

APROXIMACIÓN AL DIAGNÓSTICO DE CAUSA DE MUERTE MEDIANTE EL ESTUDIO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS CARDIACOS.

APPROACH TO THE DIAGNOSIS OF CAUSE OF DEATH THROUGH THE STUDY OF BIOCHEMICAL MARKERS OF HEART.

PELEGRINA JIMÉNEZ A.¹, HERNÁNDEZ-ROMERO D.², O'VALLE RAVASSA F.³, GARCÍA DEL MORAL GARRIDO R.³, HERNÁNDEZ DEL RINCÓN J.P.², OSUNA CARRILLO DE ALBORNOZ E.²

RESUMEN.

Hasta el 90% de los casos de muerte súbita tienen un origen cardíaco y en un 95% de los casos se observa una cardiopatía estructural, representando el origen isquémico el 80% de los casos. En el 5% de las autopsias de muerte súbita, no es posible averiguar la causa de muerte y son clasificadas como autopsias blancas que pueden llegar al 30% en adultos jóvenes. El diagnóstico de infarto agudo de miocardio (IAM) puede resultar complicado si la muerte se produce antes de que se produzcan cambios anatomopatológicos, que no son inmediatos desde el inicio de la isquemia y precisan un tiempo de supervivencia mínimo para ser detectados. Por ello, se hace necesario encontrar biomarcadores de isquemia miocárdica precoces. Obtuvimos muestras de suero y líquido pericárdico en autopsias practicadas en el Instituto de Medicina Legal de Murcia que fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis en el área de Medicina Legal de nuestra Universidad. Observamos que la determinación de troponina I en líquido pericárdico y CK-MB en suero y líquido pericárdico han mostrado un rendimiento diagnóstico *post mortem*, para diferenciar causas de muerte de origen cardíaco de otras causas de muerte, excepto para las de origen traumático. Adicionalmente, el comportamiento de las isoformas enzimáticas MBmb1 y MBmb2 en líquido pericárdico apoya el diagnóstico diferencial cardíaco, separándola de otras causas de muerte, excepto en muertes de etiología traumática y asfixias por ahorcadura. Consideramos que la valoración de estos biomarcadores podría resultar de gran interés como estudio complementario a la autopsia convencional en casos de muerte súbita.

PALABRAS CLAVE: Muerte súbita, CK-MB, isoformas enzimáticas creatin kinasa, troponina I cardíaca, diagnóstico muerte.

ABSTRACT.

Up to 90% of sudden death cases have cardiac origin, finding structural heart disease in 95%, with ischemic origin representing 80% of cases. In 5% of sudden death autopsies, it is not possible to find out the cause of death and they are classified as white autopsies that can reach 30% in young adults. The diagnosis of MI can be complicated if death occurs before pathological changes occur, which are not immediate from the onset of ischemia, but require a minimum survival time to be detected. For this reason, it is necessary to find early myocardial ischemia biomarkers. We obtained serum and pericardial fluid samples in autopsies performed at the Murcia Institute of Legal Medicine, which were stored at -80°C until their analysis at our University. We found that the determination of troponin I in pericardial fluid and CK-MB in serum and pericardial fluid have shown a post-mortem diagnostic performance to differentiate causes of death of cardiac origin from other causes of death, except for those of traumatic origin. Additionally, the behavior of the enzymatic isoforms MBmb1 and MBmb2 in pericardial fluid support the cardiac differential diagnosis, separating it from other causes of death, except in deaths of traumatic etiology and asphyxia due to hanging. For all these reasons, we believe that the assessment of these biomarkers could be of great interest as a complementary study to the conventional autopsy in cases of sudden death.

KEY WORDS: Sudden death, CK-MB, creatin kinase enzyme isoforms, cardiac troponin I, death diagnosis

CONTACTO: Diana Hernández-Romero. Departamento de Medicina Legal y Forense, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB) Campus Regional Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum", Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, (Murcia), Spain. Tel.: ++34868887020; Fax++34868884150. dianahr@um.es

1. INTRODUCCIÓN.

La muerte súbita es una de las causas más comunes de muerte en los países occidentales [1]. El estudio morfológico *post mortem* de la

muerte súbita es diagnóstico en un porcentaje significativo de casos; sin embargo, hasta un 5% de las muertes rápidas e inesperadas la autopsia no permite un diagnóstico concluyente. La etiología de la muerte súbita

1 Especialista en Medicina de Familia y Comunitaria. Centro de Salud de Huétor Tajar Servicio Andaluz de Salud, Granada.

2 Departamento de Medicina Legal y Forense, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB) Campus Regional Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum", Facultad de Medicina, Universidad de Murcia.

3 Departamento de Anatomía Patológica, Instituto de investigación biosanitario (IBS).GRANADA, Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Universidad de Granada.

comprende un amplio espectro de causas, llegando al origen cardíaco en el 90% de los casos [2-4]. El diagnóstico *post mortem* de daño miocárdico depende tanto de los fenómenos de autólisis que se manifiestan en las células tras la muerte, como del tiempo de evolución de la isquemia, determinando la afectación. Salvo que haya complicaciones como rotura de pared cardíaca, trombosis mural, rotura de músculos papilares etc, en el examen en fresco macroscópico del tejido cardíaco sólo es posible evidenciar lesiones características del infarto agudo de miocardio (IAM) a partir de un intervalo de tiempo que oscila entre las 4 y 10 horas para algunos autores [5,6] y para otros entre 8 y 12 horas [7,8]. Por tanto, establecer un diagnóstico concluyente en muerte súbita exclusivamente a partir de los hallazgos morfológicos, macro y microscópicos, puede resultar difícil [9], especialmente con un período de supervivencia breve desde el inicio de los síntomas.

Los biomarcadores *post mortem* se han investigado muy activamente en el análisis complementario para llegar a conclusiones válidas sobre las circunstancias de la muerte [10]. Se han identificado varios fluidos en el cadáver, que se ajustan en gran medida a estas condiciones, resultando para el diagnóstico *post mortem* del infarto de miocardio, los fluidos corporales más adecuados la sangre periférica, el líquido pericárdico y el humor vítreo [11-13].

