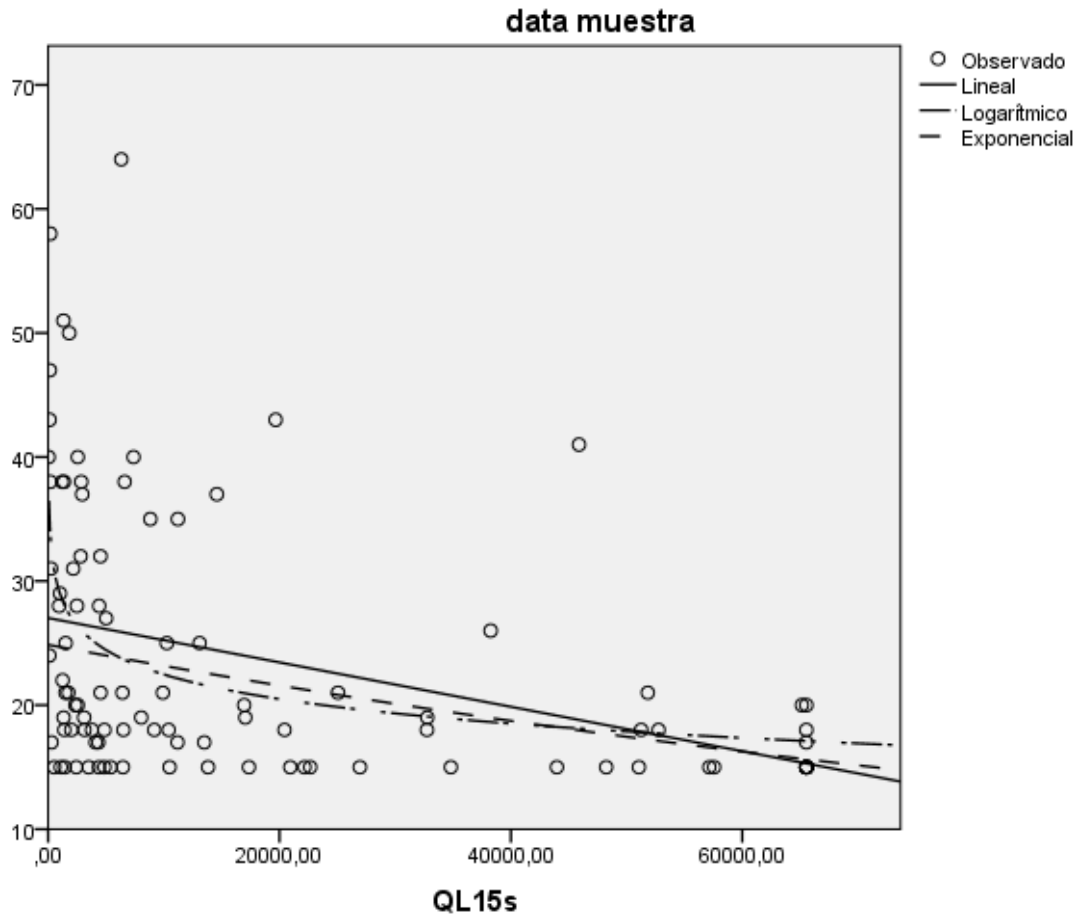


Figura 21. Representación gráfica comparativa entre el modelo lineal, logarítmico y exponencial de la variable QL15s.

Vemos que al anular el valor 0 de la variable QL15s en la muestra 69 ac+bc el modelo logarítmico es ahora el que mejor se ajusta, con un R^2 de 0,211 , frente al modelo exponencial y al modelo lineal que presentarán un R^2 de 0,170 y 0,140 respectivamente.

En este caso nos encontramos ante un modelo logarítmico decreciente, ya que sus valores son más representativos que en el caso del modelo lineal y el exponencial.

ANÁLISIS DISCRIMINANTE

Tiene como objetivo evaluar la capacidad de clasificación de una muestra en diferentes intervalos postmortem definidos previamente, a partir de los valores de un conjunto de variables.

En nuestro trabajo se ha realizado el análisis discriminante frente a dos situaciones diferentes de distribución de grupos de data. Una primera en que tendremos en cuenta solo dos poblaciones de data, en donde distinguiremos por una parte datas hasta 20 años de datas superiores a 20 años. En el segundo análisis tendremos en cuenta tres poblaciones de data, en donde distinguiremos una primera hasta 19 años de data, una segunda de 20 a 29 años de data y una tercera de 30 a 39 años de data de la muerte.

Las variables de quimioluminiscencia que hemos utilizado son aquellas que en el estudio de correlación bivariada presentan un nivel de significación mayor de la milésima (tabla 13), es decir, QL10s, QL15s, QL20s, QL25s, QL30s y QL35s.

Validaremos el análisis discriminante con aquellos índices que nos sirven para interpretarlos, tales como la Lambda de Wilks, el estadístico F, Autovalor y la Correlación canónica.

Lambda de Wilks: Mide el poder discriminante de las variables, de tal forma que en términos absolutos su valor debe de encontrarse entre 0 y 1, y será más representativo conforme se acerca a 0, es decir, la variable más discriminante será aquella cuyo valor de lambda sea más cercano a 0 con respecto a otras variables.

Estadístico F: Relaciona las variaciones entre grupos con las variaciones intragrupos.

Autovalores. Se corresponde con la suma de los cuadrados entre grupos de cada función discriminante. Cuanto más alto es su valor, mayor discriminación.

Correlaciones canónicas: Mide en términos relativos el poder discriminante. Representa el porcentaje de la variación total en dicha función que es explicada por las diferencias entre los grupos. Tiene valores entre 0 y 1 y debe ser lo más próxima posible a 1.

Análisis discriminante con dos grupos de data.

En este apartado hacemos el análisis discriminante entre dos poblaciones de data, de tal forma que como vemos en la tabla 27 tenemos un primer grupo de 59 casos con una data de la muerte que no supera los 20 años y un segundo grupo de data superior a 20 años y que se corresponde con 43 casos. Como vemos en este análisis todos los casos son válidos ya que conocemos la data cierta de todas las muestras óseas que estudiamos.

<i>Data dividida en dos grupos de población</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
<i>data entre 0 y 20</i>	59	57,8	57,8
Válidos <i>data de 21 a 69</i>	43	42,2	100,0
<i>Total</i>	102	100,0	

Tabla 27. Data dividida en dos grupos de población.

Data dividida dos grupos de población		Media	Desv. típ.	N válido (según lista)	
				No ponderados	Ponderados
data entre 0 y 20	QL10s	29583,0847	26298,57524	59	59,000
	QL15s	26083,9831	25517,96310	59	59,000
	QL20s	22764,4576	23712,42310	59	59,000
	QL25s	20076,4068	22150,28334	59	59,000
	QL30s	17720,4576	20419,05377	59	59,000
	QL35s	15768,6610	18871,40156	59	59,000
data de 21 a 69	QL10s	11151,6512	16153,58857	43	43,000
	QL15s	8018,4884	11992,78302	43	43,000
	QL20s	6139,6977	9217,86295	43	43,000
	QL25s	4954,4186	7388,80409	43	43,000
	QL30s	4124,7442	6216,66395	43	43,000
	QL35s	3518,7442	5371,30343	43	43,000
Total	QL10s	21812,9706	24276,20224	102	102,000
	QL15s	18468,1373	22674,15293	102	102,000
	QL20s	15755,9804	20646,77504	102	102,000
	QL25s	13701,4510	18993,88053	102	102,000
	QL30s	11988,9314	17349,94715	102	102,000
	QL35s	10604,4804	15920,48691	102	102,000

Tabla 28. Estadísticos de grupo para Data dividida en dos grupos de población..

Comprobamos como el valor medio de la intensidad de quimioluminiscencia en todos los grupos es mayor conforme la medición es anterior en el tiempo y menor es la data.

	Lambda de Wilks	F	gl1	gl2	Sig.
QL10s	,858	16,544	1	100	,000
QL15s	,844	18,529	1	100	,000
QL20s	,840	19,000	1	100	,000
QL25s	,844	18,497	1	100	,000
QL30s	,849	17,816	1	100	,000
QL35s	,854	17,068	1	100	,000

Tabla 29. Prueba de igualdad de las medias de los grupos.

En esta tabla podemos comprobar que QL20s es la variable que mejores resultados tiene con respecto a Lambda de Wilks y F. El nivel de significación permanece para todas las variables por encima de la milésima. Por tanto QL20s es la variable más discriminante entre las estudiadas.

Con los datos anteriores realizamos un análisis estadístico por pasos, un resumen de las funciones canónicas discriminantes y unos estadísticos de clasificación.

Estadístico por pasos

En cada paso se introduce la variable que minimiza la lambda de Wilks global y cuyo número máximo de pasos es 12.

Paso	Introducidas	Lambda de Wilks					
		Estadístico	gl1	gl2	gl3	F exacta	
						Estadístico	gl1
1	QL20s	,840	1	1	100,000	19,000	1

Tabla 30. Variables introducidas/excluidas I

Paso	Lambda de Wilks	
	F exacta	
	gl2	Sig.
1	100,000	,000

Tabla 31. Variables introducidas/excluidas II

En las tablas 30 y 31 ya vemos como selecciona QL20s en el paso 1 como variable más discriminante y excluye todas las demás

<i>Paso</i>	<i>Tolerancia</i>	<i>F para salir</i>
<i>1</i>	<i>QL20s</i>	<i>1,000</i>
		<i>19,000</i>

Tabla 32. Variables en el análisis

<i>Paso</i>	<i>Tolerancia</i>	<i>Tolerancia mín.</i>	<i>F para entrar</i>	<i>Lambda de Wilks</i>	
<i>0</i>	<i>QL10s</i>	<i>1,000</i>	<i>1,000</i>	<i>16,544</i>	<i>,858</i>
	<i>QL15s</i>	<i>1,000</i>	<i>1,000</i>	<i>18,529</i>	<i>,844</i>
	<i>QL20s</i>	<i>1,000</i>	<i>1,000</i>	<i>19,000</i>	<i>,840</i>
	<i>QL25s</i>	<i>1,000</i>	<i>1,000</i>	<i>18,497</i>	<i>,844</i>
	<i>QL30s</i>	<i>1,000</i>	<i>1,000</i>	<i>17,816</i>	<i>,849</i>
	<i>QL35s</i>	<i>1,000</i>	<i>1,000</i>	<i>17,068</i>	<i>,854</i>
<i>1</i>	<i>QL10s</i>	<i>,117</i>	<i>,117</i>	<i>,006</i>	<i>,840</i>
	<i>QL15s</i>	<i>,031</i>	<i>,031</i>	<i>,005</i>	<i>,840</i>
	<i>QL25s</i>	<i>,022</i>	<i>,022</i>	<i>,003</i>	<i>,840</i>
	<i>QL30s</i>	<i>,066</i>	<i>,066</i>	<i>,001</i>	<i>,840</i>
	<i>QL35s</i>	<i>,114</i>	<i>,114</i>	<i>,006</i>	<i>,840</i>

Tabla 33. Variables no incluidas en el paso 1 del análisis.

Vemos como en el paso 1 QL20s no se encuentra entre las excluidas.

Resumen de las funciones canónicas discriminantes.

<i>Función</i>	<i>Autovalor</i>	<i>% de varianza</i>	<i>% acumulado</i>	<i>Correlación canónica</i>
<i>1</i>	<i>,190^a</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>,400</i>

Tabla 34. Autovalores

<i>Contraste de las funciones</i>	<i>Lambda de Wilks</i>	<i>Chi-cuadrado</i>	<i>gl</i>	<i>Sig.</i>
<i>1</i>	<i>,840</i>	<i>17,308</i>	<i>1</i>	<i>,000</i>

Tabla 35. Lambda de Wilks

	<i>Función</i>
	<i>1</i>
<i>QL20s</i>	<i>1,000</i>

Tabla 36. Coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes canónicas

	<i>Función</i>
	<i>1</i>
<i>QL20s</i>	<i>1,000</i>
<i>QL25s</i>	<i>,989</i>
<i>QL15s</i>	<i>,985</i>
<i>QL30s</i>	<i>,967</i>
<i>QL35s</i>	<i>,941</i>
<i>QL10s</i>	<i>,940</i>

Tabla 37. Matriz de estructura

Correlaciones intragrupo combinadas entre las variables discriminantes y las funciones discriminantes canónicas tipificadas. Variables ordenadas por el tamaño de la correlación con la función.

QL35s, QL15s, QL30s, QL35s y QL10s no se utilizan en el análisis.

Data dividida en dos grupos de población	Función	Funciones discriminantes canónicas no tipificadas evaluadas en las medias de los grupos.
	1	
<i>data entre 0 y 20</i>	,368	Vemos como diferencia los ejes de proyección de los dos grupos de data estudiadas.
<i>data de 21 a 69</i>	-,506	

Tabla 38. Funciones en los centroides de los grupos

Teniendo en cuenta todos los resultados anteriores, vemos que QL20s es la variable con mayor poder de discriminación entre los dos grupos de data.

Estadístico de clasificación

Data en dos grupos.	Grupo de pertenencia pronosticado		Total	
	<i>data entre 0 y 20</i>	<i>data de 21 a 69</i>		
Recuento	<i>data entre 0 y 20</i>	27	32	59
	<i>data de 21 a 69</i>	5	38	43
%	<i>data entre 0 y 20</i>	45,8	54,2	100,0
	<i>data de 21 a 69</i>	11,6	88,4	100,0

Tabla 39. Resultados de la clasificación.

En donde se concluye en el análisis discriminante que de los 102 casos estudiados, en estas condiciones se clasifican correctamente 65 casos (27 en data entre 0 y 20 y 38 en data entre 21 y 69), **lo que en porcentaje representa el 63,7% de los casos agrupados original.**

Análisis discriminante con tres grupos de población de data

En este apartado hacemos el análisis discriminante entre tres poblaciones de data, de tal forma que como vemos en la tabla 40 tenemos un primer grupo de 54 casos con una data de la muerte que no supera los 19 años, un segundo grupo de data entre 20 y 29 años y que se corresponde con 23 casos, y un tercer grupo entre 30 y 39 años con 14 casos. Como vemos en este análisis todos los casos son válidos ya que conocemos la data cierta de todas las muestras óseas que estudiamos.

