



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

**Avances Recientes en Técnicas
de Cronotanatodiagnóstico
hasta las 72 Horas**

David Pérez Delgado

Grado en Veterinaria
Año 2024

Modalidad del Trabajo: Revisión bibliográfica

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a David Pérez Delgado y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.



Resumen

El cronotanatodiagnóstico es la ciencia que estudia cómo estimar el intervalo *post mortem* (IPM), el tiempo que transcurre entre la muerte y el hallazgo del cadáver. Calcular el IPM es una de las principales labores a las que se enfrenta un forense y hacerlo de forma precisa requiere de un conocimiento muy amplio y profundo de las ciencias forenses.

Este trabajo recopila las técnicas y métodos utilizados en la estimación del IPM en animales hasta las 72 horas *post mortem* que aparecieron en las publicaciones científicas desde el 2019 hasta el 2024, excluyendo las técnicas entomológicas y microbiológicas debido a su extensión. No obstante, sí incluye un gran número de procedimientos que cuantifican cambios *post mortem* como, por ejemplo, pruebas de imagen, distintas tinciones histológicas en diversos órganos, examen del globo ocular, mediciones físicas, análisis bioquímicos, estudios en genómica y epigenética y sobre el fenómeno de la redistribución *post mortem* de fármacos y tóxicos.

Las técnicas incluidas son marcadamente innovadoras, por lo que, en muchos casos, aún faltan más estudios que corroboren sus resultados y su aplicabilidad. Por otro lado, la mayoría de los estudios tienen la intención de aplicar sus hallazgos a la medicina forense humana; por ello, es esencial para la veterinaria forense que la investigación no solo considere los factores ambientales e individuales que influyen en las mediciones, sino que también se validen los procedimientos en las diferentes especies de interés veterinario.

En conclusión, la diversidad de técnicas encontrada tiene como objetivo adaptarse a distintos contextos, puesto que cada una posee unas ventajas y limitaciones. La tendencia actual en la investigación se centra en la cuantificación objetiva de datos y en dos enfoques principales: el desarrollo de tecnologías portátiles para uso inmediato en la escena del crimen y la creación de modelos matemáticos y computacionales para estimaciones precisas del IPM.

Palabras clave: cambios *post mortem*, cronotanatodiagnóstico, intervalo *post mortem*, tiempo desde la muerte, veterinaria forense

Resumo

O cronotanatodiagnóstico é a ciencia que estuda como estimar o intervalo *post mortem* (IPM), o tempo que transcorre entre a morte e o achado do cadáver. Calcular o IPM é un dos principais labores ás que se enfronta un forense e facelo de forma precisa require dun coñecemento moi amplo e profundo das ciencias forenses.

Este traballo recompila as técnicas e métodos utilizados na estimación do IPM en animais ata as 72 horas *post mortem* que apareceron nas publicacións científicas desde o 2019 ata o 2024, excluindo as técnicas entomolóxicas e microbiolóxicas debido á súa extensión. Non obstante, si inclúe un gran número de procedementos que cuantifican cambios *post mortem* como, por exemplo, probas de imaxe, distintas tinguaduras histolóxicas en diversos órganos, exame do globo ocular, medicións físicas, análises bioquímicos, estudos en xenómica e epixenética e sobre o fenómeno da redistribución *post mortem* de fármacos e tóxicos.

As técnicas incluídas son marcadamente innovadoras, polo que, en moitos casos, aínda faltan máis estudos que corroboren os seus resultados e a súa aplicabilidade. Por outro lado, a maioría dos estudos teñen a intención de aplicar os seus achados á medicina forense humana; polo tanto, é esencial para a veterinaria forense que a investigación non só considere os factores ambientais e individuais que inflúen nas medicións, senón que tamén se validen os procedementos nas diferentes especies de interese veterinario.

En conclusión, a diversidade de técnicas atopada ten como obxectivo adaptarse a distintos contextos, posto que cada unha posúe unhas vantaxes e limitacións. A tendencia actual na investigación céntrase na cuantificación obxectiva de datos e en dous enfoques principais: o desenvolvemento de tecnoloxías portátiles para uso inmediato na escena do crime e a creación de modelos matemáticos e computacionais para estimacións precisas do IPM.

Palabras chave: cambios *post mortem*, cronotanatodiagnóstico, intervalo *post mortem*, tempo transcorrido desde a morte, veterinaria forense

Abstract

Chronotanodiagnosis is the science that studies how to estimate the *post mortem* interval (PMI), the time that elapses between death and the discovery of the corpse. Calculating the PMI is one of the main tasks a forensic scientist faces, and doing so accurately requires a very broad and deep knowledge of forensic sciences.

This study compiles the techniques and methods used in estimating the PMI in animals up to 72 hours *post mortem* that appeared in scientific publications from 2019 to 2024, excluding entomological and microbiological techniques due to their extent. However, it does include a large number of procedures that quantify *post mortem* changes such as, for example, imaging tests, different histological stains in various organs, examination of the eyeball, physical measurements, biochemical analyses, studies in genomics and epigenetics, and on the phenomenon of *post mortem* redistribution of drugs and toxins.

The included techniques are remarkably innovative, so in many cases, more studies are still needed to corroborate their results and applicability. On the other hand, most studies intend to apply their findings to human forensic medicine; therefore, it is essential for forensic veterinary medicine that research not only considers the environmental and individual factors that influence measurements, but also validates the procedures in different species of veterinary interest.

In conclusion, the diversity of techniques found aims to adapt to different contexts, since each one has its advantages and limitations. The current trend in research focuses on the objective quantification of data and on two main approaches: the development of portable technologies for immediate use at the crime scene and the creation of mathematical and computational models for precise PMI estimates.

Keywords: postmortem changes, chronotanodiagnosis, postmortem interval, time since death, veterinary forensics

Índice

Índice de figuras	7
Abreviaturas	9
Introducción y objetivos.....	10
Metodología	13
Exposición del tema	14
<i>Rigor mortis</i> y elastografía por ultrasonidos	14
Tomografía computarizada	15
Resonancia magnética	16
Histología.....	17
Corazón	17
Encéfalo.....	18
Estómago, intestino delgado e intestino grueso.	19
Hígado	19
Músculo esquelético.....	20
Páncreas.....	21
Piel.....	21
Riñón	22
Tendón.....	22
Testículo.....	23
Examen del globo ocular.....	23
Opacidad corneal.....	23
Humor vitreo	24
Humor acuoso	25
Retina	26
pH en músculo.....	28
Luminometría.....	28
Marcadores de estrés oxidativo	29

Proteómica.....	29
Tropomiosina, desmina, vinculina, GAPDH y eEF1A2	29
Mioglobina	30
Proteínas de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1).....	30
Proteína Fosfatasa 2A (PP2A).....	31
Proteínas totales en hígado y bazo	31
Genómica y epigenética	31
ADN libre en sangre periférica	31
Fragmentación del ADN	32
ARN mensajero.....	32
MicroARN.....	34
Redistribución <i>post mortem</i>	34
Conclusiones	36
Bibliografía	37

Índice de figuras

Figura 1. Esquema del proceso de selección de publicaciones. _____	13
Figura 2. Elastografía de músculo masetero de cerdo en distintos IPM. Ecografía en modo B a la izquierda y superposición de elastografía en lado derecho. La medición de la rigidez se obtiene de los cinco círculos que se encuentran sobre el músculo (Kliwer et al., 2021). _____	15
Figura 3. Medición de CDA en músculo de cerdo en el momento de muerte (a) y a las 36 horas post mortem (b) (Sapienza et al., 2020). _____	16
Figura 4. Corazón de rata a diferentes IPM. Se observan espacios dilatados (★), fibras onduladas (flechas en b), capilar congestivo (flecha en d) y cambios post mortem de los núcleos (cabezas de flecha). HE 400x (Welson et al 2021). _____	18
Figura 5. Gráfico lineal representando los valores medios de la colorimetría para Caspasa 9 (verde) y Caspasa 3 (azul) de las tinciones inmunohistoquímicas realizadas a distintos IPM en músculo esquelético (A) y músculo cardiaco (B) (Mondello et al., 2021). _____	18
Figura 6. Hígado de rata a diferentes IPM. Glucógeno (flechas verdes); membrana celular (flechas amarillas) HE. Barra de 50 µm (Garczyńska et al., 2021). _____	19
Figura 7. Hígado de caballo a las 60 horas. Epitelio del conducto biliar separado de la membrana basal (flechas) HE. 400× (Wenzlow et al., 2021). _____	20
Figura 8. Músculo estriado de caballo. Hipereosinofilia en fibras musculares (*); interrupciones en las fibras (flechas). HE 200x (Wenzlow et al., 2021). _____	20
Figura 9. Músculo de perro a distintos IPM. PAS 20x (Piegari et al., 2023). _____	21
Figura 10. Riñón de rata a diferentes IPM. Glomérulo (G), espacio de Bowman (B), túbulo contorneado proximal (P) y distal (D), congestión peritubular (flechas en a-d), necrosis tubular (flechas en e-f), cilindros de hialina (★) e hialinización masiva. HE 400x (Welson et al 2021). _____	22
Figura 11. Testículo de rata a diferentes IPM. Desprendimiento del epitelio (flechas en d-e), ruptura de uniones celulares (flechas en g), vacuolización (V) y material hialino (H). HE 100x (Welson et al 2021). _____	23
Figura 12. Esquema del sistema fotográfico usado por Zheng et al (2021). _____	24
Figura 13. Mapa de calor mostrando la correlación positiva (verde) y negativa (rojo) en distintos metabolitos y el efecto del IPM (PMI), mantener el ojo abierto durante el periodo post mortem (EYE) y el efecto combinado ambos (PMI+EYE) (Locci et al., 2019). _____	26
Figura 14. Retina de ratón inmediatamente después de la muerte en fijador de Davidson. HE. Barra de 60 µm (Finnie et al., 2021). _____	27
Figura 15. Retina de ratón inmediatamente después de la muerte en fijador de Davidson. HE. Barra de 30 µm (Finnie et al., 2021). _____	27
Figura 16. Homogeneización e hipereosinofilia del OS. HE. Barra de 30 µm (Finnie et al., 2021). _____	27

<i>Figura 17. Curva de pH en músculo de cerdo en función del IPM (Zhu et al., 2021).</i>	28
<i>Figura 18. Patrones de degradación en western blot de la tropomiosina (a), la desmina (b) y la vinculina (c) en rata (Choi et al., 2019).</i>	30
<i>Figura 19. Gráfico de barras comparando valores de ADN libre en ratas diferenciando por temperatura de conservación del cadáver (Emiral et al, 2021).</i>	31
<i>Figura 20. Ensayo cometa de músculo de rata a diferentes IPM (Mostafa et al., 2023).</i>	32
<i>Figura 21. Patrones de expresión genética, en función del IPM, de Casp3 (a), Bax (b) y Bcl2 (c). En el eje de ordenadas está representada la expresión relativa del gen y en el de abscisas el IPM (Noshy, 2021).</i>	33

Abreviaturas

1H-RMN: Resonancia magnética nuclear de protones o espectroscopia de resonancia magnética nuclear

ATP: Adenosín trifosfato

CDA: Coeficiente de difusión aparente

Ct: Valor umbral de ciclos o *cycle threshold*

FA: Anisotropía fraccional

GCL: Células ganglionares

GSH: Glutati6n reducido

HE: Hematoxilina-eosina

HMGB1: Proteínas de alta movilidad del grupo 1 o *high mobility group box 1 protein*

INL: Capa nuclear interna

IPM: Intervalo *post mortem*

IS: Segmento interno de bastones de los fotorreceptores

MDA: Malondialdehido

ONL: Capa nuclear externa

OS: Segmento externo de bastones de los fotorreceptores

PAS: Tinci6n con 6cido pery6dico de Schiff

PP2A: Proteína Fosfatasa 2A

PS: Segmentos de los fotorreceptores

RPE: Epitelio pigmentario retinal

RTM: Ratio de transferencia de magnetizaci6n

SOD: Super6xido dismutasa

UH: Unidades Hounsfield

Introducción y objetivos

En la sociedad actual cada vez hay una mayor sensibilidad respecto al maltrato animal y, por ello, se demanda que quienes cometan actos de crueldad o negligencia hacia los animales rindan cuentas ante la ley. Sin embargo, la mayoría de los veterinarios no han recibido formación formal en el reconocimiento de casos de maltrato animal como parte de su educación de grado universitaria (Balkin *et al.*, 2012).

El papel del veterinario es esencial en la investigación, evaluación y procesamiento de delitos sospechosos contra los animales; sin embargo, la formación en ciencias forenses suele ser adquirida por formación continuada o libros de texto específicos y no se adquiere a lo largo de los estudios de grado (Balkin *et al.*, 2012). De la misma forma que se llevan a cabo las investigaciones de muertes medicolegales en casos humanos, es importante que los investigadores de casos animales recopilen toda la información necesaria para que el veterinario examine cualquier animal vivo o muerto. Tener un veterinario formado en ciencias forenses en el lugar de los hechos, funcionando de manera similar a un médico forense, ayuda a garantizar que se complete toda la información y documentación necesaria (Merck, 2012).

Los veterinarios forenses dependen de las evidencias encontradas en la escena del crimen (o la falta de ellas) para ayudar a determinar la causa próxima de la muerte/lesión, el mecanismo de la muerte, la forma de la muerte/lesión y, en último lugar, para establecer la tríada forense, que consiste en vincular a la víctima con un sospechoso y conectarlos a una escena del crimen (Merck, 2012), esto se basa en el principio de intercambio de Locard, que dice que todo contacto deja un rastro o huella y es tarea del forense identificar estos rastros (Payne-James *et al.*, 2013). Además de esto, se considera de relevancia crucial verificar que esa concurrencia sucede en el momento de la muerte o lesión tanto en investigaciones criminales como en los litigios civiles (Vij, 2011).

Un veterinario forense puede ser requerido en cualquier situación en que se sospeche un delito que involucre a un animal (Balkin *et al.*, 2012). Algunos ejemplos son la caza de animales fuera de temporada, la caza furtiva y otros delitos contra la fauna silvestre, la muerte de ganado durante el transporte, casos de negligencia por parte del tutor o de otro profesional veterinario, sospecha de malos tratos intencionados, reclamaciones fraudulentas a una aseguradora y otras actividades relacionadas con la ganadería (Munro & Munro, 2008; Sriraman, 2021). Cuando se encuentran varios animales en una escena se debe investigar si son resultado de un mismo evento o son parte de un proceso continuado en el tiempo (Munro & Munro, 2008).

El cronotanatodiagnóstico o tanatocronología es la ciencia que estudia cómo calcular el intervalo *post mortem* (IPM), tiempo que transcurre entre la muerte y el hallazgo del cadáver, principalmente a partir de cambios *post mortem* (Dell'Aquila *et al.*, 2021). Debe distinguirse del periodo de supervivencia, lapso de tiempo desde la lesión fatal hasta la hora de la muerte. Para

hallar el IPM se podrían utilizar métodos que requerirían de un conocimiento muy preciso de las condiciones ambientales durante el IPM, pero, debido a la complejidad que esto supondría, se recurre en ocasiones a una exploración física y la experiencia del patólogo. Como regla general, cuanto más largo es el IPM, más amplia es la estimación de la hora de la muerte (Dell'Aquila *et al.*, 2021; Merck & Miller, 2012). La investigación se centra en encontrar métodos cuantitativos basados en mediciones físicas o bioquímicas puntuales más que en la observación; en definitiva, que dependan menos de interpretaciones subjetivas. Un método reconocido que intentó cuantificar el cálculo del IPM con el uso de temperaturas y masa corporal en medicina humana sería el nomograma de Henssge (Dell'Aquila *et al.*, 2021).