En la práctica forense se han realizado diversos estudios para conocer la utilidad de la determinación de marcadores bioquímicos de daño miocárdico, que complementan el análisis morfológico [14-16]. La eficacia diagnóstica de las troponinas cardíacas se ha demostrado en casos de muerte cardíaca súbita [17-18]. Cina et al. [19] demostraron la correlación de cTnI en la causa de muerte de origen isquémico y Ooi et al., en 2000 [20] han demostrado esa correlación entre los niveles de CK-MB, cTnI y cTnT y cambios histológicos cardíacos significativos, en autopsias de pacientes sin clínica de IAM. En el cadáver los niveles de cTnI y CK-MB en la sangre periférica, cardíaca y líquido pericárdico en general muestran una

elevación leve y gradual *post mortem*, dependiente del factor tiempo.

Los biomarcadores son capaces de difundirse pasivamente en el líquido pericárdico, siendo detectables en niveles más elevados en este fluido que en el suero [21,22]. Dado que el líquido pericárdico está más próximo al miocardio y ocupa una cavidad serosa cerrada, los niveles de biomarcadores pueden aparecer en niveles *post mortem* más altos y con menos vulnerabilidad a la contaminación y los cambios *post mortem* [22, 23].

El objetivo principal del presente estudio fue evaluar en suero y líquido pericárdico marcadores específicos de daño cardíaco que nos permita conocer las diferencias entre grupos de causa de muerte, con la finalidad de establecer su capacidad diagnóstica para conocer la etiología de la muerte. Nuestra hipótesis es que estos biomarcadores pueden ser de gran utilidad como herramienta complementaria en el diagnóstico *post mortem* junto con los hallazgos anatomopatológicos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.

Se analizaron casos procedentes de autopsias forenses realizadas en el Instituto de Medicina Legal de Murcia, con un intervalo *post mortem* inferior a 24 horas, para evitar posibles interferencias por procesos de autólisis. Para minimizar la posible interferencia derivada de los fenómenos de autólisis, los cadáveres se conservaron en una cámara fría hasta que se realizó la autopsia. En todos los casos estudiados se conoce la existencia de un tiempo de supervivencia, según la información de la anamnesis de las personas relacionadas con el fallecido y de la información obtenida en la inspección ocular y levantamiento del

cadáver. La causa de muerte se clasificó en cinco grupos, alcanzándose el diagnóstico tras la práctica de una autopsia completa, detallada y minuciosa, tal y como está establecido en los protocolos [24-27] (Orden de JUS/1291/2013 ministerial 13 de mayo BOE 120; 011). La inclusión en cada uno de los grupos se realizó basándose en los antecedentes clínicos previos al fallecimiento, a la información obtenida durante el levantamiento del cadáver, a la autopsia y a los hallazgos toxicológicos e histopatológicos y de acuerdo con la similitud del mecanismo fisiopatológico de la causa de muerte. Los cinco grupos diagnósticos fueron: muerte por ahorcadura, muerte por sumersión, muerte por infarto de miocardio, muerte de etiología violenta con traumatismo torácico (accidentes de tráfico) y muerte de etiología natural excluyendo una causa cardíaca (enfermedad cerebrovascular, neumonía, insuficiencia renal aguda y hemorragia aguda). La consideración del diagnóstico de muerte súbita cardíaca isquémica, se realizó según la Cuarta Definición Universal de Infarto de Miocardio [28] y se atendió a dos posibles situaciones:

1. Diagnóstico anatomopatológico de infarto agudo de miocardio (IAM) establecido mediante estudio microscópico con H&E por el hallazgo de necrosis de miocardiocitos o bien existencia de infiltrado inflamatorio agudo, (constituida por polimorfonucleares, lo que nos indica un IAM en fase aguda) o por la existencia de infiltrados inflamatorios subagudos (formado fundamentalmente por linfocitos y macrófagos, también células plasmáticas y/o fibroblastos), que implica un IAM en evolución reciente (pocos días).
2. Diagnóstico de muerte cardíaca de origen isquémico, sin signos de necrosis y/o sin infiltrado inflamatorio agudo, pero que en el estudio anatomopatológico mediante la tinción de hematoxilina-eosina (H&E) aparecen signos inespecíficos de isquemia (edema, congestión, ondulación de fibras, bandas de contracción) y/o infarto de miocardio antiguo (fibrosis de reemplazo) o existiendo evidencias de cardiopatía

isquémica severa (estenosis significativa coronaria superior al 70%), en al menos una rama principal y/o presencia de trombo coronario oclusivo. Todo ello junto con antecedentes personales de una cardiopatía isquémica y una vez descartadas otras causas de muerte mediante la realización de una autopsia completa.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Medicina Legal y el Comité de Ética de la Universidad de Murcia y la Comisión de Ética en Investigación de la Universidad de Granada (Informe 700 del comité de investigación humana, de 21 de mayo 2012). El manejo de todas las muestras se ha ajustado a la ley de protección de datos.

2.2. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE FLUIDOS BIOLÓGICOS.

Durante la autopsia, se recogieron muestras de sangre periférica y líquido pericárdico con una jeringa estéril de la vena femoral y del saco pericárdico, respectivamente. Las muestras se centrifugaron sin demora después de la extracción y se almacenaron para su conservación a una temperatura de -80°C, hasta que se realizó el análisis bioquímico.

Se analizaron los marcadores bioquímicos mediante los siguientes procedimientos:

2.2.1. Determinación electroforética de las Isoformas de isoenzima CK-MM y CK-MB.

Se evaluó mediante el ensayo "Cardio REP@ CK Isoforms" (Helena Laboratories Beaumont, Texas, USA). Brevemente, se trata de un método de electroforesis en el que las isoformas de la CK-MB migran más anódicamente que las de la CK-MM. La CK-MB1 es la banda más rápida y por tanto la más anódica de las MB. La lectura de resultados se realizó mediante el densitómetro Cardio REP, calculando automáticamente el porcentaje relativo de la CK-MB1, CK-MB2 y la

relación MB2/MB1. La interpretación de resultados es positiva para infarto de miocardio para una actividad CK-MB $\geq 5\%$ de la actividad CK total y valor mínimo de 10 UI/L, o para una MB2 ≥ 2.6 UI/L a 37°C y una relación MB2/MB1 ≥ 1.7 . La isoforma MM es más inespecífica y a menudo es la única isoenzima encontrada en el suero normal. Se encuentra elevada en daño en el músculo esquelético, daño miocárdico, o daño cerebral. El coeficiente de variación del ensayo se situó en el 13.4%.

