



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

Aurelio Luna Maldonado, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Medicina Legal y Forense, médico especialista en Medicina Legal y Forense y en Medicina del Trabajo, responsable de la unidad docente acreditada por el Ministerio de Educación para la formación de Médicos especialistas en Medicina Legal y Forense (programa MIR) de la Universidad de Murcia, director del SECYTEF, servicio Externo de Ciencias Forenses de la Universidad de Murcia, director de las tres ediciones del Máster de Valoración del Daño y de Medicina del Seguro de la Universidad de Murcia y médico forense en excedencia, tiene el honor de emitir el presente informe conjunto sobre los estudios realizados a las muestras remitidas desde el Servicio Médico Legal de Chile y recogidas en la embajada de Chile en Madrid de la mano del vicecónsul, se remitieron por email, el correspondiente acta de recepción, durante el transporte, manipulación y análisis las muestras han estado siempre bajo mi supervisión directa no interrumpiéndose en ningún momento la cadena de custodia.

Para la caracterización bioquímica y estructural del hueso se han realizado los siguientes estudios sobre las dos muestras recibidas:

- Difracción de Rayos X
- Estudio de Composición del hueso mediante Microscopia Electrónica de Barrido con microsonda
- Concentraciones de ADN y bases púricas (Adenina, Guanina, Citosina, Timina, Guanina, Hipoxantina) como marcadores de degradación y para cálculo aproximado de la Data
- Estudio de composición proteica del hueso (Proteómica), mediante análisis por HPLC masas-masas
- Estudio de la matriz lipídica del hueso

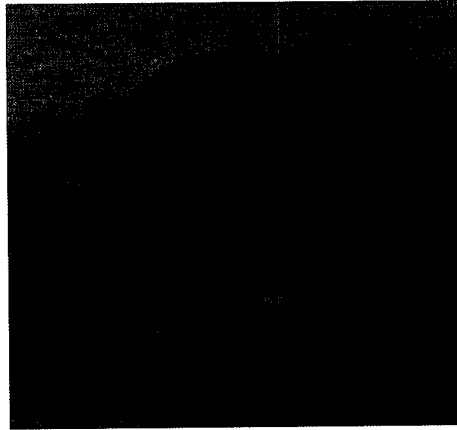


**UNIVERSIDAD
DE MURCIA**

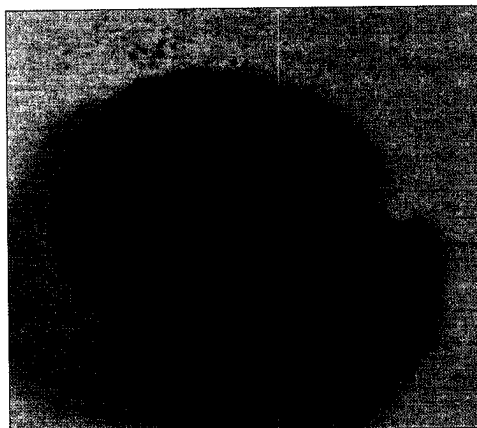
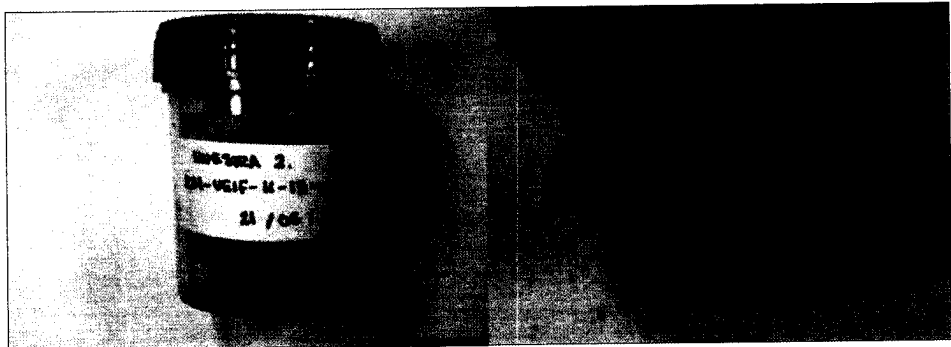
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIOSANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

Muestra 1. RM-UEIF-11-13m-001.5-RF-100 Fémur (zona cortical).



Muestra 2. RM-UEIF-11-13m-001.2-LH-t2 Húmero (zona medular).





UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

A) Estudio de Difracción de Rayos X

I. Referencia

H-PN-1: RM-UEIF-11-13m-001. 2-LH-t2. Húmero.

H-PN-2: RM-UEIF-11-13m-001.5- RF-100. Fémur.

II. Objetivo

Se someten las muestras a diferentes espectroscopías para tratar de observar diferencias entre ellas y para poder identificar alguna anomalía con respecto a otras muestras de edad biológica similares y con un periodo *postmortem* similar (40 años).

III. Metodología

Las muestras se molieron en mortero de ágata hasta obtener un tamaño homogéneo, que fuese inferior a 50 μ , y posteriormente, se sometieron a análisis por difracción de rayos X y espectrometría FTIR-ATR.

IV. Resultados

Difracción de Rayos X

- Identificación y cuantificación de componentes

Los resultados obtenidos muestran unos espectros muy similares, con un mayor contenido en amorfos y mejor definición para H-PN-2 respecto a H-PN-1 (Figuras 1 y 5).

La identificación de fases presentes es de Fluorapatito para ambas muestras (referencia JCPDS 15-0876), con contenidos variables en amorfos, 11% para H-PN-1 y 15% para H-PN-2.

Esta opción es la conservadora, si bien, se podría haber escogido Carbonatohidroxiapatito (CH-apatito, referencia JCPDS 19-0272) como otra fase presente, pero los resultados no hubieran variado en lo fundamental.

En este supuesto, los porcentajes atribuidos a las fases cristalinas identificadas serían para H-PN-1, 54% de CH-apatito y 35% de Fluorapatito y para H-PN-2 50% de CH-apatito y 35% Fluorapatito, conservando el mismo porcentaje de amorfos anteriormente calculado.

- Características cristalográficas

A partir de los espectros obtenidos se ha procedido a un refinamiento simple de parámetros cristalinos, con objeto de observar una buena identificación de las reflexiones más características del apatito identificado en las muestras de estudio.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

Los resultados obtenidos muestran una escasa desviación de los valores dados en la base de datos de referencia (JCPDS) para la ficha 19-0876, obteniendo unos valores del parámetro *a* de 9,3706 Å y 9,3833Å, para H-PN-1 y H-PN-2 respectivamente y de *c* de 6,8668 Å, para ambas muestras, siendo los valores de referencia de 9,3684 Å de *a* y 6,8841 Å de *c*.

Otra característica muy importante es conocer el grado de cristalinidad de la muestra, que es función del tamaño de cristalito. Para ello se calcula según la ecuación de Scherrer utilizando las reflexiones (002), (310) y (211), siendo inversamente proporcional al valor de la anchura de pico.

Los resultados, recogidos en la tabla 1, muestran una interesante particularidad, la muestra H-PN-2 presenta un tamaño de cristalito mayor, y por tanto un mayor grado de cristalinidad frente a la muestra H-PN-1, aunque contenga una proporción más elevada de amorfos.

Reflexión	(002)	(310)	(211)
H-PN-1	14 nm	17 nm	6 nm
H-PN-2	14 nm	5 nm	6 nm

Las figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 muestran las reflexiones seleccionadas.

- Estudio por FTIR

La espectroscopia de FTIR es una técnica complementaria para el estudio de los materiales sólidos, utilizándose en este caso para poder aportar un mayor conocimiento cualitativo de las diferencias encontradas entre estas muestras.

Las figuras 9 y 10 muestran los espectros obtenidos para estas muestras.

La tabla 2 relaciona la longitud de onda del espectro de FTIR con el grupo funcional componente del hueso asociado.

λ aproximada	Grupo funcional
565	$\gamma_4\text{PO}_4$
605	$\gamma_4\text{PO}_4$
630-650	OH
874	$\gamma_2\text{CO}_3$
1028-1100	$\gamma_3\text{apatito}$
1400-1550	CO_3
1630-1660	Materia orgánica
3400	OH – H ₂ O

La Figura 11 relaciona ambas muestras, observándose diferentes detalles.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO-SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

La muestra H-PN-2, que contiene más amorfos, coincide con un pico más desarrollado para la zona de 1630 que la muestra H-PN-1. También muestra una presencia mayor de enlaces OH y de moléculas de agua.

También se corroboran los resultados de cristalinidad de las muestras desde un punto de vista cualitativo, sin calcular relaciones de área de pico, observando el menor desarrollo de las bandas asignadas a los grupos fosfato en H-PN-1 frente a los obtenidos en H-PN-2.



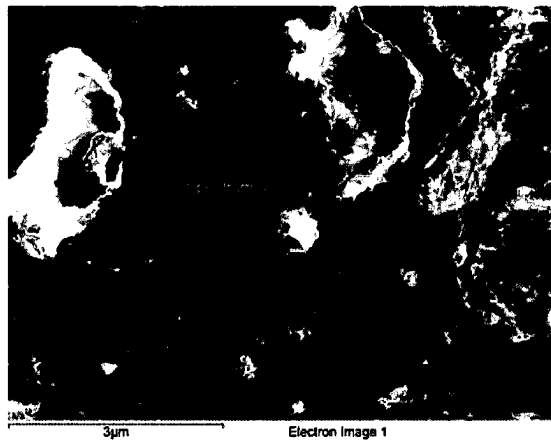
UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

B) Estudio de composición del hueso mediante Microscopía Electrónica de Barrido con microsonda

Microscopia de Scanning Muestra nº 1. RM-UEIF-11-13m-001.5-RF-100 (Fémur).



