

Cambios Histológicos del Tejido Muscular Estriado Lingual en Ratas Sprague Dawley (*Rattus norvegicus*) para Estimar el Intervalo Postmortem

Histological Changes of Lingual Striated Muscle Tissue in Sprague Dawley Rats (*Rattus norvegicus*) for Estimating the Postmortem Interval

Clivia Guerrero-Urbina^{1,2,3}; Martha Fors⁴; Bélgica Vásquez⁵; Marjorie Rodríguez-Guerrero⁶ & Gabriel M. Fonseca^{1,7}

GUERRERO-URBINA, C.; FORS, M.; VÁSQUEZ, B.; RODRÍGUEZ-GUERRERO, M. & FONSECA, G. M. Cambios histológicos del tejido muscular estriado lingual en ratas Sprague Dawley (*Rattus norvegicus*) para estimar el intervalo postmortem. *Int. J. Morphol.*, 39(5):1502-1508, 2021.

RESUMEN: El intervalo postmortem (IPM) equivale al tiempo que ha transcurrido desde que un ser humano ha muerto hasta su examinación postmortem. Después de la muerte, el cuerpo experimenta modificaciones en su composición física y química denominados cambios postmortem expresados por signos que pueden ser analizados para el cálculo del IPM. El objetivo del estudio fue describir los cambios histológicos presentes en la musculatura estriada lingual de rata en diferentes IPM. Se utilizaron 10 ratas machos Sprague dawley de dos meses de edad. Los animales fueron eutanasiados y dejados a temperatura ambiente (4 - 14 °C) para tomar muestras de la lengua a distintos IPM (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas postmortem). El estudio se llevó a cabo considerando las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Las muestras fueron fijadas en formaldehído tamponado a 10 % y procesadas para su inclusión en paraplást. Se realizaron cortes de 5 µm de grosor y fueron teñidas con HE para su análisis con microscopía óptica. Los cambios histológicos en las células musculares estriadas de la lengua estaban asociados a los distintos IPM. A las 6 horas postmortem, hubo cambios iniciales en la morfología nuclear y su pigmentación. A las 12 y 24 horas postmortem, se observaron cambios en las estrías musculares y aumento en el número de casos con alteraciones nucleares. A las 48 y 72 horas postmortem, eran evidentes las vacuolas citoplasmáticas, cambios en la coloración de las miofibras y aumento en las alteraciones nucleares. A las 92 y 120 horas postmortem, se observó disminución de las estrías musculares y núcleos celulares. Los núcleos eran picnóticos y puntiformes; hubo pérdida de la morfología celular y presencia de músculo liso. En conclusión, los cambios de la histología del músculo estriado lingual de rata permiten estimar el IPM. Este modelo podría ser aplicable a la medicina forense.

PALABRAS CLAVE: Intervalo postmortem; Músculos de la lengua; Histología; Medicina forense.

INTRODUCTION

Los patólogos forenses esencialmente deben estimar el intervalo postmortem (IPM), que equivale al tiempo que ha transcurrido después de que un ser humano ha muerto hasta el momento de su examinación postmortem (Kajee *et al.*, 2013; Madea, 2016; Mahalakshmi *et al.*, 2016).

Conocer esta información, permite limitar el período de investigación y así ayudar a reducir el número de sospechosos en los casos de homicidio. Sin embargo, establecer el IPM es una de las problemáticas que enfrenta la prác-

tica forense (Vargas, 2012; Anders *et al.*, 2013; Montefusco-Pereira, 2016; Fais *et al.*, 2018).

Después de la muerte, el cuerpo humano experimenta modificaciones en su composición física y química, denominadas cambios postmortem (Pradeep *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2012; Yadav, *et al.*, 2015), expresados mediante una secuencia de signos físicos (autólisis, algor mortis, rigor mortis, livor mortis, coagulación postmortem, putrefacción y aparición de adipocira) (Vargas; Pradeep *et al.*; Yadav, 2012, 2015;

¹ Programa de Doctorado en Ciencias Morfológicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

² Carrera de Obstetricia, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

³ Unidad de Medicina Legal, Zona 9. Policía Nacional del Ecuador, Quito, Ecuador.

⁴ Universidad de Las Américas, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Medicina, Quito, Ecuador.

⁵ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Tarapacá, Iquique, Chile.

⁶ Médico Rural, Ministerio de Salud Pública, Ecuador.

⁷ Centro de Investigación en Odontología Legal y Forense (CIO), Facultad de Odontología, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Villanueva, 2019), bioquímicos (concentración de electrolitos, actividad enzimática), entomológicos y botánicos (Sampaio-Silva *et al.*, 2013; Madea; Carrasco *et al.*, 2017 y Villanueva).