2.2.2. Determinación cuantitativa de la Isoenzima MB de la Creatinkinasa (CK-MB).

Evaluado mediante el sistema de química clínica Dimensión® con el módulo de inmunoensayo heterogéneo es un análisis de diagnóstico in vitro que tiene por objeto la determinación cuantitativa de la isoenzima MB de la creatinkinasa en suero y plasma humano para la confirmación del infarto agudo de miocardio. Durante el período de incubación se forma un sándwich partícula/CK-MB/conjugado donde la cantidad de proteína CK-MB se mide inmunológicamente y los resultados se expresan en unidades de masa (ng/mL o $\mu\text{g/L}$). El intervalo de referencia calculado para el sistema de inmunoensayo es del: 0- 3.6 ng/mL. En muestras con resultados elevados de CK y CK-MB, un índice relativo (IR) puede utilizarse para diferenciar entre elevaciones de CK-MB debidas a daños en el músculo esquelético e IAM. Un IR $< 1.5\%$ se sugiere como consistente con daños en el músculo esquelético [7]. Se recomienda un protocolo de muestreo secuencial para el diagnóstico del infarto agudo de miocardio. Un punto de corte $> 5\text{ng/mL}$ y un índice relativo (IR) $> 0.4\%$ se sugieren como datos consistentes con un IAM. El IR se calcula expresando la masa de CK-MB como porcentaje de la CK total (masa de CK-MB/CK) x 100.

2.2.3. Troponina I.

El ensayo Access AccuTnl® (Beckman-Coulter, N° catálogo 33320) de troponina I es un inmunoensayo quimioluminiscente con partículas paramagnéticas para la detección cuantitativa de niveles de troponina cardíaca I en suero humano y plasma (EDTA) en analizadores Access® (Izasa). Presenta un rango de detección de 0.03-50 ng/mL. En la práctica clínica el valor de corte por encima del cual una muestra se considera positiva es de 0.1 ng/mL. Sin embargo, en los pacientes en las primeras fases de un infarto agudo de miocardio el valor puede oscilar entre 0.07 y 0.1 ng/mL.

3. PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO.

Los datos recogidos fueron analizados el programa informático SPSS, versión 20.0 (SPSS Institute Inc., Cary NC, USA). Se comprobó si las variables siguen una distribución normal mediante el análisis de Komolgorov-Smirnov. Se llevo a cabo la comparación entre variables mediante análisis bivalente paramétrico o no paramétrico, según lo apropiado. Se realizó el cálculo de los coeficientes de correlación de Pearson y/o regresión lineal para variables con distribución normal o el coeficiente de Spearman para variables no normales. Para variables de tipo cuantitativo se realizó la comparación de medias mediante t de Student o ANOVA, según el número de variables. También se utilizó la prueba U de Mann-Whitney o el test de Kruskal-Wallis (test K-W) en función del número de niveles de la variable cualitativa. Para variables categóricas se evaluó el estadístico chi-cuadrado de Pearson o el test de Fisher. Para el análisis discriminante se estableció la capacidad de seleccionar una variable definida en varias categorías en relación con la función discriminante obtenida en la aplicación del modelo de análisis paso a paso.

3. RESULTADOS.

Se analizaron 92 casos procedentes de autopsias judiciales, 66 (71,7 %) hombres y 26 (28,3%) mujeres con edades comprendidas entre 12 y 87 años (edad media de 50.33±18.78). Todos los cadáveres tenían una data conocida que oscilaba entre 5 y 24 horas con una media de 15.27±5.67 horas. Los casos fueron categorizados según la causa de muerte en los siguientes grupos: muerte por ahorcadura (N=12), muerte por sumersión (N=14), muerte por infarto de miocardio (N=23), muerte violenta con traumatismo torácico (N=23) y muerte de etiología natural (N=20). En este último grupo se incluyen los casos de enfermedad cerebrovascular, neumonía, insuficiencia renal aguda y hemorragia aguda.

3.1. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL INTERVALO *POST MORTEM* SOBRE LOS VALORES DE LOS DIFERENTES BIOMARCADORES.

Hemos realizado una correlación no paramétrica enfrentado el intervalo *post mortem* frente a los distintos parámetros estratificados para cada una de las causas. Para rechazar la hipótesis nula la mayor

significación obtenida para el test K-W fue de 0.078. La ausencia de relación entre el intervalo *post mortem* y los parámetros se confirmó con una correlación tanto de Pearson como Spearman con coeficiente de 0.06 y 0.014, respectivamente lo cual nos valida los intervalos de toma de muestra para todos los casos (datos no mostrados).

3.2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ISOENZIMAS CARDÍACAS.

Se ha comparado la expresión de isoformas e isoenzimas en suero y líquido pericárdico en función de la causa de muerte, tal y como se muestra en la tabla 1. Encontramos diferencias estadísticamente significativas (P=0.025) para la isoforma MBmb2 en suero lo que permite diferenciar entre causa de muerte por asfixia por sumersión frente a traumatismo mediante comparaciones múltiples (P=0.010, prueba U de Mann-Whitney). En líquido pericárdico también los niveles de MBmb2 fueron estadísticamente significativos (P=0.002) permitiendo distinguir en las comparaciones múltiples entre la causa de muerte por infarto y la asfixia por sumersión (P=0.004) y por otras causas de muerte natural (P=0.039) (prueba U de Mann-Whitney) (tabla 2) (figura 1).