Condiciones técnicas:

Processing option : All elements analyzed (Normalised)

Number of iterations = 4

Standard :

C CaCO₃ 1-Jun-1999 12:00 AM

O SiO₂ 1-Jun-1999 12:00 AM

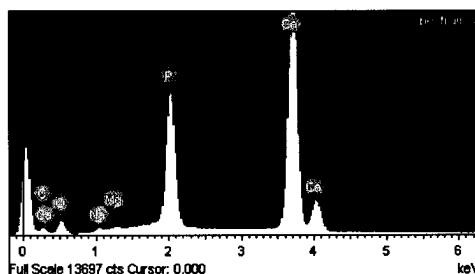
Na Albite 1-Jun-1999 12:00 AM

Mg MgO 1-Jun-1999 12:00 AM

P GaP 1-Jun-1999 12:00 AM

Ca Wollastonite 1-Jun-1999 12:00 AM

Resultados



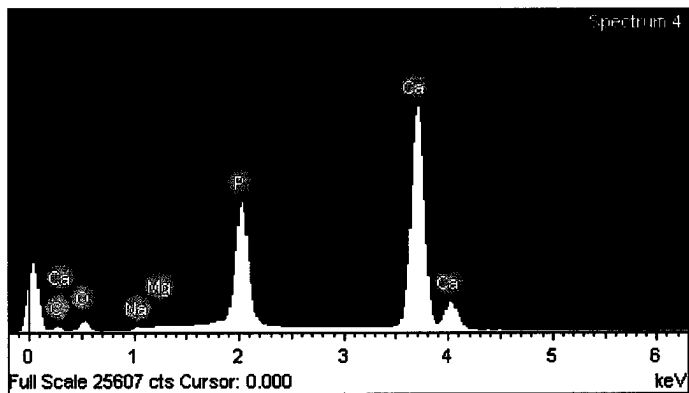
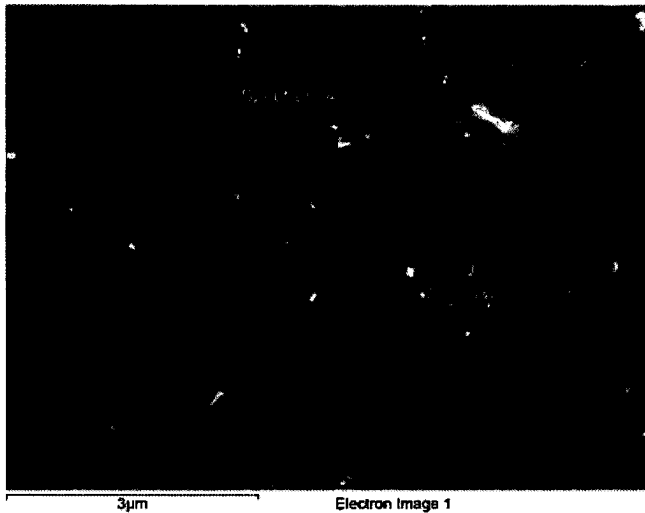


UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

Element	Weight%	Atomic%
C K	20.78	36.87
O K	22.62	30.14
Na K	0.61	0.56
Mg K	0.33	0.29
P K	16.19	11.14
Ca K	39.47	20.99





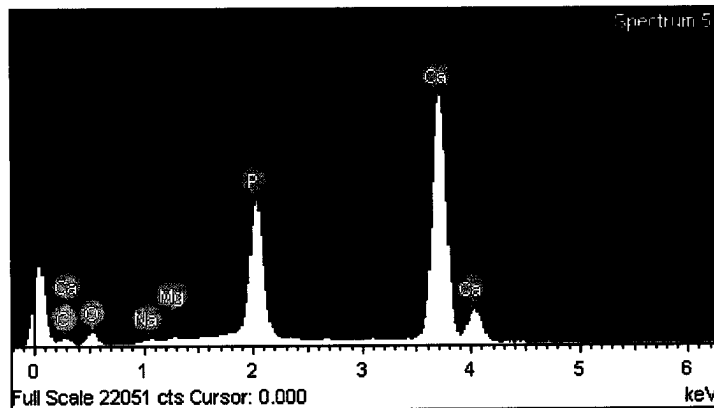
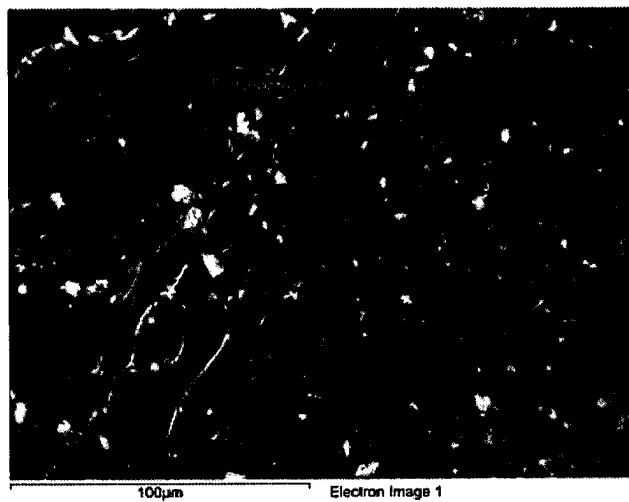
UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

Element	Weight%	Atomic%
C K	20.65	37.02
O K	21.55	29.01
Na K	0.53	0.49
Mg K	0.25	0.23
P K	16.57	11.52
Ca K	40.45	21.73

Totals 100.00



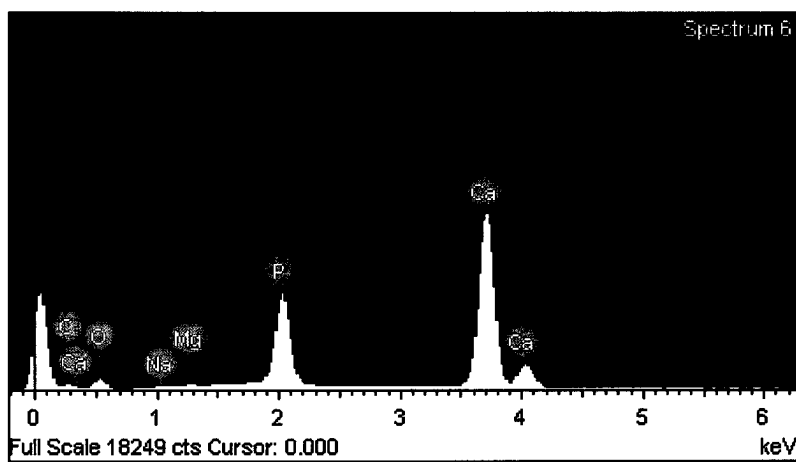


UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO-SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

Element	Weight%	Atomic%
C K	24.28	41.73
O K	21.44	27.66
Na K	0.48	0.43
Mg K	0.31	0.27
P K	15.64	10.42
Ca K	37.83	19.48
Totals	100.00	





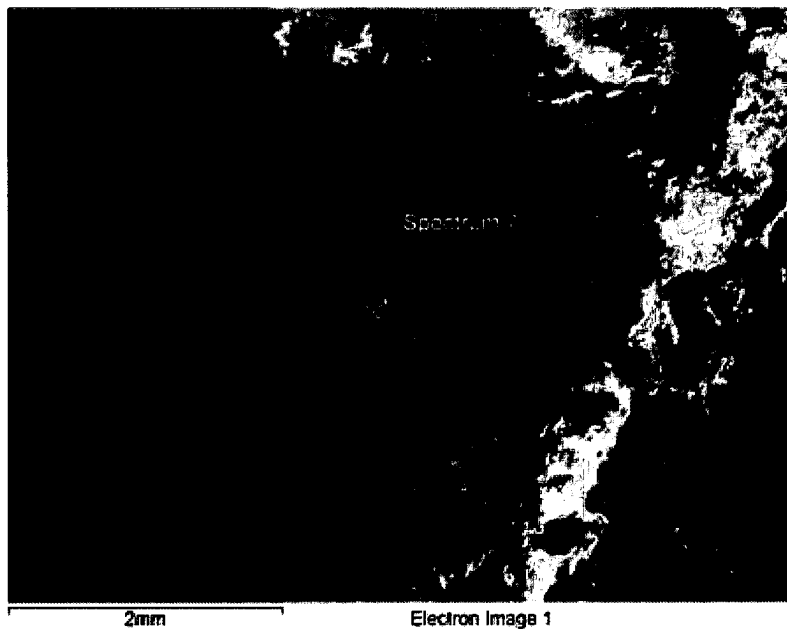
UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

Element	Weight%	Atomic%
C K	22.64	38.61
O K	25.30	32.39
Na K	0.42	0.37
Mg K	0.26	0.22
P K	14.28	9.44
Ca K	37.11	18.97
Totals	100.00	

Muestra nº 2 (bajo el nivel de lavado), RM-UEIF-11-13m-001.2-LH-t2 (Húmero)

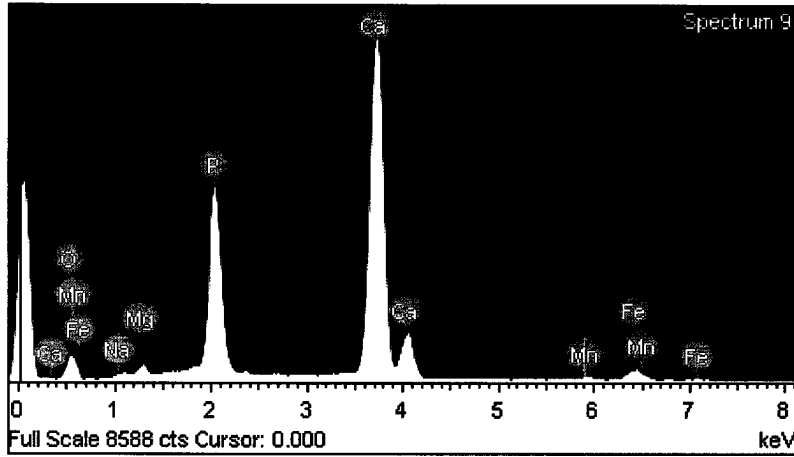




**UNIVERSIDAD
DE MURCIA**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina



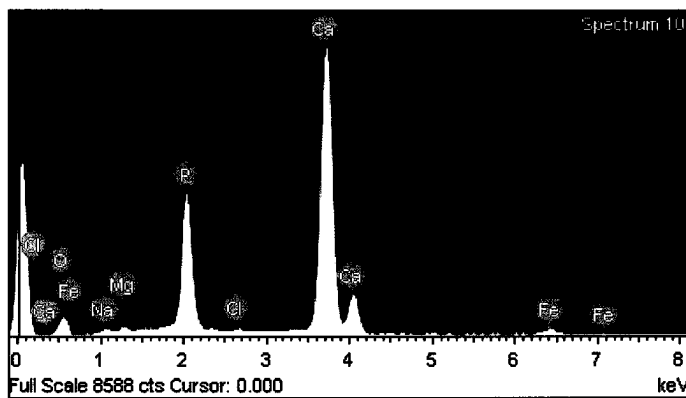
Element	Weight%	Atomic%
O K	31.16	51.18
Na K	0.74	0.84
Mg K	1.26	1.36
P K	18.44	15.65
Ca K	44.26	29.01
Mn K	0.81	0.39
Fe K	3.33	1.57
Totals	100.00	



