DATA DE LA MUERTE

J.A. Sánchez Sánchez

En Medicina Legal y Forense, cuando nos enfrentamos al estudio de unos restos óseos humanos la primera pregunta que se nos plantea siempre es cual es la data de la muerte. La información que podamos dar va a tener una importancia primordial para continuar la investigación o sencillamente considerar que esos restos solo tienen un valor histórico o arqueológico.

Müller estableció un esquema que se basa en la evolución de las partes blandas del cadáver y que resume en los siguientes pasos:

1. Formación de una capa de moho en los cadáveres sepultados en tierra (se presenta de 2 a 4 años después de la muerte).
2. Desaparición de las partes blandas en enterramientos en fosas (indica que han transcurrido 2 a 4 años después de la muerte)
3. Desaparición de cartílagos y ligamentos en sepultados en tierra (tiene lugar a los 5 o mas años)
4. Desaparición de la grasa en los huesos (tiene lugar a los 5-15 años después de la muerte).
5. Destrucción del hueso, puede presentarse entre 10 a 15 años, dependiendo del terreno. Hay huesos que resisten miles de años.
6. Estado quebradizo, frágil y poroso de los huesos (quiere decir que por lo menos han transcurrido 50 años. Una vez mas esto hay que cotejarlo con el estado y composición química del terreno).
7. El hueso no tiene médula ósea (mas de 6 años).
8. No hay nada de materia orgánica en el canal medular (mas de 10 años).

Mas recientemente algunos autores se han ocupado de establecer técnicas que pudieran tener una mayor fiabilidad en la resolución de ese tipo de casos. Estas técnicas pueden resumirse en los siguientes puntos:

Estudio del contenido mineral
Estudio histológico
Reacción de la Benzidina
Reacción al suero antihumano
Fluorescencia ultravioleta
Estudio termogravimétrico
Estudio del contenido de lípidos
Estudio del contenido de nitrógeno
Estudio del contenido de amino ácidos

En cuanto al contenido mineral en relación con la data ha sido abordado por autores como Dell Erba (1957), Taylor (1965), Strehlow (1969), Castellano (1976). Castellano encuentra que se produce con el tiempo un aumento de Fe, Zn, Pb, y P y una disminución de K y Mg. Sin embargo establecen que estas transformaciones pueden estar influenciadas por contaminación del terreno.

El estudio histológico es abordado entre otros por Berg (1962) y Nokes y cols (1987). Estos autores señalan la existencia de alteraciones con pérdida de actividad óptica en huesos antiguos, mientras que en huesos recientes muestran sistemas lamelares con birrefrigencia en el área de la osteona.

La reacción a la Benzidina, reacción a suero antihumano y fluorescencia ultravioleta son estudiados por Knight y Lauder (1969) y concluyen en su estudio que la actividad inmunológica sobrevive poco tiempo, del orden de 5 a 6 años, que la fluorescencia ultravioleta es de limitado uso pero que puede ayudar en conjunción con otros test (el umbral lo establece en 150 años), con menos de esta edad los cortes frescos de huesos largos exhiben fluorescencia. La bencidina también parece persistir durante 100-150 años. En cuanto al contenido de nitrógeno establece que menos de 2.5 grs % parece indicar que el hueso tiene mas de 350 años, y que casi todas las muestras de menos de 50 años tienen un contenido de nitrógeno de mas de 3-5 mgrs %. Similares cifras establece Berg (1962).

Mas recientemente Yoshino (1991), aplica la fluorescencia ultravioleta en cortes histológicos de hueso y señala la posibilidad de establecer la data mediante esta técnica en huesos con un periodo de tiempo próximo a la muerte y que puede ser de interés en los estudios antropológico forenses, aunque dado el tamaño de la muestra que estudia (n=51) repartido entre 0 y 15 años.

El estudio termogravimétrico y el contenido de lípidos es realizado por Castellano (1976).

En cuanto al estudio termogravimétrico que se basa en la pérdida de peso que sufre la muestra ósea al someterla a diferentes temperaturas, los autores concluyen que este método es de utilidad para diferenciar huesos recientes y antiguos (mas de 100 años).