En general, se puede subdividir al IPM en dos intervalos diferentes: el IPM temprano, entre la muerte y el inicio de la putrefacción, en general, antes de las primeras 24 horas, donde se dan los cambios *post mortem* tempranos; y el IPM tardío, periodo que sigue al inicio la putrefacción y se dan los cambios *post mortem* tardíos (Payne-James *et al.*, 2011; Vij, 2011). También es aceptado dividirlo por el momento en que la temperatura del cadáver alcanza el equilibrio con la del ambiente (Brooks & Sutton, 2018).

Esencialmente existen tres fuentes de información para determinar la hora de la muerte: evidencia anamnésica (basada en los hábitos, movimientos y actividades del fallecido), evidencia ambiental y asociada (presente en las cercanías del cuerpo) y evidencia corporal (presente en el cuerpo) (Merck & Miller, 2012).

La mayoría de los cambios *post mortem* están afectados por las condiciones ambientales, y los cambios que son más consistentes son los más útiles para determinar la hora de la muerte. Se distinguen dos tipos de métodos para estimar la hora de la muerte: de tasa o de concurrencia. El método de tasa se refiere a medir un cambio que ocurre a una velocidad conocida y que es iniciado o detenido por la muerte. Entre otros, incluye al *rigor mortis*, al *algor mortis* y a la putrefacción. El método de concurrencia compara la ocurrencia de eventos que tuvieron lugar en momentos conocidos alrededor de la hora de la muerte, como comer justo antes de la muerte (Merck & Miller, 2012).

Los principales métodos de estimación del IPM en la práctica veterinaria son métodos basados en la temperatura (*algor mortis*), los cambios corporales *post mortem* macroscópicos (*livor mortis* y *rigor mortis*, cambios en el globo ocular y procesos de putrefacción y descomposición), el estudio entomológico y la valoración del ambiente y escena del crimen. Aunque también están recogidos los estudios histológicos y de microscopía electrónica, de estimulación eléctrica y de cambios bioquímicos, entre otros (Sriraman, 2021).

Según Merck (2012), las principales tareas que ha de realizar un forense en la escena para ayudar a determinar el momento de la muerte son:

- Determinar el estado de rigor y lividez.
- Tomar la temperatura rectal de los animales muertos en la escena, con la excepción de los casos de abuso sexual con posible penetración rectal. Después, deben tomarse cada hora para establecer la tasa de enfriamiento o calentamiento para las condiciones ambientales.
- Anotar si el animal estaba a pleno sol, a la sombra, bajo alguna cubierta o expuesto, y si las condiciones cambiasen en diferentes momentos del día.
- Recoger la evidencia entomológica relacionada con el cuerpo o la escena.

Los objetivos que guían la elaboración de esta revisión bibliográfica son los siguientes:

1. Recopilar las técnicas que se encuentran en la literatura científica de los últimos 5 años para datar la muerte hasta las 72 horas *post mortem* en animales y examinar los resultados de cada estudio. Se excluyeron las técnicas entomológicas y microbiológicas debido a que, por su diversidad y extensión, requieren un estudio separado.
2. Reconocer las tendencias actuales en la investigación de la estimación del IPM
3. Identificar las especies animales empleadas en los estudios.
4. Determinar las áreas en las que debería centrarse la investigación en el futuro.

Metodología

A fin de alcanzar los objetivos, se realizó una revisión sistemática en las bases de datos *Sciencedirect*, *Scopus*, *Pubmed*, *Dialnet* y *Medline*. La búsqueda en las bases de datos se circunscribió a los últimos 5 años, siendo elegibles todos los artículos publicados desde el año 2019 en el que aparecieran los términos "cronotanodiagnóstico", "tiempo desde la muerte", "intervalo *post mortem*" y "data de la muerte"; para acotarla al ámbito veterinario debían contener los términos "animal" o "veterinaria"; y finalmente se excluyeron todos los que contenían "entomología" o "microbiología" para descartar los estudios sobre técnicas entomológicas y microbiológicas. Siguiendo el mismo patrón se extendió la búsqueda al idioma inglés utilizando la traducción de los términos descritos anteriormente.

De la búsqueda inicial resultaron 258 publicaciones tras descartar las duplicadas en varias bases de datos. Para evaluar si eran idóneos para su inclusión en este trabajo se revisaron los resúmenes de todas ellas, resultando en que 164 se descartaron por no ajustarse a los objetivos de esta revisión. Al recopilar las publicaciones se descartaron 10 trabajos más porque el texto completo no se encontraba en inglés ni español y otros 6 porque no estaba disponible la visualización ni la descarga del texto completo. Por último, se procedió a la lectura completa de los 78 artículos y capítulos de libros restantes, de los que tan solo 44 se ajustaron a los objetivos de la presente revisión bibliográfica (figura 1).

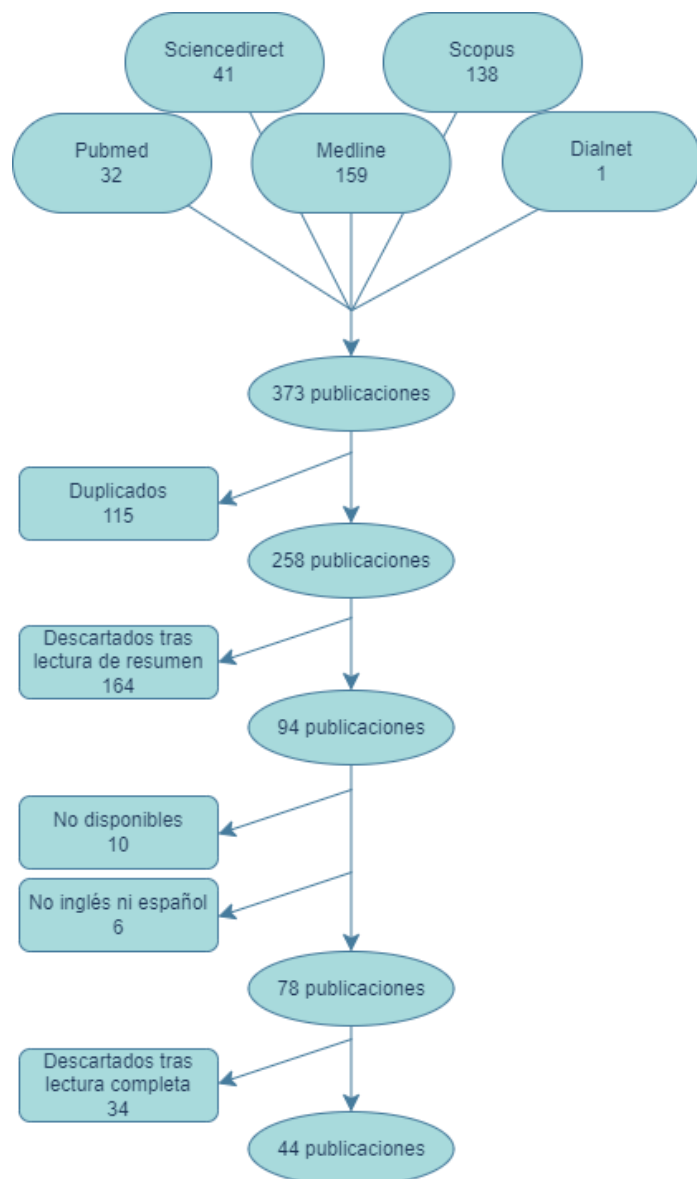


Figura 1. Esquema del proceso de selección de publicaciones.

Exposición del tema

Rigor mortis y elastografía por ultrasonidos

Es un fenómeno post mortem que inmoviliza los músculos del cuerpo debido a la contracción muscular causada por la falta de ATP (adenosín trifosfato), molécula necesaria para mantener a la musculatura en relajación y lista para la contracción. Este estado puede ser influenciado por varios factores, incluyendo la temperatura, la nutrición y la causa de la muerte. En climas fríos, el rigor puede ser difícil de evaluar y puede retrasarse, mientras que en climas cálidos, puede aparecer y disiparse rápidamente (Merck & Miller, 2012).

En algunos casos, puede instaurarse de forma casi instantánea en el momento de la muerte, un fenómeno conocido como espasmo cadavérico. La duración del rigor varía, pero generalmente comienza a desaparecer aproximadamente 36 a 48 horas después de la muerte en climas templados. Su desvanecimiento natural se debe al desacoplamiento de los filamentos de miosina y actina cuando se produce la desnaturalización de sus proteínas. Artificialmente, es posible romper el rigor estirando las extremidades, y no se reinstaurará si ya estaba completamente desarrollado (Merck & Miller, 2012). Los métodos actuales para estimar la intensidad del *rigor mortis* implican calificar subjetivamente la cantidad de esfuerzo requerida al forzar la flexión y extensión de articulaciones, típicamente el codo y la rodilla, para romper el *rigor mortis* (Kliewer *et al.*, 2021).

La rigidez puede calcularse mediante la elastografía, midiendo porciones en 2D del músculo en cuestión que se cuantifican en kilopascales y se reflejan en el ecógrafo con un cambio de color (figura 2) (Kliewer *et al.*, 2021).

En un reciente estudio de Kliewer *et al* (2021) con cerdos se probó a cuantificar el *rigor mortis* con elastografía por ultrasonidos. Se tomó en consideración la edad del animal, su peso corporal, la temperatura de conservación (32°C, 21°C o 1°C) y se midieron distintos músculos (masetero, braquiocefálico, tríceps braquial, dorsal ancho bíceps femoral y tríceps braquial).

Los valores de rigidez muscular en el *rigor mortis* muestran un gran rango de variación: mientras que en dos cerdos vivos sedados que se usaron como control osciló entre 7 y 19 kPa, en el pico de máxima intensidad de rigidez a 21°C sucedió a las 18-21 horas con valores entre 280-300 kPa. Con una temperatura de 32°C, la máxima intensidad encontrada fue de 80-100 kPa a las 6-9 horas. Estos hallazgos no habían sido reportados antes con el uso de métodos basados en la percepción humana. Además, la duración del pico de *rigor mortis* fue más larga a temperaturas inferiores. Por otro lado, los animales con más de 50 kg tendieron a alcanzar mayor rigidez pico y permanecer en *rigor mortis* por más tiempo; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas por la edad o en diferentes músculos (Kliewer *et al.*, 2021).

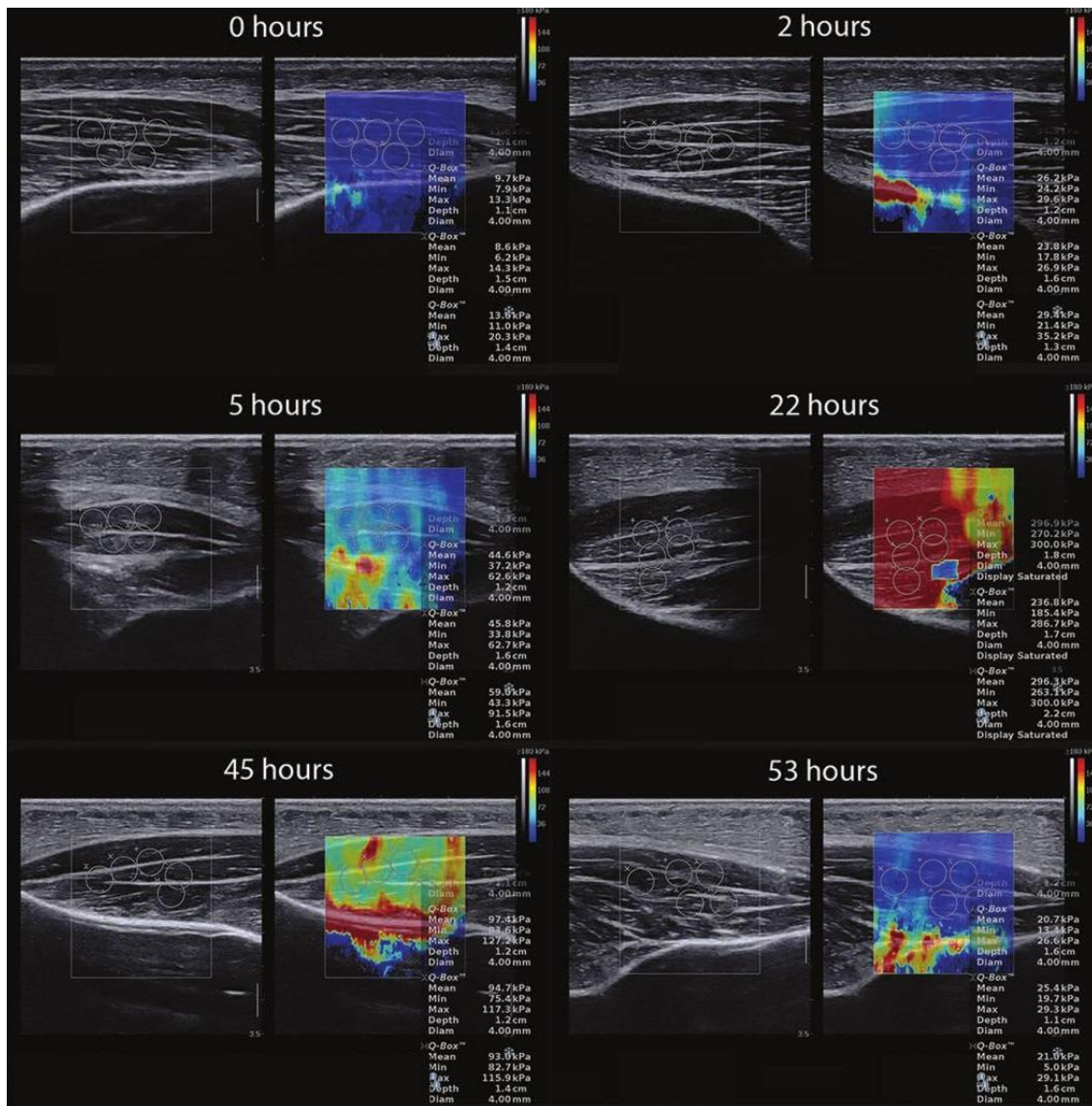


Figura 2. Elastografía de músculo masetero de cerdo en distintos IPM. Ecografía en modo B a la izquierda y superposición de elastografía en lado derecho. La medición de la rigidez se obtiene de los cinco círculos que se encuentran sobre el músculo (Kliewer et al., 2021).

La elastografía no permitió observar tres fenómenos aceptados tradicionalmente: la pérdida inicial de tono muscular o flacidez primaria, que probablemente no se observó por el uso de fármacos relajantes musculares previamente al sacrificio; la manifestación más temprana del *rigor mortis* en músculos pequeños que en músculos grandes; y la progresión del rigor desde craneal hacia caudal (Kliewer et al., 2021).