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina



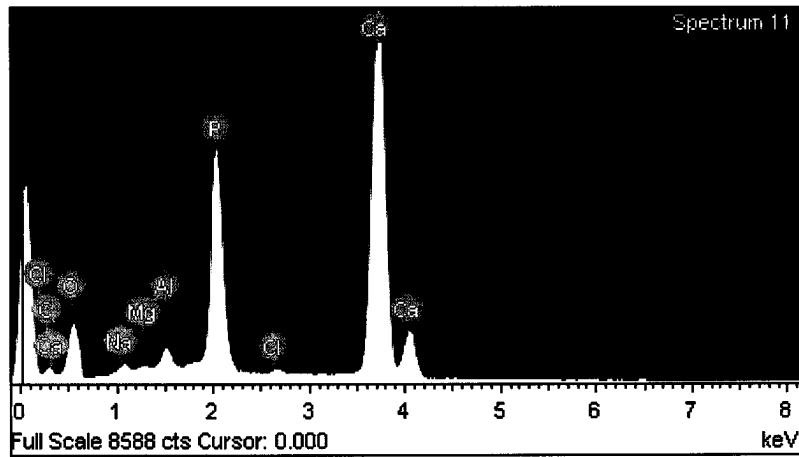
Element	Weight%	Atomic%
O K	31.20	51.29
Na K	0.70	0.80
Mg K	0.70	0.76
P K	17.03	14.46
Cl K	0.42	0.31
Ca K	47.82	31.37
Fe K	2.13	1.00
Totals	100.00	



**UNIVERSIDAD
DE MURCIA**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO-SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina



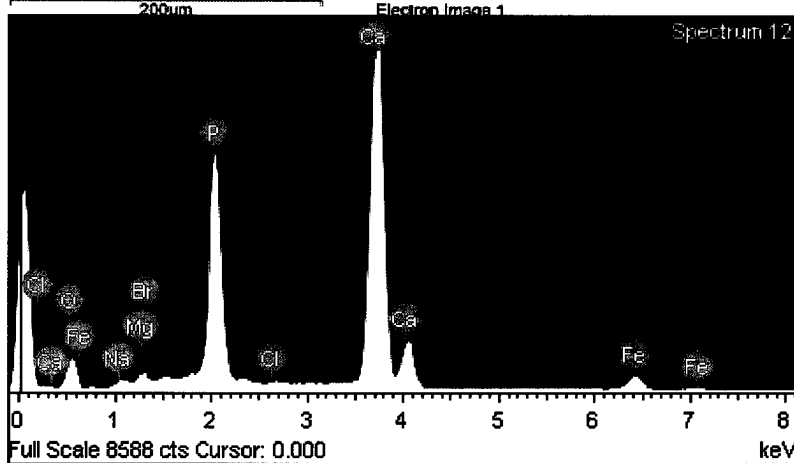
Element	Weight%	Atomic%
C K	17.08	28.26
O K	37.52	46.60
Na K	0.83	0.72
Mg K	0.31	0.25
Al K	1.02	0.75
P K	13.41	8.60
Cl K	0.31	0.18
Ca K	29.51	14.63
Totals	100.00	



**UNIVERSIDAD
DE MURCIA**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIOSANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina



Element	Weight%	Atomic%
O K	33.49	53.73
Na K	0.86	0.96
Mg K	1.02	1.07
P K	19.54	16.19
Cl K	0.31	0.22
Ca K	40.40	25.87
Fe K	3.90	1.79
Br L	0.49	0.16
Totals	100.00	



UNIVERSIDAD DE MURCIA

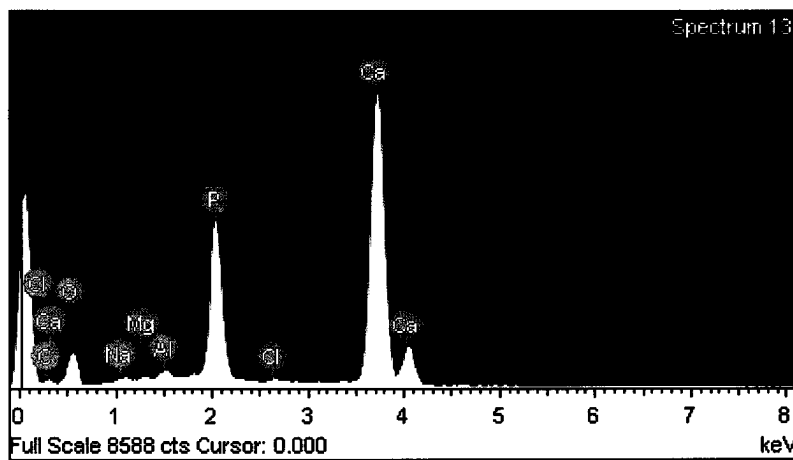
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIOSANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina



200µm

Electron Image 1



Spectrum 13

0 1 2 3 4 5 6 7 8 keV
Full Scale 8588 cts Cursor: 0.000

Element	Weight%	Atomic%
C K	11.96	21.21
O K	36.54	48.63
Na K	0.66	0.61
Mg K	0.36	0.31
Al K	0.60	0.47
P K	14.44	9.92
Cl K	0.31	0.18
Ca K	35.13	18.66
Totals	100.00	



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIOSANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

C) Estudio de caracterización bioquímica del hueso

I. Composición del hueso en condiciones normales

El hueso en condiciones normales está formado por matriz ósea la cual contiene un 35% de componentes orgánicos (fase orgánica) y un 65% de componentes inorgánicos (fase mineral).

En la fase mineral, los iones mayoritarios son el calcio y el fosfato, que forman sales complejas de estequiometría variable, siendo la más importante en este caso la hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ que además de los iones mencionados también contiene otros aniones, sobre todo hidroxilo y componentes tales como el carbonato de calcio, fluoruro de calcio, hidróxido de calcio y citrato. Esta fase es una red iónica compleja que puede considerarse formada por pequeños cristales, los cuales se distribuyen en los espacios intersticiales que separan las fibras de colágeno de tipo I y se alinean a lo largo de las mismas (Solano-Muñoz & Lozano-Teruel 1998).

La fase orgánica que representa la fase minoritaria de la matriz ósea y cuya composición mayoritaria son proteínas, aunque también encontramos lípidos en menor concentración, suele dividirse en dos partes, el colágeno tipo I y la fracción no-colagenosa, más heterogénea. El colágeno puede suponer hasta el 90% de la proteína total de los tejidos calcificados (Solano-Muñoz & Lozano-Teruel 1998).

En el 10% proteico restante que completa la matriz orgánica se encuentran proteínas específicas del hueso como proteoglicanos y sialoproteínas, como la sialoproteína ósea y la osteopontina, las cuales son glicoconjugados, proteínas ácidas ricas en los aminoácidos ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu) (Lozano-Teruel et al. 2005), tales como la osteocalcina (BPG o proteína ósea con γ -Glu) y la proteína γ -Gla-matricial, fosfoproteínas ácidas como la osteonectina así como albúminas, globulinas y péptidos dializables que parecen quedar atrapados en la matriz al mineralizarse ésta, pero se encuentran en menor cantidad que las primeras (Solano-Muñoz & Lozano-Teruel 1998).

II. Diagénesis del tejido óseo

Durante la diagénesis, las proteínas del hueso son eliminadas, lo cual da lugar primero a un cambio en la organización (Miles et al. 2000) y en última instancia a la gelatinización y la pérdida de colágeno (Collins et al. 1995), siendo reemplazadas por sustancias inorgánicas.

Además del deterioro químico de la fase orgánica también encontramos otras vías de diagénesis, como son el deterioro de la fase mineral (Castaños et al. 2010). La hidroxiapatita está formada por cristales de pequeño tamaño lo que les hacen ser muy reactivo durante los procesos de diagénesis (Trueman 1999; Trueman & Tuross 2002), lo que favorece la exposición del colágeno por lo que se acelera la degradación química y biológica y por último el ataque microbiológico (Collins et al. 2002), que puede ocurrir rápidamente después de la muerte (Yoshino et al. 1991; Bell et al. 1996).



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIOSANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

Debido a los procesos de destrucción citados, biomoléculas como el ADN y otras, como las proteínas y los lípidos que se encuentran dentro de los espacios del hueso podrían encontrarse en cantidades pequeñas o como productos de degradación de las moléculas más complejas.

Respecto al ADN podemos decir que estudios de diferentes autores señalan que el material genético se degrada más rápidamente en tejidos blandos que en huesos, debido a la estructura más resistente del último que actúa como barrera física frente a las influencias tafonómicas (Barrio-Caballero 2013). La densidad del hueso también es un factor importante que influye en su preservación (Galloway et al. 1997). El ADN está normalmente menos degradado en las porciones más densas del esqueleto, como el fémur y la tibia (Barrio-Caballero 2013). Algunas publicaciones sugieren que el ADN está mejor preservado en clavículas que en costillas (Perry et al. 1988), en huesos largos más densos que en elementos menos densos (Edson et al. 2004; Milós et al. 2007).

La degradación del ADN se produce a través de la reducción en la longitud de la cadena, por lo que esto da lugar a moléculas más sencillas como los mononucleótidos y sus componentes químicos los cuales son: fosfato, un azúcar (desoxirribosa) y 4 bases nitrogenadas: adenina y guanina (purinas) y citosina y timina (pirimidinas) (Griffiths et al. 2000) así como bases minoritarias como la hipoxantina y la xantina (producto de la síntesis de *ново* de las purinas).

En último lugar, respecto a los lípidos podemos decir que las moléculas que se encuentran en el hueso tras largos periodos de tiempo son en primer lugar colesterol, en cantidades apreciables junto con productos de degradación de los lípidos así como acil-lípidos. Ambas moléculas se han detectado en hueso medular y en la cavidad medular (Collins et al. 2002).

Sabiendo esto por tanto, podemos decir que es posible realizar una caracterización bioquímica de las moléculas citadas anteriormente de la matriz orgánica del hueso.

III. Material y métodos

El estudio de caracterización bioquímica se realizó sobre dos muestras:

- ⊕ RM-UEIF-11-13m-001.5-RF-100 Fémur (zona cortical).
- ⊕ RM-UEIF-11-13m-001.2-LH-t2 Húmero (zona medular).

Ambas muestras fueron seccionadas en el SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de Murcia y posteriormente fueron molidas con un molino de bolas.

a. Tratamiento de las muestras

1. Extracción de ADN, bases nitrogenadas, proteínas y péptidos siguiendo una combinación de dos protocolos modificados, el protocolo de Jiang et al. (Jiang et al. 2007) y el protocolo de Schweitzer (Cleland et al. 2012).