En este análisis discriminante deseamos la población de data comprendida entre 40 y 69 años ya que solo se registra en 11 casos de los 102 estudiados y sobre un rango de data de 30 años de margen.

<i>Data</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
<i>entre 0 y 19</i>	54	52,9	52,9
<i>entre 20 y 29</i>	23	22,5	75,5
<i>Válidos entre 30 y 39</i>	14	13,7	89,2
<i>entre 40 y 69</i>	11	10,8	100,0
<i>Total</i>	102	100,0	

Tabla 40. Data con cuatro grupos de población..

Como en el caso anterior validaremos el análisis discriminante con aquellos índices que nos sirven para interpretarlos, tales como la Lambda de Wilks, el estadístico F, Autovalor y la Correlación canónica.

<i>Casos no ponderados</i>	<i>N</i>	<i>Porcentaje</i>
<i>Válidos</i>	<i>91</i>	<i>89,2</i>
<i>Códigos de grupo para perdidos o fuera de rango</i>	<i>11</i>	<i>10,8</i>
<i>Perdida al menos una variable discriminante</i>	<i>0</i>	<i>,0</i>
<i>Excluidos</i>		
<i>Perdidos o fuera de rango ambos, el código de grupo y al menos una de las variables discriminantes.</i>	<i>0</i>	<i>,0</i>
<i>Total excluidos</i>	<i>11</i>	<i>10,8</i>
<i>Casos Totales</i>	<i>102</i>	<i>100,0</i>

Tabla 41. Resumen del procesamiento para análisis de casos

<i>data dividida en tres grupos de población</i>		<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>N válido (según lista)</i>	
				<i>No ponderados</i>	<i>Ponderados</i>
<i>entre 0 y 19</i>	<i>QL10s</i>	29278,5556	26113,30311	54	54,000
	<i>QL15s</i>	25674,6481	25131,81830	54	54,000
	<i>QL20s</i>	22451,2407	23458,48807	54	54,000
	<i>QL25s</i>	19812,1481	21968,77794	54	54,000
	<i>QL30s</i>	17671,7222	20611,73173	54	54,000
	<i>QL35s</i>	15849,8519	19248,86592	54	54,000
<i>entre 20 y 29</i>	<i>QL10s</i>	16470,8261	22761,13508	23	23,000
	<i>QL15s</i>	13341,3913	20663,14401	23	23,000
	<i>QL20s</i>	10765,7391	17607,14476	23	23,000
	<i>QL25s</i>	8942,5652	15400,92320	23	23,000
	<i>QL30s</i>	7182,7391	12040,84546	23	23,000
	<i>QL35s</i>	5909,2174	9625,47902	23	23,000
<i>entre 30 y 39</i>	<i>QL10s</i>	8265,7143	8095,01192	14	14,000
	<i>QL15s</i>	5714,0714	6036,15839	14	14,000
	<i>QL20s</i>	4431,0714	5295,67169	14	14,000
	<i>QL25s</i>	3735,2143	4882,07028	14	14,000
	<i>QL30s</i>	3169,1429	4440,42298	14	14,000
	<i>QL35s</i>	2729,1429	3988,38120	14	14,000
<i>Total</i>	<i>QL10s</i>	22808,6923	24616,07246	91	91,000
	<i>QL15s</i>	19486,5934	23317,61888	91	91,000
	<i>QL20s</i>	16725,4286	21357,84467	91	91,000
	<i>QL25s</i>	14591,5165	19709,83460	91	91,000
	<i>QL30s</i>	12789,4945	18033,46363	91	91,000
	<i>QL35s</i>	11318,8132	16565,44098	91	91,000

Tabla 42. Estadísticos de grupo para data dividida en tres grupos de población

En la tabla anterior comprobamos como el valor de la media en todos los grupos es mayor conforme la medición es anterior en el tiempo y menor es la data.

	<i>Lambda de Wilks</i>	<i>F</i>	<i>gl1</i>	<i>gl2</i>	<i>Sig.</i>
<i>QL10s</i>	,887	5,588	2	88	,005
<i>QL15s</i>	,886	5,677	2	88	,005
<i>QL20s</i>	,885	5,693	2	88	,005
<i>QL25s</i>	,890	5,454	2	88	,006
<i>QL30s</i>	,887	5,603	2	88	,005
<i>QL35s</i>	,886	5,660	2	88	,005

Tabla 43. Pruebas de igualdad de las medias de grupos.

En esta tabla podemos comprobar que QL20s es la variable que mejores resultados tiene con respecto a Lambda de Wilks y F.

Con los datos anteriores realizamos un análisis estadístico por pasos, un resumen de las funciones canónicas discriminantes y unos estadísticos de clasificación.

Estadístico por pasos

En cada paso se introduce la variable que minimiza la lambda de Wilks global y cuyo número máximo de pasos es 12.

Paso	Introducidas	Lambda de Wilks					
		Estadístico	gl1	gl2	gl3	F exacta	
						Estadístico	gl1
1	QL20s	,885	1	2	88,000	5,693	2

Tabla 44. Variables introducidas/excluidas I

Paso	Lambda de Wilks	
	F exacta	
	gl2	Sig.
1	88,000	,005

Tabla 45. Variables introducidas/excluidas II

En las tablas 44 y 45 ya vemos como selecciona QL20s en el paso 1 como la variable con mayor poder discriminante y excluye todas las demás.

Paso	Tolerancia	F para salir
1 QL20s	1,000	5,693

Tabla 46. Variables en el análisis.

Paso	Tolerancia	Tolerancia mín.	F para entrar	Lambda de Wilks	
0	QL10s	1,000	1,000	5,588	,887
	QL15s	1,000	1,000	5,677	,886
	QL20s	1,000	1,000	5,693	,885
	QL25s	1,000	1,000	5,454	,890
	QL30s	1,000	1,000	5,603	,887
	QL35s	1,000	1,000	5,660	,886
1	QL10s	,105	,105	,167	,882
	QL15s	,028	,028	,202	,881
	QL25s	,021	,021	,202	,881
	QL30s	,063	,063	,452	,876
	QL35s	,109	,109	,600	,873

Tabla 47. Variables no introducidas en el paso 1 del análisis.

Vemos como en el paso 1, QL20s no se encuentra entre las excluidas.

Resumen de las funciones canónicas discriminantes.

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	,129 ^a	100,0	100,0	,338

Tabla 48. Autovalores .

Contraste de las funciones	Lambda de Wilks	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1	,885	10,708	2	,005

Tabla 49. Lambda de Wilks.

	Función
	1
QL20s	1,000

Tabla 50. Coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes canónicas.

	Función
	1
QL20s	1,000
QL25s	,989
QL15s	,986
QL30s	,968
QL10s	,946
QL30s	,944

Tabla 51. Matriz de estructura.

Correlaciones intragrupo combinadas entre las variables discriminantes y las funciones discriminantes canónicas tipificadas. Variables ordenadas por el tamaño de la correlación con la función.

QL25s, QL15s, QL30s, QL10s y QL35s no se utilizan en el análisis.

Data dividida en tres grupos de población	Función
	1
entre 0 y 19	,282
entre 20 y 29	-,293
entre 30 y 39	-,605

Tabla 52. Funciones en los centroides de los grupos.

Funciones discriminantes canónicas no tipificadas evaluadas en las medias de los grupos.

Vemos como diferencia los ejes de proyección de los tres grupos de data estudiados.

Teniendo en cuenta todos los resultados anteriores, vemos que QL20s es la variable con mayor poder de discriminación entre los tres grupos de data estudiados.

Estadístico de clasificación

<i>Data dividida en tres grupos de población</i>	<i>Grupo de pertenencia pronosticado</i>			<i>Total</i>
	<i>entre 0 y 19</i>	<i>entre 20 y 29</i>	<i>entre 30 y 39</i>	
<i>entre 0 y 19</i>	23	8	23	54
<i>entre 20 y 29</i>	4	3	16	23
<i>entre 30 y 39</i>	1	1	12	14
<i>Casos desagrupados</i>	2	1	8	11
<i>entre 0 y 19</i>	42,6	14,8	42,6	100,0
<i>entre 20 y 29</i>	17,4	13,0	69,6	100,0
<i>entre 30 y 39</i>	7,1	7,1	85,7	100,0
<i>Casos desagrupados</i>	18,2	9,1	72,7	100,0

Tabla 53. Resultados de la clasificación.

En donde se concluye en el análisis discriminante que de los 91 casos estudiados, en estas condiciones se clasifican correctamente 38 casos (23 en data entre 0 y 19; 3 en data entre 20 y 29; 12 en data entre 30 y 39), lo que en porcentaje representa el 41,8% de los casos agrupados originales.

	<i>QL20s con dos grupos de data</i>	<i>Nivel de significación de QL20s con dos grupos de data</i>	<i>QL20s con tres grupos de data</i>	<i>Nivel de significación de QL20s con tres grupos de data</i>
<i>Lambda de Wilks</i>	0,840	0,000	0,885	0,005
<i>F</i>	19,000	0,000	5,693	0,005
<i>Autovalor</i>	0,190		0,129	
<i>Correlación Canónica</i>	0,400		0,338	
<i>Porcentaje de clasificación correcta.</i>	63,7 %			41,8 %

Tabla 54. Comparación de resultados del análisis discriminante entre los casos de dos y tres poblaciones de data.

CURVAS COR en el caso de dos poblaciones de data.

Con este estadístico evaluamos la eficacia de la quimioluminiscencia para poder distinguir grupos de data diferentes.

Para ello utilizamos el Area Bajo la Curva (ABC) que mide la probabilidad de clasificar correctamente una muestra problema en la población a la que pertenece. Por tanto está reflejando la capacidad de distinción de poblaciones.

Así mismo, y siguiendo las coordenadas de la curva, nos proporcionará el par en donde coincidan los mejores resultados *sensibilidad / especificidad* que representa el punto de corte en donde tendremos mayor posibilidad de clasificar correctamente.

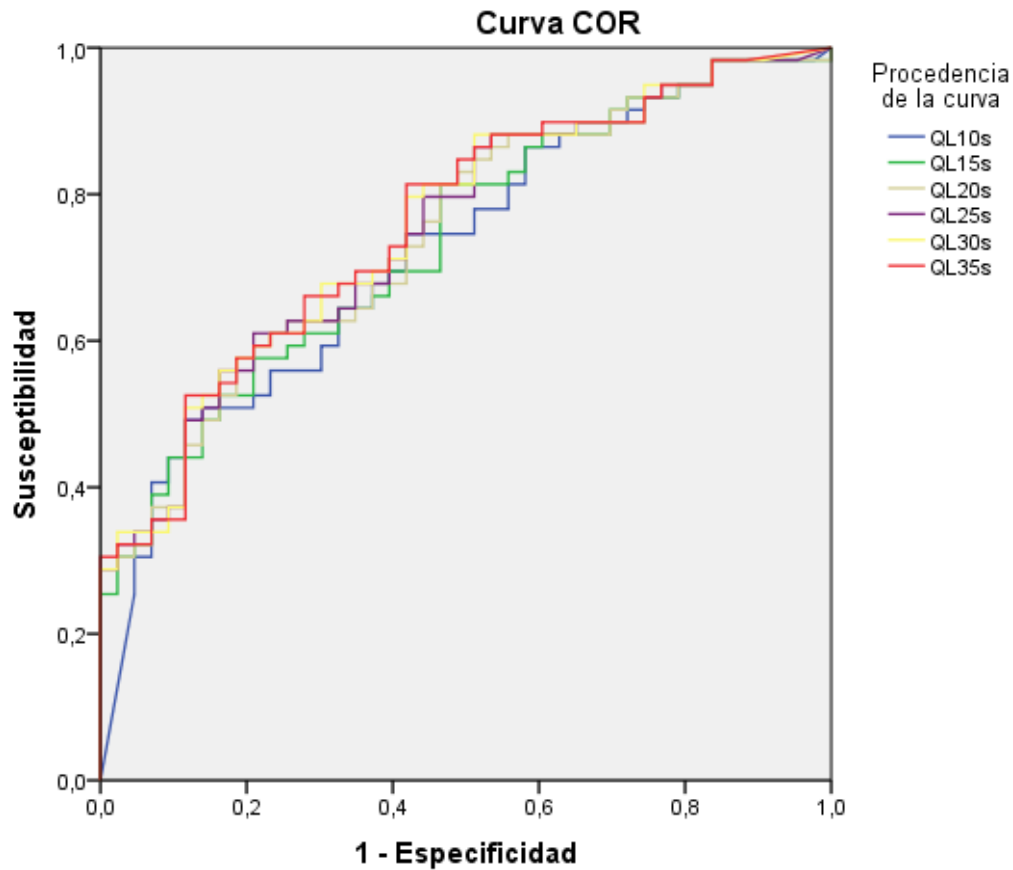
Se hace el tratamiento estadístico en el caso en que hay dos poblaciones, valor 1 hasta 20 años y valor 2 de 20 a 69 años. Utilizamos el valor 1 (data menor de 20) frente a las variables QL10s, QL15s, QL20s, QL25s, QL33s y QL35s.

<i>Data dividida en dos grupos de población</i>	<i>N válido (según lista)</i>
<i>Positivo</i>	<i>59</i>
<i>Negativo</i>	<i>43</i>

Tabla 55. Resumen del proceso de casos.