En el estudio de los lípidos los autores llegan a las siguientes conclusiones:

1. Que la concentración de los lípidos varía mucho de unos huesos a otros.
2. Que los lípidos disminuyen con el tiempo, siendo esta pérdida mas brusca en los huesos

recientes (hasta dos años) y mas lenta para los de 10, 15, 20 y 50 años y huesos milenarios.
3. Mediante cromatografía en capa fina observan un empobrecimiento de triglicéridos, colesterol, y diglicéridos mientras que la fracción de ácidos grasos libres se va enriqueciendo con el paso del tiempo.
4. El estudio mediante cromatografía de gases de los esteres metílicos de los ácidos grasos libres señala un aumento estadísticamente significativo del palmítico, esteárico, linoleico, y miristoléico y disminuyen el oleico y araquídico.

El estudio del contenido de aminoácidos es realizado por Knight y Lauder (1969), por el método de cromatografía en capa fina y establecen que las muestras de menos de 70-100 años producen 7 o mas aminoácidos y que la presencia de prolina o hidroxiprolina parece que se presenta solo antes de los 50 años.

De la lectura de los autores citados anteriormente se podía concluir que las técnicas que se realizaban sobre la materia orgánica del hueso tenían menos problemas en cuanto a contaminación por el terreno y parecían tener mejores perspectivas en la aplicación concreta de la data de la muerte con fines forenses. En un trabajo realizado personalmente con el profesor Busuttil en la cátedra de Patología Forense de Edimburgo decidimos ampliar el estudio de nitrógeno y aminoácidos en hueso utilizando la siguiente metodología:

Para la determinación de nitrógeno utilizamos una muestra compuesta por 13 huesos humanos, 14 dientes, igualmente humanos y 3 huesos animales, todos ellos de data conocida. Cuando se tenia conocimiento del sexo y edad del individuo era incluido en el estudio.

Para el estudio de amino ácidos utilizamos 13 huesos humanos, 2 molares igualmente humanos y dos huesos animales (perro), también de data conocida.

a) Determinación de nitrógeno.

Usamos el método de Kjeldahl que ya había sido usado antes por Knight y Lauder (1969) a fin de poder comparar nuestros resultados. En 7 de las muestras se realizó también el estudio mediante el método de Dumas que había sido utilizado por otros autores (Denninson, 1980).

b) Determinación de aminoácidos.

El método usado fue el seguido por Law y Hedges (1989) y Gillespie y Hedges (1984), ligeramente modificado, realizando una extracción de la materia orgánica y análisis de aminoácidos en los siguientes pasos:

1. Una muestra ósea es fragmentada y limpiada cuidadosamente mediante raspado de la cortical tanto en su cara externa como interna.

2. Los fragmentos son sometidos a un lavado con ácido clorhídrico 1 N durante 5 minutos con agitador magnético.

3. Posteriormente y tras secado de estos fragmentos se pulverizan hasta obtener harina de hueso.

4. 5 mgrs de la harina de hueso obtenida son utilizados para la realización del estudio, siendo desmineralizados mediante agitación magnética en una solución de ácido clorhídrico 1 N durante 3 horas.

5. Después del proceso de desmineralización se procede a centrifugar la solución a 3.000 r.p.m (5 minutos) y son separados el sobrenadante y el precipitado.

6. El sobrenadante es llevado a sequedad en un rotavapor y después vuelto a diluir en agua destilada (5?10 ml).

7. Tras esto el sobrenadante es pasado a través de una columna de intercambio iónico (BIORAD 50X8).

8. Los aminoácidos son extraídos de la columna usando una solución de hidróxido amónico 1.5 M.

9. El sedimento que habíamos obtenido tras la centrifugación es disuelto en una solución de ácido clorhídrico 6 N y calentado en una estufa durante 24 horas a 105º C. Posteriormente se filtra con un filtro de vidrio.

10. El filtrado es llevado a sequedad, redisuelto en agua destilada y sometido al mismo proceso que el sobrenadante.

11. Tanto el sobrenadante como el precipitado aunque separadamente son llevados al analizador de amino ácidos (ABI mod. 420 A). Hemos de señalar que el precipitado debe ser diluido 1: 50 M.

En la determinación de aminoácidos obtuvimos los siguientes: Ácido aspártico, Ácido glutámico, Serina, Glicina, Histidina, Arginina, Treonina, Alanina, Prolina, Tirosina, Valina, Metionina, Isoleucina, Leucina, Fenilalanina, Lisina, y Cisteina.