- a) Pesar 1,5 gramos de hueso medular y cortical.
- b) Lavar en 15 ml de PBS 1X el pulverizado (relación 1:10).
- c) Agitar de forma continua 72 horas.
- d) Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

- e) Separar sobrenadante de precipitado.
- f) Tomar 1 ml de sobrenadante y añadir 10 ml de buffer Tris-HCl Guanidina (relación 1:10).
- g) Refrigerar durante 72 horas las muestras a 4°C.

Tabla 1. Composición Tampón Fosfato Solución Salina, PBS 10X pH 7,4.

Compuesto	PM (g/mol)	[] (M)	Peso (gramos)
NaCl	58,44	1,37	80,6
KCl	74,56	0,027	2,01
Na ₂ HPO ₄	141,96	0,1	14,2
K ₂ HPO ₄	174,18	0,018	3,14

Tabla 2. Composición Buffer Lisis Tris-HCl Guanidina 1X pH 7,4.

Compuesto	PM (g/mol)	[] (M)	Peso (gramos)
Tris	121,14	0,01	0,04
HCl-Guanidina	95,53	6	17,2
NaH ₂ PO ₄	137,99	0,1	0,42

2. Extracción de lípidos siguiendo el protocolo de Folch et al. (Folch et al. 1957) aplicando modificaciones.

- a) Pesar 1,5 g de hueso medular y cortical.
- b) Añadir 15 ml de cloroformo-metanol (2:1) en un tubo de centrifuga.
- c) Agitación continua durante 72h.
- d) Centrifugar 5 minutos a 2000 rpm.

b. Análisis de las muestras

1. Análisis de bases nitrogenadas. Cromatografía de alta resolución con detector UV.

Para la detección de 6 bases nitrogenadas, adenina, guanina, citosina, timina, hipoxantina y xantina en los restos para poner de manifiesto la presencia de productos de degradación de ADN en los huesos estudiados.

Se inyectan 40 µl de estándares de concentración conocida y muestras en un sistema consistente en un HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con un micro-automuestreador termostatzado G1377A, una bomba capilar G1376A, un compartimento termostatzado para columnas de HPLC G1316A y un detector de absorbancia UV-Vis G1365D.

Cada muestra se inyectó en el equipo hasta una columna de HPLC específica para la separación y análisis de compuestos polares como las bases nitrogenadas (Agilent Zorbax SB-Aq (5 µm, 150 × 2.1 mm), colocada en el compartimento de columnas termostatzado a 40 °C. El flujo utilizado fue de 200 µl/min y tras la inyección, los compuestos se separaron y analizaron en modo



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIOSANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

isocrático con tampón A (50 mM acetato sódico pH 4.8 ajustado con ácido acético) durante 60 min. Se adquiere la señal UV-Vis a 254 nm característica de las bases nitrogenadas.

Las muestras se filtraron a través de 0.22 μm antes de inyectarse.

Se analizaron estándares en concentraciones conocidas; 41,67, 10, 1 y 0,1 μM , muestras y blancos (buffer de extracción de las muestras) en las mismas condiciones. Los picos obtenidos en las inyecciones de estándares y blancos sirvieron para definir los intervalos de tiempo para la integración de las señales correspondientes a cada compuesto (según su tiempo de retención o RT). Se elaboraron rectas de calibrado con cada compuesto a partir de las cuales se determinó la concentración de los mismos en cada muestra.

El procesamiento de los datos se realizó con el programa de análisis DataAnalysis para Chemstation y LC/MSD Trap Version 3.3 (Bruker Daltonik, GmbH, Germany).

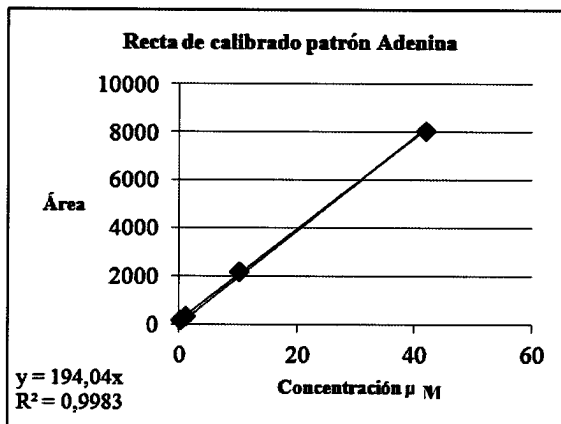


Figura 1. Recta de calibrado patrón Adenina (y= área del pico, x= concentración).

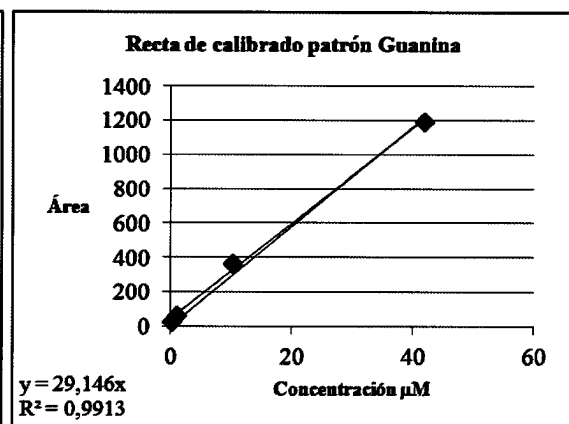


Figura 2. Recta de calibrado patrón Guanina (y= área del pico, x= concentración).

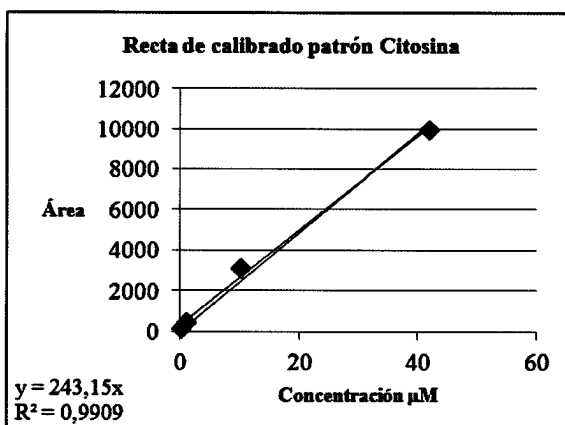


Figura 3. Recta de calibrado patrón Citosina (y= área del pico, x= concentración).

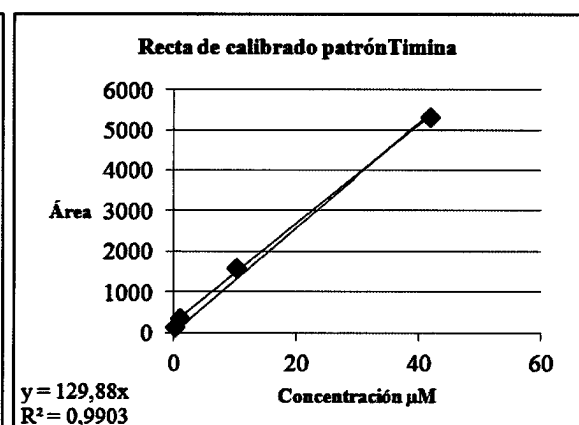


Figura 4. Recta de calibrado patrón Timina (y= área del pico, x= concentración).



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIOSANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

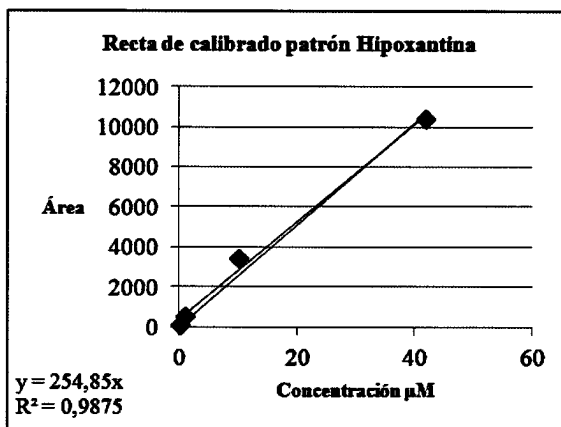


Figura 5. Recta de calibrado patrón Hipoxantina
(y= área del pico, x= concentración).

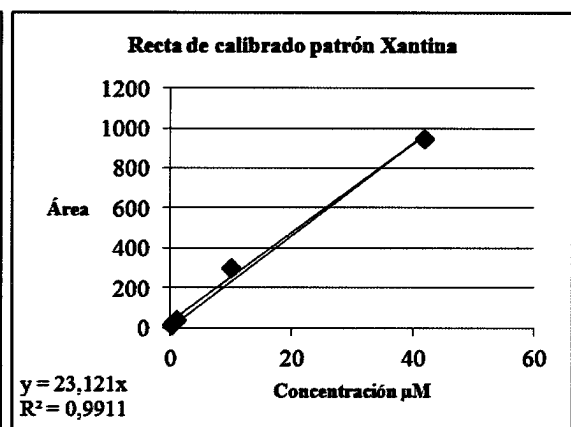


Figura 6. Recta de calibrado patrón Xantina
(y= área del pico, x= concentración).

2. Análisis de ADN. Espectrofotometría de absorción con detector UV.

Para determinar la presencia y concentración de ADN se inició el análisis con la filtración de las 2 muestras para eliminar las posibles partículas que pudieran contener las mismas y a continuación se llevó a cabo la extracción de 2 μl de cada muestra para la determinación de la concentración en $\text{ng}/\mu\text{l}$ de ácidos nucleicos, lo cual se determinó midiendo a 260 nm y comparando con un blanco, para ello se utilizó NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer.

3. Análisis Péptidos. Cromatografía de alta resolución con detector masas-masas.

Se inyectaron 40 μl de cada de las 2 muestras en un sistema consistente en un HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) con una columna de HPLC específica para la separación y análisis de péptidos (Waters Xbridge BEH300 C18 (5 μm , 150 \times 1 mm). El flujo utilizado fue de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ y tras la inyección la columna se lavó con 100% tampón A (agua MilliQ:acetonitrilo:ácido fórmico, 94.9:5:0.1) durante 10 min. A continuación los péptidos se separaron en un gradiente lineal de 0-80% de tampón B (agua MilliQ:acetonitrilo:ácido fórmico, 9.9:90:0.1) de 180 minutos de duración. Finalmente la columna recuperó las condiciones iniciales durante 15 minutos antes de un nuevo análisis.