Tomografía computarizada

Las Unidades Hounsfield (UH) se utilizan para medir la densidad de los tejidos u órganos. La medición de las UH de varios órganos resulta en una estimación más precisa del IPM que cuantificar a un solo órgano porque los diferentes tejidos exhiben cambios *post mortem* en distintos momentos. En general, en las primeras 12 horas los valores de UH aumentan en todos los tejidos, posiblemente debido a una reacción supravital (después de la muerte) transitoria; después, los valores de UH disminuyen gradualmente, excepto en los ojos, donde continúan

umentando. La aplicación de algoritmos de aprendizaje automático en conjunto con las UH ha demostrado una precisión del 93% en la estimación del IPM (Shen *et al.*, 2024).

Resonancia magnética

Uno de los valores que se ha estudiado en cuanto al cálculo del IPM mediante resonancia magnética es el coeficiente de difusión aparente (CDA), un parámetro que cuantifica el movimiento aleatorio de las moléculas de agua en un tejido (Notohamiprodjo *et al.*, 2010) y que puede ser visualizado si se codifican los valores como colores (figura 3). El CDA se ve modificado por la maceración, la edad gestacional en fetos, patologías *ante mortem* y la temperatura. Si se corrige el valor en cuanto a la temperatura se puede evaluar el efecto real de la autólisis sobre los valores de CDA, que es una correlación negativa lineal observable en todas las regiones cerebrales analizadas, siendo más destacada en los ganglios basales (Tijssen *et al.*, 2022). En la musculatura, además se ha observado una disminución mayor en las primeras 12 horas que en las siguientes 24. Este fenómeno se correlaciona muy bien con la histología, pues en las 12 primeras horas las fibras musculares aumentan su tamaño, pudiendo observarse algunas células “gigantes”, de este modo, los espacios intercelulares se vuelven estrechos, lo que explica la reducción del movimiento de las moléculas de agua. A las 36 horas, las fibras musculares ya se han encogido, viéndose un aumento de los espacios intercelulares y algunas fibras están ausentes y son reemplazadas por “canales” llenos de líquido; en este último caso, la reducción del movimiento del agua se debe solo a la disminución de la temperatura (Sapienza *et al.*, 2020). En el hígado se observa una tendencia muy similar a la de los anteriores tejidos en cuanto a los valores de CDA. En este caso, los investigadores diferencian una fase inicial de reducción hasta las 2 horas, una fase de estabilidad que sigue hasta las 10 horas y una última fase de descenso hasta las 15 horas. Al mismo tiempo, se midió la velocidad de onda de

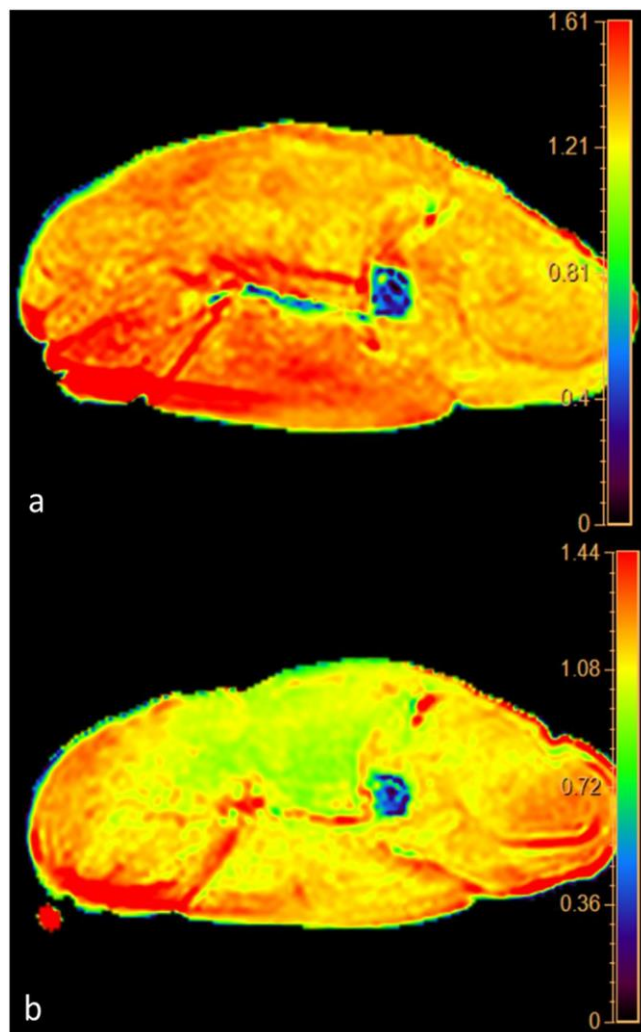


Figura 3. Medición de CDA en músculo de cerdo en el momento de muerte (a) y a las 36 horas post mortem (b) (Sapienza *et al.*, 2020).

corte y la tasa de penetración en hígado, observándose aumentos en la fase inicial y final, pero manteniéndose en la fase intermedia (Garczyńska *et al.*, 2021).

La difusión anisotrópica es un fenómeno que describe cómo las sustancias pueden desplazarse libremente o de manera organizada dentro de un tejido y se cuantifica con la anisotropía fraccional (FA). En los tejidos altamente estructurados, como la sustancia blanca del sistema nervioso y los músculos, debido a la orientación paralela de las fibras nerviosas (axones) y de las fibras musculares, el movimiento solo puede ocurrir en una dirección, por lo que el valor de FA es alto. Sin embargo, la pérdida gradual de las células musculares que se produce con el aumento del IPM, genera un incremento del espacio intercelular, lo que resulta en un movimiento más libre de las sustancias y por tanto en una FA progresivamente menor (Sapienza *et al.*, 2020).

El ratio de transferencia de magnetización (RTM) se obtiene al utilizar pulsos de radiofrecuencia para medir la magnetización de los protones de hidrógeno en distintos momentos. Esto permite distinguir a los protones que están unidos a macromoléculas de los que se encuentran en agua libre. El daño sobre las macromoléculas causa la liberación de los protones que tenían unidos, por lo que se observa una disminución del RTM con el aumento del IPM. En las primeras 12 horas hay una reducción constante, entre las 12 y las 28 se estabiliza y vuelve a bajar posteriormente, llegando a la mitad del valor original a las 36h. La anisotropía fraccional sigue un patrón temporal similar al de relación de transferencia de magnetización. (Sapienza *et al.*, 2020).

Las imágenes por susceptibilidad magnética se obtienen con una secuencia que aumenta el contraste de sustancias que distorsionan el campo magnético local, como el aire. La presencia de aire en los vasos y tejidos se puede relacionar con condiciones *ante mortem* como un traumatismo, infección o embolia gaseosa; o *post mortem*, pudiendo usarse como un marcador temprano de putrefacción por las microburbujas de aire que se forman en los tejidos (Sapienza *et al.*, 2020).

Histología

Corazón

Una sección de corazón de rata teñida con hematoxilina-eosina (HE) (figura 4) mostrará a partir de las 12 horas *post mortem*) a fibras musculares ligeramente onduladas y con aumento del espacio entre ellas. A las 24 horas se encuentran miocitos contraídos y comienza alguna necrosis con aplanamiento de sus núcleos. Desde las 48 horas las fibras musculares se separan, los capilares se congestionan y hay extravasación sanguínea. A partir de las 72 horas se produce picnosis de los núcleos y se fragmentan los miocitos (Mondello *et al.*, 2021; Welson *et al.*, 2021).

Al realizar una tinción inmunohistoquímica para Bcl-2, una proteína inhibidora de la apoptosis, encontraríamos en las fibras musculares una expresión alta para esta proteína a las 12 horas, moderada entre las 24-48 horas, débil a las 72 horas e inexistente horas después (Welson *et al.*, 2021). Sin embargo, la tinción inmunohistoquímica para la Caspasa 9 y la Caspasa 3, dos proteínas mediadoras de la apoptosis, revela que siguen una tendencia muy similar en el músculo cardíaco. Hasta las 4 horas *post mortem* sus niveles son muy bajos o inexistentes, alcanzan su máximo entre las 8-

post-mortem interval (h)

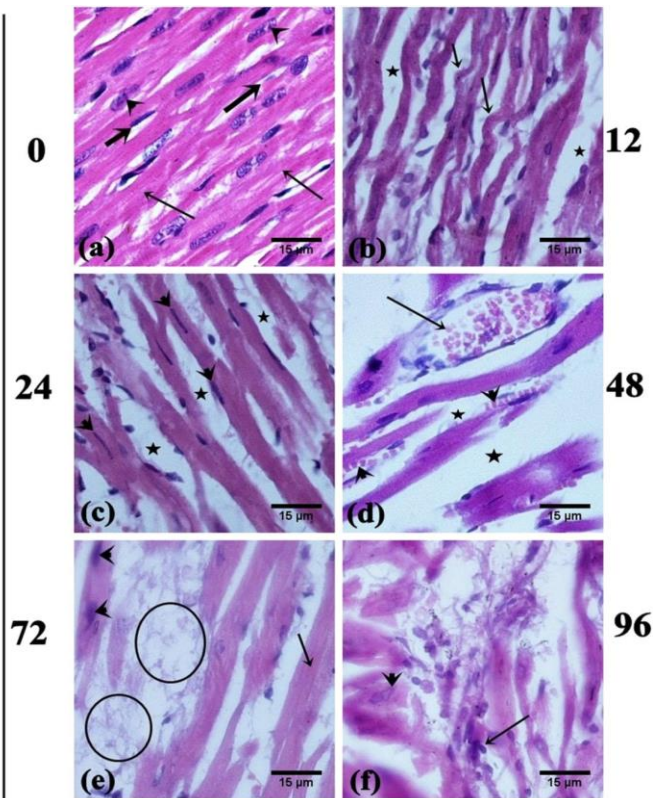


Figura 4. Corazón de rata a diferentes IPM. Se observan espacios dilatados (★), fibras onduladas (flechas en b), capilar congestivo (flecha en d) y cambios post mortem de los núcleos (cabezas de flecha). HE 400x (Welson *et al* 2021).

12 horas para después reducirse rápidamente a las 24 horas y volverse casi inexistentes a las 72 horas. Una forma de cuantificar estos cambios es con un análisis colorimétrico de las imágenes histológicas obtenidas de la tinción inmunohistoquímica (figura 5) (Mondello *et al.*, 2021).

Encéfalo

Mohammed *et al* (2023) observaron en ratas un hallazgo histológico que ocurría de forma muy constante, independientemente de la edad de la rata y la temperatura de la habitación en que se encontraban durante el periodo *post mortem*, y es que comenzaban a producirse las vacuolizaciones y apoptosis de células de Purkinje a las 8 horas *post mortem* en el cerebelo y en las posteriores horas (12 y

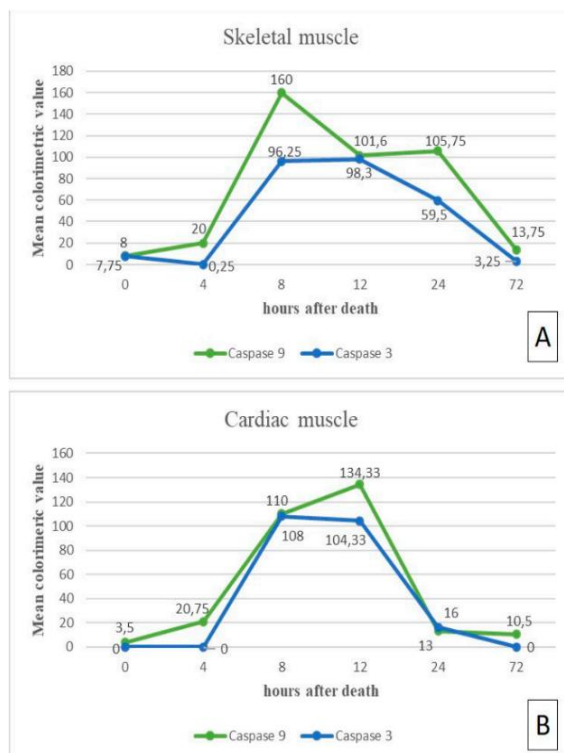


Figura 5. Gráfico lineal representando los valores medios de la colorimetría para Caspasa 9 (verde) y Caspasa 3 (azul) de las tinciones inmunohistoquímicas realizadas a distintos IPM en músculo esquelético (A) y músculo cardíaco (B) (Mondello *et al.*, 2021).

24 horas *post mortem*) las apoptosis aumentaban de manera progresiva. Los cambios que se producían en neuronas y células de la glía mostraban un comportamiento más variado y dependiente de las características del animal o del ambiente.

Wenzlow *et al* (2021) estudió varios parámetros histológicos en el cerebro del caballo, entre ellos: cambios de tamaño del núcleo y del citoplasma de las neuronas, picnosis neuronal y vacuolización de neuropilo. Todos se relacionaron con el IPM, pero de forma distinta dependiendo de la temperatura de conservación del cadáver.

Estómago, intestino delgado e intestino grueso.

Novakoski *et al* (2023) describe en el cerdo un desprendimiento de células del epitelio de la mucosa ya desde las 2-4 horas *post mortem* y que progresa rápidamente hasta perderse por completo entre las 14-16 horas *post mortem*.

Hígado

Una muestra de hígado de rata fijada y teñida con HE (figura 6) inmediatamente después de la muerte permite ver a sus hepatocitos organizados en trabéculas, con formas poligonales y con gran cantidad de glucógeno almacenado. De fijarlo a las 2 horas de la muerte los hepatocitos se encontrarán más libres en la trabécula, adquieren una forma más redondeada, sus núcleos se vuelven hiper cromáticos y el glucógeno almacenado se reduce drásticamente (Garczyńska *et al.*, 2021). A partir de las 2-4 horas puede verse una dilatación de la vena central. A las 6 horas se observan los sinusoides hepáticos dilatados (Derakhshanfar *et al.*, 2022). A las 10 horas, los hepatocitos aparecen elongados con forma elipsoidal, aunque de menor tamaño, sus paredes están menos definidas y sus núcleos se vuelven más pequeños, hiper cromáticos, picnóticos y con evidencia de cariorexis (Garczyńska *et al.*, 2021; Khalifa *et al.*, 2022). A las 24-48 horas los tejidos se encuentran

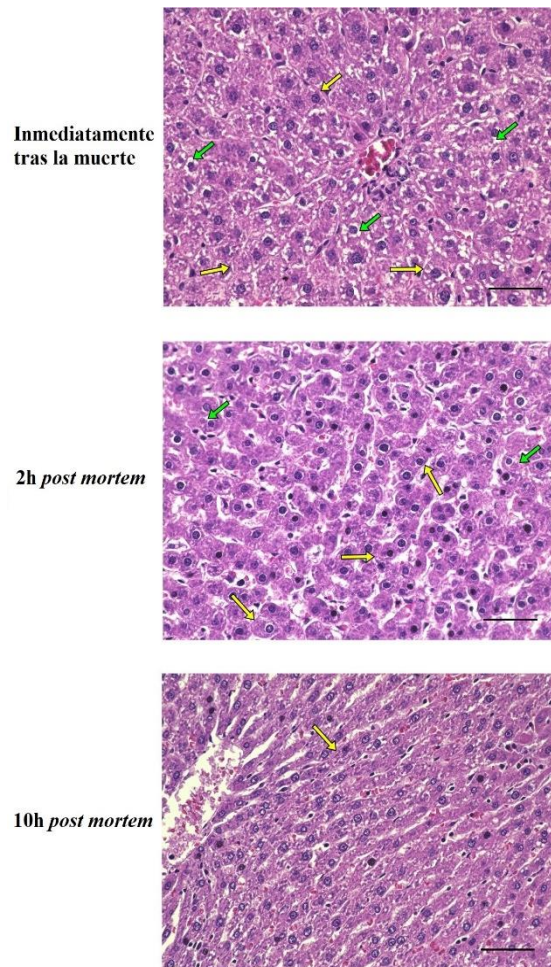


Figura 6. Hígado de rata a diferentes IPM. Glucógeno (flechas verdes); membrana celular (flechas amarillas) HE. Barra de 50 μ m (Garczyńska *et al.*, 2021).

totalmente destruidos. Además, el método de eutanasia puede causar variaciones en el tiempo en que aparecen (Derakhshanfar *et al.*, 2022).