Las cantidades presentes de estos amino ácidos fueron obtenidas tanto en el sobrenadante como en el precipitado. Debido a que las cantidades halladas en el sobrenadante eran muy bajas y tenían un comportamiento muy irregular solo sometimos a estudio los resultados obtenidos en el precipitado excepto el amino ácido cisteina que solo se obtiene en muestras muy recientes (hasta 4 años).

Se realizaron estudios de correlación considerando las muestras globalmente, por grupos de huesos y finalmente por huesos individuales.

Como conclusión a nuestro estudio del contenido de nitrógeno debemos decir que comparados nuestros resultados con los dados por Knight y Lauder (1969). Estos autores establecen que un contenido de nitrógeno menor de 2.5 mgrs parece indicar que el hueso tiene mas de 350 años y que casi todas las muestras de menos de 50 años tienen un contenido de mas de 3.5 mgrs % se ajustan bastante bien al contenido que nosotros encontramos en huesos largos, pero nuestros resultados en cuanto a huesos planos (costillas) son sistemáticamente de mayor porcentaje al establecido, igualmente el contenido en molares y huesos animales es menor que el establecido por ellos.

No parecen existir diferencias en cuanto a edad, sexo y lugar de enterramiento con las cantidades de nitrógeno obtenidas.

En cuanto a la determinación de aminoácidos como método de datación ósea podemos establecer que tienen un gran número de posibilidades debido a la gran cantidad de aminoácidos que usamos y sus variaciones individuales en cada muestra, pero para una correcta interpretación de los resultados debemos tener en cuenta que:

Los test de correlación indican que existe una diferencia en el contenido y evolución de los aminoácidos dependiendo del hueso que se estudie, sin embargo no parecen existir diferencias por el lugar de enterramiento, aunque este último punto para ser confirmado necesita de estudios mas extensos.

Igualmente existe una diferencia en huesos animales y huesos humanos en cuanto al contenido de amino ácidos.

OTRAS TÉCNICAS DE DATACIÓN

Incluimos aquí otras técnicas de datación que se aplican en hueso aunque no con fines exclusivos antropológico-forenses.

-Estas serian:

- Datación por C14
- Racemización de aminoácidos
- Resonancia electrónica

DATACIÓN POR C14

La técnica de datación por carbono ha sido utilizada con una amplia variedad de propósitos, entre ellos la determinación de la edad en material óseo.

Su aplicación para la data se basa en los mismos principios que para cualquier otro material orgánico. Mientras que un organismo que está vivo mantiene una constante interrelación con el medio y la cantidad de C14 que posee es la misma que existe en la atmósfera que se mantiene constante a través del tiempo. Al morir el C14 disminuye progresivamente a una velocidad constante de aproximadamente un 1% cada 80 años. En la medida que este descenso, se basa esta técnica de datación.

Se puede usar la parte orgánica o inorgánica del hueso siendo preferible la primera debido a que sufre menor contaminación del medio. El componente inorgánico que está constituido por hidroxiapatita y carbonato cálcico se transforma en fluoropatita y fosfato cálcico por la acción de las aguas que existen en el medio por lo que puede dar lugar a errores de datación.

Si se utiliza la parte orgánica (constituida por colágeno) este error se elimina y algunos problemas que pueden plantearse como contaminación por microorganismos o por un terreno rico en materia orgánica se eliminan por los procederes habituales de los laboratorios dedicados a ello.

Mediante este método de análisis se pueden datar muestras de entre 500 y 50.000 años aproximadamente, y tiene como principales inconvenientes el tamaño de la muestra, (usualmente grande) y el tiempo necesario para obtener los resultados que tiene una relación inversa con el tamaño de la muestra.

En 1877 Muller aplicó un nuevo método, el acelerador de radiocarbono o ciclotrón que puede realizar la datación con una cantidad mínima de material y en corto periodo de tiempo. Sin embargo Berger (1979) señala como inconvenientes la posible contaminación de la lectura de la muestra por el propio sistema debido a la alta energía que utiliza y el coste económico. Como ventaja el periodo de tiempo para datar se amplia a 100.000 años de edad. De cualquier manera el periodo de tiempo mínimo continua igual, en los 500 años lo que hace que esta técnica no tenga hasta ahora una indicación de

uso en Antropología Forense.