<i>VARIABLES resultado de contraste</i>	<i>Área</i>	<i>Error típ.^a</i>	<i>Sig. asintótica^b</i>	<i>Intervalo de confianza asintótico al 95%</i>	
				<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
<i>QL10s</i>	<i>,723</i>	<i>,050</i>	<i>,000</i>	<i>,625</i>	<i>,822</i>
<i>QL15s</i>	<i>,736</i>	<i>,048</i>	<i>,000</i>	<i>,641</i>	<i>,831</i>
<i>QL20s</i>	<i>,745</i>	<i>,048</i>	<i>,000</i>	<i>,651</i>	<i>,839</i>
<i>QL25s</i>	<i>,751</i>	<i>,047</i>	<i>,000</i>	<i>,658</i>	<i>,844</i>
<i>QL30s</i>	<i>,757</i>	<i>,047</i>	<i>,000</i>	<i>,665</i>	<i>,849</i>
<i>QL35s</i>	<i>,759</i>	<i>,047</i>	<i>,000</i>	<i>,668</i>	<i>,851</i>

Tabla 56. Areas Bajo la Curva (ABC)



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Figura 22. Representación gráfica comparativa de las curvas COR entre QL10s y QL35s.

Analizando los resultados de ABC observamos que el valor de QL35s se encuentra por encima del resto de variables, lo que dice que esta variable es la que mejor clasifica la muestra problema siendo el mejor valor de coordenadas el de 0,881 de sensibilidad y 0,535 de 1- Especificidad para un valor de QL35s igual o superior a 1046 (ver ANEXO II).

Los resultados obtenidos en las curvas COR nos autorizan a afirmar que la técnica de quimioluminiscencia aplicada a la data de restos óseos tiene la sensibilidad y especificidad suficiente para poder ser utilizada.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

No hemos encontrado publicaciones previas en relación a la determinación cuantitativa de la quimioluminiscencia, con ayuda de un luminómetro, sometiendo polvo óseo al reactivo de luminol, con la finalidad de establecer el intervalo postmortem de las muestras analizadas.

Desde el trabajo de Introna y cols. (1999) se abre una vía para el uso del reactivo de luminol como herramienta para establecer el intervalo postmortem de los restos óseos.

Se puede afirmar según las diferentes fuentes bibliográficas estudiadas, que como resultado de la procesos postmortem (autolisis, putrefacción, etc..) se produce una desintegración de la materia orgánica del hueso que coincide con una mejor conservación de la materia inorgánica; lo que conlleva que el cociente materia orgánica/materia inorgánica sea cada vez menor con el transcurso del tiempo. Se produce un enriquecimiento relativo de la materia inorgánica, coincidiendo con un empobrecimiento de la materia orgánica. El grupo hemo procedente de la sangre es una molécula orgánica, degradándose a lo largo de los procesos postmortem de tal forma que con el paso del tiempo, menor será la concentración del mismo en los restos óseos.

Introna y cols. (1999) demuestran que cuando se somete restos óseos a la acción del reactivo de luminol se produce una quimioluminiscencia cada vez menor conforme se alarga el intervalo postmortem de los restos óseos. Tanto la positividad como la negatividad de la reacción la clasifica midiendo la presencia o ausencia de la quimioluminiscencia por medio de una escala de grises, pero lo que no hace es cuantificar la cantidad de quimioluminiscencia y por tanto no compara numéricamente las diferentes intensidades de la reacción de quimioluminiscencia. En este trabajo, sus autores obtienen una quimioluminiscencia positiva en el 100% de una población de data entre 1 mes y 3 años, y de un 80% entre 10 y 15 años, resultados éstos que no mejoran los que se obtendrían por técnicas morfológicas. De hecho, presenta un 20 % de falsos negativos en datas menores de 15 años. En su trabajo, en el rango de población entre 25 y 35 años de data, los resultados son muy pobres ya que la positividad se presenta tenuemente en el 33% de los casos, dándonos un margen de aplicación práctica muy escaso.

Ramsthaller y cols. (2009 y 2011) estudian de nuevo la quimioluminiscencia del luminol y su aplicación sobre la data de restos óseos. Aun coincidiendo en la conclusión de que dicha técnica por sí misma es insuficiente para la resolución de la cuestión y precisa complementarse con otros métodos de estudio, como señalamos más adelante; los resultados obtenidos en nuestro trabajo entran en contraposición con sus postulados en el sentido de que dichos autores hacen énfasis en la suficiencia de la técnica de la mera observación visual, no siendo relevante para ellos la utilización de técnicas instrumentales cuantitativas. Nuestros resultados nos permiten afirmar la importancia y fiabilidad de la realización de una determinación cuantitativa de quimioluminiscencia en restos óseos desde el momento en que el análisis discriminante de las variables utilizadas nos permite una clasificación correcta del 63,7% de los casos con dos grupos de data (uno entre 0 y 20 y otro grupo de data entre 21 y 69, siempre muy inferiores a 100 años), mientras que estos autores trabajan con una muestra en la que el intervalo postmortem es amplísimo (entre 6 y 1500 años y en la mitad de los casos siempre superior o muy superior a 100 años).

No existen publicaciones sobre la relación Fe^{+2}/Fe^{+3} en hueso en relación a la data. Castellano y cols. (1976) cuantifican, Pb, Zn, Fe, P, Mg y K, por absorción atómica sin especificar la valencia del Fe, sus resultados son poco concluyentes y demuestran un incremento del material inorgánico con la data de los restos óseos.

Por otra parte, nos movemos ante un problema donde los límites son difíciles de precisar, como ocurre con la data o el intervalo postmortem, con la reacción del luminol, de sensibilidad extrema y muy poca especificidad, un sustrato óseo sujeto a variables como lugar de enterramiento, causa de muerte, edad, sexo, variabilidad del curso de la putrefacción, fenómenos tafonómicos, y las diferentes características del tipo de hueso frente al que nos enfrentamos. (Álvarez, 1999).

Si lo que vamos buscando es una mayor cantidad de grupo hemo, parece evidente que tendríamos que centrarnos en el estudio de aquellos huesos con esponjosa abundante, como podría ser el coxal. Sin embargo, precisamente por su estructura, estos huesos van a presentar menos estabilidad postmortem que un hueso largo. Con el mismo razonamiento, siempre en un hueso largo la estabilidad de la diáfisis sería mucho mayor, rica en hueso compacto, que la estabilidad de las epífisis, rica en hueso esponjoso. Por

otra parte, la cortical sería la zona de elección frente a la medular. Se decide, por tanto, trabajar sobre la cortical de la diáfisis de huesos largos y por ello todo nuestro estudio se desarrollará sobre fémures con datas conocidas. (Prieto-Castelló y cols., 2007)

Nuestra técnica, nos proporciona, por una parte, la intensidad de la quimioluminiscencia, en unidades URL, que se emite en cada unidad de tiempo que nosotros precisemos; y por otra, nos describe para cada muestra que estudiamos, una curva que resulta de unir las diferentes medidas de quimioluminiscencia con respecto al tiempo.

En concreto, y como hemos descrito a lo largo del trabajo, medimos cada 5 segundos, durante 5 minutos y las intensidades de URL se encuentran entre un mínimo de 0 y un máximo de 65535. En la curva X es el tiempo e Y es URL.

Observamos que cada vez que se produce una reacción de quimioluminiscencia por la acción del luminol sobre el polvo óseo, con independencia de la edad, sexo o data del hueso del que procede, se traduce en una cinética en donde hay un primer momento de grandísima intensidad y velocidad de instauración, alcanzándose de forma prácticamente inmediata un pico máximo de quimioluminiscencia, y se sigue de una curva que refleja el descenso gradual de la intensidad de dicha señal, para continuarse con una desaparición insidiosa y lenta de dicha quimioluminiscencia.

Distinguimos una primera parte de la curva, muy breve, que coincide con el ascenso, pico e inicio del descenso de la señal. Una segunda parte de dicha curva de descenso gradual, pero evidente y donde hay un margen bien diferenciador entre cada dos puntos susceptibles de ser medidos. Una tercera parte de la curva que tiende a ser una meseta, con valores de URL ya muy bajos con respecto a todo el trazado, de muy lenta disminución y apenas discriminantes y diferenciadores entre cada par de ellos.

Cuando nos iniciamos en el trabajo, vimos que debíamos de centrarnos en la segunda parte de la curva, desde el momento en que es el margen en donde mejor podemos obviar los problemas derivados de la intensidad y rapidez de la primera fase del proceso, muy variable entre las muestras estudiadas, y que nos puede llevar a error.

En el tratamiento estadístico, inicialmente, se realizó una correlación bivariada sobre los datos obtenidos en donde se relaciona la data con los diferentes valores de quimioluminiscencia obtenidos en cada hueso, entre QLorigen y QL70s (medidas en el

tiempo desde el momento en que contacta el reactivo con la muestra de polvo óseo hasta 70 segundos); pudiendo observar que hay relación entre la data y la intensidad de quimioluminiscencia, y que todos los valores obtenidos son significativos. Aquellos que se encuentran entre QL05s y QL70s, ambas inclusive, presentan un nivel de significación superior a la milésima. (tabla13).

	<i>Coefficiente de Pearson</i>	<i>Nivel significación</i>
<i>QLorigen</i>	<i>-,297**</i>	<i>,002</i>
<i>QL05s</i>	<i>-,345**</i>	<i>,000</i>
<i>QL10s</i>	<i>-,361**</i>	<i>,000</i>
<i>QL15s</i>	<i>-,367**</i>	<i>,000</i>
<i>QL20s</i>	<i>-,366**</i>	<i>,000</i>
<i>QL25s</i>	<i>-,356**</i>	<i>,000</i>
<i>QL30s</i>	<i>-,349**</i>	<i>,000</i>
<i>QL35s</i>	<i>-,342**</i>	<i>,000</i>
<i>QL40s</i>	<i>-,335**</i>	<i>,001</i>
<i>QL45s</i>	<i>-,329**</i>	<i>,001</i>
<i>QL50s</i>	<i>-,324**</i>	<i>,001</i>
<i>QL55s</i>	<i>-,318**</i>	<i>,001</i>
<i>QL60s</i>	<i>-,314**</i>	<i>,001</i>
<i>QL65s</i>	<i>-,314**</i>	<i>,001</i>
<i>QL70s</i>	<i>-,312**</i>	<i>,001</i>

Tabla 13. Coeficiente de Pearson entre data y quimioluminiscencia y nivel de significación.

El estudio por medio de una regresión por pasos determina que QL15s es la variable con mayor poder de predicción, excluyendo dicho análisis todas las variables con excepción de la anterior. (tabla 14 y 15)

<i>Modelo</i>	<i>Variables introducidas</i>	<i>Variables eliminadas</i>	<i>Método</i>
<i>1</i>	<i>QL15s</i>		<i>Por pasos (criterio: Prob. de F para entrar <= ,050, Prob. de F para salir >= ,100).</i>

Tabla 14. Variables introducidas/eliminadas

Variable predictora: (Constante), QL15s.

Variable dependiente: data de la muestra.

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,379	,144	,135	10,108

Tabla 15. Resumen del modelo

Variable predictora: (Constante), QL15s

Variable dependiente: data de la muestra

Comprobamos por los valores de R^2 en la estimación de la data a partir de la quimioluminiscencia y por los valores que se obtienen de las curvas COR en los restos óseos de data superior e inferior a los 20 años, que la técnica es útil para la determinación del intervalo postmortem en restos óseos.

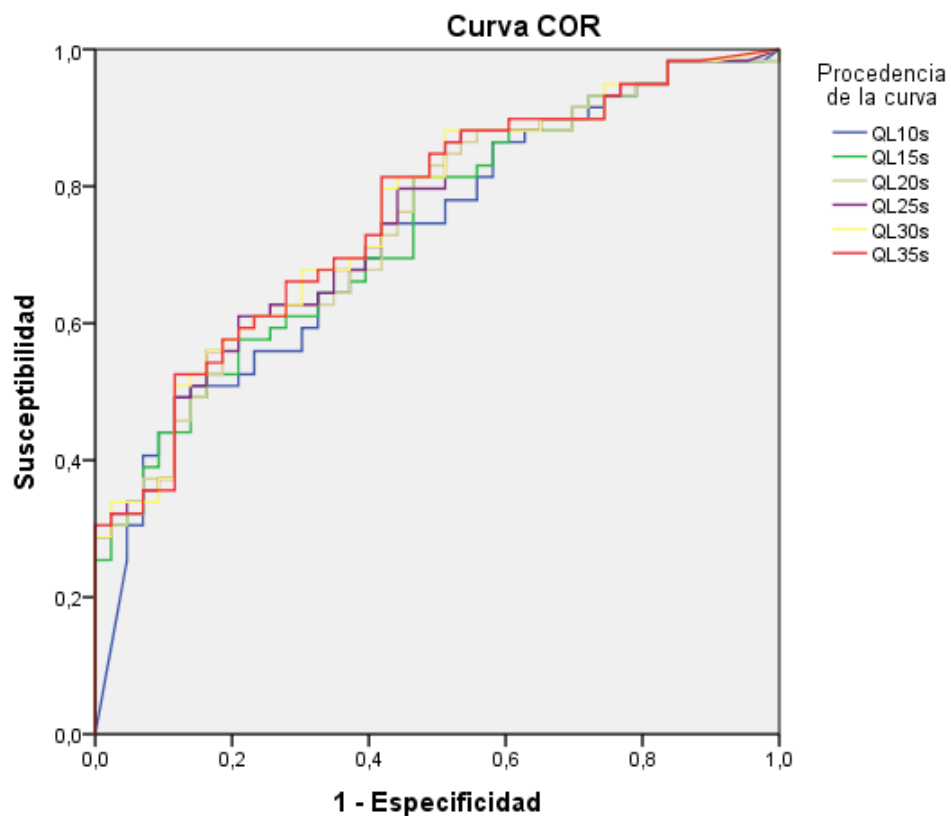


Figura 22. Representación gráfica comparativa de las curvas COR entre QL10s y QL35s.

Por tanto, esta técnica, es útil junto a otras pruebas que se puedan utilizar para determinar el intervalo postmortem de los restos óseos.

Hemos podido comprobar que el modelo exponencial para QL15s (medición a los 15 s, variable de mayor capacidad predictora para establecer la data en función de la intensidad luminométrica) es el que mejor se ajusta, por encima del lineal y del logarítmico. (Tabla 21).