Numerosos cambios celulares ocurren de manera irreversible después de la muerte y varían de acuerdo al tiempo postmortem (Kumar, 2015; Pradeep *et al.*); se producen mediante dos procesos: la apoptosis (o muerte de forma ordenada y programada), y la necrosis (o muerte desordenada e impredecible), en la cual la célula se hincha y se desintegra, liberando su contenido al entorno incluyendo enzimas proteolíticas que favorecen el inicio de un proceso inflamatorio (Fortoul, 2010; Montuenga *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2015; Mohan *et al.*, 2016). En ambos casos, las células muestran histológicamente aumento de la eosinofilia con apariencia homogénea y vidriosa, con cambios nucleares, siguiendo tres patrones: desvanecimiento de la basofilia de la cromatina (cariolisis), contracción nuclear (picnosis) y fragmentación del núcleo (cariorexis) (Kumar *et al.*; Pawlina, & Ross, 2015; Yadav *et al.*, 2015; Mohan *et al.*).

Existen estudios disponibles relevantes que evalúan los cambios histológicos que ocurren después de la muerte en diferentes tejidos, como la piel (Bardale *et al.*, 2012), las glándulas salivales (Rajkumari *et al.*, 2020), la pulpa dentaria (Bhuyan *et al.*, 2020), entre otros. Sin embargo, son escasas las investigaciones sistémicas publicadas en la literatura que se relacionen con los cambios histológicos que ocurren en los tejidos de la lengua. A la fecha existe un estudio publicado por Rajkumari *et al.*, (2020b) en la cual evaluaron los cambios histológicos postmortem en el epitelio y el tejido conectivo de la lengua, considerando estos tejidos como un marcador confiable de la estimación del IPM.

Según nuestro conocimiento, la lengua de rata no ha sido utilizada previamente como modelo animal para estimar el IMP a través de los cambios histológicos ocurridos en las células musculares de esta estructura, por lo que su empleo para este fin representa una posibilidad inédita de obtener información que contribuya a aumentar el conocimiento para este dilema médico forense. Así, el objetivo fue describir los cambios histológicos presentes en la musculatura estriada lingual de rata en diferentes IPM.

MATERIAL Y METODO

Se utilizaron 10 ratas machos Sprague dawley (*Rattus norvegicus*) de 2 meses de edad, con un peso promedio entre 250 y 300 g provenientes del Bioterio del Centro de Excelencia en Estudios Morfológicos y Quirúrgicos (CEMyQ) de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. Los animales

fueron alimentados con pellet y agua *ad libitum* y mantenidos en condiciones ambientales controladas respecto a temperatura, ruido ambiental y ciclos de 12 horas luz / 12 horas oscuridad. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con las directrices establecidas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (2011).

Los animales fueron anestesiados con ketamina 80 mg/kg y Xilacina 10 mg/kg (CONICYT, 2009) y luego fueron eutanasiados con una dosis intracardiaca de ketamina / Xilacina 240 mg/kg. Posteriormente, fueron dejados a temperatura ambiente (4 - 14 °C) para simular la exposición de un cadáver a las condiciones ambientales. La ciudad de Temuco tiene un clima oceánico templado lluvioso con influencia mediterránea típica de la depresión intermedia del país. Su temperatura mínima promedio anual es de 4 °C y la máxima promedio anual de 11 °C; su humedad relativa media anual es de 79 %.

Se formaron ocho grupos según IPM crecientes de 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la eutanasia. Cada grupo estaba constituido por diez muestras de lengua provenientes de cada animal. Una vez transcurrido el IPM correspondiente, las muestras fueron fijadas en formalina tamponada (1,27 mol/L de formalina en buffer fosfato 0,1 M pH 7,2) a 10 % por 48 horas y procesadas para su inclusión en paraplast (Histotec-Merck®), luego se realizaron cortes seriados de 5 µm de espesor en un micrótomo (Microm HM 325, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) y las láminas histológicas fueron teñidas con Hematoxilina & Eosina (HE) para su análisis. La visualización de los cortes se realizó con un microscopio de luz Olympus BX53 y la digitalización de las placas histológicas se realizó mediante equipo Hamamatsu NanoZoomer Digital Pathology (NDP).

El examen histológico fue realizado por dos expertos, los cuales no estaban cegados respecto a la pertenencia de las placas histológicas a los grupos según IPM. Los cambios histológicos postmortem evaluados se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Parámetros histológicos postmortem evaluados en el tejido muscular estriado de la lengua de rata Sprague dawley.