El espectrómetro de masas opera en modo positivo con las siguientes condiciones de la fuente electrospray (ESI): voltaje del capilar de 3500V, presión de 15 psi, flujo de 5 l/min y temperatura de 350 $^{\circ}\text{C}$. Además, mide a una velocidad de 8100 (m/z)/seg en el rango de tamaño de 50-2200 m/z, con una diana óptima de medida de 1000 m/z y un promediado de 3 espectros. Los datos MS y MS/MS se recogieron en modo AutoMS, de forma que tras cada scan sencillo, los cinco iones más intensos se sometieron a aislamiento y fragmentación por disociación inducida por colisión con helio (CID) con una anchura de aislamiento de 2 m/z y una energía de colisión relativa de 35%.

4. Cuantificación de proteínas. Método del Ácido Bincinonínico, sensible y selectivo para la estimación de la concentración de proteína total en las muestras.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIOSANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

5. Análisis de lípidos. Espectrometría de masa exacta TOF/Q-TOF (Analizador del tiempo de vuelo) y cuantificación residuo graso.

El espectrómetro de masas en este caso sirve para la identificación y cuantificación de lípidos en las muestras. Se inyectaron de forma directa 3 μ l de cada muestra en el sistema de espectrometría de masa exacta HPLC-TOF Agilent 6220 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La fuente de ionización empleada, electrospray (ESI), opera en modo negativo con las siguientes condiciones: voltaje del capilar de 3000V, presión de 40 psi, flujo de 9 l/min y temperatura de 350 °C. Además, mide a una velocidad de 8100 (m/z)/seg en el rango de tamaño de 100-3200 m/z. La técnica de separación usada es un analizador de tiempo de vuelo (TOF) en combinación con cuadropolo (Q) en modo SCAN. Por último, el sistema de detección para la obtención del espectro de masas fue el propio espectrómetro de masas, que registró la corriente iónica total generada en la fuente iónica, representación gráfica es el cromatograma o TIC (Total Ion Current).

Se realizó también con el producto tratado con cloroformo-metanol una cuantificación del residuo graso de las muestras mediante evaporación directa durante 24 horas.

IV. Resultados

Los resultados obtenidos se explicaran siguiendo la estructura fijada en el apartado anterior, Material y métodos.

1. Detección de bases nitrogenadas y bases minoritarias.

Tabla 3. Concentración bases nitrogenadas en ng/mg de hueso.

Muestras	[Adenina] ng/mg hueso	[Guanina] ng/mg hueso	[Citosina] ng/mg hueso	[Timina] ng/mg hueso	[Hipoxantina] ng/mg hueso	[Xantina] ng/mg hueso
RM-UEIF-11-13m-001.5- RF-100 Fémur	4,065 e-9	2,008 e-8	7,608 e-9	4,278 e-9	2,004 e-9	2,159 e-8
RM-UEIF-11-13m-001.2- LH-t2 Húmero	3,178 e-9	1,599 e-8	6,062 e-9	3,027 e-9	1,590 e-9	1,631 e-8

2. Detección y cuantificación ADN total en muestras.

Tabla 4. Concentración ADN en ng/mg de hueso.

Muestras	[ADN] ng/mg hueso
RM-UEIF-11-13m-001.5-RF-100 Fémur	1277,5 e-6
RM-UEIF-11-13m-001.2-LH-t2 Húmero	1606 e-6



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

3. Análisis de proteínas y péptidos.

⊕ Muestra RM-UEIF-11-13m-001.5-RF-100 Fémur

Tabla 5. Contenido de péptidos, secuencias y proteínas en muestra de húmero.

Group	Spectra	Peptides	Score	Cover %	Intensity	Protein MW	pI	Species	Database	Protein Name
1	1	1	3.50	1	3.80e+005	93466.8	9.21	Homo sapiens	296439373	collagen alpha-1(I)(X) chain

z	Score	SPI%	Intensity	m/z	Protein MW	pI	Species	Database	Protein Name	Sequence
1	3.50	80.7	380126	1013.62	93466.8	9.21	Homo sapiens	296439373	collagen alpha-1(I)(X) chain	(V)PGIDGDGR(G)

⊕ Muestra RM-UEIF-11-13m-001.2-LH-t2 Húmero

Tabla 6. Contenido de péptidos, secuencias y proteínas en muestra de fémur.

Group	Spectra	Peptides	Score	Cover %	Intensity	Protein MW	pI	Species	Database	Protein Name
1	1	1	3.85	0	7.54e+005	138033.1	5.65	Homo sapiens	296439504	collagen alpha-1(I) chain precursor
2	2	1	3.40	3	5.24e+005	33670.2	4.95	HUMAN	108935845	RecName: Full=Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2
3	1	1	3.07	2	5.13e+005	57857.5	10.00	HUMAN	61212252	RecName: Full=Carbohydrate sulfotransferase 2
4	1	1	3.06	5	9.67e+005	21634.6	11.73	Homo sapiens	119572748	ribosomal protein L18, isoform CRA_e

z	Score	SPI%	Intensity	m/z	Protein MW	pI	Species	Database	Protein Name	Sequence
1	3.85	94.7	753529	1169.03	138033.1	5.65	Homo sapiens	296439504	collagen alpha-1(I) chain precursor	(G)IEPGKAGERGLPG(P)
1	3.40	61.3	526409	1015.10	33598.1	5.00	Homo sapiens	13937888	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	(P)PPPPARAV(V)(P)
1	3.32	61.6	521551	1015.43	33598.1	5.00	Homo sapiens	13937888	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	(P)PPPPARAV(V)(P)
1	3.07	77.0	513129	1300.38	57857.5	10.00	HUMAN	61212252	RecName: Full=Carbohydrate sulfotransferase 2	(G)PPRAHARLDLR(T)
1	3.06	75.9	967212	1168.88	21634.6	11.73	Homo sapiens	119572748	ribosomal protein L18, isoform CRA_e	(R)PPLSLSRMIR(K)

4. Concentración total de proteínas en muestras.

Tabla 7. Concentración de proteínas en mg/g de hueso.

Muestras	[Proteínas] mg/g hueso
RM-UEIF-11-13m-001.5-RF-100 Fémur	7,667
RM-UEIF-11-13m-001.2-LH-t2 Húmero	13,667

5. Identificación de lípidos en muestras y cuantificación residuo graso.

Tabla 8. Espectros ácidos grasos en muestras de hueso.

Ácidos Grasos	Espectro
Linoleico	279.2324
Oleico	281.2481
Palmítico	255.2324
Estearico	283.2637
Linolénico	278.2246
Colesterol	385.347



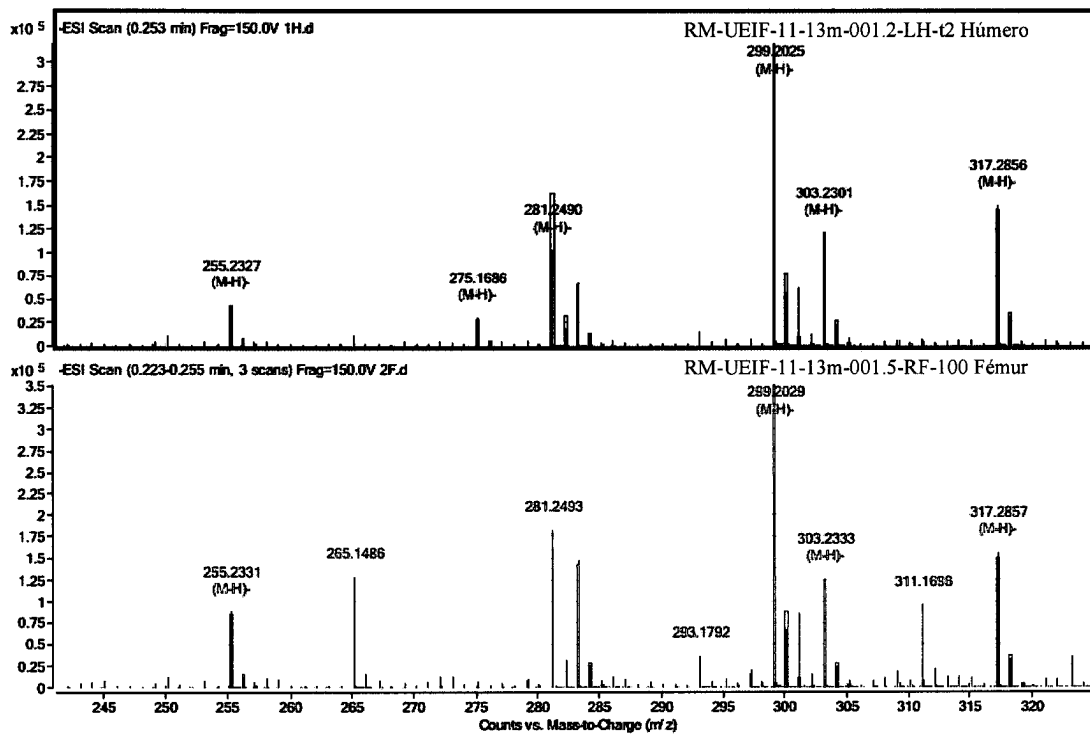
UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIOSANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

Tabla 9. Residuo graso en muestras de hueso.