En caballo, los hallazgos histológicos que mejor se correlacionan con el IPM son la vacuolización de los hepatocitos y el grado de separación del epitelio del conducto biliar (figura 7), esta última se correlaciona de forma lineal. Ambos cambios *post mortem* ocurren de forma constante tanto a 22°C como a 8°C (Wenzlow *et al.*, 2021).

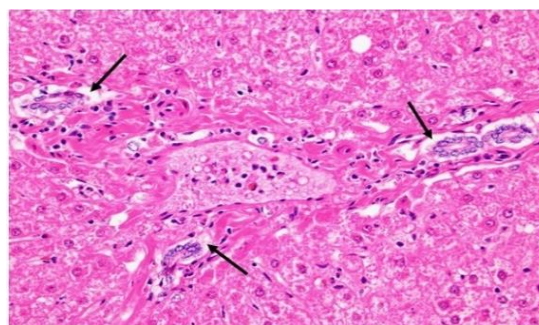


Figura 7. Hígado de caballo a las 60 horas. Epitelio del conducto biliar separado de la membrana basal (flechas) HE. 400× (Wenzlow *et al.*, 2021).

Músculo esquelético

En la rata, los cambios *post mortem* observados en el músculo esquelético guardan cierta similitud con los encontrados en su músculo cardíaco. En una tinción con HE, de forma orientativa se pueden describir los siguientes cambios *post mortem*: a las 6 horas *post mortem* comienza la disminución del número de estrías musculares y ligera ondulación de las mismas, con variación del tamaño de sus núcleos; a las 12 horas aparecen núcleos picnóticos; a las 24 horas aparecen vacuolas citoplasmáticas; a las 48 horas se puede percibir un aumento de la matriz extracelular (Guerrero-Urbina *et al.*, 2021; Mondello *et al.*, 2021), núcleos autolíticos y desintegración de algunas fibras musculares (Mostafa *et al.*, 2023); y a las 72 horas se puede observar edema y vasos sanguíneos con muy pocos hematíes (Guerrero-Urbina *et al.*, 2021).

Al realizar una tinción inmunohistoquímica para Caspasa 9 y Caspasa 3 en el músculo esquelético se observan diferencias entre ambas. La Caspasa 9 incrementa hasta alcanzar su máximo a las 8 horas *post mortem*, seguido por una ligera disminución y mantenimiento entre las 12-24 horas, a las 72 horas vuelve a disminuir hasta casi los valores iniciales. La Caspasa 3 en cambio se comporta igual que en el músculo cardíaco durante las primeras 12 horas: empieza a aumentar a las 4 horas y alcanza su máximo entre las 8-12 horas, después disminuye de forma lenta y progresiva hasta llegar casi a los valores iniciales a las 72 horas. Al comparar su comportamiento en el músculo esquelético y el músculo cardíaco pueden observarse diferencias notables (figura 5) (Mondello *et al.*, 2021).

En el caballo, un hallazgo constante que aparecía a temperaturas de 22°C y 8°C, y que estaba linealmente correlacionado con el IPM fue la aparición de hipereosinofilia en las fibras musculares del músculo semitendinoso (figura 8). Otros hallazgos como la

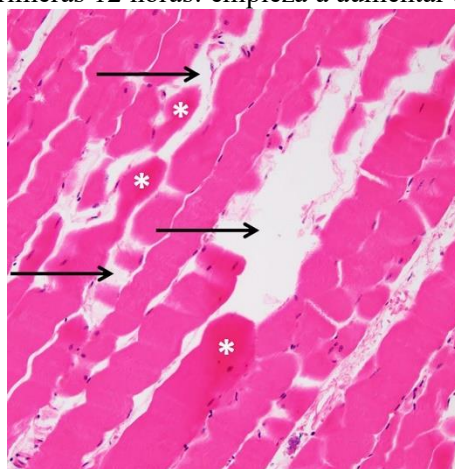


Figura 8. Músculo estriado de caballo. Hipereosinofilia en fibras musculares (*); interrupciones en las fibras (flechas). HE 200× (Wenzlow *et al.*, 2021).

discontinuidad de las fibras musculares no tiene una fuerte correlación con el IPM si se conservaba el cadáver a bajas temperaturas (Wenzlow *et al.*, 2021).

La tinción con ácido periódico de Schiff (PAS), entre otros usos, permite valorar el glucógeno almacenado en el hígado o en el músculo. En el perro mostró una reacción fuerte durante las primera 24 horas *post mortem*, una reacción moderada entre las 48 y 72 horas, y después una reacción muy débil (figura 9) (Piegari *et al.*, 2023).

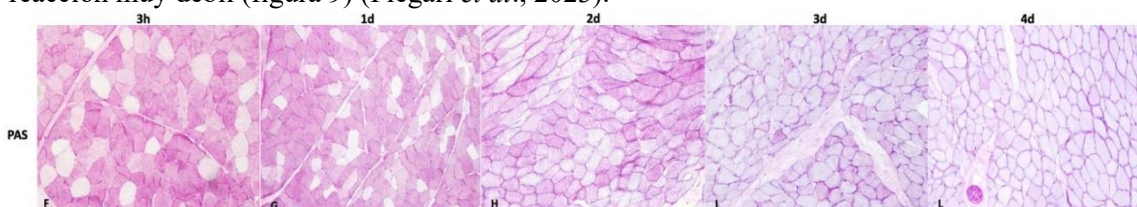


Figura 9. Músculo de perro a distintos IPM. PAS 20x (Piegari *et al.*, 2023).

La tinción inmunohistoquímica en perros para desmina y distrofina reveló una tendencia similar a la vista en el PAS. A las 3 horas el 90 % de las fibras tenían una reacción positiva a ambas proteínas. A las 24 horas *post mortem*, el 90% de fibras eran positivas para desmina, pero solo entre el 60-90% para distrofina. A las 48 horas, el porcentaje de fibras positivas para la distrofina disminuyó aún más a entre el 30-60%, mientras que la desmina se mantuvo en un 60-90% de las fibras. Tras 72 horas, la distrofina estaba ausente o presente en menos del 30% de las fibras, mientras que la desmina persistía en un 30-60%. Posteriormente, no hubo inmunorreactividad detectable para distrofina, aunque la desmina todavía podía encontrarse en un 30-60% de las fibras musculares (Piegari *et al.*, 2023).

Páncreas

Una sección de páncreas de rata que se somete a una tinción inmunohistoquímica para la proteína p53, proteína que participa en la regulación del ciclo celular, mostrará un reacción negativa inmediatamente después de la muerte, a las 8 horas *post mortem* algunas células acinares mostrarán una reacción citoplásmica, a las 24-48 horas *post mortem* se observará un aumento progresivo del número de células con inmunoreacción, y a las 72 horas *post mortem* se reduce la reacción a la proteína p53 (Khalifa *et al.*, 2022).

Piel

Novakoski *et al* (2023) describe en la piel de cerdo que comienza a observarse un ligero aumento de tamaño en los núcleos de los queratinocitos desde las 6 horas *post mortem*, que progresa a moderado a las 10 horas *post mortem* y a severo a las 22 horas *post mortem*.

En piel de rata, se observa la pérdida de la capa granulosa de la epidermis a las 3 horas *post mortem*. A las 6 horas, la capa espinosa de la epidermis mostró degeneración hidrópica, que progresó con pérdida de la morfología normal de la capa basal y degeneración de los melanocitos

a las 12 horas. A las 24 horas *post mortem*, la dermis exhibió cambios hidrópicos en las glándulas sudoríparas junto con hialinización de las fibras de colágeno (El-Din *et al.*, 2021).

Riñón

Una muestra de riñón de rata fijada y teñida con HE (figura 10) a las 2 horas *post mortem* mostrará glomérulos atrofiados (Derakhshanfar *et al.*, 2022). A las 12 horas los glomérulos se contraen, la cápsula de Bowman se dilata y los capilares peritubulares se congestionan, progresando hasta las 24 horas. A las 48 horas se pierde el epitelio tubular y se liberan algunos de sus núcleos (Khalifa *et al.*, 2022; Welson *et al.*, 2021). A las 72 horas hay necrosis tubular e hialinización intratubular que progresarán durante las siguientes horas (Welson *et al.*, 2021). Derakhshanfar *et al* (2022) apunta que la aparición y progresión de la mayoría de estos cambios *post mortem* dependerán en cierta medida del método de eutanasia utilizado y de características propias del individuo, como la edad.

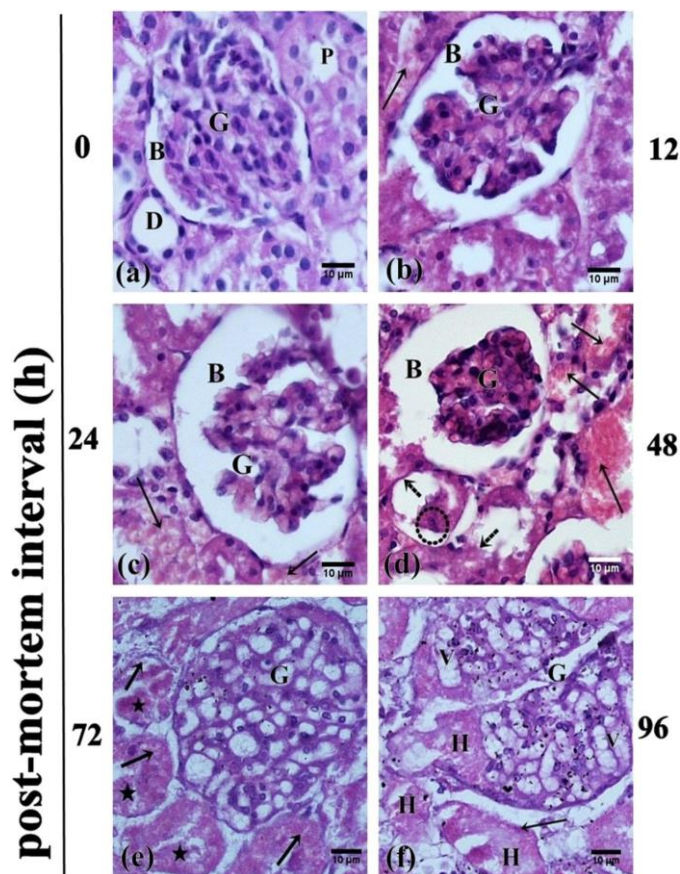


Figura 10. Riñón de rata a diferentes IPM. Glomérulo (G), espacio de Bowman (B), túbulo contorneado proximal (P) y distal (D), congestión peritubular (flechas en a-d), necrosis tubular (flechas en e-f), cilindros de hialina (★) e hialinización masiva. HE 400x (Welson *et al* 2021).

Al realizar una tinción inmunohistoquímica para Bcl-2 encontraríamos en las células tubulares una expresión alta para esta proteína a las 12 horas, moderada entre las 24-48 horas, débil a las 72 horas e inexistente después (Welson *et al.*, 2021).

Tendón

El cultivo celular de fibroblastos a partir de secciones de tendón de cerdo podría permitir la estimación del IPM, ya que muestras recogidas antes de las 24 horas *post mortem* revelan tasas de proliferación de los fibroblastos más altas que muestras recogidas a las 48 horas y que a las 72 horas. A partir de las 96 horas *post mortem* el crecimiento de fibroblastos es inexistente (Ozhathil *et al.*, 2022).

Testículo

En una muestra de testículo de rata fijada y teñida con HE (figura 11) puede verse como comienza el desprendimiento del epitelio germinativo de la lámina basal desde las 12 horas y cómo se completa a las 24 horas. A las 48 horas se rompen las uniones celulares, ampliándose el intersticio. A las 72 horas se reducen las capas de células germinativas y aparece una sustancia acidófila en la luz de los túbulos seminíferos (Welson *et al.*, 2021).

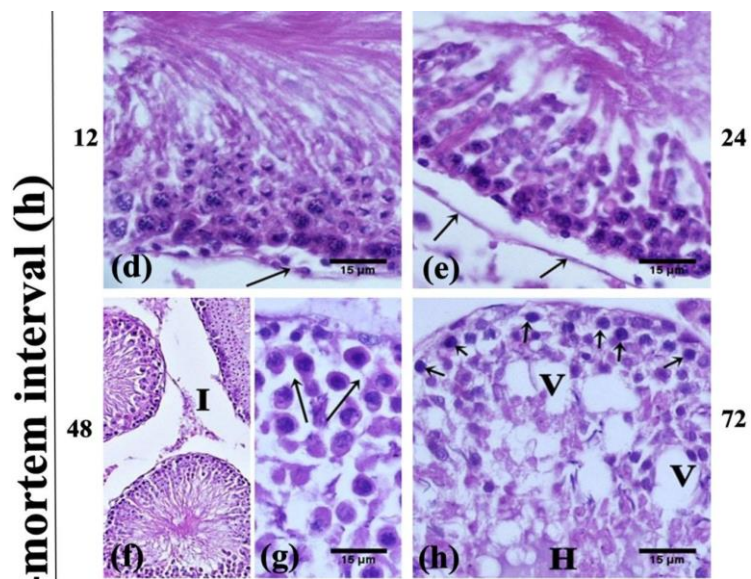


Figura 11. Testículo de rata a diferentes IPM. Desprendimiento del epitelio (flechas en d-e), ruptura de uniones celulares (flechas en g), vacuolización (V) y material hialino (H). HE 100x (Welson *et al.* 2021).

Al realizar una tinción inmunohistoquímica para Bcl-2 encontraríamos en las células intersticiales una expresión alta para esta proteína a las 12 horas, moderada entre las 24-48 horas, débil a las 72 horas e inexistente después (Welson *et al.*, 2021).