Evaluación histológica postmortem	
1. Vacuolas citoplasmáticas	6. Morfología nuclear
0 - ausentes	0 - alterada
1 - presentes	1 - normal
2. Coloración de las miofibras	7. Núcleos picnóticos
0 - sin cambios	0 - ausentes
1 - con cambios	1 - presentes
3. Estrías musculares conservadas	8. Morfología celular
0 - ausentes	0 - alterada
1 - presentes	1 - normal
4. Estrías musculares disminuidas	9. Aumento de la matriz extracelular
0 - ausentes	0 - ausente
1 - presentes	1 - presente
5. Edema en las miofibras	
0 - ausentes	
1 - presentes	

Tabla II. Caracterización de los grupos utilizando los parámetros histológicos postmortem en el tejido muscular estriado de la lengua de rata Sprague dawley.

Evaluación histológica postmortem		Frecuencia de los grupos en %								valor P
		0 h	6 h	12h	24h	48h	72h	96h	120 h	
Vacuolas citoplasmáticas	ausentes	100	100	70	40	40	40	40	20	0,0025
	presentes	0	0	30	60	60	60	60	80	
Coloración de las miofibras	sin cambios	100	100	100	70	40	40	10	10	0,0001
	con cambios	0	0	0	30	60	60	90	90	
Estrías musculares	ausentes	0	0	30	30	30	40	50	70	0,0125
	conservadas	100	100	70	70	70	60	50	30	
Estrías musculares	ausentes	90	80	0	0	0	0	0	0	0,0001
	disminuidas	10	20	100	100	100	100	100	100	
Edema en las miofibras	ausentes	100	100	100	90	90	20	20	20	0,0001
	presentes	0	0	0	10	10	80	80	80	
Morfología nuclear	alterada	10	60	60	100	100	100	100	100	0,0001
	normal	90	40	40	0	0	0	0	0	
Núcleos picnóticos	ausentes	90	80	80	0	0	0	0	0	0,0001
	presentes	10	20	20	100	100	100	100	100	
Morfología celular	alterada	0	10	40	60	60	70	90	90	0,0001
	normal	100	90	60	40	40	30	10	10	
Aumento de la matriz extracelular	ausente	100	100	100	90	90	30	50	50	0,0003
	presente	0	0	0	10	10	70	50	50	

El análisis de los datos se realizó utilizando el software SPSS versión 24.0. Para evaluar si hubo diferencias significativas entre los grupos en los cambios histológicos de las miofibras se utilizó la prueba exacta de Fisher. Los niveles de significación se fijaron en $p < 0,05$.

RESULTADOS

Los cambios histológicos en las miofibras de la lengua estaban asociados a los distintos IPM (Tabla II).

En el grupo 0 horas postmortem (control), las células musculares presentaban características histológicas dentro de límites normales y el espacio intercelular se mantenía

conservado. Sus núcleos eran claramente visibles y presentaban una forma ovalada; las estrías musculares se encontraban conservadas en cuanto a su morfología y número (Figs. 1A y B).

En el grupo 6 horas postmortem, el 20 % de los casos presentó disminución de las estrías musculares y el 60 % presentó variación en el tamaño nuclear. Las miofibras presentaron una ligera ondulación (Figs. 2A y B).

El grupo 12 horas postmortem, mostró miofibras sin cambios en la coloración, sin embargo, el 100 % de los casos presentó miofibras con estrías musculares disminuidas y el 80 % de los casos presentó células con núcleos picnóticos. Los espacios intercelulares presentaron una tendencia a la separación (Figs. 3A y B).

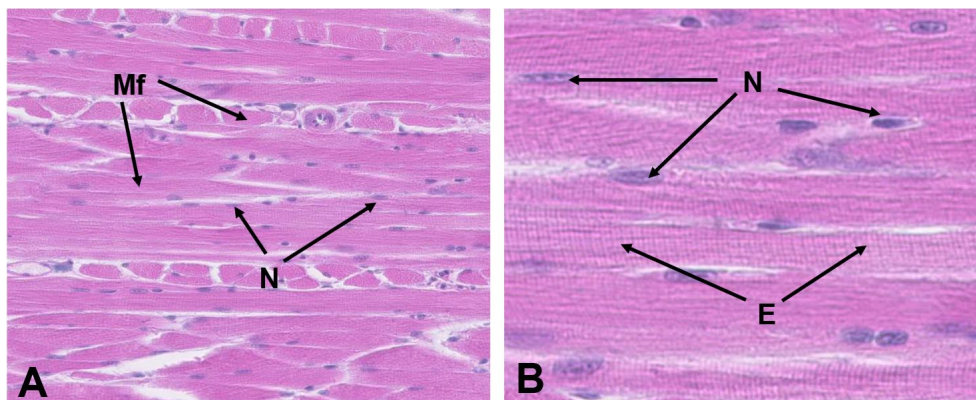


Fig. 1. Grupo 0 horas postmortem. Células musculares de lengua de rata Sprague dawley. Mf: miofibras, N: núcleos, E. estrías musculares. Tinción HE. A: aumento 20X, B: aumento 63X.