<i>Ecuación</i>	<i>Resumen del modelo</i>					<i>Estimaciones de los parámetros</i>
	<i>R cuadrado</i>	<i>F</i>	<i>gl1</i>	<i>gl2</i>	<i>Sig.</i>	<i>Constante</i>
<i>Lineal</i>	<i>,135</i>	<i>15,595</i>	<i>1</i>	<i>100</i>	<i>,000</i>	<i>26,857</i>
<i>Logarítmica^a</i>	<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>	<i>.</i>
<i>Exponencial</i>	<i>,164</i>	<i>19,614</i>	<i>1</i>	<i>100</i>	<i>,000</i>	<i>24,709</i>

Tabla 21. Resumen del modelo y estimaciones de los parámetros I.

Los resultados del estudio discriminante entre dos poblaciones de data, hasta 20 años la primera, y más de 20 años la segunda, ponen de manifiesto que la variable QL20s es la que tiene mayor poder discriminante (tabla 29).

	<i>Lambda de Wilks</i>	<i>F</i>	<i>gl1</i>	<i>gl2</i>	<i>Sig.</i>
<i>QL10s</i>	,858	16,544	1	100	,000
<i>QL15s</i>	,844	18,529	1	100	,000
<i>QL20s</i>	,840	19,000	1	100	,000
<i>QL25s</i>	,844	18,497	1	100	,000
<i>QL30s</i>	,849	17,816	1	100	,000
<i>QL35s</i>	,854	17,068	1	100	,000
<i>QL40s</i>	,886	5,660	2	88	,005

Tabla 29. Pruebas de igualdad de las medias de grupos.

Con nuestra técnica hemos podido comprobar en el análisis discriminante de los 102 casos estudiados, que se clasifican correctamente 65 casos (27 en data entre 0 y 20 y 38 en data entre 21 y 69), lo que en porcentaje representa el 63,7% de los casos agrupados originales.

Por otra parte, mediante el uso de las curvas COR, queda demostrado que QL35s, (analizando los valores entre QL10s y QL35s) siguiendo criterios de sensibilidad y especificidad, es la que proporciona el mejor corte entre dos poblaciones de data diferente a la hora de predecir la pertenencia a la población de data que le corresponda a la muestra problema estudiada. (tabla 56)

<i>Variables resultado de contraste</i>	<i>Área</i>	<i>Error típ.^a</i>	<i>Sig. asintótica^b</i>	<i>Intervalo de confianza asintótico al 95%</i>	
				<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
<i>QL10s</i>	,723	,050	,000	,625	,822
<i>QL15s</i>	,736	,048	,000	,641	,831
<i>QL20s</i>	,745	,048	,000	,651	,839
<i>QL25s</i>	,751	,047	,000	,658	,844
<i>QL30s</i>	,757	,047	,000	,665	,849
<i>QL35s</i>	,759	,047	,000	,668	,851

Tabla 58. Areas Bajo la Curva (ABC)

De hecho es capaz de proporcionarnos, vistas las coordenadas de la curva el par que nos define la mejor sensibilidad y especificidad.

En el Anexo II podemos comprobar que el par de coordenadas que mejor resultado proporciona en QL35s cuando ésta tiene un valor de 1046 URL, sería 0,881 de sensibilidad y 0,535 de 1-Especificidad.

Las limitaciones en nuestro trabajo son:

En primer lugar, la producción de la quimioluminiscencia por el uso del reactivo de luminol en restos óseos, depende de la presencia de hematina, por lo tanto los resultados que se obtengan dependerán de la concentración de Fe^{+2} que tenga el hueso previamente al momento de la muerte.

La concentración de Fe^{+2} en el vivo, tiene unos márgenes amplios y compatibles con la vida, nos podemos mover desde situaciones de anemias extremas, pasando por la normalidad y llegando a tesaurismosis férricas. Esta variable es de difícil valoración desde el momento en que no podremos tener datos previos al fallecimiento del individuo cuyos restos óseos estudiamos.

Al trabajar con huesos, tendremos que tener en cuenta la masa ósea, y la irrigación y vascularización de los mismos. La mejor o peor vascularización nos está determinando la concentración de hemoglobina, de Fe^{+2} y lógicamente de Fe^{+3} .

Por lo anterior tendremos que tener en cuenta la constitución, la edad y el sexo del individuo de quien procede el hueso que estudiamos. Por técnicas antropológicas podríamos llegar a determinar dichos extremos, pero aun así chocaríamos con otras limitaciones. Por ejemplo, dependeríamos de la edad y periodo hormonal en el caso de la mujer, por su reflejo en la masa ósea. Dependeríamos también de la posibilidad de que el individuo padeciese una osteoporosis previa o no. En el primer caso, será preciso distinguir si la osteoporosis es el resultado de una evolución patogénica previa al fallecimiento, o por el contrario es el reflejo de fenómenos tafonómicos que se pueden

presentar en el cadáver. Al valorar éste extremo último, la tafonomía, tendremos que tener en cuenta inexcusablemente las condiciones de inhumación; debiendo estudiar el resto óseo, determinando los datos objetivos y circunstanciales que nos orienten sobre donde pudo haber permanecido el hueso.

La causa y el mecanismo de la muerte, son datos de interés en la medida que pueden condicionar la concentración de Fe^{+2} en el hueso (metahemoglobinemias, hemorragias masivas, etc.).

En definitiva, sería recomendable, que para mejor interpretación de los datos que hemos obtenido con la finalidad de establecer una data ignorada, deberíamos determinar la concentración de Fe^{+3} en la muestra problema por lo anteriormente razonado, y desde luego también la determinación de Ca^{+2} , con la finalidad de obtener datos acerca de la masa ósea, y no debemos quedarnos aquí, sino que se debe de establecer un cociente $\text{Fe}^{+2} / \text{Ca}^{+2}$ que conjuntamente con todo lo anterior, será capaz de darnos información sobre extremos tales como osteoporosis, edad, fenómenos tafonómicos, y otros.

Nuestros datos demuestran el interés de la utilización de métodos objetivos y contrastables, que permitan establecer el grado de precisión y error, que son elementos fundamentales en la pericia médico legal, eliminando el factor de subjetividad que introducen las técnicas basadas en la apreciación personal o en el uso de elementos con estimaciones relativamente imprecisas como ocurre con la gama de grises. En cualquier caso la determinación de la data se debe basar en la confluencia de la complementariedad de técnicas y en la prudencia; no existiendo un método que, de forma aislada, nos solucione el problema con la precisión necesaria.

Por tanto, y a pesar de los resultados obtenidos tendremos que terminar manifestando que aun con el conocimiento de los factores que influyen en las variables que hemos manejado, nuestra técnica exigiría para su aplicación en la determinación de la data de restos óseos, el uso combinado con otras ya utilizadas con esta finalidad, tipo difracción de RX (Alvarez P 1999) (Hernández del Rincón 2001) (Prieto-Catelló MJ y

cols, 2007), análisis termogravimétrico (Villanueva E y cols. 1976) (Alvarez 1999) aplicación de parámetros bioquímicos (Castellanos y cols. 1976,1977,1978,1984) (Bonte y cols. 1976)(Grupe y cols. 1998) (Jarvis 1997) (Hernández del Rincón 2001) (Prieto-Castelló y cols. 2007) histomorfometría (Yoshino M 1991, 1994) (Watanabe y cols 1998), estudio con radionucleidos(Libby 1949) (Swift 1998) (Swift y cols. 2001) (İşcan 2001) (Scharg y cols. 2014), racemización de aminoácidos (Ohtani y cols. 2000) y otros.

Proponemos por tanto, seguir en la línea de aplicar la reacción del luminol en el establecimiento de la data de los restos óseos. Si la investigación se orienta como profundización de la técnica que hemos propuesto en este trabajo, debe de ser estudiando cinéticamente las curvas que se obtienen al enfrentar los valores de quimioluminiscencia obtenidos frente al tiempo en que transcurre la reacción, estudio que se encuentra en ejecución. Para profundizar en el valor de los datos de quimioluminiscencia que se obtienen por esta técnica, debemos calcular y tener en cuenta la concentración de Fe en la muestra ósea y relacionar dichos valores. Por último, recomendamos que para mejorar los resultados que hemos obtenido referidos al cálculo del intervalo postmortem de los restos óseos por nuestra técnica, se deben de relacionar con algunos de los compuestos orgánicos que se están analizando (hipoxantinas, proteínas estructurales, etc.).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) Hemos encontrado una correlación negativa entre la quimioluminiscencia medida por luminometría y la data de los restos óseos, de tal forma que la quimioluminiscencia decrece conforme aumenta la data.
- 2) El modelo matemático que mejor ajusta la relación entre quimioluminiscencia y data es el exponencial.
- 3) La lectura de quimioluminiscencia a los 15 s (QL15s) es la que presenta una mayor capacidad de predicción de la data.
- 4) La lectura de quimioluminiscencia a los 20 s (QL20s) presenta el mayor poder discriminante (capacidad de clasificación) de todos los tiempos analizados.
- 5) Del estudio realizado pensamos que nuestros resultados nos permiten proponer el estudio por luminometría de los restos óseos para el cálculo de la data de los mismos al tratarse de una técnica simple, de bajo coste y con una capacidad de clasificación aceptable.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Albrecht. H.O. Chemilumiscence of hidrazine amino acid phtalic. Physik.Chem. 136 (1928) 321-330.

Alvarez Jiménez P. Aplicación de la difracción de rayos X y del análisis Termogravimétrico a la estimación de la data de los restos óseos. Tesis Doctoral, 1999.

Auerbach GD, Marx SJ, Spiegel AM. Hormona paratiroidea, calcitonina y calciferoles. En: Williams R H. Tratado de Endocrinología. 5ª ed. Madrid: Interamericana, 1984.

Aznar B, Maestre T. Identificación de restos cadavéricos óseos- Investigación 1945, 211: 79-81.

Balthazard V, Lebrun L. Les canaux de Havers de l'os humain. Ann Hyg Publ 1910, 7: 167-176.

Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lago G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. Talanta. 2007, 72: 896-913.

Bayle, Ami, Rondeau de Noyer. Estudio de la materia orgánica y del flúor en restos óseos. Bull Soc Chimique de France 1939; 5: 1011-1041.

Berg S. The determination of bone age. Methode in Forensis Sci 1963; 2: 231-252.

Boaks A., Siwek D., Mortazavi F. The temporal degradation of bone collagen: A histochemical approach. Forensic Science International 240 (2014) 104-110.

Bonte W. Johansson J., Garbe G., Berg S. Determination of the amino acid spectrum as an aid in the up-dating of skeletal finding. Arch Kriminol (1976); 158: 163-174.

Burgueño M.J., Garcia-Bastos J.L., Gonzalez-Buitrago J.M. Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. Med Clin (Barc) 104 (1995) 661-670

Castellano M, Rodrigo MªD, Villanueva E, Luna A. Evolution de la composición minerale de l'os avec le vieillissement. L'application a la data des restes osseux. Acta Med Leg Soc 1976; 27: 21-23.

Castellano M, Villanueva E, López-Gorje J. Etude de l'évolution de la composition proteique des os dans son processus de vieillissement. Sa mise en pratique dans l'estimation de l'age des restes osseux. *Acta Med Leg soc* 1976; 27: 13-19.

Castellano M, Villanueva E, Von Frenckel R. Estimating the date of bone remains: a multivariate study. *J-Forensic-Sci* 1984; 29: 527-534.

Castellano M, Villanueva E. Estudio sobre la evolución de los lípidos en restos óseos en función de la data. I.- Lípidos totales. *Zacchia*. 1977; 13, 3, 3.

Castellano M, Villanueva E. Estudio sobre la evolución de los lípidos en restos óseos en función de la data. II.- Colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres. *Zacchia* 1978; 14, 3, 1. 1978.

Castellano M, Villanueva E. Estudio sobre la evolución de los lípidos en restos óseos en función de la data. III.- Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos libres por cromatografía de gases. *Zacchia* 1978; 14,3,3.

Castellano M. Estudio del comportamiento de material orgánico e inorgánico en el proceso de envejecimiento de restos óseos. Aplicación al establecimiento de la data. Granada: Universidad de Granada, 1976. Tesis Doctoral.

Durigon M. *Pathologie Médico Legale*. Paris: Ed. Masson. 1988.

Facchini F, y Pettener D. Chemical and physical methods in dating human skeletal remains. *Am J Phys Anthropol* 1977; 47: 65-70.

Ferrer D. *Esquemas de Histología*. Barcelona: Editorial Espaxs, 1975.

García- Campaña AM, Baeyens WRG, Cuadros-Rodríguez L, Alés Barrero F, Bosque-Sendra JM, Gamiz-Gracia L. Potencial of Chemiluminescence and Bioluminescence in organic analysis. *Current Organic Chemistry*. 6 (2002) 1-20.

García- Campaña AM, Baeyens WRG, Zhao Y. Peer Reviewed: Chemiluminescence Detection in Capillary Electrophoresis. *Anal.Chem.* 69 (1997) 83A-88A.

García-Campaña AM; Baeyens WRG; Zhang X; Ales F; Gámiz L. Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo. *Ars Pharmaceutica*. 2001. 42:1; 81-107.

Geneser F. *Histología*. Ed: Médica Panamaricana. 3ª ed. 2000

Gisbert Calabuig JA, Villanueva Cañadas E, Gisbert Grifo MS. Fenómenos cadavéricos. En Gisbert Calabuig JA, Villanueva Cañadas E. Medicina legal y Toxicología. 6ª ed. Valencia: Masson, 2004.

Grodsky M., Wright K., Kirk P.L. J. Crimin. Law Criminol. Police Sci. 42 (1951) 95-104.

Grupe G, Turban Just S. Amino acid composition of degraded matrix collagen from archaological human bone. Anthropol-Anz, 1998 Sep; 56(3): 213-226.

Guyton AC. Hormona paratiroidea, calcitonina, metabolismo de calcio y fosfato, vitamina D, huesos y dientes. En Guyton AC. Tratado de Fisiología Médica. 7ª Ed. Madrid: Interamericana, 1988.