<i>Muestras</i>	<i>Residuo graso en gramos por gramo de hueso</i>
RM-UEIF-11-13m-001.5-RF-100 Fémur	0,192
RM-UEIF-11-13m-001.2-LH-t2 Húmero	0,213





UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

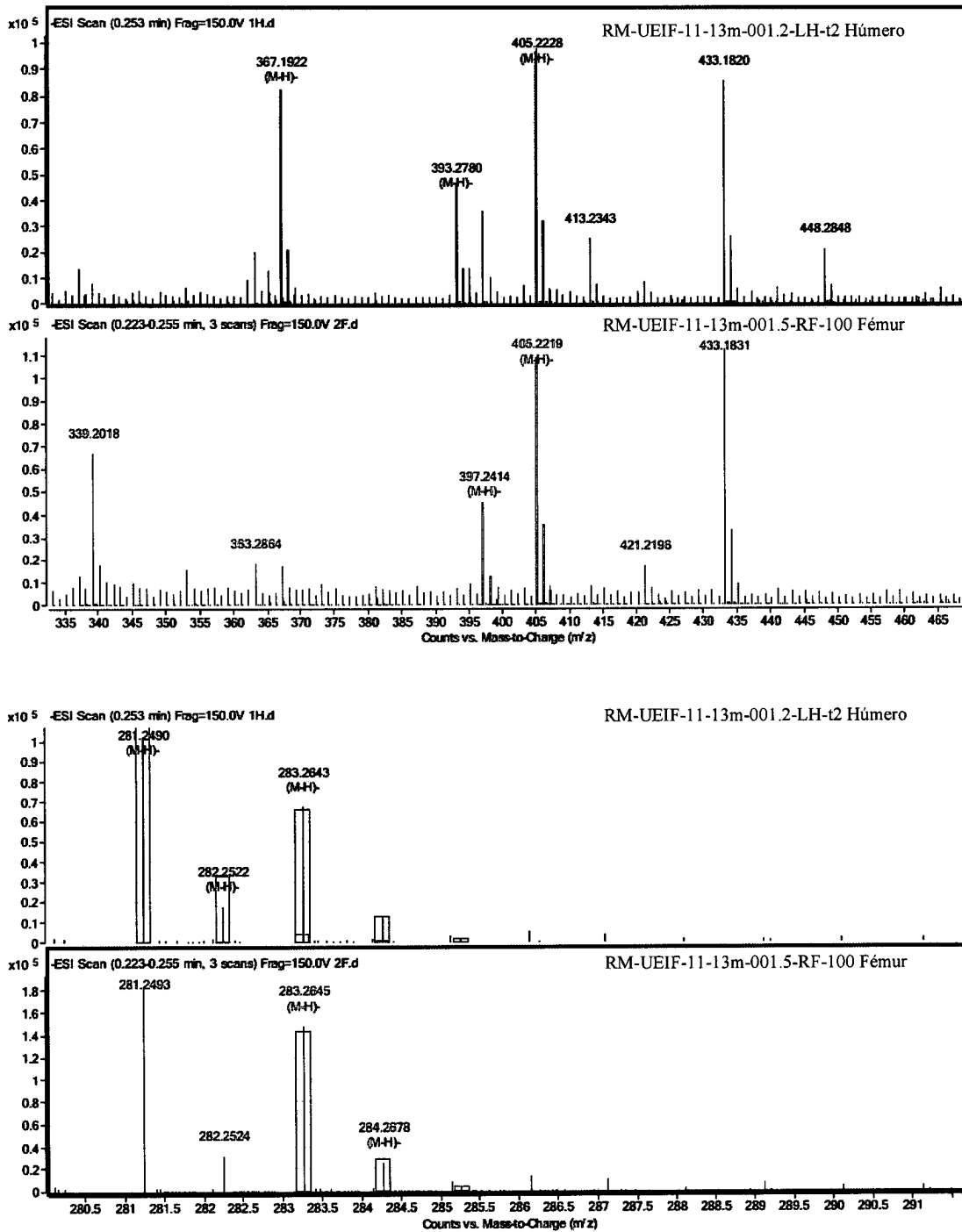


Figura 7. Espectros de lípidos presentes en las muestras.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

MS Formula Results: - Scan (0.223-0.255 min)									
m/z	Ion	Formula	Abundance						
283.2645	(M-H)	C18H35O2	143027.6						
<input checked="" type="checkbox"/>	Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc
<input checked="" type="checkbox"/>		C18H35O2	C18H35O2	283.2643	284.2715	283.2645	284.2718	-1.01	99.37
299.2029	(M-H)	C20H27O2	335036.1						
<input checked="" type="checkbox"/>	Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc
<input checked="" type="checkbox"/>		C20H28O2	C20H27O2	299.2017	300.2089	299.2029	300.21	-3.67	91.39
303.2333	(M-H)	C20H31O2	125055.3						
<input checked="" type="checkbox"/>	Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc
<input checked="" type="checkbox"/>		C20H32O2	C20H31O2	303.233	304.2402	303.2333	304.2406	-1.13	99.14
255.2331	(M-H)	C16H31O2	86968.4						
<input checked="" type="checkbox"/>	Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc
<input checked="" type="checkbox"/>		C16H32O2	C16H31O2	255.233	256.2402	255.2331	256.2404	-0.63	99.78
317.2857	(M-H)	C22H37O	155814.3						
<input checked="" type="checkbox"/>	Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc
<input checked="" type="checkbox"/>		C22H38O	C22H37O	317.285	318.2923	317.2857	318.2929	-2.1	96.91
405.2219	(M-H)	C30H29O	108765.2						
<input checked="" type="checkbox"/>	Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc
<input checked="" type="checkbox"/>		C30H30O	C30H29O	405.2224	406.2297	405.2219	406.2292	1.11	98.88
397.2414	(M-H)	C25H33O4	40627.3						
<input checked="" type="checkbox"/>	Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc
<input checked="" type="checkbox"/>		C25H34O4	C25H33O4	397.2384	398.2457	397.2414	398.2486	-7.34	61.95
339.2018	(M-H)	<none>							



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIOSANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

MS Formula Results: - Scan (0.253 min)									
m/z	Ion	Formula	Abundance						
255.2327	(M-H) ⁻	C16 H31 O2	43104.3						
Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc	
<input checked="" type="checkbox"/>	C16 H32 O2	C16 H31 O2	255.233	256.2402	255.2327	256.24	0.91	99.54	
275.1686	(M-H) ⁻	C17 H23 O3	28962.7						
Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc	
<input checked="" type="checkbox"/>	C17 H24 O3	C17 H23 O3	275.1653	276.1725	275.1686	276.1759	-12.14	40.8	
281.249	(M-H) ⁻	C18 H33 O2	101801						
Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc	
<input checked="" type="checkbox"/>	C18 H34 O2	C18 H33 O2	281.2486	282.2559	281.249	282.2583	-8.58	63.18	
283.2643	(M-H) ⁻	C18 H35 O2	67059.4						
Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc	
<input checked="" type="checkbox"/>	C18 H36 O2	C18 H35 O2	283.2643	284.2715	283.2643	284.2716	-0.26	99.96	
299.2025	(M-H) ⁻	C20 H27 O2	303669.5						
Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc	
<input checked="" type="checkbox"/>	C20 H28 O2	C20 H27 O2	299.2017	300.2089	299.2025	300.2097	-2.54	95.79	
303.2301	(M-H) ⁻	C20 H31 O2	119244.4						
Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc	
<input checked="" type="checkbox"/>	C20 H32 O2	C20 H31 O2	303.233	304.2402	303.2301	304.2374	9.36	55.27	
317.2856	(M-H) ⁻	C22 H37 O	149131.7						
Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc	
<input checked="" type="checkbox"/>	C22 H38 O	C22 H37 O	317.286	318.2923	317.2856	318.2929	-2.04	97.08	
211.0878	(M-H) ⁻	<none>							
367.1922	(M-H) ⁻	C23 H27 O4	79318.2						
Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc	
<input checked="" type="checkbox"/>	C23 H28 O4	C23 H27 O4	367.1915	368.1988	367.1922	368.1995	-2.06	96.56	
393.278	(M-H) ⁻	C27 H37 O2	38689.5						
Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc	
<input checked="" type="checkbox"/>	C27 H38 O2	C27 H37 O2	393.2799	394.2872	393.278	394.2849	5.79	74.42	
405.2228	(M-H) ⁻	C30 H29 O	97876.6						
Best	Formula (M)	Ion Formula	Calc m/z	Calc Mass	m/z	Mass	Diff (p)	Mass Matc	
<input checked="" type="checkbox"/>	C30 H30 O	C30 H29 O	405.2224	406.2297	405.2228	406.2301	-0.99	99.12	
413.2343	(M-H) ⁻	<none>							

Figura 8. Resultados de formulación de los ácidos grasos presentes en las muestras.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIOSANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

D) Resumen final

Difracción de Rayos X

Las muestras estudiadas muestran unas características composicionales muy semejantes, salvando las pequeñas diferencias observadas, de mayor grado de cristalinidad y contenido en amorfos para la muestra H-PN-2.

Las muestras no presentan ninguna característica apreciable con las técnicas analíticas utilizadas que las haga diferentes de otras muestras similares desde el punto de vista cualitativo. Sin embargo, si comparamos con otras muestras similares, con intervalo *postmortem igual o inferior* (mayores de 10 años), se obtienen espectros más mineralizados.

Este hecho se puede explicar por las diferencias ambientales de las procedencias de los restos comparados. Para sacar más conclusiones sería necesario recurrir a otro tipo de estudio.

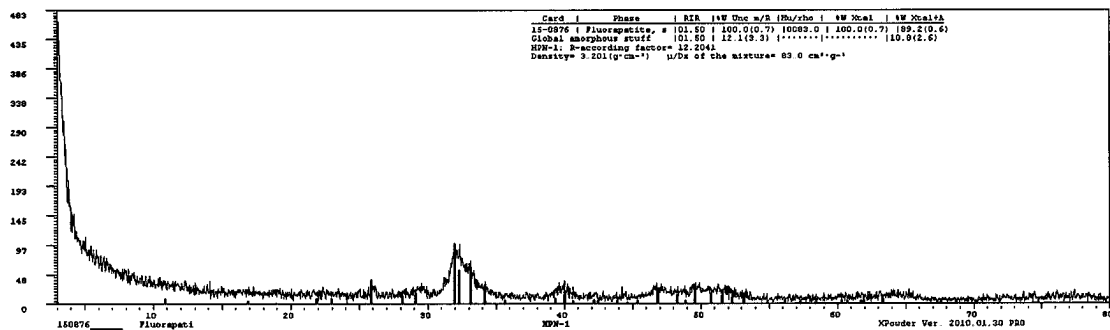


Figura 1. Difractograma de la muestra H-PN-1.

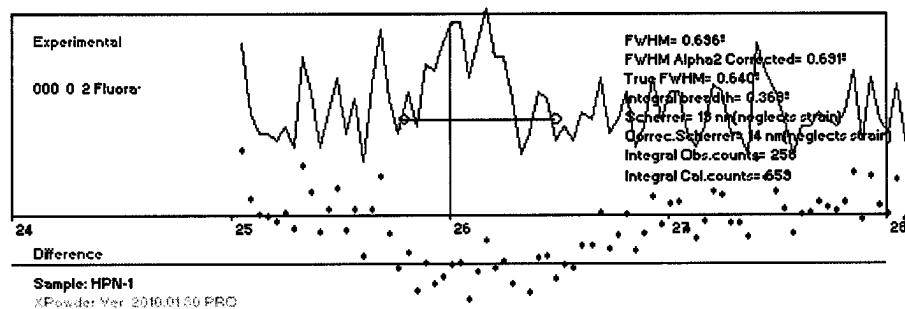


Figura 2. Cálculo de β para la reflexión (002), muestra H-PN-1.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIOSANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

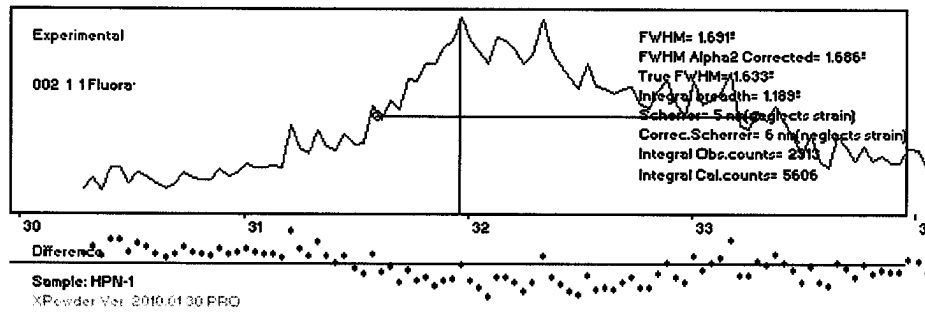


Figura 3. Cálculo de β para la reflexión (211), muestra H-PN-1.