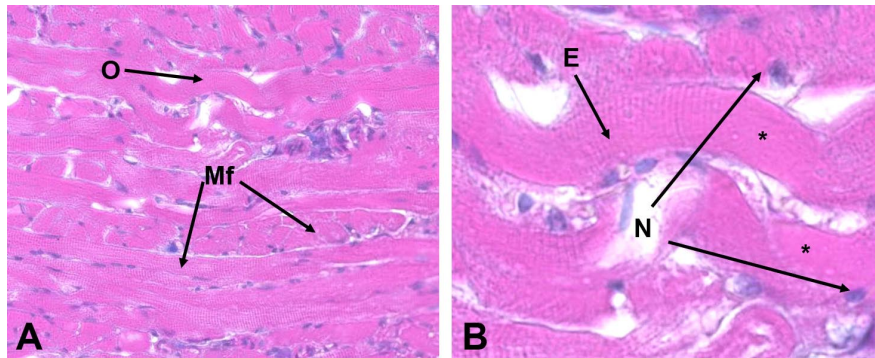


Fig. 2. Grupo 6 horas postmortem. Células musculares de lengua de rata Sprague dawley. Mf: miofibras, O: ondulaciones de las miofibras, E: estrías musculares, *: ausencia de estrías musculares. Tinción HE. A: aumento 20X, B: aumento 63X.

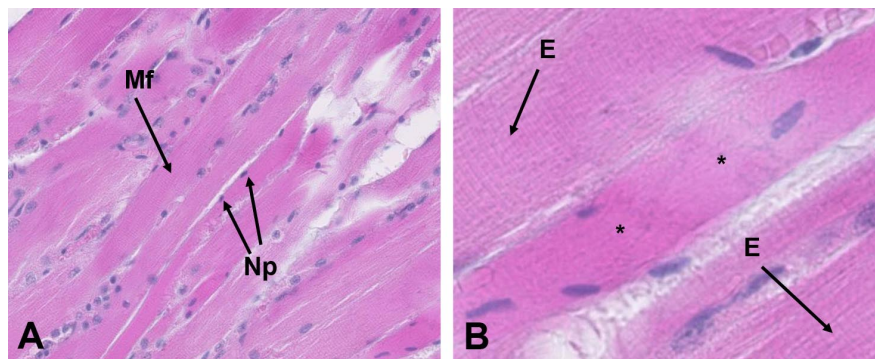


Fig. 3. Grupo 12 horas postmortem. Células musculares de lengua de rata Sprague dawley. Mf: miofibras, Np: núcleos picnóticos, E: estrías musculares, *: ausencia de estrías musculares. Tinción HE. A: aumento 20X, B: aumento 63X.

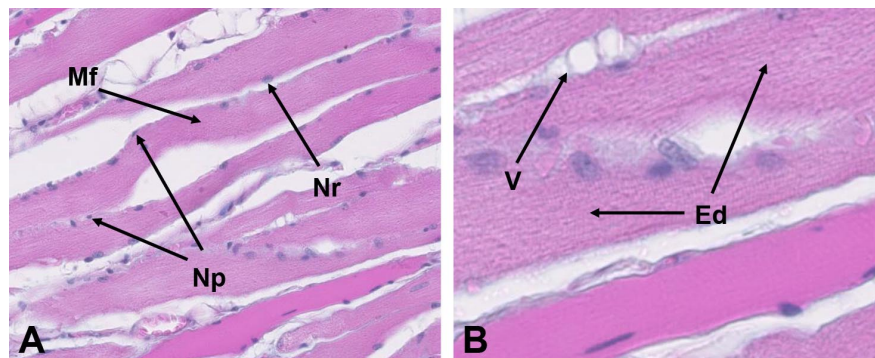
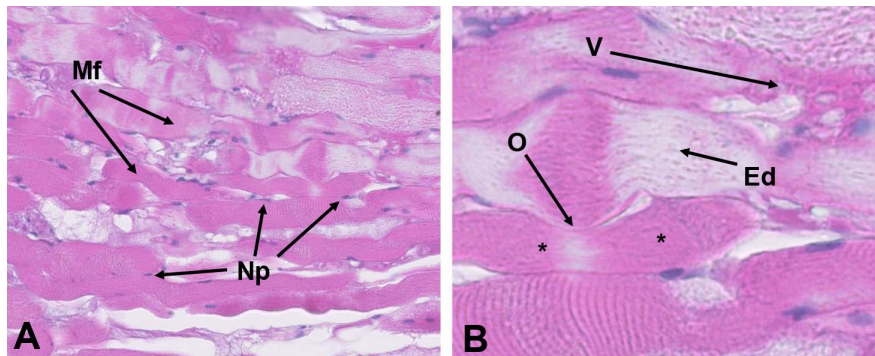


Fig. 4. Grupo 24 horas postmortem. Células musculares de lengua de rata Sprague dawley. Mf: miofibras, Np: núcleos picnóticos, Nr: núcleos redondos, V: vacuolas citoplasmáticas, Ed: edema celular. Tinción HE. A: aumento 20X, B: aumento 63X.