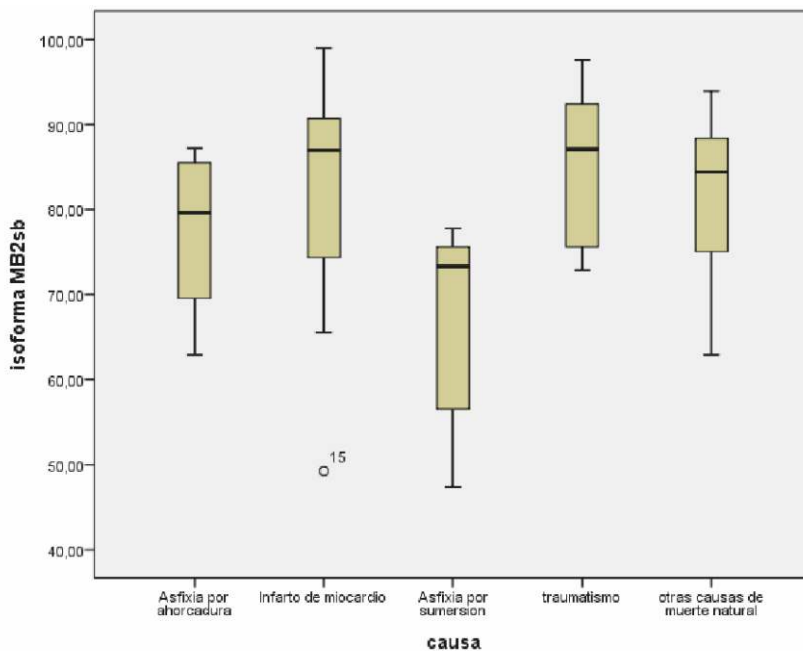
Variable	Asfixia por ahorcadura	Infarto de miocardio	Asfixia por sumersión	Traumatismo	Otras causas muerte natural	X ²	Valor de P
ckmbs	48.2 (18.1-189.4)	69.3 (17.2-171.0)	20.7 (9.8-33.0)	178.5 (34.3-317.5)	42.4 (16.8164.5)	10.517	.033
ckmblp	54.8 (0.40-128.7)	261.3 (125.8-819.0)	29.4 (22.6-65.4)	110.8 (9.7-301.5)	51.1 (14.6-176.9)	20.941	<.001
trops	6.3 (0.05-12.9)	0.58 (0.12-8.17)	0.09 (0.05-0.14)	0.18 (0.05-1.6)	0.40 (0.05-0.90)	8.156	0.091
troplp	2.6 (0.67-10.1)	51.4 (5.9-431.4)	5.1 (0.15-28.0)	6.9 (1.5-37.9)	1.8 (1.2-6.7)	20.378	<.001
isoforma MB2s	42.0 (13.3-156.2)	51.4 (13.6-152.6)	14.5 (7.1-22.2)	154.6 (29.9-244.5)	37.1 (12.0-152.5)	11.155	.025
isoforma MB1s	6.2 (4.2-40.6)	6.8 (2.6-27.5)	4.9 (2.7-11.4)	15.2 (4.8-79.3)	6.5 (3.4-15.6)	3.016	.555
isoforma MB mb2lp	46.4 (0.34-111.0)	221.2 (93.9-767.2)	24.6 (18.0-60.7)	102.2 (12.7-265.5)	44.2 (12.1-147.9)	16.452	.002
isoforma MB mb 1 lp	2.6 (0.11-21.5)	47.1 (12.3-150.1)	4.4 (3.3-6.9)	8.1 (4.0-34.7)	5.4 (2.9-21.5)	18.184	.001

TABLA 1: Comparación de la expresión de isoenzimas e isoformas enzimáticas en función de la causa diagnóstica (Prueba de Kruskal-Wallis). Valores de los biomarcadores expresados en mediana (rango intercuartílico) Lp = líquido pericárdico; s= suero.

TABLA 2: Comparaciones dos a dos entre causas diagnósticas de la expresión de isoenzimas, isoformas enzimáticas y marcadores cardiacos (Test de la U de Mann-Whitney). Lp = liquido pericárdico; s= suero.

		Infarto de miocardio	Asfixia por	Traumatismo	Otras causas de muerte natural
Asfixia por ahorcadura	Ckmb s	1.000	1.000	1.000	1.000
	Ckmb lp	0.031	1.000	1.000	1.000
	Trop lp	0.044	1.000	1.000	1.000
	Isoforma MB2 s	1.000	1.000	1.000	1.000
	Isoforma MB mb2 lp	0.083	1.000	1.000	1.000
	Isoforma MB mb1 lp	0.083	1.000	1.000	1.000
Infarto de miocardio	Ckmb s	-	0.088	1.000	1.000
	Ckmb lp	-	0.002	0.503	0.004
	Trop lp	-	0.019	0.230	0.003
	Isoforma MB2 s	-	0.243	0.569	1.000
	Isoforma MB mb2 lp	-	0.004	1.000	0.039
	Isoforma MB mb1 lp	-	0.005	0.354	0.031
Asfixia por sumersión	Ckmb s		-	0.028	0.117
	Ckmb lp		-	0.309	1.000
	Trop lp		-	0.849	1.000
	Isoforma MB2 s		-	0.010	0.588
	Isoforma MB mb2 lp		-	0.682	1.000
	Isoforma MB mb1 lp		-	0.275	1.000
Traumatismo	Ckmb s			-	1.000
	Ckmb lp			-	1.000
	Trop lp			-	0.332
	Isoforma MB2s			-	1.000
	Isoforma MB mb2 lp			-	1.000
	Isoforma MB mb1 lp			-	1.000

FIGURA 1: Valores de expresión de la isoforma MB2 en función de la causa de muerte.



Aproximación al diagnóstico de causa de muerte mediante el estudio de marcadores bioquímicos cardiacos. PELEGRINA JIMÉNEZ A. et al.

Idéntico resultado se obtuvo al evaluar la isoforma de MBmb1 en líquido pericárdico ($P=0.001$, test K-W) que tras la corrección mediante las comparaciones múltiples a través de la prueba U de Mann-Whitney permitió establecer diferencias significativas entre IAM y muerte por asfixia por sumersión ($P=0.005$) y otras causas de muerte natural ($P=0.031$) (tabla 2).