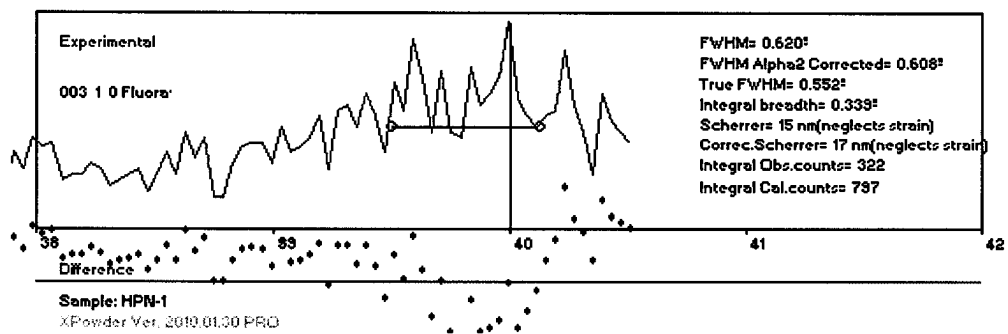


Figura 4. Cálculo de β para la reflexión (310), muestra H-PN-1.

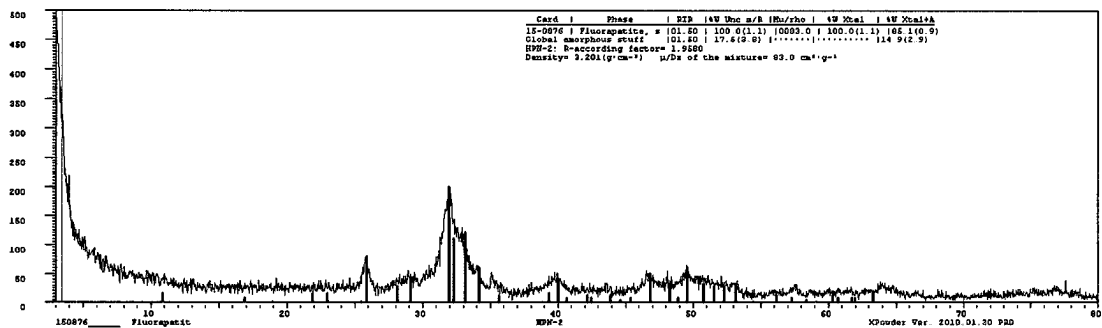


Figura 5. Difractograma de la muestra H-PN-2.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

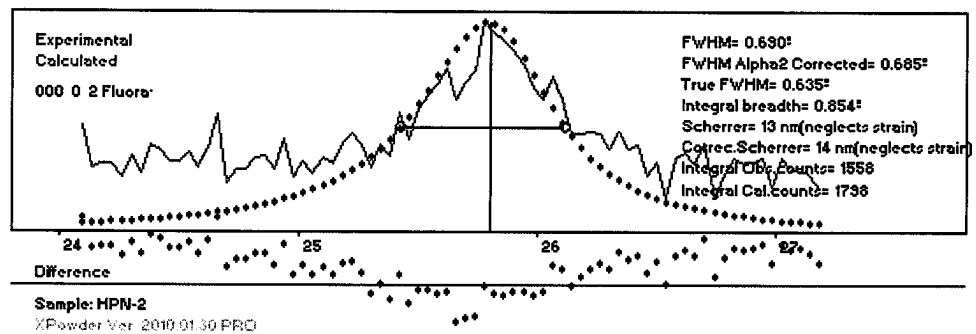


Figura 6. Cálculo de β para la reflexión (002), muestra H-PN-2.

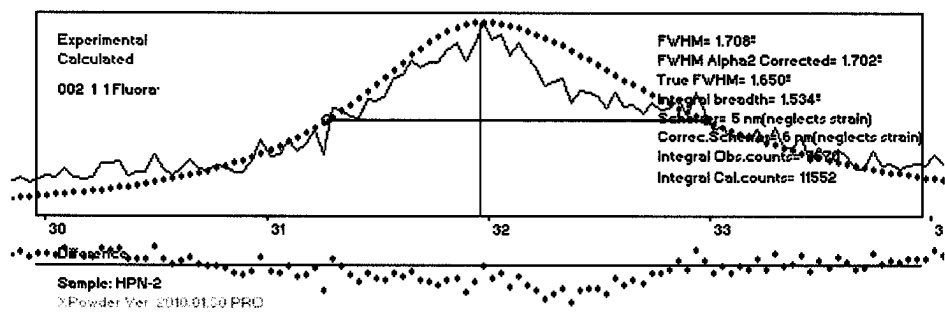


Figura 7. Cálculo de β para la reflexión (211), muestra H-PN-2.

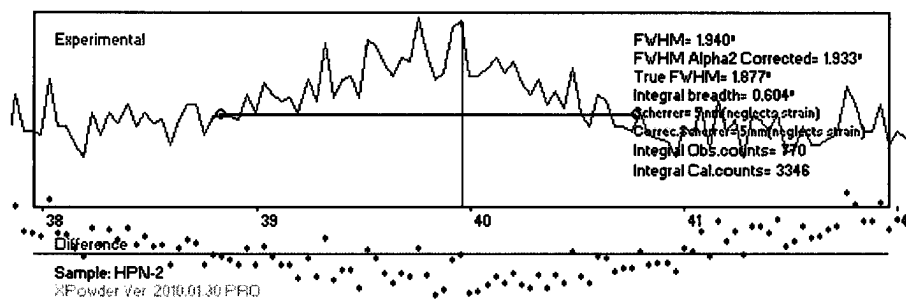


Figura 8. Cálculo de β para la reflexión (310), muestra H-PN-2.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

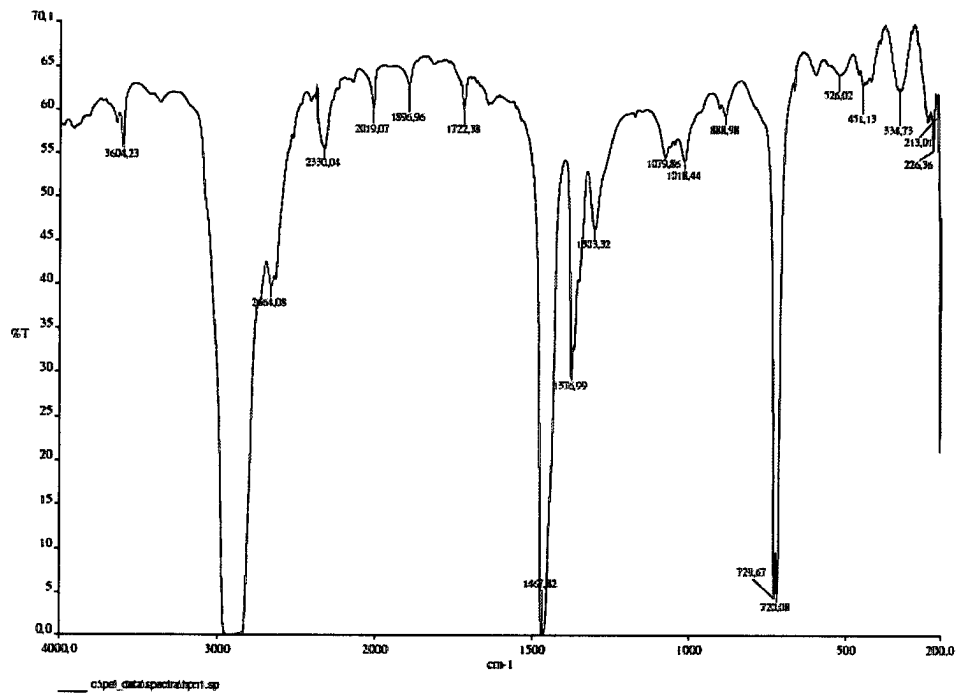


Figura 9. Espectro de FTIR para la muestra H-PN-1.

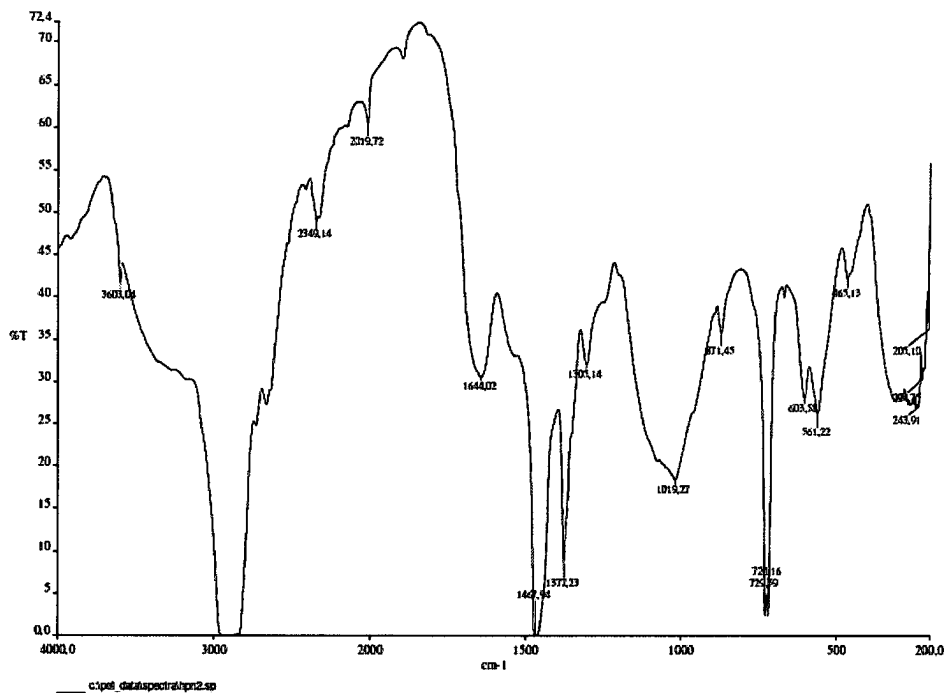


Figura 10. Espectro de FTIR para la muestra H-PN-2.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