Examen del globo ocular

Opacidad corneal

La superficie corneal es muy sensible a la deshidratación, especialmente cuando los párpados quedan abiertos o las condiciones ambientales son de alta temperatura y baja humedad relativa. Esta deshidratación causa que se vuelva cada vez más turbia y opaca y se relaciona con el IPM de forma directa. Su clasificación en opacidad leve, moderada o severa ya es utilizada de forma habitual como un dato complementario para estimar el IPM. En un reciente estudio en cerdos, Zheng *et al.* desarrollaron un dispositivo (figura 12) que se podría acoplar a un teléfono móvil con cámara de fotos integrada para tomar imágenes de la superficie corneal y medir de forma cuantitativa la opacidad corneal. Los hallazgos más importantes de este estudio es la alta correlación entre el contraste (un parámetro de textura de las imágenes) y el IPM que consigue utilizarse en un modelo para conseguir que en IPM menores de 36 horas el error sea inferior a las 3 horas. Si bien es una herramienta muy prometedora, el estudio presenta algunas limitaciones, como que su modelo se desarrolla a temperatura y humedad constante, cuando ya se sabe que estos factores afectan en gran medida a la evaporación de agua que causa la deshidratación corneal (Zheng *et al.*, 2021). También existe otro problema que apuntan Dhillon *et al.* (2022) al no haberse

investigado si las correlaciones se mantendrían cuando se encuentra el cadáver con los párpados cerrados, ya que es frecuente que se cierren los ojos al morir, reduciéndose así la deshidratación corneal.

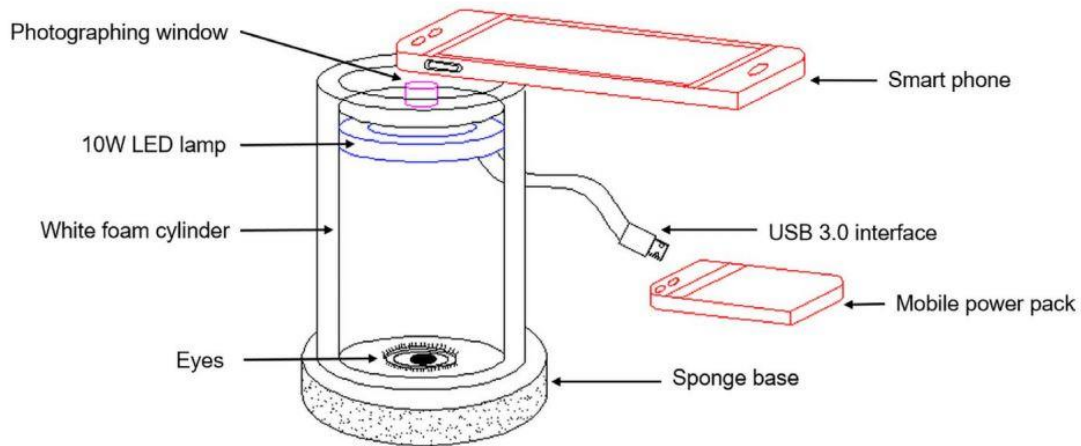


Figura 12. Esquema del sistema fotográfico usado por Zheng et al (2021).

Humor vítreo

Ocupa el espacio que se encuentra entre el cristalino y la retina, es más denso que el humor acuoso y permite que el globo ocular mantenga su forma.

La elección del humor vítreo y acuoso para la estimación del IPM se debe a su relativo aislamiento del resto del cuerpo y a su mayor estabilidad en el periodo *post mortem* en comparación con otros fluidos, como la sangre y el líquido cefalorraquídeo, a la degradación bacteriana (Locci *et al.*, 2021; Merck & Miller, 2012).

El potasio es el analito más estudiado del humor vítreo en cuanto a la estimación del IPM. Su interpretación se basa en que tras la muerte del individuo, las células circundantes a este líquido liberan potasio en él por la falta de ATP necesario para el mantenimiento de la permeabilidad selectiva de la membrana celular y el funcionamiento del transporte activo, como la bomba Na/K ATPasa (Locci *et al.*, 2021). Es por ello que la medición de potasio no puede ser utilizada para diagnosticar hiperkalemia *ante mortem* (Merck & Miller, 2012). Además, pueden existir variaciones en la concentración de potasio debido a la duración del periodo de supervivencia, la temperatura externa, condiciones patológicas, causa de muerte y cualquier otro factor que afecte a la tasa de descomposición (Locci *et al.*, 2021; Merck & Miller, 2012). Incluso se ha de tener cuidado durante la toma de muestras puesto que puede haber diferentes niveles de potasio en las capas anterior, central y posterior del vítreo hasta el momento en que se alcanza el equilibrio; por ello se debe tomar tanto humor vítreo como sea posible, para eliminar la variación de concentración entre capas (Merck & Miller, 2012).

Un dato a tener en cuenta es que se puede hallar hasta un 10% de diferencia en la concentración de potasio entre el ojo derecho y el izquierdo y, sin embargo, esto no afecta significativamente al cálculo del IPM con una recta de regresión (Merck & Miller, 2012).

Aunque se han propuesto numerosos modelos para la estimación del IPM mediante la medición de potasio en humor vítreo, la mayoría de ellos lineales, aún no está claro que exista uno definitivo (Locci *et al.*, 2021). Un ejemplo sería el del estudio de Jashnani *et al* (2010) que resultó en la siguiente fórmula: $IMP \text{ (horas)} = 1,076 * [K+] - 2,815$.

En el estudio de Stern & Muralidhar (2022) se comprueba que el uso de un analizador de bioquímica seca como el Element DC podría utilizarse para el análisis *post mortem* del humor vítreo de perros, gatos y caballos, obteniendo resultados precisos de varios analitos entre los que se encuentra el potasio. Sin embargo, los autores aclaran que se requieren investigaciones más extensas y con mayor número de individuos para validar este método con vistas a su uso en investigaciones forenses.

Humor acuoso

Se localiza entre la córnea y el cristalino, ocupando las cámaras anterior y posterior. Su función es nutrir estructuras sin aporte sanguíneo como córnea y cristalino.

Sin embargo, la toma de muestras de humor acuoso tiene unos inconvenientes muy marcados en comparación con el humor vítreo: su volumen es menor y disminuye rápidamente tras la muerte, y su tasa de evaporación es mayor (Locci *et al.*, 2021).

La resonancia magnética nuclear de protones o espectroscopia de resonancia magnética nuclear (1H-RMN) proporciona un perfil global de todos los metabolitos de bajo peso molecular detectables. Tiene grandes ventajas, como que no depende de una sola característica química, es rápido, no requiere una extensa preparación de la muestra y no es destructivo, la muestra se recupera inmediatamente tras su análisis y puede someterse a otras pruebas. Sin embargo, su principal limitación es su baja sensibilidad, al analizar pequeños volúmenes o metabolitos en muy baja concentración, pueden quedar oscurecidos por el pico que muestran otras macromoléculas grandes. (Locci *et al.*, 2020)

En la figura 13 puede observarse el perfil de metabolitos obtenido de la muestra de humor acuoso y la correlación de cada uno de ellos con el IPM, con que el ojo se encontrara abierto durante el IPM y con el efecto combinado de ambos. No obstante, el efecto del IPM resultó más fuerte sobre el perfil metabólico, independientemente de que el ojo estuviera abierto o cerrado (Locci *et al.*, 2019).

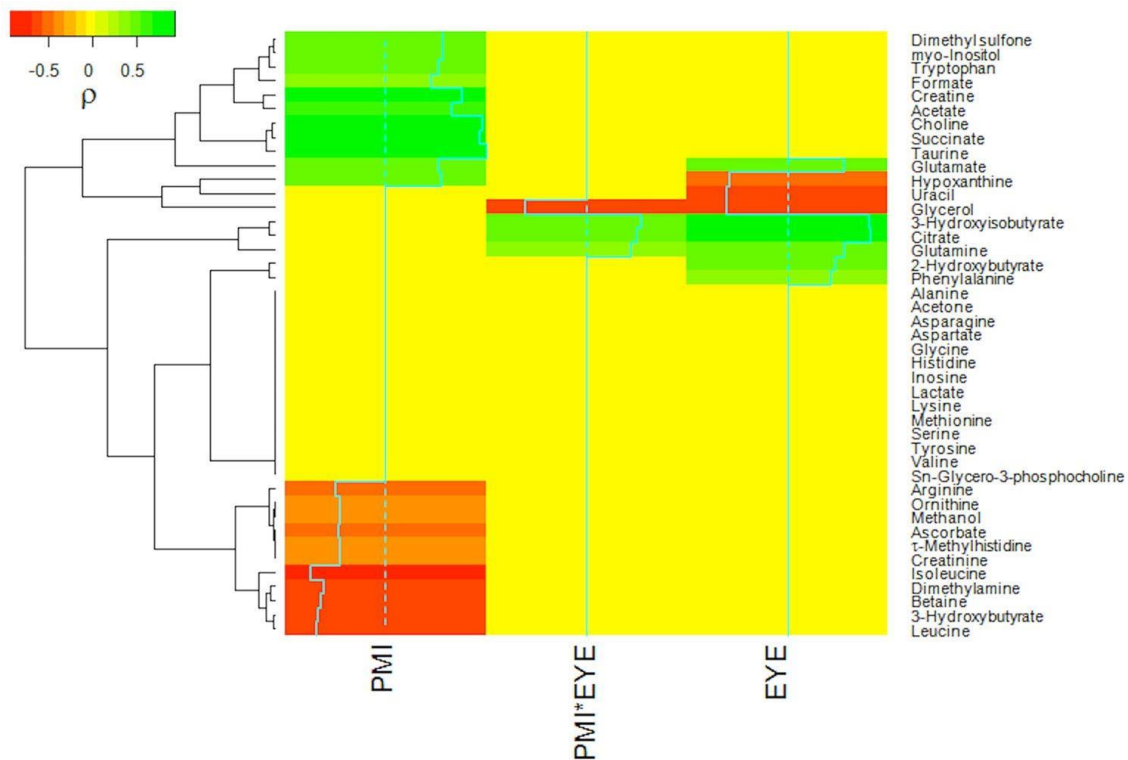


Figura 13. Mapa de calor mostrando la correlación positiva (verde) y negativa (rojo) en distintos metabolitos y el efecto del IPM (PMI), mantener el ojo abierto durante el periodo post mortem (EYE) y el efecto combinado ambos (PMI+EYE) (Locci *et al.*, 2019).

En un estudio posterior de Locci *et al* (2021) se comparó un modelo de estimación del IPM basado en la concentración de potasio en el humor vítreo mediante electroforesis capilar de iones con un modelo basado en la 1H-RMN del humor acuoso. Los metabolitos, identificados con la 1H-RMN, que mejor reflejaron la variación de potasio *post mortem* fueron la colina, la taurina y el succinato. Sin embargo, resultó más preciso predecir el IPM en función del perfil de metabolitos que a partir de los niveles de potasio; incluso, resultó más exacto utilizar únicamente el perfil de metabolitos que combinarlo con los valores de potasio. Este último hecho se debe a que la información que dan los metabolitos sobre el cálculo del IPM es más precisa que la que ofrece el potasio, que en este caso estaría perjudicando la exactitud de la medición (Locci *et al.*, 2021).

Retina

Ya conociendo que a partir de las 4-6 horas *post mortem* las células ganglionares de la retina presentarán cromatolisis, Finnie *et al* (2021) se propusieron establecer una secuencia temporal de los cambios histológicos *post mortem* que se dan en la retina y comparar el uso del fijador de Davidson con el formaldehído al 10%. Las estructuras de la retina (figura 14 y 15) de las que se describen cambios histológicos en el estudio son el epitelio pigmentario retinal (RPE), el segmento de fotorreceptores (PS) que incluye los segmentos internos (IS) y externos de fotorreceptores (OS), la capa nuclear externa (ONL), la capa nuclear interna (INL) y las células ganglionares de la retina (GCL).

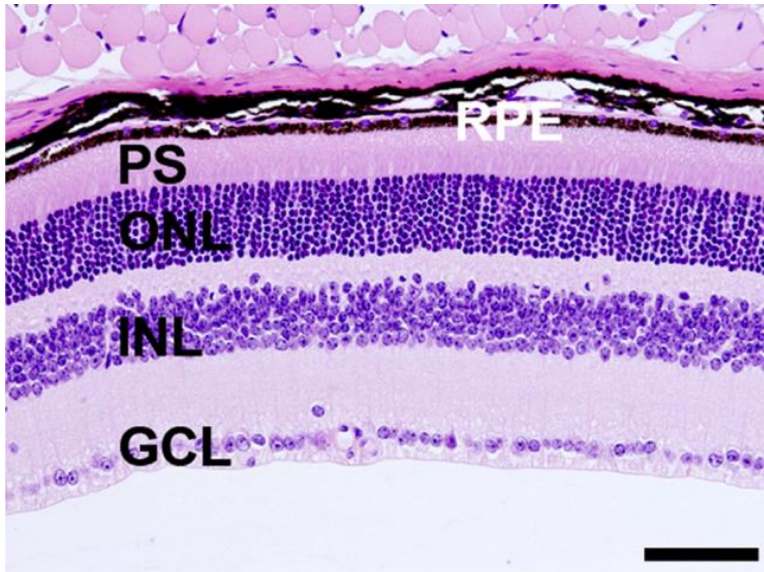


Figura 14. Retina de ratón inmediatamente después de la muerte en fijador de Davidson. HE. Barra de 60 μm (Finnie et al., 2021).

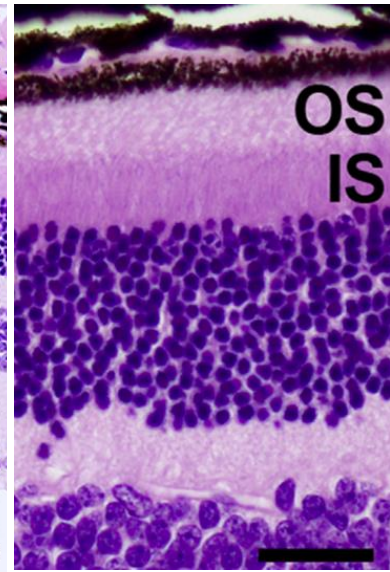


Figura 15. Retina de ratón inmediatamente después de la muerte en fijador de Davidson. HE. Barra de 30 μm (Finnie et al., 2021).

Un resumen de la secuencia de cambios en orden cronológico sería el siguiente (Finnie et al., 2021):

- **Inmediatamente después de la muerte**, aunque aún no debería de haber cambios *post mortem*, cuando se fijaba con formaldehído al 10% podía observarse un desprendimiento parcial de la retina, separación de los fotorreceptores del RPE y disrupción del OS.
- **Entre las 0.5-1 hora post mortem** comienza la homogeneización del OS, los bastones afectados se vuelven amorfos e hipereosinofílicos (figura 16) y se puede observar una ligera inflamación del citoplasma de las células ganglionares.
- **Entre la 1ª y 2ª hora post mortem** se produce el desprendimiento parcial de retina cuando se usa el fijador de Davidson y se pueden observar picnosis nuclear, la condensación de la cromatina, de las células de la INL.
- **A las 4 horas post mortem** se intensifica la inflamación de las GCL, comienza la picnosis de las células de la ONL y se rompe el RPE.
- **A las 16 horas post mortem** la inflamación de las GCL cambia a contracción y basofilia, el resto de los cambios antes mencionados progresan.
- **Después de 48-72 horas post mortem** la depleción celular es más evidente en todas las capas neuronales de la retina y el desprendimiento de retina es completa.