La combinación de los niveles de expresión de isoformas cardíacas MBmb2s, MBmb2lp y MBmb1lp permitieron establecer diferencias entre las muertes por asfixia por sumersión frente a IAM y traumatismo, así como los fallecimientos por IAM frente a asfixias por sumersión y otras causas de muerte natural (todos $P<0.05$, tabla 2).

3.3. ANÁLISIS DE LOS BIOMARCADORES CARDÍACOS EN SUERO Y LÍQUIDO PERICÁRDICO.

Analizamos los tres marcadores cardíacos CK-MB, Mioglobina y cTnI en suero y líquido pericárdico frente a la categorización diagnóstica en función de la causa de la muerte, obteniendo valores significativos para CK-MB en suero entre las diferentes etiologías de muerte ($P=0.033$, test K-W). Realizamos comparaciones por pares múltiples a través de la prueba U de Mann-Whitney, indicando que las diferencias de expresión se establecieron entre la causa de muerte por traumatismo y asfixia por sumersión ($P=0.001$). Adicionalmente, la CK-MB en líquido pericárdico mostró expresión con diferencias estadísticas entre las causas de muerte ($P=0.000$, test K-W). Nuevamente mediante comparaciones múltiples a través de la prueba U de Mann-Whitney por parejas, encontramos que la expresión de CK-MB en infarto de miocardio fue mayor de manera estadísticamente significativa comparado con la expresión en asfixia por ahorcadura, ($P=0.031$), asfixia por sumersión ($P=0.002$), y otras causas de muertes naturales ($P=0.004$). Finalmente, la cTnI en líquido pericárdico también mostró expresión con diferencias estadísticas entre las causas de muerte ($P=0.000$, test K-W), que corregido con las comparaciones múltiples a

través de la prueba U de Mann-Whitney para comparación entre parejas, indicó que la expresión de CK-MB en infarto de miocardio fue mayor de manera estadísticamente significativa comparado con la expresión en asfixia por ahorcadura ($P=0.044$), asfixia por sumersión ($P=0.019$) y otras causas de muertes naturales ($P=0.003$), tablas 1 y 2.

4. DISCUSIÓN.

El establecimiento de la causa fundamental del fallecimiento, así como al esclarecimiento de las circunstancias que lo rodearon, puede resultar muy complicado en algunos casos utilizando sólo los datos obtenidos a partir del análisis morfológico durante la autopsia. En las muertes por IAM, existen lesiones macroscópicas que permiten establecer el diagnóstico de forma inequívoca, como por ejemplo la rotura del tabique interventricular, trombosis y oclusión total de la luz en arterias coronarias, establecimiento claro de una zona necrótica, etc. Sin embargo, en la práctica son muchos los cadáveres en los que no son evidentes esos signos. En estos casos es donde adquieren todo su valor las técnicas diagnósticas complementarias, destacando los exámenes morfoestructurales y la determinación de los niveles de los marcadores cardíacos bioquímicos, cuyo análisis ha sido el objeto del presente trabajo.

El fin último de todas estas exploraciones complementarias y de todas las restantes técnicas empleadas durante la realización de la autopsia es llegar a la certeza objetiva de la causa del fallecimiento, llamada por algunos autores “certeza física”, entendiéndose como tal aquella que es “capaz de ser medida y de dar a conocer el tanto por ciento de sus probabilidades de error” [29,30]. Es por ello que se debe profundizar más en la búsqueda de marcadores bioquímicos que actúen como indicadores de sufrimiento cardíaco. Éstos podrán complementar el resto de hallazgos de la necropsia y así conducirnos al establecimiento de la certeza física en el diagnóstico *post mortem* de infarto agudo de miocardio.

Una vez realizada la determinación de los biomarcadores seleccionados, nos planteamos evaluar la validez del estudio, en relación a aquellos parámetros que pudieran tener alguna influencia en el valor con de estos biomarcadores. Pudimos descartar cualquier efecto debido al el intervalo *post mortem*. Además, se valoró que la edad y el sexo no tuvieran relación con los parámetros estudiados, sin encontrar ninguna relación. En este sentido, hay que destacar que todos los cadáveres tenían una data conocida que oscilaba entre 5 y 24 horas con una media de 15.27 ± 5.67 horas y que los cadáveres se mantuvieron refrigerados a 4°C desde el momento de su recepción en el Instituto de Medicina Legal hasta la realización de la autopsia. En trabajos realizados por Pérez-Cárceles et al. [31,32] y Osuna et al. [33,34], se analizó la posible interferencia introducida por los fenómenos autolíticos en las concentraciones de marcadores bioquímicos cardíacos utilizados en el diagnóstico *post mortem* y no se observa una correlación significativa entre la data de la muerte y las concentraciones de los diferentes marcadores en cadáveres conservados y con datas inferiores a 72 horas. A la vista de estos resultados, podemos concluir que nos encontramos ante una data idónea, a la que se une la refrigeración del cadáver en la sala de autopsias, lo que nos puede permitir obtener conclusiones válidas sobre el comportamiento de los marcadores y estudios analizados.

En relación a los biomarcadores evaluados, en el líquido pericárdico tanto la CKMB como cTnI, permitieron diferenciar entre infarto de miocardio y el resto de los grupos (asfixias por ahorcamiento, sumersión y otras causas de muerte natural) salvo traumatismos. El valor del porcentaje sobre el total de las isoformas MBmb1, del MBmb2 en líquido pericárdico diferenció infartos frente a asfixia por sumersión y otras causas de muerte natural. Por su lado, en suero la utilización de parámetros bioquímicos como CKMB, o el valor de la isoforma cardíaca MBmb2 sobre el Total de MB diferenciaron muertes por asfixia y por sumersión frente a traumatismos. Como hemos señalado, las troponinas cardíacas constituyen en la actualidad el criterio de referencia en el diagnóstico de laboratorio del infarto agudo de miocardio, debido a su alta eficacia diagnóstica. Las troponinas

cardioespecíficas muestran una muy alta sensibilidad y especificidad como marcadores de necrosis miocárdica, tanto en pacientes con o sin diagnóstico electrocardiográfico [35-37]. En los últimos años, la utilización de las troponinas séricas en el diagnóstico de los síndromes coronarios agudos ha aumentado, al demostrarse una mayor sensibilidad en relación a la fracción MB de la CK, que era el marcador tradicionalmente utilizado [38]. Su determinación ha mostrado también una gran utilidad como consecuencia de la gran ventana diagnóstica que provoca su liberación al torrente sanguíneo tras un IAM en pacientes que son ingresados en un hospital con síntomas inespecíficos o que los presentan numerosos días después del inicio de la sintomatología [39,40].