RACEMIZACION DEL ÁCIDO ASPARTICO

Se basa este método en la medida de las forma D y L de los aminoácidos. Mientras que un organismo está vivo utiliza exclusivamente las formas L de los aminoácidos, siendo por tanto las únicas que posee. Cuando fallece las formas L se van transformando en forma D a una velocidad que es constante e independiente para cada aminoácido y que está influenciada por el ph y la temperatura. Su rango de actuación en el tiempo depende de la temperatura a que haya estado sometido el material, lo que hace de ella una técnica insegura. De cualquier manera su uso está restringido al terreno de la paleontología alcanzando su límite según la zona hasta 500.000 años (Centro Europa) o 60.000 años (Ecuador).

RESONANCIA ELECTRÓNICA.

Esta técnica se basa en la detección del momento magnético inducido por la rotación de un electrón cargado negativamente. Estos electrones son producidos por la radiación natural resultante de la descomposición del uranio, torio, y potasio del material que se estudia.

La dosis total de radiación, que está en relación con la edad, puede determinarse a partir de la concentración de electrones cargados negativamente. El primer estudio en huesos se realiza por Ikeya y Miki (1980). El rango de tiempo que cubre depende del comportamiento de la muestra y de la temperatura a la que haya estado sometida, por lo que es necesario calibrar el comportamiento termal del material de estudio para poder establecer la velocidad de transformación. El rango de tiempo no ha sido establecido con seguridad. La muestra que se ha datado con menos tiempo es de 600 años, mientras el límite superior se extiende hasta un millón de años.

Desde el punto de vista de la Antropología Forense algunos autores señalan que si se calibra el equipo para muestras recientes sería posible establecer la data con fines forenses.

Además de las técnicas aquí descritas el método entomológico puede ayudar también en las primeras fases de evolución del cadáver hasta llegar a su esqueletización. Esta metodología tiene su campo de estudio propio y deber ser realizada por expertos en este tema.

Como conclusión a esta revisión podemos señalar que hasta la actualidad no se dispone de ningún método de laboratorio contrastado y fiable pare establecer la data de la muerte con fines antropológico forenses, dado que los estudios citados adolecen de una falta en cuanto al numero de muestras analizadas para que puedan aplicarse con fiabilidad, y otros métodos mas contrastados son aplicables solo con fines arqueológicos, debido al periodo de tiempo en el que se mueven.

BIBLIOGRAFÍA

Berg,S. (1962). Methods in Forensic Sciences. Interscience Publishers. London.

Berger, R. (1979). Radiocarbon Dating of Bone and Shell from their Organic Components. Science 6: 101-104.

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

Dell'Erba, A. and Caretto,I. (1957). La osteodiagnosi dell'epoca della morte. Giornale Medicine Legale, Infeziosi et Toxicology. 3: 26?29.

Denninson, K.J. (1980). Amino acid in Archeological Bone. Journal of Archeological Science. 7:81?86.

Gillespie, R.,Edges R.E.M. and Wand, J.O. (1984). Radiocarbon Dating of Bone by accelerator Mass Spectrometry. Journal of Archeological Sciences. 11: 165?170.

Ikeya m., y Miki, T. (1980). Electrón Spin Resonance Dating of Animal and Human Bones. Science 207: 979-989.

Knight, B. and Lauder, I. (1969). Methods of Dating Skeletal Remains. Human Biology. 41: 322?341.

Law, I.A., and Hedges, R.M. (1989). A semi?Automated Pretreatment System and the Pretreatment of Older and Contaminated Samples. Radiocarbon. 31(3): 247?243.

Muller, R.A. (1977). Radioisotope Dating with a cyclotron. Science, 196: 489-494.

Nokes,L.D.M., Grenn,M., and Knight,B. (1978). The use of Scanning Electron Microscopy in the Dating of Human Skeletal Remains. Journal of Forensic Sciences Society. 27: 413?426.

Strehlow, C and Knip,T. (1969). The Distribution of Lead and Zinc in the Human Skeleton. Americam Industrial Hygiene Journal. 30: 373?378.

Taylor's. (1962). Principles and Practice of Medical Jurisprudence. Ed. Churchill. London.

Yoshino, M. et al. (1991). Microscopical study on estimation of time since death in skeletal remains. Forensic Sciences International, 49:143-158.