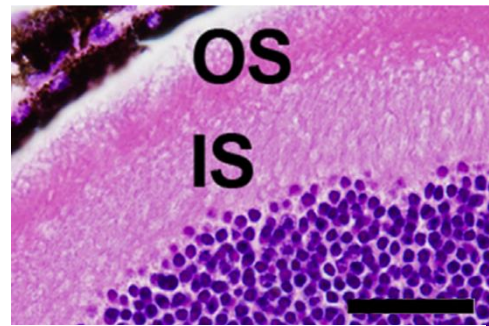


Figura 16. Homogeneización e hipereosinofilia del OS. HE. Barra de 30 μm (Finnie et al., 2021).

En resumen, el fijador de Davidson produce menos artefactos, especialmente el desprendimiento de retina, y otra alternativa de fijación podría ser inyectar formaldehído al 10% de forma intraocular, que podría ofrecer buenos resultados. Finalmente, hay que destacar que este estudio se realizó en murinos y extrapolarlo a animales domésticos de mayor tamaño presenta problemas al enfriarse estos más lentamente, lo que acelera la autólisis, y, al tener estos una esclerótica más gruesa, el fijador se introduciría más lentamente.

pH en músculo

En el periodo *post mortem* se dan procesos que dan lugar a cambios de pH. En el cerdo, la producción de ácido láctico resultante de la respiración anaeróbica al estar en condiciones de hipoxia reduce el pH del músculo durante las primeras 2-32 horas, desde 5,77 hasta 5,54, disminuyendo una media de 0,01 por hora. En las siguientes 40 horas el pH aumenta a un ritmo de 0,05 por hora, hasta 7.55 como consecuencia de la degradación de las proteínas que conlleva la generación de sustancias

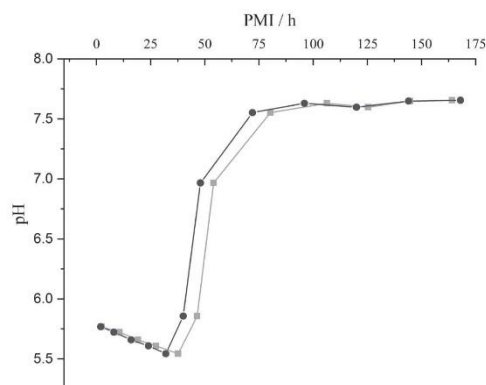


Figura 17. Curva de pH en músculo de cerdo en función del IPM (Zhu et al., 2021).

alcalinizantes que contienen nitrógeno. Después de las 72 horas, la acción bacteriana durante la fase putrefacción mantiene el pH estable (figura 17) (Zhu et al., 2021).

Luminometría

La enzima luciferasa en presencia de ATP produce bioluminiscencia, que puede ser detectada por un luminómetro, siendo más intensa la luz emitida cuanto más ATP reacciona. Además, la medición de ATP en *Paralichthys olivaceus* (fletán coreano o bastardo) con luminometría demostró tener una muy alta correlación con la medición por cromatografía líquida de alta eficacia (Shim, 2019).

Shim (2019) observó una disminución constante del ATP estimado por luminometría que se correlacionaba con el IPM. Esta disminución dependía del peso inicial del individuo y, aunque se conservaron las muestras a temperatura constante de refrigeración, es de esperar que las variaciones de temperatura afecten a los niveles de ATP.

En base a que la depleción de ATP comienza con la muerte y es uno de los desencadenantes de los cambios *post mortem*, medir la cantidad de ATP en músculo podría ser un método eficaz de estimación del IPM en situaciones que no generen un agotamiento de las reservas de ATP como la miopatía por captura.

Marcadores de estrés oxidativo

En la célula viva se producen constantemente radicales libres que deben ser contrarrestados por antioxidantes para evitar daño celular. Después de la muerte, la hipoxia genera un desequilibrio con grandes pérdidas de ATP y producción de ácido láctico, lo que conlleva la reducción del pH celular que genera cambios atróficos en la célula y su degradación, junto con la posterior acumulación de radicales libres, desnaturalización de proteínas, peroxidación de membranas y destrucción del ADN (Mostafa *et al.*, 2023; Welson *et al.*, 2021).

Dos antioxidantes usados como marcadores de estrés oxidativo son la catalasa y el glutatión reducido (GSH) que, medidos en conjunto, demostraron tener una correlación negativa estadísticamente significativa con el IPM (Mostafa *et al.*, 2023).

Otra forma de valorar el estrés oxidativo sería estimar la peroxidación lipídica, que puede lograrse mediante el método de Draper y Hadley, que se basa en la medición por espectrofotometría a 532 nm durante la reacción del ácido tiobarbitúrico y el malondialdehído (MDA), el indicador de peroxidación lipídica (Mostafa *et al.*, 2023). En ratas, la medición de MDA tiene una gran correlación positiva con el IPM, especialmente en los testículos, aumentando su concentración casi un 50% cada 24 horas durante los primeros 4 días. Si se mide en conjunto con otros marcadores de estrés oxidativo, en particular, dos antioxidantes, el superóxido dismutasa (SOD) y el GSH, podría aplicarse la siguiente fórmula para estimar el IPM (Welson *et al.*, 2021):

$$IPM = 79,7 + 0,5005 \text{ MDA testicular} - 0,0582 \text{ SOD testicular} - 0,0385 \text{ GSH testicular}$$

En la búsqueda de nuevos biomarcadores, da Fonseca *et al* (2019) estudiaron las enzimas Na⁺/K⁺-ATPasa, acetilcolinesterasa y glutatión S-transferasa por su sensibilidad al estrés oxidativo. En la rata, la Na⁺/K⁺-ATPasa sufría una importante disminución en el cerebro en las primeras 6 horas y después se mantenía estable hasta las 48 horas, la acetilcolinesterasa en el cerebro llegó a su pico máximo a las 24 horas y la glutatión S-transferasa aumentaba considerablemente a las 6 horas y se mantenía hasta que volvía a incrementarse otra vez a las 48 horas.

Proteómica

Tropomiosina, desmina, vinculina, GAPDH y eEF1A2

El *western blot* es una técnica muy utilizada en el análisis de proteínas. Implica el uso de electroforesis en gel para separar las moléculas por su tamaño y el uso de anticuerpos frente a la proteína de estudio junto con sustancias quimioluminiscentes; esto es lo que permite visualizar las distintas proteínas de una muestra como bandas (Battistini *et al.*, 2023; Choi *et al.*, 2019). A esta técnica se puede sumar la medición de la densidad óptica, un método de cuantificar la señal luminiscente emitida por las bandas de proteínas (Battistini *et al.*, 2023).

Choi *et al* (2019) utilizan los ya conocidos patrones de degradación en *western blot* de la tropomiosina, la desmina y la vinculina (figura 18) para validar la tendencia de degradación de otras proteínas. En este caso se les compararon con las proteínas GAPDH y eEF1A2; ambas se degradan en ratas y ratones, lo que sugiere que este hallazgo podría extrapolarse a más especies.

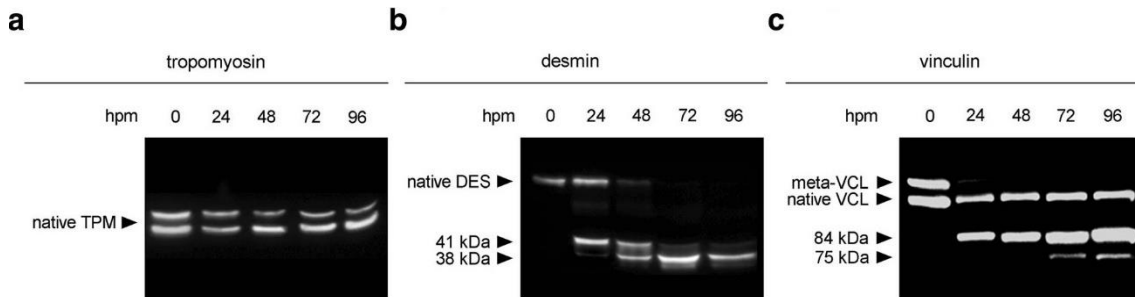


Figura 18. Patrones de degradación en *western blot* de la tropomiosina (a), la desmina (b) y la vinculina (c) en rata (Choi *et al.*, 2019).

Mioglobina

El color del músculo esquelético se debe en gran medida a los cambios redox en la mioglobina y a la formación de complejos entre la mioglobina y otros compuestos exógenos. A pesar de que existe una variación de color evidente en el músculo durante el periodo *post mortem*, al calcular la cantidad de desoximioglobina, oximioglobina y metamioglobina mediante los métodos de Krzywickit y de Viriyarattanasak, técnicas basadas en el uso de espectrofotometría UV visible, en distintos IPM, Zhu *et al* (2021) no encontraron una correlación entre la variación de mioglobina y el IPM en cerdos.

Proteínas de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1)

Las HMGB1 son proteínas intracelulares reguladoras que participan en la transcripción, replicación y reparación de genes. Se liberan pasivamente por la destrucción de células y activamente por macrófagos, monocitos, células NK, células dendríticas, células endoteliales y plaquetas. La liberación pasiva es mayor a la activa en ciertas condiciones clínicas como la isquemia o el shock séptico por la gran destrucción por necrosis (El-Din *et al.*, 2021; Emiral *et al.*, 2021).

El-Din *et al* (2021) detallaron un incremento en los niveles séricos de HMGB1 que se hizo evidente por primera vez a las 6 horas *post mortem*, lo que coincide con la degeneración hidrópica observada en la histología. Los niveles de HMGB1 continuaron elevándose significativamente con el aumento del IPM a las 12 horas y alcanzaron su máximo a las 24 horas. Los hallazgos bioquímicos se correlacionaron con los cambios histopatológicos observados en la piel de las ratas debido a que la autólisis constituye una de las fuentes principales de liberación de esta proteína al torrente sanguíneo.

Por otro lado, Emiral *et al* (2021) no hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de HMGB1 evaluadas en los IPM de 3, 6, 9 y 24 horas. Además, los valores a temperatura ambiente se correlacionaban muy débilmente con el IPM.

Proteína Fosfatasa 2A (PP2A)

La PP2A se encuentra en grandes cantidades en el músculo esquelético de los mamíferos. Una de sus subunidades, la PP2A-C, ha demostrado ser más adecuada para la estimación de IPM temprano que las subunidades PP2A-A y PP2A-B. Entre las características que la hacen más idónea están que sus variaciones se mantienen más constantes entre temperaturas de 15 y 25°C, mientras que la temperatura acelera en mayor medida la degradación de la PP2A-B. La tendencia observada de la PP2A-C durante el periodo *post mortem* consiste en una reducción paulatina de sus niveles hasta aproximadamente un 50% en las primeras 24 horas. Estos niveles se mantienen hasta las 48 horas y posteriormente vuelven a caer hasta ser despreciables (Wang *et al.*, 2021).

Proteínas totales en hígado y bazo

La cantidad de proteínas se podría usar como indicador del IPM porque la degradación de las proteínas comienza tras la disminución de ATP que sigue a la muerte. Al medir las proteínas totales en hígado o bazo de rata por el método de Bradford, procedimiento basado en el uso de un tinte que se une a las proteínas para generar un cambio de color que posteriormente será cuantificado en un espectrofotómetro, encontramos una fuerte correlación lineal negativa entre los niveles de proteínas en cualquiera de ambos órganos y el IPM (Zhang *et al.*, 2024).

Genómica y epigenética

ADN libre en sangre periférica

Durante el periodo *post mortem*, la necrosis y la apoptosis provocan indirectamente la liberación del ADN previamente almacenado en el núcleo hacia la sangre del individuo. Aunque es normal encontrar una pequeña porción de ADN libre en sangre de un individuo sano, en comparación con el periodo *post mortem* hasta las 72 horas los niveles son muy superiores (Emiral *et al.*, 2021).

En ratas se vio una fuerte correlación positiva inicial, con valores máximos de ADN libre en suero que se daban antes (3-9 horas) a temperaturas ambiente que a temperaturas de refrigeración (48-72 horas) (figura 19), por lo

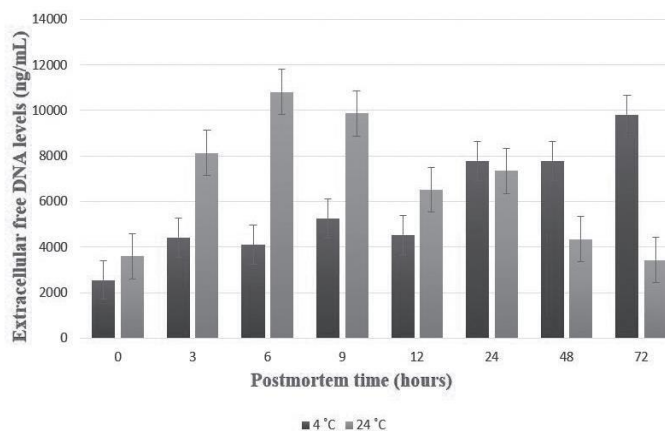


Figura 19. Gráfico de barras comparando valores de ADN libre en ratas diferenciando por temperatura de conservación del cadáver (Emiral *et al*, 2021).

que se puede afirmar que la temperatura de conservación durante el IPM es un factor determinante para esta medición (Emiral *et al.*, 2021).

Fragmentación del ADN

Hay varias características de la molécula de ADN que hacen que sea un componente de gran interés forense para la estimación de IPM. Está presente en la mayoría de células de todas las especies animales, su degradación comienza inmediatamente después de la muerte y no depende en gran medida de la temperatura ni de la causa de muerte (Mostafa *et al.*, 2023).

El ensayo cometa o electroforesis alcalina de células individuales permite separar del ADN de una célula los pequeños fragmentos de ADN que se desprenden como resultado de su deterioro. Sobre las imágenes obtenidas en la electroforesis (figura 20) se pueden hacer mediciones: el número de células que obtienen una “cola de cometa”, la intensidad o porcentaje de ADN en la cola, la longitud de la cola y la distribución o momento del ADN. Todos los parámetros poseen una correlación positiva con el IPM en ratas (Mostafa *et al.*, 2023).

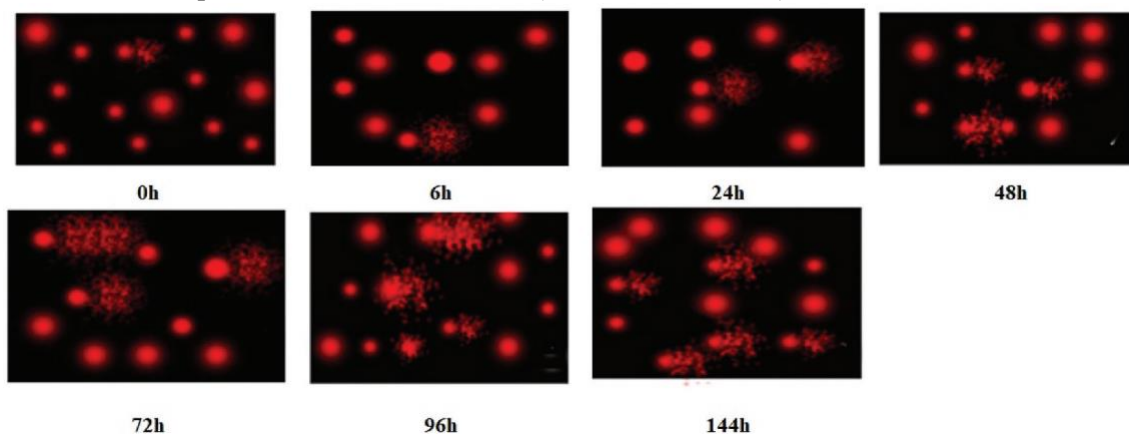


Figura 20. Ensayo cometa de músculo de rata a diferentes IPM (Mostafa *et al.*, 2023).