Se han descrito algunos problemas derivados del uso de la cTnI que se manifiestan en el hallazgo de diferencias en las concentraciones observadas de hasta 20 veces. Estas discrepancias pueden ser el resultado de la liberación de numerosos productos derivados de modificaciones de la cTnI presentes en el miocardio isquémico. En el miocardio humano la proteólisis de la cTnI es más intensa y compleja, en parte debido a la heterogeneidad de la enfermedad presente en una población determinada. El significado de esta liberación de productos modificados no ha sido investigado, a pesar de la posible importancia clínica como un dato correlacionado con la subsiguiente progresión de la enfermedad isquémica cardíaca [38]. Pagani et al. comparan el valor diagnóstico de la cTnI y la cTnT en una población no seleccionada ingresada en una unidad de Medicina General por diferentes patologías [38]. La elevación de ambas troponinas se asocia con la sensibilidad diagnóstica en el infarto agudo de miocardio, siendo del 100% para la cTnI y del 98% para la cTnT, y la especificidad es también un poco más elevada para la cTnI (78.7%) que para la cTnT (68.1%) [38]. Concluyen que se obtiene una eficacia diagnóstica comparable entre la cTnI y la cTnT. Ooi et al. [20] realizaron un estudio *post mortem* en 66 cadáveres correlacionando muestras de suero *ante mortem* en las que determinan los valores de CK, CKMB, cTnI y cTnT y correlacionan los hallazgos con los

resultados obtenidos tras el análisis *post mortem* del tejido cardíaco. Cuando son tenidas en cuenta todas las patologías cardíacas, las sensibilidades son 38%, 26%, 44% y 53% para CK, CKMB, cTnI y cTnT, respectivamente. La especificidad para la CK es del 80% y para el resto de los marcadores del 100%. Para el infarto agudo de miocardio las especificidades para la CK, CKMB, cTnI y cTnT son del 75%, 92%, 87% y 73%, respectivamente. La sensibilidad clínica para el infarto agudo de miocardio es del 22%, 19%, 48% y 62%, respectivamente.

Apple et al. [41,42]. evalúan la sensibilidad y especificidad diagnóstica de diferentes marcadores bioquímicos utilizados en servicios de urgencia (mioglobina, creatin kinasa masa, cTnI y CK total masa) en sangre total en pacientes que presentan dolor torácico, para confirmar o descartar un infarto de miocardio. Con un intervalo de confianza del 95% obtienen las sensibilidades y especificidades en los puntos de corte siguientes: para la cTnI con un punto de corte de 0.4 µg/L obtienen una sensibilidad del 93% y una especificidad del 94%; para la CKMB un punto de corte de 7.0 µg/L, y una sensibilidad y especificidad del 90% y 90% respectivamente y finalmente para la CK total con niveles de 190 µg/L una sensibilidad del 86% y una especificidad del 86%.

Así pues, los hallazgos de los diferentes estudios consultados confirman la mayor sensibilidad clínica de las troponinas séricas sobre la CK y CKMB en los síndromes coronarios agudos. En muchos de los pacientes con incrementos “borderline” de las concentraciones de troponina sérica se observan pequeños microinfartos *post mortem*. Cina et al. [19] analizan la utilidad de la cTnT como test diagnóstico cualitativo en la sala de autopsias.

Ooi et al. [20] demostraron una correlación entre los niveles de CK-MB, cTnI y cTnT y cambios histológicos cardíacos significativos en autopsias de pacientes sin clínica de IAM. Cina et al. [19] demostraron que la determinación de cTnT cardíaca podría discriminar si la víctima de un accidente de tráfico ha sido causada por un

IAM siempre y cuando no hubiera lesiones torácicas.

Una posible explicación a las diferencias encontradas en las concentraciones séricas entre los diferentes grupos en los que hemos categorizado nuestro estudio viene determinada por las características del parámetro bioquímico que se libera como expresión de la lesión muscular. En estudios previos, realizados por el grupo de investigación del Área de Medicina legal y Forense de la Universidad de Murcia la cTnI presenta una alta sensibilidad además de una elevada especificidad para el diagnóstico clínico del infarto agudo de miocardio, por lo que sus mayores concentraciones se encuentran en sujetos fallecidos por esta patología [43,44]. Estos autores concluyen sobre el valor diagnóstico que posee la determinación de marcadores bioquímicos en los fluidos del cadáver para descartar una muerte de etiología cardíaca, dada la gran especificidad diagnóstica que presentan.

En nuestro caso cuando estudiamos los valores en suero de CK-MB, encontramos que solo las asfixias por sumersión presentan valores muy bajos en relación al resto, mostrando una significación estadística con la prueba U de Mann-Whitney en la comparación de parejas frente a traumatismo con $P=0.028$ y significación marginal para infarto de miocardio con $P=0.088$. La determinación de las isoenzimas e isoformas cardíacas, ha caído en desuso desde el uso de las troponinas. De hecho, en las guías de la tercera definición de Infarto de Miocardio de la “ESC/ACCF/AHA/WHF Expert Consensus Document” se desaconseja ya su uso por obsoleto. Sin embargo, para el objetivo de nuestro estudio se mostró eficaz su determinación para nuestra aplicación de diferenciar en suero asfixia por sumersión frente a traumatismo con el porcentaje de la fracción MBmb2 sobre MB total en suero. Además, el porcentaje de las isoformas MBmb1 y MBmb2 en líquido pericárdico diferenciaría IMA frente a asfixia por sumersión y otras causas de muerte natural.