En el grupo 24 horas postmortem, las alteraciones se hicieron más evidentes. El 60 % de los casos presentó vacuolas citoplasmáticas, el 100 % presentó miofibras con estrías musculares disminuidas y el 100 % de los casos presentó morfología nuclear alterada y núcleos picnóticos (Figs. 4A y B).

El grupo 48 horas postmortem, se caracterizó por una matriz extracelular aumentada y miofibras longitudinales onduladas. Al igual que el grupo anterior, en el 100 % de los casos se observaron fibras con estrías musculares disminuidas, núcleos redondeados y núcleos picnóticos (Fig. 5A y B).

En el grupo 72 horas postmortem, se observaron escasos hematíes en los vasos sanguíneos. El 60 % de los casos presentó miofibras con vacuolas citoplasmáticas y coloración disminuida y el 80 % de los casos mostró edema. En el 100 % de los casos se observaron miofibras con estrías musculares disminuidas, morfología nuclear alterada, con tamaños variables, redondeados y picnóticos (Fig. 6A y B).

En el grupo 96 horas postmortem, se observó un franco aumento de la matriz extracelular (50 % de los casos); en el 60 % de los casos se visualizaron vacuolas citoplasmáticas y coloración disminuida de las miofibras. En el 100 % de los casos las estrías musculares se encontraron disminuidas. En el 90 % de los casos la morfología celu-

Fig. 5. Grupo 48 horas postmortem. Células musculares de lengua de rata Sprague dawley. Mf: miofibras, Np: núcleos picnóticos, V: vacuolas citoplasmáticas, Ed: edema celular, O: ondulaciones de las miofibras, *: ausencia de estrías musculares. Tinción HE. A: aumento 20X, B: aumento 63X.

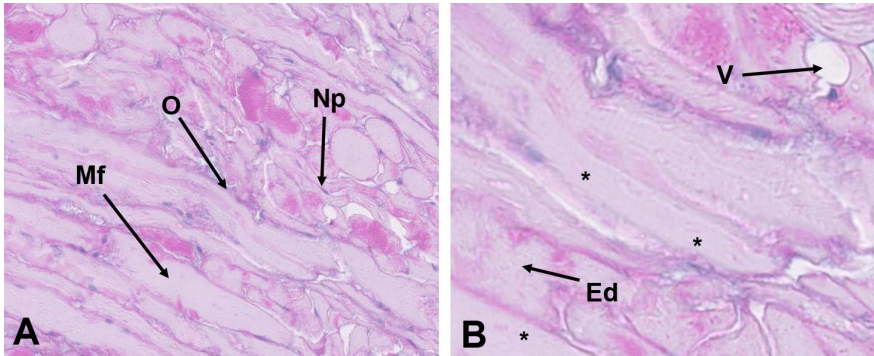


Fig. 6. Grupo 72 horas postmortem. Células musculares de lengua de rata Sprague dawley. Mf: miofibras, Np: núcleos picnóticos, O: ondulaciones de las miofibras, V: vacuolas citoplasmáticas, Ed: edema celular, *: ausencia de estrías musculares. Tinción HE. A: aumento 20X, B: aumento 63X.

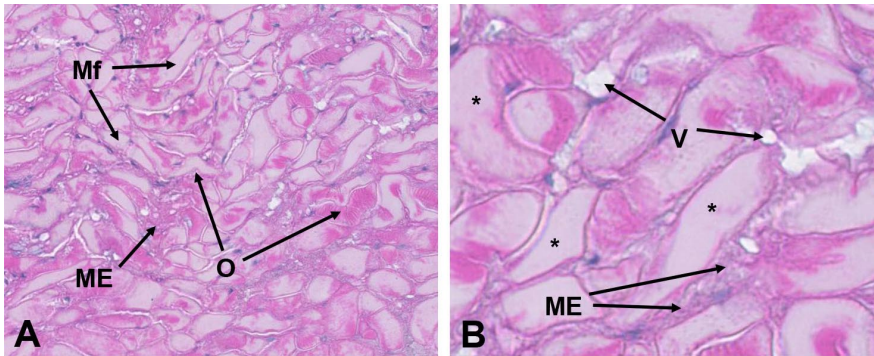


Fig. 7. Grupo 96 horas postmortem. Células musculares de lengua de rata Sprague dawley. Mf: miofibras, ME: matriz extracelular, O: ondulaciones de las miofibras, V: vacuolas citoplasmáticas, *: ausencia de estrías musculares. Tinción HE. A: aumento 20X, B: aumento 63X.