ARN mensajero

Dentro del campo de la genética, una herramienta que se está estudiando con el objetivo de estimar el IPM es cuantificar la expresión génica *post mortem* de diferentes genes relacionados con procesos como la apoptosis, la autofagia, la respuesta inmune, la respuesta a la hipoxia y el metabolismo de ARN (Guardado-Estrada *et al.*, 2023)

Se dice tanatotranscriptoma a la cantidad de ARN transcrito en las células durante el periodo *post mortem* y se usa como medida de la expresión un gen en cuestión (Halawa *et al.*, 2021). Para ello, es necesario realizar una PCR cuantitativa en tiempo real en conjunto con la determinación del valor umbral de ciclos o *cycle threshold* (*Ct*). Se ha de tener en cuenta que el valor *Ct* es inversamente proporcional a la cantidad del gen seleccionado. Además, es necesaria la normalización del valor comparándolo con la expresión de otro gen de referencia y, en casos en los que se hacen múltiples mediciones en distintos intervalos de tiempo, también se debe comparar

con el valor inicial, para finalmente poder estimar la expresión relativa de un gen. Estos cálculos se pueden expresar como: (Noshy, 2021; Wang *et al.*, 2019).

$$\Delta Ct = Ct(\text{gen objetivo}) - Ct(\text{gen de referencia})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{para cada punto de tiempo}) - \Delta Ct(\text{para control o tiempo 0})$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Wang *et al* (2019) identificaron en el tejido cerebral de ratas a los genes *Ninj2*, *Grifin*, *Hopx* y *Arpp19* como los más prometedores para estimar el IPM temprano. El modelo que proponen sería el de integrar la determinación de la expresión de los cuatro genes mediante la cuantificación del ARNm que produce cada uno de ellos.

En tejido hepático y cerebral, al comparar la expresión de genes proapoptóticos, como Casp3 y Bax, y antiapoptóticos, como Bcl2, se encuentra una correlación positiva de los primeros y negativa con los segundos con el IPM (figura 21), lo que, además de señalar la implicación de la apoptosis con los procesos tempranos *post mortem*, podría permitir establecer modelos matemáticos para la estimación del IPM si se conociera a fondo el comportamiento de estos genes en distintas circunstancias (Halawa *et al.*, 2021; Noshy, 2021; Peng *et al.*, 2020). Una de las variables que se ha estudiado que modifican la expresión de los genes durante

el periodo *post mortem* es el estrés térmico, que aumenta la expresión de algunos genes relacionados con la inflamación o la apoptosis (Halawa *et al.*, 2021).

Otros genes que también se identificaron como posibles marcadores del IPM son algunos de los relacionados con la hipoxia, el estrés y activación neuronal (Peng *et al.*, 2020), la inflamación (Halawa *et al.*, 2021) o la autofagia y el receptor de melatonina 2 (Martínez *et al.*, 2019).

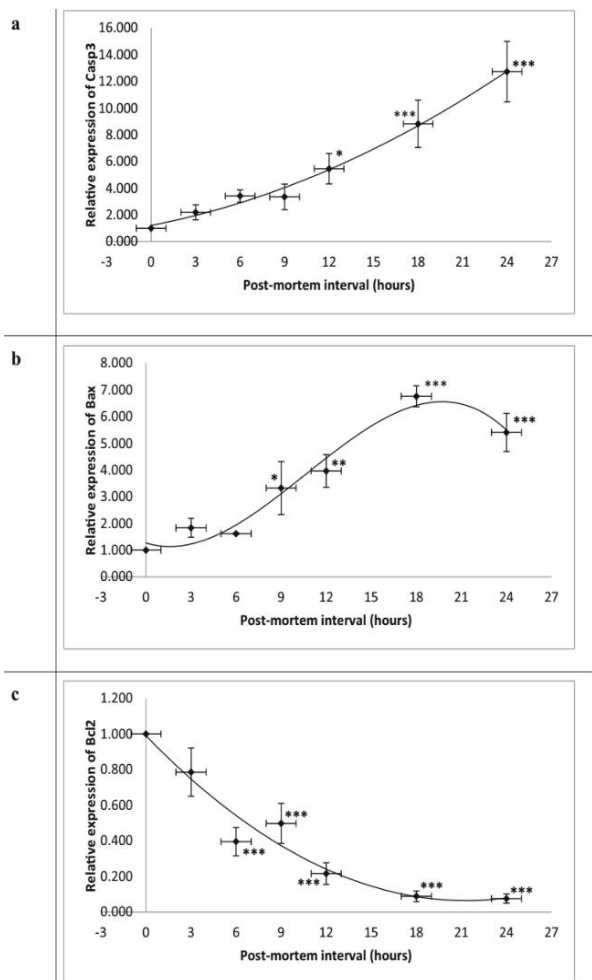


Figura 21. Patrones de expresión genética, en función del IPM, de Casp3 (a), Bax (b) y Bcl2 (c). En el eje de ordenadas está representada la expresión relativa del gen y en el de abscisas el IPM (Noshy, 2021).

MicroARN

El microARN o miARN son cadenas no codificantes de ARN, con entre 18 y 25 nucleótidos, que regulan la expresión del ARNm. Se ha visto que su producción en diferentes tejidos de ratas y humanos perdura durante el periodo *post mortem*. Además, por su tamaño y características físicas, posee una gran resistencia a la degradación, lo que permite que se utilice con fines forenses y, concretamente, para la estimación de IPM (Guardado-Estrada *et al.*, 2023; Martínez-Rivera *et al.*, 2021; Noshay, 2021).

Guardado-Estrada *et al* (2023) analizaron 1218 miARNs del músculo esquelético de ratas tras 24 horas de su muerte y encontraron que la actividad de 84 había disminuido y la de otros 72 había aumentado, indicando cambios en la expresión génica de varios miARN en este tejido. Los que mostraron mayor número de interacciones con ARNm fueron rno-miR-125b-5p, rno-miR-138-5p y rno-miR-291a-3p.

La actividad aumentada de rno-miR-125b-5p está relacionada con el desarrollo muscular y la producción de interleucinas 2, que estimulan la respuesta inmune. Durante el IPM se encuentra un descenso en la actividad de este miARN, lo que acompaña a que encontremos una pérdida muscular después de la muerte (Guardado-Estrada *et al.*, 2023).

Se ha visto que el descenso de actividad de rno-miR-138-5p juega un papel crucial en la inducción del cáncer, por lo que su aparición en el periodo *post mortem* apunta a que su rol principal estaría en la regulación de la autofagia (Guardado-Estrada *et al.*, 2023).

El aumento de actividad de rno-miR-291a-3p se relaciona principalmente con el desarrollo epitelial, pero no se conoce cuál es su papel durante el IPM (Guardado-Estrada *et al.*, 2023)

Martínez-Rivera *et al* (2021) centraron su estudio en miR-381-3p y miR-23b-3p, dos miARNs que participan en rutas metabólicas relacionadas con la hipoxia, la apoptosis y el metabolismo del ARN. La cuantificación de su expresión en *Fold Change* permite conocer cómo varía en el periodo *post mortem* y con ello propusieron un modelo que consigue estimar indirectamente el IPM al comparar los niveles reales de expresión con los estimados según el modelo. Sin embargo, su modelo tiene aún grandes limitaciones, como una gran variabilidad a las 6 horas *post mortem* o no tener en cuenta las variaciones de temperatura y humedad.

Redistribución *post mortem*

La concentración en sangre de fármacos, tóxicos y metabolitos en el momento de la necropsia no coincide con las concentraciones que se encuentran antes del momento de la muerte. Esto se debe a que hay una redistribución entre tejidos de sus concentraciones, que tiene lugar en el periodo *post mortem* (Rohrig, 2019).

Según Rohrig (2019) la redistribución se debe principalmente al cese de los procesos activos, dependientes de energía, que mantenían las concentraciones en vida, y a la difusión pasiva entre tejidos adyacentes hasta alcanzar un equilibrio de gradientes. Las características fisicoquímicas que hacen que una sustancia tienda más a redistribuirse son: un alto volumen de distribución ($>3L/kg$), que sea una base débil ($pK_a > 7$) o tenga un alto coeficiente de reparto octanol/agua, que indicaría que es lipofílica. La velocidad de distribución, además de por las características propias de la sustancia, también estaría influenciada por el intervalo *post mortem*, la condición corporal (descomposición, *rigor mortis*, pH, traumatismos), el movimiento *post mortem* de la sangre, las barreras físicas como válvulas venosas o esfínteres y el sitio anatómico de recolección de la muestra.

De este modo, las concentraciones de la mayoría de los principios activos aumentan con el IPM inicialmente en sangre central y también, aunque más lentamente, se distribuyen hacia sangre periférica. Incluso en un IPM de 5-30 horas ya se pueden apreciar incrementos de concentración en sangre periférica que superan la concentración encontrada *ante mortem* de algunos fármacos (Rohrig, 2019).

La morfina parece distribuirse de forma diferente en ratas hembra y macho y tener una predisposición por ciertos tejidos, especialmente la sangre femoral (Gleba & Kim, 2020).

En cuanto a la cantaridina, un principio activo utilizado para tratar ciertas dolencias en la medicina tradicional china, que también se ha usado como veneno, en un artículo se vio que tenía predisposición por dirigirse hacia el hígado y los riñones de las ratas, alcanzando las concentraciones más elevadas a las 72 horas, para posteriormente disminuir. Los investigadores, tras elaborar una recta de regresión, sugieren que en casos de envenenamiento por cantaridina medir la concentración *post mortem* en hígado podría ser un método eficaz para la determinación del IPM (Zhang *et al.*, 2020).

En conejos se ha visto que, en el caso de un principio activo del cannabis, el tetrahidrocannabinol, que el cadáver se encontrara a temperatura de refrigeración (4°C) o a temperatura ambiente (18-22°C) no eran un condicionante importante hasta por lo menos pasadas las 24 horas *post mortem*, debido a que a partir de ese momento la autólisis comenzaba a ser demasiado severa para ciertas tomas de muestras. Por otro lado, se observó una tendencia en la distribución del principio activo por los tejidos que dependía del IPM, lo que permitiría establecer un patrón: el tetrahidrocannabinol alcanza concentraciones máximas en corazón a las 2 horas y en sangre periférica (venas femorales e ilíacas) a las 16 horas; en pulmones (siendo la vía respiratoria la vía de entrada habitual de este principio activo) se observó la disminución paulatina de su concentración con el paso del tiempo (Cliburn *et al.*, 2023).

Conclusiones

1. Se identificó una amplia gama de técnicas de cronotanodiagnóstico, esta diversidad responde a la necesidad de cubrir todas las situaciones posibles de la práctica forense. Por otro lado, cada técnica posee sus propias ventajas y limitaciones, lo que hace que unas puedan ser más adecuadas que otras en algunos casos, sin que esto limite necesariamente la posibilidad de combinarlas con el fin de obtener más información. Considerando la variedad de técnicas disponibles y las sutilezas de su aplicación, es esencial destacar la importancia de una formación especializada para su empleo de forma efectiva.
2. Se pueden diferenciar dos tendencias marcadas en los tipos de investigación, una hacia el desarrollo de tecnologías portátiles para facilitar su uso en escenas del crimen y otra hacia la creación de modelos matemáticos o basados en aprendizaje automático que buscan una estimación precisa del IPM mediante la cuantificación de distintos parámetros.
3. La especie de estudio más frecuente fue la rata y el ratón debido a su uso en investigación como modelo animal que busca sentar las bases para estudios posteriores en humanos. No obstante, pueden guiar a futuras investigaciones en veterinaria forense.
4. Es necesario seguir profundizando en cómo afectan los factores ambientales e individuales a cada una de las mediciones. Por otro lado, se deben desarrollar estudios que comprueben si los resultados encontrados hasta ahora son de utilidad en más especies animales de interés veterinario.

Bibliografia

- Balkin, D. E., Janssen, L. A., & Merck, M. D. (2012). The Legal System: The Veterinarian's Role and Responsibilities. En M. D. Merck (Ed.), *Veterinary Forensics: Animal Cruelty Investigations* (2.^a ed., pp. 1-16). Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118704738.ch1>
- Battistini, A., Capitanio, D., Bailo, P., Moriggi, M., Tambuzzi, S., Gelfi, C., & Piccinini, A. (2023). Proteomic analysis by mass spectrometry of postmortem muscle protein degradation for PMI estimation: A pilot study. *Forensic science international*, 349, 111774. MEDLINE. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111774>
- Brooks, J. W., & Sutton, L. (2018). Postmortem Changes and Estimating the Postmortem Interval. En J. W. Brooks (Ed.), *Veterinary Forensic Pathology* (Vol. 1, pp. 43-63). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67172-7_4
- Choi, K.-M., Zissler, A., Kim, E., Ehrenfellner, B., Cho, E., Lee, S.-I., Steinbacher, P., Yun, K. N., Shin, J. H., Kim, J. Y., Stoiber, W., Chung, H., Monticelli, F. C., Kim, J.-Y., & Pittner, S. (2019). Postmortem proteomics to discover biomarkers for forensic PMI estimation. *International journal of legal medicine*, 133(3), 899-908. MEDLINE. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02011-6>
- Cliburn, K. D., Kemp, P. M., Huestis, M. A., Wagner, J. R., Payton, M., Liu, L., Liang, Y., & Maxwell, L. K. (2023). Time- and temperature-dependent postmortem Δ^9 -tetrahydrocannabinol concentration changes in rabbits following controlled inhaled cannabis administration. *Journal of analytical toxicology*, 47(9), 850-857. MEDLINE. <https://doi.org/10.1093/jat/bkad076>
- da Fonseca, C. A. R., Paltian, J., Dos Reis, A. S., Bortolatto, C. F., Wilhelm, E. A., & Luchese, C. (2019). Na⁺/K⁺-ATPase, acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities as new markers of postmortem interval in Swiss mice. *Legal medicine (Tokyo, Japan)*, 36, 67-72. MEDLINE. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2018.11.003>
- Dell'Aquila, M., De Matteis, A., Scatena, A., Costantino, A., Camporeale, M. C., & De Filippis, A. (2021). Estimation of the time of death: Where we are now? *La Clinica terapeutica*, 172(2), 109-112. MEDLINE. <https://doi.org/10.7417/CT.2021.2294>
- Derakhshanfar, A., Kian, M., Dehghan, Z., Valizadeh, A., & Moayedi, J. (2022). Comparison of the effects of two methods of euthanasia on post mortem changes in rats: Histopathological and molecular findings. *Comparative Clinical Pathology*, 31(5), 815-826. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s00580-022-03385-7>
- Dhillon, S., Dhillon, N., & Dhillon, B. (2022). Commentary on: Zheng J, Huo D, Wen H, Shang Q, Sun W, Xu Z. Corneal-smart phone: A novel method to intelligently estimate postmortem interval.