Ham AW. Tratado de Histología. 6ªEd. México: Interamericana, 1970.

Hernández del Rincón JP. Aplicación de Análisis Bioquímicos y de Difracción de Rayos X al cálculo de la data de restos óseos. Tesis Doctoral. 2001.

Holick M, Krane SM Potts J. Calcio, fósforo y metabolismo óseo. Hormonas reguladoras del calcio. En: Harrison. Principios de medicina interna. 11ª ed. México: Interamericana, 1989.

Introna F; Di Vella G; Campobasso CP. Determination of postmortem interval from old skeletal remains by image analysis of luminol test results. J-Forensic-sci. 1999 May; 44(3): 535-538.

Iscan M-Y. Global forensic anthropology in de 21st century. Forensis-Sci-Int. 2001 Mar 1; 117 (1-2): 1-6.

Jarvis DR. Nitrogen level in long bones from coffin burials interred for periods on 26-90 years. Forensic. Sci. Int. 1997; 85: 199-208

Knight B. Methods of gating skeletal remains. Med Sci Law 1969, 9: 247-252.

Knight B. Recent advances in bone pathology. Welsh Nat Sch Med Cardiff police Surg. 1975; 7: 8-12.

Knight B. The dating of human bones. The criminologist 1971; 6: 19-26.

Knight B. The dating of skeletal remains. Forensic Pathology. 2ª ed. London: Edward Arnold. 1997.

- Knight B.** The examination of skeletal remains. *Leg Med* 1985, 1-19.
- Krane SM, Holick M.** Enfermedad ósea metabólica. En: Harrison. Principios de Medicina Interna. 11^a ed. México: Interamericana, 1989.
- Hoke N, Grigat A, Grupe G, Harbeck M.** Reconsideration of bone postmortem interval estimation by UV-induced autofluorescence. *Forensic Science International* 228 (2013) 176.e1-176e.6.
- Leonhardt H.** Histología, citología y microanatomía humanas. Barcelona: Ed. Salvat. 1975.
- Libby W.F., Anderson E.C., Arnold J.R.** Age determination by radiocarbon content: Word-Wide assay of natural radiocarbon. *Science* (1949) vol 109; 227-228
- López Gómez L, Gisbert Calabuig JA.** Identificación cadavérica. En: López Gómez y Gisbert Calabuig JA. Tratado de medicina Legal. Tomo II. Valencia: Editorial Saber, 1961.
- López Gómez L, y Gisbert Calabuig JA.** Problemas tanatológicos médico-legales. En López Gómez L y Gisbert Calabuig JA. Tratado de Medicina Legal Tomo II. Valencia: Editorial Saber, 1961.
- Lozano JA, Galindo JD, García-Borrón JC, Martínez-Liarte JH, Peñafiel R, Solano F.** Bioquímica y Biología Molecular para ciencias de la salud. 3^a Ed. Editorial McGraw-Hill-Interamericana. 2005
- Magaña C.** Data de la muerte. Entomología Forense. Curso de introducción a la antropología Forense. Centro de Estudios Jurídicos de la Administración de Justicia. C Magaña Loarte. 1999.
- McGrath J.** Chemical luminiscence Test for Blood. *Br.Med.J.* 2(1942) 156-157.
- Merenyi G.** Luminol Chemiluminiscence:Chemistry, excitation,emitter. *Journal of Bioluminiscence and Chemilumiscence.* 5(1990) 53-56.
- Molin I.A. , Skrizhinskii S.F. , Mordasov V.F. , Korsakov A.L. , Gorshakov A.N.** The complex forensic medical study of de bony remains from a burial long ago. *Sud Med Ekspert* (1997); 47: 38-41

Orts Llorca F. Anatomía Humana. Tomo I. 5ª ed. Barcelona: Ed Científico Médica, 1984.

Ohtani S, Yamada Y, Yamamoto I, Marumo T, Sugeno H, Sugimoto H, Ogasawara A, Yamagishi M. Estimation of age from teeth using the racemization of aspartic acid (racemization method). Nipon-Hoigaku-Zasshi. 2000 Aug; 54 (2): 207-18.

Palmieri VM. Risultati dell'inchiesta nella foresta di Katyn. La Vita Italiana. 1943. F.364.

Prieto-Castelló M.J. , Hernández del Rincón J.P. , Perez-Sirvent C. , Alvarez Jiménez P. , Pérez-Cárceles M.D. , Osuna E. , Luna A. Application of biochemical and X-ray diffraction analyses to establish the postmortem interval. Forensic Science International 172 (2007) 112-118.

Ramsthaler F. , Kreutz K. , Zipp K. , Verhoff M.A. Dating skeletal remains with luminol-chemiluminescence. Validity, intra-and interobserver error. Forensic Science International 187 (2009) 47-50.

Ramsthaler F. , Ebach S. C. , Birngruber C. G. , Verhoff M. A. Postmortem interval of skeletal remains through the detecton of intraosseal hemin traces. A comparison of UV-fluorescence, luminol, Hexagon.OBTI^R , and Combur^R tests. Forensic Science International 209 (2011) 59-63.

Rapado A. Inflamación. Generalidades. Tejido conjuntivo. Biología articular. En: Martín Martín F. Medicina Interna en el paciente geriátrico. Volumen V. Madrid: Saned, 1989.

Rapado A. Metabolismo óseo. Osteoporosis. Osteopatías metabólicas. En: Martín Martín F. Medicina interna en el paciente geriátrico. Volumen V. Madrid: Saned, 1989.

Robbins, Cotran, Kumar, Collins. Patología Estructural y Funcional. Ed McGraw- Hill - Interamericana, 6ª edición. 1999.

Ross MH, Pawlina W. Histología. Ed Panamericana. 6ª edición. 2013.

Sarvesvaran R, Knight B. Examination of skeletal remains. Malays J Pathol 1994; 16: 117-126.

Schoenly K, Griest K, Rhine S. An experimental field protocol for investigating the postmortem interval using multidisciplinary indicators. *J-Forensic-Sci.* 1991 Sep; 36(5): 1395-1415.

Scharg B., Uldin T. , Mangin P. , Bochud F. , Froidevaux P. Dating human skeletal remains using ^{90}Sr and ^{210}Pb : case studies. *Forensis Science International* 234 (2014) 190,e1-190,e6.

Serrano S. Anatomía patológica ósea. En Pardo Mindan FJ. *Anatomía Patológica.* Madrid: Mosby, 1997.

Simonin C. Medicina legal criminalística. En: Simonin C. *Medicina Legal Judicial.* Barcelona: ed. JIMS. 1982.

Soderquist T.J., Chesniak O.M., Witt M.R. , Paramo A. , Keeling V-A. , Keleher J.J. Evaluation of the catalytic of H_2O_2 through use organo-metallic complexes – A potential link to the luminol presumptive blood test. *Forensic Science International* 219 (2012) 101-105.

Specht W. Die Chemiluminescenz des Hämins, ein Hilfsmittel zur Auffindung und Erkennung forensich wichtiger Blutspuren. *Angewandte Chemie.* 50(1937) 155-157.

Stryer L. *Bioquímica.* Barcelona: Reverté Ed..1976.

Swift B. Dating human skeletal remain: investigating the viability of measuring the equilibrium between ^{210}Po and ^{210}Pb as a means of estimating the post-mortem interval. *Forensic. Sci. Int.* 1998; 98: 119-26

Swift B; Lauder I; Black S; Norris J. An estimation of the postmortem interval in human skeletal remains: a radionuclide and trace element approach. *Forensic-Sci-Int.* 2001 Mar 1; 117 (1-2): 73-87.

Thornton J.I., Maloney R.S. *Calif. Assoc. Crim. Newslett* (September), (1985) 9-16

Weber K. Die Anwendung der Chemiluminescenz des Luminols in der gerichtlichen Medizin und Toxikologie. *Deutsche Zeitschrift für gerichtliche Medizin.* 57(1966) 410-423.

Villalaín D. Tafonomía médico-forense. Curso de introducción a la Antropología Forense. Centro de Estudios Jurídicos de la Administración de Justicia. D. Villalaín Blanco, 1997.

Villanueva Cañadas E, Concheiro Carro L, Suarez Peñaranda JM. Problemas tanatológicos médico-legales. En Gisbert Calabuig JA. Medicina Legal y toxicología. 5º Ed. Valencia: Masson, 1998.

Villanueva E., Girela F., Castellanos M. The application of differential thermal analysis and thermogravimetic analysis to dating bone remains. Journal Forensics Science (1976) 21: 822-830

Watanabe Y, Konishi M, Shimada M, Ohara H, Iwamoto S. Estimation of age from the femur of japanese cadavers. Forensics. Sci. Int. 1998 (98): 55-65.

Young B, Heath JW. Wheater's Histología Funcional. Ed Harcourt. 4ª Ed. 2000.

Yoshino M. Histological estimation of age in death using microrradiographs of humeral compact bones. Forensic-Sci-Int. 1994 Feb; 64 (2-3): 191-198.

Yoshino M. Microscopic and chemical examinations for estimating the time since death of skeletal remains- its application to forensic cases. Nippon Hoigaku Zasshi 1991 Dec; 45(5-6): 379-392.

ANEXOS

NOMBRE	EDAD	SEXO	DATA	PICO MAX	PENDIENTE																								
					Origen	05	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110		
1ac+bc	84	2	21	6857	4302	6857	5172	4536	4000	3516	3116	2771	2475	2219	2003	1821	1641	1504	1384	1269	1169	1063	973	882	811	751	671		
2ac+bc	86	1	40	297	297	272	127	35	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
3ac+bc	75	1	21	28410	9553	28410	26841	25056	23428	21980	20598	19344	18183	17142	16180	15279	14456	13705	13028	12388	11785	11219	10669	10192	9674	9231	8778		
4ac+bc	50	1	64	6401	1480	6005	6401	6322	6075	5795	5442	5106	4836	4540	4215	3936	3695	3469	3259	3084	2849	2669	2536	2387	2268	2147	2022		
5ac+bc	66	2	21	65535	28911	65535	65535	51837	39047	28808	22541	17855	13790	10809	8677	6963	5658	4683	3846	3165	2648	2219	1891	1603	1340	1131	953		
6ac+bc	76	2	50	3701	3212	3701	2440	1823	1424	1174	984	830	704	606	514	456	389	348	316	281	261	238	193	175	152	147	126		
7ac+bc	79	1	25	3274	3274	2982	2093	1511	1019	655	424	295	208	155	81	53	39	14	3	0	0	0	0	0	0	0	0		
8ac+bc	33	2	21	2871	2871	2777	1919	1497	1233	1028	887	760	657	606	526	459	434	407	351	314	291	264	251	220	192	175	173		
9ac+bc	62	1	18	53495	8213	46808	53495	52763	49952	47030	44383	41828	39456	37423	34800	31524	29488	27962	26667	25408	24284	23312	22328	21398	20526	19684	18946		
10ac+bc	48	1	38	2529	2107	2529	1754	1379	1168	956	846	706	606	526	461	409	351	305	255	222	200	172	154	120	96	85	71		
11ac+bc	75	2	31	4619	4619	4317	2854	2171	1753	1451	1227	1074	941	838	773	681	618	562	515	482	417	395	373	337	311	294	258		
12ac+bc	13	1	21	18872	15574	18872	12744	9914	8111	6720	5607	4717	3975	3349	2826	2436	2093	1802	1590	1432	1257	1128	1008	886	789	711	636		
13ac+bc	77	1	32	4803	4028	4803	3545	2812	2294	1923	1655	1414	1227	1071	956	826	732	664	583	517	475	438	408	361	329	306	269		
14ac+bc	53	1	20	36328	17375	36328	26532	16945	13178	11729	10688	9837	9037	8361	7717	7156	6664	6193	5793	5427	5085	4765	4484	4233	4008	3769	3565		
15ac+bc	97	2	21	9570	3708	9570	7744	6422	5511	4789	4265	3842	3449	3151	2880	2647	2470	2284	2140	2012	1899	1793	1711	1606	1533	1463	1395		
16ac+bc	65	2	27	8835	6968	8835	6812	5006	3661	2656	1940	1409	1041	782	614	482	373	293	260	197	164	116	73	61	52	27	19		
17ac+bc	74	2	51	2082	528	2082	1657	1325	1078	867	714	584	466	389	292	254	202	149	108	67	29	15	1	0	0	0	0		
18ac+bc	61	1	32	7097	1917	7097	5391	4521	3933	3552	3238	3007	2802	2662	2496	2372	2240	2155	2042	1954	1861	1756	1671	1575	1522	1435	1358		
19ac+bc	78	1	21	2500	684	2500	1898	1745	1516	1321	1154	1026	884	779	685	604	518	457	396	347	292	247	204	173	152	118	83		
20ac+bc	53	2	31	635	183	635	375	242	183	118	67	29	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
21ac+bc	76	1	19	20380	3121	20380	18471	17039	15763	14669	13497	12452	11475	10599	9753	8951	8255	7617	7021	6457	5989	5534	5149	4778	4465	4190	3920		
22ac+bc	74	2	18	53468	10433	53468	52282	51264	49182	46526	43663	40710	37841	34968	32207	29633	27283	25084	22982	21057	19275	17686	16185	14842	13596	12461	11410		
23ac+bc	60	1	18	8483	8483	7096	5805	4857	4151	3553	3083	2709	2384	2113	1876	1701	1508	1364	1206	1109	980	870	795	709	633	568	518		
24ac+bc	67	1	18	3929	1652	3929	1914	1402	1087	840	658	498	369	269	192	117	62	23	7	1	0	0	0	0	0	0	0		

Anexo I. Valores de QL en URL obtenidas por luminometría cada 5s para cada una de las muestras estudiadas.