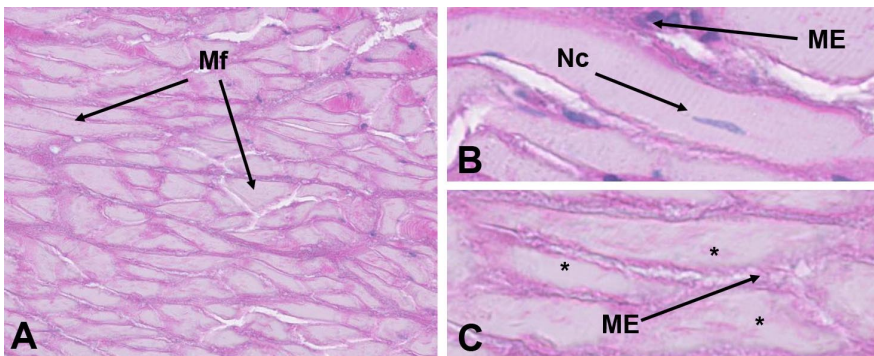


Fig. 8. Grupo 120 horas postmortem. Células musculares de lengua de rata Sprague dawley. Mf: miofibras, Nc: núcleos centrales, ME: matriz extracelular, *: ausencia de estrías musculares. Tinción HE. A: aumento 20X, B y C: aumento 63X.

lar se encontraba alterada y los núcleos se presentaron picnóticos, con forma de cabeza de alfiler y disminuidos en número (Figs. 7A y B).

El grupo 120 horas postmortem, se encontraba en fase colicuativa, con presencia de células musculares lisas. En el 70 % de los casos las estrías musculares no se encon-

traban conservadas y el 100 % de los casos presentó disminuidas de las mismas. En algunas placas histológicas se observaron escasos núcleos picnóticos puntiformes y en el resto estuvieron ausentes. En el 80 % de los casos las miofibras presentaron vacuolas citoplasmáticas y edema y en el 90 % mostraban alteraciones morfológicas con apariencia de fusión entre ellas. El 50 % de los casos presentó aumento de la matriz extracelular (Figs. 8A, B y C).

DISCUSIÓN

Todas las actividades del metabolismo celular terminan en la autólisis y la putrefacción, esta última asociada con la descomposición. La autólisis representa la destrucción de las células y órganos por acción de las enzimas presentes en los lisosomas (Yadav *et al.*, 2015; Cocariu *et al.*, 2016), la cual es acelerada por el calor y retardada por el frío, y puede ser detenida por temperaturas por debajo de 0 °C. Por tal razón, algunos de los métodos utilizados para determinar el IMP son relativamente precisos en circunstancias específicas y controladas. Sin embargo, la impredecibilidad de varios factores ambientales ha impedido el desarrollo de un único predictor confiable. Las estimaciones más precisas se logran en periodo postmortem temprano, antes de que muchas variables ambientales puedan afectar significativamente el resultado (Yadav *et al.*, 2015). Este estudio pudo corroborar las aseveraciones descritas por (Cocariu *et al.*), es decir, en bajas temperaturas, los músculos de la lengua conservaron su estructura, retrasando los cambios inherentes a la putrefacción; sin embargo, este comportamiento no se presentó en todas las muestras.

Las características histológicas de la autólisis son similares a las observadas en la necrosis, la causa es la anoxia y la ausencia de soporte de vida, por lo que diferenciar am-

Los patrones pueden ser dificultoso cuando la única diferencia es la reacción inflamatoria en la necrosis (Mahalakshmi *et al.*).

Al igual que otras células, el músculo estriado de la lengua también pierde su morfología normal como resultado de la autólisis y la putrefacción postmortem, presentando cambios celulares que pueden ser un criterio útil y un marcador para estimar el IPM (Yadav *et al.*, 2015). Este estudio permitió evidenciar la progresión de los cambios estructurales en la miofibra con el transcurso del IPM. Los principales cambios observados en el periodo postmortem temprano de 0 a 6 horas, fueron: a) homogeneización (que podría adjudicarse a una disminución en el nivel de contenido de glucógeno celular); b) disminución de las estrías musculares; c) núcleos picnóticos; y d) ligera ondulación de la fibra muscular, hallazgos similares a lo observado por quienes encontraron pérdida de estriaciones y aumento en los espacios intercelulares entre las células musculares esqueléticas de otros sustratos anatómicos (Yadav *et al.*, 2012, 2015). Si bien Rajkumari *et al.* (2020) no tenían por objetivo principal evaluar los cambios histológicos de las miofibras de la lengua, notaron una degradación del tejido muscular en las capas más profundas más allá de las 16 horas de IPM.