Por todo ello, nuestro trabajo nos permite establecer las siguientes conclusiones:

- Los fenómenos autolíticos no interfieren significativamente en las concentraciones de los marcadores bioquímicos analizados en el período *post mortem* utilizado.
- Los valores de CK-MB y de la isoforma cardíaca MBmb2 en suero pueden ayudar a diferenciar las muertes por asfixia por sumersión de las muertes a consecuencia de traumatismos.
- La determinación de troponina I en líquido pericárdico y CK-MB en suero y líquido pericárdico han mostrado un rendimiento diagnóstico *post mortem* para diferenciar causas de muerte de origen cardíaco de otras causas de muerte, excepto para las de origen traumático
- El comportamiento de las isoformas enzimáticas MBmb1 y MBmb2 en líquido pericárdico es muy semejante para apoyar el diagnóstico diferencial *post mortem* de la causa de muerte de origen cardíaco, separándola de otras causas de muerte, excepto en muertes de etiología traumática y asfixias por ahorcadura.

En nuestra opinión las pruebas bioquímicas siempre deben ser complemento de una investigación exhaustiva del cadáver y en ningún momento se puede obviar la realización de una autopsia completa del cadáver que incluya un estudio bioquímico cuando surjan dudas en relación a la causa de la muerte. Sin duda alguna, el estudio que hemos realizado en el que concurren la determinación de diferentes marcadores bioquímicos que muestran porcentajes de sensibilidad y especificidad diferentes y el análisis macroscópico y microscópico que una autopsia completa podría reducir sensiblemente el número de casos en los que la interpretación de la causa de la muerte y las circunstancias que la acompañan es compleja.

BIBLIOGRAFÍA.

1. CAMPUZANO O, ALLEGUE C, PARTEMI S, IGLESIAS A, OLIVAA, BRUGADAR. Negative autopsy and sudden cardiac death. *Int J Legal Med.* 2004; 128:599–606.
2. BAYÉS DE LUNAA, ELOSUAR. Sudden death. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2012; 65(11):1039-1052. doi:10.1016/j.recesp.2012.03.032.

3. DE ASMUNDIS C, BRUGADA P. Epidemiology of Sudden Cardiac Death. *Rev Esp Cardiol.* 2013; 13(A): 2-6.
4. PRIORI SG, BLOMSTRÖM-LUNDQVIST C, MAZZANTI A, BLOM N, BORGGREFE M, CAMM J. Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC). 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Europace.* 2015; 17(11): 1601-168.
5. SANDRITTER W. Pathologic anatomy of shock. *Dtsch Med J.* 1967 Jul 5;18(13):408-411.
6. GOULD L, ZAHIR M, CALDER B, LYON AF. Nonobstructive primary myocardial disease. Hemodynamic studies in fourteen cases. *Am J Cardiol.* 1968 Oct;22(4):523-531.
7. SHOEN FJ. el corazón en patología funcional y estructural. *K. V. C. T. R. Cotran RS ediciones McGraw-Hill interamericana* 2000; 571- 631.
8. KNIGHT B, Chest an abdominal injuric. In *Forensic Pathology.* Edward Arnold ed. London 1996; pp. 217-230.
9. CAMPUZANO O, ALLEGUE C, PATERMI S, IGLESIAS A, OLIVAA, BRUGADA R. Negative autopsy and sudden cardiac death. *Int J Legal Med.* 2014; 128:599-606.
10. MADEA B, MUSSHOF F. Postmortem biochemistry. *Forensic Science International.* 2007; 165: 165-171.
11. COE, J. Post-mortem chemistry update. Emphasis on forensic application. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 14, 91–117 (1993).
12. BELSEY, S. L. & FLANAGAN, R. J. Post-mortem biochemistry. Current applications. *J. Forensic Leg. Med.* 41, 49–57 (2016).
13. MADEA, B. Is there recent progress in the estimation of the post-mortem interval by means of thanatochemistry? *Forensic Sci. Int.* 151, 139–149 (2005).
14. WOYDT, L., BERNHARD, M., KIRSTEN, H. et al. Intra-individual alterations of serum markers routinely used in forensic pathology depending on increasing post-mortem interval. *Sci Rep* 8, 12811 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31252-5>.
15. GONZÁLEZ-HERRERA L, VALENZUELA A, RAMOS V, BLÁZQUEZ A, VILLANUEVA E. Cardiac troponin T determination by a highly sensitive assay in postmortem serum and pericardial fluid. *Forensic Sci Med Pathol.* 2016; 12: 181-188.