NOMBRE	EDAD	SEXO	DATA	PICO MAX	PENDIENTE																						
					115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225
1ac+bc	84	2	21	6857	621	570	520	482	437	421	383	337	319	294	278	243	219	204	177	173	141	107	94	69	56	62	49
2ac+bc	86	1	40	297	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3ac+bc	75	1	21	28410	8323	7906	7546	7214	6872	6551	6225	5949	5707	5449	5212	4959	4742	4549	4361	4143	3971	3821	3675	3536	3394	3243	3116
4ac+bc	50	1	64	6401	1914	1835	1744	1651	1558	1482	1390	1315	1236	1175	1106	1032	989	931	880	851	806	762	727	696	666	646	614
5ac+bc	66	2	21	65535	803	681	577	500	420	354	297	240	199	164	133	117	91	64	57	29	14	5	1	0	0	0	0
6ac+bc	76	2	50	3701	114	98	90	84	55	45	31	26	34	18	10	7	10	8	1	0	0	0	0	0	0	0	0
7ac+bc	79	1	25	3274	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8ac+bc	33	2	21	2871	153	136	120	103	98	76	57	51	35	24	23	14	12	8	7	3	9	3	5	4	0	1	0
9ac+bc	62	1	18	53495	18181	17466	16801	16218	15544	14973	14459	13903	13398	12910	12454	12014	11543	11153	10773	10408	10033	9662	9390	9015	8700	8414	8137
10ac+bc	48	1	38	2529	70	60	27	26	7	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11ac+bc	75	2	31	4619	260	241	209	191	181	154	150	148	136	107	94	92	93	74	70	56	34	33	29	10	17	6	13
12ac+bc	13	1	21	18872	571	540	496	450	406	365	348	307	290	268	238	224	213	205	171	147	143	146	126	106	95	83	84
13ac+bc	77	1	32	4803	259	234	222	206	188	160	143	135	101	82	89	76	71	65	57	42	33	23	11	6	8	7	10
14ac+bc	53	1	20	36328	3369	3212	3024	2876	2731	2611	2466	2369	2253	2148	2035	1941	1887	1770	1704	1606	1538	1492	1427	1356	1294	1245	1192
15ac+bc	97	2	21	9570	1339	1283	1217	1172	1113	1074	1027	1011	963	952	899	860	843	816	777	775	757	721	722	692	666	640	623
16ac+bc	65	2	27	8835	12	7	11	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17ac+bc	74	2	51	2082	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18ac+bc	61	1	32	7097	1276	1210	1154	1081	1033	963	909	842	808	752	706	661	616	588	542	514	484	444	411	377	329	306	293
19ac+bc	78	1	21	2500	42	33	22	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20ac+bc	53	2	31	635	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21ac+bc	76	1	19	20380	3630	3414	3189	3009	2803	2639	2510	2337	2205	2099	1981	1895	1787	1695	1600	1509	1446	1369	1306	1243	1176	1120	1068
22ac+bc	74	2	18	53468	10454	9621	8824	8101	7410	6823	6295	5811	5349	4931	4566	4216	3867	3572	3310	3090	2851	2671	2490	2294	2132	1969	1828
23ac+bc	60	1	18	8483	469	427	386		340	288	252	222	185	148	125	92	66	49	24	12	5	2	1	1	0	0	0
24ac+bc	67	1	18	3929	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo I. Continuación.

NOMBRE	EDAD	SEXO	DATA	PICO MAX	PENDIENTE										
					230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280
1ac+bc	84	2	21	6857	35	30	25	14	9	6	3	1	0	0	0
2ac+bc	86	1	40	297	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3ac+bc	75	1	21	28410	3019	2915	2794	2676	2602	2518	2425	2346	2245	2187	2135
4ac+bc	50	1	64	6401	576	537	513	486	461	439	413	397	394	372	353
5ac+bc	66	2	21	65535	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6ac+bc	76	2	50	3701	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7ac+bc	79	1	25	3274	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8ac+bc	33	2	21	2871	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9ac+bc	62	1	18	53495	7851	7562	7289	7059	6838	6602	6404	6187	5970	5782	5601
10ac+bc	48	1	38	2529	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11ac+bc	75	2	31	4619	14	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
12ac+bc	13	1	21	18872	77	55	40	44	22	23	11	5	3	1	1
13ac+bc	77	1	32	4803	7	18	3	5	6	7	1	0	0	0	
14ac+bc	53	1	20	36328	1171	1106	1072	1022	984	931	904	870	830	776	761
15ac+bc	97	2	21	9570	616	602	594	562	550	527	530	529	489	488	468
16ac+bc	65	2	27	8835	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17ac+bc	74	2	51	2082	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18ac+bc	61	1	32	7097	270	242	229	210	182	163	160	140	122	98	96
19ac+bc	78	1	21	2500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20ac+bc	53	2	31	635	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21ac+bc	76	1	19	20380	1012	972	929	881	827	785	742	711	674	664	626
22ac+bc	74	2	18	53468	1699	1584	1476	1379	1302	1184	1117	1035	964	903	846
23ac+bc	60	1	18	8483	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24ac+bc	67	1	18	3929	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo I. Continuación.

NOMBRE	EDAD	SEXO	DATA	PICO MAX	PENDIENTE																								
					Origen	05	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110		
25ac+bc	70	1	19	6891	1612	6891	4249	3111	2602	2261	1981	1750	1562	1400	1248	1113	977	853	761	673	598	528	447	381	331	268	228		
26ac+bc	85	1	18	6946	1243	6946	6721	6506	6327	6103	5881	5668	5390	5192	4976	4758	4556	4360	4165	3985	3808	3611	3464	3304	3130	3003	2841		
27ac+bc	55	1	24	746	746	725	272	99	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
28ac+bc	56	2	18	4189	1698	4189	3565	3143	2826	2566	2343	2199	2021	1907	1791	1675	1575	1471	1388	1315	1241	1166	1098	1041	990	940	872		
29ac+bc	47	1	18	3143	2074	3143	2413	2011	1751	1557	1387	1238	1136	1013	921	857	785	700	651	601	557	498	450	423	382	343	316		
30ac+bc	74	1	19	3085	1827	3085	1772	1334	1162	1048	903	824	718	626	554	508	442	415	368	340	306	265	237	217	188	164	150		
31ac+bc	78	2	19	36730	5941	36730	36181	32770	28897	25465	22426	19786	17592	15696	14024	12709	11502	10450	9554	8764	8068	7447	6914	6397	5969	5568	5247		
32ac+bc	57	1	38	829	508	829	381	196	87	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
33ac+bc	39	1	18	9447	1619	8889	9447	9170	8598	7731	7066	6060	5681	5271	4980	4659	4409	4192	4042	3903	3821	3721	3608	3567	3498	3449	3408		
34ac+bc	76	1	28	960	69	740	960	950	886	842	748	687	618	548	487	428	373	325	280	229	192	156	118	92	53	27	14		
35ac+bc	84	1	19	11489	5712	11489	9467	8049	6941	6073	5383	4757	4261	3853	3452	3117	2856	2614	2353	2173	1997	1829	1678	1567	1434	1329	1244		
36ac+bc	82	2	29	1884	879	1884	1287	1028	854	707	601	504	406	358	295	231	203	151	113	79	54	32	25	6	0	0	0		
37ac+bc	88	2	18	65535	28693	65535	65535	65535	65535	65535	63587	55486	49248	44399	40706	37393	34710	32346	30332	28440	26761	25312	24003	22743	21567	20577	19596		
38ac+bc	42	1	18	11251	5319	11251	10625	10421	10114	9747	9360	9044	8688	8349	8112	7807	7457	7153	6836	6566	6262	6013	5752	5486	5252	5013	4798		
39ac+bcR	90	2	22	8342	8342	5585	2329	1250	767	503	345	252	179	132	101	60	38	20	5	3	0	0	0	0	0	0	0		
41ac+bcR	58	1	37	51485	25136	51485	23252	14579	10653	8368	6908	5814	5086	4501	4050	3666	3338	3067	2836	2681	2530	2377	2250	2127	2053	1944	1883		
42ac+bcR	86	2	28	7186	5763	7186	3929	2485	1709	1246	961	752	601	480	387	331	265	203	153	137	108	106	76	58	46	26	3		
43ac+bc	68	2	18	3919	705	3837	3919	3788	3648	3489	3325	3174	3059	2895	2791	2688	2588	2485	2391	2303	2236	2174	2124	2037	1974	1910	1857		
44ac+bc	65	1	17	4462	1316	4411	4462	4347	4171	3927	3641	3290	2845	2166	1605	1335	1067	931	817	725	637	576	521	462	440	386	363		
45ac+bcR	86	2	17	65535	32695	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535		
47ac+bc	67	1	17	6920	1449	6920	5526	4108	3844	3648	3495	3352	3202	3043	2905	2744	2584	2443	2328	2240	2135	2008	1896	1810	1746	1659	1563		
48ac+bcR	81	2	18	59026	24861	59026	43772	32742	25973	21644	18627	16650	15119	14098	13285	12753	12289	11844	11243	10739	10261	9901	9540	9139	8791	8471	8234		
49ac+bc	84	1	17	567	281	567	409	299	219	141	93	45	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
50ac+bc	58	1	18	21641	7084	21641	21444	20432	19601	18721	17173	15463	13888	12508	11454	10873	10586	10391	10294	10201	10044	9966	9796	9628	9405	9176	8961		

Anexo I. Continuación.

NOMBRE	EDAD	SEXO	DATA	PICO MAX	PENDIENTE																						
					115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225
25ac+bc	70	1	19	6891	194	157	117	75	49	28	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
26ac+bc	85	1	18	6946	2700	2554	2401	2287	2168	2047	1942	1835	1729	1640	1558	1456	1395	1324	1243	1166	1116	1047	998	924	881	831	779
27ac+bc	55	1	24	746	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
28ac+bc	56	2	18	4189	833	776	735	674	632	594	575	536	512	468	458	409	387	367	345	323	301	279	251	232	215	213	205
29ac+bc	47	1	18	3143	280	267	242	222	195	165	158	125	106	99	81	72	61	61	42	20	12	5	4	3	3	0	0
30ac+bc	74	1	19	3085	135	113	92	71	60	29	24	15	11	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
31ac+bc	78	2	19	36730	4895	4609	4311	4040	3813	3640	3454	3263	3093	2930	2788	2659	2503	2385	2273	2124	2039	1940	1828	1749	1663	1560	1497
32ac+bc	57	1	38	829	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33ac+bc	39	1	18	9447	3338	3313	3245	3187	3000	2923	2901	2875	2803	2750	2701	2573	2621	2586	2500	2451	2409	2357	2299	2250	2231	2207	2130
34ac+bc	76	1	28	960	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35ac+bc	84	1	19	11489	1150	1070	990	913	847	788	737	675	628	588	540	499	447	411	372	355	318	296	272	224	213	200	171
36ac+bc	82	2	29	1884	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37ac+bc	88	2	18	65535	18749	17864	17093	16351	15659	14966	14342	13760	13171	12624	12092	11612	11133	10724	10224	9885	9487	9144	8806	8503	8198	7919	7632
38ac+bc	42	1	18	11251	4588	4384	4207	4033	3864	3669	3519	3358	3218	3094	2955	2839	2709	2613	2491	2386	2285	2178	2096	2006	1924	1866	1783
39ac+bcR	90	2	22	8342	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41ac+bcR	58	1	37	51485	1787	1713	1639	1554	1486	1422	1365	1317	1247	1192	1139	1074	1013	966	907	852	814	763	722	688	651	635	590
42ac+bcR	86	2	28	7186	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43ac+bc	68	2	18	3919	1810	1737	1721	1661	1595	1560	1531	1488	1452	1442	1393	1353	1326	1286	1254	1215	1193	1160	1154	1108	1085	1037	1028
44ac+bc	65	1	17	4462	334	318	313	276	248	226	222	200	181	193	173	163	143	116	104	102	83	77	56	63	46	37	34
45ac+bcR	86	2	17	65535	36255	35037	33846	32717	31621	30622	29726	28810	28014	27222	26471	25742	25048	24351	23696	23090	22489	21873	21304	20746	20204	19634	19183
47ac+bc	67	1	17	6920	1489	1411	1349	1292	1226	1166	1130	1085	1015	954	923	869	819	771	741	671	650	611	577	537	514	474	433
48ac+bcR	81	2	18	59026	7949	7676	7343	7098	6842	6559	6294	6032	5825	5655	5397	5136	4861	4616	4376	4148	3923	3710	3522	3343	3148	2957	2790
49ac+bc	84	1	17	567	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50ac+bc	58	1	18	21641	8724	8488	8262	8010	7787	7526	7320	7098	6900	6686	6468	6292	6068	5902	5723	5520	5357	5197	5015	4872	4709	4562	4431

Anexo I. Continuación.

NOMBRE	EDAD	SEXO	DATA	PICO MAX	PENDIENTE										
					230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280
25ac+bc	70	1	19	6891	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26ac+bc	85	1	18	6946	741	691	675	605	568	537	517	479	440	423	383
27ac+bc	55	1	24	746	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28ac+bc	56	2	18	4189	179	161	155	142	133	116	99	96	72	68	59
29ac+bc	47	1	18	3143	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30ac+bc	74	1	19	3085	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31ac+bc	78	2	19	36730	1428	1385	1305	1250	1162	1130	1056	1020	986	934	871
32ac+bc	57	1	38	829	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33ac+bc	39	1	18	9447	2070	2000	1968	1943	1901	1850	1827	1801	1769	1736	1701
34ac+bc	76	1	28	960	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35ac+bc	84	1	19	11489	149	136	121	95	71	43	26	33	17	5	4
36ac+bc	82	2	29	1884	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37ac+bc	88	2	18	65535	7374	7144	6886	6678	6446	6256	6037	5872	5680	5516	5392
38ac+bc	42	1	18	11251	1715	1632	1576	1479	1439	1363	1320	1246	1201	1147	1118
39ac+bcR	90	2	22	8342	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41ac+bcR	58	1	37	51485	562	526	494	469	448	414	401	383	383	368	333
42ac+bcR	86	2	28	7186	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43ac+bc	68	2	18	3919	1020	1015	989	971	953	929	903	870	859	832	811
44ac+bc	65	1	17	4462	20	11	5	4	1	1	1	0	0	0	0
45ac+bcR	86	2	17	65535	18664	18111	17648	17187	16711	16281	15837	15453	15043	14624	14203
47ac+bc	67	1	17	6920	419	392	357	354	335	311	275	249	229	199	182
48ac+bcR	81	2	18	59026	2613	2465	2342	2209	2077	1947	1832	1691	1591	1490	1406
49ac+bc	84	1	17	567	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50ac+bc	58	1	18	21641	4270	4172	4039	3899	3786	3628	3519	3401	3280	3181	3089

Anexo I. Continuación.