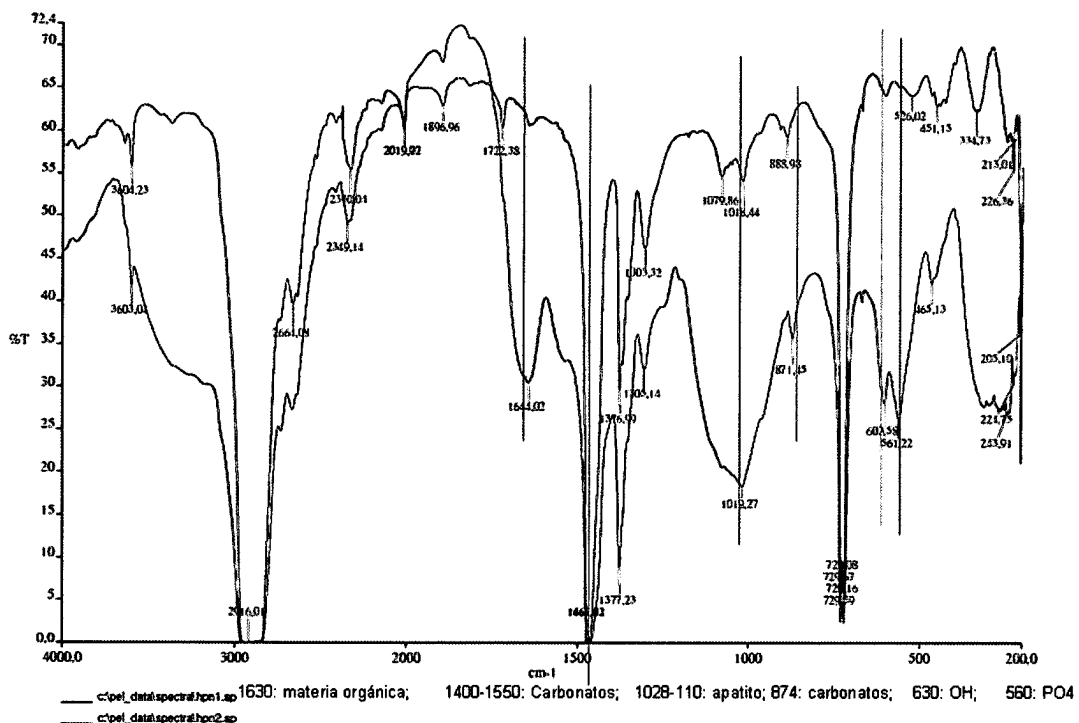


Figura 11. Comparación de Espectros de FTIR para las muestras H-PN-1 y H-PN-2

Microscopía Electrónica de Barrido

La estructura ósea se encuentra aceptablemente conservada, una de las muestras correspondiente a la referencia nº 2 muestra los efectos de la interacción con los niveles de agua y los productos procedentes de la caja de restos.

Como puede observarse existe Fe, (se encontraba la muestra debajo del nivel de afectación del agua) correspondiente a la oxidación de este metal, y concentraciones de Bromo y Cloro, probablemente correspondientes a los efectos del agua del mar. Estos hallazgos no aparecían en la muestra no sumergida del hueso (muestra nº1) que presenta solo concentraciones de elementos constituyentes de la hidroxiapatita.

Caracterización Bioquímica del hueso

Las conclusiones a las que se ha llegado con la caracterización bioquímica de las muestras de hueso compacto y hueso medular son:

1. Es posible identificar y/o cuantificar ADN, bases nitrogenadas y bases minoritarias, proteínas y lípidos.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

2. Se detecta la presencia de proteínas en una concentración de 13,667 mg/g en hueso en la muestra de húmero y de 7,667 mg/g en hueso en la muestra de fémur, por lo que podemos afirmar que dichas concentraciones son suficientes para identificar un estado de preservación bioquímica del hueso aceptable y que son compatibles con la data referida. Además se han identificado proteínas colágenas tipo I que son las mayoritarias en la fase orgánica del hueso y un péptido que podría corresponder a un fragmento de proteína no caracterizada.

3. Se detectan el lípido colesterol y los siguientes ácidos grasos: ácido linoleico, linolénico, oleico, esteárico y palmítico. El peso del residuo de materia grasa extraído mediante el procedimiento de cloroformo-metanol en las muestras es de 0,192 g y 0,213 g por gramo de hueso en la muestra de fémur y de húmero respectivamente.

4. Las muestras óseas presentan un estado de conservación suficiente para permitir la detección de sustancias presentes en ellas, sin que puedan existir distorsiones o artefactos por alteraciones estructurales o de composición del tejido óseo analizado

Las personas que han colaborado en la realización de los análisis han sido:

Aurelio Luna Maldonado

Cristina Pérez Martínez

Carmen Pérez Sirvent

M^a Dolores Pérez Cárcelos

María Falcón Romero

Todas ellas miembros del SECYTEF y de la Catedra de Medicina Legal y Forense de la Universidad de Murcia



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIOSANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

VI. Bibliografía

- Antonakosa A, Liarokapisa E & Leventourib T. 2007. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials* 28, 3043–3054.
- Barrio-Caballero PA. 2013. Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Revista Española de Medicina Legal*, 39 (2), 54-62.
- Bell LS, Skinner MF & Jones SJ. 1996. The speed of post mortem changes to the human skeleton and its taphonomic significance. *Forensic Science International*, 82, 129-140.
- Castaños J, Murelaga X, Castellanos I, Alonsa-Olazabal A, Zuluaga MC & Ortega LA. 2010. Evaluación del grado de diagénesis en huesos fósiles mediante espectroscopía de infrarrojos. *Geogaceta*, 49, 11-14.
- Cleland TP, Voegelé K & Schweitzer MH. 2012. Empirical Evaluation of Bone Extraction Protocols. *PLoS ONE*, 7(2), 1-9.
- Collins MJ, Nielsen-Marsh CM, Hiller J, Smith CI, Roberts JP, Prigodich RV, Wess J, Csapò J, Millard AR & Turner-Walker G. 2002. The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry*, 44 (3), 383–394.
- Collins MJ, Riley M, Child AM & Turner-Walker G. 1995. A basic mathematical simulation of the chemical degradation of ancient collagen. *Journal of Archeological Science* 22, 175-183.
- Edson SM, Ross JP, Coble MD, Parsons TJ & Barritt SM. 2004. Naming the dead: confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. *Forensic Science Review*, 16, 63-90.
- Folch J, Lees M & Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226 (1), 497-509.
- Galloway A, Willy P & Snyder L. 1997. Human bone mineral densities and survival of bone elements: a contemporary sample. En: Haglund WD & Sorg MH. *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains*. Boca Raton: CRC Press; pp. 295-317.
- Griffiths AJF, Gerlbart WM, Miller JH & Lewontin RC. 2000. La Estructura de los Genes y de los Genomas. En: Griffiths AJF, Gerlbart WM, Miller JH & Lewontin RC. *Genética Moderna*. McGraw-Hill Interamericana de España S.A.U, pp: 23-50.
- Jiang X, Ye M, Jiang X, Liu G, Feng S, Cui L & Zou H. 2007. Method Development of Efficient Protein Extraction in Bone Tissue for Proteome Analysis. *Journal of Proteome Research*, 6, 2287-2294.



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

Lozano-Teruel JA, Galindo JD, García-Borrón JC, Martínez-Liarte JH, Peñafiel R & Solano-Muñoz F. 2005. Tejidos Calcificados. En: Lozano JA, Galindo JD, García-Borrón JC, Martínez-Liarte JH, Peñafiel R & Solano F. *Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud*. Editorial McGraw-Hill Interamericana de España, S.A., pp: 637-652.

Miles CA, Sionkowska A, Hulin SL, Sims TJ, Avery NC & Bailey AJ. 2000. Identification of an intermediate state in the helix-coil degradation of collagen by ultraviolet light. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 33, 14-20.

Milós A, Selmanovic A, Smajlovic L, Huel R, Katzmarzyk C, Rizvic A & Parsons TJ. 2007. Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croatian Medical Journal*, 48, 486-493.

Pasteris JD, Wopenka B, Freeman JJ, Rogers K, Valsami-Jones E, van der Houwen JAM & Silva MJ. 2005. Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. *Biomaterials* 25, 229–238.

Perry WL, Bass WM, Riggsby WS & Sirotkin K. 1988. The autodegradation of deoxyribonucleic-acid (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death. *Journal of Forensic Sciences*, 33, 144-153.

Prieto-Castello MJ, Hernández del Rincón JP, Pérez-Sirvent C, Álvarez-Jiménez P, Pérez-Cárceles MD, Osuna E & Luna A. 2007. Application of biochemical and X-ray diffraction analyses to establish the postmortem interval. *Forensic Science International* 172, 112–118.

Reyes-Gasga J, Martínez-Piñeiro EL, Rodríguez-Álvarez G, Tiznado-Orozco GE, García-García R & Brès EF. 2013. XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering C* xxx (2013) xxx–xxx. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.014>.

Solano-Muñoz F & Lozano-Teruel JA. 1998. *Bioquímica del Tejido Dental: Composición y Mineralización*. En: Bascones-Martínez. Tomo I: *Tratado de Odontología*. Smithkline Beecham, pp: 499-511.

Thompson TJU, Islam M & Bonniere M. 2013. A new statistical approach for determining the crystallinity of heat-altered bone mineral from FTIR spectra. *Journal of Archaeological Science* 40, 416-422.

Trueman CN & Tuross N. 2002. Trace elements in modern and ancient bone. En: Kohn MJ, Rakovan J & Hughes JM. *Phosphates-Geochemical, Geobiological and Materials Importance*. Mineralogical Society of America, Washington DC, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 48, 489-522.

Trueman CN. 1999. Rare Earth Elements Geochemistry and Taphonomy of Terrestrial Vertebrate Assemblages. *Palaios*, 14, 555-568.



**UNIVERSIDAD
DE MURCIA**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS SOCIO-SANITARIAS,
CATEDRA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Facultad de Medicina

Yoshino M, Kimijima T, Miyasaka S, Sato H & Seta S. 1991. Microscopic study on estimation of time since death in skeletal remains. *Forensic Science International*, 49, 143-158.