16. OSUNA E, PÉREZ-CÁRCELES MD, VIEIRA DN, LUNA A. Distribution of biochemical markers in biologic fluids: application to the postmortem diagnosis of myocardial infarction. *Am J Forensic Med Pathol.* 1998; 19(2): 123-128.
17. OSUNA E, PÉREZ-CÁRCELES MD, ALVAREZ MV, NOGUERA J, LUNAA. Cardiac troponin I (cTnI) and the postmortem diagnosis of myocardial infarction. *Int J Legal Med.* 1998; 111(4): 173-176.
18. BAÑÓN R, HERNÁNDEZ-ROMERO D, NAVARRO E, PÉREZ-CÁRCELES MD, NOGUERA-VELASCO JA, OSUNA E. Combined determination of B-type natriuretic peptide and high-sensitivity troponin I in the postmortem diagnosis of cardiac disease. *Forensic Science, Medicine and Pathology.* 2019; 15(4): 528-535.
19. CINA SJ, BROWN DK, SMIALEK JE, COLLINS KA. A rapid postmortem cardiac troponin T assay: laboratory evidence of sudden cardiac death. *Am J Forensic Med Pathol.* 2001; 2: 173-176.
20. OOI DS, ISOTALO PA, VEINOT JP. Correlation of antemortem serum creatine kinase, creatine kinase-MB, troponin I, and troponin T with cardiac pathology. *Clin Chem.* 2000 Mar; 46(3): 338-44.
21. PALMIERE C, TETTAMANTI C, BONSIGNORE A, et al. Cardiac troponins and NT-proBNP in the forensic setting: Overview of sampling site, postmortem interval, cardiopulmonary resuscitation, and review of the literature. *Forensic Sci Int.* 2018; 282: 211-218. doi:10.1016/j.forsciint.2017.11.034.
22. BATALIS NI, MARCUS BJ, PAPADEACN, COLLINS KA. The role of postmortem cardiac markers in the diagnosis of acute myocardial infarction. *J Forensic Sci.* 2010; 55(4): 1088-1091. doi:10.1111/j.1556-4029.2010.01368.x.
23. VOGIATZIDIS K, ZAROGIANNIS SG, AIDONIDIS I, et al. Physiology of pericardial fluid production and drainage. *Front Physiol.* 2015; 6: 62. Published 2015 Mar 18. doi:10.3389/fphys.2015.00062.
24. CASTELLÁ J, MEDALLO J, MARRÓN T. Medicolegal Consideration in Sudden Cardiac Death. *Rev Esp Cardiol.* 2013 Supl13: 30-39
25. MICHAUD K, BASSO C, D'AMATI G, GIORDANO C, KHOLOVÁ I, PRESTON SD, et al. Diagnosis of myocardial infarction at autopsy: AECVP reappraisal in the light of the current clinical classification. *Virchows Arch [Internet].* 2020; 476(2): 179-194. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7028821>
26. BASSO C, BURKE M, FOMES P, GALLAGHER PJ, DE GOUVEIA RH, SHEPPARD M, THIENE G, VAN DER WAL A. Association for European Cardiovascular Pathology 2010 Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Pathologica* 2010 Oct; 102(5): 391-404
27. OLIVA A, BRUGADA R, D'ALOJA E, BOSCHI 1, PARTEMI S, BRUGADA J, PASCALI VL State of the art in forensic investigation of sudden cardiac death. *Am J Forensic Med Pathol.* 2011 Mar; 32(1): 1-16.
28. THYGESEN K, ALPERT JS, JAFFE AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018) [published correction appears in *Circulation.* 2018 Nov 13; 138(20): e652]. *Circulation.* 2018; 138(20): e618-e651. doi:10.1161/CIR.0000000000000617.
29. GISBERT, J.A., VERDU F.A., Autopsia médico-legal. In *Medicina Legal y Toxicología. Gisbert Calabuig JA ed (Barcelona: Masson) 1989 pp. 119-243*
30. GISBERT, J.A., VILLANUEVA E., Procesos destructores del cadáver. In *Medicina Legal y Toxicología. Gisbert Calabuig JA ed (Barcelona: Masson) 1989 pp. 172-185*
31. PÉREZ-CÁRCELES MD, OSUNA E, VIEIRA DN, LUNA A. Usefulness of myosin in the post mortem diagnosis of myocardial damage. *Int J Legal Med.* 1995a; 108(1): 14-18.
32. PÉREZ-CÁRCELES MD, OSUNA E, VIEIRA DN, MARTÍNEZ A, LUNA A. Biochemical assessment of acute myocardial ischaemia. *J Clin Pathol.* 1995b Feb; 48(2): 124-128.
33. OSUNA E, PÉREZ-CÁRCELES MD, GARCÍA-LORENTE A, SÁNCHEZ-HANKE M, VIEIRA DN, CARVALHO L, PÜSCHEL K, LUNAA. Lipid peroxidation in lung tissue after chest trauma and correlation with the duration of the post-trauma survival period. *Int J Legal Med.* 1998b 111(5): 256-260.
34. OSUNA E, VIVERO G, CONEJERO J, ABENZA JM, MARTÍNEZ P, LUNA A, PÉREZ-CÁRCELES MD. Post mortem vitreous humor beta-hydroxybutyrate: its utility for the post mortem interpretation of diabetes mellitus. *Forensic Sci Int.* 2005 Oct; 153(2-3): 189-195.
35. HILLIS GS., FOX KAA. Cardiac troponins in chest pain. Can help in risk stratification. *Br Med J.* 1999; 319: 1451-1452.
36. WU AHB., APPLE FS., GIBLER WB., JESSE RL., WARHSAW MM., VALDÉS R Jr. National Academy of Clinical Biochemistry standards of laboratory practice: recommendations for use of cardiac markers in coronary artery diseases. *Clin Chem.* 1999; 45: 1104-1121
37. GERHARDT TW., LJUNGDAHL L. TROPONIN T. A sensitive and specific prognostic marker of myocardial damage. *Clin Chem Acta.* 1998; 272: 47-57.
38. PAGANI F., BONETTI G., PANTEGHINI M. Comparative study of cardiac troponin I and T measurements in a routine extra-cardiological clinical setting. *J Clin Lab Anal.* 2001; 15: 210-214.
39. PANTEGHINI M. Biochemical assesment of myocardial damage with new diagnostic tools. *Cardiologia.* 1999; 44: 419-425. Parks D.A., Granger D.N., Xanthine

- oxidase: biochemistry, distribution and physiology, *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 1986;548 87-99.
40. JAFFE AS., RAVKILDE J., ROBERTS R., NASLUND U., APPLE FS., GALVANI M., KATUS H. It's time for a change to a troponin standard. *Circulation*, 2000; 102: 1216-1220.
41. APPLE F, COLLINSON PO, IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Chem.* 2012; 58:54-61
42. APPLE FS., ANDERSON P., COLLINSON P., JESSE RL., KONTOS MC., LEVITT MA., MILLER EA., MURAKMI MM. Clinical evaluation of the first medical whole blood, point-of-care testing device for detection of myocardial infarction. *Clin Chem*, 2000; 46: 1604-1609
43. PÉREZ-CÁRCELES MD, NOGUERA J, JIMÉNEZ JL, MARTÍNEZ P, LUNAA, OSUNA E. Diagnostic efficacy of biochemical markers in diagnosis post-mortem of ischaemic heart disease. *Forensic Sci Int.* 2004 May;142(1):1-7
44. MARTÍNEZ DÍAZ. RODRÍGUEZ-MORLENSÍN F., M, PÉREZ-CÁRCELES M.D., NOGUERA J., LUNA A AND OSUNA E., Biochemical analysis and immunohistochemical determination of cardiac troponin for the post mortem diagnosis of myocardial damage. *Histol Histopathol* 2005 Apr; 20: 475-481