NOMBRE	EDAD	SEXO	DATA	PICO MAX	PENDIENTE																											
					Origen	05	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110					
51ac+bc	82	1	38	19773	6751	19773	10954	6611	4376	3241	2545	2114	1769	1525	1338	1204	1076	999	905	854	795	730	700	660	605	565	531					
53ac+bc	79	1	38	8588	7046	8588	4559	2861	2019	1527	1223	989	842	732	645	580	525	486	440	387	350	318	311	275	241	210	207					
55ac+bc	69	1	17	59914	32374	59914	24591	13496	8199	5488	3905	2922	2265	1806	1497	1226	1055	906	776	665	586	510	442	384	347	303	273					
56ac+bc	71	1	17	27301	8256	27301	17263	11190	8601	6957	5893	5062	4480	3961	3546	3276	2960	2726	2517	2338	2183	2043	1917	1814	1718	1621	1540					
57ac+bc	63	2	58	1613	1613	1007	391	196	97	33	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
58ac+bc	68	2	43	55417	28074	55417	31507	19665	13231	9719	7488	5976	4962	4359	3985	3581	3251	2982	2732	2577	2390	2254	2098	1958	1831	1711	1603					
59ac+bc	69	1	28	14863	7563	14863	7553	4407	2974	2154	1648	1334	1082	916	758	623	543	470	426	368	307	279	248	217	173	153	126					
60ac+bc	92	2	26	65535	28874	65535	52705	38249	29805	24454	20662	17911	14773	12070	10781	9716	8877	8192	7491	6806	6273	5859	5435	5000	4599	4160	3818					
61ac+bc	78	1	41	65535	27377	65535	65535	45884	32772	24862	19726	16438	13959	12105	10708	9612	8736	7959	7383	6847	6445	6048	5681	5407	5119	4851	4626					
62ac+bc	58	1	40	8239	7950	8239	4185	2555	1743	1287	988	780	628	512	448	371	300	274	232	195	162	140	118	106	94	73	57					
63ac+bc	87	2	40	15982	15475	15982	10121	7381	5019	3855	2994	2546	2211	1990	1763	1580	1426	1308	1188	1143	1102	1045	1012	993	986	977	930					
65ac+bc	91	2	37	10913	10908	10913	5160	2943	1915	2113	1597	1216	959	818	696	583	490	411	368	311	270	230	211	185	163	132	104					
66ac+bc	75	2	38	4422	4167	4422	1988	1208	841	627	469	385	318	306	296	294	300	293	289	251	195	155	108	65	21	12	19					
67ac+bc	69	2	47	505	505	0	0	145	173	131	89	41	34	2	1	0	0	1	0	2	16	1	0	0	0	0	0					
68ac+bc	54	2	43	7298	7298	791	254	118	56	17	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
69ac+bc	33	1	17	1361	1361	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
70ac	89	1	15	3911	1648	3911	2986	2433	2058	1833	1667	1552	1455	1366	1304	1275	1243	1224	1188	1178	1167	1126	1118	1107	1093	1073	1043					
70bc	89	1	15	2327	884	2327	1520	1096	847	692	606	522	493	453	435	411	396	360	355	337	326	308	297	285	270	259	264					
71ac	24	1	15	65535	24000	65535	65535	51070	39677	31504	25649	21239	17910	15303	13218	11650	10243	9130	8207	7484	6854	6287	5785	5406	5002	4673	4433					
71bc	24	1	15	65535	28517	65535	65535	65535	65535	53782	42818	35169	29783	25807	22313	18679	16778	15210	13940	12816	12157	11384	10650	10184	9447	8805	8432					
72ac	20	1	15	65535	27690	65535	65535	65535	56185	47367	41006	36393	32885	30227	28129	26442	25056	23922	22921	22078	21404	20725	20120	19511	18929	18339	17838					
72bc	20	1	15	65535	24907	65535	65535	57148	46794	39608	34466	30571	27592	25117	23187	21599	20235	19051	18015	17149	16318	15520	14848	14254	13675	13144	12651					
73ac	48	1	15	65535	30770	65535	43292	26945	18702	13448	10499	8554	6951	6542	5813	5061	4422	3856	3367	2967	2628	2346	2104	1932	1755	1599	1470					
73bc	48	1	15	65535	30185	65535	65453	43973	31218	23626	18777	15092	12165	9953	8340	7623	6932	6343	6029	5465	4926	4493	4027	3622	3308	3023	2786					

Anexo I. Continuación.

NOMBRE	EDAD	SEXO	DATA	PICO MAX	PENDIENTE																						
					115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225
51ac+bc	82	1	38	19773	502	468	440	395	372	345	323	320	277	266	262	229	215	208	202	183	159	157	135	119	121	119	131
53ac+bc	79	1	38	8588	196	180	170	151	152	136	124	119	102	99	93	74	60	60	53	42	35	37	33	18	22	19	11
55ac+bc	69	1	17	59914	234	211	194	181	151	138	121	101	82	82	71	78	53	41	38	32	35	17	7	5	0	0	0
56ac+bc	71	1	17	27301	1452	1402	1328	1265	1215	1149	1111	1050	1018	981	939	902	862	838	804	755	725	714	684	649	626	628	586
57ac+bc	63	2	58	1613	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58ac+bc	68	2	43	55417	1534	1424	1335	1253	1189	1106	1053	1017	951	893	843	804	748	696	666	630	591	564	506	505	468	440	419
59ac+bc	69	1	28	14863	116	108	85	80	70	55	53	47	27	32	14	3	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
60ac+bc	92	2	26	65535	3469	3197	2910	2650	2438	2238	2023	1848	1689	1578	1443	1336	1236	1117	1030	946	875	820	751	699	649	598	556
61ac+bc	78	1	41	65535	4417	4192	4043	3891	3754	3716	3607	3516	3398	3323	3231	3166	3068	2934	2802	2642	2509	2388	2247	2144	2024	1909	1823
62ac+bc	58	1	40	8239	39	20	28	10	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
63ac+bc	87	2	40	15982	909	910	907	760	732	728	714	664	395	301	268	245	216	207	197	171	172	162	137	142	106	93	93
65ac+bc	91	2	37	10913	76	76	69	51	39	40	37	33	20	13	10	4	4	4	0	1	3	1	0	0	0	0	0
66ac+bc	75	2	38	4422	3	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67ac+bc	69	2	47	505	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68ac+bc	54	2	43	7298	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69ac+bc	33	1	17	1361	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70ac	89	1	15	3911	1003	1013	1006	980	958	951	936	914	916	915	898	881	879	861	841	839	815	792	786	759	740	712	699
70bc	89	1	15	2327	237	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71ac	24	1	15	65535	4159	3938	3699	3486	3319	3156	2990	2861	2722	2602	2485	2370	2283	2168	2103	2002	1928	1856	1787	1741	1666	1620	1552
71bc	24	1	15	65535	7862	7365	6840	6455	6184	5895	5604	5288	5008	4784	4578	4379	4144	3950	3759	3615	3443	3254	3061	2935	2826	2676	2526
72ac	20	1	15	65535	17384	16916	16476	16096	15706	15344	14952	14591	14284	13923	13657	13394	13150	12866	12627	12356	12157	11919	11691	11497	11303	11112	10960
72bc	20	1	15	65535	12203	11790	11375	10979	10600	10297	10019	9707	9421	9149	8929	8693	8482	8295	8082	7906	7719	7570	7405	7245	7094	6943	6796
73ac	48	1	15	65535	1340	1227	1131	1039	971	902	822	759	684	652	595	548	524	483	446	426	381	371	325	300	292	283	258
73bc	48	1	15	65535	2548	2347	2171	2025	1852	1730	1588	1490	1383	1302	1188	1135	1049	990	939	905	839	783	741	702	673	628	590

Anexo I. Continuación.

NOMBRE	EDAD	SEXO	DATA	PICO MAX	PENDIENTE										
					230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280
51ac+bc	82	1	38	19773	93	89	76	66	67	43	56	52	38	42	9
53ac+bc	79	1	38	8588	6	6	3	1	0	0	0	0	0	0	0
55ac+bc	69	1	17	59914	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56ac+bc	71	1	17	27301	570	518	503	496	462	441	436	412	403	389	365
57ac+bc	63	2	58	1613	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58ac+bc	68	2	43	55417	375	355	328	327	324	311	297	274	262	238	226
59ac+bc	69	1	28	14863	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60ac+bc	92	2	26	65535	519	500	453	432	411	382	366	346	317	293	288
61ac+bc	78	1	41	65535	1744	1652	1585	1492	1420	1345	1289	1216	1148	1087	1055
62ac+bc	58	1	40	8239	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
63ac+bc	87	2	40	15982	65	51	49	50	32	29	22	20	7	6	8
65ac+bc	91	2	37	10913	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
66ac+bc	75	2	38	4422	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67ac+bc	69	2	47	505	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68ac+bc	54	2	43	7298	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69ac+bc	33	1	17	1361	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70ac	89	1	15	3911	681	658	643	627	609	601	583	568	570	542	543
70bc	89	1	15	2327	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71ac	24	1	15	65535	1511	1449	1393	1362	1329	1288	1248	1233	1188	1149	1108
71bc	24	1	15	65535	2432	2347	2261	2158	2073	1986	1912	1816	1739	1672	1596
72ac	20	1	15	65535	10780	10580	10429	10270	10110	9951	9810	9664	9558	9414	9265
72bc	20	1	15	65535	6673	6563	6387	6291	6169	6044	5938	5864	5759	5653	5557
73ac	48	1	15	65535	249	225	212	185	168	156	143	133	132	108	100
73bc	48	1	15	65535	557	540	503	486	456	436	419	402	375	360	354

Anexo I. Continuación.

NOMBRE	EDAD	SEXO	DATA	PICO MAX	PENDIENTE																								
					Origen	05	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110		
74ac	93	1	15	3254	1223	3254	2142	1440	1044	803	652	552	459	407	374	334	321	303	273	268	247	249	245	236	222	215	199		
74bc	93	1	15	1380	807	1380	799	525	368	280	219	177	154	149	130	114	102	110	96	77	77	77	81	57	67	68	76		
75ac	58	1	15	65535	30381	65535	65535	65535	53200	38227	29439	23691	19602	16492	14242	12569	11250	10169	9322	8624	7923	7268	6716	6220	5790	5430	5187		
75bc	58	1	15	65535	29393	65535	65535	65535	53878	41243	32510	26471	21820	18460	15722	13670	11887	10433	9156	7947	7033	6288	5596	5079	4701	4337	4055		
76ac	49	2	35	32841	17956	32841	18307	11213	7523	5495	4249	3452	2925	2550	2272	2042	1851	1705	1551	1423	1336	1282	1224	1153	1108	1057	1005		
76bc	49	2	35	36860	25042	36860	15756	8829	5689	4176	3171	2545	2126	1837	1614	1429	1299	1182	1094	1011	941	892	831	794	739	704	675		
77ac	69	1	15	56598	25516	56598	33184	22656	17092	13418	10793	8853	7393	6299	5500	4852	4311	3888	3509	3236	2959	2728	2519	2352	2212	2086	1953		
77bc	69	1	15	41246	19041	41246	28525	22158	17211	13714	11242	9563	8262	7200	6352	5642	5092	4627	4202	3899	3618	3340	3088	2803	2725	2474	2247		
78ac	26	1	15	65535	18127	65535	60054	48244	40308	35215	32149	29800	28058	26482	25222	24265	23457	22792	22196	21640	21127	20584	20195	19693	19273	18825	18395		
78bc	36	1	15	12983	9450	12983	6960	4860	3678	2905	2436	2109	1846	1647	1476	1355	1241	1146	1083	1024	957	927	878	854	809	758	715		
79ac	37	1	20	65535	33372	65535	65535	65149	48233	36982	29579	24712	20805	17820	15428	13078	11011	9661	8937	8042	7229	6559	5965	5439	5004	4613	4316		
79bc	37	1	20	65535	35952	65535	65535	65535	65535	62866	48335	37583	29801	24128	20771	18130	16136	14474	13182	12427	11636	10635	9802	9050	8355	7885	7300		
80ac		1	15	28117	26964	28117	15966	10493	7550	5831	4743	3959	3359	2943	2613	2355	2089	1911	1743	1631	1501	1402	1291	1234	1147	1091	1028		
80bc		1	15	10726	9268	10726	5691	3507	2391	1769	1384	1088	913	784	659	605	543	471	396	353	328	289	258	224	209	180	157		
81ac	92	2	15	18295	18295	15846	7200	4384	3096	2485	2051	1707	1467	1272	1127	1030	927	841	755	670	606	558	515	464	432	379	348		
81bc	92	2	15	20258	20258	19126	9458	5398	3905	2965	2330	1900	1589	1364	1169	1007	883	773	693	604	547	465	426	377	346	312	291		
82ac	69	1	15	48867	12974	48867	42263	34807	29061	24843	21680	19234	17302	15869	14695	13654	12861	12092	11471	10942	10470	9989	9635	9305	8940	8618	8331		
82bc	69	1	15	40133	17134	40133	28622	20924	15944	12716	10464	8857	7661	6762	6074	5564	5111	4753	4474	4215	4015	3836	3669	3508	3362	3207	3106		
83ac	59	1	15	65535	34288	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	60171	50817	44910	40285	36236	32995	29970	27253	24905	22848	21004	19401	17952	16708	15594	
83bc	59	1	15	65535	34317	65535	65535	65535	65535	65535	65535	58815	49326	41678	35762	31064	27291	24327	21770	19658	17816	16261	14917	13815	12781	11872	11093		
84ac	88	2	20	4824	2698	4824	3269	2347	1808	1465	1233	1066	966	862	813	773	734	709	685	663	641	637	613	609	595	604	610		
84bc	88	2	20	5053	2426	5053	3489	2548	1982	1610	1399	1261	1158	1086	1034	990	967	956	943	931	918	923	924	914	890	898	898		
85ac	64	1	15	42325	20237	42325	25995	17362	12546	9689	7873	6642	5801	5155	4691	4305	3990	3762	3542	3393	3247	3100	2965	2858	2739	2648	2546		
85bc	64	1	15	65535	32309	65535	65535	57565	38606	28073	21560	17203	14303	12131	10505	9249	8232	7427	6793	6233	5740	5314	4968	4666	4363	4110	3891		

Anexo I. Continuación.