- J Forensic Sci. 2021;66(1):356-64. Doi: 10.1111/1556-4029.14611. *Journal of forensic sciences*, 67(4), 1752. MEDLINE. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15041>
- El-Din, E. A. A., Ahmed, S. M., El Shafei, D. A., & Mostafa, H. E.-S. (2021). Implication of High-mobility group box-1 and skin post mortem changes in estimation of time passed since death: Animal and human study. *Legal medicine (Tokyo, Japan)*, 53, 101949. MEDLINE. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2021.101949>
- Emiral, E., Kilicaslan, D. Y., Hamit Hanci, I., & Satiroglu-Tufan, N. L. (2021). Role of cell free DNA and hmgb-1 in postmortem interval determination. *Romanian Journal of Legal Medicine*, 29(1), 1-7. Scopus. <https://doi.org/10.4323/rjlm.2021.1>
- Finnie, J., Manavis, J., Chidlow, G., Casson, R., & Blumbergs, P. (2021). Temporal Sequence of Post-Mortem Autolysis in the Mouse Retina. *Journal of Comparative Pathology*, 187, 17-26. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.jcpha.2021.06.006>
- Garczyńska, K., Tzschätzsch, H., Assili, S., Kühl, A. A., Häckel, A., Schellenberger, E., Berndt, N., Holzhütter, H.-G., Braun, J., Sack, I., & Guo, J. (2021). Effect of Post-mortem Interval and Perfusion on the Biophysical Properties of ex vivo Liver Tissue Investigated Longitudinally by MRE and DWI. *Frontiers in Physiology*, 12. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.696304>
- Gleba, J., & Kim, J. (2020). A Mechanism-Based Forensic Investigation into the Postmortem Redistribution of Morphine. *Journal of analytical toxicology*, 44(3), 256-262. MEDLINE. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz093>
- Guardado-Estrada, M., Cárdenas-Monroy, C. A., Martínez-Rivera, V., Cortez, F., Pedraza-Lara, C., Millan-Catalan, O., & Pérez-Plasencia, C. (2023). A miRNome analysis at the early postmortem interval. *PeerJ*, 11, e15409. MEDLINE. <https://doi.org/10.7717/peerj.15409>
- Guerrero-Urbina, C., Fors, M., Vásquez, B., Rodríguez-Guerrero, M., & Fonseca, G. M. (2021). Histological changes of lingual striated muscle tissue in sprague dawley rats (*Rattus norvegicus*) for estimating the postmortem interval. *International Journal of Morphology*, 39(5), 1502-1508. Scopus. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022021000501502>
- Halawa, A. A., El-Adl, M. A., & Marghani, B. H. (2021). Postmortem Heat Stress upregulates Thanatotranscriptome of Genes encode Inflammation, Apoptosis and Neuronal Stress in Brain of Rats at Short Postmortem Intervals. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 53(3), 271-282. Scopus. <https://doi.org/10.1080/00450618.2019.1682669>
- Jashnani, K. D., Kale, S. A., & Rupani, A. B. (2010). Vitreous Humor: Biochemical Constituents in Estimation of Postmortem Interval. *Journal of Forensic Sciences*, 55(6), 1523-1527. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01501.x>

- Khalifa, F. N., Hosny, S. A., & Moawad, A. M. (2022). Histobiochemical changes in early postmortem interval in liver, pancreas, skin and kidney of adult male albino rats. *Rechtsmedizin*, 32(5), 374-385. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s00194-022-00565-1>
- Kliwer, M. A., Mao, L., Weigman, B. J., Walker, D. C., Gettle, L. M., & Corliss, R. F. (2021). Ultrasound Elastographic Measurement of Rigor Mortis in an Animal Model: A Feasibility Study for Improved Time-of-Death Estimates in Forensic Investigations. *AJR. American journal of roentgenology*, 216(4), 1126-1133. MEDLINE. <https://doi.org/10.2214/AJR.20.22915>
- Locci, E., Bazzano, G., Chighine, A., Locco, F., Ferraro, E., Demontis, R., & d'Aloja, E. (2020). Forensic NMR metabolomics: One more arrow in the quiver. *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*, 16(11), 118. MEDLINE. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01743-6>
- Locci, E., Stocchero, M., Gottardo, R., De-Giorgio, F., Demontis, R., Nioi, M., Chighine, A., Tagliaro, F., & d'Aloja, E. (2021). Comparative use of aqueous humour 1 H NMR metabolomics and potassium concentration for PMI estimation in an animal model. *International journal of legal medicine*, 135(3), 845-852. MEDLINE. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02468-w>
- Locci, E., Stocchero, M., Noto, A., Chighine, A., Natali, L., Napoli, P. E., Caria, R., De-Giorgio, F., Nioi, M., & d'Aloja, E. (2019). A 1 H NMR metabolomic approach for the estimation of the time since death using aqueous humour: An animal model. *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*, 15(5), 76. MEDLINE. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1533-2>
- Martínez, P. N., Menéndez, S. T., Villaronga, M. de L. Á., Ubelaker, D. H., García-Pedrero, J. M., & Zapico, S. (2019). The big sleep: Elucidating the sequence of events in the first hours of death to determine the postmortem interval. *Science & justice: journal of the Forensic Science Society*, 59(4), 418-424. MEDLINE. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2019.03.001>
- Martínez-Rivera, V., Cárdenas-Monroy, C. A., Millan-Catalan, O., González-Corona, J., Huerta-Pacheco, N. S., Martínez-Gutiérrez, A., Villavicencio-Queijeiro, A., Pedraza-Lara, C., Hidalgo-Miranda, A., Bravo-Gómez, M. E., Pérez-Plasencia, C., & Guardado-Estrada, M. (2021). Dysregulation of miR-381-3p and miR-23b-3p in skeletal muscle could be a possible estimator of early post-mortem interval in rats. *PeerJ*, 9. Scopus. <https://doi.org/10.7717/peerj.11102>
- Merck, M. D. (2012). Crime Scene Investigation. En M. D. Merck (Ed.), *Veterinary Forensics: Animal Cruelty Investigations* (2.^a ed., pp. 17-35). Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118704738.ch2>
- Merck, M. D., & Miller, D. M. (2012). Postmortem Changes and the Postmortem Interval. En M. D. Merck (Ed.), *Veterinary Forensics: Animal Cruelty Investigations* (2.^a ed., pp. 255-271). Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118704738.ch14>

- Mohammed, A. T., Abdelfattah-Hassan, A., Abdo, S., Ali, M. I. M., & Wagih, E. (2023). Estimation of the Time Since Death Based on the Post-mortem Histopathological Changes in a Rat Brain: An Observational Study. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 13(3), 526-530. Scopus. <https://www.advetresearch.com/index.php/AVR/article/view/1286>
- Mondello, C., Stassi, C., Minutoli, L., Baldino, G., Alibrandi, A., Spatola, G. F., Uzzo, M. L., Micali, A., Puzzolo, D., Asmundo, A., & Spagnolo, E. V. (2021). Caspase 9 and caspase 3 immunohistochemical pattern in skeletal and cardiac muscles at different times after death: An experimental study on PMI estimation. *Diagnostics*, 11(6). Scopus. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11061062>
- Mostafa, H. E.-S., El-Shafei, D. A., Abouhashem, N. S., & Alaa El-Din, E. A. (2023). Could skeletal muscle changes provide a reliable method for estimating the time since death: A histological, biochemical, and DNA study. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 55(1), 46-58. Scopus. <https://doi.org/10.1080/00450618.2021.1921272>
- Munro, R., & Munro, H. M. C. (2008). 13—Estimation of Time since Death. En R. Munro & H. M. C. Munro (Eds.), *Animal Abuse and Unlawful Killing* (pp. 88-93). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2878-6.50022-2>
- Noshy, P. A. (2021). Postmortem expression of apoptosis-related genes in the liver of mice and their use for estimation of the time of death. *International journal of legal medicine*, 135(2), 539-545. MEDLINE. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02419-5>
- Notohamiprodjo, M., Reiser, M. F., & Sourbron, S. P. (2010). Diffusion and perfusion of the kidney. *European Journal of Radiology*, 76(3), 337-347. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2010.05.033>
- Novakoski, E., Branchini, G., Franco de Oliveira, T., Flôres Kuhn, J., Bueno Motter, S., Lee, P., Krauspenhar Rossato, C., Frau Alveal, V. A., & Bordignon Nunes, F. (2023). Time since death: The histological chronotanatognostic. *Journal of forensic and legal medicine*, 97, 102554. MEDLINE. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2023.102554>
- Ozhathil, L. C., Chen, Y., Nissen, S. D., Banner, J., Tfelt-Hansen, J., & Jespersen, T. (2022). Time matters: Characterization of fibroblast-like cells harvested from pig profundus tendon stored at room temperature at different postmortem time intervals. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 58(8), 633-637. MEDLINE. <https://doi.org/10.1007/s11626-022-00712-8>
- Payne-James, J., Jones, R., Karch, S., & Manlove, J. (2011). Appearance of the Body after Death. En C. Makepeace & J. Silman (Eds.), *Simpson's Forensic Medicine* (13.^a ed., pp. 42-53). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b13324-12>

- Payne-James, J., Jones, R., Karch, S., & Manlove, J. (2013). Principles of Forensic Science. En C. Makepeace & J. Silman (Eds.), *Simpson's Forensic Medicine* (13.^a ed., pp. 1-11). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b13324-30>
- Peng, D., Lv, M., Li, Z., Tian, H., Qu, S., Jin, B., Long, B., Liang, W., & Zhang, L. (2020). Postmortem interval determination using mRNA markers and DNA normalization. *International journal of legal medicine*, 134(1), 149-157. MEDLINE. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02199-7>
- Piegari, G., De Pasquale, V., d'Aquino, I., De Biase, D., Caccia, G., Campobasso, C. P., Tafuri, S., Russo, V., & Paciello, O. (2023). Evaluation of Muscle Proteins for Estimating the Post-Mortem Interval in Veterinary Forensic Pathology. *Animals: an open access journal from MDPI*, 13(4). MEDLINE. <https://doi.org/10.3390/ani13040563>
- Rohrig, T. P. (2019). 13—Postmortem Redistribution. En T. P. Rohrig (Ed.), *Postmortem Toxicology* (pp. 185-198). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815163-1.00013-7>
- Sapienza, D., Asmundo, A., Silipigni, S., Barbaro, U., Cinquegrani, A., Granata, F., Barresi, V., Gualniera, P., Bottari, A., & Gaeta, M. (2020). Feasibility Study of MRI Muscles Molecular Imaging in Evaluation of Early Post-Mortem Interval. *Scientific reports*, 10(1), 392. MEDLINE. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57357-z>
- Shen, Z., Zhong, Y., Wang, Y., Zhu, H., Liu, R., Yu, S., Zhang, H., Wang, M., Yang, T., & Zhang, M. (2024). A computational approach to estimate postmortem interval using postmortem computed tomography of multiple tissues based on animal experiments. *International journal of legal medicine*, 138(3), 1093-1107. MEDLINE. <https://doi.org/10.1007/s00414-023-03127-6>
- Shim, K. (2019). Estimating Postmortem Interval by Bioluminescent Determination of ATP Content in the Muscle of Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of food protection*, 82(4), 703-709. MEDLINE. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-440>
- Sriraman, P. K. (2021). Forensic Necropsy. En *Wildlife Necropsy and Forensics* (1.^a ed., pp. 152-199). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003172017-10>
- Stern, A. W., & Muralidhar, M. (2022). Postmortem Vitreous Humor Analysis in Dogs, Cats and Horses. *Journal of Analytical Toxicology*, 46(1), 103-107. Scopus. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa175>
- Tijssen, M. P. M., Robben, S. G. F., Klein, W. M., & Hofman, P. A. M. (2022). Postmortem Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging of the Brain in Perinatal Death: An Animal Control Study to Detect the Influence of Postmortem Interval. *Topics in magnetic resonance imaging: TMRI*, 31(5), 43-50. MEDLINE. <https://doi.org/10.1097/RMR.0000000000000299>

- Vij, K. (2011). Death and Its Medicolegal Aspects (Forensic Thanatology). En S. Nasim & S. Kumar (Eds.), *Textbook of Forensic Medicine and Toxicology: Principles and Practice* (5.^a ed., pp. 74-99). Elsevier.
- Wang, H., Ma, J., Xu, H., Lyu, Y., Tao, L., Li, W., Zeng, Y., Ma, K., Xiao, B., & Chen, L. (2019). Early postmortem interval (EPMI) estimation using differentially expressed gene transcripts. *Legal medicine (Tokyo, Japan)*, 38, 83-91. MEDLINE. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2019.04.008>
- Wang, J., Chen, G., Qian, H., Shang, Q., Xiao, J., Liang, M., Gao, B., Li, T., & Liu, X. (2021). PP2A-C may be a promising candidate for postmortem interval estimation. *International journal of legal medicine*, 135(3), 837-844. MEDLINE. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02466-y>
- Welson, N. N., Gaber, S. S., Batiha, G. E.-S., & Ahmed, S. M. (2021). Evaluation of time passed since death by examination of oxidative stress markers, histopathological, and molecular changes of major organs in male albino rats. *International journal of legal medicine*, 135(1), 269-280. MEDLINE. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02463-1>
- Wenzlow, N., Neal, D., Stern, A. W., Prakoso, D., Liu, J. J., Delcambre, G. H., Beachboard, S., & Long, M. T. (2021). Feasibility of using tissue autolysis to estimate the postmortem interval in horses. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 33(5), 825-833. MEDLINE. <https://doi.org/10.1177/10406387211021865>
- Zhang, W., Dong, K., Sun, J., Huang, Z., & Shi, P. (2024). The relationship between postmortem interval and protein changes in mice. *Journal of forensic and legal medicine*, 101, 102618. MEDLINE. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2023.102618>
- Zhang, Y., Liu, L., & Ren, L. (2020). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) determination of cantharidin in biological specimens and application to postmortem interval estimation in cantharidin poisoning. *Scientific reports*, 10(1), 10438. MEDLINE. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67278-x>
- Zheng, J., Huo, D., Wen, H., Shang, Q., Sun, W., & Xu, Z. (2021). Corneal-Smart Phone: A novel method to intelligently estimate postmortem interval. *Journal of forensic sciences*, 66(1), 356-364. MEDLINE. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14611>
- Zhu, W., Jia, Z., Zhang, Z., Qian, M., & Yaonan, M. (2021). A study on the myoglobin redox of pig skeletal muscle and post-mortem interval by UV-Vis spectrophotometric technique. *Romanian Journal of Legal Medicine*, 29(1), 8-15. Scopus. <https://doi.org/10.4323/rjlm.2021.8>