Según nuestro conocimiento, a la fecha no se han correlacionado los cambios histológicos en la musculatura lingual postmortem con el tiempo transcurrido desde la muerte del sujeto. Este estudio demuestra que el músculo estriado de la lengua puede ser una estructura confiable para estimar el IPM.

En relación con la matriz extracelular de la mucosa labial, Yadav *et al.* (2012) encontraron que la vacuolización de los fibroblastos empieza entre las 0 y las 8 horas, a diferencia de lo observado en este estudio, donde el músculo de lengua no evidenció vacuolización en las IPM iniciales. Además, estos autores señalaron disrupción de tejido adiposo y de la musculatura, evidencias no visibilizadas en el tejido adiposo en nuestro estudio.

A diferencia de los hallazgos de Cocariu *et al.*, en este estudio el núcleo fue tornándose picnótico de forma secuencial siendo francamente picnótico a las 72 horas, para casi en su totalidad desaparecer a las 120 horas. También se observó la ruptura de las miofibras debido a la desnaturalización de las proteínas por la actividad lítica; el espacio entre las fibras aumentó, se visualizaron células adiposas degeneradas, pero no se lisaron completamente.

Consideramos que el estudio del tejido lingual será un aporte para la medicina legal moderna, ya que su análisis

histológico permite evaluar la secuencia de los cambios en la morfología celular y nuclear de las miofibras, así como en su coloración, estructura y presencia de las estriaciones musculares, presencia de vacuolas, entre otros parámetros.

CONCLUSIÓN

La Medicina Legal actual utiliza técnicas y procedimientos científicos en la resolución de los problemas que se le planteen. En este caso la utilización del tejido muscular estriado de la lengua, hasta el momento no ha sido considerado para la estimación del IPM. Nuestros resultados nos permiten sugerir que esta estructura puede ser utilizada para determinar el IMP, ya que es una muestra de fácil obtención y experimenta cambios histológicos irreversibles que son progresivos con el IMP.

AGRADECIMIENTOS

A los médicos patólogos Francisco Estrella y Johanna Latta del Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Quito N°1 de la Policía Nacional del Ecuador. A la Profesora Dra. Mariana Rojas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile por la digitalización de las imágenes.

GUERRERO-URBINA, C.; FORS, M.; VÁSQUEZ, B.; RODRÍGUEZ-GUERRERO, M. & FONSECA, G. M. Histological changes of lingual striated muscle tissue in Sprague Dawley rats (*Rattus norvegicus*) for estimating the postmortem interval. *Int. J. Morphol.*, 39(5):1502-1508, 2021.

SUMMARY: The postmortem interval (PMI) equals the time that has elapsed since a human being has died until his postmortem examination. After death, the body experiences modifications in its physical and chemical composition known as postmortem changes expressed by signs that can be analyzed for the calculation of the MPI. The aim of the study was to describe the histological changes present in rat lingual striated musculature in different PMIs. 10 two-month-old male Sprague Dawley rats were used. The animals were euthanized and left at room temperature (4-14 °C) to sample the tongue at different PMIs (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hours postmortem). The study was carried out considering the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The samples were fixed in 10% buffered formaldehyde and processed for inclusion in paraplast. 5 µm thick sections were made and stained with HE for analysis with light microscopy. Histological changes in the striated muscle cells of the tongue were associated with the different PMIs. At 6 hours postmortem, there were initial changes in nuclear morphology

and its pigmentation. At 12 and 24 hours postmortem, changes in muscle striae and an increase in the number of cases with nuclear alterations were observed. At 48 and 72 hours postmortem, cytoplasmic vacuoles, changes in myofiber coloration, and increased nuclear alterations were evident. At 92 and 120 hours postmortem, a decrease in muscle striae and cell nuclei was observed. The nuclei were pyknotic and pinpoint; there was loss of cell morphology and presence of smooth muscle. In conclusion, changes in the histology of rat lingual skeletal muscle make it possible to estimate MPI. This model could be applicable to forensic medicine.