NOMBRE	EDAD	SEXO	DATA	PICO MAX	PENDIENTE																						
					115	120	125	130	135	140	145	150	155	165	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225
74ac	93	1	15	3254	200	181	167	160	155	156	139	141	153	141	147	142	146	143	132	134	126	135	127	116	108	109	117
74bc	93	1	15	1380	59	54	70	79	74	69	64	59	54	65	85	80	83	65	76	78	87	74	74	94	76	78	78
75ac	58	1	15	65535	4932	4667	4367	4103	3889	3672	3521	3380	3206	3029	2895	2778	2664	2571	2454	2331	2203	2087	1997	1886	1788	1696	1630
75bc	58	1	15	65535	3719	3510	3328	3067	2868	2670	2553	2386	2201	2057	1933	1792	1694	1563	1488	1387	1322	1248	1199	1171	1110	1039	973
76ac	49	2	35	32841	998	956	915	892	873	850	835	821	787	776	769	745	742	725	719	710	690	676	669	655	635	636	626
76bc	49	2	35	36860	648	620	579	560	530	502	490	469	452	433	403	385	375	364	351	340	318	310	301	299	278	259	252
77ac	69	1	15	56598	1864	1734	1655	1567	1487	1391	1332	1266	1215	1154	1102	1062	1002	938	877	845	802	781	748	713	671	653	614
77bc	69	1	15	41246	2061	1942	1886	1800	1668	1557	1461	1374	1262	1202	1134	1057	992	940	888	848	801	771	738	724	696	651	626
78ac	26	1	15	65535	18001	17663	17358	17031	16687	16385	16077	15757	15473	15172	14911	14692	14439	14134	13884	13633	13388	13097	12921	12683	12452	12244	12036
78bc	36	1	15	12983	699	670	646	614	561	558	535	528	500	493	465	464	433	398	405	383	369	358	340	340	315	315	315
79ac	37	1	20	65535	4015	3792	3538	3360	3112	2968	2796	2654	2517	2376	2257	2147	2035	1962	1879	1792	1736	1661	1617	1540	1487	1428	1383
79bc	37	1	20	65535	6779	6321	5925	5596	5263	5000	4775	4524	4286	4076	3860	3701	3538	3410	3272	3137	3010	2898	2790	2677	2570	2495	2417
80ac		1	15	28117	991	946	913	874	833	778	743	709	716	674	653	634	605	567	548	543	525	517	497	485	462	440	435
80bc		1	15	10726	149	133	123	121	107	90	81	87	70	75	65	42	57	30	33	27	21	16	6	12	14	20	2
81ac	92	2	15	18295	298	266	258	246	209	190	180	195	183	175	132	137	124	119	109	109	93	76	67	60	46	39	34
81bc	92	2	15	20258	264	234	209	190	175	175	167	134	133	113	119	124	107	100	66	67	68	50	34	32	17	19	9
82ac	69	1	15	48867	8091	7871	7647	7469	7322	7093	6912	6750	6595	6431	6299	6157	6047	5921	5804	5690	5588	5488	5391	5306	5217	5119	5050
82bc	69	1	15	40133	3016	2904	2828	2719	2652	2593	2517	2446	2385	2316	2271	2194	2141	2089	2038	1982	1937	1896	1859	1809	1786	1729	1687
83ac	59	1	15	65535	14588	13655	12837	12158	11461	10785	10227	9689	9219	8818	8416	8013	7702	7356	7056	6781	6505	6258	6030	5760	5578	5360	5172
83bc	59	1	15	65535	10368	9735	9150	8585	8114	7686	7277	6912	6591	6237	5947	5637	5384	5137	4865	4616	4393	4236	4056	3890	3734	3607	3448
84ac	88	2	20	4824	595	582	582	591	597	574	574	553	548	535	533	521	514	501	511	503	485	482	461	456	448	440	439
84bc	88	2	20	5053	878	888	886	859	866	834	836	838	824	799	812	783	765	766	748	749	755	732	728	726	738	720	687
85ac	64	1	15	42325	2470	2385	2317	2248	2155	2112	2028	1995	1946	1900	1849	1818	1762	1727	1687	1644	1620	1587	1536	1517	1502	1464	1450
85bc	64	1	15	65535	3681	3489	3312	3157	3018	2871	2782	2643	2537	2439	2343	2269	2162	2104	1999	1959	1873	1835	1774	1721	1676	1624	1563

Anexo I. Continuación.

NOMBRE	EDAD	SEXO	DATA	PICO MAX	PENDIENTE										
					230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280
74ac	93	1	15	3254	103	115	106	96	102	102	100	86	93	62	76
74bc	93	1	15	1380	79	84	89	83	80	99	86	79	84	63	81
75ac	58	1	15	65535	1556	1481	1419	1364	1300	1259	1204	1160	1103	1061	1006
75bc	58	1	15	65535	925	885	840	808	738	711	664	640	614	586	562
76ac	49	2	35	32841	628	609	604	587	574	564	560	548	550	535	546
76bc	49	2	35	36860	241	216	211	188	184	163	155	139	139	130	127
77ac	69	1	15	56598	569	569	547	536	506	495	471	474	454	435	414
77bc	69	1	15	41246	615	578	563	535	498	487	465	423	393	377	347
78ac	26	1	15	65535	11795	11603	11358	11210	11013	10808	10670	10481	10312	10160	9973
78bc	36	1	15	12983	294	283	266	252	246	239	237	209	213	203	209
79ac	37	1	20	65535	1323	1282	1242	1178	1140	1097	1063	1024	983	950	912
79bc	37	1	20	65535	2307	2235	2151	2070	2006	1950	1899	1833	1772	1749	1668
80ac		1	15	28117	429	388	397	379	358	360	333	345	321	302	291
80bc		1	15	10726	1	0	4	5	1	4	0	0	1	0	0
81ac	92	2	15	18295	35	18	23	13	11	22	12	12	7	6	13
81bc	92	2	15	20258	1	3	3	9	10	7	3	0	0	0	0
82ac	69	1	15	48867	4961	4894	4804	4735	4638	4568	4536	4485	4421	4346	4291
82bc	69	1	15	40133	1656	1625	1597	1566	1533	1505	1476	1435	1399	1354	1364
83ac	59	1	15	65535	5000	4817	4669	4509	4381	4224	4096	3972	3848	3731	3583
83bc	59	1	15	65535	3313	3176	3056	2936	2833	2718	2650	2542	2472	2383	2308
84ac	88	2	20	4824	421	420	417	416	391	378	372	357	336	332	333
84bc	88	2	20	5053	695	687	682	686	677	667	653	648	640	626	621
85ac	64	1	15	42325	1424	1386	1369	1353	1325	1291	1263	1268	1247	1215	1217
85bc	64	1	15	65535	1539	1510	1443	1389	1359	1330	1291	1289	1225	1197	1168

Anexo I. Continuación.

NOMBRE	EDAD	SEXO	DATA	PICO MAX	PENDIENTE																						
					Origen	05	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110
86ac	87	2	15	41948	28652	41948	22149	13817	9742	7313	5578	4422	3724	3201	2758	2401	2161	1962	1765	1611	1510	1403	1288	1200	1118	1022	965
86bc	87	2	15	22643	22643	20985	10479	6466	4513	3426	2735	2276	1939	1679	1494	1351	1214	1101	1028	924	855	823	784	737	718	672	638
87ac	74	2	15	65535	34520	65535	65535	65535	65535	64943	52227	43372	36911	32235	28447	25546	23167	21249	19620	18263	17117	16099	15200	14344	13615	12962	12397
87bc	74	2	15	65535	34283	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	65535	61403	54533	49113	44907	41000	39291	37232	35100	33160	31395	29831	28468	27123	26005
88ac	94	2	25	47722	30640	47722	22051	13095	8962	6661	5272	4268	3616	3118	2769	2450	2163	1923	1720	1572	1463	1351	1265	1163	1090	1040	958
88bc	94	2	25	43676	28872	43676	19339	10262	6801	4967	3798	3070	2552	2150	1824	1615	1419	1266	1148	1026	914	837	795	751	716	684	620

NOMBRE	EDAD	SEXO	DATA	PICO MAX	PENDIENTE																						
					115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225
86ac	87	2	15	41948	894	843	789	744	699	657	625	598	561	548	530	483	448	432	410	391	392	379	337	312	292	284	275
86bc	87	2	15	22643	595	576	553	535	532	514	500	453	454	452	410	391	382	368	346	334	336	335	331	315	307	291	269
87ac	74	2	15	65535	11801	11308	10808	10395	9986	9569	9259	8886	8558	8250	7978	7739	7448	7208	6976	6775	6543	6361	6177	5961	5787	5603	5437
87bc	74	2	15	65535	24985	24015	23115	22310	21551	20854	20135	19532	18807	18229	17671	17046	16509	15962	15394	14829	14350	13853	13394	12948	12498	12103	11700
88ac	94	2	25	47722	906	858	819	768	709	655	628	570	536	509	461	452	436	418	369	353	323	303	287	282	259	244	228
88bc	94	2	25	43676	599	561	520	481	453	425	402	370	328	322	288	277	256	255	228	222	206	182	163	142	146	142	146

NOMBRE	EDAD	SEXO	DATA	PICO MAX	PENDIENTE										
					230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280
86ac	87	2	15	41948	250	234	238	220	208	193	187	181	168	172	148
86bc	87	2	15	22643	278	251	255	247	245	232	236	211	201	194	179
87ac	74	2	15	65535	5304	5138	4982	4861	4708	4595	4464	4337	4202	4108	4006
87bc	74	2	15	65535	11265	10957	10603	10258	9936	9605	9337	9018	8772	8520	8241
88ac	94	2	25	47722	210	224	217	189	188	177	170	145	152	140	121
88bc	94	2	25	43676	131	147	121	124	100	93	68	57	56	62	70

Anexo I. Continuación

<i>Coordenadas de la curva COR para QL35s</i>			
<i>Variables resultado de contraste</i>	<i>Positivo si es mayor o igual que^a</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>1 –Especificidad</i>
<i>QL35s</i>	<i>-1,0000</i>	<i>1,000</i>	<i>1,000</i>
<i>QL35s</i>	<i>14,5000</i>	<i>,983</i>	<i>,884</i>
	<i>35,0000</i>	<i>,983</i>	<i>,860</i>
	<i>43,0000</i>	<i>,983</i>	<i>,837</i>
	<i>111,0000</i>	<i>,966</i>	<i>,837</i>
	<i>214,5000</i>	<i>,949</i>	<i>,837</i>
	<i>273,5000</i>	<i>,949</i>	<i>,814</i>
	<i>340,0000</i>	<i>,949</i>	<i>,791</i>
	<i>441,5000</i>	<i>,949</i>	<i>,767</i>
	<i>501,0000</i>	<i>,932</i>	<i>,767</i>
	<i>513,0000</i>	<i>,932</i>	<i>,744</i>
	<i>537,0000</i>	<i>,915</i>	<i>,744</i>
	<i>568,0000</i>	<i>,898</i>	<i>,744</i>
	<i>635,5000</i>	<i>,898</i>	<i>,721</i>
	<i>696,5000</i>	<i>,898</i>	<i>,698</i>
	<i>729,0000</i>	<i>,898</i>	<i>,674</i>
	<i>756,0000</i>	<i>,898</i>	<i>,651</i>
	<i>770,0000</i>	<i>,898</i>	<i>,628</i>
	<i>802,0000</i>	<i>,898</i>	<i>,605</i>
	<i>827,0000</i>	<i>,881</i>	<i>,605</i>
	<i>909,5000</i>	<i>,881</i>	<i>,581</i>
	<i>1007,5000</i>	<i>,881</i>	<i>,558</i>
	<i>1046,0000</i>	<i>,881</i>	<i>,535</i>
	<i>1070,0000</i>	<i>,864</i>	<i>,535</i>
	<i>1081,0000</i>	<i>,864</i>	<i>,512</i>
	<i>1152,0000</i>	<i>,847</i>	<i>,512</i>
	<i>1227,0000</i>	<i>,847</i>	<i>,488</i>
	<i>1249,5000</i>	<i>,831</i>	<i>,488</i>
	<i>1297,5000</i>	<i>,814</i>	<i>,488</i>

	1371,5000	,814	,465
	1411,5000	,814	,442
	1483,0000	,814	,419
	1629,5000	,797	,419
	1728,5000	,780	,419
	1825,0000	,763	,419
	2004,5000	,746	,419
	2111,5000	,729	,419
	2156,5000	,729	,395
	2237,5000	,712	,395
	2410,5000	,695	,395
QL35s	19565,0000	,305	,000
	20512,5000	,288	,000
	22465,0000	,271	,000
	24201,5000	,254	,000
	25591,5000	,237	,000
	28135,5000	,220	,000
	30185,5000	,203	,000
	32870,0000	,186	,000
	35781,0000	,169	,000
	36988,0000	,153	,000
	39146,5000	,136	,000
	41269,0000	,119	,000
	42600,0000	,102	,000
	49429,0000	,085	,000
	57150,5000	,068	,000
	62175,0000	,051	,000
	65536,0000	,000	,000