KEYWORDS: postmortem interval, tongue muscle, histological changes, forensic medicine.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anders, S.; Kunz, M.; Gehl, A.; Sehner, S.; Raupach, T. & Beck-Bornholdt, H. P. Estimation of the time since death—reconsidering the re-establishment of rigor mortis. *Int. J. Legal Med.*, 127(1):127-30, 2013.
- Bardale, R. V.; Tumram, N. K.; Dixit, P. G. & Deshmukh, A. Y. Evaluation of histologic changes of the skin in postmortem period. *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 33(4):357-361, 2012.
- Bhuyan, L.; Behura, S. S.; Dash, K. C.; Mishra, P.; Mahapatra, N. & Panda, A. Characterization of histomorphological and microbiological changes in tooth pulp to assess post-mortem interval: an observational study. *Egypt J. Forensic Sci.*, 10:19, 2020.
- Cocariu, E. A.; Mageriu, V.; Staniceanu, F.; Bastian, A.; Socoliuc, C. & Zurac, S. Correlations between the autolytic changes and postmortem interval in refrigerated cadavers. *Rom. J. Intern. Med.*, 54(2):105-12, 2016.
- Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica. *Aspectos bioéticos de la experimentación animal*. Comité Asesor de Bioética, FONDECYT- CONICYT, Santiago, Chile, 2009. p. 140.
- Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research (ILAR), Division on Earth and Life Studies (DELS), National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory animals*. 8th edn. Washington (DC): The National Academies Press, 2011.
- Fais, P.; Mazzotti, M. C.; Teti, G.; Boscolo-Berto, R.; Pelotti, S. & Falconi, M. HIF 1a protein and mRNA expression as a new marker for post mortem interval estimation in human gingival tissue. *J. Anat.*, 232(6): 1031-7, 2018.
- Fortoul Van der Goes, Teresa I. *Histología y biología celular*. No. 611.018 611.018 F6H5 HISF4, 2010.
- Junqueira, L. and Carneiro, J. *Histología Básica Texto y Atlas*. 12. ed. Mexico, Panamericana, 2015.
- Kajee, Y.; Pelteret, J-P. V. & Reddy, B. D. The biomechanics of the human tongue. *Int. J. Numer. Method Biomed. Eng.*, 29(4):492-514, 2013.
- Kumar, V.; Abbas, A. & Aster, J. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 9. ed. Chicago, Elsevier, 2015.
- Madea, B. Methods for determining time of death. *Forensic Sci. Med. Pathol.*, 12(4):451-85, 2016.
- Mahalakshmi, V.; Gururaj, N.; Sathya, R.; Sabarinath, T. R.; Sivapathasundharam, B. & Kalaiselvan, S. Assessment of histological changes in antemortem gingival tissues fixed at various time intervals: A method of estimation of postmortem interval. *J. Forensic Dent. Sci.*, 8(2):114, 2016.
- Mohan, C. V.; Charan, G. B. K.; Denish, S. H.; Kokila, G.; Ashwini, H. & Rudramurthy, S. Postmortem Histological Changes of Oral Mucosal Tissue in Hypoxic and Histotoxic Death to Differentiate Cause and Manner of Death. *Forensic Res. Criminol. Int. J.*, 2(4):00062, 2016.
- Montefusco-Pereira, C. V. & Pinto, L. M. A. El humor vítreo como fluido biológico de importancia clínica en ciencias forenses. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.*, 50(1):27-35, 2016.
- Montuenga, B. L.; Esteban Ruiz, F. & Calvo, G. A. *Técnicas en histología y biología celular*. 2. ed. Barcelona, Masson, 2014.
- Pawlina, W. & Ross, M. *Histología texto y atlas correlación con biología molecular y celular*. 7. ed. Barcelona, Wolters Kluwer, 2015.
- Pradeep, G. L.; Uma, K. S.; Sharada, P. & Prakash, N. Histological assessment of cellular changes in gingival epithelium in ante-mortem and post-mortem specimens. *J. Forensic Dent. Sci.*, 1(2):61, 2009.
- Rajkumari, S.; Mensudar, R.; Naveen, N. & Thayumanavan, B. Histopathological assessment of autopsied salivary gland tissue to estimate the post mortem interval – A cross sectional observational study. *Indian J. Forensic. Med. Toxicol.*, 15(1):309-13, 2020a.
- Rajkumari, S.; Mensudar, R.; Naveen, N.; Thayumanavan, B. & Thammaiah, S. Estimation of postmortem death interval from autopsied tongue tissue: A cross-sectional study. *J. Oral. Maxillofac. Pathol.*, 24:568-71, 2020b.
- Vargas, A. E. *Medicina Legal*. 4. ed. México, Editorial Trillas, 2012.
- Villanueva E. *Medicina legal y toxicología*. 7. ed. Barcelona, Elsevier, 2019.
- Yadav, A.; Angadi, P. V.; Hallikerimath, S.; Kale, A. & Shetty, A. Applicability of histologic post-mortem changes of labial mucosa in estimation of time of death—a preliminary study. *Australian J. Forensic Sci.*, 44(4):343-52, 2012.
- Yadav, A. B.; Angadi, P. V.; Kale, A. D. & Yadav, S. K. Histological assessment of cellular changes in postmortem gingival specimens for estimation of time since death. *J. Forensic Odontostomatol.*, 33(1): 19-26, 2015.

Dirección para correspondencia:

Prof. Dr. Gabriel M. Fonseca

Centro de Investigación en Odontología Legal y Forense (CIO)

Facultad de Odontología

Universidad de La Frontera

Temuco -CHILE

E-mail: gabriel.fonseca@ufrontera.cl

Recibido : 24-05-2021

Aceptado: 26-06-2021